Institut für Ernährungswissenschaft
Justus-Liebig-Universität Gießen

Gastrointestinale Prozessierung und physiologische Bedeutung von Oligosacchariden der Humanmilch

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades am Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement
Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Meike Bettina Engfer
Dipl. oec. troph.
Gießen, im Mai 2000

Inhaltsübersicht

1 Einleitung

1.1 Fragestellung

1.2 Synthese und Zusammensetzung der Humanmilch

1.3 Regulation der Lactosesynthese

1.4 Synthese und Struktur der Oligosaccharide der Humanmilch

1.5 Oligosaccharide der Milch anderer Spezies

2 Eigene Untersuchungen

2.1 Werden Oligosaccharide der Humanmilch im Gastrointestinaltrakt hydrolytisch durch Enzyme des Pankreas und der Darmschleimhaut gespalten ?

2.2 Können Oligosaccharide der Humanmilch in intakter Form oder als Bruchstücke resorbiert werden und biologische Wirkungen im Intermediärstoffwechsel entfalten ?

2.3 Können Oligosaccharide der Humanmilch den Zellzyklus von intestinalen Epithelzellen modifizieren ?

2.4 Können freie oder peptidgebundene Oligosaccharide der Milch antiadhäsiv wirken ?

2.5 Zusammenfassung / Summary

3 Anhang

3.1 Material und Methoden

3.2 Abkürzungsverzeichnis

3.3 Abbildungsverzeichnis

3.4 Strukturen ausgewählter Oligosaccharide der Humanmilch

4 Literaturverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Fragestellung 1

1.2 Synthese und Zusammensetzung der Humanmilch 4

1.3 Regulation der Lactosesynthese 7

1.4 Synthese und Struktur der Oligosaccharide der Humanmilch 9

1.5 Oligosaccharide der Milch anderer Spezies 18

2 Eigene Untersuchungen

2.1 Werden Oligosaccharide der Humanmilch im Gastrointestinaltrakt hydrolytisch durch Enzyme des Pankreas und der Darmschleimhaut gespalten ? 19

2.1.1 Enzymausstattung des Säuglings zur Hydrolyse von Oligosacchariden der Humanmilch im Gastrointestinaltrakt 19

2.1.2 Studien zur gastrointestinalen Hydrolyse von Oligosacchariden der Humanmilch 23

2.1.3 In vitro Modell zur Hydrolyse von Oligosacchariden der Humanmilch 26

2.1.3.1 Kurzdarstellung der Methoden 26

2.1.3.2 Ergebnisse und Diskussion 27

2.1.4 In vivo Modell zur Hydrolyse von Oligosacchariden der Humanmilch 45

2.1.4.1 Kurzdarstellung des Modells 45

2.1.4.2 Ergebnisse und Diskussion 46

2.2 Können Oligosaccharide der Humanmilch in intakter Form oder als Bruchstücke resorbiert werden und biologische Wirkungen im Intermediärstoffwechsel entfalten ? 61

2.2.1 Studien über den Nachweis von Oligosacchariden der Humanmilch im Urin gestillter Säuglinge 61

2.2.2 In vitro Modell zur Resorption von Oligosacchariden der Humanmilch 64

2.2.2.1 Kurzdarstellung des Modells 64

2.2.2.2 Ergebnisse und Diskussion 65

2.2.3 In vivo Modell zur Resorption von Oligosacchariden der Humanmilch 92

2.2.3.1 Kurzdarstellung des Modells 92

2.2.3.2 Ergebnisse und Diskussion 93

2.3 Können Oligosaccharide der Humanmilch den Zellzyklus von intestinalen Epithelzellen modifizieren ? 106

2.3.1 Einsatz von Zellkulturen zur Untersuchung von Zellzyklusereignissen 106

2.3.2 In vitro Modelle zum Einfluß komplexer Oligosaccharide auf die Zellproliferation 110

2.3.2.1 Kurzdarstellung der Methoden 110

2.3.2.2 Ergebnisse und Diskussion 111

2.3.3 In vitro Modelle zum Einfluß komplexer Oligosaccharide auf die Zelldifferenzierung und Apoptose 118

2.3.3.1 Kurzdarstellung der Methoden 118

2.3.3.2 Ergebnisse und Diskussion 120

2.4 Können freie oder peptidgebundene Oligosaccharide der Milch anti-adhäsiv wirken ? 124

2.4.1 Potentielle anti-adhäsive Eigenschaften von Oligosacchariden der Humanmilch 124

2.4.2 Modellsysteme zur Untersuchung anti-adhäsiver Eigenschaften von freien und peptidgebundenen Oligosacchariden der Milch 128

2.5 Zusammenfassung 136

Summary 139

3 Anhang

3.1 Material und Methoden 142

3.2 Abkürzungsverzeichnis 171

3.3 Abbildungsverzeichnis 173

3.4 Strukturen ausgewählter Oligosaccharide der Humanmilch 184

4 Literaturverzeichnis 188

1 Einleitung

1.1 Fragestellung

Bereits vor über 100 Jahren erkannte man, daß in Humanmilch neben der Lactose ein weiteres Kohlenhydrat vorhanden sein muß. Diese lactoseähnliche Substanz wurde Gynolactose genannt [116]. Inzwischen ist bekannt, daß es sich dabei nicht um ein einzelnes Molekül, sondern um eine Vielzahl komplexer Oligosaccharide handelt. Kleinere Mengen dieser oder ähnlicher Oligosaccharide wurden auch in der Milch anderer Spezies nachgewiesen, doch nicht annähernd in dem Umfang wie in der Humanmilch. Seit der ersten Charakterisierung von Oligosacchariden der Humanmilch in den 50er Jahren kennt man mittlerweile die Struktur von mehr als 80 Verbindungen [159].

Die Frage nach der biologischen Bedeutung dieser ungewöhnlichen Oligosaccharide in der Humanmilch wird inzwischen von einer ganzen Reihe von Forschergruppen bearbeitet [u.a. 93] und findet auch in der Säuglingsnahrungsindustrie zunehmend Beachtung. Zwar sind die Muttermilchersatznahrungen schon sehr stark der Humanmilch angepaßt, doch sind deren komplexe Oligosaccharide bisher in den kommerziellen Produkten nicht enthalten. Ein Anpassung der Säuglingsnahrungen an die Oligosaccharidkomposition der Muttermilch scheint wünschenswert, da den komplexen Sacchariden vielfältige Schutzfunktionen zugeschrieben werden [124]. Die protektive Wirkung des Stillens auf die Infekthäufigkeit des Säuglings scheint erwiesen, wenngleich die betreffenden Studien die Bedingungen einer “double blind placebo controlled” Studie a priori nicht erfüllen können [u.a. 16]. Nachdem man lange Zeit den Proteinen der Muttermilch (bspw. IgA, Lactoferrin) diese protektiven Wirkungen zugeschrieben hatte, werden nun verstärkt die Oligosaccharide dafür verantwortlich gemacht [u.a. 123]. So wird ihre vermeintliche anti-adhäsive Eigenschaft als primärer Schutzfaktor gegenüber pathogenen Mikroorganismen im Intestinal-, Urogenital- und Ohrbereich (Otitis media) eingestuft [189].
Nicht nur die freien Oligosaccharide und Glykoproteine der Humanmilch erhalten zunehmend wissenschaftliches Interesse, sondern ganz allgemein scheint die “Glycoscience” ein expandierendes Forschungsgebiet zu sein, was die zahlreichen Veröffentlichungen in diesem Bereich während der letzten Jahre unterstreichen [90,

176, 101, 84]. Hier interessiert vor allem, welchen Einfluß die Glykosylierung eines Peptids oder Proteins auf dessen Konformation, Stabilität, Allergenität und biologische Funktion ausübt.

Bei der Produktentwicklung im Nahrungsmittelbereich konnten komplexe Oligosaccharide einen neuen Einsatzbereich finden. Vor allem die Homooligomere aus Fructose oder Galactose und verschiedene Heterooligomere finden als sogenannte Präbiotika Einsatz in einer Vielzahl von Produkten. Da sie unhydrolysiert in den menschlichen Dickdarm gelangen, wo sie von speziellen Bakterien verstoffwechselt werden, scheinen sie selektiv das Wachstum bestimmter Keime zu begünstigen [183]. Es wird angenommen, daß die Förderung dieser Bakterienarten für den menschlichen Organismus überaus positiv ist [59]. Wenngleich diese Oligosaccharide noch nicht breit in Säuglingsnahrungen eingesetzt werden, sind doch in einigen Ländern Formulanahrungen mit einem Zusatz von Oligosacchariden auf dem Markt. Primäres Ziel ist dabei, die Etablierung der Bifidoflora des Säuglings zu fördern, was bislang mit verschiedenen anderen Zusätzen, wie bspw. Lactoferrin, nicht erreicht werden konnte [27, 138].

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang der Mangel an Wissen über die Eigenschaften der Humanmilcholigosaccharide (HMO). So gibt es weder über deren Schicksal im Organismus des Säuglings noch über ihre Wirkungsweise eindeutige wissenschaftliche Ergebnisse. Nur eine Arbeitsgruppe hat über die Wiederfindungsrate von HMO in den Faeces und im Urin reifgeborener und gestillter Säuglinge Angaben veröffentlicht [31], die Annahmen über deren metabolisches Schicksal erlauben. Vielversprechende Untersuchungen mit Hilfe stabiler Isotope (^{13}C-Galactose) werden gegenwärtig vor allem von der Arbeitsgruppe von C. Kunz und S. Rudloff durchgeführt. Die systematische Analyse der biologischen Bedeutung der HMO wurde bisher insbesondere dadurch erschwert, daß die in der Humanmilch enthaltenen HMO nicht oder nur in unzureichender Menge für Studien zur Verfügung standen.
Aufgrund einer Zusammenarbeit zwischen der Milupa GmbH & Co. KG (Friedrichsdorf) und verschiedenen Universitätsinstituten standen uns im Rahmen eines BMBF-Projektes Oligosaccharide aus einem großen Pool von Humanmilch zur Verfügung. Aus dem Milchpool wurden verschiedene Subfraktionen der HMO gewonnen und diskrete Oligosaccharide als Reinsubstanzen abgetrennt, die es uns ermöglichten,

ausgewählte Studien zur biologischen Bedeutung und zum metabolischen Schicksal der HMO im größeren Umfang durchzuführen. Als Arbeitsschwerpunkt dieses Dissertationsvorhabens wurden folgende Fragestellungen formuliert:

Werden Oligosaccharide der Humanmilch im Gastrointestinaltrakt hydrolytisch durch Enzyme des Pankreas und der Darmschleimhaut gespalten ? (Abschnitt 2.1)

Können Oligosaccharide der Humanmilch in intakter Form oder als Bruchstücke resorbiert werden und biologische Wirkungen im Intermediärstoffwechsel entfalten ? (Abschnitt 2.2)

Können Oligosaccharide der Humanmilch den Zellzyklus von intestinalen Epithelzellen modifizieren ? (Abschnitt 2.3)

Können freie oder peptidgebundene Oligosaccharide der Milch anti-adhäsiv wirken ? (Abschnitt 2.4)

Aufgrund der Komplexität der Fragestellungen wird jeder Themenkomplex in einem eigenen Kapitel behandelt. Dazu wird zunächst in die jeweilige Fragestellung eingeführt. Es folgt eine Kurzdarstellung der eingesetzten Methoden, die in ausführlicher Beschreibung in den Anhang integriert sind. Ergebnisse und Diskussion werden in jedem Kapitel aus Gründen der Übersichtlichkeit zusammengefaßt. Zunächst werden jedoch Synthese, Strukturen und mögliche biologische Wirkungen der HMO vorgestellt.

1.2 Synthese und Zusammensetzung der Humanmilch

Mit Beginn einer Schwangerschaft kommt es unter dem Einfluß von mehreren Hormonen zu einer Volumenvergrößerung der Brust. Diese enthält zahlreiche Segmente, die aus je einem sich baumartig verzweigenden Milchgangsystem und den dazugehörigen Drüsenlappen und -läppchen bestehen. Progesteron stimuliert die Ausbildung und Proliferation der Milchalveolen, unterdrückt aber gleichzeitig die Milchproduktion. Nach der Geburt und dem Entzug der die Sekretion hemmenden plazentaren und lutealen Hormone kommt es zur Milchbildung, die bis zur Abstillphase andauert [64].
In jeder Zelle der Milchdrüse werden Milchinhaltsstoffe entweder synthetisiert oder aus dem Blut filtriert und anschließend in das Alveolenlumen abgegeben. Beispielsweise werden die für die Proteinsynthese benötigten Aminosäuren aus dem Blut absorbiert. Entstandene Proteine verlassen in Vesikeln verpackt den Golgi-Apparat und werden an der apikalen Plasmamembran ins Lumen abgegeben. Die Milchabgabe wird durch Oxytocin gefördert, das die Kontraktion der Drüsenepithelien und somit die Entleerung der Drüsenalveolen anregt. Während die Initiation der Milchsynthese (Galactopoese) unabhängig von dem Anlegen des Säuglings erfolgt, erfordert die weitere Milchbildung neurohormonelle Reize in Form des Saugens des Säuglings und der Leerung der Brust, so daß die Prolactin- und Oxytocinspiegel aufrecht erhalten werden können [64].

Das Milchvolumen steigt von wenigen Millilitern in den ersten 24 Stunden nach der Geburt entsprechend dem Bedarf des Säuglings kontinuierlich an, bis es bereits nach wenigen Tagen bei ca. 800 ml pro Tag ein Plateau erreicht [148, 126, 2, 120]. Bei Zwillingsgeburten werden entsprechend bis zu zwei Liter am Tag produziert. Beim Stillvorgang trinkt der Säugling zuerst die Milch, die nach der letzten Mahlzeit bereits aus den Alveolen durch die Läppchen und Lappen in die Milchgänge gelangt ist (ca. 1/3 der Gesamtmenge). Durch die Oxytocinfreisetzung ziehen sich die gefüllten Alveolen während dem Stillen zusammen und pressen die energiereichere, sogenannte Hintermilch in die Milchgänge.

Die Zusammensetzung der Muttermilch ändert sich deutlich im Laktationsverlauf. Man unterscheidet das anfängliche Colostrum, die etwa zwischen dem 3. und 13.

Tag gebildete transistorische Milch und die reife Muttermilch. Das gelbliche Colostrum enthält einen sehr hohen Gehalt an Proteinen mit bedeutenden Mengen an Immunglobulinen. Das Verhältnis von Caseinen zu Molkenproteinen ist hier mit etwa 20 zu 80 am niedrigsten [102]. Zu den wichtigsten Molkenproteinen zählen α-Lactalbumin, sekretorisches IgA, Lactoferrin und Lysozym. Bereits über die Plazenta gelangen IgG Antikörper zum Fötus und überbrücken so die Zeit, bis der Säugling selbst in der Lage ist, IgG zu produzieren. Während der Schwangerschaft wandern immunkompetente Zellen aus dem mütterlichen Darm und Tracheobronchialsystem in die Brustdrüse, um dort zur Antikörperproduktion beizutragen [61, 72]. So kann über die Milch ein passiver Schutz gegen die Erreger vermittelt werden, mit denen sich der mütterliche Organismus auseinandergesetzt hat. IgA wird dem Säugling in hohen Mengen über die Colostralmilch zugeführt. Es liegt als dimeres Molekül vor, dessen Monomere von einer J-Kette (joining) zusammengehalten werden. Diese Bindung wird durch die sekretorische Komponente, einem Glykoprotein, stabilisiert. So sind die sekretorischen IgA Moleküle gegen den Angriff von Proteasen im Darmlumen des Kindes geschützt und fangen u.a. Bakterien oder Viren ab, ohne das Komplementsystem zu aktivieren [73].

Neben den Antikörpern spielen eine Reihe anderer Inhaltsstoffe der Colostralmilch eine bedeutende Rolle für den Säugling. Das eisenbindende Glykoprotein Lactoferrin bspw. hemmt das Wachstum eisenabhängiger Mikroorganismen [103]. Lysozym lysiert gramnegative und zum Teil auch grampositive Bakterien durch Spaltung der Mukopolysaccharide ihrer Zellwand [68]. Außer humoralen Faktoren besitzt das Colostrum auch große Mengen an weißen Blutzellen, vorwiegend Makrophagen sowie Lymphozyten, Granulozyten und Zelltrümmer, deren Enzyme an der Milchfettverdauung beteiligt sind [61, 155].

Die gelbliche Farbe des Colostrums ist auf den hohen Gehalt an Carotinen zurückzuführen [64]. Es hat offenbar eine leicht laxierende Wirkung und beschleunigt die Ausscheidung des Mekoniums während der ersten Tage [149]. Der Energie- und Fettgehalt der Milch steigt im Laufe der Laktation an. Auch die Lactosekonzentration des Colostrums ist mit ca. 56 g/l deutlich geringer als in der reifen Milch [120, 180]. Dagegen ist während der Colostralphase die höchste Gesamtkonzentration an Oligosacchariden vorhanden: Bei einer Studie an 46 Frauen wurden durchschnittlich 20,9 g/l nachgewiesen [32].

Ca. 48 Stunden nach der Geburt erfolgt die Bildung und das Einschießen der sogenannten transistorischen Milch. In diesem Zeitraum schließen sich die Zellzwischenräume der Alveolen, was mit dem Anstieg des Lactosegehalts der Milch einhergeht [2, 120]. Obwohl die Proteinkonzentration der Milch signifikant abnimmt, wird durch das erhöhte Milchvolumen eine adäquate Proteinaufnahme gewährleistet. Die Zusammensetzung der Milch bleibt nach der zweiten Laktationswoche relativ konstant. Man spricht nun von reifer Milch, obgleich kleine Konzentrationsänderungen im weiteren Laktationsverlauf auftreten.

Im Vergleich zu anderen Spezies weist die reife Humanmilch einen geringen Fettgehalt auf. Der ebenfalls niedrige Proteingehalt der Humanmilch kommt der beschränkten Ausscheidungskapazität der Nieren des Säuglings für Aminosäurenstickstoff zugute [182]. Das Verhältnis von Caseinen zu Molkenproteinen beträgt in der reifen Humanmilch etwa 40 zu 60. In der Kuhmilch dominieren dagegen eindeutig die Caseine, die nicht so feinflockig gerinnen und langsamer den Magen verlassen als Molkenproteine [152]. Während des Stillvorgangs bleiben die Proteinkonzentrationen konstant – dagegen verändert sich der Fettgehalt: hier wird die fettärmere Vormilch von der gehaltvolleren Nachmilch unterschieden. Auch die mütterliche Nahrung hat einen Einfluß auf die Konzentration der Fettbestandteile [71]. Das Milchfett deckt über 40 % des kindlichen Energiebedarfs [152]. Die gute Resorptionsrate von Muttermilchfett beruht zum einen auf der mitgelieferten gallensalzabhängigen Lipase, welche für 30 bis 40 % der Fettverdauung verantwortlich ist, zum anderen auf der charakteristischen Struktur der Triglyzeride, bei denen Palmitinsäure in der β-Position nicht enzymatisch abgespalten, sondern als Monoglyzerid resorbiert wird [182, 55]. Auch der Gehalt an Mineralstoffen und Spurenelementen ist mit wenigen Ausnahmen in der Humanmilch deutlich geringer als in der Kuhmilch und gewährleistet hohe Wasserreserven im Fall von großen Flüssigkeitsverlusten, wie z.B. bei starken Durchfallerkrankungen [152]. Der pH-Wert liegt bei etwa 6,9 und ist dem der Kuhmilch sehr ähnlich [2].
In der nachfolgenden Tabelle sind die Gehalte wichtiger Inhaltsstoffe des Humancolostrums und der reifen Humanmilch aufgelistet. Zum Vergleich wurden die entsprechenden Angaben für Kuhmilch ebenfalls aufgenommen.

Tabelle 1: Vergleich verschiedener Inhaltstoffe von Humancolostrum, reifer Humanmilch und Kuhmilch (MW = Mittelwert, Min = Minimum, Max = Maximum; Quellen: [2, 55, 64, 71, 83, 99, 120, 126, 148, 182])

	Humancolostrum MW (Min - Max)	**reife Humanmilch** MW (Min - Max)	**Kuhmilch** MW (Min - Max)
Volumen [ml/d]	120 (35 - 350)	800 (610 - 1080)	ca. 19.000
Lactose [g/l]	51 (34 - 57)	69 (59 - 74)	47 (45 - 49)
Oligosaccharide [g/l]	18 (13 - 25)	11 (6 - 16)	0,1
Proteine, gesamt [g/l]	30 (15 - 65)	10,5 (9 - 12)	33
α-Lactalbumin [g/l]	7 (2,5 - 11)	2,8 (2,3 - 3,6)	1,5 (1,0 - 2,4)
IgA [g/l]	7 (6,2 - 8,6)	1,2 (1,0 - 1,6)	0,03
Fett, gesamt [g/l]	34 (20 - 55)	38 (34 - 45)	36 (35 - 38)
Mineralstoffe, gesamt [g/l]	2,0	1,6 (1,2 - 2,2)	6,1 (4,6 - 7,6)
Natrium [g/l]	0,57	0,16	0,62 (0,47 - 0,77)
Kalium [g/l]	0,75	0,52	1,5

1.3 Regulation der Lactosesynthese

Die bereits vor der Geburt gebildete Humanmilch hat eine deutlich geringere Lactosekonzentration (80 mmol/l = 27 g/l) als reife Milch [2]. Dies ist zum einen auf die erhöhte Durchlässigkeit der sogenannten “tight junctions“ zwischen den Alveolarzellen der laktierenden Brustdrüse zurückzuführen und zum anderen auf die geringen Konzentrationen an α-Lactalbumin. Dieses Molkenprotein, das nur in der laktierenden Brustdrüse vorkommt, bildet die Untereinheit B der Lactosesynthase und ist durch den noch relativ hohen Progesteronspiegel vor der Geburt in seiner Expression gehemmt. Dies erklärt auch den niedrigen Lactosegehalt der Milch bei Frühgeburten. Die Hormone Insulin, Cortisol und Prolactin bewirken während der Schwangerschaft die Umwandlung der Zellen der Milchdrüse in sekretorische Zellen, welche die Untereinheit A (Galactosyltransferase) der Lactosesynthase produzieren. In Abwesenheit der Untereinheit B - also bis gegen Ende der Schwangerschaft - wird im

Golgi-Apparat der laktierenden Brustdrüse aktivierte UDP-Galactose nicht auf Glucose, sondern auf das stickstoffhaltige Monosaccharid N-Acetylglucosamin übertragen. Statt Lactose entsteht somit N-Acetyllactosamin [91, 155]. Da N-Acetyllactosamin auch Bestandteil der Milcholigosaccharide ist, könnte die Lactosesynthese in gewisser Hinsicht in Konkurrenz zur Oligosaccharidsynthese stehen [112]. Die bekannte reziproke Entwicklung dieser beiden Milchbestandteile im Verlauf der Laktation (d.h. Anstieg der Lactosekonzentration, Abnahme der Konzentration an HMO) würde eine solche Annahme unterstützen. Dagegen spricht jedoch, daß Lactose auch als Bestandteil aller Oligosaccharide benötigt wird und daß die Bestandteile des N-Acetyllactosamins β 1-4 glykosidisch gebunden sind, während bei den Milcholigosacchariden auch β 1-3 glykosidische Verknüpfungen zwischen Galactose und N-Acetylglucosamin vorkommen. Daher bleibt es unklar, ob vor der Geburt synthetisiertes N-Acetyllactosamin als Grundbaustein der HMO dienen kann oder lediglich Lactose für die Synthese der HMO verwendet wird und ob nach der Geburt Lactose und N-Acetyllactosamin parallel synthetisiert werden (siehe 1.4).
Reaktionsablauf 1 zeigt die Reaktion, die in Abwesenheit des α-Lactalbumins zur Bildung des N-Acetyllactosamins führt. N-Acetylglucosamin dient dabei als Akzeptor der aktivierten Galactose.

Reaktionsablauf 1:

UDP-Galactose + N-Acetylglucosamin $\xrightarrow{\text{Lactosesynthase}}$ N-Acetyllactosamin + UDP

Das gebildete N-Acetyllactosamin kann für die Synthese von Glykoproteinen eingesetzt werden, wobei eine Lactosamintransferase zur Übertragung auf die entstehende Oligosaccharidkette benötigt wird.

Während der Laktationsphase wird dagegen Glucose als Akzeptor bevorzugt:

Reaktionsablauf 2:

UDP-Galactose + Glucose $\xrightarrow{\text{Lactosesynthase}}$ Lactose + UDP

Auch für die Lactosesynthese kann Galactose nur im aktivierten Zustand als UDP-Galactose eingesetzt werden. Die benötigte Galactose stammt dabei entweder aus

der Nahrung oder wird aus Glucose gebildet. Ob und wieviel der aufgenommenen Galactose zur Synthese der Lactose und HMO beiträgt, ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Die Lactosesynthase gehört zu der Familie der β 1-4 Galactosyltransferasen, die in der Golgi-Membran vieler Gewebe vorkommen. Die Lactosesynthese findet dagegen ausschließlich in der Golgi-Membran der laktierenden Brustdrüse statt, so daß Lactose auch nur in der Milch vorkommt.

Für alle Säugetiere stellt Lactose während der Laktationszeit das mengenmäßig dominierende Kohlenhydrat dar. Als freies Disaccharid sind in der reifen menschlichen Milch ca. 68 g/l vorhanden, was einer täglichen Aufnahme durch den Säugling von etwa 50 g entspricht [32, 2]. Lactose aus der Muttermilch liegt als Gemisch aus α- und β-Lactose in einem Verhältnis von ca. 40 zu 60 vor [55]. In der Literatur wird von einer verzögerten Mutarotation der Lactose berichtet, was angeblich zu einer erschwerten Resorption führen soll [152, 64]. Tatsache ist, daß eine nicht vernachlässigbare Menge der Lactose unverändert in die tieferen Darmabschnitte des Säuglings gelangt [100, 14, 46]. Diese nicht resorbierte Lactose könnte möglicherweise günstig auf die Bildung bzw. Erhaltung der Bifidusflora wirken, da Milchsäurebakterien Lactose hervorragend zu Lactat verstoffwechseln können.
Reine Kuhmilch hat zwar mit ca. 47 g/l eine deutlich niedrigere Lactosekonzentration, doch in den adaptierten Formulanahrungen ist dies bereits durch Lactosezusatz ausgeglichen. In den Folgenahrungen wird Lactose meist durch Saccharose und Stärke ersetzt.

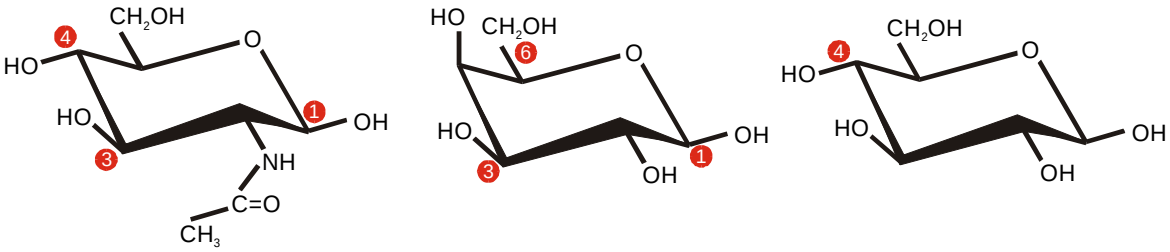
1.4 Synthese und Struktur der Oligosaccharide der Humanmilch

Wie bereits erwähnt, wurde schon im letzten Jahrhundert postuliert, daß in der Humanmilch neben der Lactose noch weitere Kohlenhydrate vorhanden sein müssen [in 116]. M. Polonowski und A. Lespagnol benannten 1933 die Kohlen-hydratfraktionen - entsprechend ihrer Löslichkeit in Methanol und in Abgrenzung zur Lactose - als Gynolactose- und Allolactosefraktion. Parallel dazu begannen experimentelle Untersuchungen zur Bifidusflora des Säuglings und die Suche nach dem “Bifidusfaktor”, der für die protektive Wirkung des Stillens verantwortlich gemacht wurde [66].

Ende der 50er Jahre trafen sich beide Forschungsgebiete, da nun stickstoffhaltige Oligosaccharide in der Muttermilch nachgewiesen wurden und als Voraussetzung für die Ausbildung der typischen Bakterienflora des gestillten Säuglings angesehen wurden [65]. Auch wenn Milchsäurebakterien im Stuhl formulaernährter Säuglinge nachweisbar sind, entwickeln gestillte Säuglinge häufiger eine Bifidusflora [135, 139, 108]. Bifidobakterien produzieren vorwiegend Acetat, was eine Erniedrigung des pH-Wertes im Colon bewirkt [59]. Das Wachstum anderer, unerwünschter Bakterien kann im Dickdarm des Säuglings hierdurch unterdrückt werden [183]. Bislang konnte keine auf Kuhmilch basierende Formulanahrung entwickelt werden, die mit der Muttermilch vergleichbare bifidogene Wirksamkeit besitzt [27, 47, 56, 97, 135,139].

Die Menge an Oligosacchariden ist in der Humanmilch deutlich größer als in Kuhmilch. Da aufgrund der Strukturspezifität der Oligosaccharide keine Anreicherung aus Kuhmilch möglich ist, sind die Gehalte in den auf boviner Milch basierenden Formulanahrungen entsprechend gering. In der Literatur findet man stark variierende Angaben über die Gehalte an Oligosacchariden in der Humanmilch (HMO). Dies liegt einerseits an der bereits erwähnten Konzentrationsabnahme im Laufe der Laktationsperiode [32, 180, 21]. Zum anderen gibt es auch große individuelle Unterschiede - und dies nicht nur in quantitativer Hinsicht: Da die Vielfalt der HMO abhängig von der genetischen Ausstattung der Mutter an Glycosyltransferasen ist, gibt es ebenso deutliche qualitative Unterschiede in der Zusammensetzung der HMO-Fraktion [164, 179] (siehe unten).

Die Synthese der HMO ist nicht im Detail geklärt, aber wahrscheinlich werden auch hier mit Hilfe von Transferasen aktivierte Monosaccharide an das entstehende Oligosaccharid addiert. Das Rückgrat, die sogenannte “core structure“, sämtlicher HMO ist lediglich aus drei verschiedenen Molekülen aufgebaut: Glucose, Galactose und N-Acetylglucosamin (**Abb. 1**).



N-Acetyl-β-D-Glucosamin (GlcNAc)

β-D-Galactose (Gal)

β-D-Glucose (Glc)

Abb.1 Darstellung von N-Acetyl-β-D-Glucosamin, β-D-Galactose und β-D-Glucose in der Sesselform (gekennzeichnet sind die C-Atome, die zur Verknüpfung des Grundge-rüstes der HMO beitragen)

Glucose kommt lediglich am reduzierenden Ende in den HMO vor. Zusammen mit Galactose bildet es als Lactose die Grundeinheit fast aller HMO, wobei abwechselnd N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und Galactose an diese Grundeinheit gebunden werden. In geringen Mengen kommen Galactose-Galactose Verbindungen in HMO vor bzw. bildet Galactose oder GlcNAc das reduzierende Ende [45, 86, 24]. Hierbei sei nochmals darauf hingewiesen, daß weder Mannose noch N-Acetylgalactosamin, welche häufig in Oligosaccharidketten vorkommen, Bestandteile der HMO sind. Zur Übertragung der Monosaccharide auf die wachsende HMO-Kette sind die aktivierten Formen, UDP-Galactose und UDP-GlcNAc, notwendig. Es ist kein HMO bekannt, welches eine ungeradzahlige Anzahl an Grundstruktureinheiten aufweist. Dies würde eine Übertragung von Disaccharideinheiten (N-Acetyllactosamineinheiten) bei der Synthese der HMO vermuten lassen. Für eine Kettenverlängerung durch Monosaccharideinheiten spricht jedoch, daß in Humanmilch eine hohe Aktivität des zur Übertragung von UDP-GlcNAc auf Galactose notwendigen Enzyms β 1-3 N-Acetylglucosaminyltransferase nachgewiesen werden konnte [81]. Zumindest in boviner Milch aktiviert diese N-Acetylglucosaminyltransferase wiederum eine Galactosyltransferase. Übertragen auf HMO würde dies bedeuten, daß ungeradzahlige Grundstrukturen mit endständiger N-Acetylglucosamineinheit lediglich als Übergangsstadium existierten und somit kaum nachweisbar wären [117].

Bei den meisten HMO mit geringerer Molmasse sind Galactose und GlcNAc β 1-3 glykosidisch verknüpft. Lediglich die Vertreter der sogenannten Typ-2 oder Neo-Reihe weisen an der äußeren N-Acetyllactosamineinheit des linearen Grundgerüstes

eine β 1-4 glykosidische Verbindung auf. **Abbildung 2** zeigt je einen Vertreter der Typ-1 und der Typ-2 Reihe.

Abb. 2 Schematische Darstellung eines Vertreters der Typ-1 Reihe (Lacto-N-tetraose, LNT) und eines Vertreters der Typ-2 oder Neo-Reihe (Lacto-N-neotetraose, LNnT)

Bei linearen HMO wird GlcNAc nach Aktivierung immer β 1-3 glykosidisch an die Galactoseeinheiten des Grundgerüstes gebunden. Treten Verzweigungen auf, so findet dies durch ein zweites GlcNAc-Molekül statt, welches an die Galactose über das C6-Atom gebunden wird. In der folgenden Abbildung ist eine Hexaose in linearer und in verzweigter Form zu sehen.

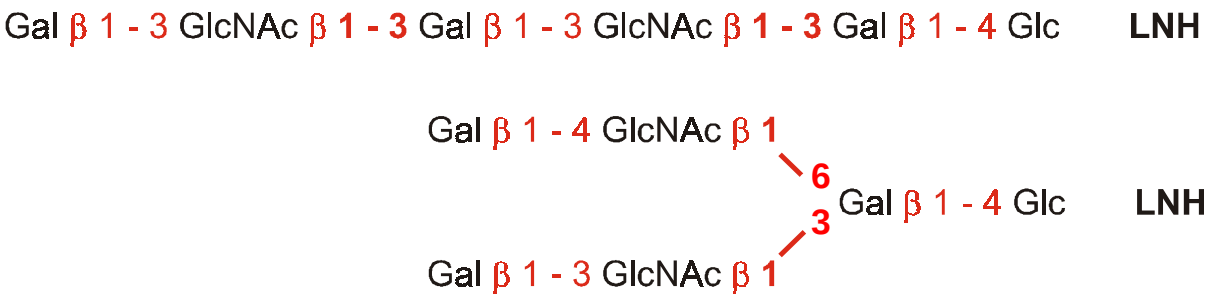


Abb. 3 Schematische Darstellung von Lacto-N-hexaose (LNH) in linearer (oben) und in verzweigter Form (unten)

Welche Enzyme für die Verknüpfungen und Verzweigungen in den HMO verantwortlich sind, ist weitgehend unbekannt. Die Aktivität einer N-Acetyllactosamin β 1-6 N-Acetylglucosaminyltransferase (EC 2.4.1.150) wird bisher nur im Zusammenhang mit der Synthese von Glykoproteinen beschrieben. Dabei stellt sich die grundsätzliche Frage, ob Transferasen, die an der Glykoproteinsynthese beteiligt sind, auch für die HMO-Synthese verantwortlich sein können. Dies konnte bislang noch nicht befriedigend geklärt werden [49].

An das erweiterte Grundgerüst der HMO, gebildet aus der Lactose am reduzierenden Ende und den N-Acetyllactosamineinheiten, können zwei weitere Moleküle gebunden werden: L-Fucose und N-Acetylneuraminsäure. Beide werden α-glykosidisch angeknüpft und können selbst keine weiteren Bindungen eingehen. Zur Übertragung im aktivierten Zustand wird bei Fucose GDP und bei NANA CMP benötigt. Fucose ist eine 6-Desoxyhexose ($C_6H_{12}O_5$) und wird aus Mannose gebildet. In den HMO liegt sie ausschließlich in der L-Konfiguration vor und ist auch Bestandteil zahlreicher Glykoproteine (**Abb. 4**).

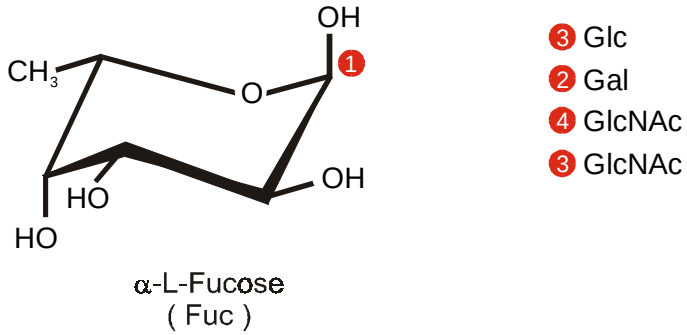


Abb. 4 Darstellung von α-L-Fucose in der Sesselform (gekennzeichnet sind die C-Atome, die zur Verknüpfung zwischen der Fucose und dem Grundgerüst der HMO beitragen)

Nach der Aktivierung durch GDP kann L-Fucose auf vier verschiedene Arten an das Grundgerüst der HMO gebunden werden: an Glucose über α 1-3, an Galactose über α 1-2 und an GlcNAc über α 1-4 (bei Typ-1) oder α 1-3 (bei Typ-2) [87, 165]. Für die Verknüpfungen werden entsprechende Fucosyltransferasen (EC 2.4.1.69, 65 und 152) benötigt, die auch in der Milch nachgewiesen werden konnten [147, 184]. Dabei ist das Vorkommen der α 1-2 Fucosyltransferase Kennzeichen des sogenannten Sekretortyps (siehe unten).

Die Anknüpfung von N-Acetylneuraminsäure (NANA) an das Grundgerüst ist charakteristisch für die sogenannten sauren HMO. NANA kann aus Fructose-6-phosphat und Glutamin in mehreren Schritten gebildet werden. Zunächst wird dabei die Aminogruppe am C2-Atom des entstandenen Glucosamins acetyliert. Das durch nachfolgende Reaktion mit Phosphoenolpyruvat entstandene N-Acetylneuraminat-9-phosphat wird zu CMP-N-Acetylneuraminat aktiviert und kann an Oligosaccharide und Glykoproteine gebunden werden. Derivate der Neuraminsäure werden allgemein

als Sialinsäuren bezeichnet. Bislang sind mehr als 36 natürlich vorkommende N- bzw. O-substituierte Sialinsäuren bekannt [112]. In den HMO kommt ausschließlich die am C5-Atom N-acetylierte Form der Neuraminsäure vor, deren C2-Atom O-glykosidisch an verschiedenen Positionen des Grundgerüstes der HMO gebunden sein kann (**Abb. 5**).

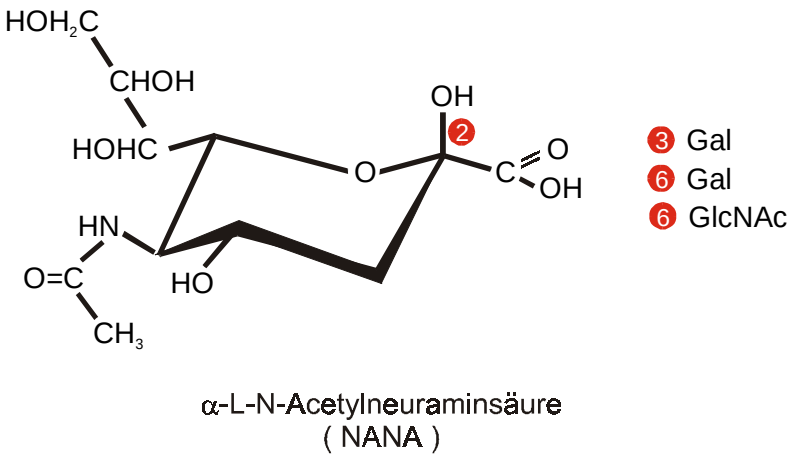


Abb. 5 Darstellung von α-L-N-Acetylneuraminsäure (NANA) in der Sesselform (gekennzeichnet sind die C-Atome, die zur Verknüpfung zwischen NANA und dem Grundgerüst der HMO beitragen)

Der Name leitet sich von “saliva“ ab, da Sialinsäuren erstmals im Speichel entdeckt wurden. Sialinsäuren findet man auch in Mucinen und Gangliosiden. Die Arbeitsgruppe um P. McVeagh und J. Brand Miller stellt die Vermutung auf, daß mit der Nahrung - sprich Muttermilch - zugeführte Sialinsäuren die Gehirnentwicklung von Säuglingen fördern [21]. In der Humanmilch ist der Anteil saurer HMO zu Beginn der Laktationsphase besonders hoch. Hierdurch können ca. 1.100 mg an HMO gebundene NANA pro Tag vom Säugling aufgenommen werden, während dieser Anteil in reifer Milch auf ca. 135 mg sinkt [22]. Einige Autoren sehen Parallelen zwischen den sauren HMO und den langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Humanmilch, welche die Ausbildung des Sehvermögens in den ersten Lebensmonaten fördern sollen und bereits einigen Formulanahrungen zugesetzt werden [112, 150]. In der reifen Humanmilch tragen etwa zehn Prozent der HMO mindestens ein Molekül NANA und liegen somit in negativ geladener Form vor [166]. Neben den oligosaccharidgebundenen Sialinsäuren gibt es einen nicht zu vernachlässigenden Anteil, der an Molkenprotein gebunden ist. So kann bei Formulanahrung auf Kuhmilchbasis

durch Annäherung des Casein-Molkenproteinverhältnisses an das der Frauenmilch bereits der Gehalt der Sialinsäuren auf ca. 150 mg pro Liter erhöht werden [22, 150]. Drei verschiedene Verknüpfungsformen von NANA kennt man bislang in den HMO: an Galactose über α 2-3 (immer am core Ende), an Galactose über α 2-6 sowie an GlcNAc über α 2-6 glykosidische Bindungen [155]. Für die ersten zwei Bindungsformen könnten die β-Galactosid α 2-3 bzw. α 2-6-Sialyltransferasen (EC 2.4.99.4 bzw. 1) verantwortlich sein.

Trotz der gleichmäßigen Grundstruktur und obwohl lediglich drei Moleküle für das Grundgerüst und zwei weitere Moleküle für die Seitenketten zur Verfügung stehen, kann aufgrund der zahlreichen Verknüpfungsmöglichkeiten - im Vergleich zu Nucleinsäuren oder Aminosäuren - eine enorme Vielfalt unterschiedlichster HMO entstehen. Strukturell charakterisiert sind bislang etwa 80 HMO mit Molekulargewichten von 488 bis ca. 2.000 Da. Zahlreiche weitere werden jedoch vermutet und mittels MALDI-MS (Matrix-assisted laser desorption ionisation-mass spectrometry) konnten bereits neutrale HMO mit Molekulargewichten bis zu 8.000 Da nachgewiesen werden, die dem Grundgerüst genau zuzuordnen waren [159, 24, 53]. Auch wenn diese größeren HMO nur in kleinsten Mengen vorhanden sind, so können sie doch von Bedeutung für den Säugling sein.
Gegenwärtig gibt es noch keine allgemein gültige Nomenklatur für die einzelnen HMO. So wird teilweise auf die Anzahl der Monosaccharide bezug genommen oder die Oligosaccharide nach ihrem Elutionsverhalten eingeteilt, teilweise haben sich auch Trivialnamen etabliert. Besonders letztere bereiten zuweilen Probleme. So steht zum Beispiel hinter dem Namen Lacto-N-fucopentaose (Abkürzung LNFP) ein Pentasaccharid mit Lactose und Lactosamin als Grundstrukturen und einer an die endständige Galactose oder an GlcNAc gebundenen Fucose. Das Pendant mit einer gebundenen NANA anstelle der Fucose wird dagegen als Lactosialyltetraose (LST) bezeichnet und nicht als Lacto-N-sialylpentaose. Eine Nomenklatur mit entsprechender Abkürzungsmöglichkeit, bei der man zwar nicht die Art und Position der Bindungen, jedoch die Anzahl der Einheiten ablesen kann, wurde von A. Pfenninger vorgeschlagen [in 10]. Diese Schreibweise ist besonders bei hochmolekularen Oligosacchariden nützlich. Die erste Position in der Abkürzung gibt die Lactoseeinheit an, die zweite die Anzahl der N-Acetyllactosamineinheiten, die dritte die der Fucosemoleküle und die vierte die der geladenen NANA-Reste. L1 / 1-0 steht somit für ein Grundge-

rüst aus Lactose und einer N-Acetyllactosamineinheit mit einer gebundenen Fucose ohne NANA. Dies entspricht einem der oben erwähnten LNFP-Isomere. Eine Tabelle der HMO, mit denen in der vorliegenden Arbeit vorwiegend gearbeitet wurde, ist im Anhang auf den Seiten 184-187 zu finden. Darin werden die am häufigsten gebrauchten Namen, Abkürzungen und die Strukturen in vereinfachter Form gezeigt. Nachfolgend werden die Abkürzungen auch im Text verwendet.

Wie bereits erwähnt, gibt es erhebliche quantitative und qualitative Unterschiede in der Zusammensetzung der HMO. Auch wenn die Gesamtkonzentration an HMO tendentiell im Laktationsverlauf abnimmt, unterliegen die Konzentrationen einzelner Oligosaccharide individuellen Schwankungen – dies gilt auch für die HMO bei Frühgeburten [119]. Nicht alle Oligosaccharide kommen gleichermaßen in jeder Frauenmilch vor, da ihr Vorhandensein an bestimmte Fucosyltransferasen gebunden ist. So weisen ungefähr 25 % der Frauen keine α 1-2 gebundenen Fucosen in den HMO ihrer Milch auf [164, 93]. Dies ist jedoch nicht nur auf die Milch beschränkt, sondern auf alle Körpersekrete, woraus sich der Name Nichtsekreter (non-secretor) ableitet [63]. Anhand der Ausstattung einer Humanmilch mit Fucopentaosen kann man recht schnell das zur Verfügung stehende Muster an Fucosyltransferasen erkennen: Die Mehrheit der Frauen besitzt alle vier Isomere, also LNFP I, II, III und V. Nichtsekreterinnen fehlt LNFP I, somit verfügen sie nicht über α 1-2 Fucosyltransferasen. Sogenannte Lewis negative Frauen weisen kein LNFP II in ihren Sekreten auf und besitzen daher keine α 1-4 Fucosyltransferasen; α 1-3 fucosylierte Bindungen wie bspw. in LNFP III finden sich dagegen in jeder Frauenmilch. Aufgrund ihrer Fucosylierungen weisen HMO große Ähnlichkeit zu den AB0(H) und Lewis (Le) Blutgruppenantigenen auf. Das erwähnte LNFP I besitzt bspw. Blutgruppen 0(H) Aktivität, LNFP II besitzt Le^a Aktivität und LNFP III besitzt Le^x Aktivität. S. Thurl et al. untersuchten Milchproben von ca. 50 Frauen und konnten sie entsprechend ihrem Oligosaccharidmuster vier Gruppen zuordnen [164]. Der größte Teil der Frauen verfügte über sämtliche der 11 untersuchten fucosylierten HMO in ihrer Milch und konnte der Lewis Blutgruppe Le^{a-b+} zugeordnet werden. Sehr interessant wären in diesem Zusammenhang weitergehende Studien, bei denen Milchproben eines großen Kollektivs an Müttern, unter Einbeziehung verschiedener Nationalitäten, über einen längeren Zeitraum hinsichtlich Blutgruppenzugehörigkeit und Oligosaccharidmuster untersucht werden - einschließlich einer genauen Quantifizierung der HMO im Laktationsverlauf.

Erste Ansätze hierzu bietet eine gerade veröffentlichte Studie, bei der das Oligosaccharidmuster von Milchproben ermittelt wurde, welche in 10 verschiedenen Ländern gesammelt worden waren [50]. Der Grund für mangelnde Untersuchungen der HMO an größeren Kollektiven liegt u.a. daran, daß die Isolierung und Quantifizierung der HMO sehr aufwendig ist. HMO sind entsprechend bereits in Milligrammengen sehr teuer oder kommerziell gar nicht erhältlich.

Der Gesamtkonzentration an HMO und die Veränderungen im Verlauf der Laktation (z.B. während des Stillens, innerhalb eines Tages, während der ersten Laktationswoche bis hin zum 4. Laktationsmonat) wurden bereits von mehreren Arbeitsgruppen dargestellt [u.a. 165, 180, 178, 32]. Genaue quantitative Bestimmungen einzelner Oligosaccharide der reifen Frauenmilch sind von den Arbeitsgruppen um C. Kunz [92], S. Thurl [166], P. Chaturvedi [26], G. Coppa [34] und R. Erney [50] bekannt. Beispielhaft seien die Ergebnisse von S. Thurl et al. genannt, bei der die quantitative Verteilung der Oligosaccharide in der Milch einer Frau mit der am häufigsten vorkommenden Ausstattung an Transferasen (Le^{a-b+}) detailliert analysiert wurde [166]. Von den 14 untersuchten neutralen HMO dominierte das Trisaccharid 2'-FL mengenmäßig deutlich mit 184 mg/dl, gefolgt von LNT (86 mg/dl), LNFP I (67 mg/dl), LNDFH I (58 mg/dl) und 3-FL (46 mg/dl). Bei den sauren HMO überwogen die Sialyllactosen 6'-SL (42 mg/dl) und 3'-SL (15 mg/dl), gefolgt von DSLNT (10 mg/dl). Aus den aufgeführten Oligosacchariden kleiner und mittlerer Größe ergeben sich etwa 6,2 g/l neutrale und 0,8 g/l saure HMO. Während P. Chaturvedi et al. zu vergleichbaren Ergebnissen kamen [26], legte die Arbeitsgruppe um G. Coppa mit durchschnittlich 13,9 g neutralen und 2,1 g sauren HMO pro Liter Frauenmilch (30. Laktationstag) deutliche höhere Ergebnisse vor [34].

1.5 Oligosaccharide der Milch anderer Spezies

Kuhmilch weist zwar nur geringe Spuren an neutralen Oligosacchariden auf, jedoch sind zumindest im Colostrum meßbare Mengen an 3'-Sialyllactose nachweisbar [88, 130]. Auch bei einigen anderen Spezies sind Oligosaccharide in der Milch - vor allem dem Colostrum - vorhanden, sie weichen allerdings in ihrer Zusammensetzung von der der Humanmilch oft deutlich ab. Die Milch von Ziegen und Pferden bspw. weisen auch im linearen Grundgerüst β 1-6 glykosidische Verknüpfungen auf, welche in der Humanmilch nur an Verzweigungsstellen auftreten [25, 171]. Die Verbindung Galactose-Galactose (α- oder β-glykosidisch) kommt sowohl in der Milch von Kühen als auch von Ziegen, Schafen, Pferden und Beuteltieren vor [173, 181, 172, 171, 113]. Besonderheiten im Kuhcolostrum sind bspw. das Vorkommen von GalNAc und einem sauren Trisaccharid ohne Lactose am reduzierenden Ende (NANA-GlcNAc-Gal) [173, 177]. N-glycolyl- anstelle von N-acetylneuraminsäure-haltigen Oligosacchariden wurden aus Kuh- und Schafcolostrum isoliert [178, 119]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden große Mengen an Oligosacchariden in der Milch von Elefanten nachgewiesen (ca. 20 g/l) [95]. Diese Oligosaccharide besitzen dabei deutliche strukturelle Ähnlichkeiten zu den HMO.

Die Arbeitsgruppe um T. Urashima hat bereits zahlreiche Studien über die Isolierung und Charakterisierung von Oligosacchariden aus der Milch von Kühen, Ziegen, Schafen, Pferden, Hunden, Bären oder Seehunden veröffentlicht [u.a. 171-173]. Mit den Kohlenhydraten der Milch von Beutel- oder Schnabeltieren (eierlegende Säugetiere) beschäftigt sich die Arbeitsgruppe um M. Messer in Australien [113]. Erwähnenswert ist bei den Beuteltieren auch, daß sie gleichzeitig zwei verschiedene "Milchtypen" für ihre unterschiedlich alten Nachkommen produzieren können [125]. Sowohl die Regulation der Synthese als auch die spätere Verwertung scheinen sich allerdings fundamental von denen der HMO zu unterscheiden [37, 113, 170]. Eine Übersichtsarbeit über sämtliche isolierte Milcholigosaccharide gibt es bislang nicht, eine große Anzahl an Literaturstellen ist aber z.B. bei D. Viverge et al. [181] zu finden.

2 Eigene Untersuchungen

2.1 Werden Oligosaccharide der Humanmilch im Gastrointestinaltrakt hydrolytisch durch Enzyme des Pankreas und der Darmschleimhaut gespalten ?

Trotz umfangreicher Forschungsbemühungen mit dem Ziel, die Säuglingsformulanahrungen der Zusammensetzung der Humanmilch anzupassen, sind die Kenntnisse über die Struktur und vor allem die biologische Rolle der Oligosaccharide in der Humanmilch (HMO) bisher nur in Ansätzen geklärt. Dies gilt auch für das Schicksal dieser Oligosaccharide im Intestinaltrakt des Säuglings. Daher versuchten wir in verschiedenen Modellen zu klären, inwieweit die HMO gegenüber den Verdauungsenzymen des Pankreas und der Bürstensaummembran resistent sind und in welchem Anteil sie in die unteren Darmabschnitte des Säuglings gelangen, um dort als intrinsisches “Präbiotikum” wirken zu können. Zu Beginn dieses Kapitels wird auf die relevante Enzymausstattung des Säuglings sowie auf einige aus der Literatur bekannte Studien zur gastrointestinalen Hydrolyse von HMO eingegangen.

2.1.1 Enzymausstattung des Säuglings zur Hydrolyse von Oligosacchariden der Humanmilch im Gastrointestinaltrakt

Als Enzymquellen des Säuglings für die mögliche Hydrolyse der Oligosaccharide der Humanmilch kommen Speichel, Pankreassekret, Dünndarmmucosa und die Enzyme der verschiedenen im Dickdarm vorhandenen Bakterienspezies in Frage. Entsprechend der unter 1.4 vorgestellten Struktur der HMO werden verschiedene Enzyme zur Abspaltung der “Seitenmoleküle” Fucose und N-Acetylneuraminsäure sowie zur Spaltung der N-Acetyllactosamineinheiten des Grundgerüstes benötigt.

Zur Abspaltung der endständigen L-Fucosen sind α-Fucosidasen notwendig, die die Bindungsformen von Fuc α 1-2 Gal, Fuc α 1-4 GlcNAc, Fuc α 1-3 GlcNAc sowie Fuc α 1-3 Glc zu hydrolysieren vermögen. Im Gegensatz zu der Familie der Fucosyltransferasen ist die α-L-Fucosidase (E.C. 3.2.1.51) zur Spaltung sämtlicher Fucose-

verknüpfungen der HMO befähigt. An den Dünndarmepithelzellen des Säuglings wurde bislang keine Fucosidaseaktivität nachgewiesen. Zwar sind Fucosidasen in zahlreichen Geweben lysosomal vorhanden, doch scheint die intrazelluläre Prozessierung der HMO beim Menschen - im Gegensatz zu den Beuteltieren - ohne Bedeutung zu sein [37]. In der Literatur finden sich Hinweise auf die Existenz einer α-L-Fucosidase in der Humanmilch [185, 184]. Aufgrund ihrer starken Glykosylierung scheint diese Fucosidase vor dem raschen Abbau im Gastrointestinaltrakt des Säuglings geschützt zu sein. Mit einer Enzymaktivität von ca. 15 U/l Humanmilch ist ihr Beitrag zur Hydrolyse der fucosylierten HMO jedoch unbedeutend.

Zur Abspaltung der N-Acetylneuraminsäure (NANA) in den sauren HMO werden Enzyme benötigt, welche die α 2-3 bzw. α 2-6 glykosidische Bindung von NANA an Galactose oder GlcNAc des HMO-Grundgerüstes zu hydrolysieren vermögen. Da NANA ebenso wie L-Fucose ohne weitere Seitenkettenverlängerung an die Oligosaccharidkette gebunden ist, erscheint eine Hydrolyse im Gastrointestinaltrakt des Säuglings zunächst naheliegend. Freie NANA ist besonders bei der Gangliosidsynthese von Bedeutung und wird - wie bereits erwähnt - im Zusammenhang mit der Gehirnentwicklung des Säuglings diskutiert [112]. Sialidase (E.C. 3.2.1.18) konnte in den Lysosomen mehrerer Gewebe des Menschen nachgewiesen werden und ein Mangel führt zur lysosomalen Speicherkrankheit Sialidose. In der reifen Muttermilch sind ca. 200 mg NANA/l vorhanden, welche in gebundener Form in sauren Oligosacchariden, Glykoproteinen und Gangliosiden vorliegen [22]. In den meisten Formulanahrungen ist der Gehalt an Gesamt-NANA mit der reifen Humanmilch vergleichbar, wobei der Gehalt an freier NANA sowohl in der Kuh- als auch in der Humanmilch sehr gering ist. Mit zunehmendem Alter des Säuglings lassen sich nach H. Sabharwal et al. steigende Mengen an freier NANA in den Faeces nachweisen, was die Autoren auf eine intestinale Sialidaseaktivität zurückführen [146]. Die Sialidaseaktivität im Dünndarm wurde von W. Den Tandt et al. [42] an Kindern im Alter von 2 Monaten bis 14 Jahren untersucht. In den Dünndarmbiopsien konnten maximale Sialidaseaktivitäten von 2,4 U/g Protein gemessen werden. Bei dieser niedrigen Enzymaktivität scheint es fraglich, ob die in den Faeces nachgewiesenen Mengen an freier NANA tatsächlich durch Enzyme des Dünndarms abgespalten werden konnten und nicht eher die bakteriellen Enzyme im Colon dafür verantwortlich waren. Bei säugenden Ratten, die über die Milch hohe Mengen an Sialyllactose erhalten, scheint der intestinalen Sialidase eine größere Bedeutung zuzukommen als beim

Säugling. So fanden J. Dickson und M. Messer Sialidaseaktivitäten bis zu 40 U/g Protein im unteren Dünndarm [44]. Bei diesen Untersuchungen blieb jedoch unklar, inwieweit die Enzyme lysosomal lokalisiert waren. Humanmilch weist mit 0,01 mU/l eine nur sehr geringe Sialidaseaktivität auf [151]. Auch wenn die Enzymaktivitäten in Abhängigkeit vom Donortyp schwanken, so scheinen sie generell keinen nennenswerten Beitrag zur Hydrolyse der sauren HMO leisten zu können.

Als weitere mögliche Enzymquelle kommt der Speichel in Frage. Die im Speichel von 3 bis 7 Monate alten Säuglingen ermittelten Konzentrationen an Sialidase würden laut P. McVeagh und J. Brand Miller [112] ausreichen, um maximal 4 % der in der Humanmilch enthaltenen NANA-Reste abzuspalten. Überraschenderweise konnten im Speichel von durchschnittlich 5 Monate alten gestillten Säuglingen größere Mengen freier NANA gemessen werden als bei Formulaernährten (16,0 versus 8,2 mg/l) [168].

Die Hydrolyse des Grundgerüsts der HMO könnte entweder exo- oder endoglykosidisch ablaufen. Im ersten Fall müßte zunächst die endständige β 1-3, β 1-4 oder bei Verzweigungen die β 1-6 glykosidisch gebundene Galactose von GlcNAc abgespalten werden. Nachfolgend müßte eine N-Acetylglucosaminidase die Verbindung zur Galactose spalten. Galactosidasen sind zwar im Intestinaltrakt vorhanden (E.C. 3.2.1.108), doch ob sie an GlcNAc gebundene Galactose abspalten können und dies auch bei den ungewöhnlichen Verknüpfungen β 1-3 und β 1-6, ist bisher nicht bekannt. Ebenso fehlen Hinweise auf Enzymaktivitäten, die GlcNAc abspalten können, und die für eine weitere Hydrolyse des Grundgerüstes benötigt werden. Lysosomal sind dagegen sowohl β-Galactosidasen als auch β-N-Acetylhexosaminidasen (E.C. 3.2.1.52) nachgewiesen, die diese Bindungen zu hydrolysieren vermögen. In der Humanmilch findet man zwar ungewöhnlich hohe Konzentrationen an Lysozym (E.C. 3.2.1.17), welches GlcNAc der Bakterienzellwand abspalten kann [70] - für die Hydrolyse von HMO scheint es jedoch ohne Bedeutung zu sein.

Eine endoglykosidische Spaltung des Grundgerüstes mit der Freisetzung der Lactosamineinheiten oder der Lactose am reduzierenden Ende erscheint zwar vorstellbar, doch gibt es dazu keine experimentellen Befunde. Die weitere Spaltung dieser Disaccharideinheiten müßte wiederum durch Galactosidasen erreicht werden. Dies ist nur für die Spaltung der Lactose mittels Lactase/Phlorizinhydrolase (E.C. 3.2.1.23/62) bekannt. Neben der in der Bürstensaummembran lokalisierten Lactase existiert noch eine lysosomale saure Lactase und eine Hetero-β-Galactosidase im

Cytoplasma [98]. Sie sind als intrazelluläre Enzyme weder für die Spaltung der freien Lactose noch des N-Acetyllactosamins relevant.

Es stellt sich daher die Frage, ob mögliche Nebenaktivitäten der im Säuglingsalter vorhandenen hydrolytischen Enzyme zu erwarten sind. Bei der Geburt ist praktisch keine Amylaseaktivität im Speichel (Ptyalin) und im Pankreassekret des Säuglings nachweisbar. Auch während der ersten 6 Lebensmonate sind die Aktivitäten noch recht gering [154, 98]. Die Funktion der α-Amylase (E.C. 3.2.1.1) - Spaltung innerer α 1-4 glukosidischer Bindungen - kann zu diesem Zeitpunkt jedoch durch die Enzyme der Bürstensaummembran (siehe unten) und durch die Muttermilchamylase nahezu ersetzt werden [43, 75]. Nach M. Lentze [99] ist die Amylase der Muttermilch für die Hydrolyse der HMO verantwortlich. Dies wird vom Autor aber nicht experimentell belegt. Eine Inkubation von Humanmilch über längere Zeit lieferte keinen Hinweis auf eine Hydrolyse der HMO durch die intrinsische Amylase, wie anhand eines unveränderten HMO-Spektrums durch MALDI-MS Analyse belegt werden konnte [unveröffentlichte Befunde].
α-Glukosidaseaktivitäten im Gastrointestinaltrakt sind bereits in der 10. Gestationswoche im menschlichen Fötus nachweisbar und bei der Geburt zeigen sie annähernd die Aktivitäten des Erwachsenen [98]. Dies steht im Gegensatz zu anderen Säugetieren, die bei der Geburt meist nur über geringe Glykosidaseaktivitäten verfügen. Die Glykosidasen des menschlichen Dünndarms besitzen meist überlappende Substratspezifität (Maltotriose wird bspw. durch Maltasen, Isomaltasen und Saccharasen gespalten). Allgemein ist die Aktivität der Enzyme der Bürstensaummembran im Jejunum und im oberen Ileum am höchsten, mit abnehmender Aktivität zum Duodenum und zum unteren Ileum [153]. Der Säugling verfügt über 7 Glykosidasen, die alle in der Bürstensaummembran verankert sind und mit ihren katalytisch aktiven Bereichen ins Lumen ragen [153]. Der Maltase-Glucoamylase-Komplex (α-Grenzdextrinase oder γ-Amylase, E.C. 3.2.1.20) kann neben Maltose und Maltotriose bis -hexaose auch geringe Mengen an Amylose und Amylopektin spalten. Darüberhinaus hat man meßbare Aktivitäten gegenüber artifiziellen Substraten wie Kojibiose (Glc α 1-2 Glc), Nigerose (Glc α 1-3 Glc) oder Turanose (Glc α 1-3 Fructose) nachgewiesen. Nebenaktivitäten zu HMO sind hier, ebenso wie beim Isomaltase-Komplex und bei der Trehalase (E.C. 3.2.1.28), nicht bekannt. Der Saccharase-Isomaltase-Komplex (E.C. 3.2.1.48,10) ist für die vollständige Saccharaseaktivität und den

Großteil der Isomaltase- und Maltaseaktivität verantwortlich [98]. Der β-Glykosidase-Komplex (Lactase, Phlorizinhydrolase, Glycosylceramidase) zeigt ein breites Substratspektrum und ist in der Lage, sowohl hydrophile Substrate wie Lactose zu hydrolysieren, als auch hydrophobe wie Phlorizin, β-Glucosyl- oder β-Galactosylceramide. Daneben wird in beschränktem Umfang auch Cellobiose und sogar Cellulose gespalten, deren Glucoseeinheiten β 1-4 glukosidisch verknüpft sind [157]. Die Aktivität der Lactase ist verglichen mit den anderen Glykosidasen gering, so daß die Lactosespaltung ein limitierender Faktor beim Säugling sein kann und durchaus nennenswerte Mengen an Lactose in den Dickdarm gelangen können [100, 14, 46].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß offenbar weder im Säugling noch in der Muttermilch Enzyme nachgewiesen werden konnten, die eine substantielle Hydrolyse von HMO (d.h. das aus N-Acetyllactosamineinheiten und Lactose bestehende Grundgerüst sowie deren Fucose- und NANA-Bindungen) erwarten lassen.

2.1.2 Studien zur gastrointestinalen Hydrolyse von Oligosacchariden der Humanmilch

Von der Arbeitsgruppe um J. Brand-Miller wurde eine Wasserstoffexhalationsstudie durchgeführt, bei der die H_2-Konzentration in der Ausatmungsluft nach Gabe von HMO und Lactulose an Säuglingen verglichen wurde [20]. Der H_2-Exhalationstest stellt einen nicht invasiven Test zur Bestimmung der Stoffwechselleistung der Dünndarmenzyme (z.B. Lactase) und der Colonbakterien dar. Gelangen unverdaute Kohlenhydrate in untere Darmabschnitte, übernehmen die bakteriellen Enzyme deren Abbau, wobei vorwiegend kurzkettige Fettsäuren entstehen. Von einigen Spezies wird auch H_2 gebildet. Dieser gelangt zu einem geringen Prozentsatz über den Blutweg zur Lunge und wird ausgeatmet. Von 24 Säuglingen im Alter von 3 bis 8 Monaten, die an dieser Studie teilnahmen, hatten lediglich acht Säuglinge nach Gabe von Lactulose H_2-Gehalte in der Ausatemluft, die oberhalb des Grenzwertes von 20 ppm lagen. Die verabreichten Lactulosemengen orientierten sich am Oligosaccharidgehalt der Muttermilch und lagen bei ca. 4 g. Diese acht Säuglinge bekamen im weiteren Verlauf der Untersuchung identische Mengen an isolierten Oligosacchariden (0,7 bis 1,0 g/kg KG) verabreicht, um wiederum die H_2-Exhalation in Zeitintervallen von 30

Minuten über 4 Stunden zu messen. Die Fläche unter der Kurve der H_2-Konzentration in der Ausatmungsluft betrug nach Lactulosegabe durchschnittlich 4.949 +/- 1.278 ppm, nach Gabe von HMO 5.135 +/- 1.148 ppm. Die Autoren schließen aus diesen Ergebnissen, daß die Oligosaccharide der Humanmilch weitgehend unverdaut das Colon erreichen und dort ebenso wie das Disaccharid Lactulose von der Bakterienflora vollständig verstoffwechselt werden. Auffallend waren bei dieser Studie die großen individuellen Unterschiede zwischen den Probanden: 5 der 24 Säuglinge produzierten bereits im Alter von 3 bis 4 Monaten Wasserstoff nach Lactulosegabe, dagegen zeigten 16 Säuglinge selbst im Alter von 8 Monaten keine oder nur einen marginalen Anstieg der H_2-Konzentrationen in der ausgeatmeten Luft. Ob dies an der vorherigen Hydrolyse der Oligosaccharide und/oder der Resorption lag, konnte in dieser Studie nicht geklärt werden. Möglicherweise waren die großen individuellen Unterschiede auch auf die jeweilige Zusammensetzung der Bakterienflora im Colon der Säuglinge zurückzuführen.

Hinweise auf das Schicksal der HMO im Gastrointestinaltrakt des Säuglings liefern auch Studien, die das Ziel hatten, die Wiederfindungsrate der HMO in den Faeces zu ermitteln. G. Coppa et al. analysierten die 24-Stunden-Faeces von 6 Säuglingen im Alter von 3 bis 4 Wochen [33]. Sie fanden 0,57 bis 0,77 g HMO entsprechend ca. 8 % der aufgenommenen HMO in den Faeces. Angaben darüber, welche Oligosaccharide in den Faeces wiedergefunden werden konnten und ob individuelle Unterschiede bestanden, wurden von den Autoren nicht gegeben. Qualitative Nachweise liefern die Untersuchungen von H. Sabharwal und A. Lundblad [142-145, 107]. Der Schwerpunkt ihrer Arbeiten lag im Vergleich des Oligosaccharidmusters einer individuellen Humanmilch und dem in den Faeces des Säuglings. Je nach Alter und Reife der Kinder sowie ihrer Blutgruppenzugehörigkeit wurden in den Faeces intakte HMO, deren Hydrolyseprodukte und HMO-ähnliche Substanzen wiedergefunden. Die Autoren postulierten eine Hydrolyse der Oligosaccharide im Dünndarm und eine nachfolgende intestinale Neusynthese von Blutgruppen-A-aktiver Oligosaccharide [142, 143]. Die nachgewiesenen Tetra- bis Heptasaccharide unterscheiden sich von den HMO lediglich durch ein N-Acetylgalactosamin-Molekül am nicht-reduzierenden Ende. Bei diesen Studien muß man einschränkend sagen, daß es sich um Einzelfallstudien handelt, deren Ergebnisse nur bedingt vergleichbar sind. D. Bailey et al. fanden in den Faeces eines gestillten Säuglings ebenfalls veränderte HMO, welche

entweder durch Hydrolyse bekannter HMO, durch Neusynthese oder aufgrund einer Kombination beider Prozesse entstanden waren [12]. Der mögliche Einfluß bakterieller Enzyme bei der Hydrolyse der HMO und vor allem Neusynthese, wurde ebenfalls nicht berücksichtigt, obgleich zahlreiche Glycosidasen bei Darmbakterien nachweisbar sind [137].

Um die Wirkung der intestinalen Verdauungsenzyme unabhängig vom Einfluß der Bakterienflora untersuchen zu können, entwickelten wir ein in vitro Modellsystem, bei dem verschiedene HMO-Fraktionen mit Enzymen des Pankreas und des Dünndarms inkubiert wurden. Die Gewebe waren entweder humanen Ursprungs oder stammten von Ferkeln bzw. jungen Schweinen. Das Schwein wird aufgrund seiner dem Menschen ähnlichen Verdauungsphysiologie gerne als Tiermodell verwendet [39]. Eine mögliche Hydrolyse der HMO nach der Inkubation mit den Enzympräparaten wurde durch den enzymatischen Nachweis von Monosacchariden, die chromatographische Auftrennung der Proben sowie durch massenspektrometrische Untersuchungen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit geprüft.
Darüberhinaus wurden in vivo Studien zum Schicksal der HMO im Tiermodell Maus durchgeführt. Für die Wahl dieser Spezies war die limitierte Verfügbarkeit der HMO als Substrat ausschlaggebend. Diese Versuchsdurchführung versprach Auskunft zu geben sowohl über die Transitgeschwindigkeit der Oligosaccharide als auch über deren Hydrolysegrad, da neben den Faecesproben auch die Inhalte verschiedener Darmabschnitte am Versuchsende untersucht werden konnten. Als Vergleichssubstanzen zu den HMO wurden u.a. auch Fructooligosaccharide eingesetzt. Ähnlich wie Lactulose erreichen diese nahezu unverändert den menschlichen Dickdarm [9].

2.1.3 In vitro Modell zur Hydrolyse von Oligosacchariden der Humanmilch

2.1.3.1 Kurzdarstellung der Methoden

Bei den in vitro Studien zur enzymatischen Stabilität wurden ausgewählte HMO mit Enzymen des Pankreas und einem Bürstensaummembranpräparat (BSM) inkubiert. Maltodextrin diente als Referenzsubstanz, wobei anhand der Freisetzung von Glucose die enzymatische Hydrolyse von Maltodextrin verläßlich erfaßt werden konnte.

Die Humanpankreassekrete wurden im Rahmen diagnostischer Verfahren am Universitätsklinikum Frankfurt durch Aspiration aus dem Duodenum nach Stimulation der Sekretion durch Sekretin und Cholecystokinin gewonnen. In einigen Studien wurde darüber hinaus ein Präparat aus Schweinepankreas eingesetzt. Dazu wurde ein Homogenat aus frischem Schweinepankreas hergestellt, gefolgt von einer Zymogenaktivierung durch Enterokinasezusatz. Die kolorimetrisch bestimmte Aktivität der α-Amylase in den verschiedenen Pankreasenzympräparaten diente als Bezugsgröße und erlaubte die Standardisierung der eingesetzten Enzymaktivität in den Hydrolysestudien. Aus der Dünndarmmucosa von Ferkeln und jungen Schweinen wurden die BSM der Epithelzellen durch Differentialzentrifugation angereichert. Darüberhinaus stand frisches humanes Resektionsmaterial aus dem proximalen Dünndarm zur Verfügung. Die Qualität der Präparation wurde anhand der Anreicherung verschiedener Leitenzyme der apikalen Membran geprüft und die Maltaseaktivität wurde zur Standardisierung der Präparationen verwendet.

Für die Studien zur Hydrolysestabilität wurden die Oligosaccharide mit dem Pankreaspräparat vorinkubiert und nach Zugabe der BSM bis zu 24 Stunden weiter inkubiert. In verschiedenen Zeitabständen wurden Proben entnommen und auf entstandene Abbauprodukte hin analysiert. Durch enzymatische Nachweisverfahren wurde die Freisetzung von Glucose mittels der Hexokinasereaktion, bei L-Fucose nach Umsetzung durch L-Fucose-Dehydrogenase und bei N-Acetylneuraminsäure (NANA) nach Umsatz mit NANA-Aldolase und Acylmannosamin-Dehydrogenase, bestimmt. Massenspektrometrisch konnte mit Hilfe der MALDI-MS geprüft werden, ob die Ausgangsprodukte im Verlauf der Inkubation degradiert und entsprechende Abbauprodukte sichtbar wurden. Darüberhinaus wurde in Einzelfällen die Anionenaustauschchromatographie (HPAEC) als weitere Nachweismethode für eine mögli-

che Hydrolyse eingesetzt. (Eine ausführliche Darstellung der Materialien und Methoden findet sich auf den Seiten 142 bis 155)

2.1.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Hydrolyse von Maltodextrin

Maltodextrin entsteht durch partielle Hydrolyse von Amylose, einem Bestandteil der Stärke. Eine genauere Produktbeschreibung der Herstellerfirma gibt Auskunft über den Anteil an Molekülen mit niedrigem Polymerisierungsgrad in dem Gemisch. Das in unseren Versuchen eingesetzte Maltodextrin bestand zu etwa 16 % aus Glucose, Maltose und Maltotriose und zu ca. 55 % aus Oligomeren mit zehn oder mehr Dextroseeinheiten.

Matrix assisted laser desorption ionization-mass spectrometry (MALDI-MS) hat sich in den letzten Jahren auch auf dem Gebiet der Glykokonjugate als sehr sensitive Nachweismethode etabliert [11, 159]. Unter bestimmten Voraussetzungen kann sogar eine semi-quantitative Auswertung der Spektren vorgenommen werden [74]. In **Abbildung 6** ist ein Massenspektrum des von uns eingesetzten Maltodextrins in Abwesenheit der Enzympräparate gezeigt. Dextrine mit DP (degree of polymerization) 6 bis 8 zeigten durchweg sehr hohe Signalintensitäten, während Oligomere mit großen Massen im MALDI-Spektrum generell schlechter, jedoch mindestens bis DP 40 nachweisbar waren.

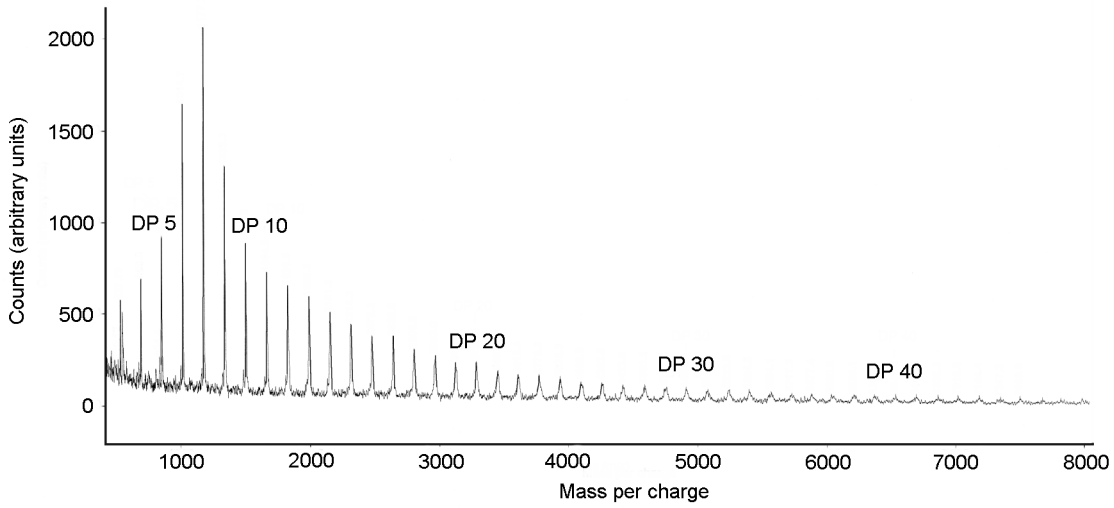


Abb. 6 MALDI-MS Spektrum (Voyager RP) von Maltodextrin (Konzentration 1 g/l H_2O, DP = degree of polymerization; Summe aus 50 Einzelspektren)

Die Enzymaktivitäten des Pankreaspräparates und der BSM wurden so eingestellt, daß nach einer einstündigen Inkubation des Maltodextrins mit Humanpankreassekret ca. 15 % und 10 Minuten nach Zugabe von BSM des Schweins etwa die Hälfte des Maltodextrins unter Bildung freier Glucose umgesetzt worden war. Eine Hydrolyse in einem kürzeren Zeitraum wäre zwar möglich gewesen, erforderte jedoch relativ hohe Enzym- und somit auch Proteinkonzentrationen, die sich bei den massenspektrometrischen Messungen als nachteilig erwiesen. Unter den gewählten Bedingungen war eine vollständige Hydrolyse des Maltodextrins, gemessen an der Wiederfindung der Glucose, nach ca. 90 Minuten erreicht, wie **Abbildung 7** (links) zu entnehmen ist.

Die α-Amylase des Pankreas greift die inneren α 1-4 glykosidischen Bindungen des Maltodextrins an, wobei bevorzugt Maltose und Maltotriose abgespalten werden. Dies erklärt die relativ geringen Mengen an freigesetzter Glucose im Laufe der Vorinkubation des Maltodextrins ausschließlich mit Pankreassekret. Die entstandenen Di- und Trisaccharide werden jedoch bei der anschließenden Inkubation mit Enzymen der BSM schnell und vollständig zu Monosacchariden gespalten.

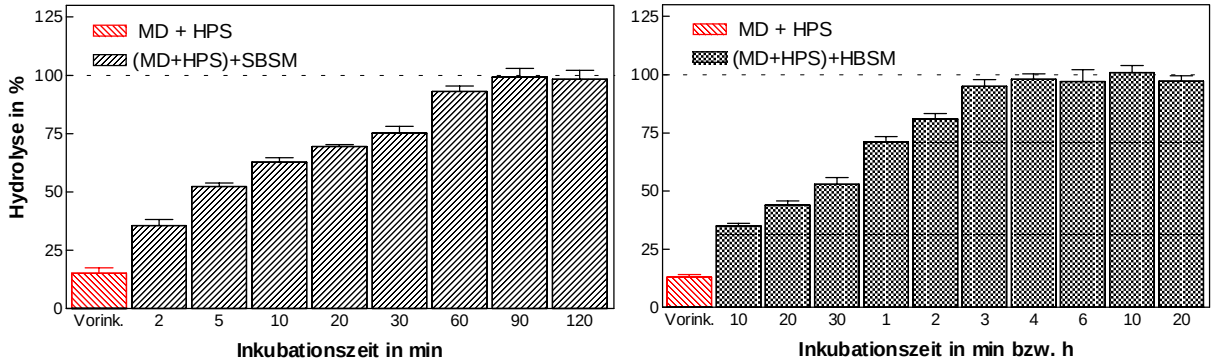


Abb. 7 Glucosefreisetzung aus Maltodextrin nach Vorinkubation mit Pankreassekret und nachfolgender Inkubation zusammen mit Bürstensaummembranenzymen (MD = Maltodextrin, HPS = Humanpankreassekret, BSM = Bürstensaummembran, SBSM = BSM vom Schwein, HBSM = BSM aus Humanmaterial, 100 % = vollständige Wiederfindung der Glucose). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 6 Versuchsserien.

Die mit BSM-Präparaten aus Humandünndarm durchgeführten Versuche zeigten einen ähnlichen, jedoch etwas verzögerten Hydrolyseverlauf (Abbildung 7, rechts). Ein vollständiger Abbau des Maltodextrins war hier nach ca. 3 Stunden erreicht, obwohl identische Amylase- und Maltasekonzentrationen eingesetzt wurden. Vermutlich waren in der Präparation Begleitsubstanzen vorhanden, die die Abbaugeschwindigkeit des Maltodextrins verminderten. Bei den nachfolgenden Hydrolysestudien an HMO unterschieden sich die Ergebnisse der Inkubationen mit Human- oder Schweinematerial nicht, so daß auf die getrennte Darstellung verzichtet wurde. Die gleichbleibenden Glucosekonzentrationen nach 20-stündiger Inkubation des Maltodextrins zeigen, daß eine bakterielle Kontamination durch den Zusatz von Antibiotika weitgehend ausgeschlossen werden konnte, da sonst die Glucose mikrobiell verwertet worden wäre.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen mit MALDI-MS bestätigten die mit den enzymatischen Tests erzielten Ergebnisse des Maltodextrinabbaus. Die Zugabe der Enzympräparate führte trotz Probenvorbereitung zu einem Verlust an Sensitivität bei der MALDI-Analyse. Dextrine mit hohen Massen waren nicht mehr deutlich vom Untergrund unterscheidbar, so daß der untersuchte Massenbereich auf ca. 500 bis 3.500 Da eingeschränkt wurde. Die Maltodextrine mit DP 3 bis DP 21 waren trotz

Zugabe von hitzeinaktiviertem Pankreassekret und der BSM (Kontrolle) noch gut detektierbar (**Abb. 8)**.

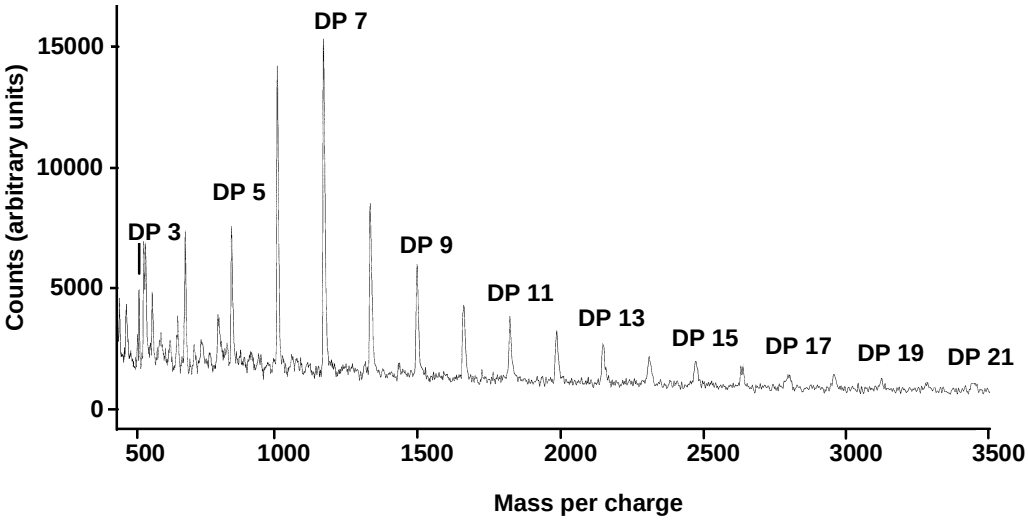


Abb. 8 MALDI-MS Spektrum (Voyager RP) von Maltodextrin nach Inkubation mit hitzeinaktiviertem Pankreassekret und Bürstensaummembranenzymen (DP = degree of polymerization; Summe aus 50 Einzelspektren)

Nach Vorinkubation mit aktiviertem Pankreassekret gefolgt von einer einstündigen Inkubation mit BSM waren die Massenpeaks nur noch weniger Oligomere mit geringer Molmasse nachweisbar (**Abb. 9**).

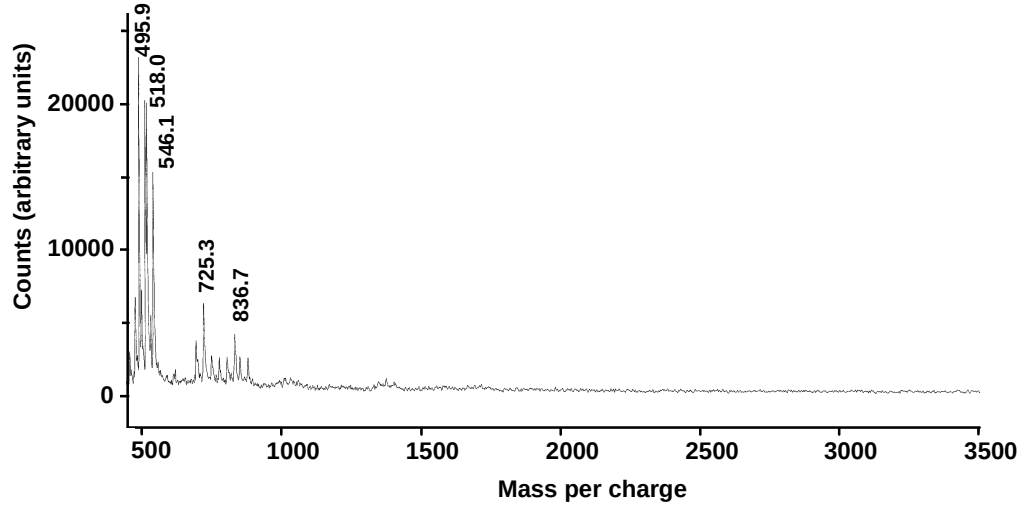


Abb. 9 MALDI-MS Spektrum (Voyager RP) von Maltodextrin nach Vorinkubation mit Pankreassekret und anschließender Inkubation über 1 Stunde zusammen mit Bürstensaummembranenzymen (Summe aus 50 Einzelspektren)

Überraschenderweise waren bei längeren Inkubationszeiten einzelne Massen des ursprünglichen Maltodextringemisches noch bzw. wieder recht deutlich vom Untergrund unterscheidbar. Es handelte sich hierbei um die Dextrine mit DP 4 ($M + Na^+$ = 689 Da), DP 7 ($M + Na^+$ = 1.175 Da) und, im geringeren Maße, um DP 10 ($M + Na^+$ = 1.660 Da). Dieser Befund bestätigte sich in mehreren Versuchen, sowohl bei Verwendung von BSM aus Humanmaterial als auch aus Schweinedünndarm. Eine Erklärung für diese erhöhte Resistenz ausgewählter Oligomere konnte nicht gefunden werden. Aufgrund der Ergebnisse aus den enzymatischen Tests konnte es sich hierbei jedoch nur um eine verschwindend kleine Menge noch intakter Maltodextrinfraktionen handeln.

Hydrolyseexperimente mit neutralen Oligosacchariden der Humanmilch

Für die Hydrolyseexperimente mit den neutralen HMO wurden neben der Gesamtfraktion auch stark aufgereinigte Fraktionen bis zur Größe der Hexaosen eingesetzt. Alle Oligosaccharidfraktionen wurden von der Milupa Forschungsabteilung aus einem Muttermilchpool isoliert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Proben für diese Versuche setzten sich jeweils aus den Isomeren der Oligosaccharide Fucosyllactose (FL), Lacto-N-tetraose (LNT), Lacto-N-fucopentaose (LNFP) und Lacto-N-difucohexaose (LNDFH) zusammen (Strukturen siehe Seiten 184 bis 187). Fucosen sind, wie bereits erwähnt, nie integraler Teil des Grundgerüstes der HMO, sondern stets in endständiger Stellung. Eine bevorzugte hydrolytische Abspaltung der Fucosen im Gastrointestinaltrakt schien somit denkbar. Freigesetzte Monosaccharide wie Fucose ließen sich in der von uns verwendeten MALDI-MS-Analyse jedoch nur sehr schlecht nachweisen. Bis zu einem Massenbereich um 500 Da absorbierten die Matrixbestandteile sehr stark. Hinzu kam ein relativ hohes Hintergrundrauschen, bedingt durch das Probenmaterial des Pankreassekrets und der BSM. Daher wurden bei den gezeigten Spektren lediglich die Massen größer 500 Da berücksichtigt, wodurch das kleinste Oligosaccharid, Fucosyllactose ($M + Na^+$ = 511 Da), gerade noch darstellbar war. Die massensprektrometrische Analyse wurde aus diesem Grund durch einen enzymatischen Nachweis der Monosaccharide Glucose und Fucose ergänzt.

Die folgende Abbildung (**Abb. 10**) zeigt ein MALDI-Spektrum der Gesamtfraktion der neutralen HMO in aqua bidest im Massenbereich von 500 bis 2.000 Da.

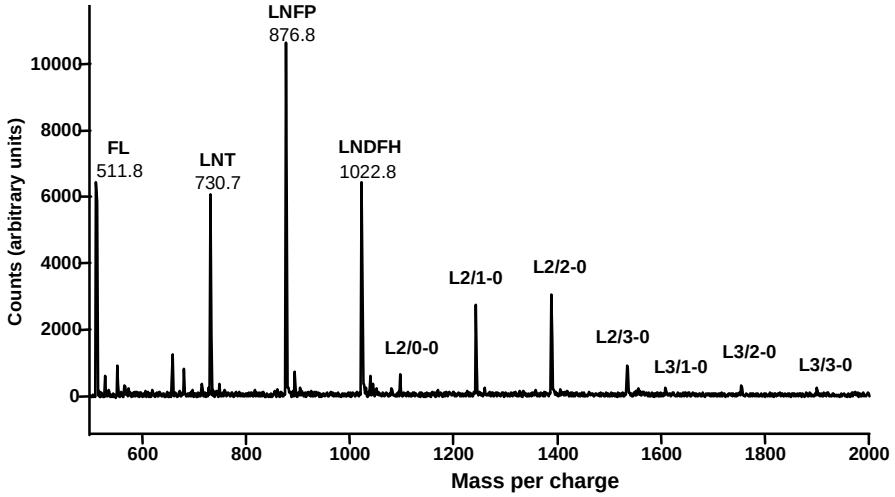


Abb. 10 MALDI-MS Spektrum (Voyager RP) von neutralen Oligosacchariden der Humanmilch (Konzentration 1 g/l H_2O; Summe aus 50 Einzelspektren)

Die Massenpeaks der Oligosaccharide sind im unteren Molekulargewichtsbereich sowohl mit den Massen als auch mit den entsprechenden Abkürzungen gekennzeichnet. Die kleineren Moleküle wurden entsprechend ihren Trivialnamen abgekürzt, bei den größeren HMO wurde dagegen die von A. Pfenninger et al. vorgeschlagene Abkürzungsmethode angewandt [in 10]. Aufgrund der Abwesenheit störender Begleitstoffe ist das “Rauschen” an der Basislinie wesentlich geringer als in Gegenwart hitzeinaktivierter Enzympräparate (vgl. Abb. 11).

Isomere können bei MALDI-MS aufgrund der identischen Masse nicht unterschieden werden. Ungünstigerweise ist die Masse von zwei Fucosemolekülen nahezu identisch mit der Masse einer N-Acetylneuraminsäure. Ebenso entsprechen fünf Fucosen der Masse zweier N-Acetyllactosamineinheiten, sodaß die Zuordnung des Molekulargewichtes zu einer bestimmten Oligosaccharidstruktur mittels MALDI-MS sehr schwierig sein kann. Da wir uns jedoch auf die kleineren Strukturen der HMO beschränkten, wirkte sich dies hier nicht nachteilig aus. Bei sämtlichen Messungen wurden die neutralen HMO im positiven Ionenmodus in ihrer natriumangelagerten Form detektiert ($M + Na^+$).

Die neutrale Gesamtfraktion der HMO spiegelt die Zusammensetzung der neutralen Oligosaccharide wider, wie sie auch in der (gepoolten) menschlichen Milch vorhanden ist. Diese Fraktion zeigte eine hohe Stabilität gegenüber den eingesetzten Enzympräparaten. Bei den massenspektrometrischen Untersuchungen wurde, trotz des relativ hohen Untergrundrauschens, deutlich, daß die Spektren zu Versuchsbeginn und Versuchsende nahezu unverändert blieben (**Abb. 11 und 12**). Dargestellt werden - wie auch in den weiteren Abbildungen - immer die mit hitzeinaktivierten Enzympräparaten inkubierte Probe (Nullprobe=Kontrolle) und die über 20 Stunden mit aktiven Enzympräparaten behandelte Probe.

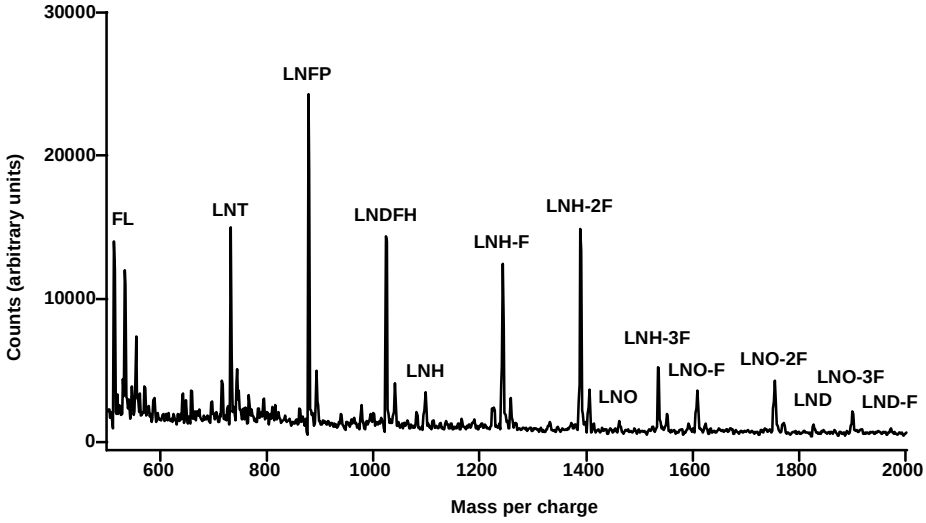


Abb. 11 MALDI-MS Spektrum (Voyager DE STR) der neutralen Gesamtfraktion nach Inkubation mit hitzeinaktiviertem Pankreassekret und Bürstensaummembranen (Summe aus 50 Einzelspektren)

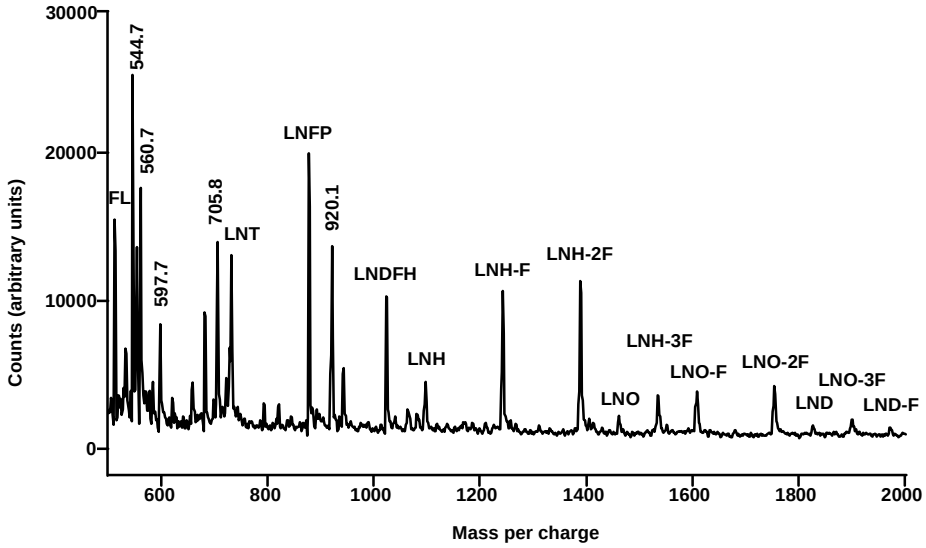


Abb. 12 MALDI-MS Spektrum (Voyager DE STR) der neutralen Gesamtfraktion nach Vorinkubation mit Pankreassekret und anschließender Inkubation über 20 Stunden zusammen mit Bürstensaummembranen (Summe aus 50 Einzelspektren)

Auch das größte, in diesem Spektrum detektierbare Oligosaccharid (LND-F, 1.973 Da), eine fucosylierte Decaose, war nach der Inkubation noch deutlich nachweisbar. Neu entstandene Peaks (545, 561, 598, 706, 920 Da) konnten keinem möglichen Hydrolyseprodukt zugeordnet werden. Eine Abspaltung der exponiert stehenden Fucosen wäre durch die Anreicherung bzw. Entstehung unfucosylierter Strukturen im Spektrum sichtbar geworden (z.B. LNT aus LNFP-Isomeren). Da die Verhältnisse der Peakhöhen einzelner HMO jedoch unverändert blieben, kann eine nennenswerte Hydrolyse - auch der fucosylierten Strukturen - ausgeschlossen werden. Ein gleichzeitiger Abbau sämtlicher HMO unter Beibehaltung des Verhältnisses der Peakhöhen konnte in einem Vergleich mit Zusatz von nicht-hydrolysierbarer Chitotetraose ebenfalls ausgeschlossen werden.

Während durch Hydrolyse entstandene Änderungen der Mengenverhältnisse von bestimmten Oligosaccharidstrukturen im MALDI-Spektrum generell sichtbar werden, kann das Erscheinen von monomeren Abbauprodukten, wie bereits erwähnt, nur sehr begrenzt nachgewiesen werden. Die Ergebnisse aus den enzymatischen Tests und den massenspektrometrischen Untersuchungen ergänzten sich jedoch in dieser Hinsicht und konnten eindeutig eine nennenswerte Hydrolyse der Gesamtfraktion der neutralen HMO ausschließen. Bei den enzymatischen Untersuchungen wurden le-

diglich nach Inkubationen über 10 bzw. 20 Stunden mit Pankreassekret und BSM geringe Mengen an freier Glucose und Fucose im enzymatischen Test nachgewiesen. Eine prozentuale Angabe der Hydrolyserate, wie sie bei den Einzelfraktionen vorgenommen wurde, war bei der Gesamtfraktion aufgrund der nicht vollständig charakterisierten Zusammensetzung jedoch nicht möglich.

Neben der Gesamtfraktion der HMO wurden auch verschiedene strukturell definierte Subfraktionen der HMO untersucht. Die FL-Fraktion bestand aus den zwei Isomeren 2'-Fucosyllactose und 3'-Fucosyllactose, die Fraktion LNT setzte sich aus Lacto-N-tetraose und Lacto-N-neotetraose zusammen. Mit LNFP wurde eine Fraktion bezeichnet, die aus vier Isomeren bestand, bei denen jeweils ein Fucosemolekül α 1-2, 1-3 oder 1-4 glykosidisch an das Tetraosengrundgerüst gebunden ist (LNFP I, II, III und V). Die Fraktion LNDFH setzte sich aus den zwei Strukturvarianten des difucosylierten Tetraosegrundgerüsts LNDFH I und II zusammen. Bei diesen Fraktionen zeigte sich im Verdauexperiment grundsätzlich das gleiche Resultat: Weder im enzymatischen Nachweis von Glucose und Fucose noch in der massenspektrometrischen Analyse konnten Hinweise auf eine Hydrolyse gefunden werden. Selbst bei den fucosylierten Oligosacchariden FL, LNFP und LNDFH war mit einer maximalen Fucosefreisetzung von ca. 1,2 % nach Inkubation über 20 Stunden keine Freisetzung der Fucose festzustellen (**Tabelle 2**). Die Einzelfraktionen spiegelten somit das bereits mit der neutralen Gesamtfraktion gewonnene Bild wider.

Tabelle 2: Durchschnittliche Freisetzung von Fucose und Glucose in mg/dl bzw. in Prozent der maximal abspaltbaren Monosaccharidmenge nach Inkubation mit Pankreashomogenat und Bürstensaummembranen über 20 Stunden (Mittelwerte aus 4 Versuchsserien)

HMO	Fucose mg/dl	Fucose %	Glucose mg/dl	Glucose %
FL	0,21	0,5	0,17	0,4
LNT	-	-	0,09	0,3
LNFP	0,29	1,2	0,20	0,8
LNDFH	0,25	0,6	0,15	0,7

In Ergänzung zur semiquantitativen MALDI-TOF Analyse und zum enzymatischen Nachweis der Monomere wurde exemplarisch eine Anionenaustauschchromatographie (high pH anion exchange chromatography, HPAEC) angewendet, die es erlaubt, das Schicksal der HMO auch quantitativ zu erfassen. Bei der HPAEC können sowohl die isomeren Strukturen als auch Monosaccharide aufgrund ihres unterschiedlichen Elutionsverhaltens erfaßt werden. Die Hydrolysestudie wurde unter identischen Bedingungen wiederholt und die gesamte Probe nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden der Chromatographie unterzogen. Da die HPAEC eine deutlich größere Probenmenge benötigt als bspw. die MALDI wurde der gesamte Verdauansatz eingesetzt. Stachyose diente bei dem Verdau und der chromatographischen Analyse als interner Standard.

Auch bei der HPAEC-Analyse konnte eindeutig gezeigt werden, daß aus LNFP weder LNT oder LNneoT noch freie Fucose freigesetzt wurden. Auch die Mengenverhältnisse der drei Isomeren LNFP I, II und III blieben erhalten (**Abb. 13 und 14**).

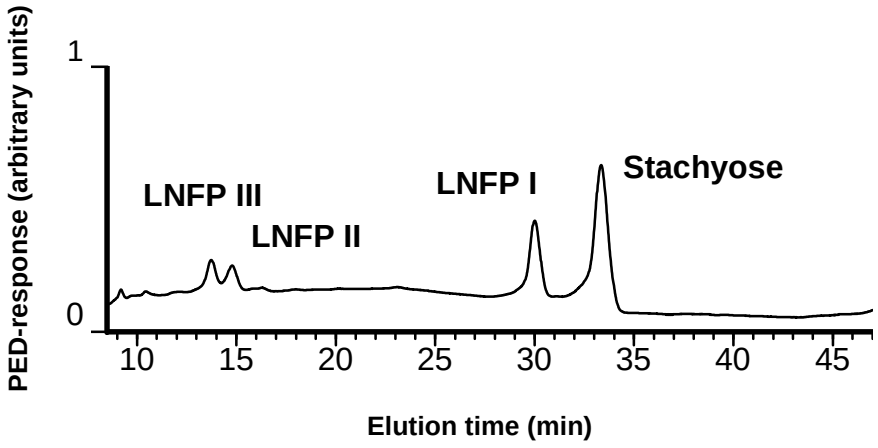


Abb. 13 HPAEC-Elutionsprofil isomerer Lacto-N-fucopentaosen (LNFP) nach Inkubation mit hitzeinaktiviertem Pankreassekret und Bürstensaummembranen (Zusatz von Stachyose zur internen Kalibrierung; PED = pulsed electrochemical detection)

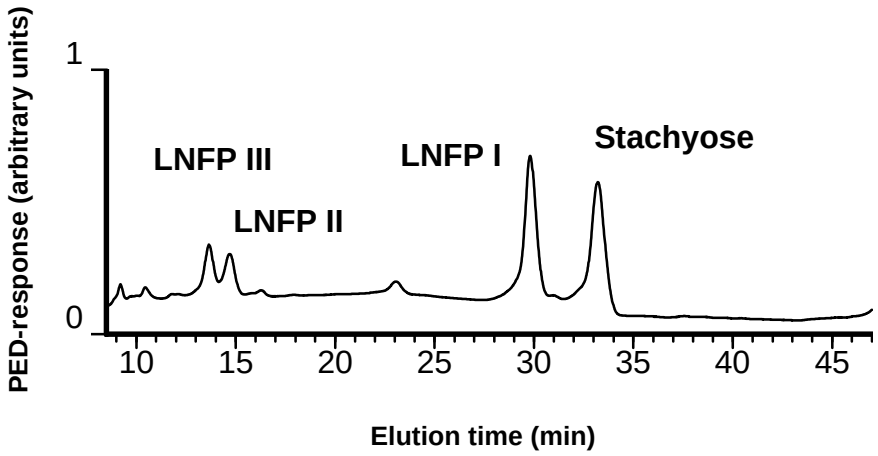


Abb. 14 HPAEC-Elutionsprofil isomerer Lacto-N-fucopentaosen (LNFP) nach Vorinkubation mit Pankreassekret und anschließender Inkubation über 20 Stunden zusammen mit Bürstensaummembranen (Zusatz von Stachyose zur internen Kalibrierung; PED = pulsed electrochemical detection)

Insgesamt weisen damit alle Experimente auf eine außergewöhnliche Hydrolysestabiltät der neutralen HMO hin. Die Enzyme des exokrinen Pankreas und der BSM tragen zu keiner nennenswerten Spaltung der glykosidischen Bindungen bei. Um zu prüfen, ob anstelle der sezernierten Enzyme die intrazellulär lokalisierten Enzyme des Pankreas zu einer Hydrolyse der HMO befähigt sind, wurden zusätzliche Hydrolysestudien mit einer Präparation aus Schweinepankreashomogenat durchgeführt. Da das Pankreasgewebe noch inaktive Zymogene enthielt, wurde eine Aktivierung mittels Enterokinase vorangestellt, um die Enzyme in ihre katalytisch wirksame Form zu überführen. Die Amylaseaktivitäten des Homogenats wurden denen des Humanpankreassekrets angepaßt. Wie dem unten abgebildeten MALDI-Spektrum (**Abb. 15**) zu entnehmen ist, waren die meisten der neutralen HMO nach einer vierstündigen Inkubation mit Pankreashomogenat und BSM kaum mehr detektierbar. Das typische Spektrum der neutralen HMO war damit vollkommen verschwunden. Im Massenbereich von 700 bis 900 Da traten vermehrt neue Peaks auf, wobei zwei Massen (877 bzw. 1023 Da) jedoch Oligosacchariden der Ausgangsprobe zugeordnet werden konnten (LNFP und LNDFH). Eine bevorzugte Fucoseabspaltung von den Oligosacchariden ließ sich somit aus diesen Ergebnissen nicht ableiten. Da keine unfucosylierten Strukturen mehr nachweisbar waren, könnte man dem Fucosemolekül sogar eine gewisse Schutzfunktion bei der Hydrolyse der Grundstruktur zuschreiben. Wurde die Inkubationszeit auf 8 Stunden verlängert, waren keine Mas-

senpeaks der eingesetzten Oligosaccharide mehr nachweisbar. Durch das Pankreashomogenat in Verbindung mit dem Bürstensaumpräparat war offenbar eine vollständige Degrada-tion der Oligosaccharide erreicht worden.

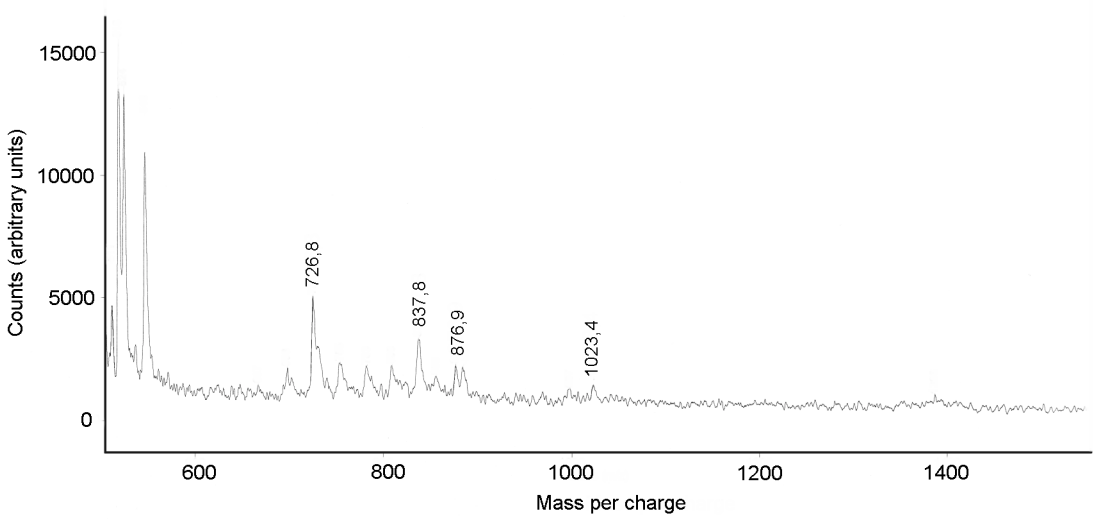


Abb. 15 MALDI-MS Spektrum (Voyager RP) der neutralen Gesamtfraktion nach Inkubation mit Pankreashomogenat und Bürstensaummembranen über 4 Stunden (Summe aus 50 Einzelspektren)

Aufgrund dieser Befunde kann abgeleitet werden, daß im Pankreasgewebe, nicht aber im Sekret, Enzymaktivitäten zur Spaltung der ungewöhnlichen glykosidischen Bindungen der HMO vorhanden sind. Es handelt sich dabei vermutlich um bekannte Glycosidhydrolasen lysosomalen Ursprungs.

Hydrolyseexperimente mit sauren Oligosacchariden der Humanmilch

Bei den Untersuchungen zur Hydrolysestabilität der sauren HMO standen uns die Gesamtfraktion und drei Einzelfraktionen zur Verfügung. Von großem Interesse war bei diesen Untersuchungen, ob die α-glykosidischen Bindungen zwischen der stets endständigen N-Acetylneuraminsäure (NANA) und dem Grundgerüst der HMO gespalten werden können. So wurde neben der enzymatischen Bestimmung von freier Glucose auch ein Enzymtest zur Quantifizierung von freier NANA angewendet. Die

massenspektrometrische Darstellung der Proben erfolgte wiederum durch MALDI-MS.

Abbildung 16 zeigt ein typisches MALDI-Spektrum der sauren Gesamtfraktion der HMO im Massenbereich von 500 bis 2.000 Da. Prominenteste Vertreter der sauren HMO sind die Sialyllactosen (SL), Lactosialyltetraosen (LST) und die Disialyllacto-N-tetraosen (DSLNT). Alle HMO größer als DSLNT wurden wiederum mit der von A. Pfenninger vorgeschlagenen Kurzschreibweise bezeichnet [10]. Wie bei den neutralen HMO wurde hier im positiven Ionenmodus gemessen, d.h. die Molekülmassen erscheinen in natrium-angelagerter, einfach positiv geladener Form. Pro Molekül NANA kann ein weiteres Natriumion angelagert werden, wobei zum Ladungsausgleich jeweils ein H^+-Ion abgespalten wird. DSLNT erscheint somit im Spektrum in Form dreier Massen, welche in Abbildung 16 mit a, b und c gekennzeichnet sind: 1.313 Da ($M + Na^+$), 1.335 Da ($M - H^+ + 2\ Na^+$) und 1.357 Da ($M - 2\ H^+ + 3\ Na^+$).

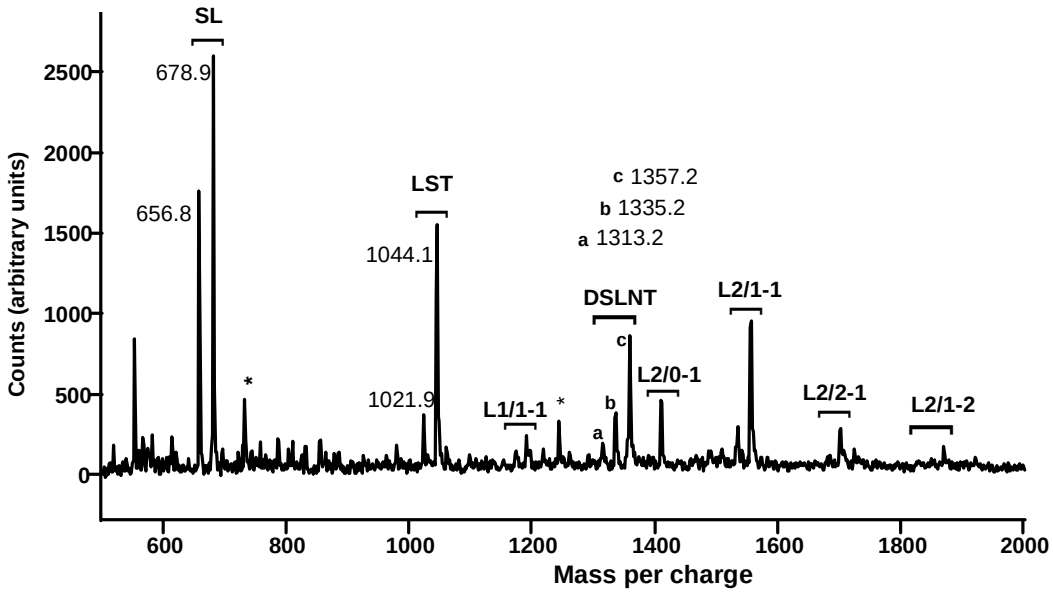


Abb. 16 MALDI-MS Spektrum (Voyager DE STR) der sauren Gesamtfraktion (Konzentration 1g/l H_2O; Summe aus 50 Einzelspektren; neutrale HMO sind mit * gekennzeichnet)

Werden saure Oligosaccharide im sogenannten negativen Modus gemessen, erfolgt primär die Abspaltung eines H^+-Ions. Bei mehrfach sialylierten Oligosacchariden wird die einfach negative Ladung durch die Anlagerung von Natriumionen aufrecht erhalten. DSLNT wäre in diesem Modus somit lediglich mit den beiden Massen 1.289 Da ($M - H^+$) und 1.311 Da ($M - 2\ H^+ + Na^+$) detektierbar.

Ein Nachteil der MALDI-Analyse bei der Darstellung saurer Oligosaccharide ist, daß die relativ labile Bindung zwischen NANA und dem Oligosaccharidgrundgerüst durch den Laserbeschuß gespalten werden kann. Hierdurch werden dann teilweise bereits in der Ausgangsprobe neutrale HMO wie LNT nachweisbar.

Aufgrund der recht inhomogenen Zusammensetzung der Proben in unseren Versuchen waren die Oligosaccharide bereits in den Ausgangsproben schlechter nachweisbar als im Standard ohne Zusatz von Pankreas- und BSM-Präparation (**Abb. 17)**. Die größte, noch deutlich erkennbare Masse entsprach der monofucosylierten und monosialylierten Octaose S-LNH-F, assoziiert mit ein bzw. zwei Natriumionen (M = 1.533 bzw. 1.555 Da). Theoretisch könnte diese Masse auch das natriumangelagerte neutrale HMO bestehend aus einem Hexaosengrundgerüst und drei Fucosen darstellen. Dieses besitzt mit 1.534 Da eine nahezu identische Masse wie die erwähnte Octaose. Das Vorkommen des neutralen Oligosaccharids kann jedoch in diesem Falle ausgeschlossen werden, da die Existenz des Doppelpeaks eindeutig auf ein sialyliertes Oligosaccharid hinweist.

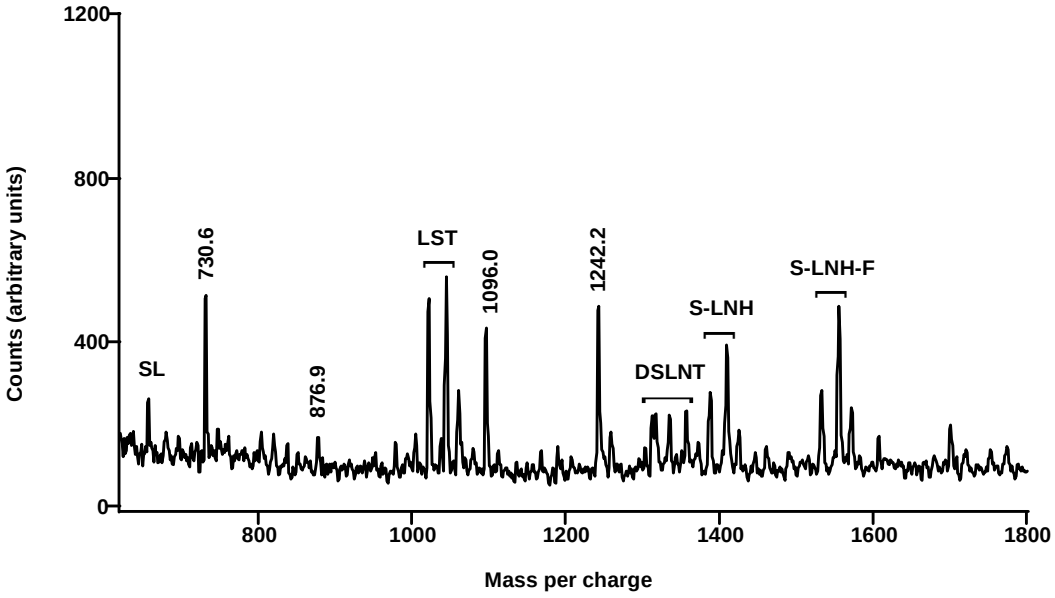


Abb. 17 MALDI-MS Spektrum (Voyager DE STR) der sauren Gesamtfraktion nach Inkubation mit hitzeinaktiviertem Pankreassekret und Bürstensaummembranen (Summe aus 50 Einzelspektren)

In den MALDI-Spektren konnten auch nach mehrstündiger Inkubation mit den Enyzmpräparaten noch sämtliche Massen der in der Gesamtfraktion der sauren

HMO vertretenen Oligosaccharide wiedergefunden werden (**Abb. 18**). Auch das Verhältnis der Massen zueinander blieb ebenso wie das zu den vorhandenen neutralen HMO nahezu unverändert.

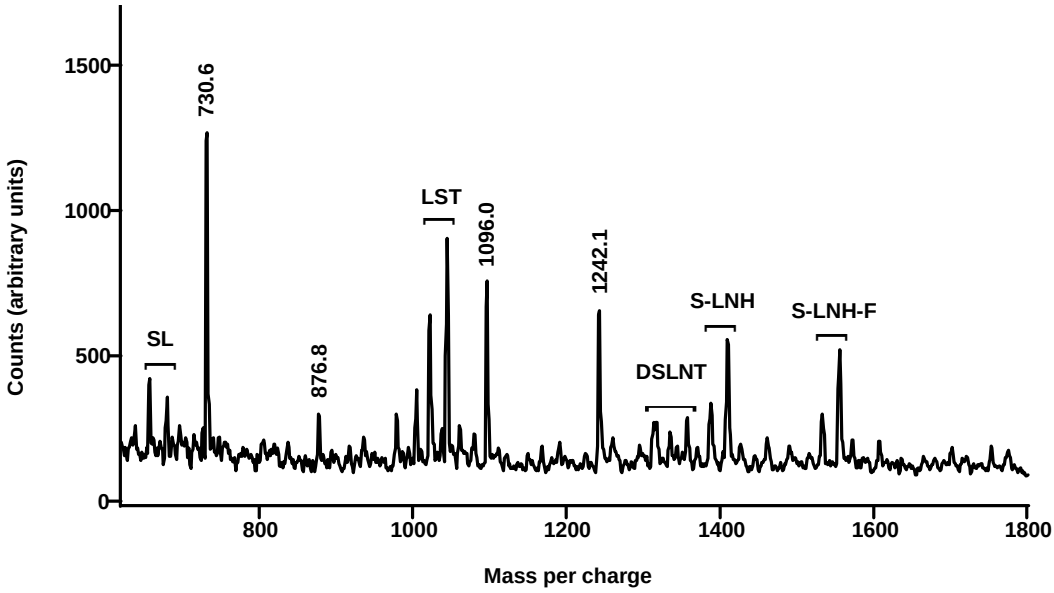


Abb. 18 MALDI-MS Spektrum (Voyager DE STR) der sauren Gesamtfraktion nach Vorinkubation mit Pankreassekret und anschließender Inkubation über 20 Stunden zusammen mit Bürstensaummembranen (Summe aus 50 Einzelspektren)

Die enzymatischen Nachweise freier Monomere ergaben, daß nach Inkubationszeiten bis zu 20 Stunden keine freie Glucose nachweisbar war. Die Bestimmung der freien NANA gab ebenfalls keinen Hinweis auf eine substantielle Freisetzung von Sialinsäuren. Das leichte Anwachsen des LNT-Peaks (731 Da) könnte als Hinweis auf eine begrenzte Hydrolyse der sialylierten Tetraosen LST und DSLNT gedeutet werden. Weitere Untersuchungen der Einzelfraktionen (siehe unten) bestätigten diese Annahme jedoch nicht.

Als Einzelfraktionen wurden SL bestehend aus 2'- und 3'-Sialyllactose, die Fraktion der LST, zusammengesetzt aus den Isomeren Lactosialyltetraose a, b und c, sowie DSLNT untersucht. Wiederum gaben weder die Befunde der enzymatischen Analyse noch die massenspektrometrischen Untersuchungen Hinweise auf eine nennenswerte Hydrolyse dieser HMO. Im enzymatischen Nachweis konnten nach längeren Inkubationszeiten kleine Mengen freier NANA nachgewiesen werden: Nach einer

Inkubation über 20 Stunden konnten maximal ca. 2,9 % der maximal abspaltbaren Menge an NANA enzymatisch erfaßt werden (**Tabelle 3**). Somit scheinen die Sialinsäuregruppen etwas leichter vom Grundgerüst abspaltbar als die Fucosegruppen.

Tabelle 3: Durchschnittliche Freisetzung von N-Acetylneuraminsäure (NANA) und Glucose in mg/dl bzw. in Prozent der maximal abspaltbaren Monosaccharidmenge nach Inkubation mit Pankreashomogenat und Bürstensaummembranen über 20 Stunden (Mittelwerte aus 4 Versuchsserien)

HMO	NANA mg/dl	NANA %	Glucose mg/dl	Glucose %
SL	0,69	1,1	0,09	0,6
LST	1,13	2,9	0,11	0,5
DSLNT	0,9	1,5	0,22	1,2

Bei den MALDI-Spektren von LST ließ sich - wie bei der Gesamtfraktion - das neutrale Tetrasaccharid LNT und bei den Spektren von DSLNT ließen sich sowohl LNT als auch LST nachweisen. Das Verhältnis der Massenpeaks blieb jedoch im Verlauf der Inkubation weitgehend konstant, so daß die Abspaltung von NANA nur im geringen Maße erfolgt sein kann, wie auch der enzymatische Nachweis belegt.

Die sauren HMO wurden ebenfalls wie zuvor für die neutralen HMO gezeigt mit Präparationen des Pankreasgewebes vom Schwein anstelle des humanen Pankreassekrets behandelt. Bereits nach vierstündiger Inkubation der sauren Gesamtfraktion waren bis auf Sialyllactose ($M - H^+ = 656$, $M - 2\,H^+ + Na^+ = 678$ Da) keine Massenpeaks mehr eindeutig identifizierbar (**Abb. 19**). Nach längeren Inkubationszeiten ließ sich auch die Sialyllactose nicht mehr im Spektrum identifizieren. Hierdurch konnte gezeigt werden, daß die glykosidischen Bindungen der sauren HMO durch intrazellulär lokalisierte (vermutlich lysosomale) Enzyme des Pankreas hydrolysierbar sind.

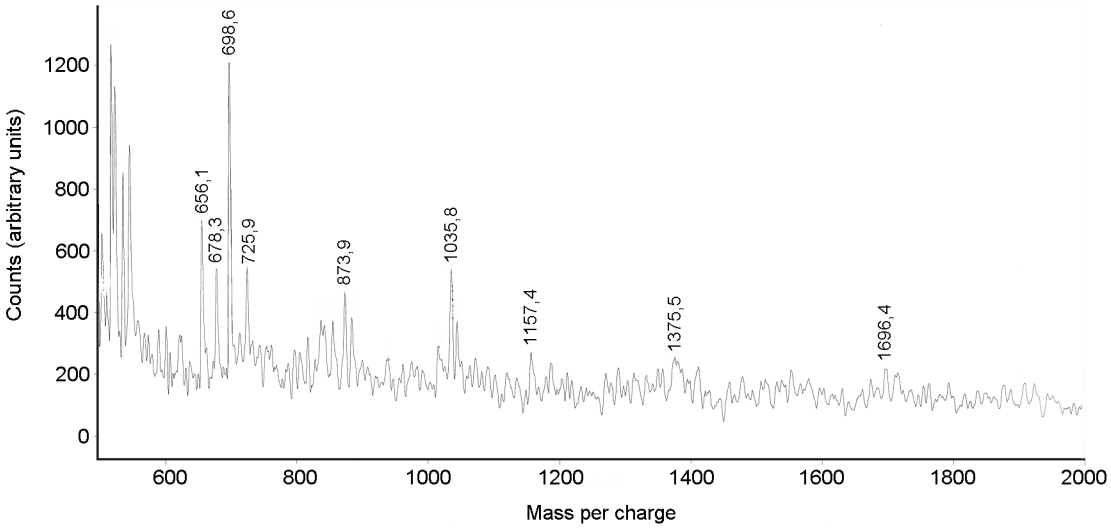


Abb. 19 MALDI-MS Spektrum (Voyager RP) der sauren Gesamtfraktion nach Inkubation mit Pankreashomogenat und Bürstensaummembranen über 4 Stunden (Summe aus 50 Einzelspektren)

Damit weisen alle Befunde dieser in vitro Hydrolyseexperimente auf eine außergewöhnlich hohe Stabilität der neutralen Oligosaccharide der Humanmilch hin. Die Enzymaktivitäten und Inkubationszeiten waren bei diesen Experimenten an den in vivo Bedingungen ausgerichtet. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß das humane Enzymmaterial (Duodenalaspirat und Dünndarmbiopsien) von jungen Erwachsenen stammte, da vergleichbare Proben von Säuglingen oder Kleinkindern nicht eingesetzt werden konnten. Mit Ausnahme der Lactase scheint jedoch beim Säugling kein Enzym der Kohlenhydratverdauung in höherer Aktivität als beim Erwachsenen vorzukommen. Es ist daher zu vermuten, daß die Aktivitäten der von uns eingesetzten Enzympräparate die im Säuglingsalter vorhandenen Aktivitäten sogar übertrafen. Eine gastrointestinale Enzymausstattung zur kompletten Spaltung der in HMO vorhandenen glykosidischen Bindungen ist daher weder für den Säugling noch für den Erwachsenen wahrscheinlich. Durch Inkubationszeiten bis zu 20 Stunden wurden in unseren Experimenten darüber hinaus extreme Versuchsbedingungen gewählt. Eine Übertragung auf in vivo Bedingungen läßt - unter Berücksichtigung aller Variablen - eine mindestens ebenso hohe Stabilität der neutralen HMO im menschlichen Verdauungstrakt erwarten.

Die große Hydrolyseresistenz gilt voraussichtlich auch für die sauren HMO, wenngleich hier eine gewisse Labilität der Bindung von NANA an das Grundgerüst vorhanden zu sein scheint. Bei den von H. Sabharwal et al. [146] untersuchten Faecesproben von Säuglingen und Kleinkindern wurden mit zunehmendem Alter der Kinder eine Zunahme des Verhältnisses von freier zu gebundener NANA gefunden, welches mit einer ansteigenden Sialidaseaktivität im Dünndarm begründet wurde. Daß überhaupt noch NANA in gebundener Form in den Faeces vorlag, spricht auch hier für die beträchtliche Stabilität der Bindungen, die offenbar selbst gegenüber den bakteriellen Enzymen des Dickdarms hydrolyseresistent waren.
Wie eingangs bereits erwähnt wurde, dienen Sialinsäuren vor allem im Wachstumsalter zum Aufbau der Ganglioside. NANA kann jedoch vom Körper selbst synthetisiert werden. Welche Bedeutung der mit den HMO zugeführten NANA zukommt, bleibt daher offen. Zwar führte eine orale Verabreichung von NANA in freier Form an neugeborene Ratten zu einem Einbau in Ganglioside und Glykoproteine und zu einer positiven Wirkung auf das Lernverhalten [22], ob jedoch in HMO gebundene NANA auch bei Säuglingen als Quelle dienen kann, scheint fraglich. Die vorliegenden Befunde weisen auf nur sehr geringe Mengen aus HMO freisetzbarer NANA im oberen Verdauungstrakt hin. Eventuell sind jedoch freie Sialinsäuren mit den in der Muttermilch enthaltenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren vergleichbar [112]. Hier scheint die Supplementierung der Formulanahrung die Entwicklung des Gehirns - zumindest in den ersten Lebensmonaten - zu fördern [169, 18]. Ergänzend sei eine kürzlich erschienene Metaanalyse erwähnt, die zeigen konnte, daß das Stillen mit einer besseren kognitiven Entwicklung des Säuglings assoziiert war [3].

Um zu prüfen, ob die hier in vitro nachgewiesene große Hydrolysestabilität der HMO auch in vivo zu demonstrieren ist, wurden exemplarische tierexperimentelle Studien an Mäusen durchgeführt, die im folgenden Kapitel beschrieben werden.

2.1.4 In vivo Modell zur Hydrolyse von Oligosaccharide der Humanmilch

2.1.4.1 Kurzdarstellung des Modells

Sieben Wochen alte weibliche Mäuse erhielten per Magensonde entweder Gynolactose (Gesamtfraktion der HMO), Glucose, Maltodextrin oder Fructooligosaccharide in Dosierungen von 25 bzw. 125 mg verabreicht. In einigen Versuchen wurde darüberhinaus fluoreszenzmarkiertes Dextran mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 4.400 Da zugesetzt. Über 14 Stunden verblieben die Mäuse in speziellen Stoffwechselkäfigen (**Abb. 20**), wobei im Abstand von 2 Stunden Faecesproben gesammelt wurden. Im Anschluß wurde den Mäusen der gesamte Darm entnommen. Der Inhalt der Darmabschnitte - proximaler und distaler Dünndarm, Caecum und Rectum - wurde aufgearbeitet. Alle Darm- und Faecesproben wurden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und die saccharidhaltigen bzw. fluoreszierenden Banden ausgewertet. (Eine ausführliche Darstellung der Materialien und Methoden findet sich auf den Seiten 155 bis 158)

Abb. 20 Stoffwechselkäfig für Mäuse mit Vorrichtung zur getrennten Sammlung von Urin und Faeces

2.1.4.2 Ergebnisse und Diskussion

Versuchsmodell und Testsubstanzen

Um die Hydrolysierbarkeit komplexer Oligosaccharide im intakten Organismus untersuchen zu können, wurde ein geeignetes Tiermodell gesucht. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit an HMO wurde die Maus als Modell gewählt. Eine Übertragung der Versuchsergebnisse auf den menschlichen Organismus ist natürlich nur bedingt möglich. So bildet beispielsweise bei Mäusen der Blinddarm (Caecum) den Hauptfermentationsort, während beim Menschen dieser Abschnitt lediglich eine ballonförmige Ausbuchtung darstellt. Erst im sich anschließenden Colon erreichen die Bakterienzahlen beim Menschen ihr Maximum und tragen damit maßgeblich zur Fermentation unverdaulicher Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSP) bei. In Kenntnis dieser speziesspezifischen Unterschiede bot das Mäusemodell jedoch die Möglichkeit, neben den Faeces auch die einzelnen Darmabschnitte untersuchen zu können und somit Vorgänge im oberen Dünndarm von denen im Dickdarm getrennt zu betrachten. Damit sollte es auch möglich sein, Hinweise auf eine Hydrolyse der HMO durch körpereigene Enzyme der Maus vom Abbau durch die Bakterienflora zu gewinnen. Zwar hätten säugende Mäuse (bis ca. 3 Wochen nach der Geburt) im Hinblick auf den menschlichen Säugling das bevorzugte Modell dargestellt, die Gefahr, die sehr kleinen Mäuse durch die Magensonde zu verletzen, war jedoch zu groß. Bei ausreichenden Mengen an Versuchsmaterial wären Schweine bzw. Ferkel aufgrund ähnlicher Verdauungsphysiologie geeignetere Tiermodelle für den Vergleich mit dem Menschen gewesen. Selbst hier wäre jedoch einschränkend zu bemerken, daß Schweine im Vergleich zum Menschen einen längeren Dünndarm besitzen, der zudem im unteren Abschnitt schon dicht von Bakterien besiedelt ist. Dies führt dazu, daß hier bspw. Abbauraten für NSP mit etwa 20 % der Gesamtkapazität im Vergleich zu vernachlässigbaren Mengen beim Menschen beobachtet werden [110].

Im Mäusemodell wurde zunächst die sogenannte Gynolactose eingesetzt. Dieses Oligosaccharidgemisch enthält sämtliche neutrale und saure HMO in der Zusammensetzung, wie sie in gepoolter Humanmilch vorliegen. Es muß hier darauf hingewiesen werden, daß durch die unzureichenden Abtrennungsverfahren für diese Fraktion meist noch Spuren von Lactose enthalten sind. Wie bei den in vitro Studien

wurde auch in den tierexperimentellen Studien Maltodextrin als Kontrollsubstanz eingesetzt. Seine inneren α 1-4 glykosidischen Bindungen werden durch Amylasen des Speichels und des Pankreas rasch gespalten und die entstandenen Di-, Tri- oder Tetrasaccharide werden durch membrangebundene Maltasen, Saccharasen und Isomaltasen weiter zu Glucose hydrolysiert. Diese Prozesse sind zum größten Teil bereits im Jejunum abgeschlossen.
Neben den leicht verdaulichen Sacchariden Glucose und Maltodextrin wurden mit Raftilose und Raftiline auch Vertreter der Gruppe der Fructooligosaccharide (FOS) untersucht. Raftilose und Raftiline unterscheiden sich voneinander in ihrem Polymerisierungsgrad: In Raftilose sind hauptsächlich FOS mit Kettenlängen von zwei bis acht vorhanden, in dem inulinähnlichen Produkt Raftiline variieren die Kettenlängen zwischen zwei und 60 Einheiten. Die Fructosemoleküle sind dabei β 2-1 glykosidisch miteinander verbunden. Beim Menschen sollen FOS weitgehend unverdaut in die tieferen Darmabschnitte gelangen, wo sie von der Bakterienflora nahezu vollständig verwertet werden [38, 9, 59].

Vergleich der Darminhalte von Mäusen nach Gabe von Glucose, Maltodextrin oder Gynolactose

Nach Gabe gleicher Mengen an Glucose, Maltodextrin und Gynolactose wurden 14 Stunden später die Darminhalte der Mäuse entnommen und einer dünnschichtchromatographischen Trennung und anschließender zuckerspezifischen Anfärbung mit Orcinol unterzogen. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Darminhalten in Abhängigkeit vom verabreichten Saccharid. Die Darminhalte sind in den nachfolgenden Abbildungen mit p für proximalen Dünndarm, d für distalen Dünndarm, C für Caecum und R für Rectum gekennzeichnet. Bei den Darminhalten der Mäuse, die Glucose erhalten hatten (abgekürzt Glucose-Mäuse) war außer den angefärbten Auftragspunkten auf den HPTLC-Platten lediglich eine sehr schwache Zuckerfärbung zu erkennen (**Abb. 21**). Dies sprach dafür, daß die verabreichte Glucose bereits vollständig resorbiert war. Auch bei den Inhalten aller vier Darmabschnitte von Mäusen, die Maltodextrin erhalten hatten (abgekürzt Maltodextrin-Mäuse), ließ sich praktisch keine Orcinol-positive Substanz mehr nachweisen. Das Maltodextrin war offenbar komplett hydrolysiert und die entstandenen Monosaccha-

ride über den Transporter SGLT 1 oder parazellulär resorbiert worden. (Anmerkung: Die gelben Spots, welche in den folgenden Abbildungen zu sehen sind, stellen Artefakte dar, die während der Probenentwicklung entstanden sind)

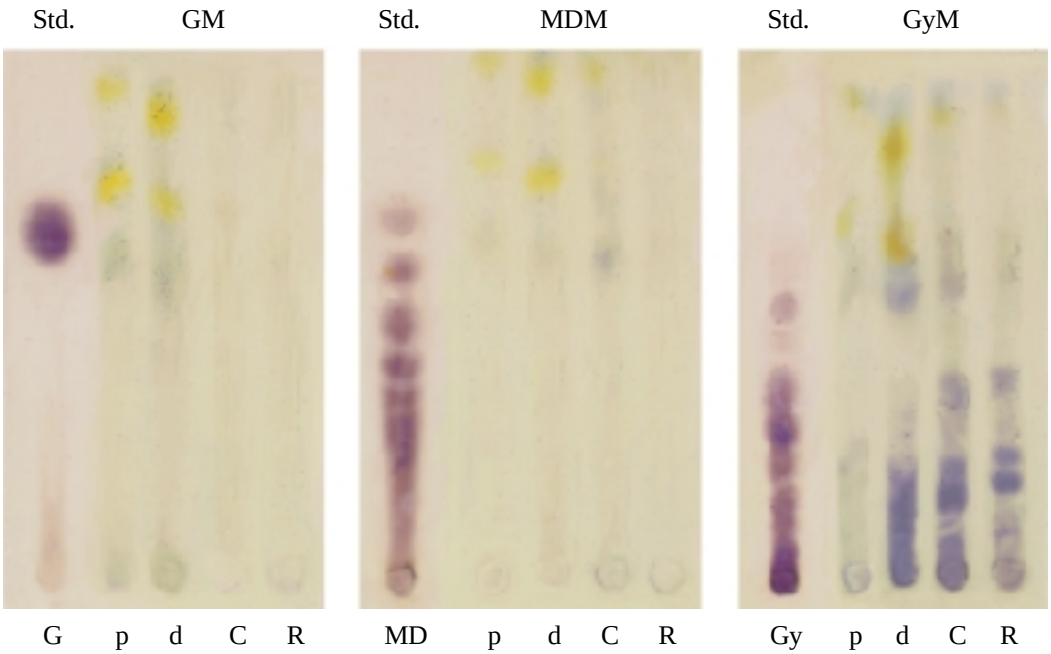


Abb. 21 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters der Darminhalte von Mäusen 14 Stunden nach Gabe von Glucose (links), Maltodextrin (Mitte) oder Gynolactose nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Anfärbung mit Orcinol (rechts; Std = Standard, G = Glucose, MD = Maltodextrin, Gy = Gynolactose, M = Maus, p = proximaler Dünndarm, d = distaler Dünndarm, C = Caecum, R = Rectum)

Die Saccharidmengen, die diese Mäuse verabreicht bekamen, waren mit 125 mg relativ hoch. Die Verwendung niedrigerer Dosierungen (25 mg) erbrachte annähernd die gleichen Ergebnisse, jedoch waren die Banden auf den HPTLC-Platten kaum mehr erkennbar. So werden hier und im folgenden die Ergebnisse nach Gabe der höheren Dosis (125 mg) dargestellt - auch wenn bei diesen Versuchen nicht mehr von physiologischen Mengen ausgegangen werden kann.

Im Gegensatz zu den Glucose- und Maltodextrin-Mäusen waren bei den Darminhalten der Mäuse nach Gabe von Gynolactose (abgekürzt Gynolactose-Mäuse) auch außer dem Auftragspunkt noch weitere eindeutige Zuckerbanden erkennbar. Die Stärke der Färbung auf den HPTLC-Platten ließ eine gewisse semiquantitative Aussage zu. Nahezu alle HMO hatten den proximalen Teil des Dünndarms passiert und

erstreckten sich auf die tieferen Darmabschnitte, wo das Verteilungsmuster der Gynolactose weitgehend erkennbar war. Im Vergleich zum distalen Dünndarm und Caecum schien der Inhalt des Rectums geringere Mengen an komplexen Oligosacchariden aufzuweisen (Abb. 21). Dies war vermutlich auf die Aktivität der Dickdarmbakterien zurückzuführen. Eine vollständige Hydrolyse des Oligosaccharidgemisches durch die Bakterien konnte jedoch innerhalb der 14 Stunden nicht erreicht werden. Da der Abbau der komplexeren HMO nicht mit dem Erscheinen von klei-neren Sacchariden einherging, kann davon ausgegangen werden, daß etwaige Hydrolyseprodukte ebenso bakteriell verstoffwechselt wurden.

Vergleich der Darminhalte von Mäusen nach Gabe von Fructooligosacchariden

Die Orcinolanfärbungen der Darminhalte der Mäuse nach Gabe des Fructooligosaccharids Raftilose (abgekürzt Raftilose-Mäuse) wiesen auf eine partielle Hydrolyse in den unteren Darmabschnitten hin (**Abb. 22**). Im proximalen Dünndarm waren keine Banden zu erkennen, ab dem distalen Abschnitt waren leichte Färbungen im mittleren Plattenbereich in der Größenordnung eines Hexasaccharids nachweisbar. Caecum- und Rectuminhalte wiesen deutliche Färbungen, insbesondere in der Höhe von Mono- und Disacchariden auf. Die im Ausgangsprodukt dominierenden Tri- bis Hexasaccharide waren somit teilweise hydrolysiert worden.

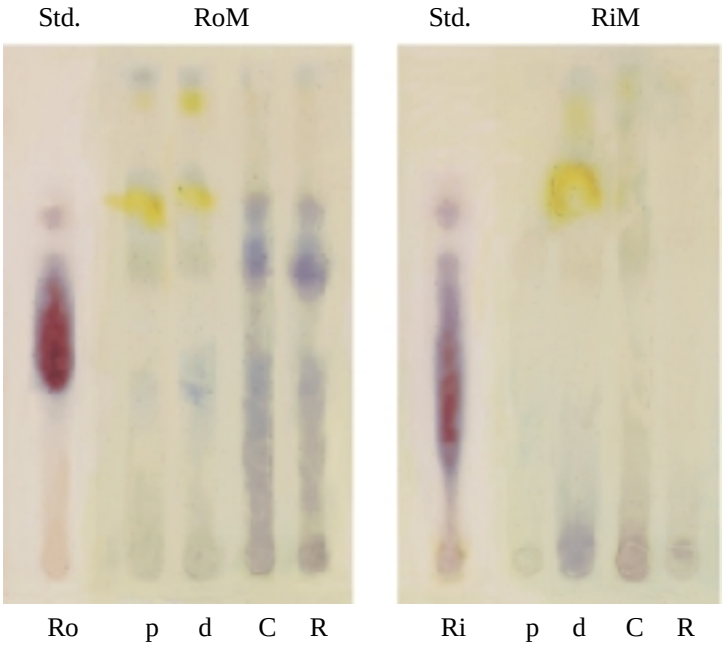


Abb. 22 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters der Darminhalten von Mäusen 14 Stunden nach Gabe von Raftilose (links) oder Raftiline (rechts) nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Anfärbung mit Orcinol (Std = Standard, Ro = Raftilose, Ri = Raftiline, M = Maus, p = proximaler Dünndarm, d = distaler Dünndarm, C = Caecum, R = Rectum)

Die Darminhalte der Mäuse nach Gabe von Raftiline (abgekürzt Raftiline-Mäuse) wiesen außer an den Auftragspunkten keine orcinolfärbbaren Banden auf. Die Transitzeit mußte demnach deutlich kürzer als bei den Vergleichssubstanzen sein. Die Gabe von Raftiline hatte bei den Mäusen auch eine laxierende Wirkung. Im Vergleich zu Raftilose liegt der Polymerisierungsgrad des Fructooligosaccharids Raftiline deutlich höher, was auch anhand der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Standardproben sichtbar wurde. Eine kürzere Transitzeit der Raftiline im Vergleich zu Raftilose wurde auch bei der Verabreichung an Menschen beobachtet [unveröffentlichte Befunde].

Vergleich der Faecesproben von Mäusen nach Gabe von Glucose, Maltodextrin oder Gynolactose

Im Verlauf der Stoffwechselversuche über 14 Stunden wurden in Zeitintervallen von zwei Stunden Faeces gesammelt - zusammen mit den Faecesproben vor Versuchsbeginn konnten so maximal acht Faecesproben pro Maus ausgewertet werden. Meist produzierten die Mäuse während der ersten 4 Stunden, also zwischen 20 und 24 Uhr, die Hauptmenge an Faeces, anschließend konnten nur noch vereinzelt Proben gesammelt werden. Die frühen Faecesproben der Mäuse nach Glucosegabe zeigten nach der Orcinolreaktion neben den Auftragsstellen leichte Anfärbungen auf Glucosehöhe (**Abb. 23**). Die innerhalb der ersten zwei Stunden gesammelten Faecesproben sind mit F1, innerhalb der folgenden zwei Stunden mit F2 usw. gekennzeichnet. Nach vier Stunden waren keine Saccharide mehr in den Faeces nachweisbar. Von den Maltodextrin-Mäusen waren zwei bis vier Stunden nach Substanzgabe Faeces abgegeben worden, bei denen zusätzlich zur Anfärbung von Monosacchariden leichte Färbungen im unteren Drittel der Platte erkennbar waren. Diese Banden könnten Dextrinen mit DP zwischen 5 und 10 entsprechen. Ein kleiner Teil des Maltodextrins scheint den Darm recht schnell passiert zu haben und der vollständigen Hydrolyse entkommen zu sein. Eventuell hatte die ungewohnte Umgebung eine anfängliche Transitbeschleunigung der Darminhalte bei den Mäusen hervorgerufen, was sich im weiteren Versuchsverlauf normalisiert hatte. Die späteren Faecesproben wiesen keine Orcinol-positiven Banden mehr auf. Man kann somit davon ausgehen, daß das Dextringemisch innerhalb von vier bis sechs Stunden hydrolysiert und verwertet wurde.

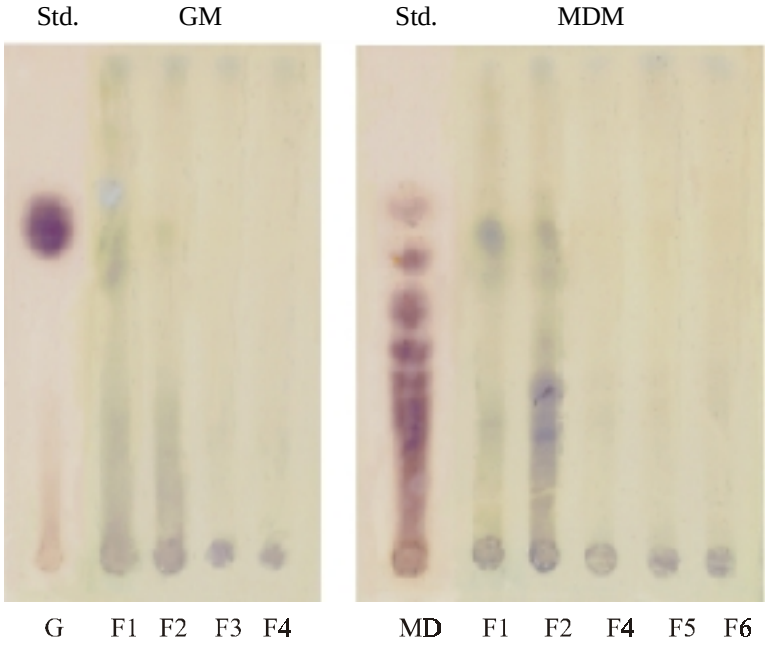


Abb. 23 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters der Faeces von Mäusen, die entweder Glucose (links) oder Maltodextrin (rechts) erhalten hatten nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Anfärbung mit Orcinol (Std = Standard, G = Glucose, MD = Maltodextrin, M = Maus, F1 = Faeces zwischen Versuchsbeginn (20 Uhr) und 22 Uhr, F2 = Faeces zwischen 22 und 24 Uhr, usw. bis F6 = Faeces zwischen 6 und 8 Uhr)

Die Gynolactose-Mäuse produzierten lediglich während der ersten sechs Stunden nach Gynolactoseeinnahme noch Faeces. Die früh abgegebenen Proben zeigten deutliche Oligosaccharidfärbungen (**Abb. 24**, links). Vor der Substanzgabe gesammelte Faecesproben wurden vergleichend aufgetragen und sind mit F0 gekennzeichnet. Zusätzlich zu den Banden, die den Laufeigenschaften des Oligosaccharidgemisches von Gynolactose entsprachen, waren bereits bei den ersten Faecesproben Färbungen im oberen Plattenbereich zu sehen: Eine Bande lag auf Glucosehöhe und eine etwas tiefer liegende Bande stellte möglicherweise Lactose dar. Nach vier bis sechs Stunden waren nur noch geringe Saccharidmengen in den Faeces vorhanden, was auf eine - wenn auch verspätete - Verwertung durch die Bakterienflora hinweisen würde. Bemerkenswert war, daß bei den meisten Mäusen, welche Gynolactose erhalten hatten, zwei Stunden nach der Gabe bereits deutliche Mengen an Oligosacchariden in den Faeces nachweisbar waren und trotzdem nach Versuchsende noch Oligosaccharide im unteren Dünndarm vorhanden waren. Eventuell ist ein Rückkopplungsmechanismus eingeschaltet worden, der das längere Verweilen

des Nahrungsbreis im Caecum und eine effizientere Verwertung des Dickdarminhaltes bewirkt hatte.

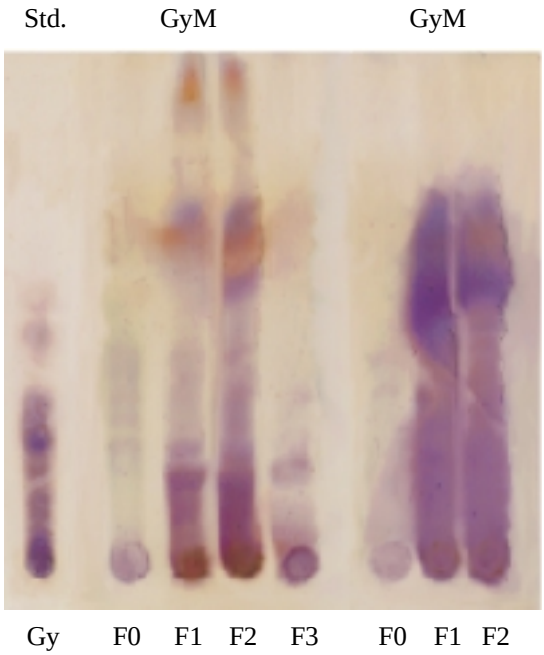


Abb. 24 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters der Faeces von Mäusen, die Gynolactose erhalten hatten nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Anfärbung mit Orcinol (Std = Standard, Gy = Ganolactose, M = Maus, F0 = Faeces vor Versuchsbeginn, F1 = Faeces zwischen Versuchsbeginn (20 Uhr) und 22 Uhr, F2 = Faeces zwischen 22 und 24 Uhr, F3 = Faeces zwischen 0 und 2 Uhr)

Durch die in Abbildung 24 gezeigten Faecesproben zweier Mäuse soll auch auf die zum Teil recht erheblichen Unterschiede zwischen den Tieren aufmerksam gemacht werden: Die in den Faeces gefundenen Mengen an Sacchariden waren bei den links gezeigten Faecesproben deutlich geringer als bei denen einer anderen Maus (Abb. 24, rechts). Der Inhalt des Rectums dieser Maus hatte kaum noch Anfärbungen gezeigt, so daß man von einer höheren Transitgeschwindigkeit ausgehen muß. Dies hat vermutlich dazu geführt, daß die bereits hydrolysierten HMO (starke Anfärbung auf Mono- und Disaccharidhöhe) nicht mehr von den Dickdarmbakterien verwertet werden konnten. Dies weist auch darauf hin, daß die individuellen Unterschiede zwischen den Mäusen berücksichtigt werden müssen.

Vergleich der Faecesproben von Mäusen nach Gabe von Fructooligosacchariden

Während der ersten zwei Stunden nach Gabe von Fructooligosacchariden (FOS) waren noch keine substantiellen Mengen an Raftilose oder deren Abbauprodukte in die Faeces gelangt (**Abb. 25**, links). Danach konnte man ein Bandenmuster erkennen, welches dem der applizierten Raftilose entsprach. Nochmals zwei Stunden später war der Anteil an höhermolekularen Sacchariden vermindert und eine starke Anfärbung war nur noch im Bereich von Di- und Trisacchariden zu sehen. Im Vergleich zu Studien an Menschen, bei denen die FOS fast vollständig in den unteren Darmabschnitten hydrolysiert wurden [59], überraschte hier die noch relativ hohe Konzentration an intakten oder nur teilweise verdauten FOS in den Mäusefaeces. Die Begründung hierfür liegt wahrscheinlich in der kürzeren Transitzeit der Mäuse und der recht hohen Dosis, die den Tieren appliziert worden war und die möglicherweise direkt auf die Transitzeit wirkte. Auch die frühen Faecesproben der Raftiline-Mäuse zeigten deutliche Orcinolfärbungen auf (Abb. 25, rechts).

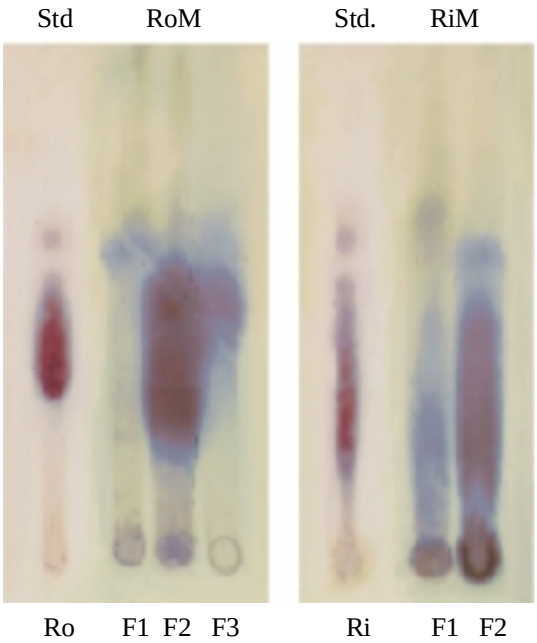


Abb. 25 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters der Faeces von Mäusen, die Raftilose (links) oder Raftiline (rechts) erhalten hatten nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Anfärbung mit Orcinol (Std = Standard, Ro = Raftilose, Ri = Raftiline, M = Maus, F1 = Faeces zwischen Versuchsbeginn (20 Uhr) und 22 Uhr, F2 = Faeces zwischen 22 und 24 Uhr, F3 = Faeces zwischen 0 und 2 Uhr)

Nach vier Stunden hatten die Raftiline-Mäuse zuletzt Faeces abgegeben. Da keine Oligosaccharide in den Darminhalten nachweisbar waren, mußten die Oligosaccharide den gesamten Verdauungstrakt dieser Mäuse innerhalb der ersten vier Stunden passiert haben - es sei denn, eine vollständige bakterielle Fermentation und Resorption der Produkte hätte noch in der Zeit zwischen der letzten Faecesabgabe (24 Uhr) und dem Versuchsende (10 Uhr) stattgefunden. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich und weitere Untersuchungen zur Resorption wiesen ebenfalls nicht darauf hin. Auch wenn die Transitzeit durch Raftiline deutlich verkürzt wurde, konnte bei den Tieren aufgrund der Stuhlkonsistenz nicht von einer Diarrhoe gesprochen werden. Geringere Mengen hätten vielleicht zu einer effizienteren Verwertung der FOS geführt. Die Verminderung der Dosis auf 10 mg FOS, was bezogen auf das Körpergewicht beim Menschen einer gut tolerierbaren Menge entsprochen hätte, unterschritt jedoch die Nachweisgrenze der HPTLC.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß das verabreichte Maltodextringemisch - wie erwartet - von den Mäusen schnell und nahezu vollständig in den oberen Darmabschnitten hydrolysiert wurde. Dagegen scheinen die Oligosaccharide der Humanmilch auch in vivo eine sehr hohe Resistenz gegenüber den Verdauungsenzymen im Intestinaltrakt der Mäuse zu besitzen - vergleichbar mit den FOS. Selbst die bakteriellen Enzyme bewirkten nur eine teilweise Hydrolyse und besonders in den früh abgegebenen Faeces waren noch signifikante Mengen an HMO nachweisbar. Auch wenn diese ersten tierexperimentellen Studien zum Schicksal der HMO im Gastrointestinaltrakt unter artifiziellen Bedingungen und mit hoher Dosierung der Saccharide durchgeführt wurden, bieten sie dennoch wertvolle Hinweise auf eine recht hohe Hydrolysestabilität der HMO auch in vivo. Damit werden auch die Befunde an gestillten Säuglingen erhärtet, die in Stuhlproben unveränderte HMO nachweisen konnten [31, 33, 144]. Hinweise auf die von A. Lundblad et al. formulierte Hypothese, nach der die HMO im Dünndarm teilweise hydrolysiert und leicht verändert wieder resynthetisiert werden [107], konnten die tierexperimentellen Studien nicht liefern. Mehrere Versuche, die Oligosaccharide und eventuelle Abbauprodukte mittels MALDI-MS Analyse im Darminhalt und Faeces zu charakterisieren, verliefen aufgrund des komplexen Probenmaterials, von Matrixeffekten und begrenzter Probenmenge wenig erfolgreich.

Nachweis von fluoreszenzmarkiertem Dextran in Darm- und Faecesproben von Mäusen

Einigen der Versuchstiere wurde zusätzlich zu den oben beschriebenen Sacchariden fluoreszenzmarkiertes Dextran verabreicht. Dieser Zusatz sollte Auskunft über die Transitgeschwindigkeit im Verdauungstrakt und über die Verteilung im Körper geben. Darüberhinaus konnte Dextran als weitere Vergleichssubstanz zu den HMO herangezogen werden. Dextran ist ein Polysaccharid, bestehend aus α 1-6 verknüpften Glucosemolekülen. Der intestinale Abbau beginnt beim Menschen im Duodenum durch den Angriff von Isomaltasen, zum Teil auch von Maltasen [153]. Die Spaltung der α 1-6 glykosidischen Bindungen läuft jedoch langsamer ab als die der α 1-4 glykosidischen Bindungen, wie sie in Maltodextrin vorhanden sind. Das mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markierte Dextran (abgekürzt Dextran) besaß ein durchschnittliches Molekulargewicht von 4.400 Da und verblieb in nativer Form bei einem HPTLC-Lauf nahezu vollständig auf dem Auftragspunkt. Unter UV Licht war es dabei als gelb leuchtender Spot zu sehen. Intaktes Dextran zeigte nach Reaktion mit Orcinol eine dunkel violette bis braune Färbung des Auftragspunktes. Die durch den Abbau entstandenen Dextranbruchstücke waren auf dem UV Schirm sehr gut, bei der Orcinolfärbung dagegen kaum zu erkennen. Die fluoreszierenden Banden wurden direkt auf der HPTLC-Platte markiert und photographisch dokumentiert. Für die Dokumentation nach Orcinolfärbung wurden die Platten eingescannt und einer Bildverarbeitung unterzogen.

Die gute Nachweisbarkeit des Fluoreszenzmarkers erleichterte in unseren Experimenten die Bestimmung der Transitgeschwindigkeit und des Hydrolysegrades. Die Verteilung des Dextrans auf die Darmabschnitte konnte während der Probenaufbereitung bereits nach dem Abzentrifugieren der festen Bestandteile sehr gut bei UV-Licht verglichen werden (**Abb. 26**). Durchweg besaßen die Caecuminhalte bei den Darmproben die höchste Fluoreszenzintensität. Bei den Gynolactose-Mäusen und noch ausgeprägter bei den Raftilose- und Raftiline-Mäusen war der obere Intestinaltrakt am Versuchsende bereits frei von Dextran. Selbst ohne größere Probenaufarbeitung konnte gezeigt werden, daß die Transitzeit nach Gabe von komplexeren Oligosacchariden im Vergleich zur Gabe von Glucose oder Maltodextrin deutlich kürzer war. (Auf den Nachweis der Fluoreszenz in Leber und Urin wird unter 2.2.3 eingegangen)

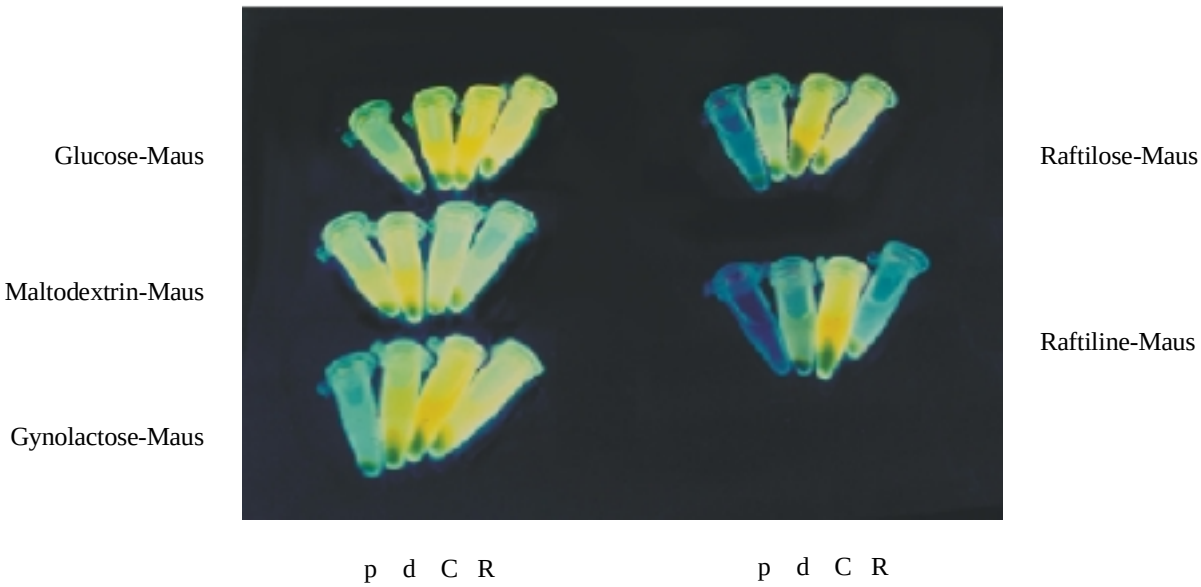
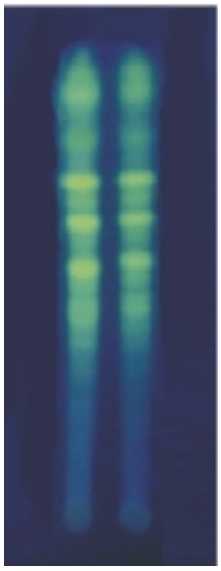


Abb. 26 Repräsentative Darstellung der Darminhalte von Mäusen 14 Stunden nachdem sie Glucose, Maltodextrin, Gynolactose, Raftilose oder Raftiline zusammen mit fluoreszenzmarkiertem Dextran erhalten hatten (p = proximaler Dünndarm, d = distaler Dünndarm, C = Caecum, R = Rectum; unter UV-Licht)

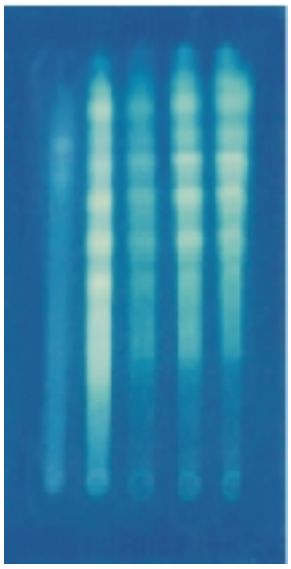
Die dünnschichtchromatographischen Trennungen der Proben zeigten, daß zum Versuchsende kaum noch intaktes Dextran in den Darminhalten der Mäuse vorhanden war. Bereits im proximalen Dünndarm konnten Banden von Dextranbruchstücken nachgewiesen werden. Zwar war die Fluoreszenz in diesen Proben nicht sehr stark, die Laufhöhen der Dextranbruchstücke entsprachen jedoch den Banden, die im Caecum und Rectum stärker sichtbar wurden. Der Vergleich der Darminhalte des Caecums und des Rectums, also zu Beginn und nach der bakteriellen Einwirkung, zeigte überraschenderweise keine substantiellen Unterschiede in der Hydrolyserate (**Abb. 27**). Die Bandenmuster waren nahezu identisch und ein weiterer Abbau des Dextrans, den man durch die Aktivität bakterieller Exoenzyme hätte erwarten können, trat offenbar nicht ein. Dies war unabhängig davon, ob ein leicht oder schwer verdauliches Saccharid gleichzeitig mit verabreicht wurde.



C R

Abb. 27 Repräsentative Darstellung der Darminhalte einer Maus 14 Stunden nachdem sie Gynolactose zusammen mit fluoreszenzmarkiertem Dextran erhalten hatte nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und unter UV-Licht (C = Caecum, R = Rectum)

Nach der Verabreichung der größeren Dextranmenge (12,5 mg, Abb. 27) waren in den unteren Darmabschnitten nach der chromatographischen Trennung bis zu 12, aus dem Dextranabbau resultierende, einzelne Banden zu erkennen. Die oberste Bande wanderte kurz hinter der Laufmittelfront und stellte vermutlich FITC gekoppelte Glucose dar, gefolgt von markierten Di-, Tri-, Tetrasacchariden usw. Bei Erniedrigung der Dextrandosis (4,1 mg) waren prinzipiell die gleichen Ergebnisse zu beobachten, die einzelnen Banden waren jedoch kaum mehr unterscheidbar. Der Einsatz von fluoreszenzmarkiertem Dextran erwies sich sowohl zur Bestimmung der Transitzeit als auch zum indirekten Hinweis auf die hohe Stabilität der HMO als gut geeignet. Während die HMO weitgehend intakt den Verdauungstrakt passierten, wurden selbst die α 1-6 glykosidischen Bindungen des Dextrans effizient hydrolysiert. Die fortschreitende Hydrolyse des fluoreszenzmarkierten Dextrans war auch bei den Faecesproben der Mäuse sichtbar: Je später die Faecesproben abgegeben worden waren, desto höher war der Anteil der stärker hydrolysierten Dextranbruchstücke. Beispielhaft seien in **Abb. 28** die über 12 Stunden gesammelten Faecesproben einer Maltodextrin-Maus gezeigt.



F1 F2 F4 F5 F6

Abb. 28 Repräsentative Darstellung der Faeces einer Maus, die Maltodextrin zusammen mit fluoreszenzmarkiertem Dextran erhalten hatte nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und unter UV-Licht (F1 = Faeces zwischen Versuchsbeginn (20 Uhr) und 22 Uhr, F2 = Faeces zwischen 22 und 24 Uhr, usw. bis F6 = Faeces zwischen 6 und 8 Uhr)

Die gleichzeitige Gabe von 12,5 mg Dextran und 125 mg der Testsaccharide zeigte damit weder einen Einfluß auf das Abbauverhalten des Dextrans noch auf das der Testsubstanzen. Erst bei einer weiteren Erhöhung der Dosis des Dextrans auf 25 und der Testsaccharide auf 250 mg bewirkten die komplexeren Oligosaccharide wie die HMO eine deutliche Verlangsamung des Dextranabbaus (**Abb. 29**, rechte Spalten). Intaktes fluoreszierendes Dextran war nach Gabe solch hoher Mengen an Gynolactose selbst nach 14 Stunden noch im unteren Dünndarm vorhanden und auch die im Rectum sichtbaren Bruchstücke waren noch deutlich größer als nach der Gabe entsprechender Mengen der Vergleichssubstanz Maltodextrin (Abb. 29, linke Spalten).

Abb. 29 Repräsentative Darstellung der Darminhalte von Mäusen 14 Stunden nachdem sie 250 mg Maltodextrin (links) oder Gynolactose (rechts) zusammen mit 25 mg fluoreszenzmarkiertem Dextran erhalten hatten nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und unter UV-Licht (MD = Maltodextrin, Gy = Gynolactose, M = Maus, d = distaler Dünndarm, C = Caecum, R = Rectum)

Faßt man die Ergebnisse der in vitro und der in vivo Untersuchungen zusammen, scheinen die HMO eine große Stabilität gegenüber den intestinalen Verdauungsenzymen aufzuweisen. Erst der Einfluß bakterieller Enzyme führt zu einer partiellen Hydrolyse und Verwertung der HMO im Gastrointestinaltrakt. Übertragen auf den Säugling ist daher zu postulieren, daß auch hier der Großteil der HMO intakt die unteren Darmabschnitte erreicht. Die Hydrolysestabilität in den oberen Darmabschnitten ist einerseits Voraussetzung für die postulierte anti-adhäsive Wirkung der HMO sowohl im Intestinaltrakt als auch - in beschränktem Maß - nach ihrer Resorption im Urogenitaltrakt. Andererseits ermöglicht die enzymatische Resistenz, daß die Oligosaccharide präbiotisch auf die Colonozyten wirken können. Auch wenn unsere Versuchsergebnisse an der Maus eine vollständige Hydrolyse im Dickdarm in Frage stellen, weist die einführend erwähnte H_2-Exhalationsstudie an Säuglingen auf eine umfangreiche Verwertung der HMO durch die Bakterienflora hin [20]. Diese scheinbare Diskrepanz ist vermutlich in erster Linie auf die hier verwendeten Dosierungen und möglicherweise auch auf die spezielle Physiologie des Gastrointestinaltrakts der Maus zurückzuführen.

2.2 Können Oligosaccharide der Humanmilch in intakter Form oder als Bruchstücke resorbiert werden und biologische Wirkungen im Intermediärstoffwechsel entfalten ?

2.2.1 Studien über den Nachweis von Oligosacchariden der Humanmilch im Urin gestillter Säuglinge

Es ist bisher wenig darüber bekannt, ob und in welchem Umfang Oligosaccharide der Humanmilch vom Säugling resorbiert werden können. In der Literatur finden sich mehr Studien über den Nachweis von Oligosacchariden im Urin von Schwangeren und laktierenden Müttern, als über den Oligosaccharidnachweis im Urin von Säuglingen [105, 188, 106]. Dies liegt daran, daß im letzten Trimester der Schwangerschaft und während der Stillphase relativ große Mengen an Sacchariden renal ausgeschieden werden. Der Lactosegehalt des Urins steigt bspw. während der Schwangerschaft auf das sechsfache, kurz nach der Geburt auf das 20-fache an [69]. Die Untersuchung des Oligosaccharidmusters im Urin wird bereits bei der Früherkennung einiger Krankheiten angewendet [89, 156].

Die einzigen quantitativen Angaben über die Oligosaccharidausscheidung im Urin reifgeborener und gestillter Kinder stammen von der Arbeitsgruppe von G. Coppa [31]. In dieser Studie wurde der Urin von zehn 30 Tage alten Säuglingen und deren Mütter mittels HPTLC- und HPLC-Techniken auf Saccharide untersucht. Dabei zeigte sich eine überraschend hohe tägliche renale Ausscheidung von ca. 300 bis 500 mg Oligosacchariden bei den Kindern und 500 bis 800 mg bei den Müttern. Leider werden in dieser Studie keine Einzeldaten angegeben und nur wenige HPTLC-Ergebnisse dargestellt, sodaß z.B. kein genereller Vergleich zwischen dem Oligosaccharidmuster der Muttermilch und des Urins vorgenommen werden kann. Das Oligosaccharidmuster des Urins einer Mutter, welches gezeigt wird, ist jedoch nahezu identisch mit dem ihrer Milch. Dagegen weist der von ihr gestillte Säugling lediglich geringe Mengen an Di- und Trisacchariden im Urin auf. Bezogen auf die mit der Muttermilch im gleichen Zeitraum normalerweise aufgenommenen Menge an Oligosacchariden würde sich nach G. Coppa eine renale Elimination von ca. 4 bis 7 % berechnen lassen. Vom selben Autor wurden jedoch in einem Übersichtsartikel Wiederfindungsraten von HMO im 24-Stunden-Urin von bis zu 960 mg bei sechs

untersuchten Säuglingen angegeben, was einem Anteil von ca. 10 % der aufgenommenen Menge bei einem Oligosaccharidgehalt der Milch von 12 g/l entsprechen würde [33]. Der Anteil der mit den Faeces ausgeschiedenen Menge, der bei dieser Studie ebenfalls bestimmt worden war, wurde mit durchschnittlich 8 % der Aufnahme angegeben. Obwohl diese Untersuchung als ”preliminary study” bezeichnet wurde, ist bisher keine weitere Studie dieser Arbeitsgruppe zur renalen Ausscheidung von HMO vorgelegt worden.

Von C. Kunz und S. Rudloff et al. liegen ebenfalls Untersuchungen über den Oligosaccharidgehalt im Urin von Säuglingen vor, jedoch ausschließlich von Frühgeborenen [140, 92]. In dieser Studie wurde die renale Exkretion von Lactose und Oligosacchariden bei gestillten und mit einer Formulakost ernährten Säuglingen verglichen. Die quantitative Auswertung mittels HPAEC ergab für den Urin wesentlich niedrigere Werte als in den Studien G. Coppas. Bei allen Säuglingen wurden laut Autoren nur ca. 1 % der aufgenommenen Menge an Oligosacchariden renal ausgeschieden. Eigene Berechnungen kommen auf etwa 0,25 % bei den HMO und 0,14 % bei der Lactose. Die untersuchten Kinder waren durchschnittlich 30 Tage alt, ihr Körpergewicht lag aber mit ca. 2,3 kg noch immer deutlich unter dem von Reifgeborenen. Da die Dichtigkeit des Darms gegenüber größeren Molekülen mit der Reife bzw. dem Alter des Kindes korreliert, würde man bei Reifgeborenen gleichen postnatalen Alters - wie bei dem Untersuchungskollektiv von G. Coppa - noch geringere Mengen an resorbierten und renal ausgeschiedenen Mengen an HMO erwarten. Wodurch diese enorme Differenz in den Wiederfindungsraten (durchschnittlich 400 mg/Tag bei G. Coppa et al. versus 10 mg/Tag bei S. Rudloff et al.) zu erklären ist, bleibt unklar. Die Studien zur Oligosaccharidausscheidung im Urin gestillter Kinder lassen dennoch vermuten, daß nur kleinste Mengen renal ausgeschieden werden und daß zuvor keine bedeutende Prozessierung der Oligosaccharide im Darm stattgefunden hat. Über Art und Umfang der intestinalen Resorption geben diese Studien jedoch keine Auskunft. So kann nicht a priori davon ausgegangen werden, daß die im Urin eliminierte Menge an Oligosacchariden tatsächlich der resorbierten Menge entspricht. Die Frage, wie die komplexen und höhermolekularen Strukturen überhaupt resorbiert werden können, ist beim Menschen nie untersucht worden.

Für die Existenz von Oligosaccharidrezeptoren oder -transportern an den menschlichen Darmepithelzellen liegen bisher keine Hinweise vor. Lediglich bei Beuteltieren wurden überhaupt Studien zur Resorption von Oligosacchariden durchgeführt. Bei säugenden Känguruhs werden sowohl Lactose als auch die galactosehaltigen Oligosaccharide der Muttermilch über Pinocytose von den Dünndarmzellen aufgenommen und intrazellulär mit Hilfe von lysosomalen Enzymen hydrolysiert [37]. Eine solche Aufnahme und Prozessierung der Saccharide ist beim menschlichen Säugling nur in geringstem Umfang zu erwarten. Auch wenn intakte Lactose im Urin und in den unteren Darmabschnitten vieler Säuglinge nachgewiesen werden kann, wird der überwiegende Teil der Lactose im Dünndarm zu den Monosaccharidbestandteilen hydrolysiert und anschließend in die Darmzelle aufgenommen [17]. Hierzu existiert offenbar eine vektorielle Kooperation des Enzymkomplexes Lactase-Phlorizinhydrolase mit dem Glucosetransporter SGLT1 [114], die für die effektive Aufnahme der Monosaccharidbestandteile verantwortlich ist. Für eine Resorption der HMO scheint dagegen der parazelluläre Weg am wahrscheinlichsten (**Abb. 30**, D). Dieser von den “tight junctions” regulierte Transportweg über die Zellzwischenräume ist für eine Reihe anderer Substanzen ähnlicher Molmassen bereits beschrieben worden [129].

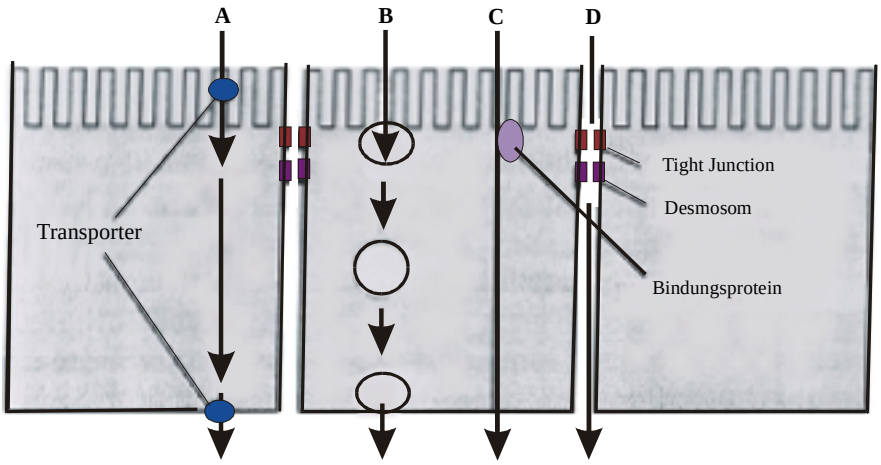


Abb. 30 Die vier möglichen Wege der intestinalen Absorption von Soluten: A = transportervermittelte Aufnahme, B = Transcytose, C = transzelluläre Diffusion, D = parazelluläre Aufnahme

Unter der Annahme einer nennenswerten intestinalen Resorption von HMO würden diese mit dem Portalblut zunächst zur Leber als dem zentralen Stoffwechselorgan

gelangen. Die Leberzellen sind recht durchlässig, verfügen jedoch über eine große Anzahl lysosomaler Enzyme. Ob hier eine Prozessierung der Oligosaccharide stattfindet, ist völlig ungeklärt. Möglicherweise gelangen die Milcholigosaccharide weiter über den Blutweg zur Niere. Moleküle bis 5.000 Da (was einem HMO bestehend aus bis zu 26 Monosaccharideinheiten entspräche) können nahezu ungehindert glomerulär filtriert werden und in das Nephron übertreten. Die negative Ladung der sauren HMO könnte diesen Vorgang jedoch behindern. Erfolgt keine Rückresorption der filtrierten Oligosaccharide würden diese schließlich mit dem Endharn ausgeschieden und wären somit nachweisbar.

Aufgrund der bestehenden Wissenslücken zum Schicksal der humanen Milcholigosaccharide versuchten wir, Art und Umfang der Resorption, ihre Ausscheidung mit dem Urin sowie die Rolle der Leber in deren Stoffwechsel zu bestimmen. Dazu dienten einerseits in den Resorptionsstudien die humane Coloncarcinomzellinie Caco-2, die wesentliche Eigenschaften von menschlichen Dünndarmepithelzellen aufweist. Andererseits führten wir Stoffwechselversuche an jungen Mäusen durch, um semiquantitative Angaben über das Schicksal dieser Oligosaccharide im intakten Organismus gewinnen zu können.

2.2.2 In vitro Modell zur Resorption von Oligosacchariden der Humanmilch

2.2.2.1 Kurzdarstellung des Modells

Auf Polycarbonatfiltern ausdifferenzierte Caco-2 Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Sacchariden inkubiert. Hierzu wurden neben HMO-Gemischen und Einzelfraktionen auch Lactose und Maltodextrin mit 2-Aminobenzamid in fluoreszierende Analoge überführt und entweder von apikaler oder basaler Seite über zwei Stunden den Zellen angeboten. Der Zusatz von radioaktiv markiertem Mannitol zur Inkubationslösung sollte über die Dichtigkeit des Zellrasens (Monolayer) Auskunft geben. In zeitlichen Abständen von 30 Minuten wurden Proben der jeweils gegenüberliegenden Kompartimente entnommen. Nach Aufreinigung wurden die Proben der Fluoreszenzmessung (Fluoroscan, HPTLC), dem Radioaktivitätsnachweis für Mannitol (β-Counter) und dem Saccharidnachweis (HPTLC, MALDI-MS) unterzogen. (Eine

ausführliche Darstellung der Materialien und Methoden findet sich auf den Seiten 158 bis 163)

2.2.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Fluoreszenzmarkierung der Saccharide

Nährstoffe werden von der apikalen, dem Darmlumen zugewandten Seite aufgenommen, intrazellulär verstoffwechselt und/oder über die basale Membran an das Blut abgegeben. Es können jedoch Moleküle auch von basal nach apikal gelangen. Um einen vektoriellen Transport ermitteln zu können, müssen die bidirektionalen Fluxe erfaßt werden. Daher wurden sowohl die basalen Erscheinungsraten der Saccharide nach der Gabe auf der apikalen Seite als auch die apikale Erscheinungsraten nach Gabe auf der kontraluminalen (basalen) Seite ermittelt.
Um die Nachweisbarkeit und Empfindlichkeit in diesen Versuchen zu erhöhen, wurden die Saccharide fluoreszenzmarkiert. 2-Aminobenzamid (2-AB, Anthranilamid) erwies sich dabei zur Markierung am besten geeignet, da es nur mit dem reduzierenden Ende von Sacchariden reagiert, ein Molekulargewicht von lediglich 136 Da besitzt und keine Ladung trägt. Das Molekulargewicht der HMO erhöhte sich durch die Markierung lediglich um durchschnittlich 17 % (Minimum 10 %, Maximum 27 %). Mehrere Vorversuche zur Optimierung der Markierung haben zu der im Anhang beschriebenen Markierungsmethode geführt. In **Abbildung 31** wird die Markierung eines Saccharids mit 2-Aminobenzamid schematisch dargestellt.

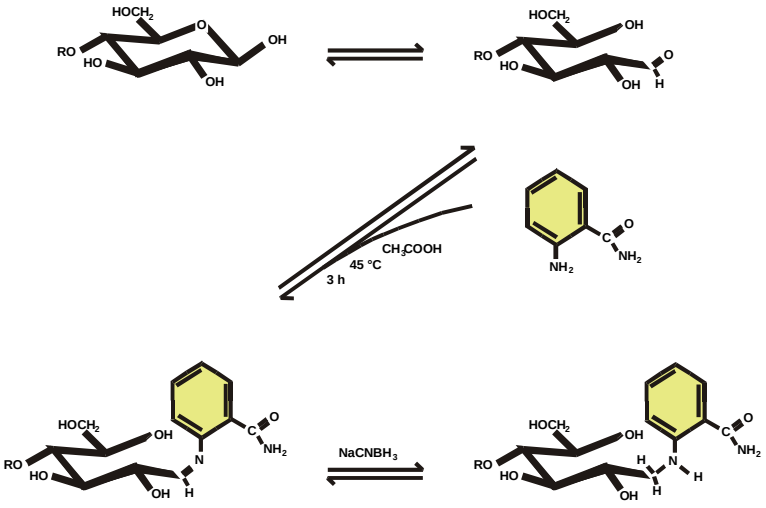


Abb. 31 Fluoreszenzmarkierung eines Saccharids mit 2-Aminobenzamid (2-AB)

Eine Markierung der Saccharide konnte zwar auch mit 2-Aminobenzoesäure erfolgreich durchgeführt werden, damit war jedoch eine Ladungsänderung verbunden, die Einfluß auf die Resorption haben könnte und daher nicht weiter untersucht wurde. Der Einsatz radioaktiv markierter HMO wäre zwar vorteilhaft gewesen, um die Einführung des lipophilen Benzolrings durch das Aminobenzamid zu umgehen, doch stehen diese nicht zur Verfügung. Der mögliche Nachteil der Erhöhung der Lipophilie der Saccharide und somit eventuell eine Überbewertung ihrer Membrandurchgängigkeit wurde von dem Vorteil wettgemacht, daß die mit 2-Aminobenzamid markierten Saccharide deutlich besser in der MALDI-MS und auf den Dünnschichtplatten nachweisbar waren als die unmarkierten Saccharide. **Abbildung 32** zeigt die markierten Saccharide nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung im UV-Licht.

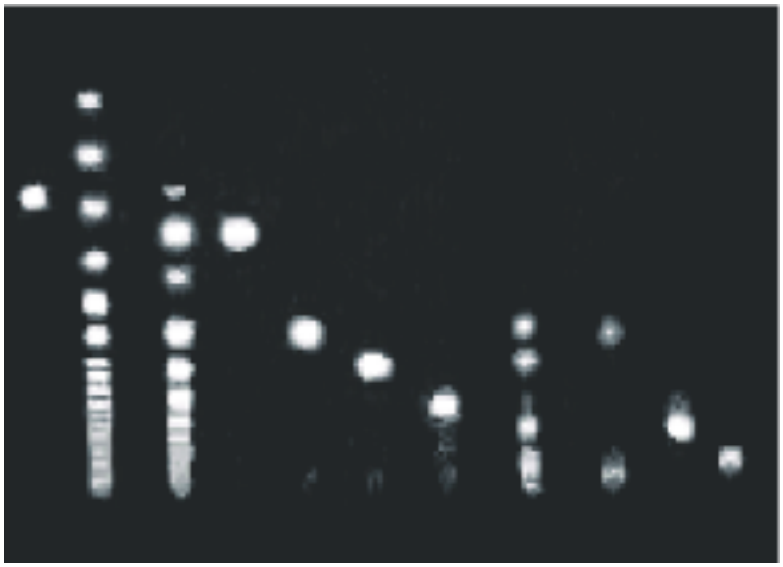


Abb. 32 Mit 2-Aminobenzamid markierte Saccharide nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung unter UV-Licht (L = Lactose, MD = Maltodextrin, NZ = Gesamtfraktion der neutralen Oligosaccharide der Humanmilch, FL = Fucosyllactose, LNT = Lacto-N-tetraose, LNFP = Lacto-N-fucopentaose, LNH = Lacto-N-hexaose, SZ = Gesamtfraktion der sauren Oligosaccharide der Humanmilch, SL = Sialyllactose, LST = Lacto-sialyltetraose, DS = Disialyllacto-N-tetraose)

In den folgenden zwei Abbildungen (**Abb. 33 und 34**) werden MALDI-Spektren der neutralen und der sauren Gesamtfraktion der HMO jeweils vor und nach der Fluoreszenzmarkierung dargestellt. Die Massendifferenz zwischen den unmarkierten und markierten Oligosacchariden beträgt jeweils 120 Da. Die Kennzeichnung der Strukturen mit * in den Abbildungen soll die Fluoreszenzmarkierung der Oligosaccharide mit 2-Aminobenzamid andeuten.

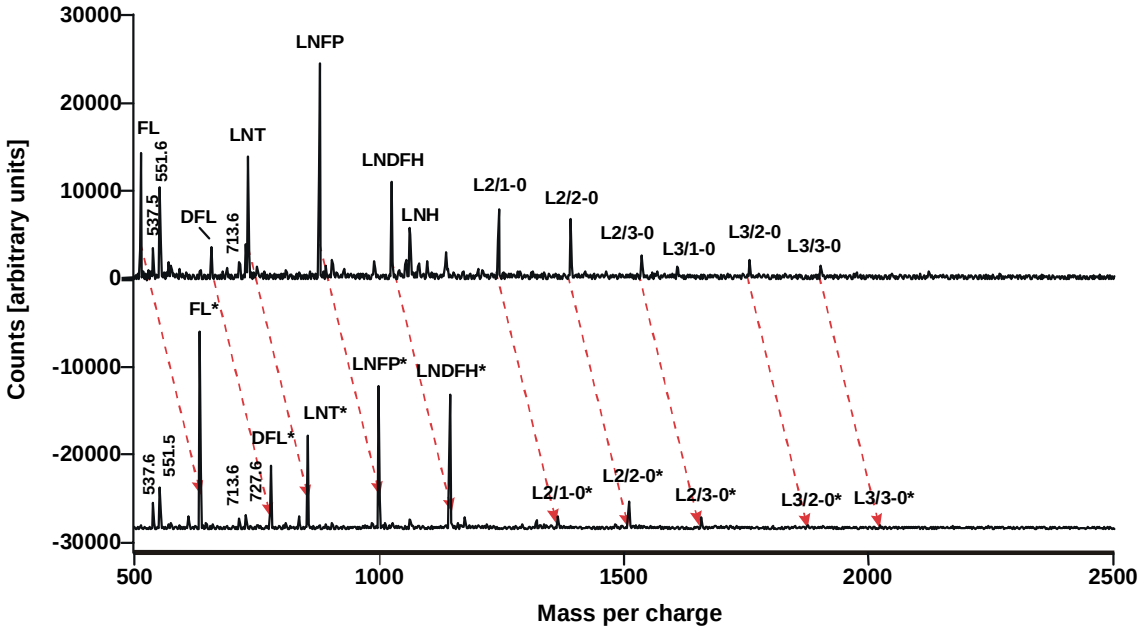


Abb. 33 MALDI-Spektren der Gesamtfraktion der neutralen Oligosaccharide der Humanmilch vor und nach (*) der Fluoreszenzmarkierung mit 2-Aminobenzamid (FL = Fucosyllactose, DFL = Difucosyllactose, LNT = Lacto-N-tetraose, LNFP = Lacto-N-fucopentaose, LNDFH = Lacto-N-difucosylhexaose, LNH = Lacto-N-hexaose; Summe aus 50 Einzelspektren)

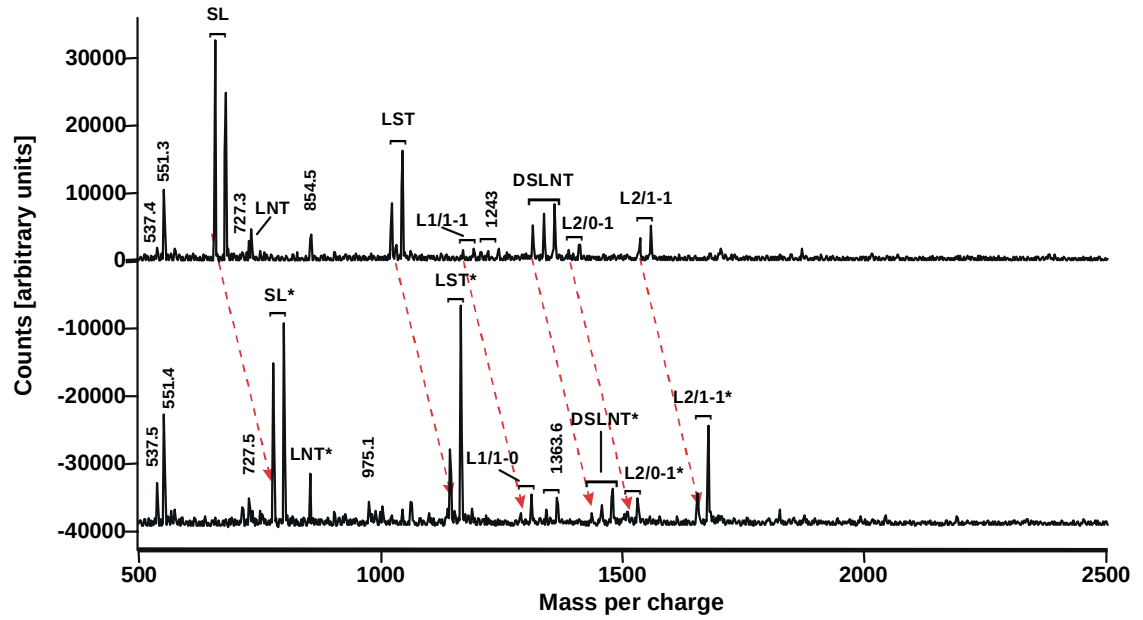


Abb. 34 MALDI-Spektren der Gesamtfraktion der sauren Oligosaccharide der Humanmilch vor und nach (*) der Fluoreszenzmarkierung mit 2-Aminobenzamid (SL = Sialyllactose, LST = Lactosialyltetraose, DSLNT = Disialyllacto-N-tetraose; Summe aus 50 Einzelspektren)

Neben diesen zwei Gesamtfraktionen wurden vier neutrale und drei saure Einzelfraktionen fluoreszenzmarkiert (Fucosyllactose, Lacto-N-tetraose, Lacto-N-fucopentaose, Sialyllactose, Lactosialyltetraose und Disialyllacto-N-tetraose). Das Disaccharid Lactose und Maltodextrin, ein Gemisch aus hydrolysierten Glucosepolymeren, wurden vergleichend eingesetzt. Übereinstimmend mit den bereits beschriebenen Ergebnissen zur chromatographischen Analyse (Abb. 32) zeigten sich auch in den MALDI-Spektren bei einigen der sauren “Einzelfraktionen” deutliche Verunreinigungen mit anderen HMO. In der Gesamtfraktion der sauren HMO erschien neben den charakterisierten Sacchariden eine unbekannte Substanz, die offenbar ebenfalls durch 2-Aminobenzamid markiert werden konnte (Abb. 34, MG ohne 2-AB = 855, MG mit 2-AB = 975 Da). Bisher ist ungeklärt, um welche Substanz es sich hierbei handelt.

Eignung der Zellinie Caco-2 zur Untersuchung von Resorptionsvorgängen

Caco-2 Zellen stammen von einem humanen Darmadenocarcinom und haben sich in zahlreichen Untersuchungen als sehr geeignetes Zellkulturmodell für den menschlichen Dünndarm herausgestellt (siehe auch Kapitel 2.3.1). Der natürliche Resorptionsvorgang am Darmepithel erfordert die Überwindung mehrerer Barrieren: die Penetration der sogenannten “unstirred water layer“ oberhalb und zwischen den Microvilli, der Apikal- und Basalmembran des Enterozyten bzw. der Zellzwischenräume, der Lamina propria sowie des Endothels der Blutkapillaren. Die Verwendung einer Darmzellinie ermöglicht die gezielte Untersuchung von Resorptionsvorgängen am Darmepithel, da der gesamte Prozeß auf den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt - den transepithelialen Weg der Substanzen - reduziert wird.
Unter normalen Kulturbedingungen differenzieren Caco-2 Zellen spontan aus und verfügen über zahlreiche Bürstensaumhydrolasen und Transporter. Sowohl Transcytose als auch über “tight junctions“ regulierte parazelluläre Transportvorgänge konnten an den Colonkarcinomzellen studiert werden. Aus diesen Gründen bot sich die Zellinie Caco-2 für unsere Untersuchungen zur Resorption von HMO an. Die folgende Abbildung (**Abb. 35**) zeigt vereinfacht das Modell einer Diffusionskammer, wie sie in unseren Experimenten mit den Caco-2 Zellen eingesetzt wurde.

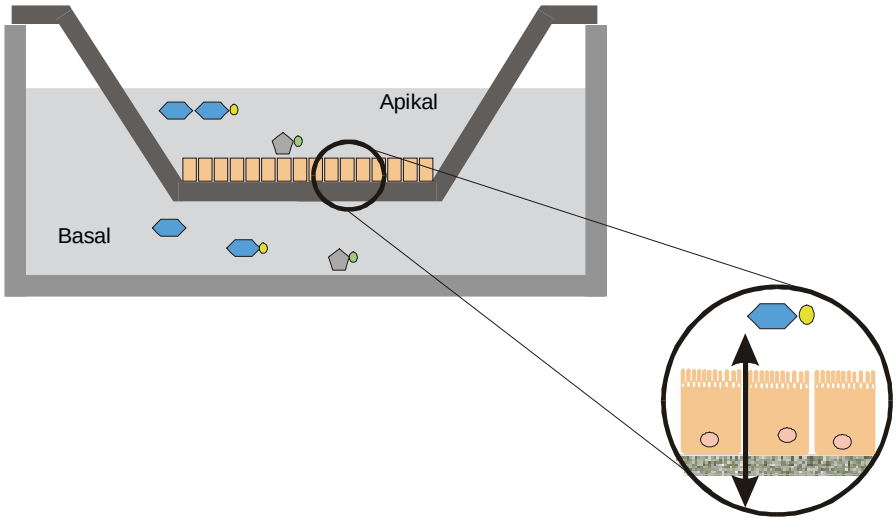


Abb. 35 Modell der Diffusionskammer zur Untersuchung der Resorptionsvorgänge von Sacchariden an der Zellinie Caco-2

Erscheinungsrate von ^{3}H-Mannitol

Der radioaktiv markierte Zuckeralkohol Mannitol wurde in unseren Experimenten als sogenannter Parazellulärmarker parallel zu den fluoreszenzmarkierten Sacchariden eingesetzt. Mit einem Molekulargewicht von 180 Da gelangt oral verabreichtes Mannitol aus dem Darm fast ausschließlich über die Zellzwischenräume zur Blutseite [1, 30]. Der Durchmesser und die Durchlässigkeit dieser Öffnungen wird entscheidend über die “tight junctions“ reguliert. Diese bestehen aus den Membranproteinen Occludin und verschiedenen nachgeordneten Proteinen (u.a. ZO-1, ZO-2), die in Kontakt mit dem Cytoskelett stehen [40]. Läsionen der Epithelschicht oder eine veränderte Dichtigkeit der “tight junctions“ lassen sich so anhand des Mannitolfluxes nachweisen. Die folgende Abbildung (**Abb. 36**) zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme des Interzellularspalts zwischen zwei benachbarten Caco-2 Zellen.

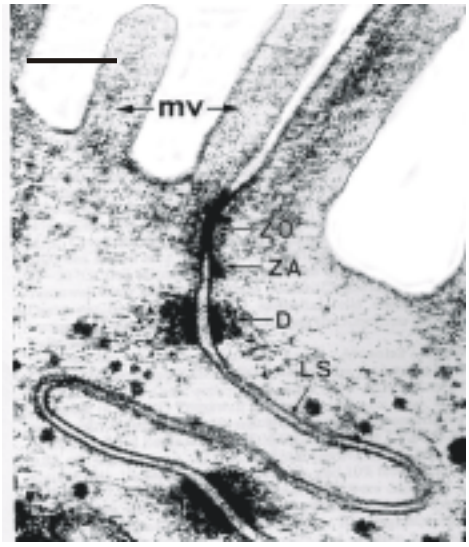


Abb. 36 Interzellularspalt zwischen zwei Caco-2 Zellen (ZO = Zonula occludens, ZA = Zonula adherens, D = Desmosom, LS = Lateralspalt, mv = Microvilli; Balkenlänge entspricht 200 nm; aus [1])

In den folgenden Abbildungen werden die nach 30, 60, 90 und 120 Minuten gemessenen Fluxe des ^{3}H-markierten Mannitols in Ab- und Anwesenheit der verschiedenen Testsaccharide dargestellt. Die Fluxraten von apikal nach basal und von basal nach apikal werden in Prozent des maximalen Durchtritts angegeben, wobei die Volumenabnahmen zum jeweiligen Zeitpunkt bei den Berechnungen berücksichtigt wurden. **Abbildung 37** zeigt die basale Erscheinungsrate von ^{3}H-Mannitol bei apikalem Angebot.

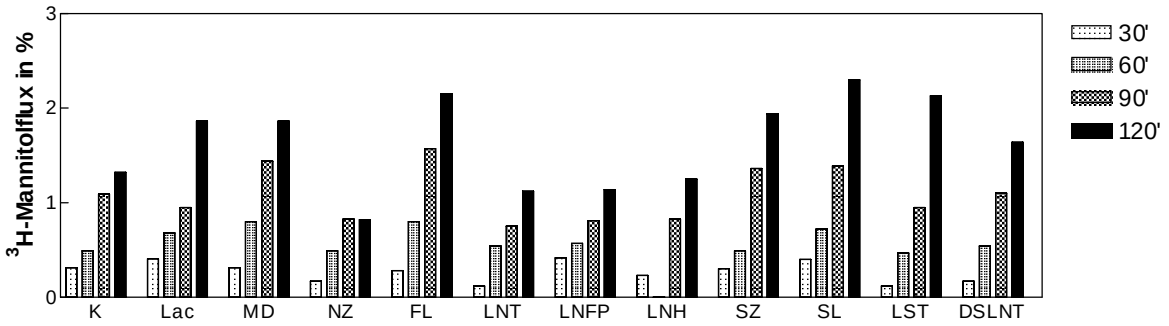


Abb. 37 Erscheinungsrate von ^{3}H-Mannitol im basalen Kompartiment nach apikaler Gabe und Inkubation mit Caco-2 Zellen über 30, 60, 90 und 120 Minuten in Ab- oder Anwesenheit von fluoreszenzmarkierten Sacchariden (K = Kontrolle, Lac = Lactose, MD = Maltodextrin, NZ = Gesamtfraktion der neutralen Oligosaccharide der Humanmilch, FL = Fucosyllactose, LNT = Lacto-N-tetraose, LNFP = Lacto-N-fucopentaose, LNH = Lacto-N-hexaose, SZ = Gesamtfraktion der sauren Oligosaccharide der Humanmilch, SL = Sialyllactose, LST = Lactosialyltetraose, DSLNT = Disialyllacto-N-tetraose). Dargestellt sind die Mittelwerte einer Versuchsserie, wobei die Standardabweichungen durchschnittlich bei 9 % lagen.

Bei der Kontrollprobe ohne Saccharidzusatz waren nach der zweistündigen Inkubationszeit durchschnittlich 1,25 % des apikal angebotenen Mannitols basal nachweisbar. Somit wies der Mannitolflux auf eine sehr gute Dichtichkeit der Monolayer bis zum Versuchsende hin. In Anwesenheit von Lactose oder Maltodextrin war der Mannitoldurchtritt nach zwei Stunden mit jeweils 1,86 % etwas erhöht. Der Mannitolflux in Anwesenheit der neutralen Einzelfraktionen unterschied sich mit durchschnittlich 1,42 % nicht wesentlich von dem der Kontrolle. Lediglich das kleinste HMO, Fucosyllactose, führte zu einer Mannitoldurchtrittsrate von 2,16 %. Der Zusatz kleiner neutraler Saccharide war somit mit einem leichten Anstieg des Mannitolfluxes verbunden. Auffällig war ebenfalls der Einfluß der sauren HMO auf den Mannitoldurchtritt, der durchschnitlich 2,06 % betrug. Hier zeigte sich wiederum eine gewisse Abhängigkeit von der Molekülgröße: Der Manntitolflux in Anwesenheit von Sialyllactose, dem kleinsten sauren HMO, betrug 2,31 %, bei Lactosialyltetraose 2,14 % und bei dem Hexasaccharid Disialyllacto-N-tetraose 1,64 %. Aufgrund der negativ geladenen Sialinsäuregruppen der sauren HMO würde man hier Wechselwirkungen mit den “tight junctions“ vermuten, wie sie für andere Anionen mit Fähigkeit zur Wechselwirkung mit Calciumionen bekannt sind. Aber auch der Zusatz neutraler Saccharide wie

des Disaccharids Lactose bewirkte eine Erhöhung des Mannitolfluxes um 49 %, die Trisaccharide Fucosyllactose bzw. Sialyllactose erhöhten den Flux um 73 bzw. 85 % gegenüber der Kontrolle auf einen Manntitolflux von etwa 2,3 %. Welche Prozesse dieser moderaten Reduktion der Selektivität des Zellrasens zugrunde liegen, konnte hier nicht geklärt werden.

In einer weiteren Versuchsserie wurde das Substratangebot um 1,0 mg des gleichen Saccharids erhöht. Hierdurch veränderte sich die durchschnittliche Konzentration der neutralen HMO im Test von 3,9 auf 9,5 mM und die der sauren HMO von durchschnittlich 3,1 auf 7,6 mM. Die Konzentrationserhöhung führte meist zu einer leichten Reduktion des beschriebenen Mannitolfluxes von apikal nach basal (**Abb. 38**).

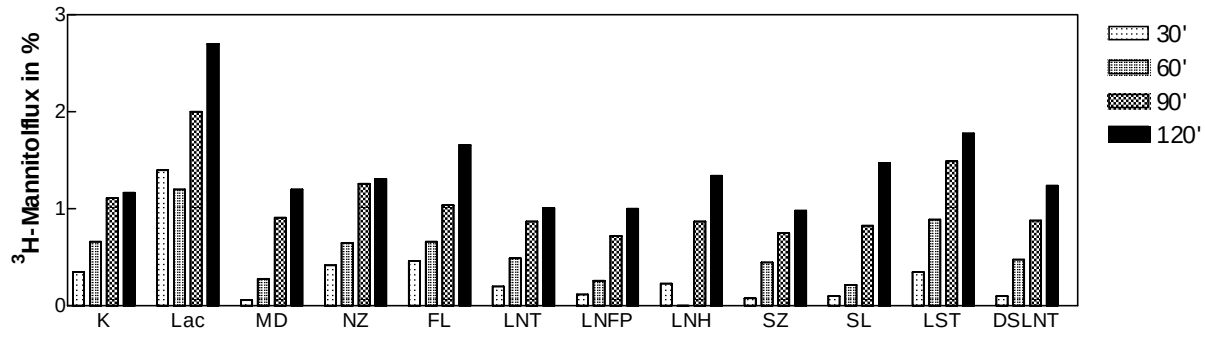


Abb. 38 Erscheinungsrate von ^{3}H-Mannitol im basalen Kompartiment nach apikaler Gabe und Inkubation mit Caco-2 Zellen über 30, 60, 90 und 120 Minuten in Ab- oder Anwesenheit von fluoreszenz- und unmarkierten Sacchariden (K = Kontrolle, Lac = Lactose, MD = Maltodextrin, NZ = Gesamtfraktion der neutralen Oligosaccharide der Humanmilch, FL = Fucosyllactose, LNT = Lacto-N-tetraose, LNFP = Lacto-N-fucopentaose, LNH = Lacto-N-hexaose, SZ = Gesamtfraktion der sauren Oligosaccharide der Humanmilch, SL = Sialyllactose, LST = Lactosialyltetraose, DSLNT = Disialyllacto-N-tetraose). Dargestellt sind die Mittelwerte einer Versuchsserie, wobei die Standardabweichungen durchschnittlich bei 11 % lagen.

Saure und neutrale HMO unterschieden sich in ihrer Wirkung auf den Mannitolflux in dieser Versuchsserie nicht mehr voneinander. Innerhalb von zwei Stunden waren jeweils durchschnittlich etwa 1,3 % des angebotenen Mannitols in Gegenwart der Oligosaccharide basal erschienen. Der Mannitolflux in Gegenwart von fluoreszenzmarkierter und unmarkierter Lactose war mit 2,7 % nach zwei Stunden deutlich erhöht im Vergleich zur Kontrolle und zur niedrigeren Lactosekonzentration. Eine Er-

höhung der transzellulären Permeation durch das Hydrolyseprodukt Glucose ist zwar aus der Literatur bekannt [128], da der Mannitolflux jedoch bei den Versuchen mit Maltodextrin nicht erhöht war, wobei Glucose in größeren Mengen durch Hydrolyse entstehen könnte, erscheint diese Möglichkeit eher unwahrscheinlich.

Wurde die Erscheinensrate von Mannitol im apikalen Kompartiment nach basalem Angebot bestimmt (**Abb. 39**), zeigte sich unabhängig von der Ab- oder Anwesenheit von Sacchariden ein Mannitolflux von 36 bis 72 % des von apikal nach basal gerichteten Fluxes. Lactose, Maltodextrin sowie die sauren HMO bewirkten lediglich eine moderate, aber nicht signifikante Erhöhung des Mannitolfluxes im Vergleich zur Kontrolle ohne Saccharidzusatz.

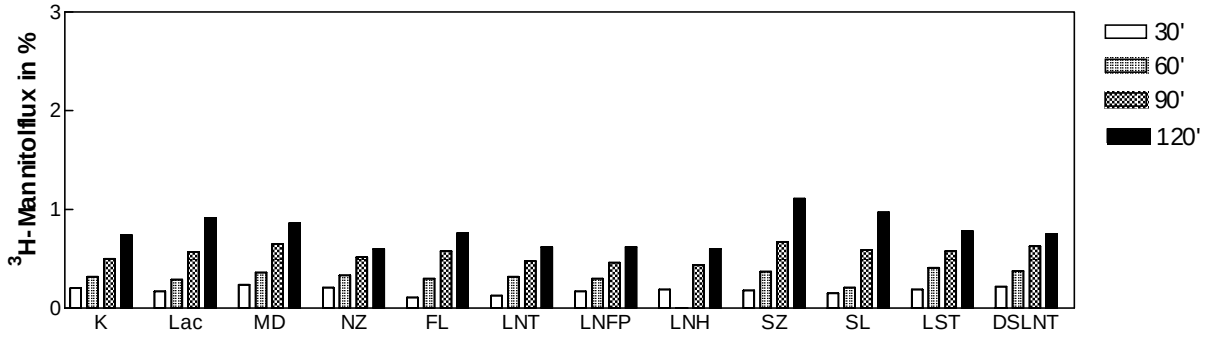


Abb. 39 Erscheinungsrate von ^{3}H-Mannitol im apikalen Kompartiment nach basaler Gabe und Inkubation mit Caco-2 Zellen über 30, 60, 90 und 120 Minuten in Ab- oder Anwesenheit von fluoreszenzmarkierten Sacchariden. (K = Kontrolle, Lac = Lactose, MD = Maltodextrin, NZ = Gesamtfraktion der neutralen Oligosaccharide der Humanmilch, FL = Fucosyllactose, LNT = Lacto-N-tetraose, LNFP = Lacto-N-fucopentaose, LNH = Lacto-N-hexaose, SZ = Gesamtfraktion der sauren Oligosaccharide der Humanmilch, SL = Sialyllactose, LST = Lactosialyltetraose, DSLNT = Disialyllacto-N-tetraose). Dargestellt sind die Mittelwerte einer Versuchsserie, wobei die Standardabweichungen durchschnittlich bei 8 % lagen.

Unterschiede in den vektoriellen Fluxraten von Mannitol, wie sie hier bestimmt wurden, sind im wesentlichen durch physikalische Ursachen, wie die Adhäsion an die Filtereinsätze oder unterschiedliche hydrostatische Druckverhältnisse in den zwei Kompartimenten bedingt. Generell weisen aber alle unsere Studien zur Mannitolpermeation auf intakte Epithelzellschichten mit hoher Dichtigkeit hin, wobei die Wirkungen der Saccharide auf die Permeabilität des Epithels nur moderat vorhanden

sind. Saure und kleine neutrale HMO ebenso wie Lactose und Maltodextrin erhöhen den Mannitolflux in der Diffusionskammer, größere neutrale HMO erniedrigen den Flux zwischen den Kompartimenten leicht.

Erscheinungsrate von 2-Aminobenzamid

Durch die Fluoreszenzmessung konnte der birektionale Durchtritt der Fluoreszenz während der Inkubation in der Diffusionskammer leicht bestimmt werden. Ob das gemessene 2-Aminobenzamid noch an das Saccharid gebunden war, konnte mit dieser Methode jedoch nicht festgestellt werden. Hierfür wurde die HPTLC-Technik angewandt (siehe unten). Zum Zeitpunkt t = 0 dem Inkubat entnommene Proben dienten als Standard für die Fluoreszenzmessungen. Die bei einem theoretisch vollständigen Durchtritt des 2-Aminobenzamids berechneten Werte wurden als 100 % gesetzt. Es stellte sich heraus, daß die zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommenen Aliquots keine ausreichende Fluoreszenz aufwiesen, so daß die Auswertung lediglich am Versuchsende, also nach zwei Stunden, vorgenommen werden konnte. **Abbildung 40** zeigt die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen im basalen Kompartiment nach apikaler Gabe der markierten Saccharide im Vergleich zu den entsprechenden Mannitolfluxen nach zwei Stunden.

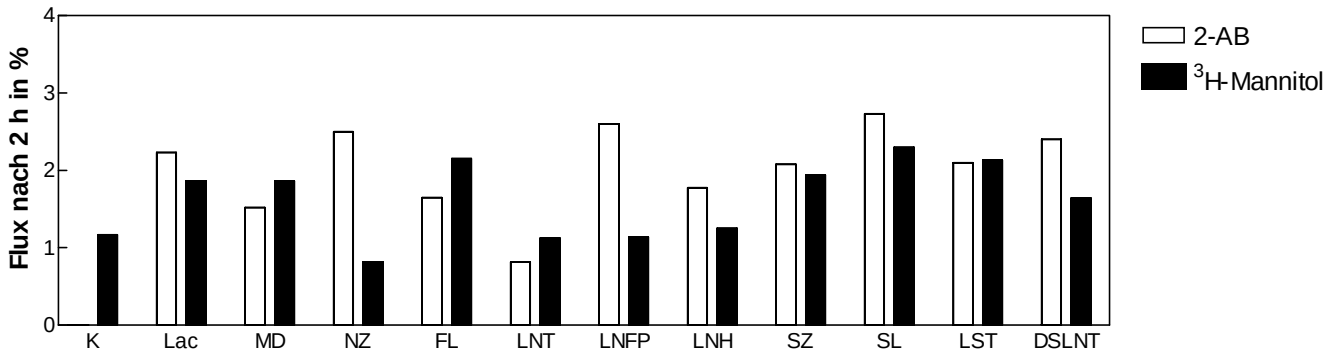


Abb. 40 Vergleich der Erscheinungsraten von 2-Aminobenzamid (2-AB) und ^{3}H-Mannitol im basalen Kompartiment nach apikaler Inkubation von fluoreszenzmarkierten Sacchariden mit Caco-2 Zellen über 2 Stunden (K = Kontrolle, Lac = Lactose, MD = Maltodextrin, NZ = Gesamtfraktion der neutralen Oligosaccharide der Humanmilch, FL = Fucosyllactose, LNT = Lacto-N-tetraose, LNFP = Lacto-N-fucopentaose, LNH = Lacto-N-hexaose, SZ = Gesamtfraktion der sauren Oligosaccharide der Humanmilch, SL = Sialyllactose, LST = Lactosialyltetraose, DSLNT = Disialyllacto-N-tetraose). Dargestellt sind die Mittelwerte einer Versuchsserie, wobei die Standardabweichungen der 2-AB Fluxe durchschnittlich bei 14 % lagen.

Die Durchtrittsrate für die Fluoreszenzkonjugate lag im Bereich des Mannitolfluxes. So konnte durchschnittlich etwa 2,0 % der eingesetzten Fluoreszenz im Meßzeitraum basal wiedergefunden werden. Wie bei den Mannitolfluxen lagen die Durchtrittsraten der sauren HMO mit 2,1 bis 2,7 % etwas höher als die bei den neutralen HMO mit 0,8 bis 1,8 %. Bei der monofucosylierten Pentaose wurde in einer der Versuchsreihen mit 7,1 % ein stark erhöhter Flux festgestellt. Dies konnte jedoch in nachfolgenden Versuchen nicht reproduziert werden. Die Befunde aus der Fluoreszenzmessung lassen sich daher am ehesten mit der Hypothese vereinbaren, daß die fluoreszenzmarkierten Saccharide - ähnlich wie Mannitol - parazellulär in das basale Kompartiment gelangen.

Auch bei diesem Modell wurde eine weitere Versuchsserie mit einer Erhöhung des Saccharidangebotes um 1,0 mg im apikalen Kompartiment durchgeführt. Dies diente vor allem dem Zweck, zu prüfen, ob damit eine spezifische Bindung oder ein spezifischer Transport der Konjugate durch Kompetition unterdrückt werden kann. Im Experiment unterschieden sich die Fluxe der fluoreszierenden Konjugate jedoch nicht wesentlich von denen der oben gezeigten Werten ohne zusätzliches Angebot an unmarkierten Sacchariden, wenngleich die Fluxraten eine größere Streuung aufwie-

sen (**Abb. 41**). Auch wenn dieser Befund keine Interpretation über die Art des Durchtritts erlaubt, zeigt sich kein Hinweis auf einen spezifischen und dosisabhängigen Mechanismus.

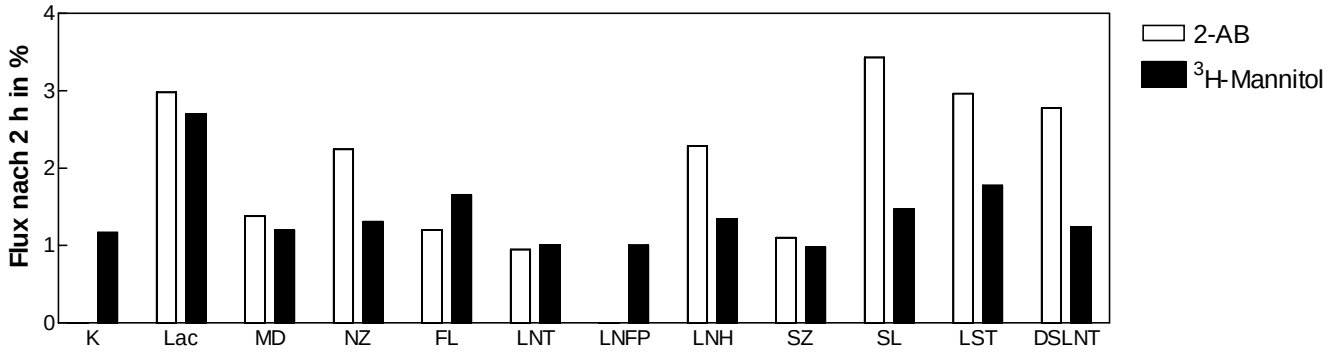


Abb. 41 Vergleich der Erscheinungsraten von 2-Aminobenzamid (2-AB) und ^{3}H-Mannitol im basalen Kompartiment nach apikaler Inkubation von fluoreszenz- und unmarkierten Sacchariden mit Caco-2 Zellen über 2 Stunden (K = Kontrolle, Lac = Lactose, MD = Maltodextrin, NZ = Gesamtfraktion der neutralen Oligosaccharide der Humanmilch, FL = Fucosyllactose, LNT = Lacto-N-tetraose, LNFP = Lacto-N-fucopentaose, LNH = Lacto-N-hexaose, SZ = Gesamtfraktion der sauren Oligosaccharide der Humanmilch, SL = Sialyllactose, LST = Lactosialyltetraose, DSLNT = Disialyllacto-N-tetraose). Dargestellt sind die Mittelwerte einer Versuchsserie, wobei die Standardabweichungen der 2-AB Fluxe durchschnittlich bei 15 % lagen.

Die höchsten Fluxraten zeigten bei diesem Versuchsansatz die Konjugate der sauren Einzelfraktionen der HMO. Diese 2-Aminobenzamid-Fluxe unterschieden sich auch am deutlichsten von den parallel gemessenen Mannitolfluxen, die wiederum in der obigen Abbildung vergleichend aufgetragen wurden. Ob hierfür möglicherweise eine Degradation der Konjugate verantwortlich war, konnte nur durch die dünnschichtchromatographische Trennung (siehe unten) geprüft werden.

Verglichen mit den oben gezeigten Fluxraten von apikal nach basal waren die apikalen Erscheinungsraten des 2-Aminobenzamids nach basaler Gabe der markierten Saccharide vermindert (**Abb. 42**). Somit unterschieden sich die Mehrzahl dieser Fluxe kaum von denen des Mannitols. Wiederum wiesen jedoch die sauren Einzelfraktionen der HMO höhere Durchtrittsraten von 2-Aminobenzamid auf als die neutralen Saccharide und übertrafen die entsprechenden Mannitolfluxe.

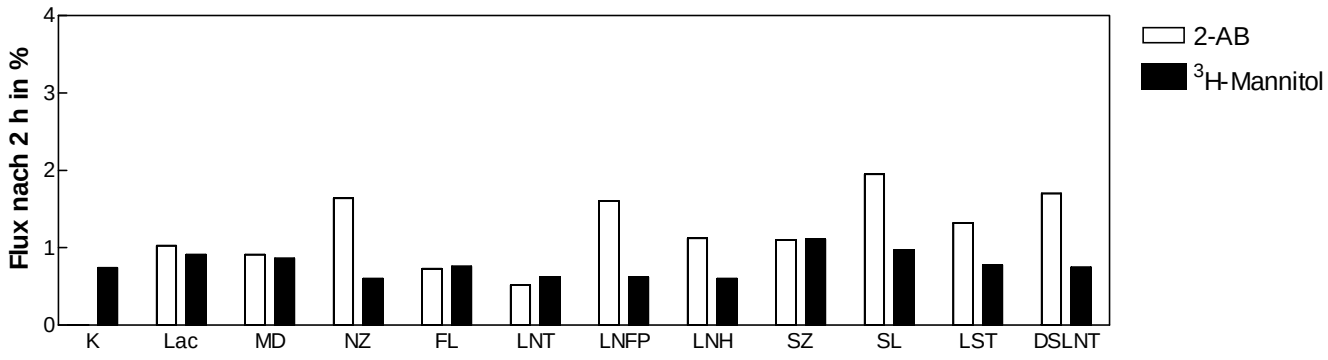


Abb. 42 Vergleich der Erscheinungsraten von 2-Aminobenzamid (2-AB) und ^{3}H-Mannitol im apikalen Kompartiment nach basaler Inkubation von fluoreszenzmarkierten Sacchariden mit Caco-2 Zellen über 2 Stunden (K = Kontrolle, Lac = Lactose, MD = Maltodextrin, NZ = Gesamtfraktion der neutralen Oligosaccharide der Humanmilch, FL = Fucosyllactose, LNT = Lacto-N-tetraose, LNFP = Lacto-N-fucopentaose, LNH =Lacto-N-hexaose, SZ = Gesamtfraktion der sauren Oligosaccharide der Humanmilch, SL = Sialyllactose, LST = Lactosialyltetraose, DSLNT = Disialyllacto-N-tetraose). Dargestellt sind die Mittelwerte einer Versuchsserie, wobei die Standardabweichungen der 2-AB Fluxe durchschnittlich bei 9 % lagen.

Neben den Fluxraten der Konjugate wurde auch die an die Zellen gebundene oder in den Zellen vorhandene Fluoreszenz am Versuchsende bestimmt. Diese betrug nach apikalem Angebot durchschnittlich 0,4 % der eingesetzten Fluoreszenz und repräsentierte nur etwa 20 % der im basalen Kompartiment gemessenen Fluoreszenz. Wurden die fluoreszenzmarkierten Saccharide von der basalen Seite angeboten, so waren am Ende der Inkubationsperiode ca. 0,2 % an bzw. in den Caco-2 Zellen nachweisbar.

Zusammenfassend läßt sich für diese Versuchsserien feststellen, daß die fluoreszenzmarkierten Saccharide nicht in nennenswertem Umfang resorbiert werden und es keinen Hinweis auf einen vektoriellen Transport gibt. Die Fluoreszenzintensität, die nach apikalem Angebot basal nachzuweisen war, lag mit ca. 2 % in dem Bereich der Durchtrittsrate von Mannitol. Von den in Abbildung 30 aufgezeigten vier Möglichkeiten der intestinalen Resorption scheint für die untersuchten Oligosaccharide der parazelluläre Weg die primäre Permeationsroute darzustellen. Generell zeigte sich für die Fluxrichtung von apikal nach basal eine etwas höhere Durchtrittsrate als von

basal nach apikal, ähnlich wie auch beim Mannitol. Die apikalen Erscheinungsraten des 2-Aminobenzamids - in freier oder gebundener Form - lagen bei ca. 1,2 % und waren durchweg etwas höher als die des parallel gemessenen Mannitols mit ca. 0,8 %, was möglicherweise auf der höheren Lipophilie der Konjugate basiert. Eine eindeutige Abhängigkeit des Durchtritts der Konjugate von ihrer Molekülmasse war bei den untersuchten Oligosacchariden zwar nicht erkennbar, dennoch ist anzunehmen, daß die wesentlich größeren komplexeren neutralen und sauren Oligosaccharide, die ebenfalls in der Muttermilch vorhanden sind, aufgrund ihrer beachtlichen Größe nicht oder nur in noch geringerem Umfang das Epithel permeieren können.

Charakterisierung der resorbierten Saccharide mittels HPTLC

Um abschließend beantworten zu können, inwieweit die Aminobenzamid-Konjugate der HMO während der Inkubation mit den Caco-2 Zellen intakt blieben, wurden Untersuchungen mittels der Dünnschichtchromatographie angeschlossen. Die am Versuchsende den Diffusionskammern entnommenen Proben wurden nach mehreren Reinigungsschritten und nach Konzentrierung chromatographisch getrennt. Zunächst wurden die fluoreszierenden Banden unter UV-Licht dokumentiert, anschließend wurden die Saccharide durch Orcinol angefärbt. Unter der starken Konzentrierung der Proben, die zur Verbesserung des Nachweises notwendig war, litt die Trennqualität der Proben, d.h. die Separierung einzelner Banden. Nur die nach apikaler Gabe basal erschienenen Proben konnten so befriedigend ausgewertet werden. Die nach Inkubationsende basal entnommenen Proben werden nachfolgend in der Kurzschreibweise als Ab bezeichnet, die apikal applizierten und entnommenen Proben als Aa.

Für alle untersuchten Fraktionen des apikalen Kompartiments traf zu, daß die nach zweistündiger Inkubation mit den Caco-2 Zellen entnommenen Proben nahezu identisch waren mit denen, der apikalen Ausgangsproben. Eine signifikante Veränderung, z.B. durch Hydrolyse eines Saccharids im Inkubationsansatz, konnte somit ausgeschlossen werden.

Die Interpretation des Saccharidmusters des jeweils gegenüberliegenden Kompartiments gestaltete sich schwieriger. Allgemein war festzustellen, daß bei den basal entnommenen Proben unter UV-Licht neben einem mehr oder weniger stark fluores-

zierenden Bereich im mittleren Plattenabschnitt zwei sehr weit gelaufene Banden zu erkennen waren. Die oberste Bande, auf Höhe der Lauffront, stellte höchstwahrscheinlich freies 2-Aminobenzamid dar, was aufgrund von Cochromatographie abzuleiten war. Gefolgt wurde diese Bande vermutlich von einem markierten Monosaccharid, sodaß eine partielle Hydrolyse im Verlauf der Inkubation und bei der Permeation durch die Zellschicht stattgefunden haben mußte. Die Anfärbbarkeit der fluoreszenzmarkierten Saccharide durch Orcinol war leider nur ungenügend. Bei der Auswertung kam erschwerend hinzu, daß die Laufeigenschaften der markierten und unmarkierten Saccharide sich unterschieden: so lief eine an 2-Aminobenzamid gekoppelte Maltose bspw. auf Höhe einer unmarkierten Glucose.

Nachfolgend wird auf einzelne Befunde nach apikaler Gabe von fluoreszenz- und unmarkierten Sacchariden eingegangen. Bereits die Ausgangsprobe des Gemisches aus markierter und unmarkierter Lactose zeigte bei der Orcinolfärbung eine deutliche Bande, die auf den Glucosezusatz (5 mM) im Inkubationsmedium zurückzuführen war (**Abb. 43**, rechts). Da diese Bande auf Monosaccharidhöhe nach Ablauf der zweistündigen Inkubation nicht intensiver wurde, kann vermutet werden, daß die bei der Hydrolyse entstandenen Monosaccharidbestandteile sofort in die Zelle bzw. das basale Kompartiment transportiert wurden. Im Falle der markierten Lactose führte die zweistündige Inkubation zwar nicht zu einer umfangreichen Hydrolyse im apikalen Kompartiment, doch hatte ein Teil der fluoreszenzmarkierten Lactose die basale Seite erreicht (Abb. 43, links). Die Auswertung der Bandengröße und Intensität ergab, daß etwa 2,5 % des angebotenen Disaccharids basal erschienen war. Dies stimmte damit sehr gut mit den fluorometrisch ermittelten Werten überein, nach denen etwa 2,9 % der Fluoreszenz basal erschienen war. Zum Vergleich werden in den folgenden Abbildungen die apikalen Ausgangsproben (Standard) und die Proben beider Kompartimente nach Inkubationsende (Aa, Ab) nebeneinander aufgetragen. Die Proben werden jeweils unter UV-Licht und nach Orcinolfärbung gezeigt, wobei die Proben aus dem basalen Kompartiment vor der Chromatographie sehr stark konzentriert wurden.

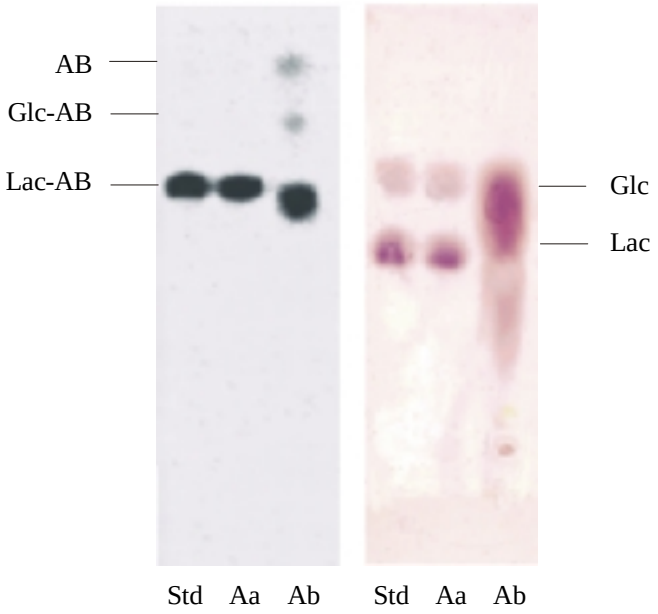


Abb. 43 Dünnschichtchromatographisch aufgetrennte Lactoseproben (fluoreszenz- oder unmarkiert) nach zweistündiger Inkubation mit Caco-2 Zellen (links unter UV-Licht, rechts nach Orcinolfärbung; Std = Standard, Aa = nach apikaler Gabe und Entnahme, Ab = nach apikaler Gabe und basaler Entnahme, AB = 2-Aminobenzamid, Glc = Glucose, Lac = Lactose)

Im Fluoreszenzlicht sind in der basal entnommenen Probe Ab zwei Banden oberhalb der Lactose sichtbar, die auf eine geringe Menge 2-Aminobenzamid sowie möglicherweise ein Glucosekonjugat hinweisen. Dies könnte durch eine Freisetzung des 2-Aminobenzamids unter Abspaltung freier Lactose erklärbar sein (Umkehrreaktion der Markierung) und gleichzeitig könnte ein kleiner Teil dieses freien 2-Aminobenzamids eine neue Bindung mit einem freien Monosaccharid eingegangen sein. Hierfür standen sowohl Glucose aus dem Puffer selbst (5 mM) als auch Hydrolyseprodukte der freien Lactose zur Verfügung. Aufgrund der unterschiedlichen Laufeigenschaften von markierten und unmarkierten Sacchariden lassen sich die Banden beider Platten nicht direkt zuordnen. Bei den mit Orcinol gefärbten Sacchariden des basalen Kompartimentes ließ sich die stärkste Bande in der Laufhöhe zwischen einem unmarkierten Mono- und Disaccharid nachweisen. Da die Laufstrecke und Trennschärfe bei den stärker konzentrierten basalen Proben generell retardiert war, scheint der größte Teil der Färbungen auf freie Monosaccharide (in erster Linie Glucose aus dem Puffer) zurückführbar zu sein. Eine nenneswerte Menge an intakter Lactose war in Ab nicht nachweisbar, was auf den insgesamt geringen Anteil (max. 2 % der eingesetzten Menge) durchgetretener Substanz zurückzuführen ist. Als

Konjugat war intakte Lactose dagegen im basalen Medium aufgrund der höheren Sensitivität des Nachweises detektierbar. Die geringe Hydrolyserate der Lactose im apikalen Medium spricht dafür, daß die Expression der saccharidspaltenden Enzyme Lactase und Maltase im Gegensatz zu Peptidasen in Caco-2 Zellen recht heterogen und generell geringer ist [174, 175].

Auch im Falle des Maltodextrins konnten die Banden unter UV-Licht besser unterschieden werden als nach Orcinolfärbung. Die basal nachweisbare Fluoreszenz (Ab) erstreckte sich zwischen der Laufhöhe einer markierten Glucose bis hin zum Maltohexaosid (**Abb. 44**, links). Auch größere markierte Dextrinkonjugate schienen somit in geringem Umfang das basale Kompartiment erreicht zu haben - wenngleich in sehr kleinen Mengen, da auch hier eine starke Konzentrierung für die Darstellung der Proben notwendig war. Ähnliche Permeationsraten können in Caco-2 Zellen für markierte inerte Polyethylenglycole im Massenbereich bis 4.000 Da erhalten werden.

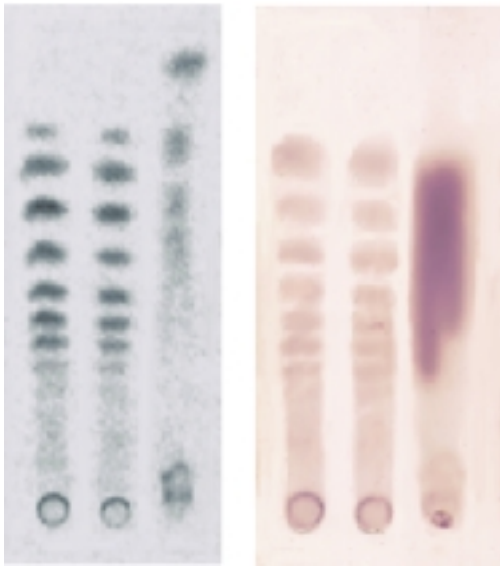


Abb. 44 Dünnschichtchromatographisch aufgetrennte Maltodextrinproben (fluoreszenz- oder unmarkiert) nach zweistündiger Inkubation mit Caco-2 Zellen (links unter UV-Licht, rechts nach Orcinolfärbung; Std = Standard, Aa = nach apikaler Gabe und Entnahme, Ab = nach apikaler Gabe und basaler Entnahme)

An der Lauffront der Probe aus dem basalen Medium war wiederum freies 2-Aminobenzamid sichtbar. Eine begrenzte Hydrolyse der markierten Dextrine mußte somit stattgefunden haben. Oberhalb des Auftragepunktes war noch eine stärker gefärbte Bande zu sehen, die jedoch eher auf Verunreinigungen zurückgeführt werden muß. Das Fluoreszenzmuster des apikalen Kompartiments zeigte am Versuchsende keine Unterschiede zur Ausgangsprobe (Abb. 44, links, Aa). Im Falle der Orcinolfärbung überlagerte im basal entnommenen Medium die starke und unscharfe Bande der Glucose eine Abtrennung und den Nachweis von kleineren Oligomeren des Maltodextrins.

Bei der Gesamtfraktion der neutralen Oligosacchariden der Humanmilch (**Abb. 45**, Spalten 1-3 und 7-9) zeigte das Saccharidmuster der apikal entnommenen Probe ebenfalls lediglich eine leichte Abnahme der Bandenfärbung/-intensität nach Ablauf der zweistündigen Inkubation. Im basalen Medium dominierten freies 2-Aminobenzamid und markierte Monosaccharide das Bild (Abb. 45, Spalte 3). Zwischen Fucosyllactose und dem Tetrasaccharid LNT, welches auf gleicher Höhe wie das Hexaosid des Maltodextrins lief, waren markierte Oligosaccharide nachweisbar. Offenbar hatten auch hier Spuren der komplexeren Saccharide die Zellschicht permeiert. Eine fluoreszierende Bande, die im Bereich der höhermolekularen HMO sichtbar wurde, scheint auf Verunreinigungen zurückzuführen zu sein. Bei den mit Orcinol angefärbten Proben zeigt sich ein bereits bekanntes Motiv in Form einer stark dominierenden unscharfen Färbung durch die Glucose des Mediums, das eine Identifizierung der HMO unmöglich machte.

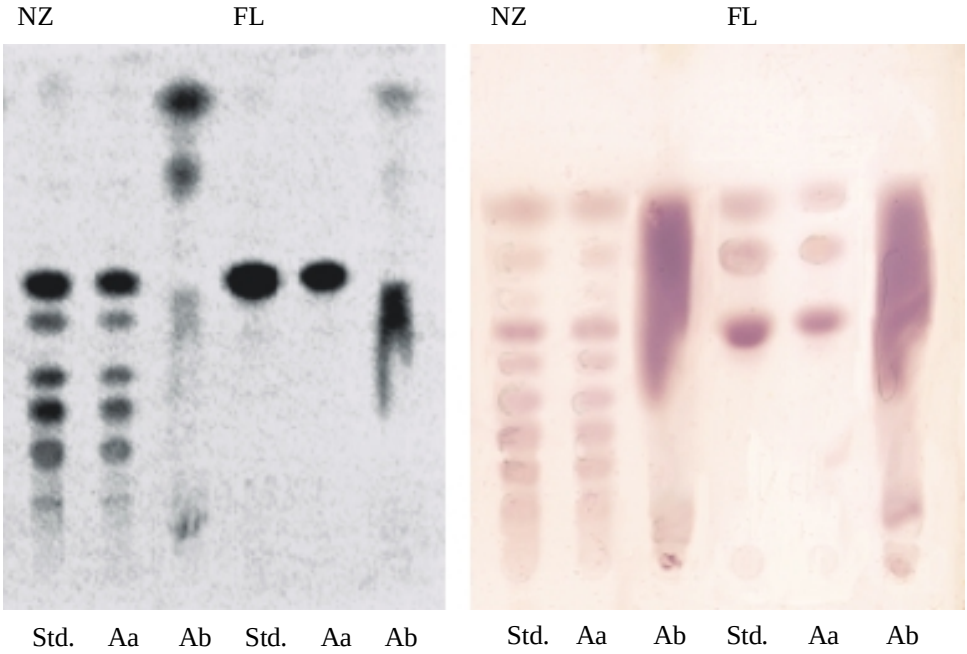


Abb. 45 Dünnschichtchromatographisch aufgetrennte Proben von neutralen Oligosacchariden der Humanmilch (fluoreszenz- oder unmarkiert) nach zweistündiger Inkubation mit Caco-2 Zellen (links unter UV-Licht, rechts nach Orcinolfärbung; NZ = Gesamtfraktion der neutralen Oligosaccharide der Humanmilch, FL = Fucosyllactose, Std = Standard, Aa = nach apikaler Gabe und Entnahme, Ab = nach apikaler Gabe und basaler Entnahme)

Einige der HMO wurden auch als Einzelfraktion gesondert untersucht. Bei der Fucosyllactose verminderte sich die apikale Konzentration im Verlauf der Inkubation, wie in Abbildung 45 (Spalten 4-6 und 10-12) zu sehen ist. Dies traf sowohl für das markierte Saccharid unter UV-Licht als auch für das unmarkierte Saccharid nach der Orcinolfärbung zu. Die Bande der basal erschienenen Fucosyllactose war zwar nach unten verlagert und unscharf, jedoch prägnant. Eine Abspaltung der Fucose war weder in dieser Probe noch bei einer anderen Fraktion zu erkennen.

Bei der Gesamtfraktion der sauren Oligosaccharide der Humanmilch gab es ebenfalls nur minimale Unterschiede zwischen den apikalen Proben zum Versuchbeginn und am Versuchende, was auf eine hohe Stabilität hinwies (**Abb. 46**, Spalten 1-3 und 7-9). Im Gegensatz zu den neutralen Sacchariden war jedoch bereits in der Ausgangsprobe freies Aminobenzamid gut erkennbar. Im Laufe der zwei Stunden wurde diese Bande schwächer, dafür zeichnete sich eine Bande auf Höhe eines markierten Monosaccharids stärker ab.

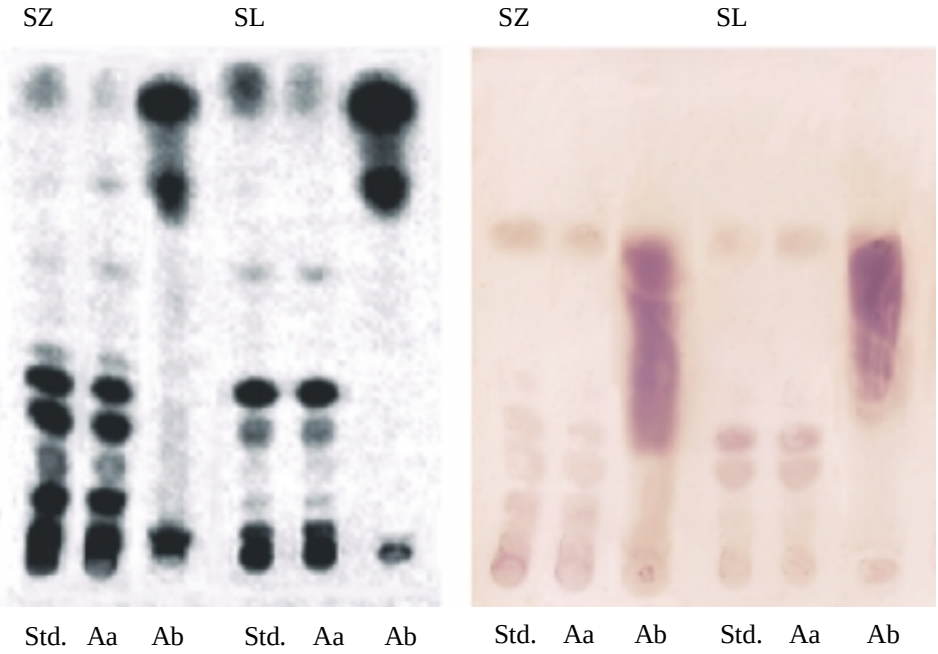


Abb. 46 Dünnschichtchromatographisch aufgetrennte Proben von sauren Oligosacchariden der Humanmilch (fluoreszenz- oder unmarkiert) nach zweistündiger Inkubation mit Caco-2 Zellen (links unter UV-Licht, rechts nach Orcinolfärbung; SZ = Gesamtfraktion der sauren Oligosaccharide der Humanmilch, SL = Sialyllactose, Std = Standard, Aa = nach apikaler Gabe und Entnahme, Ab = nach apikaler Gabe und basaler Entnahme)

Da unmittelbar nach der Fluoreszenzmarkierung bei der chromatographischen Analyse freies 2-Aminobenzamid nicht nachweisbar war, schien die Lagerung und/oder Inkubation eine Hydrolyse der markierten sauren Oligosaccharide gefördert zu haben. Extrem ausgeprägt waren die Banden von freiem 2-Aminobenzamid und der markierten Monosaccharide in der basal entnommenen Probe Ab - selbst wenn man die starke Aufkonzentrierung dieser Probe berücksichtigt. Die im Fluoreszenzassay gemessenen höheren Permeationsraten saurer HMO (Abb. 40 bis 42) scheinen somit auf diese beiden Substanzen zurückführbar zu sein. Fluoreszierende HMO-Konjugate waren im basalen Kompartiment kaum nachweisbar. Überraschenderweise waren jedoch bei allen Proben des basalen Mediums der sauren HMO am und unmittelbar über dem Auftragspunkt deutliche fluoreszierende Banden zu sehen. Die entsprechende Orcinolfärbung ließ nur sehr schwache Banden erkennen, sodaß unklar blieb, ob tatsächlich höhermolekulare saure HMO die Monolayer passiert hatten. Dagegen sprechen jedoch die nicht ausgeprägten Durchtrittsraten der Konjugate im Fluoreszenzassay. Bei einer weiter aufgereinigten Fraktion der Sialyllactose, die jedoch noch Lactosialyltetraose und einige höhermolekulare saure HMO enthielt,

fluoreszierte in der basalen Probe ebenfalls der Auftragspunkt (Abb. 46, Spalte 6). Auf Höhe der markierten Sialyllactose gab es nur eine ganz schwache Fluoreszenz. Freies 2-Aminobenzamid und markierte Glucose waren wie bei der sauren Gesamtfraktion deutlich nachweisbar, was wiederum vermuten läßt, daß eine Hydrolyse der markierten Saccharide in begrenztem Umfang beim Durchtritt durch die Zellschicht stattgefunden hat. Das kleinste saure Oligosacharid verhielt sich somit abweichend von der Fucosyllactose, welche, wie oben beschrieben, im basalen Medium gut darstellbar war.

Die dünnschichtchromatographische Auswertung der Medien aus den Caco-2 Versuchen weist insgesamt darauf hin, daß geringe Mengen an Oligosacchariden die Monolayer in intakter Form permeieren konnten. Kleinere und neutrale Molelüle scheinen dabei gegenüber größeren und geladenen Molekülen bevorzugt zum Durchtritt befähigt. Das Auftreten von freiem 2-Aminobenzamid und markierten Monosacchariden im basalen Kompartiment weist auf eine partielle Hydrolyse besonders der sauren Oligosaccharide hin. Es ist anzunehmen, daß diese Spaltung am Epithel stattgefunden hat und daß das lipophile 2-Aminobenzamid anschließend entweder parazellulär oder transzellulär in das basale Kompartiment gelangte.

Chrakterisierung der resorbierten Saccharide mittels MALDI-MS

Die Reinigung und Konzentrierung der Caco-2 Proben für die MALDI-Analyse gestaltete sich sehr aufwendig, da bereits leicht erhöhte Salzkonzentrationen oder sonstige “Verunreinigungen” aus dem Zellkulturversuch die Darstellung der HMO stark behinderten. Positiv wirkte sich hier jedoch die Fluoreszenzmarkierung der Saccharide aus, welche offenbar die Flugeigenschaften der Molekülionen verbesserte. Nachfolgend werden die massenspektrometrischen Ergebnisse von Maltodextrin, den neutralen und den sauren HMO dargestellt.

Die Ausgangsproben wurden vor der Zugabe von ^{3}H-Mannitol dem Medium entnommen und mit den zum Versuchsende entnommenen Proben der jeweils gegenüberliegenden Kompartimente verglichen. Die inkubierten Proben des Aufgabekom-

partimentes konnten aufgrund ihres hohen Gehalts an Radioaktivität nicht für die MALDI-Analysen eingesetzt werden.

Aus **Abbildung 47** wird deutlich, daß nach zweistündiger Inkubation des fluoreszenzmarkierten Maltodextrins verschiedene Oligomere bis zu einem Polymerisierungsgrad von 8 (DP 8) die Monolayer passiert haben und ins basale Kompartiment gelangten. Größere Moleküle (MG > 1.700 Da) hoben sich kaum noch vom Untergrund ab. Dabei sei daran erinnert, daß mit Hilfe der HPTLC die Dextrine bis DP 6 nachweisbar waren. Die MALDI-Spektren waren somit im höheren Massenbereich empfindlicher und genauer.

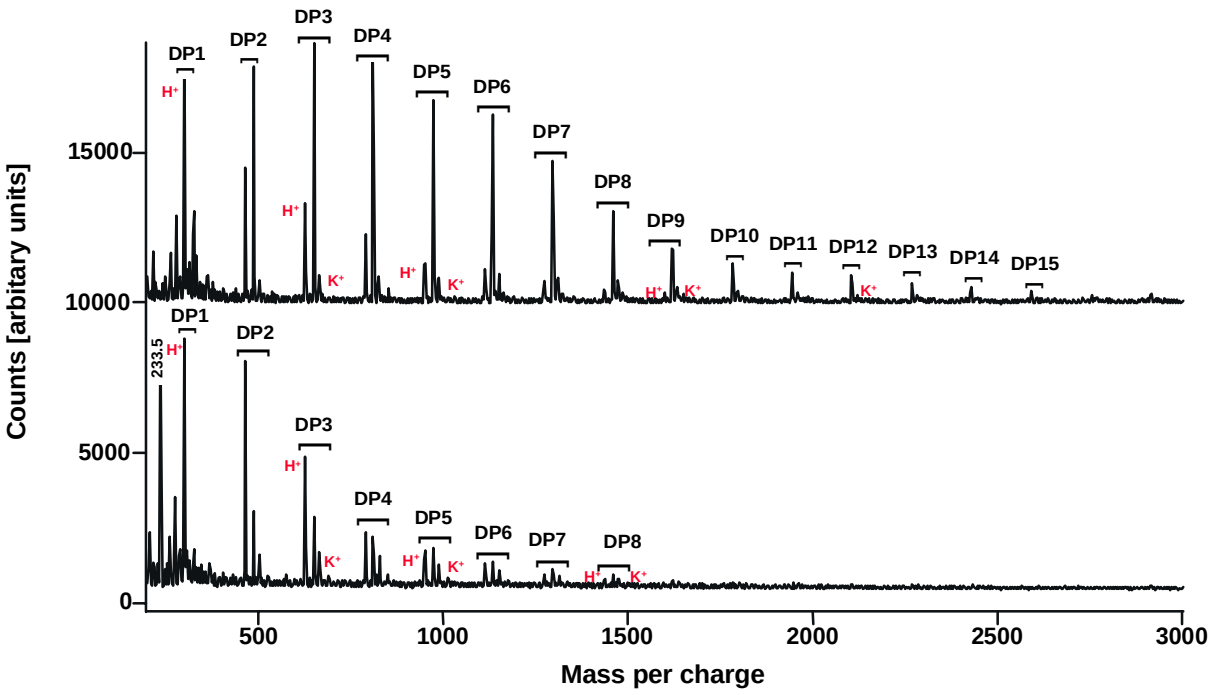


Abb. 47 MALDI-MS Spektren von fluoreszenzmarkierten Maltodextrinproben, vor (oben) und nach (unten) der Inkubation mit Caco-2 Zellen (DP = degree of polymerization, Summe aus 50 Einzelspektren)

Auffallend war bei diesen Spektren, daß die Saccharide mit jeweils drei Massenpeaks detektiert wurden: unter Anlagerung von Wasserstoff-, von Natrium- oder von Kaliumionen. Im Standard dominierte stets das mit Natrium angelagerte Dextrinmolekül, im Entnahmekompartiment waren auch die mit Wasserstoff oder Kalium angelagerten Formen vorhanden. Das Verhältnis der Peakhöhen - als Hinweis auf die

Konzentration der Saccharide - hatte sich ebenfalls während der Inkubation leicht verschoben. Addierte man sämtliche Peaks eines Dextrins, so waren in der Ausgangsprobe Tri- und Tetrasaccharide am stärksten vorhanden. Im gegenüberliegenden Kompartiment war nach der Inkubation das Disaccharid Maltose dagegen das dominierende Molekül. Ein gewisser Größenvorteil schien also bei dem Resorptionsvorgang vorhanden zu sein. Sämtliche Dextrine waren basal ausschließlich in ihrer markierten Form nachweisbar. Die Untersuchung der basal aufgetragenen und apikal entnommenen Proben ergab ein nahezu identisches Bild.

Neutrale HMO mit Molekulargewichten bis ca. 1.200 Da waren nach der Inkubation ebenfalls im basalen Kompartiment nachweisbar (**Abb. 48**). Auch hier zeigte sich, daß das kleinste Oligosaccharid, Fucosyllactose, bevorzugt die Monolayer passiert hatte. Die im Standard noch gut sichtbaren größeren Oligosaccharide waren dagegen deutlich zurückgehalten worden. Nicht nur das Molekulargewicht, sondern auch die räumliche Struktur schien daher beim parazellulären Transport von Bedeutung zu sein, da lineare Dextrine mit vergleichbaren Molekulargewichten (Maltodextrin mit DP > 6) basal gut detektierbar waren. Komplexere Strukturen mit Verzweigungen und/oder Fucosylresten wurden offensichtlich stärker zurückgehalten. Die Kennzeichnung der Strukturen mit * soll die Fluoreszenzmarkierung der Oligosaccharide mit 2-Aminobenzamid andeuten.

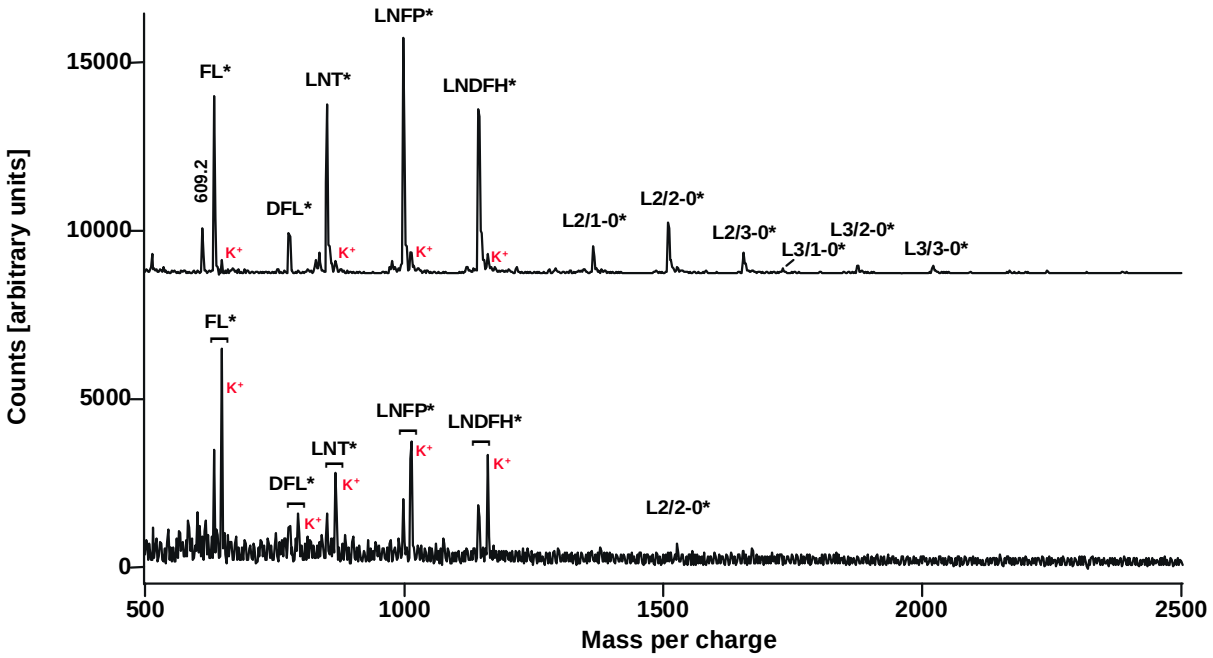


Abb. 48 MALDI-MS Spektren von neutralen fluoreszenzmarkierten Oligosacchariden der Humanmilch vor (oben) und nach (unten) der Inkubation mit Caco-2 Zellen (* = Markierung mit 2-Aminobenzamid, Summe aus 50 Einzelspektren)

Von den sauren HMO gelangten im Vergleich zu den neutralen Oligosacchariden geringere Mengen in das gegenüberliegende Kompartiment und ihre Darstellung war erst bei stärkeren Laserintensitäten möglich (**Abb. 49**). Der kleinste Vertreter, die Sialyllactose, war basal kaum, das disialylierte Tetrasaccharid DSLNT gar nicht im Spektrum nachweisbar. Dagegen war überraschenderweise das monosialylierte Tetrasaccharid LST basal gut detektierbar. Das größte, im basalen Medium detektierbare Saccharid war ein Tetrasaccharid mit einer gebundenen Fucose und einer Sialinsäure. Mehr noch als bei den neutralen HMO schien hier die räumliche Struktur der geladenen Oligosaccharide den Durchtritt durch die Zellschicht bestimmt zu haben. Das neutrale Tetrasaccharid LNT war bereits in der Ausgangsprobe vorhanden, was wahrscheinlich auf die Labilität der NANA-Bindungen während des Laserbeschusses bei der Analyse zurückzuführen war und damit nicht ein Produkt enzymatischer Prozessierung darstellt.

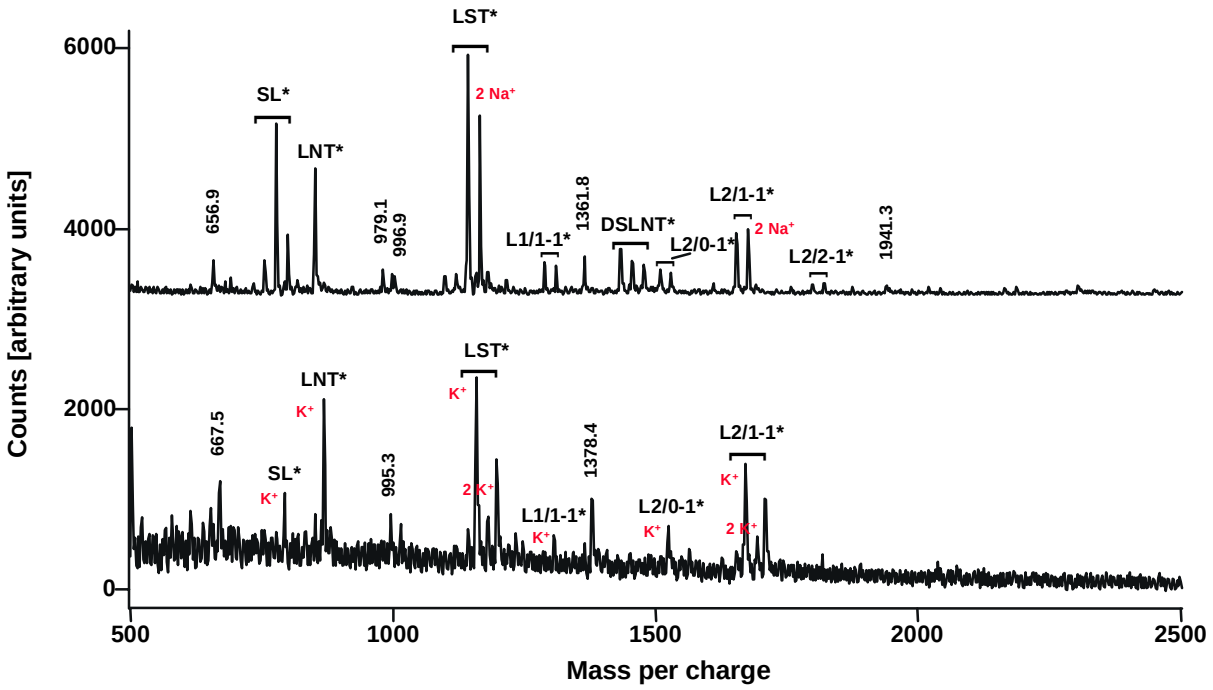


Abb. 49 MALDI-MS Spektren von sauren fluoreszenzmarkierten Oligosacchariden der Humanmilch vor (oben) und nach (unten) der Inkubation mit Caco-2 Zellen (* = Markierung mit 2-Aminobenzamid, Summe aus 50 Einzelspektren)

Zwar lassen die Ergebnisse der MALDI-Analysen keine quantitativen Angaben über den Umfang der Oligosaccharidpermeation zu, doch kann zusammen mit den Befunden der fluorimetrischen und chromatographischen Untersuchungen folgendes über die Resorption der untersuchten Saccharide ausgesagt werden: Ungefähr 2 % der Oligosaccharide gelangten während der zweistündigen Inkubation mit den Caco-2 Zellen in das gegenüberliegende Kompartiment. Dies liegt im Bereich des unspezifischen parazellulären Transports kleiner ungeladener Moleküle wie Mannitol. Ein vektorieller Transport war nicht nachweisbar. Eine substanzielle Hydrolyse während des Durchtritts durch die Epithelzellschicht findet nicht statt. Die im basalen Medium mit Hilfe der MALDI-MS nachweisbaren Oligosaccharide zeigten keine signifikanten Veränderungen ihrer Struktur, die auf eine Hydrolyse wie bspw. die Abspaltung der Fucosylgruppen hinwiesen. Sowohl die Molekülgröße als auch die räumliche Struktur schienen die Permeationsrate der Moleküle zu beeinflussen, wenngleich dies alles in einem quantitativ unbedeutenden Umfang geschieht. Die hohen Fluoreszenzwerte, die vereinzelt bei den sauren Oligosacchariden im Fluoreszenzassay gemessen worden waren, können aufgrund der Ergebnisse der

HPTLC- und MALDI-Analyse nicht auf den vermehrten Transport intakter saurer Moleküle zurückgeführt werden. Vielmehr scheint hier ein Teil des 2-Aminobenzamids bereits im apikalen Kompartiment von den Oligosacchariden abgespalten worden zu sein, welches in freier Form die Monolayer passierte. Mehrfach negativ geladene HMO konnten die Monolayer offenbar nicht passieren, ein Befund der generell für die parazelluläre Permeation von Anionen erhoben wird [13]. Zusammen mit der geringen und mit Mannitol vergleichbaren Permeationsrate kann für die HMO von einer überwiegend parazellulär stattfindenden Resorption am Dünndarmepithel ausgegangen werden.
Während die Permeationsraten von HMO mit Molmassen bis ca. 2.000 Da nach unseren Ergebnissen in einem Bereich liegen, wie sie auch für Glykol- oder Dextranpolymere bekannt sind, konnte von verschiedenen Autoren für Substanzen mit vergleichbaren oder höheren Molekargewichten ein nennenswerter parazellulärer Transport demonstriert werden - bspw. durch J. Pappenheimer für Octapeptide [129] sowie von K. Atisook und J. Madara für ein aus 11 Aminosäuren bestehendes Hämpeptid [8].

Inwieweit beim Säugling unmittelbar nach der Geburt bis zum Alter von ca. vier Wochen eine erhöhte Durchlässigkeit des Dünndarmepithels auch eine erhöhte HMO-Aufnahme ermöglicht, ist ungeklärt. Untersuchungen vor und nach der sogenannten ”gut closure” sind lückenhaft, ebenso wie der genaue Zeitpunkt der “gut closure” umstritten ist [57]. C. Catassi et al. bestimmten das Lactulose-Mannitol-Verhältnis im Urin von Säuglingen im Alter von 1, 7 und 30 Tagen [23]. In dieser Studie sank das Verhältnis von durchschnittlich 1,27 über 0,34 auf 0,22, so daß von einer merklichen Erhöhung der Dichtigkeit gegenüber größeren Molekülen bereits innerhalb der ersten Lebenswoche ausgegangen werden kann. In diesem Zeitraum ist auch die Konzentration an HMO am höchsten und die absolute Menge an resorbierten Oligosacchariden könnte daher hier durchaus von Bedeutung sein.

Neben dem parazellulären Durchtritt stellen die sogenannten M-Zellen (microfold-Zellen) der Peyer’schen Plaques einen weiteren Weg zur Resorption von Makromolekülen (u.a. von Proteinen) im Dünndarm dar [58]. Kleinste Mengen eines Proteins reichen bereits aus, um als Antigen und im weiteren Verlauf als Allergen wirken zu können. Dies gilt ebenfalls für Kohlenhydratanteile von Glykoproteinen, bspw. des

Ovomucoids [111]. Theoretisch ist auch bei den HMO als Resorptionsweg eine Transcytose über die M-Zellen denkbar, wenngleich die dabei resorbierbaren Mengen extrem gering sein müßten.

Die in den vorliegenden Experimenten verwendeten Caco-2 Zellen werden als Modell des menschlichen Dünndarms häufig eingesetzt. Bei einem Vergleich der parazellulären Fluxe von tritiummarkierter Meerrettichperoxidase an Caco-2 Zellen und im Jejunum von Kleinkindern wurden mit 1,0 bzw. 1,1 ng/h/cm^2 auch überraschend ähnliche Werte ermittelt [76]. Generell sollte aber dennoch die begrenzte Aussagekraft von Studien an transformierten Zellen mit ihren spezifischen phänotypischen Eigenschaften bedacht werden. Unsere Befunde an Caco-2 Zellen sind daher nur als Annäherung an die Resorptionsvorgänge beim Säugling zu verstehen. Sie erheben nicht den Anspruch einer umfassenden und abschließenden Antwort auf die Frage nach Art und Umfang der Resorption von HMO. Daher wurden sie durch tierexperimentelle Studien an Mäusen ergänzt, die im nachfolgenden Kapitel beschrieben werden.

2.2.3 In vivo Modell zur Resorption von Oligosacchariden der Humanmilch

2.2.3.1 Kurzdarstellung des Modells

Sieben Wochen alte weibliche Mäuse erhielten per Magensonde verschiedene Mono- oder Oligosaccharide (Glucose, Maltodextrin, Gynolactose, Raftilose, Raftiline) in Dosierungen von 25 bzw. 125 mg verabreicht. In einigen Versuchen wurde darüber hinaus fluoreszenzmarkiertes Dextran mit einem durchschnittlichen MG von 4.400 Da zugesetzt (jeweils 4,1 bzw. 12,5 mg). Über 14 Stunden verblieben die Mäuse in den Stoffwechselkäfigen, wobei im Abstand von zwei Stunden Urinproben gesammelt wurden. Am Versuchsende wurde den Mäusen die Leber entnommen. Alle biologischen Proben wurden gereinigt und konzentriert, dünnschichtchromatographisch getrennt und durch Fluoreszenz- und Orcinolfärbung ausgewertet. (Eine ausführliche Darstellung der Materialien und Methoden findet sich auf den Seiten 155 bis 158)

2.2.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Ergänzend zu den in vitro Studien am Zellmodell wurde die Resorption der HMO auch im Tiermodell untersucht. Die Maus wurde hierbei bereits zur Untersuchung der Hydrolyse von Oligosacchariden im Intestinaltrakt eingesetzt (2.1.4). Die Versuchsanordnung war dabei identisch, die Probennahmen konzentrierten sich bei den Resorptionsversuchen jedoch auf die Verteilung von intakten oder hydrolysierten Oligosacchariden in der Leber und auf die Wiederfindung im Urin der Mäuse. Neben der Gesamtfraktion der HMO in Form der Gynolactose wurden in diesen Versuchen Glucose und ein Maltodextringemisch sowie die Fructooligosaccharide Raftilose und Raftiline eingesetzt. Eine massenspektrometrische Auswertung war hier leider nur sehr begrenzt durchführbar, da das komplexe Probengemisch trotz Reinigung und Konzentrierung die Darstellung der Saccharide mittels MALDI-Analyse stark behinderte.

Vergleich des Lebergewebes von Mäusen nach Gabe von Glucose, Maltodextrin oder Gynolactose

Zwischen den Leberproben der Mäuse, die Glucoselösung bzw. Maltodextrin erhalten hatten (als Glucose- bzw. Maltodextrin-Mäuse bezeichnet) war nach chromatographischer Trennung und Reaktion mit Orcinol kein Unterschied zu sehen. Die Gabe beider Testsaccharide bewirkte leichte Anfärbung der Proben im unteren Teil der Dünnschichtplatten sowie eines größeren Bereichs in der Laufhöhe freier Glucose (**Abb. 50**, Spalte 3 und 5). Die Standards sind jeweils links von den Leberproben aufgetragen. Nach Hydrolyse des Maltodextrins und Resorption in Form von Glucose gelangten ebenso wie nach Gabe freier Glucose größere Mengen der Hexosen zur Leber. Freie Glucose wurde darüberhinaus über die Trinklösung zugeführt, die den Mäusen während der 14-stündigen Versuchsphase zur freien Verfügung stand. Die so aufgenommene Menge an Glucose lag jedoch durchschnittlich bei nur ca. 5 mg pro Maus und war damit vergleichsweise gering. Die Leberproben wiesen bei diesen Mäusen keine orcinolgefärbten Banden durch höhermolekulare Oligomere auf, so daß die Glycogenspeicher der Lebern offenbar entleert worden waren. Der Vergleich mit Leberproben von Mäusen, die bis vor dem Töten normale Futterzufuhr erhalten hatten (Kontrolle), wies ein deutlich abweichendes Muster zu den Glucose-

oder Maltodextrin-Mäusen auf. Nach der Trennung war hier eine sehr starke Orcinolfärbung an und nahe der Auftragsstelle sichtbar, was auf noch vorhandene Glycogenspeicher hinwies (Abb. 50, Spalte 1). Dagegen waren bei diesen Mäusen geringere Färbungsintensitäten im oberen Bereich der Platte vorhanden.

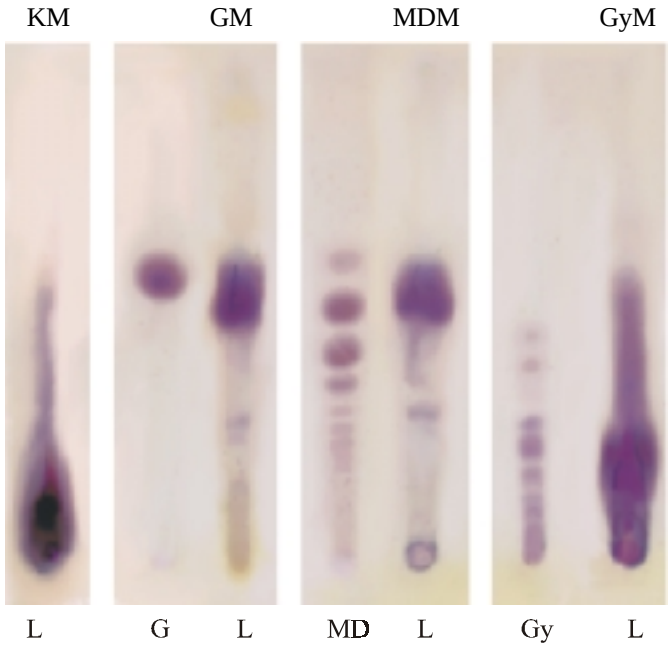


Abb. 50 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters im Lebergewebe von Mäusen unter Kontrollbedingungen und nach Gabe von Glucose, Maltodextrin oder Gynolactose nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Anfärbung mit Orcinol (K = Kontrolle, G = Glucose, MD = Maltodextrin, Gy = Gynolactose, M = Maus, L = Leber)

Bei der Mehrzahl der Mäuse, die Gynolactose erhalten hatten, waren in den Leberproben neben der Färbung in Höhe der Monosaccharide, die auch nach Glucose- bzw. Maltodextringabe zu sehen waren, zusätzliche Banden im mittleren und unteren Bereich der Dünnschichtplatten erkennbar (Abb. 50, letzte Spalte). Dieser Bereich entspricht den Färbungen des HMO-Standards, wenngleich einzelne Oligosaccharide nicht genauer identifiziert werden konnten. Daher kann nur vermutet werden, daß geringe Mengen an HMO aus dem Darm über den Blutweg in die Leber gelangt sind. Diese Banden lagen nicht nur im Bereich kleinerer Oligosaccharide wie Fucosyllactose, sondern entsprachen auch Banden von Hexa- und Heptasacchariden. Die Färbungen in Monosaccharidhöhe können entweder von der Glucoselösung stam-

men und/oder von Fucoseresten, die eventuell von den HMO auf dem Weg zur Leber oder im Organ abgespalten wurden.

Vergleich des Lebergewebes von Mäusen nach Gabe von Fructooligosacchariden

Beim Lebergewebe waren bei der Mehrzahl der Mäuse nach Gabe von Raftilose stärker gefärbte Banden zu identifizieren als bei Tieren nach Glucose- oder Maltodextrin-Verabreichung. Ähnlichkeiten bestanden hier zum Lebergewebe der Gynolactose-Mäuse. Der Bereich zwischen Auftragsstelle und Monosaccharidhöhe war fast durchgehend angefärbt (**Abb. 51**, links). Ähnlich wie bei den Gynolactose-Mäusen scheinen auch hier geringe Mengen der Raftilose über den Blutweg in die Leber gelangt zu sein. Obwohl die Darmproben auf eine Hydrolyse der Fructooligosaccharide hingewiesen hatten, war in den Lebern keine stärkere Anfärbung in Monosaccharidhöhe zu erkennen. Der Bereich des Polymerisierungsgrades von Raftilose, wie im Standard ersichtlich und von der Herstellerfirma mit zwei bis acht angegeben, schien identisch mit dem in den Leberproben. Der Ursprung der Färbungen im unteren Drittel der Platte ist unklar. Eine Bande war hierbei besonders stark gefärbt. Von der Laufhöhe entsprach diese Färbung der Bande, die im Urin einiger Raftilose-Mäuse ebenfalls im Orcinolnachweis sichtbar war (siehe unten).

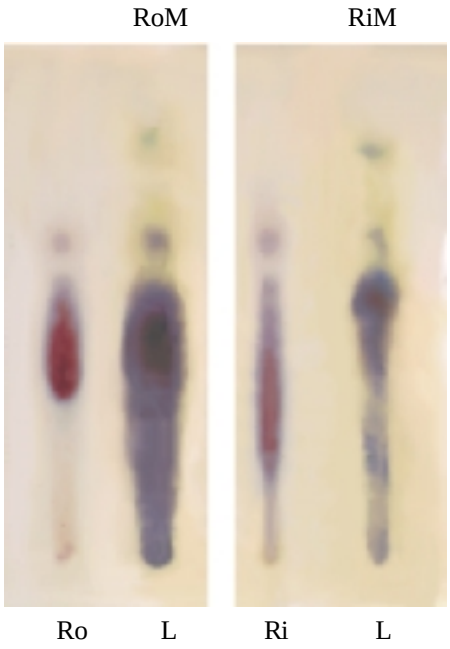


Abb. 51 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters im Lebergewebe von Mäusen nach Gabe von Raftilose oder Raftiline nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Anfärbung mit Orcinol (Ro = Raftilose, Ri = Raftiline, M = Maus, L = Leber)

Im Vergleich zu den Proben nach Raftilosegabe wiesen die Leberproben der Tiere nach Verabreichung von Raftiline weniger intensive Färbungen im mittleren Plattenbereich auf (Abb. 51, rechts). Der höhere Polymerisierungsgrad und/oder die kürzere Transitzeit von Raftiline hatte bei den Mäusen eventuell eine umfangreichere Resorption behindert. Di- und Trisaccharide schienen in den Leberproben in höheren Mengen vorhanden zu sein als Mono- oder Polysaccharide.

Nachweis von fluoreszenzmarkiertem Dextran im Lebergewebe

Die Mäuse, die keinerlei fluoreszierende Substanzen bekommen hatten, wiesen in ihrer Leber unter UV-Licht bereits gelb und blau fluoreszierende Bereiche nahe dem Auftragspunkt der Proben auf. Der von uns eingesetzte an Dextran gekoppelte Fluoreszenzmarker Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) zeigte im UV-Licht eine deutliche intensive gelbe Fluoreszenz und gab so Hinweise auf den Verbleib und Hydrolysegrad des markierten Dextrans. Wurde Dextran der Chromatographie unterzogen, blieb es nahezu vollständig auf dem Auftragspunkt liegen (**Abb. 52**, Spalte 1).

Wesentliches Kennzeichen der Lebergewebsproben von Tieren, die das fluoreszenzmarkierte Dextran zusätzlich zu den Oligosacchariden bekommen hatten, war eine im UV-Licht gelb leuchtende Bande im oberen Plattenbereich, welche bei den Kontrollmäusen nicht zu erkennen war. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um die gleiche Bande, die auch in den Urinproben nachweisbar wurde (siehe unten). Hydrolysierte Dextraneinheiten, wie sie zuvor im Darminhalt nachgewiesen wurden, waren somit resorbiert worden und in den Organismus gelangt.

Aufgrund der lipophilen Eigenschaften des FITC wanderten die markierten Dextrane bei der chromatographischen Auftrennung weiter als unmarkierte Dextrineinheiten gleicher Größe (vergleichbar mit der Markierung der Oligosaccharide mit 2-Aminobenzamid). Bei der Bande im oberen Drittel der Platte, die etwa auf der Höhe eines unmarkierten Monosaccharids lief, scheint es sich daher um ein markiertes Trisaccharidbruchstück des Dextrans zu handeln (Abb. 52, Spalten 3 bis 7). Nahe der Lauffront waren bei einigen Proben weitere schwach gelb leuchtende Banden zu erkennen, die markierte Di- bzw. Monosaccharidbruchstücke des Dextrans darstellen könnten.

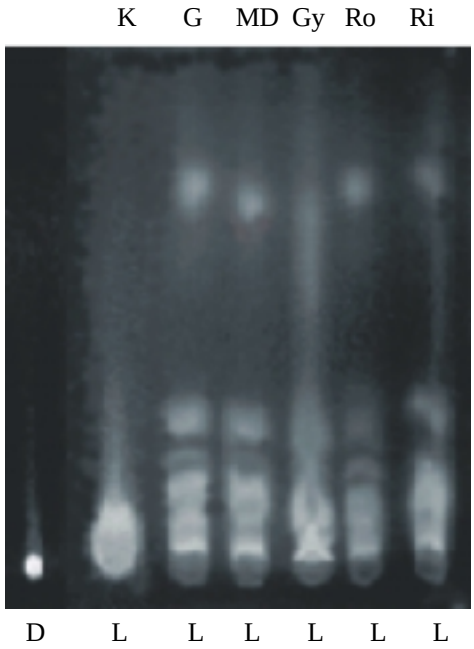


Abb. 52 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters im Lebergewebe von Mäusen unter Kontrollbedingungen oder nach Gabe von fluoreszenzmarkiertem Dextran zusammen mit Glucose, Maltodextrin, Gynolactose, Raftilose oder Raftiline nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und unter UV-Licht (K = Kontrolle, G = Glucose, MD = Maltodextrin, Gy = Gynolactose, Ro = Raftilose, Ri = Raftiline, D = fluoreszenzmarkiertes Dextran, L = Leber)

Bandenfärbungen und Bandenmuster des Lebergewebes aller Versuchsgruppen zeigten unabhängig vom verabreichten Saccharid ein weitgehend konstantes Bild des fluoreszenzmarkierten Dextrans. Der Großteil der Fluoreszenz befand sich stets in der Nähe der Auftragstelle. Stark leuchtende blaue und gelb/orange Banden lagen hier dicht beieinander. Der mittlere Bereich der Platten zeigte kaum Fluoreszenz und im oberen Drittel der Platte waren die bereits erwähnten gelb fluoreszierenden Banden sichtbar. Die komplexeren Oligosaccharide wie Gynolactose, Raftilose und Raftiline ließen daher in den Leberproben keine Unterschiede zu den leicht hydrolysierbaren Sacchariden hinsichtlich der Resorption und weiteren Prozessierung von Dextranbruchstücken erkennen. Auch die unterschiedlichen Dosierungen der Testsaccharide und des Dextrans hatten keine Auswirkung auf die in der Leber nachweisbaren Banden. Die unter UV-Licht deutlich sichtbaren kleineren Dextranbruchstücke waren durch das Orcinol nur sehr schlecht anfärbbar, so daß sie ohne die vorherige Einzeichnung der fluoreszierenden Banden auf der Platte kaum aufgefallen wären. Die größere Empfindlichkeit des Fluoreszenznachweis erwies sich so als Vorteil,

wenngleich durch die Fluoreszenzmarkierung eine mögliche Veränderung der Resorptionseigenschaften der Dextrane nicht auszuschließen ist.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß vermutlich geringe Mengen der eingesetzten komplexeren Oligosaccharide wie HMO und Fructooligosaccharide aus dem Mäusedarm aufgenommen wurden und über die Blutbahn zur Leber gelangten. Di- bis Heptasaccharide ließen sich in der Leber gut darstellen, während Monosaccharide nur in geringeren Mengen vorhanden waren. Dagegen überwog der Anteil an Monosacchariden bei den Tieren, die leicht hydrolysierbare Saccharide erhalten hatten. Die Gabe von markiertem Dextran zusätzlich zu den Testoligosacchariden zeigte, daß bei allen Mäusen etwa gleiche, aber stets nur geringe Mengen an kleineren Dextranbruchstücken in die Leber gelangten.

Vergleich des Urins von Mäusen nach Gabe von Glucose, Maltodextrin oder Gynolactose

Während des Versuchszeitraums von 14 Stunden gaben die Versuchstiere zwischen 0,3 und etwa 1,0 ml Urin ab. Der Großteil des Urins wurde während der ersten sechs Stunden nach dem Sonden abgegeben, wobei die verabreichten Testsubstanzen keine Auswirkungen auf das Urinvolumen hatten. Bei den Mäusen, die Glucoselösung erhielten, wurden nur in den frühen Urinproben nach chromatographischer Auftrennung und nach Reaktion mit Orcinol deutliche Färbungen auf Monosaccharidhöhe nachweisbar (**Abb. 53**, Spalten 2 und 3). Sowohl die frühen als auch einige der späten Urinproben der Maltodextrin-Mäuse zeigten eine schwache Bande auf Monosaccharidhöhe sowie Färbungen im mittleren Plattenbereich (Abb. 53, Spalten 5 und 6). Die weiteren Anfärbungen ließen keine genaue Zuordnung zu einzelnen Strukturen zu.

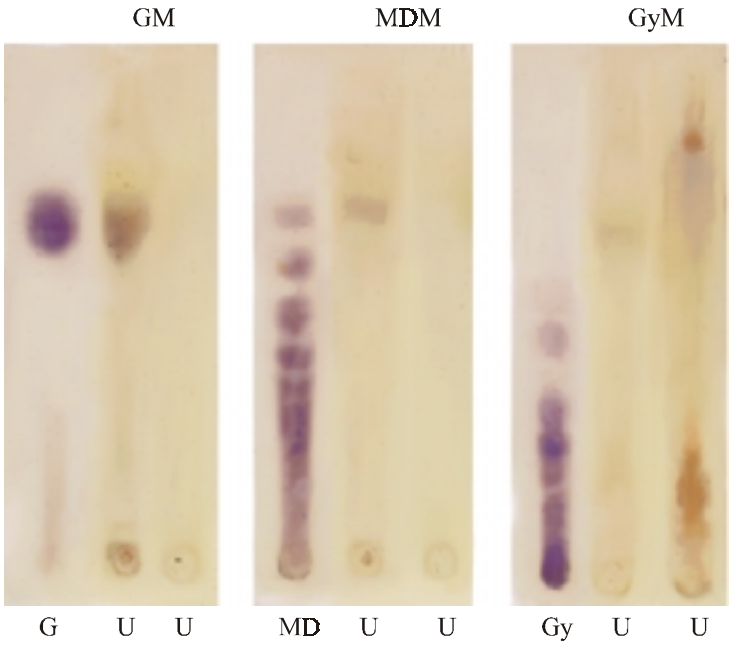


Abb. 53 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters der Urinproben von Mäusen nach Gabe von Glucose, Maltodextrin oder Gynolactose sowie entsprechender Standards nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Anfärbung mit Orcinol (G = Glucose, MD = Maltodextrin, Gy = Gynolactose, M = Maus, U = Urin)

Bei den Mäusen, die Gynolactose erhielten, waren stets größere Mengen an Sacchariden im Urin nachweisbar als bei den Glucose- und Maltodextrin-Mäusen. Bei einigen der Tiere waren bereits nach zwei Stunden starke Orcinol-positive Banden im Urin sichtbar. Bei den anderen Tieren der gleichen Gruppe waren in den frühen Urinproben nur schwache Färbungen, in den späteren Urinfraktionen jedoch stärkere Anfärbungen erkennbar (Abb. 53, Spalten 8 und 9). Dabei erwiesen sich Bereiche auf und oberhalb der Laufhöhe von Monosacchariden sowie Banden oberhalb des Auftragpunktes als stark gefärbt. Letztere finden sich auch beim Gynolactosestandard. Eine Bande auf der Laufhöhe einer Hexaose war bei mehreren Proben besonders intensiv gefärbt. Die häufige Anfärbung des unteren Plattenbereichs läßt darauf schließen, daß komplexe Oligosaccharide der Gynolactose mit Molekulargewichten über 1.000 Da aus dem Darmlumen resorbiert worden sein könnten. Da jedoch auch kleinere Saccharide bis zum Monosaccharid im Urin der Gynolactose-Mäuse nachweisbar waren, muß ein Teil der HMO zuvor hydrolysiert worden sein -es sei denn, die Färbungen stammen ausschließlich von Glucose, die von den Mäusen mit der Trinklösung aufgenommen wurde. Der Ursprung der Färbung oberhalb der Monosaccharide bleibt unklar. Bei einzelnen Tieren waren diskrete Banden in den

Urinproben generell nicht erkennbar. Hier trat vielmehr eine durchgehende Färbung entlang der gesamten Laufmittelfront auf.
Ebenso wie bei den Leberproben wurden die Urinfraktionen stark konzentriert. Eine Abschätzung der Erscheinensrate der Saccharide (Orcinol-postive Banden) nach Verabreichung von Gynolactose an die Mäuse ergab eine Wiederfindungsrate der Oligosaccharide im Urin von etwa 1 bis 3 % der Ausgangsmenge. Diese Abschätzung basiert auf einem Vergleich der densitometrisch erfaßten Intensität der Orcinolfärbung von Standard und Urinproben.

Vergleich des Urins von Mäusen nach Gabe von Fructooligosacchariden

In den Urinproben der Mäuse, die die Fructooligosaccharide Raftilose oder Raftiline erhalten hatten, waren in den meisten Proben Orcinolfärbungen auf Monosaccharidhöhe deutlich sichtbar. Bei den Raftilose-Mäusen kamen weitere Banden im mittleren Plattenbereich hinzu (**Abb. 54**, Spalte 2). Dieser Bereich entspricht den größten, deutlich nachweisbaren Sacchariden des Raftilosestandards (Abb. 54, Spalte 1). Im Lebergewebe dieser Tiere waren neben diesen Sacchariden auch höhermolekulare Saccharide nachweisbar (vergleiche Abb. 51). Bei den Mäusen, die Raftiline erhalten hatten, waren die Färbungen im mittleren Plattenbereich durchweg schwächer, während sie in Höhe von Mono- und Disacchariden deutlich vorhanden waren. Oberhalb der Auftragsstelle traten in einigen Fällen weitere Banden auf (Abb. 54, Spalte 4). Die frühen Urinproben (0 bis 6 Stunden nach Gabe) unterschieden sich kaum von den späteren Urinproben (nach 6 bis 14 Stunden) und das Bandenmuster war dem des Lebergewebes meist sehr ähnlich.

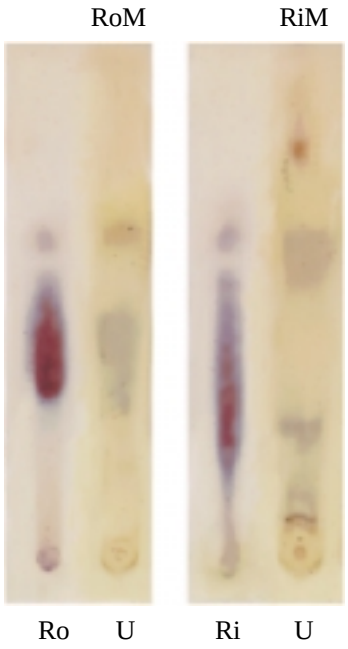


Abb. 54 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters der Urinproben von Mäusen nach Gabe von Raftilose oder Raftiline sowie entsprechender Standards nach dünnschicht-chromatographischer Auftrennung und Anfärbung mit Orcinol (Ro = Raftilose, Ri = Raftiline, M = Maus, U = Urin)

Nachweis von fluoreszenzmarkiertem Dextran im Urin

Der Urin der Mäuse besaß generell eine leichte Eigenfluoreszenz, meist gelblich bis orangefarben. Die Urinproben der Tiere, die zusätzlich zum Testoligosaccharid das fluoreszenzmarkierte Dextran erhielten, zeigten jedoch bereits vor der Konzentrierung stets eine stärkere Fluoreszenz. Ein Teil des intakten markierten Dextrans oder markierter Bruchstücke mußte somit von den Tieren resorbiert und renal eliminiert worden sein. Nach chromatographischer Trennung dominierte bei allen Urinproben eine verschwommene, gelb fluoreszierende Bande im oberen Plattenbereich (**Abb. 55**, Spalten 2 bis 6).

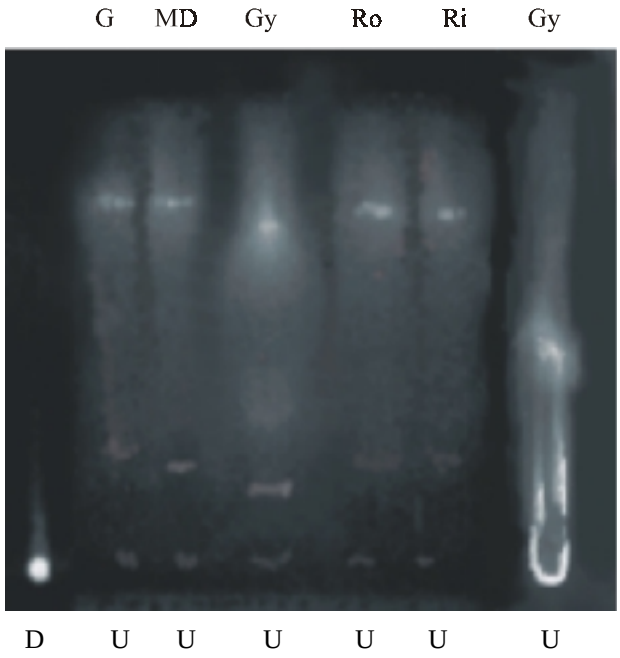


Abb. 55 Darstellung des Saccharidmusters im Urin von Mäusen nach Gabe von fluoreszenzmarkiertem Dextran zusammen mit Glucose, Maltodextrin, Gynolactose, Raftilose oder Raftiline nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und unter UV-Licht (G = Glucose, MD = Maltodextrin, Gy = Gynolactose, Ro = Raftilose, Ri = Raftiline, D = fluoreszenzmarkiertes Dextran, U = Urin)

Oberhalb dieser Bande waren meist noch schwach zwei weitere fluoreszierende Banden zu sehen. Um freies FITC konnte es sich hierbei nicht handeln, da dieses mit der Lauffront wanderte. In der Laufhöhe vergleichbare Banden wurden bereits im Darminhalt und in den Lebern der Tiere nachgewiesen. In Proben des Darminhalts waren die Banden jedoch wesentlich stärker ausgeprägt (siehe Abb. 27). Diese hier nachweisbaren Banden stellten vermutlich die kleinsten Bruchstücke des Dextrans als fluoreszierende Tri-, Di- bzw. Monosaccharide dar. Gelegentlich waren bei den Gynolactose-Mäusen etwas stärker fluoreszierende Bereiche oberhalb der Auftragsstelle und auf Monosaccharidhöhe zu erkennen, als bei den Mäusen, die Glucose, Maltodextrin oder Fructooligosaccharide erhielten (Abb. 55, Spalte 4 im Vergleich zu den Spalten 2, 3, 5 und 6). Bei allen Tieren trat im unteren Drittel der Platten häufig auch blaue Fluoreszenz auf, die jedoch nicht von der FITC-Markierung des Dextrans stammen konnte. Zum Teil korrespondierten diese fluoreszierenden Banden mit Orcinolanfärbungen, besonders bei den Gynolactose- und Raftilose-Mäusen. Größere Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren jedoch nicht zu erkennen.

Es sei hier darauf hingewiesen, daß bei einem Tier - vermutlich durch eine Perforation des Magens während der Sondenapplikation - bereits nach ca. einer Stunde ein stark fluoreszierender Urin auftrat. Nach Auftrennung mittels HPTLC fluoreszierten besonders die Auftragsstelle sowie mehrere Bereiche im unteren Drittel der Platte (Abb. 55, Spalte 7). Vermutlich waren in diesem Falle intaktes Dextran bzw. große Bruchstücke in nennenswerten Umfang ins Blut und die Nieren übergetreten. Dies weist darauf hin, daß unter physiologischen Bedingungen lediglich kleinere Bruchstücke des Dextrans in den Urin gelangten, dagegen intaktes Dextran so gut wie nicht resorbiert wurde.

Wie bereits bei den Lebern festgestellt, zeigten die Tiere, welche komplexere Saccharide wie Gynolactose oder Fructooligosaccharide erhelten, etwas stärkere Orcinolfärbungen als nach Gabe leicht hydrolysierbarer Saccharide. Mengenmäßig war der Anteil an resorbierten Oligosacchariden hier mit maximal 3 % ebenfalls gering; dennoch können auch diese kleinen Mengen physiologisch bedeutsam sein. Da eine massenspektrometrische Untersuchung, wie bereits erwähnt, nicht möglich war, konnten einzelne Oligosaccharide mit den hier angewendeten Methoden leider nicht identifiziert werden.

Vergleicht man die Fluxe an Caco-2 Zellen sowie die Befunde der dünnschichtchromatographischen und massenspektrometrischen Analyse der in vitro Versuche mit denen der Versuchstiere zeigen sich wesentliche Übereinstimmungen. Geringe Mengen an Sacchariden passierten die Monolayer im Zellkulturversuch und waren ebenfalls in geringen Mengen in der Leber und im Urin der Mäuse nachweisbar. Beide Systeme ergaben Resorptionsraten von ca. 2 % einer verabreichten Dosis. Umgerechnet auf die pro Tag aufgenommenen Mengen an HMO mit der Muttermilch, könnten somit (bei 12 g/l und 800 ml Milch/d) etwa 180 mg Oligosaccharide vom Säugling resorbiert werden. Während auch größere Homooligomere des Maltodextrins weitgehend unverändert in das serosale Kompartiment der Caco-2 Zellen - wenngleich in geringen Mengen - gelangten, waren diese Dextrine in der Leber und im Urin der Mäuse nur noch als niedermolekulare Saccharide nachweisbar. Dagegen wurden die komplexeren Oligosaccharide der Humanmilch mit einer Resorptionsrate von etwa 2 bis 3 % weitgehend intakt von den Mäusen resorbiert und renal ausgeschieden.

Aus den Befunden dieser in vitro und in vivo Versuche kann abgeleitet werden, daß nur ein geringer Anteil der HMO enzymatisch hydrolysiert oder in intakter Form resorbiert wird. Der weitaus größere Teil der Milcholigosaccharide gelangt hier offenbar - und wohl auch beim Säugling - in die unteren Darmabschnitte.
Da damit zunächst größere Mengen an intakten HMO im Gastrointestinaltrakt verbleiben, stellt sich die Frage nach möglichen biologischen Wirkungen, welche diese Oligosaccharide dort entfalten können. Wir haben daher im folgenden u.a. untersucht, inwieweit HMO in ihrer Wechselwirkung mit den Darmepithelzellen - ähnlich wie andere trophische Faktoren der Muttermilch - Einfluß auf die Zellzykluskontrolle von Enterozyten nehmen.

2.3 Können Oligosaccharide der Humanmilch den Zellzyklus von intestinalen Epithelzellen modifizieren ?

2.3.1 Einsatz von Zellkulturen zur Untersuchung von Zellzyklusereignissen

Um die Wechselwirkung von Nahrungsinhaltstoffen mit Epithelien des Intestinaltraktes zu untersuchen, werden verschiedene in vitro und in vivo Techniken wie die Zellkultur, Perfusion des Intestinalgewebes oder Untersuchungen in Ussing-Kammern angewandt. Für die Zellkultur sind inzwischen auch Primärzellinien des menschlichen Darms verfügbar, die immortalisierten Zellinien werden jedoch aufgrund ihrer guten Handhabbarkeit weiterhin überwiegend eingesetzt. J. Fogh etablierte seit 1964 mehr als 100 Krebszellinien aus dem menschlichen Colon, darunter die Linie Caco-2, das am häufigsten eingesetzte in vitro Modell für das menschliche Dünndarmepithel [54,190]. Diese Zellinie ist bislang einziger Vertreter des sogenannten Typ 1. Bei dieser Einteilung werden spontan differenzierende Zellinien (Caco-2) von Zellinien unterschieden, die entweder nur unter bestimmten Kulturbedingungen ausdifferenzieren (Typ 2, z.B. HT-29), Linien die eine Monolayer bilden, jedoch kaum oder keine Differenzierungsmarker zeigen (Typ 3, z.B. T84) sowie Linien die eine Multilayer bilden, ohne jeglichen Hinweis auf Zelldifferenzierung (Typ 4, z.B. SW480) [19].

Die Caco-2 Zellinie wird bei der American Type Culture Collection (ATCC), der größten Sammlung von Organismen und Kulturen, unter der Kennzeichnung ”HTB 37, Adenocarcinoma, colon, human” geführt. Der Name leitet sich von ”cancer” und ”colon” ab. J. Fogh isolierte diese Zellinie 1974 aus einem Primärtumor des Dickdarms eines 72jährigen Kaukasiers mit der Blutgruppe 0+. P. Artursson, A. Zweibaum, W. Rubas u.a. beschrieben seit den 80er Jahren die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten dieser Zellinie [6, 41, 190]. Trotz der Herkunft aus dem unteren Darmabschnitt besitzen Caco-2 Zellen zahlreiche morphologische und funktionelle Eigenschaften, die denen der menschlichen Dünndarmenterozyten sehr ähneln, so daß diese Zellinie auch bei unseren Untersuchungen als Modell eingesetzt wurde.

Abbildung 56 zeigt schematisch den Aufbau einer Dünndarmzotte mit ausdifferenzierten Enterozyten an der Zottenspitze, wie sie überwiegend von der Zellinie Caco-2 repräsentiert werden.

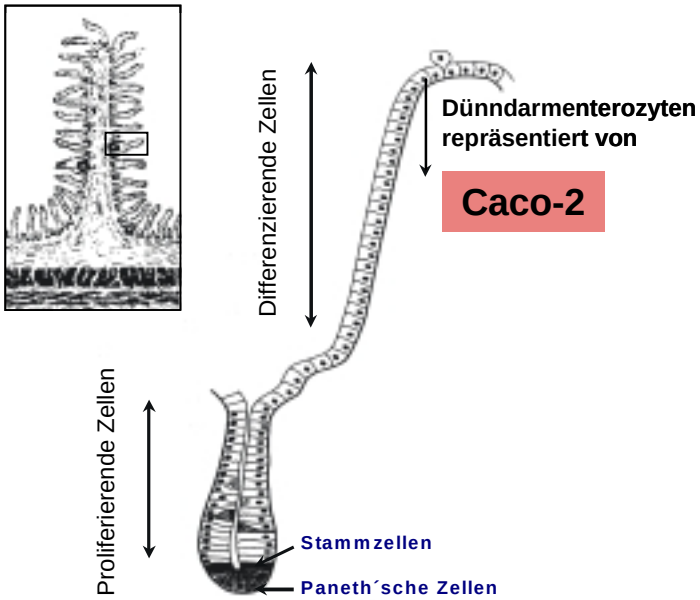


Abb. 56 Schematische Darstellung einer Dünndarmzotte

Die polarisierten Zellen besitzen eine apikale Bürstensaummembran, die der luminalen Seite, sowie die basolateralen Membranen, die zur serosalen Seite der Dünndarmenterozyten hin gerichtet sind. Caco-2 Zellen proliferieren solange bis sie eine konfluente Zellschicht ausbilden und sich zwischen den benachbarten Zellen “tight junctions“ ausbilden (Kontaktinhibierung). Die morphometrischen Eigenschaften der Caco-2 Zellen entsprechen ungefähr denen untransformierter Zellen mit einer Höhe von ca. 25 µm, einer Breite von ca. 8 µm und einer Microvillilänge von ca. 1,4 µm [41]. Zahlreiche Bürstensaummembranenzyme (wie z.B. Aminopeptidasen, Sulfo-, Glycosyl- und Sialyltransferasen) und Transporter (z.B. für Gallensäuren, Aminosäuren, Dipeptide, Wachstumsfaktoren, Vitamin B_{12} oder die Glucosetransporter SGLT1, GLUT2 und GLUT5) wurden bislang bei Caco-2 Zellen nachgewiesen, so daß diese Zellinie als wichtiges Screening-Modell auch zum Testen der oralen Verfügbarkeit von Medikamenten eingesetzt wird [41, 19]. Teilweise unterscheiden sich die Enzyme der Caco-2 Zellen jedoch im Molekulargewicht oder in den Isoformen von denen der ursprünglichen Enterozyten und ähneln eher denen von Fötal- oder

Colonzellen. Bei der Übertragung der Ergebnisse auf die in vivo Bedingungen beim Menschen müssen häufig Korrekturfaktoren eingesetzt werden, die u.a. die unterschiedlichen transepithelialen Widerstände (TEER) der Zellschichten berücksichtigen. Die Werte liegen mit durchschnittlich 200 bis 400 Ohm x cm^2 bei der Krebszelllinie deutlich höher, was vermutlich auch auf die Anzahl der “tight junctions“ pro Flächeneinheit zurückzuführen ist [162]. Das Caco-2 Modell ähnelt in dieser Hinsicht eher dem menschlichen Colon als dem Dünndarm mit seinen enormen Oberflächenvergrößerungen. Zu beachten bleibt auch, daß Caco-2 Zellen ausschließlich den absorptiven Typus der Dünndarmzellen repräsentieren. Goblet- oder Becherzellen, wie sie zu ca. 5 % im menschlichen Jejunum vorkommen, sind hier nicht vorhanden, so daß die Mucinproduktion nur durch Cokultur mit anderen Zellinien wie HT-29-H erreicht werden kann [186]. In der Literatur findet man auch häufig abweichende oder gar sich widersprechende Untersuchungsergebnisse zur Ausprägung von Eigenschaften oder der Resorption von Testsubstanzen. Dies ist in besonderem Maße auf unterschiedliche Kulturbedingungen und Materialien, auf Herkunft, Alter und Passagenzahl der Zellen zurückzuführen. Gleichzeitig besitzen gerade auch Caco-2 Zellen eine starke Diversität: voll differenzierte Zellen können neben noch unreifen in der Monolayer vorhanden sein. Präzise Angaben zur Kultivierung und die Einbeziehung von Referenzsubstanzen sind daher sehr wichtig, um die Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen vergleichen zu können (empfehlenswerter Übersichtsartikel von F. Delie und W. Rubas [41]).

Die Zellinie HT-29 wurde ebenfalls von J. Fogh etabliert. Sie stellt die erste humane Colonkarzinomzellinie dar und wurde 1964 aus einem Primärtumor einer an Darmkrebs erkrankten 44jährigen Kaukasierin mit Blutgruppe A+ isoliert [54, 190]. Bei ATCC wird die Zellinie unter der Bezeichnung ”HTB 38, Adenocarcinoma, colon, moderately well-differentiated grade II, human” geführt. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Caco-2 Zellinie differenzieren HT-29 Zellen nicht spontan aus, wachsen als unpolarisierte Mono- und Multilayer und weisen insgesamt eher Eigenschaften des menschlichen Colons auf, wie in **Abbildung 57** dargestellt wird.

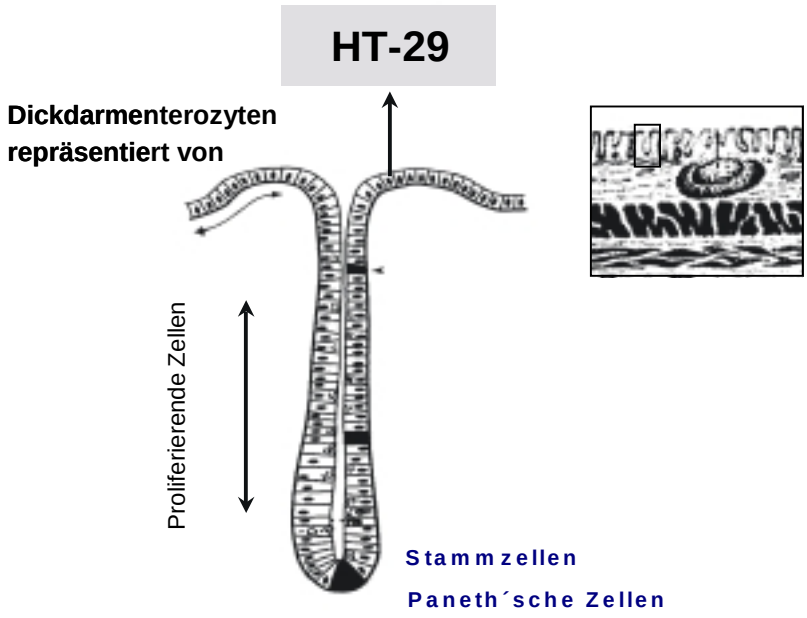


Abb. 57 Schematische Darstellung einer Dickdarmkrypte

Wird jedoch die Glucose des Standardmediums durch Galactose ersetzt, beginnen die HT-29 Zellen zu differenzieren und bilden eine polarisierte Monolayer aus. Das Charakteristikum einiger Subklone (z.B. HT-29/B6 oder HT-29-H) ist die Ausbildung von mucusproduzierenden Becherzellen. Bei unseren Untersuchungen wurde der Originalstamm der Zellinie HT-29 als Modell für eine gering differenzierte Dickdarmzelle eingesetzt.

Aufgrund der bereits beschriebenen Befunde zum Schicksal der Oligosaccharide der Humanmilch scheint es wahrscheinlich, daß ein Großteil dieser Saccharide unverändert den kindlichen Dünndarm passiert und in die tieferen Darmabschnitte gelangt (siehe 2.1 und 2.2). Da diese mit der Nahrung zugeführten Mengen mit 6 bis 25 g/l relativ hoch sind, interessierte, ob die Oligosaccharide Einfluß auf den Zellzyklus ausüben, indem sie a) die Proliferationsrate beeinflussen, b) zelltoxische Eigenschaften besitzen, c) die Zelldifferenzierung fördern oder d) den physiologischen Zelltod beeinflussen können (**Abbildung 58**).

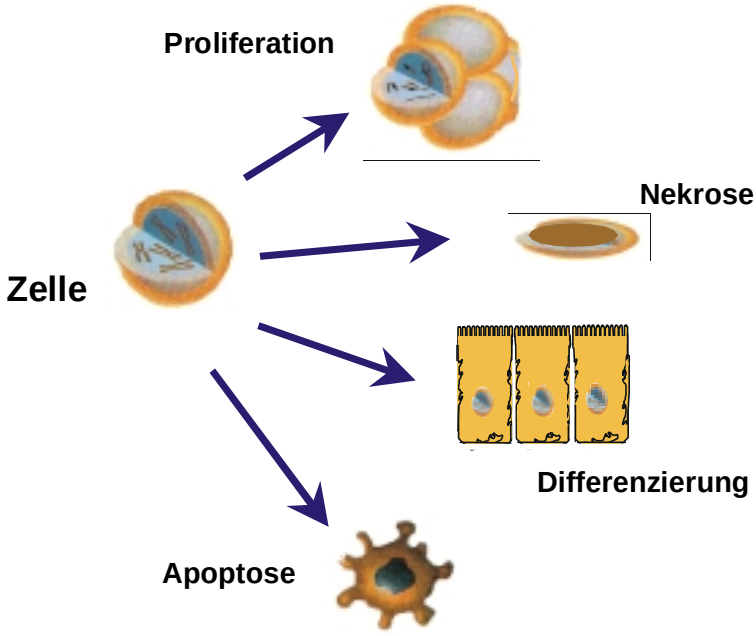


Abb. 58 Mögliche “Schicksale” einer Darmepithelzelle nach Exposition gegenüber Oligosacchariden der Humanmilch

2.3.2 In vitro Modelle zum Einfluß komplexer Oligosaccharide auf die Zellproliferation

2.3.2.1 Kurzdarstellung der Methoden

Die Colonkarzinomzellen Caco-2 und HT-29 wurden mit konstanter Zellzahl auf Multiwellplatten ausgesät und nach Anhaftung mit verschiedenen Saccharidenüber 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mikroskopisch inspiziert und die Zellzahlen ermittelt. Diese wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs (SYTOX Green Nucleic Acid Stain) bestimmt, der die Eigenschaft besitzt, nur in Zellen mit beschädigter Zellmembran einzudringen und sich an Nucleinsäuren zu binden. Bei Anregung mit der entsprechenden Wellenlänge kann diese Bindung durch Vervielfachung der Emissionsrate gemessen werden. Mit Hilfe von zellmembranschädigenden Substanzen (gezielte Lyse) konnten die Anteile toter und vitaler Zellen sowie die Gesamtzellzahl bestimmt werden. In **Abbildung 59** ist die Vorgehensweise zur Zellzahlbestimmung schematisch dargestellt.

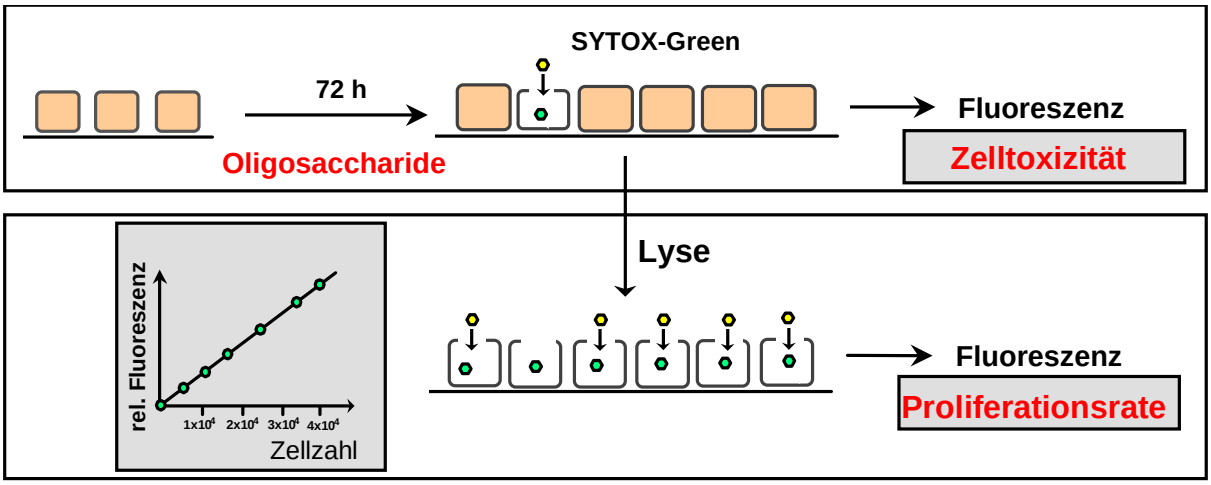


Abb. 59 Bestimmung der Zahl vitaler Zellen und der Gesamtzellzahl mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SYTOX Green

Die Effekte auf die Zellproliferation wurden an der Gesamtfraktion der HMO, den neutralen und sauren Oligosacchariden, an verschiedenen Einzelfraktionen sowie an Muttermilch unterschiedlicher Laktationsperioden getestet. Darüberhinaus wurde die Wirkung von Lactose, Lactulose und zweier Fructooligosaccharide untersucht. Die Effekte der HMO wurden auch in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an fötalem Kälberserum ermittelt (0,1 bzw. 10 %). Die höhermolekularen HMO, Lactulose, die Fructooligosaccharide und die Muttermilchfiltrate wurden lediglich an HT-29 Zellen geprüft, alle anderen Substanzen sowohl an HT-29 als auch an Caco-2 Zellen. Als Kontrollsubstanz wurde ein proliferationshemmendes Polyhydroxyphenol mit bekannter Wirkung eingesetzt. (Eine ausführliche Darstellung der Materialien und Methoden findet sich auf den Seiten 163 bis 170)

2.3.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Der Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffs SYTOX Green erleichtert die Zellzahlbestimmung im Vergleich zur Auszählung der Zellen unter dem Mikroskop unter Nutzung einer Neubauer-Kammer. Bis zu einer Zellzahl von 50.000 bei HT-29 Zellen und 70.000 bei Caco-2 Zellen gab es eine lineare Korrelation mit $p < 0{,}001$ zwischen Zellzahl und Fluoreszenz, wie **Abbildung 60** zu entnehmen ist.

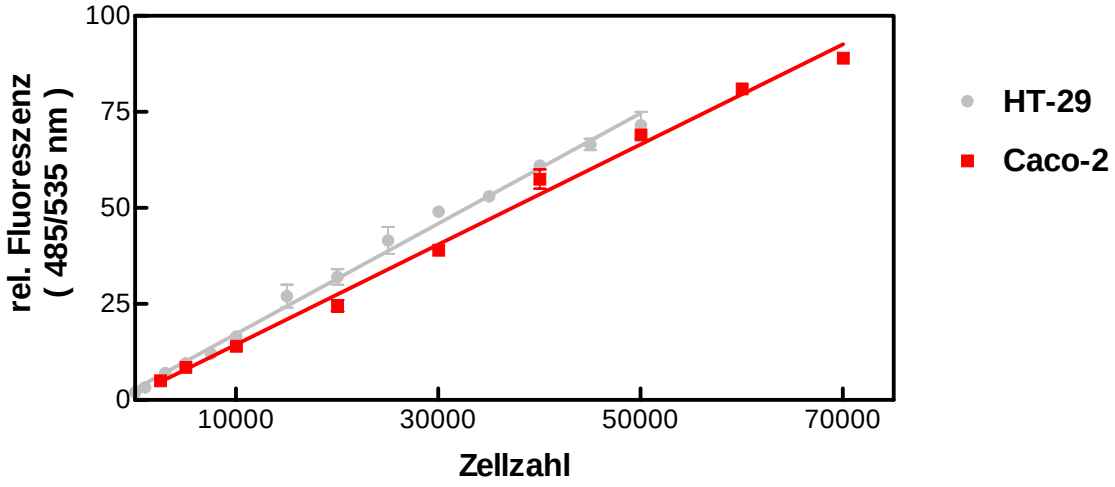


Abb. 60 Standardkurven zur Zellzahlbestimmung von Caco-2 und HT-29

Erst bei noch höheren Zellzahlen zeigte sich eine Sättigung in der Fluoreszenzintensität als Funktion der Zellzahl. Dieser Bereich wurde jedoch in unseren Versuchen nie erreicht. Bei der Darstellung unserer Studienergebnisse wurde die Anzahl der Zellen unter Kontrollbedingungen (ohne Saccharidzusatz) gleich 100 % gesetzt. Die Kontrollsubstanz Quercetin, ein Pentahydroxyflavon, kommt in pflanzlichen Nahrungsmitteln vor und gelangt nach oraler Aufnahme beim Menschen weitgehend unverändert in den Dickdarm. In Zellkulturversuchen wurde festgestellt, daß dieses Flavonoid die Proliferation von Colonkarzinomzellen signifikant hemmt [96]. In einer Konzentration von 150 µM reduzierte Quercetin in unseren dreitägigen Inkubationsversuchen die Zahl der Caco-2 und HT-29 Zellen um durchschnittlich 80 %.

Die Muttermilchproben zeigten deutliche antiproliferative Eigenschaften. Dabei verminderten frühe Muttermilchproben das Wachstum der HT-29 noch deutlicher als Proben aus der späteren Laktationsperiode. In **Abbildung 61** werden die Ergebnisse mit Muttermilch der 3. Laktationswoche (links) und des 4. Laktationsmonat (rechts) gegenübergestellt. Die sterilfiltrierten Proben wurden dabei in Anteilen von 1 bis 10 % dem Kulturmedium zugesetzt, welches 10 % fötales Kälberserum enthielt. Eine Verminderung der Zellzahl um 50 % (EC_{50} Werte) konnte bei einem Zusatz von ca. 1,4 % der frühen und ca. 6 % der späteren Milchprobe erzielt werden (siehe untere Grafiken bei Abbildung 61).

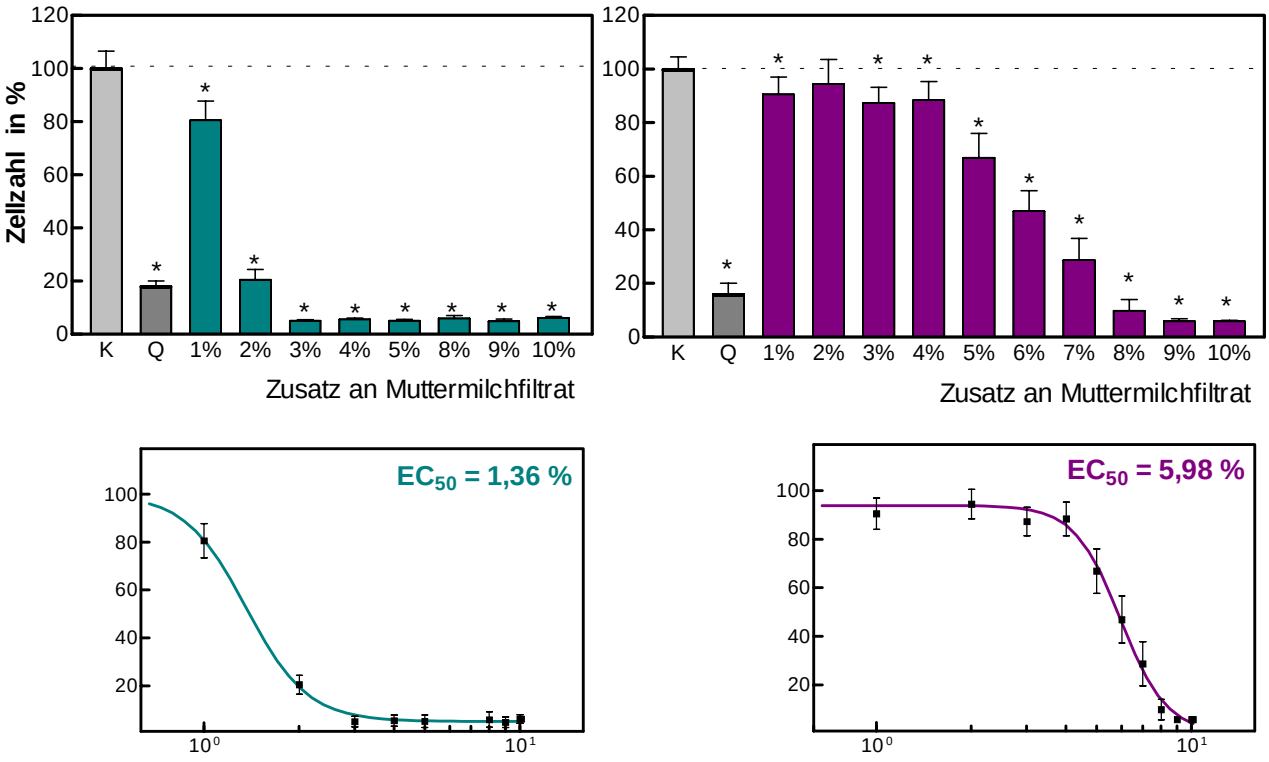


Abb. 61 Einfluß von Muttermilchfiltrat auf die Proliferation von HT-29 Zellen in Gegenwart von 10 % fötalem Kälberserum (links: Milch der 3. Laktationswoche, rechts: Milch des 4. Laktationsmonats; Angaben in Volumenprozent, K = Kontrolle, Q = 150 µM Quercetin; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 12 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 % sowie die EC_{50} Werte)

Der Einsatz von Kälberserum ist in der Zellkultur weit verbreitet, da es die Zellen mit Wachstumsfaktoren versorgt. Wurde in den vorliegenden Studien der Serumanteil von 10 % im Kulturmedium reduziert, verringerte sich entsprechend die Zellteilungsrate (**Abb. 62**, links). Ein Zusatz von Muttermilchfiltrat bei einem Serumanteil von 0,1 % konnte bei niedrigen Konzentrationen die Retardierung des Zellwachstums teilweise aufheben (Abb. 62, rechts). Bei höheren Konzentrationen des Muttermilchfiltrats zeigte sich dagegen eine deutliche proliferationshemmende Wirkung. Ein ähnliches Bild ergab sich bei dem Zusatz von pasteurisiertem Kuhmilchfiltrat. Hier führte ein Anteil von 1 % zur Erhöhung der Zellproliferation, ein Anteil von 10 % verringerte die Zellzahl, jedoch nicht so ausgeprägt wie beim Zusatz von Muttermilchfiltrat.

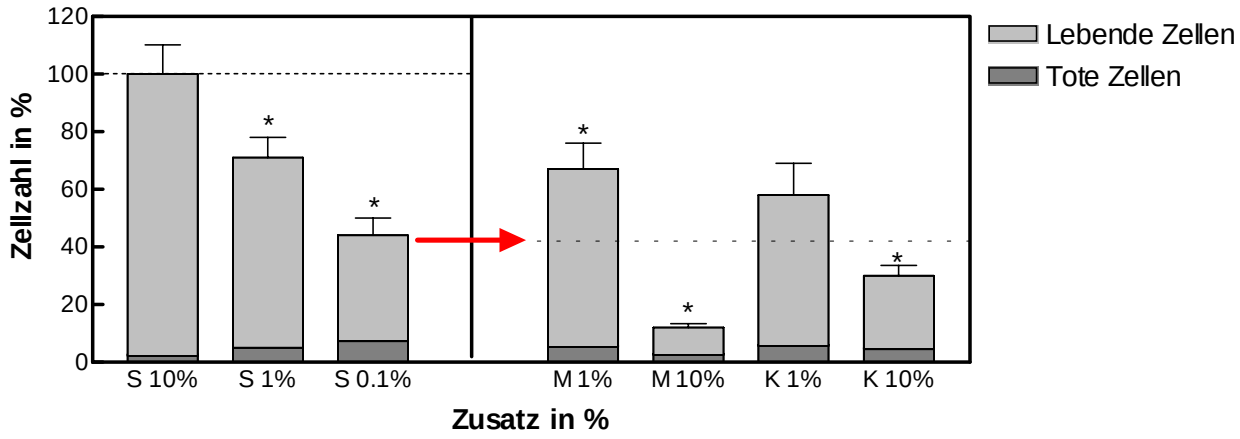


Abb. 62 Einfluß von fötalem Kälberserum und Milchfiltraten auf die Proliferation von HT-29 Zellen (links: Zugabe von fötalem Kälberserum, rechts: Zugabe von Mutter- bzw. Kuhmilch in Gegenwart von 0,1 % fötalem Kälberserum; S = fötales Kälberserum, M = reife Muttermilch, K = pasteurisierte Kuhmilch; Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 8 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 %)

Von verschiedenen Milchbestandteilen wird berichtet, daß sie proliferationsfördernde oder -hemmende Eigenschaften besitzen [134, 68]. Bovines Colostrum, welches als Nahrungsergänzungsmittel frei verkäuflich ist, zeigte im Tierversuch proliferationsfördernde Eigenschaften. Inwieweit der Kohlenhydratanteil und insbesondere die Oligosaccharide der Milch für diese Effekte (mit)verantwortlich sein könnten, wurde bislang nicht geklärt.

In den vorliegenden Studien wurden daher Lactose und verschiedene Oligosaccharidfraktionen der Humanmilch untersucht. Lactose diente als Referenzsubstanz, da sie auch Grundbaustein der HMO ist. Sie verursachte in Konzentrationen von 0,1 bis 20 g/l keine Änderung der Zellteilungsrate bei HT-29 und Caco-2 Zellen (**Abb. 63**, links). Dagegen zeigte die Gesamtfraktion der HMO bei höheren Konzentrationen in beiden Zellinien eine moderate antiproliferative Wirkung (Abb. 63, rechts). Die maximal eingesetzte Konzentration von 10 mg/ml entspricht dabei ungefähr der Oligosaccharidkonzentration in reifer Frauenmilch.

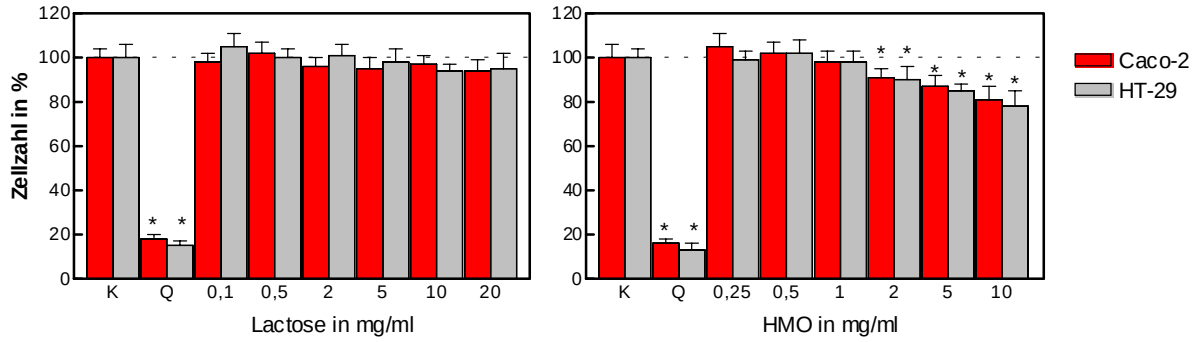


Abb. 63 Einfluß von Lactose (links) und Oligosacchariden der Humanmilch (rechts) auf die Proliferation von Caco-2 (rote Balken) und HT-29 Zellen (graue Balken) nach Inkubation über 72 Stunden (K = Kontrolle, Q = 150 µM Quercetin; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 8 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5%)

Weder die Gesamtfraktion der HMO noch die einzelnen isolierten Oligosaccharidpräparationen zeigten zellschädigende Eigenschaften. So lag der Anteil nichtvitaler Zellen nach 72 Stunden bei allen untersuchten Sacchariden bei ca. 5 % und somit im Bereich der Kontrolle. Die aus der Gesamtfraktion der HMO isolierte Fraktion der neutralen HMO zeigte keine wesentliche Wirkung auf die Proliferationsraten der beiden Zellinien (**Abb. 64**, links). Dagegen reduzierte eine Fraktion mit höhermolekularen HMO die Zellproliferationsrate von HT-29 Zellen bei einer Konzentration von 0,12 mg/ml signifikant (Abb. 64, rechts).

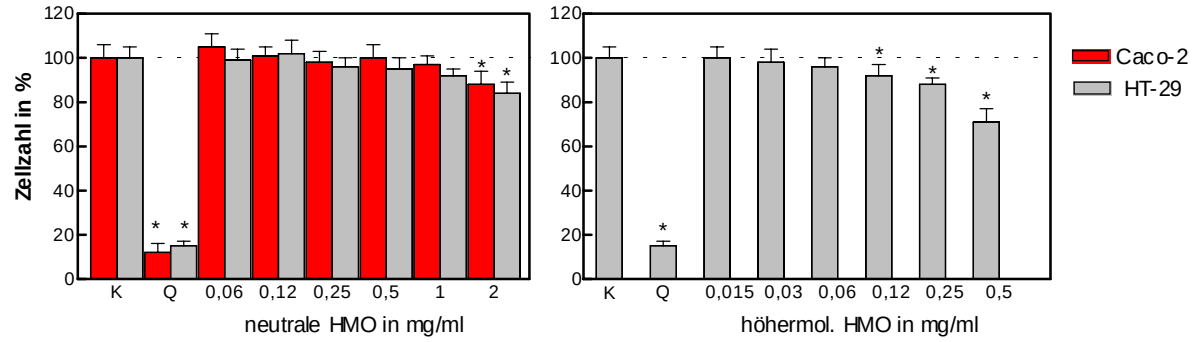


Abb. 64 Einfluß von neutralen (links) und höhermolekularen Oligosacchariden der Humanmilch (rechts) auf die Proliferationsrate von Caco-2 (rote Balken) und HT-29 Zellen (graue Balken) nach Inkubation über 72 Stunden (K = Kontrolle, Q = 150 µM Quercetin; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 8 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 %)

Die an N-Acetylneuraminsäure reichen HMO, welche aus der Gesamtfraktion abgetrennt wurden, zeigten ab Konzentrationen von 0,25 mg/ml ebenfalls eine signifikante proliferationshemmende Wirkung. (**Abb. 65**). Ihr Gehalt in der reifen Frauenmilch ist mit ca. 1 g/l sogar noch etwas höher, als die hier im Experiment eingesetzten maximalen Konzentrationen.

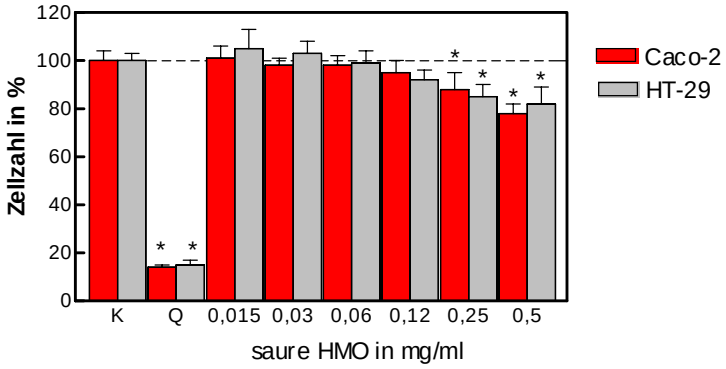


Abb. 65 Einfluß von sauren Oligosacchariden der Humanmilch auf die Proliferation von Caco-2 (rote Balken) und HT-29 Zellen (graue Balken) nach Inkubation über 72 Stunden (K = Kontrolle, Q = 150 µM Quercetin; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 8 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 %)

Einen bedeutenden Anteil der sauren HMO machen die beiden Isomere der Sialyllactose aus. In der Frauenmilch beträgt ihre Konzentration zusammen ungefähr 0,6 g/l [166], und bereits bei Konzentrationen von 0,25 g/l konnten in unseren Testsystemen antiproliferative Eigenschaften beobachtet werden (Abb. **66**, links). Das disialylierte Tetrasaccharid DSLNT verminderte bei gleicher Konzentration die Proliferationsrate sogar noch stärker als die Sialyllactose (Abb. 66, rechts). Die hier eingesetzten Konzentrationen lagen zum Teil jedoch höher als die in der Humanmilch gemessenen Konzentrationen von ca. 0,1 g/l [166].

Die Untersuchungen mit verschiedenen Oligosaccharidfraktionen der Muttermilch zeigten, daß insbesondere höhermolekulare und saure HMO antiproliferative Eigenschaften in Colonkarzinomzellen entfalten können. Der Vergleich mit den Muttermilchfiltraten (Abb. 61) demonstrierte jedoch, daß diese Oligosaccharide nicht primär für die proliferationshemmende Wirkung der Muttermilch verantwortlich sein können.

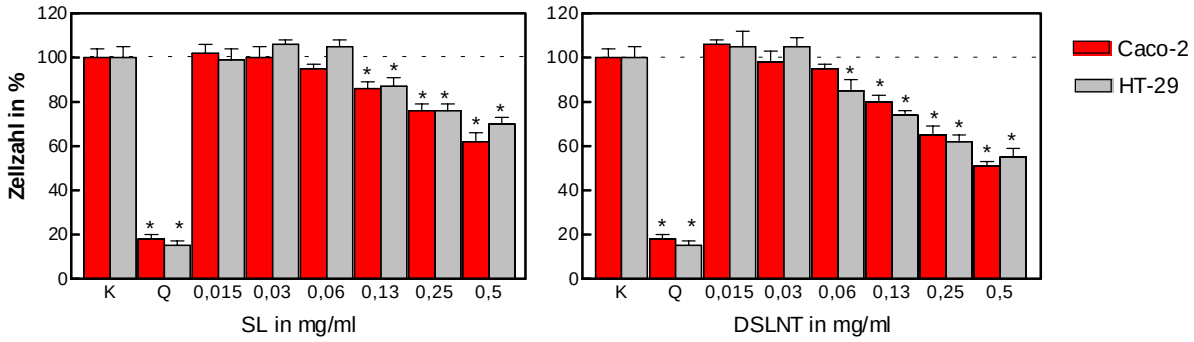


Abb. 66 Einfluß von Sialyllactose (SL) und Disialyllacto-N-tetraose (DSLNT) auf die Proliferation von Caco-2 (rote Balken) und HT-29 Zellen (graue Balken) nach Inkubation über 72 Stunden (K = Kontrolle, Q = 150 µM Quercetin; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 8 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 %)

Neben den HMO wurde in den Zellkulturstudien auch das aus Galactose und Fructose bestehenden Disaccharid Lactulose sowie die Fructooligosaccharidpräparationen Raftilose und Raftiline in Konzentrationen von 0,5 bis 40 g/l eingesetzt (**Abb. 67**).

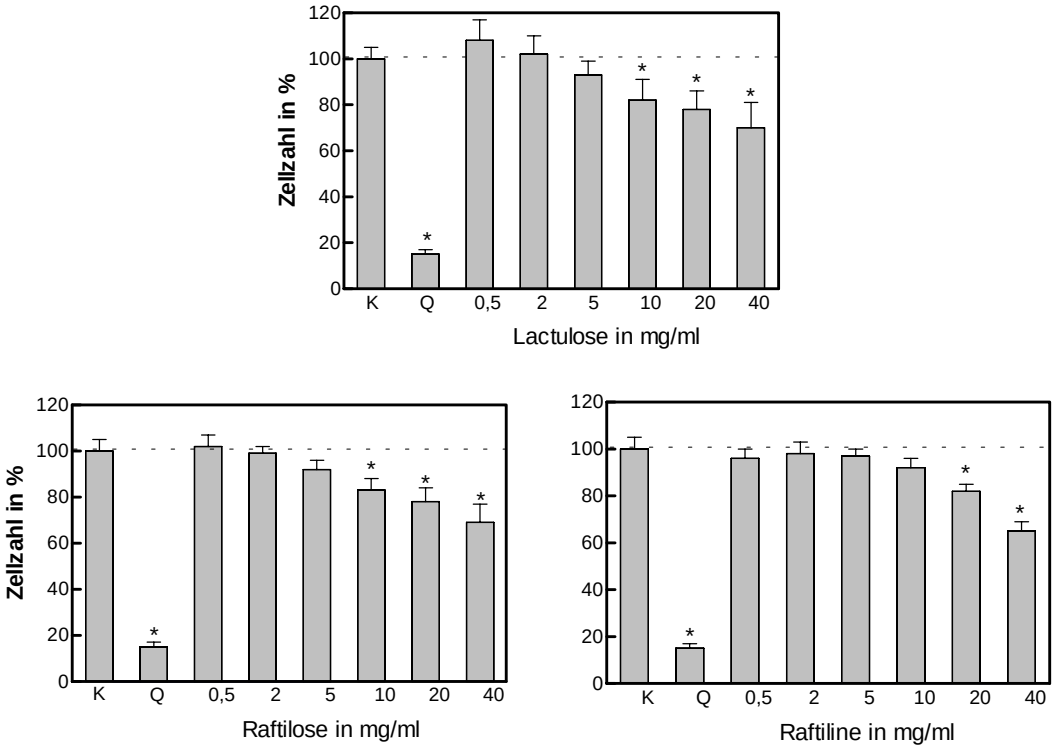


Abb. 67 Einfluß von Lactulose, Raftilose und Rafiline auf die Proliferation von HT-29 Zellen (graue Balken) nach Inkubation über 72 Stunden (K = Kontrolle, Q = 150 µM Quercetin; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 8 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 %)

Abbildung 67 zeigt, daß Lactulose und Raftilose ab Konzentrationen von 10 g/l und Raftiline ab 20 g/l eine moderate proliferationshemmende Eigenschaft aufweisen. Diese Konzentrationen sind aber im Hinblick auf Wirkungen im Gastrointestinaltrakt in vivo als unphysiologisch hoch einzustufen.

Aufgrund der nachgewiesenen leichten antiproliferativen Eigenschaften von HMO - insbesondere der anionischen Fraktion - sollte im weiteren Verlauf der Studie untersucht werden, ob die Wachstumshemmung mit einer stärkeren Zelldifferenzierung und/oder Apoptoserate einhergeht.

2.3.3 In vitro Modelle zum Einfluß komplexer Oligosaccharide auf die Zell-differenzierung und Apoptose

2.3.3.1 Kurzdarstellung der Methoden

Bestimmung der Aktivität des Enzyms alkalische Phosphatase als Differenzierungsmarker

Die Colonkarzinomzellen HT-29 wurden auf Kulturflaschen (25 cm^3) ausgesät und nach Erreichen einer etwa 50 %igen Konfluenz mit verschiedenen Sacchariden über 72 Stunden inkubiert. Nach mikroskopischer Prüfung wurde der Überstand abgenommen, die Zellen abgelöst und ein Aliquot der Zellsuspension zur Bestimmung der Zellzahl eingesetzt. Da Caco-2 Zellen weitaus stärker differenzieren als HT-29 Zellen, war in diesem Fall anstelle der Aussaat auf Kulturflaschen eine Aussaat auf 48-Well-Platten ausreichend. Zur Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase, als Leitenzym der Bürstensaummembran, wurden die HT-29 und Caco-2 Zellen mit Diethanolaminpuffer und Fluoreszeindiphosphat inkubiert. Die Freisetzung von Fluoreszein wurde im Fluorimeter (Fluoroskan Ascent) über 120 Minuten bei den HT-29 und über 30 Minuten bei den Caco-2 Zellen gemessen. Die Ergebnisse wurden als Fluoreszenzzunahme pro Minute und bezogen auf 10^6 Zellen berechnet. In **Abbildung 68** ist die Vorgehensweise schematisch dargestellt.

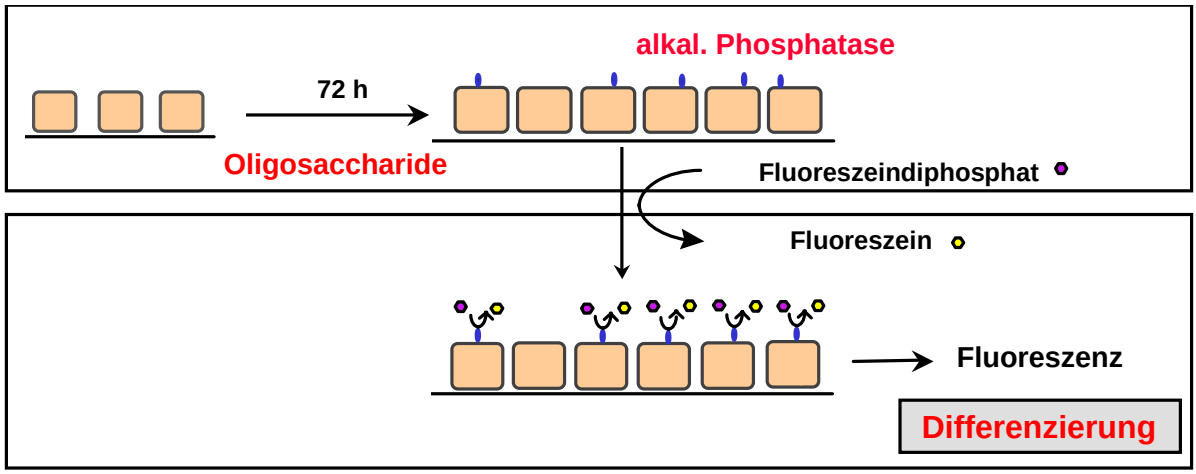


Abb. 68 Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase mit Hilfe des Substrats Fluoreszeindiphosphat

Geprüft wurden die Fraktionen der neutralen und sauren HMO, gereinigte Subfraktionen der anionischen HMO sowie die beiden Fructooligosaccharide. Butyrat (2,5 mM) diente als Referenzsubstanz, da seine differenzierungsfördernde Wirkung an Colonzellen vielfach belegt ist.

Aktivitätsmessung des Enzyms CPP-32 als Apoptosemarker

Für die Bestimmung der Wirkung von HMO auf die CPP-32 Aktivität von HT-29 Zellen wurden diese auf 6-Well-Platten ausgesät und über 24 Stunden mit den Oligosacchariden Sialyllactose und Disialyllacto-N-tetraose inkubiert, die eine signifikante Proliferationshemmung hatten erkennen lassen. Nach Zugabe eines cumarinhaltigen Substrats wurde die Freisetzung des fluoreszierenden Produktes über fünf Stunden gemessen und auf die Fluoreszenzzunahme pro Minute und 10^6 Zellen bezogen. Der Topoisomerase-Inhibitor Camptothecin diente hierbei als Referenzsubstrat, da dessen Wirkung auf die Induktion der Apoptose bekannt ist. In **Abbildung 69** ist die Bestimmung der apparenten CPP-32 Aktivität schematisch dargestellt. (Eine ausführliche Darstellung der Materialien und Methoden findet sich auf den Seiten 163 bis 170)

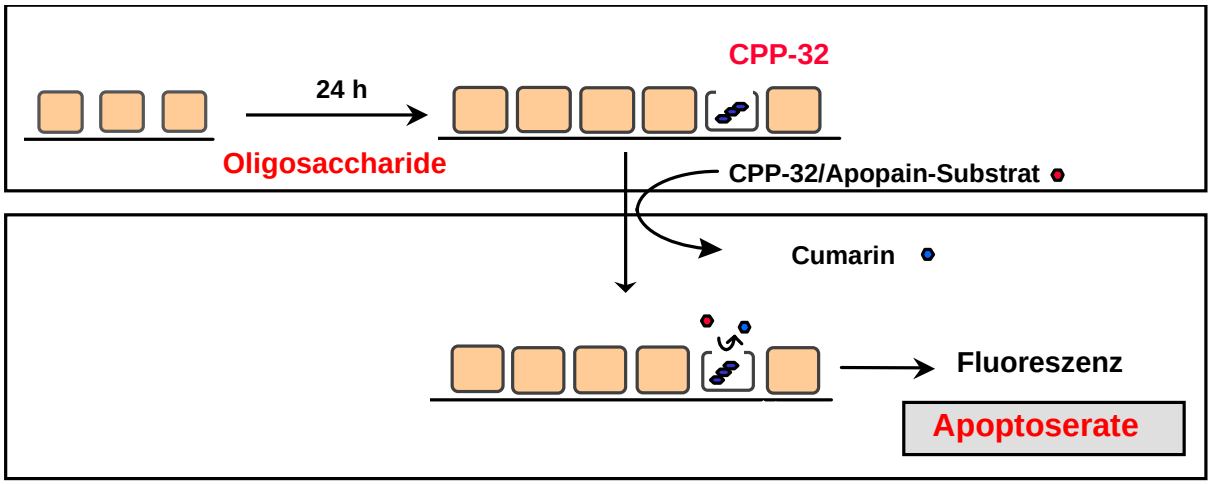


Abb. 69 Bestimmung der Aktivität des Apoptosemarkers CPP-32 mit Hilfe eines cumarinhaltigen Substrats

2.3.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Die alkalische Phosphatase wird häufig als Differenzierungsmarker in Darmepithelzellen verwendet. HT-29 Zellen besitzen unter normalen Kulturbedingungen nur sehr geringe Aktivitäten dieses Oberflächenenzyms. Inkubiert man diese Zellen jedoch mit Butyrat, wird die Zellproliferation eingestellt und die Differenzierung eingeleitet [60, 136]. Gegenüber untransformierten Dickdarmzellen zeigt Butyrat jedoch genau gegenteilige Wirkungen: Die Proliferation wird gefördert und die Differenzierung gehemmt. Die kurzkettige Fettsäure gilt daher als protektiv wirksam in der Genese von Dickdarmtumoren. In unseren Versuchen konnte Butyrat in einer Konzentration von 2,5 mM die Phosphataseaktivität in HT-29 Zellen durchschnittlich siebenfach erhöhen (**Abb. 70**, links). Berücksichtigt man darüberhinaus die antiproliferative Wirkung des Butyrats, so wurde die Phosphataseaktivität bezogen auf die Zellzahl etwa 30-fach erhöht (Abb. 70, rechts).

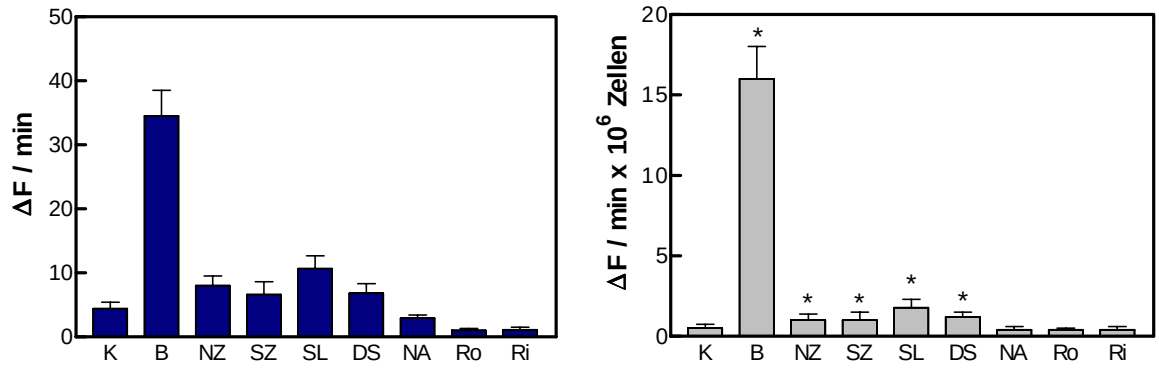


Abb. 70 Aktivität der alkalischen Phosphatase von HT-29 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen über 72 Stunden. Links dargestellt als Fluoreszenzfreisetzung pro Minute, rechts bezogen auf 10^6 Zellen (K = Kontrolle, B = Butyrat [2,5 mM], NZ = neutrale Oligosaccharide der Humanmilch [1,0 g/l], SZ = saure Oligosaccharide der Humanmilch [0,5 g/l], SL = Sialyllactose [0,25 g/l], DS = Disialyllacto-N-tetraose [0,25 g/l], NA = N-Acetylneuraminsäure [0,08 g/l], Ro = Raftilose [20 g/l], Ri = Raftiline [20 g/l]; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 6 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 %)

Butyrat zeigte in unseren Versuchen jedoch nicht nur antiproliferative, sondern auch cytotoxische Eigenschaften. So führte die 72-stündige Inkubation mit Butyrat zu einem hohen Anteil von geschädigten Zellen und Zelltrümmern im Zellverband. Der Anteil geschädigter und toter Zellen lag dagegen nach der Inkubation mit den Sacchariden bei ca. 5 % bezogen auf die Gesamtzellzahl und unterschied sich somit nicht von den Kontrollzellen. Die Aktivitäten der alkalischen Phosphatase waren bei den HMO im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht (Abb. 70). Nach Berücksichtigung der Zellzahl ließ sich insbesondere für die sauren HMO eine signifikante Wirkung nachweisen. N-Acetylneuraminsäure, Bestandteil aller sauren HMO, zeigte bei vergleichbaren Konzentrationen weder die leicht antiproliferative noch die leicht differenzierungsfördernde Eigenschaft der sauren Oligosaccharide. Im Vergleich zu Butyrat - besonders wenn die Zellzahl miteinbezogen wurde - waren die differenzierungsfördernden Wirkungen der HMO vernachlässigbar gering. Die zwei Fructooligosaccharide Raftilose und Raftiline, die in den hier eingesetzten hohen Konzentrationen leicht antiproliferativ wirkten, schienen ebenfalls keine Differenzierungsvorgänge einleiten zu können.

Die Aktivitäten der alkalischen Phosphatase liegen bei den Caco-2 Zellen deutlich höher als bei den HT-29 Zellen. Die getesteten HMO hatten jedoch auch bei dieser

Zellinie mit oder ohne Berücksichtigung der Zellzahl keinen nennenswerten Einfluß auf Differenzierungsprozesse (**Abb. 71**). Butyrat reduzierte wie bei den HT-29 Zellen die Zellproliferationsrate und förderte bei den überlebenden Zellen den Differenzierungsprozeß, wie in der Literatur belegt ist [15].

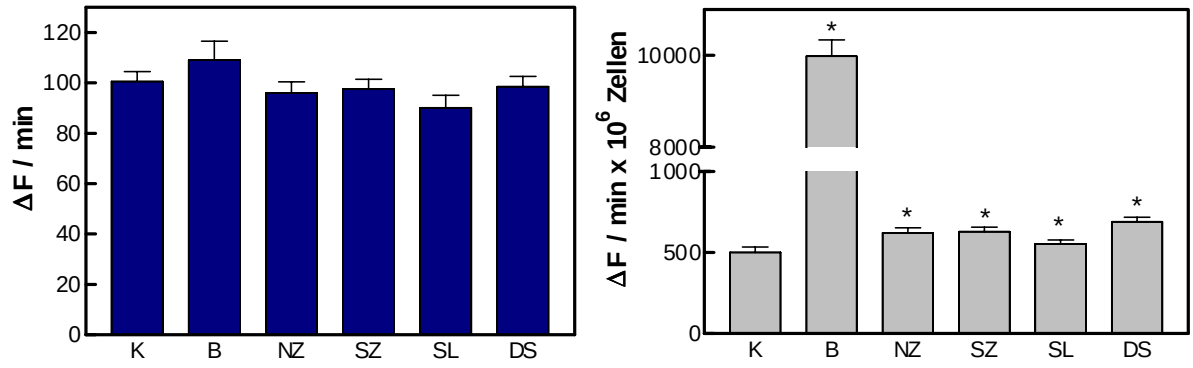


Abb. 71 Aktivität der alkalischen Phosphatase von Caco-2 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen über 72 Stunden. Links dargestellt als Fluoreszenzfreisetzung pro Minute, rechts bezogen auf 10^6 Zellen (K = Kontrolle, B = Butyrat [2,5 mM], NZ = neutrale Oligosaccharide der Humanmilch [1,0 g/l], SZ = saure Oligosaccharide der Humanmilch [0,5 g/l], SL = Sialyllactose [0,25 g/l], DS = Disialyllacto-N-tetraose [0,25 g/l]; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 6 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 %)

Nachdem einige der sauren HMO antiproliferative Eigenschaften gezeigt hatten, gleichzeitig jedoch nur einen vernachlässigbaren Einfluß auf die Zelldifferenzierung nahmen, sollte geklärt werden, ob sie den natürlichen Zelltod einleiten können. Als früher Marker der Apoptose wurde CPP-32 gewählt. CPP-32, die aktive Form der Caspase 3 (Cystein-Aspartat-spezifische Proteinase), ist Teil eines Kaskadenzyklus, der den Zelltod einleitet. Dieser natürliche Zelltod läuft ohne Beteiligung des Immunsystems ab. Ein morphologisches Merkmal, das eine apoptotische Zelle von einer nekrotischen unterscheidet, ist die Fragmentierung ihrer DNA.

Der Topoisomerase II-Inhibitor Camptothecin ist bekannt für seine pro-apoptotische Wirkung bei Colonkarzinomzellen [28] und wurde daher bei den Studien als Positivkontrolle eingesetzt. Die 24-stündige Inkubation der HT-29 Zellen mit 50 µM Camptothecin bewirkte eine Erhöhung der CPP-32 Aktivität um etwa das fünffache (**Abb. 72** links). Da Camptothecin deutliche antiproliferative Eigenschaften besitzt,

waren die Aktivitätsunterschiede bezogen auf die Zellzahl noch größer. Weder Sialyllactose noch Disialyllacto-N-tetraose konnten dagegen die Aktivität des Apoptosemarkers verändern.

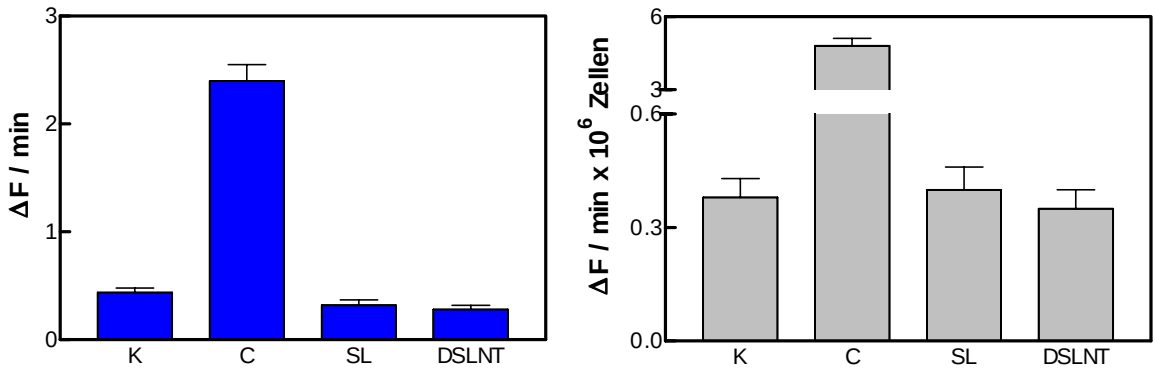


Abb. 72 Aktivität des CPP-32 von HT-29 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen über 24 Stunden. Links dargestellt als Fluoreszenzfreisetzung pro Minute, rechts bezogen auf 10^6 Zellen (K = Kontrolle, C = Camptothecin [50 µM], SL = Sialyllactose [0,5 g/l], DSLNT = Disialyllacto-N-tetraose [0,5 g/l]); dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 6 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 %)

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß einige der HMO in physiologischen Konzentrationen zwar Einfluß auf das Wachstum von Colonkarzinomzellen nehmen, vermutlich durch einen Arrest der Zellen in der G_0-Phase, eine Förderung der Differenzierung oder die Einleitung des natürlichen Zelltods waren damit jedoch nicht verbunden.

2.4 Können freie oder peptidgebundene Oligosaccharide der Milch anti-adhäsiv wirken ?

2.4.1 Potentielle anti-adhäsive Eigenschaften von Oligosacchariden der Humanmilch

Sowohl in den Industrie- als auch in den Entwicklungsländern wird das Stillen als der ”goldene Standard” der Säuglingsernährung anerkannt. Große vergleichende Studien neueren Datums zeigen, daß gestillte Kinder weniger häufig Erkrankungen der Atemwege [16, 77, 132, 127, 187], des Gehörganges, z.B. Otitis media Infektionen [5, 48, 163], des Gastrointestinaltraktes [16, 29, 82, 109] und des Urogenitaltraktes [133] haben und diese generell leichter verlaufen. Auch das Risiko für den plötzlichen Kindstod scheint bei gestillten Kindern reduziert zu sein [62, 141]. Dabei erweist es sich als außerordentlich schwierig, Faktoren, d.h. Inhaltsstoffe der Humanmilch, unabhängig von exogenen Einflußgrößen wie der Mutter-Kind-Beziehung, den genetischen Voraussetzungen, der sozioökonomischen Stellung und der Umwelt zu identifizieren.

Neben den immunologischen Faktoren werden mehreren anderen Bestandteilen der Muttermilch antibakterielle und antivirale Eigenschaften zugesprochen. Hierzu zählen u.a. die ungesättigten Fettsäuren und Monoglyzeride der Frauenmilch, die dem Säugling Schutz gegen Masern, Influenza und Herpes simplex Viren bieten sollen. Die gallensalzabhängige Lipase schützt offenbar vor Protozoen, das α-1-Antitrypsin vor Rotaviren und der “α-2-Macroglobulin like hemagglutination inhibitor“ vor Influenzaviren. Antibakterielle Aktivitäten gegenüber Salmonellen und verschiedenen E. coli Stämmen werden für Lysozym, Lactoperoxidase oder Lactoferrin angenommen (Literaturquellen in [124]).

Im Gegensatz zu den sehr unterschiedlichen Wirkmechanismen dieser Milchinhaltsstoffe steht bei den postulierten Wirkungen freier oder gebundener Oligosaccharide der Muttermilch ein gemeinsamer Wirkmechanismus im Vordergrund. Sie sollen die Bindung von Bakterien oder Viren an die Oberfläche der Wirtszelle durch Kompetition vermindern. Dies beruht im wesentlichen darauf, daß Glykokonjugate große Ähnlichkeiten in ihrer Struktur mit Oberflächenmolekülen der Epithelzellen aufweisen

und so als lösliche Rezeptoren für die Pathogene fungieren können [85]. Da die Adhäsion meist der initiale Schritt und die Voraussetzung für eine Infektion ist, kann eine Hemmung der Adhäsion den Ausbruch der Krankheit verhindern, da die nicht-adhärierenden Erreger bzw. deren Toxine besser eliminiert werden können.

Neben den postulierten anti-adhäsiven Eigenschaften von freien Oligosacchariden der Humanmilch (siehe unten) gibt es zahlreiche kohlenhydrathaltige Bestandteile der Milch, für die solche Wirkungen - zumindest unter in vitro Bedingungen - beschrieben wurden. Bei den Glykolipiden konnten speziell für Gb3 und das sialinsäurehaltige Gangliosid GM1 die Bindung von Toxinen von Shigella dysenteriae, Vibrio cholerae, Campylobacter jejuni und das hitzelabile E. coli Toxin nachgewiesen werden. Bei den Glykoproteinen sind bspw. das bereits erwähnte Lactoferrin, das κ-Casein oder das Mucin Lactadherin anti-adhäsiv wirksam, ebenso wie das Proteoglykan Chondroitinsulfat [124, 160, 161].

Bevor unsere eigenen Untersuchung zur anti-adhäsiven Aktivität der HMO vorgestellt werden, sollen Vorgehensweise und Befunde einiger in diesem Bereich tätigen Arbeitsgruppen kurz dargestellt werden. Die schwedische Arbeitsgruppe um C. Svanborg-Edén beschäftigt sich seit den 70er Jahren mit der bakteriellen Adhäsion an Zellen des Urogenitaltraktes und der oberen Atemwege. Dabei wurde auch die inhibitorische Aktivität von Oligosacchariden der Frauenmilch bei Infektionen des Respirationstraktes mit Streptococcus pneumoniae und Haemophilus influenza untersucht [4, 161]. Bei den in vitro Experimenten wurden die HMO 30 Minuten mit den Bakterien vorinkubiert und anschließend mit suspendierten humanen buccalen Epithelzellen oder humanen Oropharynxzellen inkubiert. Die Bakterienstämme stammten von Kindern und Erwachsenen mit Otitis media Infektionen. Die durchschnittliche Bakterienzahl pro Epithelzelle wurde mikroskopisch bestimmt und prozentual zur Adhäsionsrate in Abwesenheit von Oligosacchariden dargestellt. Ein Gemisch aus Tetra-, Penta- und Hexasacchariden (LNT, LNFP, LNDFH) konnte bei einer Konzentration von 6 g/l die Adhäsion des Keimes S. pneumoniae um 50 % reduzieren, die Tetrasaccharide LNT und LNnT erreichten dies in Konzentrationen von 1,3 bzw. 0,2 g/l. Bei synthetisch hergestellten Tetrasacchariden waren etwas höhere Konzentrationen notwendig, um das gleiche Ergebnis zu erzielen (LNT 2,0 g/l und LNnT

0,6 g/l). Die Adhäsion der H. influenza Bakterien konnte durch die ausgewählten HMO nicht vermindert werden.

Von der Arbeitsgruppe um G. Coppa et al. [31, 33] wurden verschiedene Oligosaccharidfraktionen auf ihre Fähigkeit zur Hemmung der Adhäsion von E. coli an Uroepithelzellen geprüft. Die angewendete in vitro Technik basierte auf der Methode von C. Svanborg-Edén. Die Bakterien waren aus dem Urin eines Säuglings mit Harnwegserkrankung isoliert worden, als Wirtszellen dienten Epithelzellen, welche ebenfalls aus dem Urin stammten. Die Bakterien wurden mit verschiedenen Oligosaccharidfraktionen (Konzentrationen von 6 g/l) über 30 Minuten vorinkubiert und anschließend eine Stunde lang mit den Epithelzellen inkubiert. Die Zahl der gebundenen Bakterien wurde lichtmikroskopisch bestimmt. Neutrale HMO mit geringem Molekulargewicht (FL, DFL, LNT) reduzierten die Adhäsion des E. coli Stammes am deutlichsten auf ca. 20 % des Kontrollwertes. Hochmolekulare saure HMO zeigten dagegen keine Wirkung, neutrale HMO mittlerer Größe (Penta- bis Heptasaccharide) sowie die hochmolekulare neutrale Fraktion bewirkten lediglich eine leichte Reduktion der bakteriellen Adhäsion. Da auch bei laktierenden Müttern Milcholigosaccharide im Urin nachweisbar sind, geht die Arbeitsgruppe davon aus, daß neutrale Tri- bis Tetrasaccharide der Humanmilch nicht nur beim Säugling, sondern auch bei der Mutter gegen Infektionen des Urogenitaltraktes wirksam sein könnten.

Auch die Arbeitsgruppe um D. Newburg versuchte zunächst im Tiermodell, später in der Zellkultur die Effekte und Wirkungsweise von HMO zu charakterisieren [7, 35, 121-124]. Nach ihren Studien besitzen einige der fucosylierten Oligosaccharide die Fähigkeit, die Wirkung des hitzestabilen Toxins (STa) von Enterobakterien zu vermindern. Im Gegensatz zur sonstigen Vorstellung von den HMO als lösliche Rezeptoren geht diese Arbeitsgruppe von der These aus, daß fucosylierte HMO allosterisch an den Rezeptor der Guanylatcyclase binden und dadurch die Wirkung des STa auf die Chloridsekretion vermindern. Im Tiermodell konnten relativ geringe Mengen an fucosylierten HMO die Mortalitätsrate bei säugenden Mäusen nach Gabe von STa deutlich reduzieren [121]. Im Zellkulturmodell an humanen Colonkarzinomzellen (T84) waren dagegen wesentlich höhere Konzentrationen an HMO notwendig, um die Bindung von STa und die Aktivität der Guanylatcyclase zu reduzieren [34]. Dabei wurden die fucosylierten HMO in Konzentrationen bis zu 150 g/l eingesetzt. In

Anwesenheit von STa (1 µM) konnten fucosylierte HMO in Konzentrationen von 5 bzw. 25 g/l die Guanylatcyclaseaktivität um ca. 60 bzw. 80 % reduzieren. Dagegen wurde die Bindung des STa in Gegenwart von fucosylierten HMO (25 g/l) lediglich um ca. 30 % reduziert. Bei allen Untersuchungen hatte die Gesamtfraktion der HMO sowie die unfucosylierten Oligosaccharide geringe oder keine Effekte. Welches der fucosylierten HMO die Wirkung des STa am effektivsten hemmen kann, konnte nicht geklärt werden.
In einem weiteren in vitro Modell zur Wirkung der HMO wurden radioaktiv markierte enterohaemorrhagische E. coli (EHEC) mit verschiedenen Fraktionen der Humanmilch und isolierten Ileum- bzw. Colonzellen vom Kaninchen inkubiert [7]. Intestinalzellen mit gebundenen Bakterien wurden von den freien Bakterien über einen Percollgradienten getrennt und die prozentuale Bindung der Bakterien entsprechend der Radioaktivität ausgewertet. Die Oligosaccharidfraktion zeigte jedoch in dieser Studie keine protektive Wirkung.

Enteropathogene E. coli Stämme (EPEC) sind häufig für Durchfallerkrankungen während der ersten 6 Lebensmonate verantwortlich. Die Arbeitsgruppe um J. Neeser untersuchte die anti-adhäsive Aktivität von verschiedenen Oligosaccharidfraktionen gegenüber EPEC an einem Zellkulturmodell [35]. Hierbei wurden die Bakterien zunächst mit den Oligosacchariden vorinkubiert. Die anschließende Inkubation mit Monolayerkulturen von HEp-2 Zellen verlief über drei Stunden. Nach einem Waschschritt wurden die Zellen fixiert, gefärbt und anschließend die Zahl der gebundenen Bakterien mikroskopisch bestimmt. Im Vergleich zur Kontrolle konnte die Adhäsion der EPEC durch die HMO in Konzentrationen von 3 g/l um 20 bis 90 % reduziert werden. Die größte Wirkung hatten dabei die monofucosylierten Tetrasaccharide (LNFP), gefolgt von der Difucosyllactose. Die unfucosylierten Tetrasaccharide sowie größere HMO zeigten deutlich geringere Aktivität bzw. veränderte Adhärenzmuster der EPEC.

Dieser Überblick soll deutlich machen, wie unterschiedlich die Modellsysteme sein können und wie schwierig es ist, die Relevanz der Befunde einzuschätzen. Sind die gewählten Keime bedeutend für Erkrankungen im Säuglingsalter, wurden die geeigneten Kulturbedingungen gewählt, spiegelt das Modellsystem die Situation an der Zelloberfläche wider und besitzen die eingesetzten Oligosaccharidkonzentrationen

physiologische Relevanz ? Es stellt sich auch die Frage, ob nicht nur Studien mit positivem Befund publiziert wurden und Experimente mit “negativem” Ergebnis nicht zur Publikation gelangten.

2.4.2 Modellsysteme zur Untersuchung anti-adhäsiver Eigenschaften von freien und gebundenen Oligosacchariden der Milch

Innerhalb dieses Promotionsvorhabens wurde ebenfalls die anti-adhäsive Wirkung von HMO studiert und eine Reihe von Modellsystemen dazu etabliert. Es sei bereits hier darauf hingewiesen, daß letztlich keine reproduzierbaren Befunde erhoben wurden, trotz intensiver und umfangreicher Experimente zur Validierung der Testsysteme. Viele der bakteriologischen Studien wurden in Kollaboration und mit dem “know how” der Arbeitsgruppen von Prof. T. Chakraborty (Institut für Medizinische Mikrobiologie, JLU Gießen) und Prof. G. Baljer (Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen) durchgeführt. Wenngleich keines der Testsysteme zu verwertbaren Ergebnissen führte, sollen die Studien als Teil dieser Arbeit hier beschrieben werden.

Adhäsionsmodell A

In diesem Modell sollte die Fähigkeit von HMO studiert werden, die Adhäsion bzw. Agglutination verschiedenster Bakterienstämme an isolierten Bürstensaummembranen (BSM) zu inhibieren. Die BSM wurden aus Schweinedünndarm oder Humanmaterial hergestellt (siehe 3.4). Diese Technik sollte es ermöglichen, ohne zeit- und kostenaufwendige Zellkulturmethoden auszukommen und ein Screening von potentiellen anti-adhäsiv wirksamen Substanzen durchzuführen. Als Bakterienstämme wurden E. coli mit unterschiedlichen Fimbrientypen ausgewählt, u.a. Vertreter mit mannosesensitiven Typ 1-Fimbrien, mit S-Fimbrien, die an die Verknüpfung N-Acetylneuraminsäure β 2-3 Galactose binden, sowie Vertreter mit P-Fimbrien, die zur Adhäsion die Verbindung Galactose β 1-4 Galactose benötigen [168]. Fluoreszenzmarkierte Bakterien (10^8/ml) wurden dazu mit verschiedenen Monosacchariden oder

Oligosacchariden der Humanmilch in Konzentrationen von 0,5 bis 15 g/l auf Objektträgern vorinkubiert. Nach 30 Minuten folgte die Zugabe der BSM und eine weitere Inkubation über 60 Minuten im Dunkeln bei unterschiedlichen Temperaturen (4, 22 und 37 °C). Als Kontrolle diente ein Puffer ohne Saccharidzusatz. Die Fluoreszenz gebundener Mikroorganismen wurde am Fluoreszenzmikroskop nach photographischer Dokumentation ermittelt. Eine Agglutination der P-Fimbrien tragenden Bakterien mit den BSM konnte generell nicht festgestellt werden. Bei den anderen Bakterienstämmen bildeten sich dagegen Agglutinate, wie sie exemplarisch in **Abbildung 73** (links) zu sehen sind.

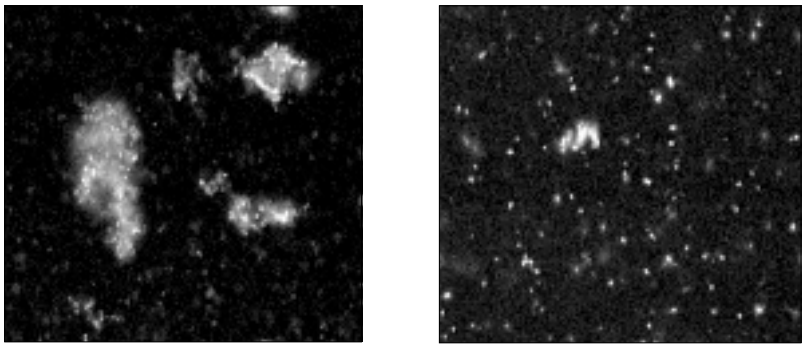


Abb. 73 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Inkubation von FITC-markierten E. coli mit Typ 1-Fimbrien und Bürstensaummembranen aus Schweinedünndarm in Abwesenheit (links) und in Gegenwart (rechts) von neutralen Oligosacchariden der Humanmilch (Konzentration 5 g/l)

In Anwesenheit ausgewählter HMO konnte die Agglutination der Bakterien und BSM teilweise unterbunden werden. Ein Beispiel zeigt Abbildung 73 (rechts). Dies war jedoch meist nicht reproduzierbar, wobei umfangreiche Studien zur Standardisierung des Modells durchgeführt wurden, die letztlich die Qualität der Befunde aber nicht verbesserten.

Adhäsionsmodell B

Bei diesem Modell wurden ebenfalls Bürstensaummembranen und verschiedene Modellorganismen, u.a. die oben genannten fimbrientragenden Bakterienstämme, eingesetzt. Zusätzlich wurden auch isolierte S-Fimbrien verwendet. Diese wurden zusammen mit den BSM und den Saccharidfraktionen drei Stunden inkubiert. Ein Zentrifugationsschritt (43.000 rpm, Sorvall RC-5B) diente der Trennung von freien und agglutinierten Bakterien. Die pelletierten Bakterien wurden danach resuspendiert und auf Nitrocellulosemembranen aufgebracht, die in 24-Well-Platten eingepaßt waren. Nach einem Blockierungsvorgang wurden die Membranen mit einem spezifisch gegen die Fimbrien gerichteten murinen monoklonalen Antikörper inkubiert. Es schloß sich eine Inkubation mit einem zweiten, gegen Maus gerichteten FITC-markierten Antikörper an. Die Stärke der Fluoreszenz bei verschiedenen eingesetzten Saccharidkonzentrationen und mehreren Kontrollen wurde im Fluorimeter (Fluoroscan Ascent) bestimmt.
Auch die Ergebnisse dieses Versuchsansatzes erwiesen sich als nicht standardisierbar und reproduzierbar. Hier wurde in Gegenwart von HMO sogar häufiger eine verstärkte Agglutination beobachtet.

Adhäsionsmodell C

Bei diesem experimentellen Ansatz wurde ein Durchflußcytometer zur Trennung und Quantifizierung von freien und mit Bürstensaummembranen agglutinierten Bakterien verwendet. Hierbei dienten verschiedene enteropathogene E. coli Stämme sowie zwei Salmonella Stämme als Modellorganismen. Zunächst wurde versucht, BSM und die freien bzw. gebundenen Bakterien allein aufgrund ihrer Größe mit Veränderungen der Diskriminatoreinstellung am Cytometer zu unterscheiden. Die geeigneten Mengenverhältnisse aller Komponenten (Bakterien, Saccharide, BSM) wurden zuvor auf Objektträgern ausgetestet und mikroskopisch überprüft. Während man hier Unterschiede bei der Anzahl und der Größe der Agglutinate in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen beobachten konnte, gelang es nicht, diese Unterschiede im Cytometer zu bestimmen. Daraufhin wurden verschiedenste Markierungsmöglichkeiten für Bakterien als auch für BSM u.a. mit Propidiumiodid, Acridin Orange,

Dichlorofluoreszeindiacetat oder Dihydroethidium geprüft, um eine fluoreszenzunterstützte Zählung der Agglutinate zu ermöglichen. Doch auch hierdurch war keine eindeutige Unterscheidung zwischen freien und mit BSM agglutinierten Bakterien möglich. Nach unzähligen Optimierungversuchen wurde letztlich auch dieses Testsystem als nicht validierbar verworfen.

Adhäsionsmodell D

Enteropathogene und enterohaemorrhagische E. coli Stämme (EPEC CB 207, EHEC 413/89-1) sowie der nicht-adhärente Stamm (C 600) wurden als Übernachtkulturen angesetzt. Ein Inoculum wurde mit Zellkulturmedium verdünnt, dem freie oder gebundene Oligosaccharide in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt waren, und über 30 Minuten vorinkubiert. Als Zellmodell humaner Darmschleimhaut dienten differenzierte Caco-2 Zellen (siehe 2.3.1). Die Zellen wurden auf 24-Well-Platten ausgesät und nach ihrer Ausdifferenzierung (14 bis 17 Tage) mit dem Bakterien-Saccharidgemisch für drei Stunden inkubiert. Im Anschluß wurden die Monolayer sorgfältig gewaschen, lysiert und ein Aliquot wurde mit Hilfe einer Ausplattiermaschine auf Agarplatten verteilt. Nach 20 Stunden wurden die kolonieformenden Einheiten (CFU) mehrerer Plattensegmente ausgezählt. Nachfolgend ist der Ablauf nochmals schematisch in **Abbildung 74** dargestellt.

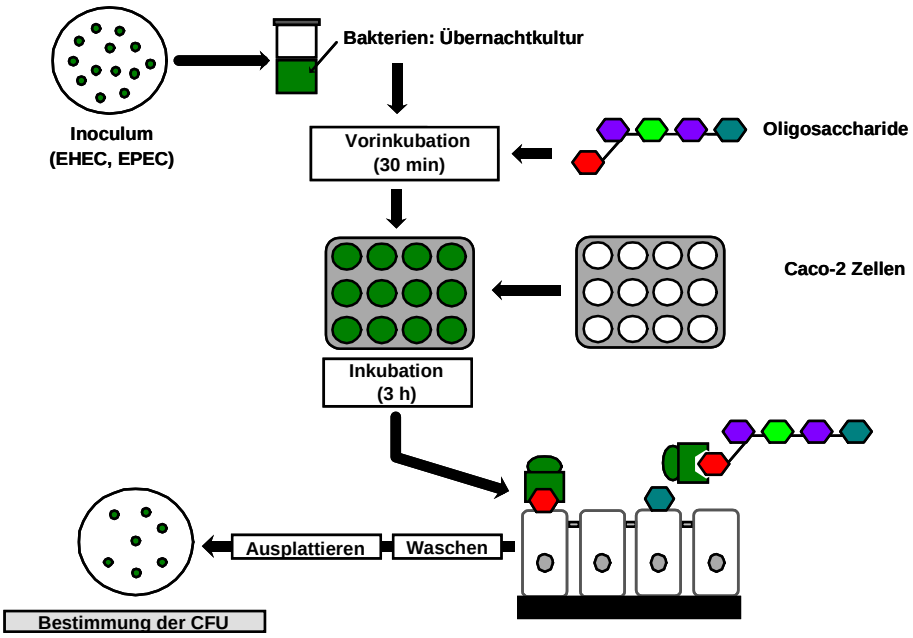


Abb. 74 Schematische Darstellung des Zellkulturmodells zur Bestimmung der anti-adhäsiven Aktivität von freien und gebundenen Oligosacchariden (CFU = Anzahl der koloniebildenden Einheiten, EPEC = enteropathogene E. coli, EHEC = enterohaemorrhagische E. coli)

Neben der Gynolactose, der Gesamtfraktion der Oligosaccharide der Humanmilch, wurden die neutralen HMO sowie verschiedene Einzelfraktionen der neutralen und sauren HMO in Konzentrationen von 25 bis 1.500 mg/l getestet. Darüberhinaus wurde auch das Glykoprotein Glykomakropeptid (GMP) eingesetzt. Das GMP wird bei der Prozessierung des κ-Casein freigesetzt. Es ist ausschließlich O-glykosyliert, wobei das humane GMP mit einem ca. 55 %igen Kohlenhydratanteil deutlich stärker glykosyliert ist als die bovine Variante mit ca. 10 % [51, 52, 115]. Die Oligosaccharidseitenketten des humanen GMP und des colostralen bovinen GMP sind ähnlich wie die HMO aus den Monosaccharideinheiten Galactose, N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalactosamin, N-Acetylneuraminsäure und Fucose aufgebaut. Auf die mögliche anti-adhäsive Potenz des humanen, aber auch des bovinen GMP wird in der Literatur hingewiesen [160]. Für unsere Versuche stand bovines GMP zur Verfügung, welches in Kuhmilch eine Konzentration von ca. 3 g/l aufweist.

Neben den Studien zur quantitativen Erfassung der adhärierenden Bakterienzahl wurden auch qualitative Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden Caco-2 Zellen auf Objektträger ausgesät und ihre Zellstruktur nach der Inkubation mit den Bakterien mikroskopisch betrachtet. Adhärente Bakterien wurden hierbei mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper nachgewiesen und eventuelle Veränderungen in der Struktur der Caco-2 Zellen konnten mit Hilfe von FITC-markiertem Phalloidin sichtbar gemacht werden.

Die Inkubation der Caco-2 Zellen mit dem EPEC-Stamm führte zu einer Veränderung der Aktinstruktur, bei längeren Inkubationszeiten (> 3 Stunden) wurde auch die Monolayerstruktur aufgelöst. Die Bakterien ließen sich vorwiegend an den Zell-Zell-Verbindungen lokalisieren, ein Hinweis darauf, daß bei einer intakten Monolayer die EPEC wohl keinen Zugang zu Bindungsstellen haben. Bei Einsatz des EHEC-Stammes waren kaum Wirkungen auf die Zellstruktur nachweisbar und die Adhäsionsraten insgesamt geringer (siehe **Abb. 75**).

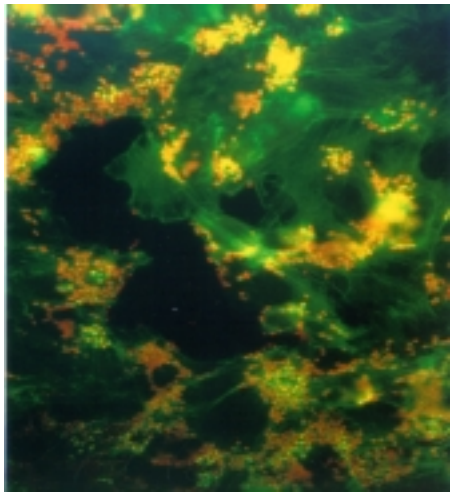


Abb. 75 Caco-2 Zellen nach Inkubation mit EHEC 413/89-1 (Markierung der Aktinfilamente mit Phalloidin-FITC, Markierung der Bakterien mit Maus-Anti-413/89 und Anti-Maus-CY3)

Weder die Gesamtfraktionen der HMO noch einzelne Oligosaccharide konnten in diesem experimentellen Ansatz, der ein etabliertes Modell für die Interaktion von pathogenen Keimen mit epithelialen Strukturen darstellt, die Adhärenz der ausgewählten Bakterienstämme signifikant hemmen. Beispielhaft seien hier die Ergebnisse für Gynolactose, die neutralen HMO und die Einzelfraktionen LNFP und LST gezeigt.

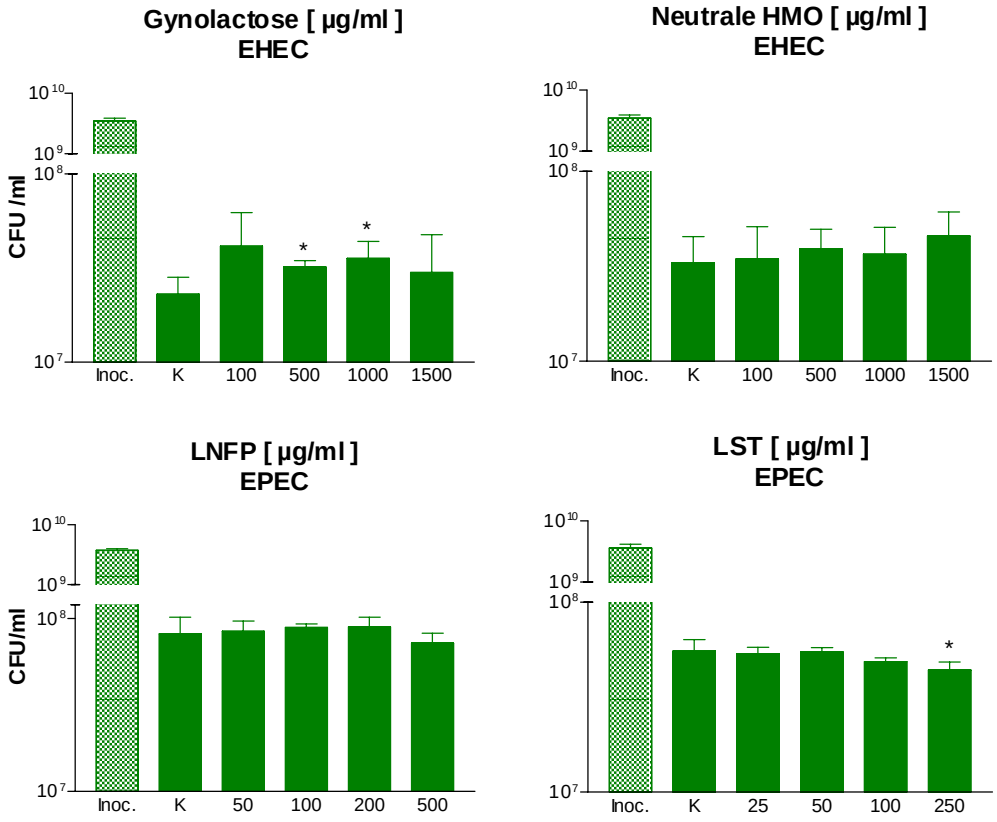


Abb. 76 Anzahl der kolonieformenden Einheiten (CFU) nach Ausplattierung von enteropathogenen (EPEC) und enterohaemorrhagischen E. coli (EHEC) nach Vorinkubation mit verschiedenen Oligosacchariden und dreistündiger Exposition gegenüber Caco-2 Zellen (K = Kontrolle ohne Saccharidzusatz, LNFP = Lacto-N-fucopentaose, LST = Lactosialyltetraose; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 4 Versuchsserien; * = signifikant zum Niveau 5 %)

Abbildung 76 zeigt exemplarisch, daß nur wenige HMO-Fraktionen im untersuchten Konzentrationsbereich zu einer Reduktion adhärierender Keime führten. Gelegentlich waren deutlichere Wirkungen der HMO sichtbar, die sich jedoch meist nicht reproduzieren ließen. Lediglich durch das Glykoprotein GMP konnte in Konzentrationen oberhalb von 10 bzw. 50 g/l sowohl die Adhärenz der EPEC als auch der EHEC reproduzierbar und signifikant gehemmt werden, wie **Abbildung 77** zeigt.

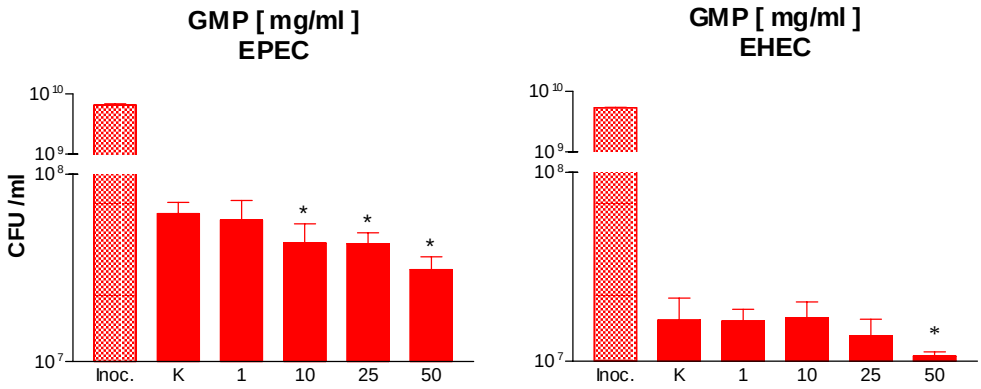


Abb. 77 Anzahl der kolonieformenden Einheiten (CFU) nach Ausplattierung von enteropathogenen (EPEC) und enterohaemorrhagischen E. coli (EHEC) nach Vorinkubation mit Glykomakropeptid (GMP) und dreistündiger Inkubation mit Caco-2 Zellen (K = Kontrolle ohne Saccharidzusatz; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 4 Versuchsserien; * = signifikant zum Niveau 5 %)

Mit diesem Versuchsaufbau und den gewählten Bakterienstämmen konnten somit für freie HMO keine eindeutigen anti-adhäsiven Eigenschaften nachgewiesen werden. Dies gilt auch für die fucosylierten Vertretern, wie z.B. LNFP, für die in anderen experimentellen Ansätzen (siehe oben) potente Wirkungen demonstriert wurden.
Zu unserem Testsystem sei angemerkt, daß es den Vorteil hatte, nur vitale adhärierende Bakterien zu erfassen. Dies war nur in wenigen der publizierten experimentellen Studien gewährleistet. Der Nachteil des Modells lag im großen Arbeitsaufwand durch die Kultivierung der Zellen, die Ausplattierung und die Nachkultur zur Ermittlung der kolonieformenden Einheiten.

Zusammenfassend sei für diese langwierigen und aufwendigen Studien festgehalten, daß es nicht gelungen ist, ein standardisiertes und reproduzierbares Testmodell zum Studium der anti-adhäsiven Eigenschaften von HMO zu etablieren. Im Zellkulturansatz mit Caco-2 Zellen konnte die Adhärenz an die Epithelzellen erreicht werden, wenngleich sich hier die untersuchten HMO nicht als adhäsionshemmend erwiesen. Lediglich das hochglykosylierte bovine Glykomakropeptid zeigte in höheren Konzentrationen eine reproduzierbare und signifikante Reduktion der Adhäsion von EHEC und EPEC Stämmen an die Caco-2 Zellen.

2.5 Zusammenfassung

Die komplexen Oligosaccharide der Humanmilch sind sowohl hinsichtlich ihrer Konzentration als auch aufgrund ihrer strukturellen Vielfalt einzigartig. Weder über ihr Schicksal nach Aufnahme durch den Säugling noch über ihre biologischen Funktionen besteht gegenwärtig Klarheit. In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, folgende Fragestellungen zu beantworten:

Werden Oligosaccharide der Humanmilch im Gastrointestinaltrakt hydrolytisch durch Enzyme des Pankreas und der Darmschleimhaut gespalten ?

Sowohl unsere in vitro als auch in vivo Untersuchungen ergaben, daß die Oligosaccharide eine außergewöhnliche Stabilität gegenüber Hydrolasen des Gastrointestinaltraktes aufweisen. Selbst terminale Fucosyl- und Sialinsäurereste wurden nur in geringen Mengen hydrolytisch abgespalten. Erst nach Einwirkung intrazellulärer bzw. lysosomaler Enzyme des Pankreasgewebes gelang der Nachweis einer vollständigen Hydrolyse. Im Pankreassekret und am Darmepithel sind entsprechende Enzymaktivitäten aber offenbar nicht vorhanden. Dies ermöglicht den Oligosacchariden die Passage durch den Dünndarm weitgehend in intakter Form. Wie eine kürzlich publizierte Studie dokumentiert, dienen die Milcholigosaccharide im Dickdarm der Fermentation, vergleichbar mit anderen Nicht-Stärke-Polysacchariden. Die Oligosaccharide können aus diesem Blickwinkel als die lösliche Ballaststofffraktion der Humanmilch angesehen werden.

Können Oligosaccharide der Humanmilch in intakter Form oder als Bruchstücke resorbiert werden und biologische Wirkungen im Intermediärstoffwechsel entfalten?

Nach den Befunden der von uns angewendeten in vitro Methoden können Oligosaccharide der Humanmilch in einem Umfang von ca. 2 bis 3 % der angebotenen Menge in intakter Form das Darmepithel permeieren. Innerhalb dieser geringen Resorptionsrate zeigten kleinere ungeladene Moleküle eine etwas höhere Permeationsrate als die negativ geladenen oder größeren Oligosaccharide. Da sich die Durchtrittsraten praktisch nicht von denen des Mannitols als Marker für den parazellulären Weg unterschieden und keine Hinweise auf einen spezifischen Transportschritt gefunden werden konnten, kann postuliert werden, daß die Resorption der Oligosaccharide

ebenfalls überwiegend parazellulär erfolgt. Eine intrazelluläre Prozessierung (Hydrolyse) der Oligosaccharide der Humanmilch in den Darmepithelien wird hierdurch wohl umgangen. An Mäuse verabreichte Oligosaccharide konnten sowohl in der Leber als auch im Urin zum Teil noch in intakter Form nachgewiesen werden. Auch in diesem Tiermodell zeigten sich dem in vitro Modell entsprechende geringe Resorptionsraten.

Da Oligosaccharide der Humanmilch offensichtlich nur in geringem Umfang zur Resorption gelangen, verbleibt die größte Menge im Gastrointestinaltrakt und dient der Dickdarmflora des Säuglings als Substrat zur Fermentation. Dies kann einerseits zu einer Beeinflussung des Bakterienspektrums (Selektion von Keimen) führen, andererseits dienen Fermentationsprodukte, vor allem Butyrat, als Energiesubstrat von Colonocyten und als trophischer Faktor beim Wachstum des Epithels.

Können Oligosaccharide der Humanmilch den Zellzyklus von intestinalen Epithelzellen modifizieren?

Die hohe Stabilität und die geringe Resorptionsrate dieser Oligosaccharide ermöglichen den intensiven Kontakt mit Epithelzellen im Dünndarm und Colon. Bei unseren Studien zur möglichen Beeinflussung der Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose zeigten die Milcholigosaccharide nur schwache Wirkungen auf die Biologie der Epithelzellen. Zwar konnten insbesondere höhermolekulare sowie saure Oligosaccharide der Humanmilch die Proliferation von Caco-2 und HT-29 Zellen signifikant hemmen. Dies war aber nicht mit einer starken Differenzierungsförderung oder der Einleitung des physiologischen Zelltods verbunden. Die proliferationshemmende Wirkung einiger Vertreter dieser Oligosaccharide erscheint jedoch unter physiologischen Bedingungen und im Vergleich zu anderen Nahrungsinhaltsstoffen als minimal und vermutlich nicht bedeutend.

Können freie oder peptidgebundene Oligosaccharide der Milch anti-adhäsiv wirken ?

Nach Befunden aus der Literatur besitzen ausgewählte Oligosaccharide der Humanmilch anti-bakterielle und anti-virale Eigenschaften, da sie als lösliche Rezeptoranaloge (Liganden) im Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt fungieren können. Um prüfen zu können, inwieweit dies auch für die uns zur Verfügung stehenden Isolate dieser Oligosaccharide zutraf, wurden verschiedene Testsysteme zur

Adhäsion von Bakterien an Epithelzellen bzw. Bürstensaummembranen auf ihre Einsetzbarkeit geprüft. Trotz umfangreicher Validierung der Modelle gelang es nicht, die anti-adhäsive Wirkung von Oligosacchariden der Humanmilch in physiologisch relevanten Konzentrationen nachzuweisen. Dies lag für die Mehrzahl der Testsysteme in erster Linie an der unzureichenden Reproduzierbarkeit der Adhäsionsassays. Lediglich im Zellkulturmodell an Caco-2 Zellen gelang es, eine reproduzierbare Bindung von pathogenen E. coli Stämmen zu erreichen, die sich jedoch durch die freien Oligosaccharide kaum hemmen ließ. Nur für das glykosylierte Peptidbruchstück des bovinen κ-Caseins konnte eine deutliche anti-adhäsive Wirkung bei hohen Konzentrationen demonstriert werden. Unter Einbeziehung der geringen Resorptionsrate der Oligosaccharide muß die Relevanz von Befunden vor allem zur anti-adhäsiven Rolle der Oligosaccharide in extraintestinalen Geweben im Hinblick auf die dort vorkommenden sehr geringen Konzentrationen von Oligosacchariden der Humanmilch kritisch hinterfragt werden.

Abschließend läßt sich für die hier durchgeführten Studien zum Schicksal der Oligosaccharide der Humanmilch im Gastrointestinaltrakt und ihrer biologischen Rolle feststellen: Aufgrund ihrer außerordentlichen Stabilität gegenüber gastrointestinalen Hydrolasen und ihrer geringen Resorptionsrate im Dünndarm scheinen Oligosaccharide der Humanmilch in erster Linie als die lösliche Ballaststofffraktion der Humanmilch zu dienen. Weitere Funktionen im Organismus bzw. Intermediärstoffwechsel sind nicht auszuschließen, bedürfen jedoch weiterer experimenteller Prüfung.

Summary

Gastrointestinal processing and physiological relevance of oligosaccharides from human milk

Human milk is especially rich in complex oligosaccharides providing an extraordinary structural diversity. Neither their fate after intake by the human infant nor their biological functions are known. Therefore, the aim of the present study was to answer the following questions:

Are the secreted pancreatic enzymes and/or the brush border bound hydrolases in the small intestine capable of hydrolysing the free oligosaccharides of human milk ?

Our in vitro as well as in vivo experiments demonstrated an exceptional enzymatic stability of the oligosaccharides against hydrolases of the gastrointestinal tract. Even fucose and sialic acid in terminal positions of the oligosaccharides were highly resistant to the enzymatic attack. A complete hydrolysis could only be achieved by applying intracellular or lysosomal enzymes of pancreatic tissues. However, these enzymes are not or only in trace amounts inherent in pancreatic secretions. Therefore, human milk oligosaccharides most likely survive passage along the human small intestine as intact molecules. As shown recently, the milk oligosaccharides are submitted to fermentation in the infants large intestine comparable to other non starch polysaccharides. In this way these oligosaccharides may serve primarily as the soluble fiber fraction of human milk.

Are oligosaccharides of human milk absorbed in their intact form or after partial digestion?

Supported by the results obtained in our in vitro systems, oligosaccharides of human milk may permeate the small intestinal epithelia in intact form with an absorption rate of 2 - 3 %. Within this range of low permeation rates smaller uncharged oligosaccharides show enhanced absorption when compared to the negatively charged or larger saccharides. As there were no differences in the permeation rates between oligosaccharides and mannitol, the oligosaccharides most likely use the paracellular permeation route; similar to mannitol. This implies that intracellular hydrolysis in epithelia

may not be of great importance. When oligosaccharides were administered to young mice, small amounts were detected in the liver as well as in the urine, partly in intact form. However, the absorption rates in this animal model were similar to those determined in Caco-2 monolayer cultures. As human milk oligosaccharides mostly escape absorption, larger amounts are submitted to the microflora of the human infant. This might be important for the selection of a particular colonic flora. Furthermore, the fermentation products of the oligosaccharides such as butyrate may serve as energy fuel in colonic cells and provoke the growth of the epithelium.

Do oligosaccharides of human milk affect the cell cycle of intestinal epithelial cells ?

The high stability and low absorption rate of the oligosaccharides provide an intense contact with the intestinal epithelial cells. The results of our studies do not indicate a profound effect of milk oligosaccharides on proliferation, differentiation or apoptosis of epithelial cells. Although proliferation rates of Caco-2 and HT-29 cells were significantly reduced, especially by high concentrations of acidic or high molecular weight oligosaccharides, this was not accompanied by an increase in differentiation or induction of physiological cell death. The reduced proliferation rates seen with some human milk oligosaccharides seem to be of no great importance under physiological conditions and in comparison to other food ingredients.

Do free or peptide bound milk oligosaccharides possess anti-adhesive properties ?

According to the literature several milk oligosaccharides have anti-bacterial as well as anti-viral properties in acting as soluble receptors in the respiratory tract, the gastrointestinal as well as the urinary tract. To test this assumption for the milk oligosaccharides available to us, we developed different model systems. In spite of several methods to test the adherence of bacterial strains to epithelial cells or isolated brush border membranes, none of the human milk oligosaccharides showed reproducible effects on adhesion. Only a cell culture model of Caco-2 cells provided consistent results showing distinct anti-adhesive effects of the glycosylated part of bovine κ–casein at higher concentrations but not of free milk oligosaccharides. These results, along with the low absorption rates, do not support an important role of human

milk oligosaccharides as anti-adhesive molecules in extraintestinal tissues such as the respiratory or urogenital tract.

In summary, we conclude with respect to the fate and biological role of human milk oligosaccharides, that - based on their extraordinary stability against gastrointestinal hydrolysis and their low rates of absorption in the small intestine - they seem to function primarily as the soluble fiber fraction of human milk. As there might be the possibility of further biological functions of human milk oligosaccharides in infant metabolism, they clearly need to be investigated further.

3 Anhang

3.1 Material und Methoden

Material zu 2.1.3

Lösungen für die Bürstensaummembranpräparation

Mannitol-Tris-Puffer:
Mannitol 0,3 M, Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) 12 mM, pH 7,1 (HCl)

$CaCl_2$ 1 M

Mannitol-HEPES-Tris-Puffer:
Mannitol 0,1 M, N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES) 20 mM, pH 7,4 (Tris)

Proteinbestimmung

Rinderserumalbumin (0,05 bis 1,0 mg/ml NaCl)
Farbreagenz BioRad (Bradfort protein assay, BioRad, München)

Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase und der Leucin-Aminopeptidase

Diethanolaminpuffer:
Diethanolamin 1 M, $MgCl_2$ 0,5 mM, pH 9,8 (HCl)

p-Nitrophenylphosphat (Sigma, Deisenhofen) 10 mM in Diethanolaminpuffer

HEPES-MES-Puffer:
HEPES 20 mM, 2-N-Morpholinoethansulfonsäure (MES) 10 mM, K_2SO_4 100 mM, pH 6,7 (Tris)

L-Leucin-p-Nitroanilid (HCl, Sigma) 4 mM in HEPES-MES-Puffer

Bestimmung der Aktivtät der Maltase und Lactase

Acetatpuffer:
Essigsäure 0,1 M, Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA, Sigma) 1,35 mM, pH 6,0

Maltoselösung 0,55 M in Acetatpuffer
Lactoselösung 0,55 M in Acetatpuffer

Bestimmung der Glucosekonzentration

Boehringer Kit Gluco-quant MPR2 (Boehringer, Mannheim)

Pankreasaufarbeitung, Zymogenaktivierung und Bestimmung der Aktivtät der α-Amylase

Phosphatpuffer:
Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 200 mM, NaCl 50 mM, pH 7,1
Boratpuffer:
$Na_2B_4O_7$ 100 mM, pH 8,0 (HCl)

Enterokinase (Sigma) 5,5 U/ml Boratpuffer
Boehringer-Kit AMYL MPR 2 (Boehringer)

Hydrolyseversuch

Maltodextrin (Glucidex 12, Roquette, Lestrem, Frankreich)
Oligosaccharidfraktionen der Humanmilch
(bereitgestellt von Milupa Research, Friedrichsdorf)
Penicillin-Streptomycin (Gibco, Eggenstein)

MALDI-MS Analyse der Hydrolyseproben

Matrix assisted laser desorption ionisation-mass spectrometry (MALDI-MS:
Voyager RP bzw. DE STR, TOF, Perseptive Biosystems, Framingham, USA)
Mischbettionenaustauscher Dowex 50WX8-200 (Sigma)
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB, 20 g/L, Aldrich, Deisenhofen)

Die Messungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Karas an der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt und bei Milupa Research in Friedrichsdorf durchgeführt.

Bestimmung der freien L-Fucose und N-Acetylneuraminsäure

Tris-Acetat-Puffer:
Tris 120 mM, Natriumacetat 120 mM, pH 9,5 (Essigsäure)

Kaliumphosphatpuffer 50 µM:
KH_2PO_4/K_2HPO_4 50 µM, pH 8,0

Kaliumphosphatpuffer 20 mM:
KH_2PO_4/K_2HPO_4 20 mM, pH 6,8

Kaliumphosphatpuffer 100 mM:
KH_2PO_4/K_2HPO_4 100 mM, pH 8,0

NADP (Sigma) 15 mM in H_2O
L-Fucosedehydrogenase (Sigma) 3,3 U/ml NADP-Lösung
L-Fucose (Sigma)
N-Acetylneuraminsäure (Sigma)
N-Acetylneuraminsäurealdolase (NANA-Aldolase, Sigma)
NAD (Sigma) 51 mM in Kaliumphosphatpuffer 100 mM
Oxamat (Sigma) 43 mM in Kaliumphosphatpuffer 100 mM
Acylmannosamindehydrogenase (AMDH, Funakoshi, Japan) 31 U/470 µl

HPAEC-Analyse der Hydrolyseproben

HPAEC-PAD (DX-300 Bio-LC-System, Dionex, Idstein)
Anionenaustauscher (AG501X8, BioRad)
Stachyose (Sigma)

Die Messungen wurden bei Milupa Research in Friedrichsdorf durchgeführt.

Methoden zu 2.1.3

Präparation der Bürstensaummembran

Die Bürstensaummembran (BSM) der intestinalen Epithelzellen stellt die Kontaktstelle zwischen dem Darmlumen und dem Körperinneren dar. Die Reaktionsverläufe an dieser Membran sind in mehrerer Hinsicht von großer Bedeutung: zum einen für die Prozessierung von Nahrungsinhaltstoffen in Form der komplexen Oligosaccharide durch die apikal lokalisierten Enzyme, zum anderen für die Adhäsion enteropathogener Bakterien. Beide Vorgänge wurden an isolierten BSM studiert. Die Präparation der BSM wurden nach der von U. Hopfer et al. und H. Lücke et al. etablierten Methode vorgenommen [78, 104].
Um für diese Versuche standardisiertes Material einsetzen zu können, wurden aus den zur Verfügung stehenden Geweben die BSM isoliert, charakterisiert und in standardisierter Form bei den Experimente eingesetzt. Der Verdauungstrakt des

Schweins ist dem Menschen sehr ähnlich. Schweinedünndarm wurde daher als Alternative zum nur im begrenzten Umfang erhältlichen Humanmaterial eingesetzt. Da sich die Oberflächenstruktur des Darms mit dem Alter verändert und somit von großer Bedeutung für die bakterielle Adhärenz sein kann, wurden zusätzlich zum adulten Schweinedarm BSM auch aus Ferkeldarm präpariert.

Das tierische Versuchsmaterial stammte aus dem Gießener Schlachthof. Die menschlichen Gewebe wurden von der Chirurgischen Abteilung der Universitätsklinik Gießen zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um kleine Mengen an pathologisch nicht verändertem Resektionsmaterial des proximalen Dünndarms.

Die Darmstücke wurden sofort nach der Entnahme gründlich mit eiskalter physiologischer NaCl-Lösung mit Zusatz von Penicillin/Streptomycin (1 % = 10 U/ml) gewaschen. Alle Arbeitsschritte wurden mit eisgekühlten, sterilen Lösungen bei 0 °C durchgeführt. Die Oberfläche einzelner, aufgeschnittener und ausgebreiteter Darmstücke wurde mit Hilfe von Objektträgern abgeschabt. Die Mucosaschabsel wurden mit gleichem Volumen Mannitol-Tris-Puffer (pH 7,1) und vierfachem Volumen H_2O versetzt und 3 min mit dem Ultraturax zerkleinert. 1 ml dieses Rohhomogenates wurden zur späteren Bestimmung der Enzymaktivität abgenommen. Nach Zusatz der $CaCl_2$-Lösung (Endkonzentration 15 mM) zum Ausfällen der Proteine, wurde das Homogenat 1 min mit einem Glasstab gerührt und auf Zentrifugenröhrchen verteilt. Nach der 15-minütigen Inkubation folgte die erste Zentrifugation bei 7.500 g für 15 min im SS34 Rotor. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand erneut bei 20.000 g über 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 70 ml Mannitol-HEPES-Tris-Lösung (pH 7,4) mit Hilfe einer Pipette resuspendiert und bei 1.400 U/min unter Auf- und Abwärtsbewegungen (10 strokes) in einem Homogenisiergefäß aus Glas nach Potter homogenisiert. Erneut wurde unter Rühren $CaCl_2$ zugegeben (Endkonzentration 10 mM) und nach einer Minute auf Zentrifugenröhrchen verteilt. Nach 15 Minuten Inkubation schloß sich der zweite Aufreinigungsabschnitt an: zunächst eine Zentrifugation bei niederen Umdrehungszahlen (7.500 g, 15 min), dann bei hohen (20.000 g, 25 min). Das Pellet wurde mit 4 ml Mannitol-HEPES-Tris-Lösung (pH 7,4) sorgfältig resuspendiert und einem kurzen Waschschritt unterworfen (2.600 g, 5 min). Der Überstand wurde auf Eppendorfgefäße verteilt und abschließend bei 22.000 g für 30 min zentrifugiert.

Die Pellets wurden mit insgesamt 1 ml Mannitol-HEPES-Tris-Lösung (pH 7,4) resuspendiert. Zur Vesikulierung und homogenen Verteilung wurde die Suspension zunächst 10 mal mit einer 20 g Kanüle (gelb), anschließend mit einer 27 g Kanüle (braun) nochmals suspendiert.
Der Proteingehalt wurde mit Hilfe des BioRad-Reagenz bestimmt und die Qualität des BSM-Präparates wurde anhand von Markerenzymen charakterisiert. Die hydrolytischen Enzyme alkalische Phosphatase und Leucinaminopeptidase befinden sich nur an der apikalen Membran der Epithelzelle. Bei guter Isolierung der Mem-branen sollte somit die Aktivität der Enzyme gegenüber dem Ausgangsmaterial (Rohhomogenat) deutlich erhöht sein.
Für die Standardisierung der Hydrolyseexperimente wurden die Maltase- und Lactaseaktivitäten bestimmt (siehe unten) und anschließend die BSM mit Mannitol-HEPES-Tris-Lösung auf 2,4 U Maltase/ml eingestellt. Aliquotiert und in Stickstoff tiefgefroren konnten die BSM über mehrere Wochen gelagert werden.
Darüberhinaus wurden Aufnahmeexperimente mit radioaktiv markierter Glucose durchgeführt, um die funktionelle Integrität der BSM anhand des natriumabhängigen Transports von Glucose durch SGLT1 nachzuweisen. Der charakteristische Verlauf des Glucosetransports in Form eines “overshoot” bei kurzen Inkubationszeiten der BSM in Anwesenheit von Natrium galt als Voraussetzung für die Verwendung der BSM in den verschiedenen biologischen Testsystemen.
Die Aktivität der Enzyme wurde auf den Proteingehalt des Präparates bezogen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde auch hier die BioRad-Methode (Dreifachbestimmungen) verwendet.

Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase

Zur Bestimmung der Phosphataseaktivität wird das Substrat p-Nitrophenolphosphat eingesetzt, welches in Gegenwart von Wasser zu Phosphat und p-Nitrophenol gespalten wird. Die nach einer bestimmten Zeit freigesetzte Menge an p-Nitrophenol ist proportional der Aktivität der alkalischen Phosphatase, wobei die Extinktionsdifferenz bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen wird.
Das Substrat p-Nitrophenylphosphat wurde 10 mM in Diethanolaminpuffer angesetzt und jeweils 3,0 ml mit 50 µl der Probe gemischt. Die Extinktionszunahme wurde über

5 min bei 405 nm gemessen. Aus dem Vergleich der Aktivität der alkalischen Phosphatase im Rohhomogenat mit der des BSM-Präparates erhält man den volumenbezogenen bzw. nach Bezug auf den Proteingehalt der Probe spezifischen Anreicherungsfaktor, der für die verschiedenen Präparationen durchschnittlich zwischen 15 und 20 lag.

Bestimmung der Aktivität der Leucin-Aminopeptidase

Die Leucin-Aminopeptidase (LAP) spaltet bevorzugt N-terminale Leucinreste ab. Daneben werden auch Aminosäureamide und -arylamide hydrolysiert. Diese Nitralidaseaktivität wird bei der verwendeten Bestimmung der LAP angewandt, indem L-Leucin-p-Nitroanilid als Substrat angeboten wird. Unter Abspaltung der Aminosäure L-Leucin entsteht das gelbe p-Nitroanilin, welches bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden kann.
Das Substrat L-Leucin-p-Nitroanilid wurde 4 mM in HEPES-MES-Puffer (pH 6,7) angesetzt und 2,5 ml hiervon mit 25 µl der Probe gemischt. Die Messung bei 405 nm erfolgte über 5 min. Der Extinktionskoeffizient von p-Nitroanilin beträgt unter diesen Bedingungen 9,62 cm^2/µmol.

Bestimmung der Maltaseaktivität

Zu 1 ml des Acetatpuffers (pH 6,0) wurden 200 µl der Maltoselösung (0,55 M) und 50 µl der verdünnten BSM gegeben (Verdünnungsfaktor 1/25). Das Gemisch wurde genau 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend im kochenden Wasserbad mindestens 5 min inaktiviert. Beim Blindwert wurden die BSM erst nach der Inkubation, also unmittelbar vor der Hitzeinaktivierung zugegeben. Die Lösung wurde abzentrifugiert und jeweils 10 µl hiervon mit 1000 µl der Lösung des Hexokinasetests (Boehringer) für 15 min inkubiert. Über die gemessene Glucosekonzentration kann die Maltaseaktivität berechnet werden, wobei die Maltaseaktivität der BSM in U/ml der gemessenen Glucosekonzentration in µmol/ml x 25/2 x 15 min entspricht. Die präparierten BSM wurden entsprechend ihren Maltaseaktivitäten so verdünnt, daß bei den Hydrolyseexperimenten einheitlich 2,4 U/ml eingesetzt wurden.

Bestimmung der Lactaseaktivität

Zu 1 ml des Acetatpuffers wurden 200 µl der Lactoselösung (0,55 M) und 100 µl der verdünnten BSM gegeben (Verdünnungsfaktor 1/13). Das Gemisch wurde genau 20 min bei 37 °C inkubiert und anschließend im kochenden Wasser mindestens 5 min inaktiviert. Beim Blindwert wurden die BSM erst nach der Inkubation, also unmittelbar vor der Hitzeinaktivierung zugegeben. Die Lösung wurde abzentrifugiert und jeweils 10 µl hiervon mit 1000 µl der Lösung des Hexokinasetests für 15 min inkubiert. Über die gemessene Glucosekonzentration kann die Lactaseaktivität berechnet werden, wobei die Lactaseaktivität der BSM in U/ml der gemessenen Glucosekonzentration in µmol/ml x 13/1 x 20 min entspricht.

Bestimmung der Glucosekonzentration mittels Hexokinasereaktion

Die Glucosebestimmung war einerseits bei der Bestimmung der Maltase- und Lactaseaktivität im BSM-Präparat notwendig. Zum anderen wurde freie Glucose in den Hydrolyseexperimenten bestimmt. Bei der Verwendung von Maltodextrin erlaubte die Methode, den Verlauf des Abbaus und die Freisetzung von Glucose zu verfolgen. Bei Einsatz von HMO wurde der vollständige Abbau des Substrates anhand der Entstehung von freier Glucose verfolgt. Für die Messungen wurde ein Boehringer-Kit, basierend auf der Hexokinase-Reaktion verwendet.

Präparation des Schweinepankreashomogenates

Das Pankreasgewebe der Schweine wurde entnommen, mit physiologischer NaCl Lösung gespült und im Verhältnis 1:10 (w/v) mit Phosphatpuffer (pH 7,1) versetzt. Das gekühlte Gewebe wurde 10 min bei 1400 Umdrehungen/min im Homogenisator nach Potter aufgeschlossen und 15 min bei 6.000 rpm (Rotor SS34) zentrifugiert. Der Überstand wurde über 20 min bei 13.000 rpm nochmals zentrifugiert. Die Amylaseaktivität und Proteinkonzentration des Überstandes wurden bestimmt und der Überstand portioniert bei -80 °C gelagert. Vor dem Einsatz bei den Hydrolyseexperimenten wurde das Homogenat durch Inkubation mit Enterokinase bei 4 °C über 12 h

aktiviert (5,5 U/ml Boratpuffer, Mischung im Verhältnis 1:2), um den physiologischen Vorgang der Trypsinaktivierung nachzuahmen. Bei der Verwendung dieses Homogenats in den Hydrolyseexperimenten wurde somit nicht nur die enzymatische Aktivität des exokrinen Pankreas eingebracht, sondern auch die der intrazellulär lokalisierten Enzyme der Pankreaszellen.

Gewinnung des Humanpankreassekrets (Duodenalaspirats)

Die Duodenalaspirate stammten von gesunden Probanden und Patienten der Universitätsklinik Frankfurt (Gastroenterologische Abteilung, PD Dr. Dr. J. Stein), die einem exokrinen Pankreastest unterzogen wurden. Hierfür wurde den Personen zunächst Sekretin (Sekretolin, Hoechst, 1 U/kg KG), 60 min später ein Gemisch aus Sekretin und CCK (jeweils 1 U/kg KG) per Infusionslösung (60 ml/h) verabreicht. Die Pankreassekrete wurden über eine nasoduodenale Sonde aspiriert und in 7 Fraktionen über 120 min aufgefangen und bei -80 °C gelagert. Die Angaben über Bicarbonat, Bilirubin, Amylase, Lipase und Trypsin standen aus dem Testprotokoll zur Verfügung, wobei die Messung der Amylaseaktivität unmittelbar vor der Verwendung bei unseren Hydrolyseexperimenten wiederholt wurde.

Bestimmung der Aktivität der α-Amylase

Die α-Amylaseaktivität wurde über den Boehringer-Kit AMYL MPR 2 bestimmt, um anschließend die Aktivität des Pankreassekrets bzw. Schweinepankreashomogenats entsprechend den Bedingungen der Hydrolyseexperimente einstellen zu können.
Die Amylaseaktivität wird bei diesem Test gemessen als Spaltung eines Heptaosids, welches mit p-Nitrophenol markiert ist (3 mmol/l im Ansatz). Die entstandenen Di- und Trisaccharide werden durch Zugabe von α-Glucosidase zu Glucose und p-Nitrophenol gespalten. Dieses wird bei 405 nm detektiert.

Zu 1,5 ml des angesetzten Reagenz wurden 50 µl der Probe pipettiert und die Extinktionsänderungen pro Minute im Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen (ε von p-Nitrophenol = 9,9 $cm^2/\mu mol$). Bei der verwendeten Testausfüh-

rung wurden lediglich 80 % des Heptaosid-gekoppelten p-Nitrophenols freigesetzt, woraus sich ein Faktor von 1,25 ergibt. Die Amylaseaktivität wurde auf 125 U/ml eingestellt.

Hydrolyseversuch

Für die Vorinkubation wurden folgende Substanzen eingesetzt :
10 µl Oligosaccharidlösung (Maltodextrin bzw. HMO 125 g/l)
500 µl Pankreassekret (α-Amylase 125 U/ml)
5 µl $CaCl_2$ (15 mM)
5 µl Penicillin-Streptomycin (10 U/ml)

Diese Vorinkubation erfolgte bei 37 °C über 60 min, wobei die Oligosaccharidkonzentration 1,25 mg/520 µl = 2,4 mg/ml betrug. Nach dieser und während der folgenden Inkubationsperiode wurden Aliquots entnommen. Für die Glucosebestimmungen der Kontrollversuche mit Maltodextrin wurden jeweils 10 µl entnommen. Bei den Experimenten mit HMO wurden für die Glucose- und die Fucosebestimmung nach der Vorinkubation sowie an jedem weiteren Zeitpunkt jeweils 40 µl abgenommen, für die Bestimmung der freien Sialinsäure 50 µl und 20 µl für die Massenuntersuchung mittels MALDI-MS. 400 µl des Vorinkubats wurden mit 400 µl BSM (Maltase 2,4 U/ml) versetzt und bis zu 24 h bei 37 °C weiter inkubiert, wobei die Probenentnahmen meist nach 1, 2, 4, 8, 12 h und am Versuchsende erfolgten. Die Inkubationsperiode für Maltodextrin war wesentlich kürzer; hier wurden 2, 5, 10, 20, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Zugabe der BSM-Präparate die Proben entnommen. Direkt an die Probennahme wurde eine Hitzeinaktivierung im kochenden Wasserbad angeschlossen.

Die Enzymkonzentrationen betrugen nach Zusatz der BSM 62,5 U Amylase/ml und 1,2 U Maltase/ml. Vollständige Stabiltät vorausgesetzt, würde die Konzentration des Maltodextrins und der eingesetzten HMO 1,2 mg/ml betragen.
Als Kontrollen, sowohl für die enzymatischen Bestimmungen als auch für den Vergleich der MALDI-Spektren, wurden zwei Blindwertvarianten parallel zum beschriebenen Versuch durchgeführt. Bei der sogenannten Nullprobe wurde erst nach der

Inkubation und Hitzeinaktivierung das entsprechende Saccharid zugesetzt. Bei der als Leerwert bezeichneten Zusammensetzung war der Zucker durch Puffer ersetzt worden. Somit konnte eine Beeinflussung der Reaktion durch das Pankreassekret und die BSM separat berücksichtigt werden. Für die Auswertung der Versuche per MALDI-MS war es wichtig, die Matrix- und Hintergrundpeaks zu kennen, sowie die besten Bedingungen für die Darstellung der Massenpeaks anhand des Nullwertes einzustellen.
Alle in dieser Arbeit eingesetzten Oligosaccharidfraktionen der Humanmilch wurden nach den Methoden von S. Thurl et al. und B. Finke et al. [166, 167, 53] isoliert und uns von Milupa Research zur Verfügung gestellt.

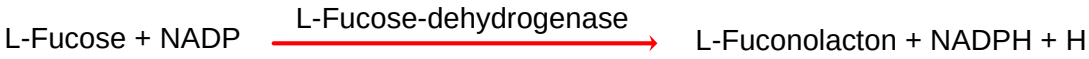
Probenaufarbeitung für die MALDI-MS Analyse

Der dem Hydrolyseversuch entnommenen Probe wurde Ethanol bis zu einer Endkonzentration von 66 % zugesetzt. Nach anschließender Zentrifugation wurde der Überstand gefriergetrocknet, in aqua bidest gelöst und entweder auf Ursprungskonzentration oder zweifach konzentriert eingestellt. Eine Spatelspitze Mischbettionenaustauscher wurde zur Probe gegeben und nach ca. einstündiger Inkubation (unter Schütteln) abzentrifugiert. Der optimale Meßbereich der Oligosaccharide in der MALDI-MS lag bei 0,5 bis 1 mg/ml. Die zu erwartende Konzentrationen der HMO in der Probe wurde daher rechnerisch überschlagen und entsprechend durch Verdünnung mit aqua bidest eingestellt. Bei vollständigem Abbau bzw. extremer Stabilität betrug die Konzentration der inkubierten Oligosaccharidfraktionen bei der Vorinkubation 2,4 und nach BSM-Zusatz 1,2 mg/ml, sofern bei der anschließenden Aufarbeitung keine Konzentrierung vorgenommen wurde.
Die eingesetzten “time of flight“ (TOF) Massenspektrometer mit N_2-Laser emittieren bei der Wellenlänge von 337 nm. Es wurde überwiegend im linearen positiven Ionenmodus gemessen mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV. Eine interne Kalibrierung wurde mit HMO durchgeführt, wobei eine Massenabweichung von maximal 0,06 % toleriert wurde. Als Matrix wurde die von A. Pfenninger et al. vorgeschlagene Dihydroxybenzoesäure eingesetzt [131]. Jeweils 1 µl der Matrixlösung und 1 µl der Oligosaccharidlösung wurden auf den Probenteller pipettiert, vermischt

und mit Hilfe eines Föns getrocknet. Die in dieser Arbeit dargestellten Spektren sind die Summe aus mindestens 50 Einzelspektren.

Bestimmung der freien L-Fucose

Die Menge der freien Fucose in den Proben wurde anhand der Extinktionszunahme von $NADPH_2$ bestimmt, entsprechend der folgenden Reaktionsgleichung :

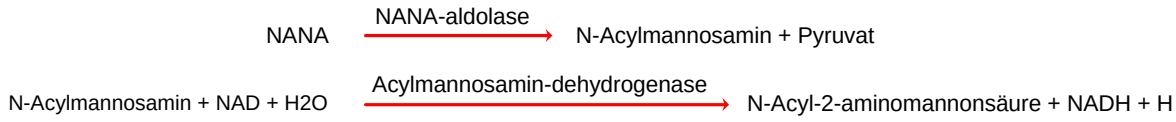


Die Methode von T. Horiuchi et al. [80] wurde leicht modifiziert. Für die Reaktion wurden 1250 µl Tris-Acetat-Puffer (pH 9,5) und 100 µl NADP-Lösung mit 40 µl der Probe versetzt und bei 37 °C 5 min inkubiert. Anschließend wurden 50 µl des Enzyms L-Fucosedehydrogenase (3,3 U/ml) zugegeben und weitere 40 min bei 37 °C inkubiert. Die Messung erfolgte bei 340 nm gegen den Blindwert, bei dem der gleiche Reaktionsansatz mit Tris-Acetat-Puffer anstelle des Enzyms angesetzt worden war.

Die maximal mögliche Konzentration an freigesetzter Fucose bei vollständiger Abspaltung berechnete sich beispielhaft für die Fucosyllactose (Ausgangskonzentration 125 mg/dl) aufgrund des Anteils am Molekulargewicht auf ca. 42 mg/dl (MG Fucose 164, MG FL 488 Da; Anteil der Fucose ca. 33 %).

Bestimmung der freien Sialinsäure

Die Menge der freien Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure, NANA) wurde anhand der Extinktionszunahme von $NADH_2$ bestimmt, entsprechend der folgenden Reaktion:



Die Methode [79] wurde für kleine Volumina verändert. NANA-Aldolase (0,5 U) wurde in 216 µl Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH 6,8) gelöst und mit 50 µl der Probe bei 37 °C 30 min inkubiert. Hinzugefügt wurden 47 µl NAD-, 47 µl Oxamat-, 47 µl Acylmannosamindehydrogenase-Lösung und 293 µl Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 8,0). Dieses Gemisch (Volumen 700 µl) wurde erneut bei 37 °C über 15 min inkubiert. Die Messung der Extinktionsänderung erfolgte bei 340 nm gegen den Blindwert (gleicher Ansatz, jedoch mit Kaliumphosphatpuffer statt NANA-Aldolase). Aufgrund der geringen Konzentrationen an freier NANA in den Proben konnten mehrere Proben hintereinander im gleichen Reaktionsgemisch gemessen werden. Die vollständige Umsetzung wurde in einem Kontrollexperiment mit freier N-Acetylneuraminsäure in Konzentrationen von 10 bis 100 mg/dl überprüft.
Die maximal mögliche Konzentration an freigesetzter NANA bei vollständiger Abspaltung berechnete sich beispielhaft für die Sialyllactose (Ausgangskonzen-tration 125 mg/dl) aufgrund des Anteils am Molekulargewicht auf ca. 63 mg/dl (MG NANA = 309, MG SL = 634 Da; Anteil der NANA ca. 50 %).

HPAEC-Analyse der Hydrolyseproben

Ausgewählte Hydrolyseproben wurden nach Entsalzung mittels “High pH anion exchange chromatography“ (HPAEC) mit gepulster amperometrischer Detektion (PAD) nach der Methode von S. Thurl et al. [166] analysiert. Als Elutionsmittel wurden NaOH und NaOAc eingesetzt.

Material zu 2.1.4 und 2.2.3

Maltodextrin (Glucidex 12, Roquette, Lestrem, Frankreich)
Gynolactose (bereitgestellt von Milupa Research, Friedrichsdorf)
Raftilose, Raftiline (Orafti, Tienen, Belgien)
Dextran 4000 FITC (Sigma, Deisenhofen)
Mischbettaustauscher AG 501-X8 (BioRad, München)
HPTLC-Silica-Platten mit Fluoreszenzindikator (Merck, Darmstadt)
Butanol/Ethanol/H_2O/Essigsäure (4/3/2/1)
Orcinol (Sigma) 0,2 % in 25 %iger Schwefelsäure

Versuchstiere

Weibliche Mäuse des Stammes C57 B6 im Alter von 7 Wochen

Methoden zu 2.1.4 und 2.2.3

Stoffwechselversuche

Es wurden zwei Versuchsserien - A und B - mit jeweils 4 bis 6 Mäusen durchgeführt, bei denen verschiedene Mono- oder Oligosaccharide den Tieren in unterschiedlichen Mengen verabreicht wurden.

Versuchsserie A:
Die Mäuse erhielten per Magensonde jeweils eines der folgenden Saccharide:

50 mg Glucose
125 mg Maltodextrin
125 mg Gynolactose
125 mg Raftilose
125 mg Raftiline

Alle Substanzen wurden unmittelbar vor dem Sonden in 200 µl Wasser gelöst. In einigen Versuchen wurde den Sacchariden jeweils 12,5 mg des mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markierten Dextrans (durchschnittliches MG 4.400 Da) zugesetzt.

Versuchsserie B:

Bei diesen Versuchen erhielten die Mäuse per Magensonde jeweils eines der folgenden Saccharide:
25 mg Glucose
25 mg Maltodextrin
25 mg Gynolactose

Alle Substanzen wurden unmittelbar vor dem Sonden in 100 µl Wasser gelöst. In einigen Versuchen wurden den Sacchariden jeweils 4,1 mg des FITC-markierten Dextrans (durchschnittliches MG 4.400 Da) hinzugefügt.

Bei beiden Versuchsserien standen den Mäusen bis zum Versuchsbeginn Wasser und Trockenfutter ad libitum zur Verfügung. Um die Nachtaktivität der Mäuse zu berücksichtigen, wurden die Stoffwechselversuche um 20 Uhr begonnen und dauerten 14 Stunden. Speziell angefertigte Stoffwechselkäfige ermöglichten durch eine Trichtervorrichtung Urin und Faeces getrennt aufzufangen. Im Abstand von 2 Stunden wurden Urin und Faeces entnommen und gekühlt im Dunkeln aufbewahrt (F1/U1 = zwischen 20 und 22 Uhr gesammelter Faeces/Urin; F7/U7 = zwischen 8 und 10 Uhr gesammelter Faeces/Urin). Vor Versuchsbeginn gesammelte Faeces- bzw. Urinproben wurden mit F0 bzw. U0 bezeichnet. Während des Versuchs stand den Mäusen eine einprozentige Glucoselösung ad libitum zur Verfügung.
Nach 14 Stunden wurden die Mäuse durch Genickschlag getötet. Alle nachfolgenden Arbeiten wurden soweit wie möglich eisgekühlt und unter Gelblicht durchgeführt. Zunächst wurde der gesamte Darm entnommen. Der Dünndarm, beginnend direkt am Magen, wurde in zwei gleich lange Abschnitte zu ca. 12 cm geteilt (bezeichnet als “proximal” und “distal”). Diese, sowie das Caecum und der Abschnitt bis zum Anus, bezeichnet als Rectum, wurden mit jeweils 0,7 ml eiskaltem aqua bidest gründlich gespült. Die Darminhalte wurden in Eppendorfhütchen überführt und kräftig gemischt.

Die Leber wurde ohne Gallenblase entnommen und mit ca. 1 ml aqua bidest im Homogenisiergefäß nach Potter homogenisiert. Die gesammelten Urin- und die in jeweils 0,7 ml aqua bidest suspendierten Faecesproben wurden gewogen.
Zu allen Proben (proximaler und distaler Dünndarm, Caecum, Rectum, Leber, Urinfraktionen ggf. 1-7, Faecesproben ggf. 1-7) wurde Ethanol im gleichen Volumenverhältnis zugesetzt und für 30 min auf einem Schüttelinkubator mit höchster Geschwindigkeit bei 4 °C durchmischt. Anschließend wurden die Proben in einer Tischzentrifuge 15 min abzentrifugiert. Den Überständen wurde jeweils eine Spatelspitze Mischbettaustauscher zugesetzt und die Proben nochmals für 1 Stunde auf dem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Hierdurch wurde die Salzkonzentration in den Proben reduziert, was besonders wichtig für die Bestimmung der Proben mittels MALDI-MS war. Die Proben wurden erneut über 15 min abzentrifugiert und die Überstände gefriergetrocknet. Die Lyophilisate wurden danach in 50 µl aqua bidest gelöst.

Dünnschichtchromatographische Trennung der Proben

Jeweils 5 µl der Darm-, Faeces-, Urin- und Leberproben wurden auf die Dünnschichtplatten aufgetragen. Es wurde zunächst maximal 1 µl der Probe auf die Platte aufgetragen und mit dem erneuten Auftrag bis zur vollständigen Trocknung gewartet, so daß der Auftragsradius so klein wie möglich blieb. Die Platten wurden in ein 500 ml Gefäß gestellt, welches mit einem Laufmittel, bestehend aus Butanol/Ethanol/H_2O/Essigsäure im Verhältnis 4/3/2/1, ca. 1 cm hoch gefüllt war. Die Laufzeit betrug ca. 2 ½ Stunden. Nach dem Trocknen der Platte konnten über dem UV-Schirm die fluoreszierenden Bereiche markiert und photographisch dokumentiert werden. Gelb und blau fluoreszierende Bereiche wurden mit Bleistift direkt auf der Platte gekennzeichnet. Es schloß sich die “Zuckerfärbung” an: die Platte wurde dazu in Orcinollösung (0,2 %ige Lösung in 25 %iger Schwefelsäure) getaucht und anschließend bei ca. 110 °C im Ofen für 10 min entwickelt. Da die Platten nach der Färbung sehr empfindlich sind, wurden sie sofort nach dem Abkühlen dokumentiert.

Material zu 2.2.2

Fluoreszenzmarkierung von Sacchariden

2-Aminobenzamid (2-AB, Sigma, Deisenhofen) 0,3 M in 15 %iger Essigsäure
$NaCNBH_3$ (Sigma) 1 M in Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma)

Lactose (Sigma)
Maltodextrin (Glucidex IT 19, Roquette, Lestrem, Frankreich)
Neutrale Oligosaccharide der Humanmilch (Gesamt- und Einzelfraktionen)
Saure Oligosaccharide der Humanmilch (Gesamt- und Einzelfraktionen)
Alle Oligosaccharide wurden von Milupa Research zur Verfügung gestellt.

GlycoClean Cartridges (Oxford GycoSystems, Abingdon, England)
Essigsäure 30 %, Acetonitril 100 % und 96 %

Medium für Caco-2 Zellen

DMEM Medium
10 % Fötales Kälberserum
0,70 % Gentamycin (10 mg/ml)
0,88 % nichtessentielle Aminosäuren
0,88 % Glutamin (200 mM)
alle von Gibco, Eggenstein

HBSS-Puffer (Hanks Balanced Salt Solution, pH 7,4)

145 mM NaCl
3,0 mM KCl
1,0 mM $CaCL_2$
0,5 mM $MgCl_2$

5 mM Glucose
10 mM HEPES

Sonstiges

12-Well-Platten mit Filtereinsätzen (3,0 µm, 0,8 cm^2, Nunc, Wiesbaden)
48-Well-Platten (Renner, Dannstadt)
96-Well-Platten mit V-Boden (Greiner, Frickenhausen)
^{3}H-Mannitol (27Ci/mmol, ICN, Irvine, USA)

Elektrodialysegerät (Eigenbau, Werkstatt A. Kratz)
Anionen- und Kationenaustauschermembran (Schleicher und Schüll, Wiesbaden)
Leitfähigkeitmeßgerät (Knauer, Berlin)
Gefriertrockenanlage (WKf L2-60, Brandau)
Fluoroskan Ascent (Labsystems, Frankfurt)
Flüssigszintillationszähler (Beckman LS 6500, München)
HPTLC-Platten Kieselgel 60 F254 (Merck, Darmstadt)

Methoden zu 2.2.2

Fluoreszenzmarkierung der Saccharide

Jeweils 3,0 mg des Saccharids wurden in 200 µl 2-Aminobenzamidlösung (2-AB) gelöst und zusammen mit 200 µl Natriumcyanoborhydridlösung bei 45 °C im Heizblock drei Stunden inkubiert. Die Aminogruppe des Aminobenzamids bindet dabei an das C1-Atom am reduzierenden Ende des Saccharids. Alle Reaktionsschritte wurden lichtgeschützt durchgeführt. Nach Abkühlung des Reaktionsgemischs wurden die fluoreszenzmarkierten Saccharide von überschüssigem 2-AB und/oder von unmarkierten Sacchariden gereinigt. Hierzu wurden jeweils 50 bis 100 µl des Reaktionsgemischs auf eine kleine Kartusche pipettiert, die zuvor mit 5 ml 30 %iger Essigsäure und 1 ml 100 %igem Acetonitril aktiviert worden war. Nach 45 bis 60 Minuten Einwirkzeit wurde mit 1 ml 100 %igem Acetonitril, anschließend mit 5 x 1 ml

96 %igem Acetonitril gespült. Es folgte die Elution mit 3 x 100 µl Wasser. Nach entsprechender Regeneration konnte die Kartusche erneut verwendet werden. Die Eluate mit den markierten Sacchariden wurden gefriergetrocknet und in 100 µl aqua bidest vereint. Bei vollständiger Elution besaßen diese Lösungen eine Konzentration von 30 mg des markierten Saccharids pro ml.
Die Qualität der Fluoreszenzmarkierung wurde chromatographisch und massenspektrometrisch überprüft. Für die HPTLC wurden hierzu jeweils 1 µl der 1/3 verdünnten Saccharidlösung auf die Silicaplatten aufgetragen (ca. 10 µg/Probe). Für die MALDI-MS wurden jeweils 1 µl der 1/30 verdünnten Saccharidlösung zusammen mit der Matrix auf den Probenteller pipettiert (ca. 1 µg/Probe). Eine begrenzte Lagerung der markierten Saccharide war bei -80 °C möglich.

Resorptionsversuch mit Caco-2 Zellen

Kultivierung der Zellen siehe Seite 166

Pro Filter wurden 2 x 10^5 Zellen (Passagenummern 41 bis 43) ausgesät. Alle zwei Tage erfolgte ein Medienwechsel im apikalen und basalen Kompartiment. Nach Überprüfung der Dichtigkeit des Zellrasens (Widerstandsmessungen, Einsatz von Parazellulärmarkern) wurde der Versuch am 14. Tag durchgeführt. Das Medium wurde abgesaugt und die Filtereinsätze vorsichtig in 37 °C warmen HBSS-Puffer gewaschen. Entweder von apikaler oder von basaler Seite wurden die in HBSS-Puffer gelösten fluoreszenzmarkierten Saccharide zusammen mit Mannitol aufgegeben, die gegenüberliegende Seite erhielt HBSS-Puffer (Pipettierschema siehe unten). Das apikale Angebot wurde in zwei Varianten durchgeführt: Entweder die ausschließliche Gabe von fluoreszenzmarkierten Sacchariden oder diese zusammen mit unmarkierten Sacchariden.
Pro Testsubstanz wurden somit drei Versuche durchgeführt: 1) apikales Angebot von fluoreszenzmarkiertem Saccharid und ^{3}H-Mannitol, 2) apikales Angebot von fluoreszenzmarkiertem und unmarkiertem Saccharid und ^{3}H-Mannitol sowie 3) basales Angebot von fluoreszenzmarkiertem Saccharid und ^{3}H-Mannitol. Das apikale Auftragsvolumen betrug 250 µl, das basale 400 µl. Bei den Kontrollproben wurde die Saccharidlösung durch Puffer ersetzt. Nach Auftrag der Lösungen wurden die Plat-

ten zwei Stunden lang auf der Heizplatte (37 °C) unter leichter Bewegung inkubiert. Nach 30, 60 und 90 Minuten wurden dem jeweils gegenüberliegenden Kompartiment 30 µl entnommen. Nach 120 Minuten wurden die restlichen apikalen und basalen Medien (als Restvolumina bezeichnet) abgenommen. Die Filtereinsätze mit den anhaftenden Zellen wurden dreimal in eiskaltem Puffer gewaschen, von den Plastikhaltern abgetrennt, vorsichtig getrocknet und tiefgefroren.

Pipettierschema:

93 µl 2-AB-markiertes Saccharid	
Zugabe von 897 µl HBSS-Puffer	= 990 µl
Abnahme von 30 µl als Standard ohne Mannitol	= 960 µl
Abnahme von 295 µl *	= 665 µl
Zugabe von 2,6 µl ^{3}H-Mannitol	
Abnahme von 10 µl als Standard	
Abnahme von 250 µl für die apikale Gabe	
Abnahme von 400 µl für die basale Gabe	

* Zugabe von 1,0 mg unmarkiertem Saccharid	= 295 µl
Abnahme von 30 µl als Standard ohne Mannitol	= 265 µl
Zugabe von 1,0 µl ^{3}H-Mannitol	
Abnahme von 10 µl als Standard	
Abnahme von 250 µl für die apikaleGabe	

Folgende Kurzschreibweise wurde für die Probenentnahmen verwendet:

Ab	Nach apikaler Gabe des fluoreszenzmarkierten Saccharids basal entnommene Probe
Ba	Nach basaler Gabe des fluoreszenzmarkierteen Saccharids apikal entnommene Probe
Aa, Bb	Restvolumina auf der jeweiligen Gabeseite

Messung der Erscheinungsrate von ^{3}H-Mannitol

Jeweils 10 µl des Standards und der nach 30, 60, 90 und 120 Minuten entnommenen Proben wurden mit 3,0 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Flüssigszintillationszähler gemessen. Ein vollständiges Erscheinen des tritiummarkierten Mannitols (bei der Kontrolle) wurde 100 % gesetzt und die entsprechenden Fluxe (apikal nach basal, basal nach apikal) in Gegenwart der verschiedenen Saccharide mit Bezug auf die Kontrolle berechnet.

Messung der Erscheinungsrate von 2-Aminobenzamid

Um von der gemessenen Stärke der Fluoreszenz auf die Konzentration des 2-Aminobenzamids schließen zu können, wurde eine Standardkurve von 2-Aminobenzamid (3 bis 3.000 µM) erstellt. Jeweils 200 µl wurden in 48-Well-Platten pipettiert und im Ascent Fluoroskan gemessen. Die Ansätze wurden vor ihrer Fluoreszenzmessung 1 zu 60 mit aqua bidest verdünnt. Jeweils 200 µl wurden in eine 48-Well-Platte überführt und bei 340/460 nm gemessen. Von den entnommenen basalen Restvolumina (Ab) wurden 200 µl abpipettiert und gemessen, von den apikalen Restvolumina (Ba) wurden 100 µl abgenommen und zusammen mit 100 µl aqua bidest gemessen. 20 µl der nach 30, 60 und 90 Minuten abgenommenen Proben wurden zunächst unverdünnt in 96-Well-Platten, anschließend 1 zu 10 mit aqua bidest verdünnt in 48-Well-Platten gemessen.

Vorbereitung der Proben für die HPTLC- und die MALDI-MS-Analysen

Zu den apikalen bzw. basalen Restvolumina wurden jeweils 2,5 ml aqua bidest zugegeben und in die mittlere Elektrodialysekammer gefüllt. Nach 50-minütiger Dialyse wurden die Proben auf ihre Leitfähigkeit geprüft. Nach vollständiger Entsalzung wurden die Proben entweder lyophilisiert und in 5 µl aqua bidest gelöst oder weiter über C18-Säulen aufgereinigt (1. Elution mit aqua bidest, 2. Elution mit aqua bidest/Methanolgemisch, 3. Elution mit Methanol) und erst dann lyophilisiert.

Material zu 2.3.2 und 2.3.3

Medium für Caco-2 Zellen

DMEM Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
10 % Fötales Kälberserum (FKS)
0,70 % Gentamycin (10 mg/ml)
0,88 % nichtessentielle Aminosäuren
0,88 % Glutamin (200 mM)
alle von Gibco, Eggenstein

Medium für HT-29 Zellen

RPMI 1640 Medium (Roswell Park Memorial Institute)
10 % FKS *
1 % Glutamin (200 mM)
0,88 % Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml, 10 mg/ml)
alle von Gibco, Eggenstein

* bei serumreduziertem Medium betrug der FKS Anteil 1,0 bzw. 0,1 %

Phosphatpuffer (PBS, pH 7,4)

140 mM NaCl
2,5 mM KCl
8,0 mM Na_2HPO_4
1,5 mM KH_2PO_4

Trypsinlösung

Trypsin-EDTA (5 g/l Trypsin, 2 g/l EDTA, Gibco)
verdünnt 1/10 mit dem jeweiligen Medium

Lösungen zur Zellzahlbestimmung

Trypan-Blau
0,4 % (Sigma, Deisenhofen)
verdünnt 4/5 mit Zellsuspension

SYTOX Green Nucleic Acid Stain (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)
5 mM in DMSO, verdünnt 1/2.500 mit NaCl (0,9 %)

Triton X-100 (Sigma), 6 %ig in NaCl (0,9 %)
(Endkonzentration 1 %)

Lösungen zur Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase

Diethanolaminpuffer
1,0 mol/l Diethanolamin (Sigma)
0,5 mmol/l $MgCl_2$
pH 9,8 (Tris)
Fluoreszeindiphosphat 5 mM (Molecular Probes)
verdünnt 1/50 mit Diethanolaminpuffer

Lösungen zur Bestimmung der CPP-32 Aktivität

1,0 % 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propansulfonat (CHAPS)
2 mM EDTA
5 mM Dithiotreitol (DTT)

1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
10 mM HEPES
10 µg/ml Pepstatin A
10 µg/ml Aprotinin
20 µg/ml Leupeptin
pH 7,4 (KOH)

Sonstiges

Humanmilch aus verschiedenen Laktationsperioden
Oligosaccharide der Humanmilch in verschiedenen Fraktionierungsstufen:
Gesamtfraktion (0,25 bis 10 g/l), neutrale HMO (0,06 bis 2 g/l),
saure HMO (0,015 bis 1,0 g/l), höhermolekulare HMO (0,015 bis 0,5 g/l),
Sialyllactose (0,015 bis 1,0 g/l), Disialyllacto-N-tetraose (0,015 bis 1,0 g/l).

Alle Oligosaccharide wurden von Milupa Research zur Verfügung gestellt.

Lactose (0,1 bis 20 g/l, Sigma)
Lactulose (0,5 bis 40 g/l, Sigma)
Raftilose, Raftiline (0,5 bis 40 g/l, Orafti, Tienen, Belgien)
Quercetin (150 µM, Sigma)
Butyrat (2,5 mM, Sigma)
Camptothecin (50 µM, Sigma)
CPP-32/Apopain Substrat (25 µM, CALBIOCHEM, Bad Soden)

Zellkulturflaschen, Multiwell-Platten (Renner, Dannstadt)
Fluoroskan Ascent (Labsystems, Frankfurt)

Methoden zu 2.3.2 und 2.3.3

Kultivierung der Colonkarzinomzellinien Caco-2 und HT-29

Die Zellen wurden in Kulturflaschen bei 37 °C im Brutschrank bei 5 % CO_2/95 % O_2 kultiviert. Alle zwei Tage erfolgte ein Medienwechsel. Zweimal pro Woche, nach Erreichen von ca. 80 %iger Konfluenz, wurden die Zellen geteilt. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml der verdünnten Trypsinlösung inkubiert. Nach ca. 3 min, mit Beginn des Loslösens der Zellen von der Flasche, wurde der Prozeß durch Mediumzugabe gestoppt. Verbliebene Zellaggregate wurden durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette vereinzelt und ein Aliquot zur Zellzahlbestimmung abgenommen.

Zellzahlbestimmung im Hämocytometer

Von der Zellsuspension wurden 20 µl im Verhältnis 1 zu 5 mit Trypanblaulösung gemischt. Der Farbstoff dringt nur in tote Zellen ein, welche dadurch separat von den vitalen Zellen erfaßt werden können. Das Auszählen erfolgte mikroskopisch in einer Neubauerzählkammer (Hämocytometer). Hierbei sind vier Quadranten von 1 mm^2 in jeweils 16 kleinere Quadrate aufgeteilt. Der Spalt zwischen Deckgläschen und Glaskammer beträgt 0,1 mm, so daß ein Volumen von 0,1 µl pro Quadrant vorhanden ist. Der Durchschnitt der ausgezählten Quadranten wird multipliziert mit dem Faktor 10^4 und den vorangegangenen Verdünnungsstufen, so daß die Zellzahl pro ml bzw. die Gesamtzellzahl pro Flasche bestimmt werden konnte.

Zellaussaat

Die Neuaussaat der Zellen erfolgte entweder in Kulturflaschen oder auf Multiwell-Platten mit Hilfe einer automatischen Pipette. Für die Weiterkultivierung auf 25 cm^3-Flaschen wurden die Zellen mit einer Dichte von 2 x 10^6 ausgesät.
Die Aussaatdichte für die Proliferationsassays auf 24-Well-Platten betrug 10^3 Zellen in einem Volumen von 400 µl pro Well. Für die Bestimmung der Aktivität der alkali-

schen Phosphatase wurden die HT-29 Zellen auf kleinen Kulturflaschen in einer Dichte von 2 x 10^6 Zellen ausgesät. Von den Caco-2 Zellen wurden 2,5 x 10^3 Zellen pro Well auf 48-Well-Platten ausgesät. Für die Bestimmung der CPP-32 Aktivität in HT-29 Zellen wurden 5 x 10^4 Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät.

Messung der Proliferationsrate von Colonkarzinomzellen

Nach der Zellaussaat auf den 24-Well-Platten folgte eine Anheftungsphase über 24 Stunden im Brutschrank. Alle Testsubstanzen wurden sterilfiltriert (0,2 µm) und unter sterilen Bedingungen weiter mit Medium verdünnt. Pro Platte konnten neben der Kontrolle 5 Substanzen in Vierfachbestimmung getestet werden. Zu Versuchsbeginn wurde das Medium abgesaugt und je 500 µl der Oligosaccharidlösung pro Well aufgetragen. Die Kontrollzellen erhielten nur Medium und als Vergleichsubstanz diente Quercetin. Die Inkubation der Zellen mit den Substanzen verlief über 3 Tage (72 Stunden) ohne Medienwechsel unter den oben beschriebenen Bedingungen.

Zur Verdünnung der Humanmilchfiltrate wurde auch Medium eingesetzt, welches lediglich 1 bzw. 0,1 % fötales Kälberserum (FKS) enthielt. Nach der Anhaftungsphase, während der die Zellen noch mit 10 % FKS-haltigem Medium inkubiert worden waren, wurden die Zellen gründlich - aber vorsichtig - mit jeweils 0,7 ml PBS pro Well gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit den unterschiedlich verdünnten Humanmilchfiltraten maximal 72 Stunden inkubiert. Als Kontrollen wurden mehrere Wells mit Medium inkubiert, welches die entsprechenden Konzentrationen an FKS besaß.
Nach der Inkubation wurden die Zellen mikroskopisch überprüft. Im Anschluß wurde das Medium von jedem Well abpipettiert und zur späteren Zellzahlbestimmung des Überstands in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Pro Well wurden 50 µl NaCl (0,9 %) und 200 µl SYTOX Green mit einer Multipipette auf die noch anhaftenden Zellen gegeben. Dieser Farbstoff war bei -20 °C in Aliquots gelagert und erst unmittelbar vor dem Versuch 1 zu 2.500 mit NaCl (0,9 %) verdünnt worden. Die Zellen wurden mit dem Farbstoff auf einem Schüttler mit geringer Geschwindigkeit für 30 min inkubiert und anschließend wurde die Fluoreszenz im automatischen Meßgerät bestimmt (Anregung bei 485 nm, Emission bei 535 nm; Bestimmung der toten

Zellen). Sofort nach dieser ersten Messung erfolgte eine Tritonzugabe von 50 µl pro Well. Das Endvolumen eines Wells betrug somit jeweils 300 µl bei einer Tritonkonzentration von 1 %. Nach einer weiteren Inkubation von 30 min schloß sich die zweite Fluoreszenzmessung an (Bestimmung der Gesamtzellzahl). Die zuvor abgenommenen Zellen im Überstand wurden abzentrifugiert und mit 50 µl NaCl, 200 µl SYTOX-Lösung sowie 50 µl Triton X-100 auf eine 24-Well-Platte überführt. Nach 30 min erfolgte die Zellzahlbestimmung des Überstands.

Um von den gemessenen Fluoreszenzwerten auf die entsprechende Zellzahl pro Well zurückschließen zu können, wurde eine Standardkurve erstellt. Hierzu wurden HT-29 bzw. Caco-2 Zellen passagiert und die Zellzahl nach der Trypan-Blau Methode bestimmt. Eine Verdünnungsreihe wurde erstellt und jeweils 50 µl (Vierfachbestimmung) in ein Well einer 24-Well-Platte übertragen. Anschließend wurden 200 µl der SYTOX-Lösung zusammen mit 50 µl der Triton-Lösung hinzu pipettiert. Nach einer Inkubation von 30 min wurden die Platten gemessen und die bekannten Zelllzahlen wurden den entsprechenden Fluoreszenzintensitäten zugeordnet.

Messung der Aktivität des Enzyms alkalische Phosphatase als Differenzierungsmarker

Für die Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase in HT-29 Zellen wurde pro Substrat und Konzentration eine kleine Flasche (25 cm^3) mit ca. 50 % konfluenten Zellen benötigt. Die Saccharidgemische verschiedener Konzentrationsstufen wurden mit 6 ml Standardmedium verdünnt und nach Absaugen des Zellmediums für 72 h mit den Zellen im Brutschrank inkubiert. Über diesen Zeitraum erfolgte kein weiterer Medienwechsel. Nach mikroskopischer Überprüfung der Zellen wurde das Medium abgenommen und zur Bestimmung der Zellzahl der abgelösten Zellen zentrifugiert (5.000 rpm, 15 min). Das Zellpellet wurde sofort in 1 ml NaCl (0,9 %) resuspendiert und hiervon 50 µl, wie oben beschrieben, zur Zellzahlbestimmung eingesetzt.
Die an der Kulturflasche haftenden Zellen wurden nach dem Waschen mit PBS mit Hilfe von Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 ml) vom Plastikboden gelöst. Der Vorgang wurde durch die Zugabe von 5 ml Medium gestoppt und die Zellsuspension an-

schließend homogenisiert. Nach Abnahme eines Aliquots zur Zellzahlbestimmung (ca. 100 µl) wurde die Zellsuspension weiter mit 10 ml PBS verdünnt und bei 5.000 rpm 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde jeweils in 550 µl Diethanolaminpuffer sorgfältig resuspendiert und 250 µl davon mit dem gleichen Volumen an Fluoreszeindiphosphat auf eine 24-Well-Platte aufgetragen. Die Endkonzentration des Substrats betrug 50 µM.
Die Freisetzung des Fluoreszeins als Indikator der Phosphataseaktivität der Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen wurde über 120 min alle 15 min im Ascent Fluoroskan (Anregungswellenlänge 485 nm, Emissionswellenlänge 535 nm) gemessen. Die Fluoreszenzzunahme pro Minute wurde auf eine konstante Zellzahl (10^6) bezogen. Als Vergleichsubstanz zu den Saccharidgemischen wurde bei jedem Versuchsansatz Butyrat in einer Konzentration von 2,5 mM eingesetzt.

Da Caco-2 Zellen weitaus stärker differenzieren als HT-29 Zellen, war anstelle der Aussaat auf Kulturflaschen eine Aussaat auf 48-Well-Platten ausreichend, um die Aktivität der alkalischen Phosphatase messen zu können. Nach einer 24stündigen Anheftungsphase wurden die Zellen über 72 Stunden mit den im Medium gelösten Substanzen inkubiert. Das Volumen betrug dabei 250 µl pro Well. Zur parallelen Bestimmung der Zellzahl wurden zusätzlich je 2 Wells mit den Testsubstanzen inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit Puffer gewaschen. Für die Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase wurden pro Well 50 µl Diethanolaminpuffer sowie 50 µl des Substrats Fluoreszeindiphosphat zu den Zellen pipettiert und gemischt. Die Fluoreszeinfreisetzung wurde über 30 min alle 5 min gemessen (Anregung bei 485 nm, Emission bei 535 nm) und die Fluoreszenzzunahme pro Minute wurde auf eine konstante Zellzahl (10^6) bezogen. Als Vergleichsubstanz zu den Saccharidgemischen wurde wiederum bei jedem Versuchsansatz Butyrat in einer Konzentration von 2,5 mM eingesetzt.

Aktivitätsmessung des Enzyms CPP-32 als Marker der Apoptose

Einige der Oligosaccharidfraktionen wurden auch auf ihre Wirkung auf die Apoptose untersucht. Dabei diente die CPP-32 Aktivität der inkubierten Zellen als früher Marker des natürlichen Zelltods.
Nach der Aussaat der HT-29 Zellen auf 6-Well-Platten und einer 24-stündigen Anheftungsphase wurden die Oligosaccharidfraktionen (0,5 g/l) sowie Camptothecin (50 µM) als Vergleichsubstanz in Medium gelöst, in einem Volumen von 2,0 ml pro Well aufgegeben und 24 h mit den Zellen inkubiert. Ein Teil der Wells wurde für die Zellzahlbestimmung benötigt und wie oben beschrieben weiterbehandelt. Die Überstände der anderen Wells wurden abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und für 20 min mit 0,5 ml des Apoptosepuffers inkubiert. Diese Zellsuspension wurde in ein Homogenisiergefäß nach Potter aus Glas überführt, die Wells nochmals mit 250 µl Apoptosepuffer nachgespült und gemeinsam bei 2.500 U/min bei 0 °C homogenisiert. Es folgte eine Ultrazentrifugation bei 43.000 rpm für 30 min. 0,5 ml des Überstands wurden zusammen mit 5 µl des fluorogenen CPP-32/Apopainsubstrates (Endkonzentration 25 µM) auf eine 24-Well-Platte überführt und über 5 h alle 30 min im Ascent Fluoroskan gemessen (Anregung bei 390 nm, Emission bei 460 nm). Die Fluoreszenzzunahme pro min wurde auf 10^6 Zellen bezogen.

Statistische Auswertung

Die Versuchsergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung (SD) angegeben. Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse von Kapitel 2.3 und 2.4 wurde der Mann-Whitney-Test zum Niveau von 5 % durchgeführt (Vergleich zwischen Kontroll- und Saccharidgruppen). Die Berechnung der linearen Regression und die graphischen Darstellungen der Ergebnisse wurde mit Hilfe der Graph Pad™ Software (San Diego, USA) ausgeführt.

3.2 Abkürzungsverzeichnis

2-AB	2-Aminobenzamid
ATCC	American type culture collection
BSM	Bürstensaummembran
CHAPS	[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propansulfonat
Da	Dalton
DTT	Dithiiotreitol
DP	Degree of polymerization
DSLNT	Disialyllacto-N-tetraose
EHEC	Enterohaemorrhagische Escherichia coli
EPEC	Enteropathogene Escherichia coli
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FL	Fucosyllactose
Fuc	L-Fucose
FOS	Fructooligosaccharide
Gal	D-Galactose
Glc	D-Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Gyno	Gynolactose
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HMO	Oligosaccharide der Humanmilch
HPAEC	High pH anion exchange chromatography
HPTLC	High performance thin layer chromatography
LNDFH	Lacto-N-difucosylhexaose
LNFP	Lacto-N-fucopentaose
LNH	Lacto-N-hexaose
LNT	Lacto-N-tetraose
LST	Lactosialyltetraose
MALDI-MS	Matrix assisted laser desorption ionization-mass spectrometry
MD	Maltodextrin
MES	2-N-Morpholinoethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht

MW	Mittelwert
NANA	N-Acetylneuraminsäure
NSP	Nicht Stärke Polysaccharide
PA(E)D	Gepulste amperometrische (elektrochemische) Detektion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SD	Standardabweichung vom Mittelwert
SL	Sialyllactose
TOF	Time of flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

3.3 Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich verschiedener Inhaltstoffe von Humancolostrum, reifer Humanmilch und Kuhmilch (MW = Mittelwert, Min = Minimum, Max = Maximum; Quellen: [2, 55, 64, 71, 83, 99, 120, 126, 148, 182]) 7

Tabelle 2: Durchschnittliche Freisetzung von Fucose und Glucose in mg/dl bzw. in Prozent der maximal abspaltbaren Monosaccharidmenge nach Inkubation mit Pankreashomogenat und Bürstensaummembranen über 20 Stunden (Mittelwerte aus 4 Versuchsserien) 35

Tabelle 3: Durchschnittliche Freisetzung von N-Acetylneuraminsäure (NANA) und Glucose in mg/dl bzw. in Prozent der maximal abspaltbaren Monosaccharidmenge nach Inkubation mit Pankreashomogenat und Bürstensaummembranen über 20 Stunden (Mittelwerte aus 4 Versuchsserien) 42

Tabelle 4: Bezeichnungen und Strukturen der für diese Arbeit wesentlichen Oligosaccharide der Humanmilch (Fuc = Fucose, Gal = Galactose, Glc = Glucose, GlcNAc = N-Acetylglucosamin, NANA = N-Acetylneuraminsäure); Kurzschreibweise aus [10] 184

Abb.1 Darstellung von N-Acetyl-β-D-Glucosamin, β-D-Galactose und β-D-Glucose in der Sesselform (gekennzeichnet sind die C-Atome, die zur Verknüpfung des Grund-gerüstes der HMO beitragen) 11

Abb. 2 Schematische Darstellung eines Vertreters der Typ-1 Reihe (Lacto-N-tetraose, LNT) und eines Vertreters der Typ-2 oder Neo-Reihe (Lacto-N-neotetraose, LNnT) 12

Abb. 3 Schematische Darstellung von Lacto-N-hexaose (LNH) in linearer (oben) und in verzweigter Form (unten) 12

Abb. 4 Darstellung von α-L-Fucose in der Sesselform (gekennzeichnet sind die C-Atome, die zur Verknüpfung zwischen der Fucose und dem Grundgerüst der HMO beitragen 13

Abb. 5 Darstellung von α-L-N-Acetylneuraminsäure (NANA) in der Sesselform (gekenn-zeichnet sind die C-Atome, die zur Verknüpfung zwischen NANA und dem Grund-gerüst der HMO beitragen) 14

Abb. 6 MALDI-MS Spektrum (Voyager RP) von Maltodextrin (Konzentration 1 g/l H_2O, DP = degree of polymerization; Summe aus 50 Einzelspektren) 28

Abb. 7 Glucosefreisetzung aus Maltodextrin nach Vorinkubation mit Pankreassekret und nachfolgender Inkubation zusammen mit Bürstensaummembranenzymen (MD = Maltodextrin, HPS = Humanpankreassekret, BSM = Bürstensaummembran, SBSM = BSM vom Schwein, HBSM = BSM aus Humanmaterial, 100 % = vollständige Wiederfindung der Glucose). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 6 Versuchsserien 29

Abb. 8 MALDI-MS Spektrum (Voyager RP) von Maltodextrin nach Inkubation mit hitzeinaktiviertem Pankreassekret und Bürstensaummembranenzymen (DP = degree of polymerization; Summe aus 50 Einzelspektren) 30

Abb. 9 MALDI-MS Spektrum (Voyager RP) von Maltodextrin nach Vorinkubation mit Pankreassekret und anschließender Inkubation über 1 Stunde zusammen mit Bürstensaummembranenzymen (Summe aus 50 Einzelspektren) 30

Abb. 10 MALDI-MS Spektrum (Voyager RP) von neutralen Oligosacchariden der Humanmilch (Konzentration 1 g/l H_2O; Summe aus 50 Einzelspektren) 32

Abb. 11 MALDI-MS Spektrum (Voyager DE STR) der neutralen Gesamtfraktion nach Inkubation mit hitzeinaktiviertem Pankreassekret und Bürstensaummembranen (Summe aus 50 Einzelspektren) 33

Abb. 12 MALDI-MS Spektrum (Voyager DE STR) der neutralen Gesamtfraktion nach Vorinkubation mit Pankreassekret und anschließender Inkubation über 20 Stunden zusammen mit Bürstensaummembranen (Summe aus 50 Einzelspektren) 34

Abb. 13 HPAEC-Elutionsprofil isomerer Lacto-N-fucopentaosen (LNFP) nach Inkubation mit hitzeinaktiviertem Pankreassekret und Bürstensaummembranen (Zusatz von Stachyose zur internen Kalibrierung; PED = pulsed electrochemical detection) 36

Abb. 14 HPAEC-Elutionsprofil isomerer Lacto-N-fucopentaosen (LNFP) nach Vorinkubation mit Pankreassekret und anschließender Inkubation über 20 Stunden zusammen mit Bürstensaummembranen (Zusatz von Stachyose zur internen Kalibrierung; PED = pulsed electrochemical detection) 37

Abb. 15 MALDI-MS Spektrum (Voyager RP) der neutralen Gesamtfraktion nach Inkubation mit Pankreashomogenat und Bürstensaummembranen über 4 Stunden (Summe aus 50 Einzelspektren) 38

Abb. 16 MALDI-MS Spektrum (Voyager DE STR) der sauren Gesamtfraktion (Konzentration 1g/l H_2O; Summe aus 50 Einzelspektren; neutrale HMO sind mit * gekennzeichnet) 39

Abb. 17 MALDI-MS Spektrum (Voyager DE STR) der sauren Gesamtfraktion nach Inkubation mit hitzeinaktiviertem Pankreassekret und Bürstensaummembranen (Summe aus 50 Einzelspektren) 40

Abb. 18 MALDI-MS Spektrum (Voyager DE STR) der sauren Gesamtfraktion nach Vorinkubation mit Pankreassekret und anschließender Inkubation über 20 Stunden zusammen mit Bürstensaummembranen (Summe aus 50 Einzelspektren) 41

Abb. 19 MALDI-MS Spektrum (Voyager RP) der sauren Gesamtfraktion nach Inkubation mit Pankreashomogenat und Bürstensaummembranen über 4 Stunden (Summe aus 50 Einzelspektren) 43

Abb. 20 Stoffwechselkäfig für Mäuse mit Vorrichtung zur getrennten Sammlung von Urin und Faeces 45

Abb. 21 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters der Darminhalte von Mäusen 14 Stunden nach Gabe von Glucose (links), Maltodextrin (Mitte) oder Gynolactose nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Anfärbung mit Orcinol (rechts; Std = Standard, G = Glucose, MD = Maltodextrin, Gy = Gynolactose, M = Maus, p = proximaler Dünndarm, d = distaler Dünndarm, C = Caecum, R = Rectum) 48

Abb. 22 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters der Darminhalten von Mäusen 14 Stunden nach Gabe von Raftilose (links) oder Raftiline (rechts) nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Anfärbung mit Orcinol (Std = Standard, Ro = Raftilose, Ri = Raftiline, M = Maus, p = proximaler Dünndarm, d = distaler Dünndarm, C = Caecum, R = Rectum) 50

Abb. 23 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters der Faeces von Mäusen, die entweder Glucose (links) oder Maltodextrin (rechts) erhalten hatten nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Anfärbung mit Orcinol (Std = Standard, G = Glucose, MD = Maltodextrin, M = Maus, F1 = Faeces zwischen Versuchsbeginn (20 Uhr) und 22 Uhr, F2 = Faeces zwischen 22 und 24 Uhr, usw. bis F6 = Faeces zwischen 6 und 8 Uhr) 52

Abb. 24 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters der Faeces von Mäusen, die Gynolactose erhalten hatten nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Anfärbung mit Orcinol (Std = Standard, Gy = Ganolactose, M = Maus, F0 = Faeces vor Versuchsbeginn, F1 = Faeces zwischen Versuchsbeginn (20 Uhr) und 22 Uhr, F2 = Faeces zwischen 22 und 24 Uhr, F3 = Faeces zwischen 0 und 2 Uhr) 53

Abb. 25 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters der Faeces von Mäusen, die Raftilose (links) oder Raftiline (rechts) erhalten hatten nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Anfärbung mit Orcinol (Std = Standard, Ro = Raftilose, Ri = Raftiline, M = Maus, F1 = Faeces zwischen Versuchsbeginn (20 Uhr) und 22 Uhr, F2 = Faeces zwischen 22 und 24 Uhr, F3 = Faeces zwischen 0 und 2 Uhr) 54

Abb. 26 Repräsentative Darstellung der Darminhalte von Mäusen 14 Stunden nachdem sie Glucose, Maltodextrin, Gynolactose, Raftilose oder Raftiline zusammen mit fluoreszenzmarkiertem Dextran erhalten hatten (p = proximaler Dünndarm, d = distaler Dünndarm, C = Caecum, R = Rectum; unter UV-Licht) 57

Abb. 27 Repräsentative Darstellung der Darminhalte einer Maus 14 Stunden nachdem sie Gynolactose zusammen mit fluoreszenzmarkiertem Dextran erhalten hatte nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und unter UV-Licht (C = Caecum, R = Rectum) 58

Abb. 28 Repräsentative Darstellung der Faeces einer Maus, die Maltodextrin zusammen mit fluoreszenzmarkiertem Dextran erhalten hatte nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und unter UV-Licht (F1 = Faeces zwischen Versuchsbeginn (20 Uhr) und 22 Uhr, F2 = Faeces zwischen 22 und 24 Uhr, usw. bis F6 = Faeces zwischen 6 und 8 Uhr) 59

Abb. 29 Repräsentative Darstellung der Darminhalte von Mäusen 14 Stunden nachdem sie 250 mg Maltodextrin (links) oder Gynolactose (rechts) zusammen mit 25 mg fluoreszenzmarkiertem Dextran erhalten hatten nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und unter UV-Licht (MD = Maltodextrin, Gy = Gynolactose, M = Maus, d = distaler Dünndarm, C = Caecum, R = Rectum) 60

Abb. 30 Die vier möglichen Wege der intestinalen Absorption von Soluten: A = transportervermittelte Aufnahme, B = Transcytose, C = transzelluläre Diffusion, D = parazelluläre Aufnahme 63

Abb. 31 Fluoreszenzmarkierung eines Saccharids mit 2-Aminobenzamid (2-AB) 66

Abb. 32 Mit 2-Aminobenzamid markierte Saccharide nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung unter UV-Licht (L = Lactose, MD = Maltodextrin, NZ = Gesamtfraktion der neutralen Oligosaccharide der Humanmilch, FL = Fucosyllactose, LNT = Lacto-N-tetraose, LNFP = Lacto-N-fucopentaose, LNH = Lacto-N-hexaose, SZ = Gesamtfraktion der sauren Oligosaccharide der Humanmilch, SL = Sialyllactose, LST = Lactosialyltetraose, DS = Disialyllacto-N-tetraose) 67

Abb. 33 MALDI-Spektren der Gesamtfraktion der neutralen Oligosaccharide der Humanmilch vor und nach (*) der Fluoreszenzmarkierung mit 2-Aminobenzamid (FL = Fucosyllactose, DFL = Difucosyllactose, LNT = Lacto-N-tetraose, LNFP = Lacto-N-fucopentaose, LNDFH = Lacto-N-difucosylhexaose, LNH = Lacto-N-hexaose; Summe aus 50 Einzelspektren) 68

Abb. 34 MALDI-Spektren der Gesamtfraktion der sauren Oligosaccharide der Humanmilch vor und nach (*) der Fluoreszenzmarkierung mit 2-Aminobenzamid (SL = Sialyllactose, LST = Lactosialyltetraose, DSLNT = Disialyllacto-N-tetraose; Summe aus 50 Einzelspektren) 68

Abb. 35 Modell der Diffusionskammer zur Untersuchung der Resorptionsvorgänge von Sacchariden an der Zellinie Caco-2 70

Abb. 36 Interzellularspalt zwischen zwei Caco-2 Zellen (ZO = Zonula occludens, ZA = Zonula adherens, D = Desmosom, LS = Lateralspalt, mv = Microvilli; Balkenlänge entspricht 200 nm; aus [1]) 71

Abb. 37 Erscheinungsrate von ^{3}H-Mannitol im basalen Kompartiment nach apikaler Gabe und Inkubation mit Caco-2 Zellen über 30, 60, 90 und 120 Minuten in Ab- oder Anwesenheit von fluoreszenzmarkierten Sacchariden (K = Kontrolle, Lac = Lactose, MD = Maltodextrin, NZ = Gesamtfraktion der neutralen Oligosaccharide der Humanmilch, FL = Fucosyllactose, LNT = Lacto-N-tetraose, LNFP = Lacto-N-fucopentaose, LNH = Lacto-N-hexaose, SZ = Gesamtfraktion der sauren Oligosaccharide der Humanmilch, SL = Sialyllactose, LST = Lactosialyltetraose, DSLNT = Disialyllacto-N-tetraose). Dargestellt sind die Mittelwerte einer Versuchsserie, wobei die Standardabweichungen durchschnittlich bei 9 % lagen. 72

Abb. 38 Erscheinungsrate von ^{3}H-Mannitol im basalen Kompartiment nach apikaler Gabe und Inkubation mit Caco-2 Zellen über 30, 60, 90 und 120 Minuten in Ab- oder Anwesenheit von fluoreszenz- und unmarkierten Sacchariden (K = Kontrolle, Lac = Lactose, MD = Maltodextrin, NZ = Gesamtfraktion der neutralen Oligosaccharide der Humanmilch, FL = Fucosyllactose, LNT = Lacto-N-tetraose, LNFP = Lacto-N-fucopentaose, LNH = Lacto-N-hexaose, SZ = Gesamtfraktion der sauren Oligosaccharide der Humanmilch, SL = Sialyllactose, LST = Lactosialyltetraose, DSLNT = Disialyllacto-N-tetraose). Dargestellt sind die Mittelwerte einer Versuchsserie, wobei die Standardabweichungen durchschnittlich bei 11 % lagen. 73

Abb. 39 Erscheinungsrate von ^{3}H-Mannitol im apikalen Kompartiment nach basaler Gabe und Inkubation mit Caco-2 Zellen über 30, 60, 90 und 120 Minuten in Ab- oder Anwesenheit von fluoreszenzmarkierten Sacchariden. (K = Kontrolle, Lac = Lactose, MD = Maltodextrin, NZ = Gesamtfraktion der neutralen Oligosaccharide der Humanmilch, FL = Fucosyllactose, LNT = Lacto-N-tetraose, LNFP = Lacto-N-fucopentaose, LNH = Lacto-N-hexaose, SZ = Gesamtfraktion der sauren Oligosaccharide der Humanmilch, SL = Sialyllactose, LST = Lactosialyltetraose, DSLNT = Disialyllacto-N-tetraose). Dargestellt sind die Mittelwerte einer Versuchsserie, wobei die Standardabweichungen durchschnittlich bei 8 % lagen. 74

Abb. 40 Vergleich der Erscheinungsraten von 2-Aminobenzamid (2-AB) und ^{3}H-Mannitol im basalen Kompartiment nach apikaler Inkubation von fluoreszenzmarkierten Sacchariden mit Caco-2 Zellen über 2 Stunden (K = Kontrolle, Lac = Lactose, MD = Maltodextrin, NZ = Gesamtfraktion der neutralen Oligosaccharide der Humanmilch, FL = Fucosyllactose, LNT = Lacto-N-tetraose, LNFP = Lacto-N-fucopentaose, LNH = Lacto-N-hexaose, SZ = Gesamtfraktion der sauren Oligosaccharide der Humanmilch, SL = Sialyllactose, LST = Lactosialyltetraose, DSLNT = Disialyllacto-N-tetraose). Dargestellt sind die Mittelwerte einer Versuchsserie, wobei die Standardabweichungen der 2-AB Fluxe durchschnittlich bei 14 % lagen. 76

Abb. 41 Vergleich der Erscheinungsraten von 2-Aminobenzamid (2-AB) und ^{3}H-Mannitol im basalen Kompartiment nach apikaler Inkubation von fluoreszenz- und unmarkierten Sacchariden mit Caco-2 Zellen über 2 Stunden (K = Kontrolle, Lac = Lactose, MD = Maltodextrin, NZ = Gesamtfraktion der neutralen Oligosaccharide der Humanmilch, FL = Fucosyllactose, LNT = Lacto-N-tetraose, LNFP = Lacto-N-fucopentaose, LNH = Lacto-N-hexaose, SZ = Gesamtfraktion der sauren Oligosaccharide der Humanmilch, SL = Sialyllactose, LST = Lactosialyltetraose, DSLNT = Disialyllacto-N-tetraose). Dargestellt sind die Mittelwerte einer Versuchsserie, wobei die Standardabweichungen der 2-AB Fluxe durchschnittlich bei 15 % lagen. 77

Abb. 42 Vergleich der Erscheinungsraten von 2-Aminobenzamid (2-AB) und ^{3}H-Mannitol im apikalen Kompartiment nach basaler Inkubation von fluoreszenzmarkierten Sacchariden mit Caco-2 Zellen über 2 Stunden (K = Kontrolle, Lac = Lactose, MD = Maltodextrin, NZ = Gesamtfraktion der neutralen Oligosaccharide der Humanmilch, FL = Fucosyllactose, LNT = Lacto-N-tetraose, LNFP = Lacto-N-fucopentaose, LNH =Lacto-N-hexaose, SZ = Gesamtfraktion der sauren Oligosaccharide der Humanmilch, SL = Sialyllactose, LST = Lactosialyltetraose, DSLNT = Disialyllacto-N-tetraose). Dargestellt sind die Mittelwerte einer Versuchsserie, wobei die Standardabweichungen der 2-AB Fluxe durchschnittlich bei 9 % lagen. 78

Abb. 43 Dünnschichtchromatographisch aufgetrennte Lactoseproben (fluoreszenz- oder unmarkiert) nach zweistündiger Inkubation mit Caco-2 Zellen (links unter UV-Licht, rechts nach Orcinolfärbung; Std = Standard, Aa = nach apikaler Gabe und Entnahme, Ab = nach apikaler Gabe und basaler Entnahme, AB = 2-Aminobenzamid, Glc = Glucose, Lac = Lactose) 81

Abb. 44 Dünnschichtchromatographisch aufgetrennte Maltodextrinproben (fluoreszenz- oder unmarkiert) nach zweistündiger Inkubation mit Caco-2 Zellen (links unter UV-Licht, rechts nach Orcinolfärbung; Std. = Standard, Aa = nach apikaler Gabe und Entnahme, Ab = nach apikaler Gabe und basaler Entnahme) 82

Abb. 45 Dünnschichtchromatographisch aufgetrennte Proben von neutralen Oligosacchariden der Humanmilch (fluoreszenz- oder unmarkiert) nach zweistündiger Inkubation mit Caco-2 Zellen (links unter UV-Licht, rechts nach Orcinolfärbung; NZ = Gesamtfraktion der neutralen Oligosaccharide der Humanmilch, FL = Fucosyllactose, Std = Standard, Aa = nach apikaler Gabe und Entnahme, Ab = nach apikaler Gabe und basaler Entnahme) 84

Abb. 46 Dünnschichtchromatographisch aufgetrennte Proben von sauren Oligosacchariden der Humanmilch (fluoreszenz- oder unmarkiert) nach zweistündiger Inkubation mit Caco-2 Zellen (links unter UV-Licht, rechts nach Orcinolfärbung; SZ = Gesamtfraktion der sauren Oligosaccharide der Humanmilch, SL = Sialyllactose, Std = Standard, Aa = nach apikaler Gabe und Entnahme, Ab = nach apikaler Gabe und basaler Entnahme) 85

Abb. 47 MALDI-MS Spektren von fluoreszenzmarkierten Maltodextrinproben, vor (oben) und nach (unten) der Inkubation mit Caco-2 Zellen (DP = degree of polymerization, Summe aus 50 Einzelspektren) 87

Abb. 48 MALDI-MS Spektren von neutralen fluoreszenzmarkierten Oligosacchariden der Humanmilch vor (oben) und nach (unten) der Inkubation mit Caco-2 Zellen (* = Markierung mit 2-Aminobenzamid, Summe aus 50 Einzelspektren) 89

Abb. 49 MALDI-MS Spektren von sauren fluoreszenzmarkierten Oligosacchariden der Humanmilch vor (oben) und nach (unten) der Inkubation mit Caco-2 Zellen (* = Markierung mit 2-Aminobenzamid, Summe aus 50 Einzelspektren) 90

Abb. 50 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters im Lebergewebe von Mäusen unter Kontrollbedingungen und nach Gabe von Glucose, Maltodextrin oder Gynolactose nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Anfärbung mit Orcinol (K = Kontrolle, G = Glucose, MD = Maltodextrin, Gy = Gynolactose, M = Maus, L = Leber) 94

Abb. 51 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters im Lebergewebe von Mäusen nach Gabe von Raftilose oder Raftiline nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Anfärbung mit Orcinol (Ro = Raftilose, Ri = Raftiline, M = Maus, L = Leber) 96

Abb. 52 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters im Lebergewebe von Mäusen unter Kontrollbedingungen oder nach Gabe von fluoreszenzmarkiertem Dextran zusammen mit Glucose, Maltodextrin, Gynolactose, Raftilose oder Raftiline nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und unter UV-Licht (K = Kontrolle, G = Glucose, MD = Maltodextrin, Gy = Gynolactose, Ro = Raftilose, Ri = Raftiline, D = fluoreszenzmarkiertes Dextran, L = Leber) 98

Abb. 53 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters der Urinproben von Mäusen nach Gabe von Glucose, Maltodextrin oder Gynolactose sowie entsprechender Standards nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Anfärbung mit Orcinol (G = Glucose, MD = Maltodextrin, Gy = Gynolactose, M = Maus, U = Urin) 100

Abb. 54 Repräsentative Darstellung des Saccharidmusters der Urinproben von Mäusen nach Gabe von Raftilose oder Raftiline sowie entsprechender Standards nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Anfärbung mit Orcinol (Ro = Raftilose, Ri = Raftiline, M = Maus, U = Urin) 102

Abb. 55 Darstellung des Saccharidmusters im Urin von Mäusen nach Gabe von fluoreszenzmarkiertem Dextran zusammen mit Glucose, Maltodextrin, Gynolactose, Raftilose oder Raftiline nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung und unter UV-Licht (G = Glucose, MD = Maltodextrin, Gy = Gynolactose, Ro = Raftilose, Ri = Raftiline, D = fluoreszenzmarkiertes Dextran, U = Urin) 103

Abb. 56 Schematische Darstellung einer Dünndarmzotte 107

Abb. 57 Schematische Darstellung einer Dickdarmkrypte 109

Abb. 58 Mögliche “Schicksale” einer Darmepithelzelle nach Exposition gegenüber Oligosacchariden der Humanmilch 110

Abb. 59 Bestimmung der Zahl vitaler Zellen und der Gesamtzellzahl mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SYTOX Green 111

Abb. 60 Standardkurven zur Zellzahlbestimmung von Caco-2 und HT-29 112

Abb. 61 Einfluß von Muttermilchfiltrat auf die Proliferation von HT-29 Zellen in Gegenwart von 10 % fötalem Kälberserum (links: Milch der 3. Laktationswoche, rechts: Milch des 4. Laktationsmonats; Angaben in Volumenprozent, K = Kontrolle, Q = 150 µM Quercetin; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 12 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 % sowie die EC_{50}-Werte) 113

Abb. 62 Einfluß von fötalem Kälberserum und Milchfiltraten auf die Proliferation von HT-29 Zellen (links: Zugabe von fötalem Kälberserum, rechts: Zugabe von Mutter- bzw. Kuhmilch in Gegenwart von 0,1 % fötalem Kälberserum; S = fötales Kälberserum, M = reife Muttermilch, K = pasteurisierte Kuhmilch; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 8 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 %) 114

Abb. 63 Einfluß von Lactose (links) und Oligosacchariden der Humanmilch (rechts) auf die Proliferation von Caco-2 (rote Balken) und HT-29 Zellen (graue Balken) nach Inkubation über 72 Stunden (K = Kontrolle, Q = 150 µM Quercetin; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 8 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 %) 115

Abb. 64 Einfluß von neutralen (links) und höhermolekularen Oligosacchariden der Humanmilch (rechts) auf die Proliferationsrate von Caco-2 (rote Balken) und HT-29 Zellen (graue Balken) nach Inkubation über 72 Stunden (K = Kontrolle, Q = 150 µM Quercetin; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 8 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 %) 115

Abb. 65 Einfluß von sauren Oligosacchariden der Humanmilch auf die Proliferation von Caco-2 (rote Balken) und HT-29 Zellen (graue Balken) nach Inkubation über 72 Stunden (K = Kontrolle, Q = 150 µM Quercetin; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 8 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 %) 116

Abb. 66 Einfluß von Sialyllactose (SL) und Disialyllacto-N-tetraose (DSLNT) auf die Proliferation von Caco-2 (rote Balken) und HT-29 Zellen (graue Balken) nach Inkubation über 72 Stunden (K = Kontrolle, Q = 150 µM Quercetin; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 8 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 %) 117

Abb. 67 Einfluß von Lactulose, Raftilose und Rafiline auf die Proliferation von HT-29 Zellen (graue Balken) nach Inkubation über 72 Stunden (K = Kontrolle, Q = 150 µM Quercetin; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 8 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 %) 117

Abb. 68 Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase mit Hilfe des Substrats Fluoreszeindiphosphat 119

Abb. 69 Bestimmung der Aktivität des Apoptosemarkers CPP-32 mit Hilfe eines cumarinhaltigen Substrats 120

Abb. 70 Aktivität der alkalischen Phosphatase von HT-29 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen über 72 Stunden. Links dargestellt als Fluoreszenzfreisetzung pro Minute, rechts bezogen auf 10^6 Zellen (K = Kontrolle, B = Butyrat [2,5 mM], NZ = neutrale Oligosaccharide der Humanmilch [1,0 g/l], SZ = saure Oligosaccharide der Humanmilch [0,5 g/l], SL = Sialyllactose [0,25 g/l], DS = Disialyllacto-N-tetraose [0,25 g/l], NA = N-Acetylneuraminsäure [0,08 g/l], Ro = Raftilose [20 g/l], Ri = Raftiline [20 g/l]; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 6 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 %) 121

Abb. 71 Aktivität der alkalischen Phosphatase von Caco-2 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen über 72 Stunden. Links dargestellt als Fluoreszenzfreisetzung pro Minute, rechts bezogen auf 10^6 Zellen (K = Kontrolle, B = Butyrat [2,5 mM], NZ = neutrale Oligosaccharide der Humanmilch [1,0 g/l], SZ = saure Oligo-saccharide der Humanmilch [0,5 g/l], SL = Sialyllactose [0,25 g/l], DS = Disialyllacto-N-tetraose [0,25 g/l]; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 6 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 %) 122

Abb. 72 Aktivität des CPP-32 von HT-29 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen über 24 Stunden. Links dargestellt als Fluoreszenzfreisetzung pro Minute, rechts bezogen auf 10^6 Zellen (K = Kontrolle, C = Camptothecin [50 µM], SL = Sialyllactose [0,5 g/l], DSLNT = Disialyllacto-N-tetraose [0,5 g/l l; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 6 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 %) 123

Abb. 73 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Inkubation von FITC-markierten E. coli mit Typ 1-Fimbrien und Bürstensaummembranen aus Schweinedünndarm in Abwesenheit (links) und in Gegenwart (rechts) von neutralen Oligosacchariden der Humanmilch (Konzentration 5 g/l) 129

Abb. 74 Schematische Darstellung des Zellkulturmodells zur Bestimmung der anti-adhäsiven Aktivität von freien und gebundenen Oligosacchariden (CFU = Anzahl der koloniformenden Einheiten, EPEC = enteropathogene E. coli, EHEC = enterohaemorrhagische E. coli) 132

Abb. 75 Caco-2 Zellen nach Inkubation mit EHEC 413/89-1 (Markierung der Aktinfilamente mit Phalloidin-FITC, Markierung der Bakterien mit Maus-Anti-413/89 und Anti-Maus-CY3) 133

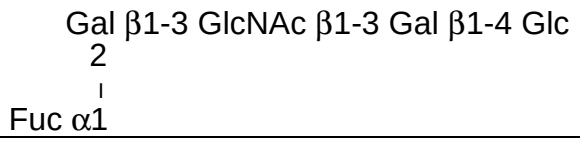
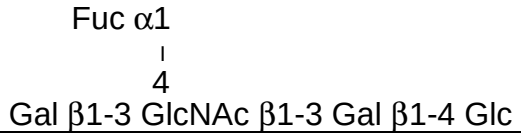
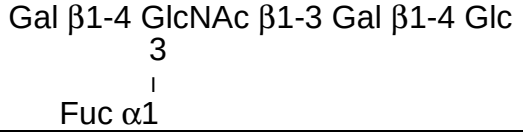
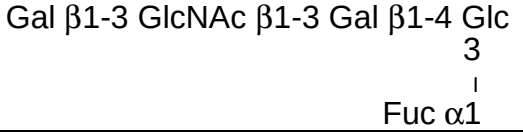
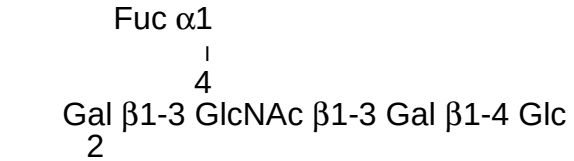
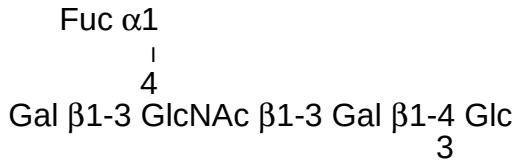
Abb. 76 Anzahl der koloniformenden Einheiten (CFU) nach Ausplattierung von enteropathogenen (EPEC) und enterohaemorrhagischen E. coli (EHEC) nach Vorinkubation mit verschiedenen Oligosacchariden und dreistündiger Exposition gegenüber Caco-2 Zellen (K = Kontrolle ohne Saccharidzusatz, LNFP = Lacto-N-fucopentaose, LST = Lactosialyltetraose; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 4 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 %) 134

Abb. 77 Anzahl der koloniformenden Einheiten (CFU) nach Ausplattierung von enteropathogenen (EPEC) und enterohaemorrhagischen E. coli (EHEC) nach Vorinkubation mit Glykomakropeptid (GMP) und dreistündiger Inkubation mit Caco-2 Zellen (K = Kontrolle ohne Saccharidzusatz; dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 4 Versuchen; * = signifikant zum Niveau 5 %) 135

3.4 Strukturen ausgewählter Oligosaccharide der Humanmilch

Tabelle 4: Bezeichnungen und Strukturen der für diese Arbeit wesentlichen Oligosaccharide der Humanmilch (Fuc = Fucose, Gal = Galactose, Glc = Glucose, GlcNAc = N-Acetyl-glucosamin, NANA = N-Acetylneuraminsäure); Kurzschreibweise aus [10]

Kurz-Schreibweisen	Trivialname	Struktur
L0/1-0 2'-FL	2'-Fucosyllactose	Fuc α1-2 Gal β1-4 Glc
L0/1-0 3-FL	3-Fucosyllactose	Gal β1-4 Glc 3 I Fuc α1
L0/2-0 DFL	Difucosyllactose	Fuc α1-2 Gal β1-4 Glc 3 I Fuc α1
L1/0-0 LNT	Lacto-N-tetraose	Gal β1-3 GlcNAc β1-3 Gal β1-4 Glc
L1/0-0 LNnT	Lacto-N-neotetraose	Gal β1-4 GlcNAc β1-3 Gal β1-4 Glc

Kurz-Schreibweisen	Trivialname	Struktur
L1/1-0 LNFP I	Lacto-N-fucopentaose I	
L1/1-0 LNFP II	Lacto-N-fucopentaose II	
L1/1-0 LNFP III	Lacto-N-fucopentaose III	
L1/1-0 LNFP V	Lacto-N-fucopentaose V	
L1/2-0 LNDFH I	Lacto-N-difucohexaose I	
L1/2-0 LNDFH II	Lacto-N-difucohexaose II	

Kurz-Schreibweisen	Trivialname	Struktur
L2/0-0 LNH	para-Lacto-N-hexaose	Gal β1-3 GlcNAc β1-3 Gal β1-4 GlcNAc β1-3 Gal β1-4 Glc
L2/0-0 LNH	Lacto-N-hexaose	Gal β1-4 GlcNAc β1-6 Gal β1-3 GlcNAc β1-3 Gal β1-4 Glc
L2/0-0 LNnH	para-Lacto-N-neohexaose	Gal β1-4 GlcNAc β1-3 Gal β1-4 GlcNAc β1-3 Gal β1-4 Glc
L2/0-0 LNnH	Lacto-N-neohexaose	Gal β1-4 GlcNAc β1-6 Gal β1-4 GlcNAc β1-3 Gal β1-4 Glc

Kurz-Schreibweisen	Trivialname	Struktur
L0/0-1 3'-SL	3'-Sialyllactose	NANA α2-3 Gal β1-4 Glc
L0/0-1 6'-SL	6'-Sialyllactose	NANA α2 | 6 Gal β1-4 Glc
L0/1-1 3'-S,3-FL	3'-Sialyl- 3-fucosyllactose	NANA α2-3 Gal β1-4 Glc 3 | Fuc α1
L1/0-1 LST a	Lactosialyltetraose a	Gal β1-3 GlcNAc β1-3 Gal β1-4 Glc 3 | NANA α2
L1/0-1 LST b	Lactosialyltetraose b	NANA α2 | 6 Gal β1-3 GlcNAc β1-3 Gal β1-4 Glc
L1/0-1 LST c	Lactosialyltetraose c	NANA α2 | 6 Gal β1-3 GlcNAc β1-3 Gal β1-4 Glc
L1/0-2 DSLNT	Disialyllacto-N- tetraose	NANA α2 | 6 Gal β1-3 GlcNAc β1-3 Gal β1-4 Glc 3 | NANA α2

4 Literaturverzeichnis

1 Adson A, Raub TJ, Burton PS, Barsuhn CL, Hilgers AR, Audus KL, Ho NF. Quantitative approaches to delineate paracellular diffusion in cultured epithelial cell monolayers. Journal of Pharmaceutical Sciences, 83, 1529-36, 1994

2 Allen JC, Keller RP, Archer P, Neville MC. Studies in human lactation: milk composition and daily secretion rates of macronutrients in the first year of lactation. American Journal of Clinical Nutrition, 54, 69-80, 1991

3 Anderson JW, Johnstone BM, Remley DT. Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. American Journal of Clinical Nutrition, 70, 525-35, 1999

4 Andersson B, Porras O, Hanson LA, Lagergard T, Svanborg-Edén C. Inhibition of attachment of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae by human milk and receptor oligosaccharides. The Journal of Infectious Diseases, 153, 232-7, 1986

5 Aniansson G, Alm B, Andersson B, Hakansson A, Larsson P, Nylen O, Peterson H, Rigner P, Svanborg M, Sabharwal H et al. A prospective cohort study on breast-feeding and otitis media in Swedish infants. Pediatric Infectious Disease Journal, 13, 183-8, 1994

6 Artursson P, Borchardt RT. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. Pharmaceutical Research, 14, 1655-8, 1997

7 Ashkenazi S, Newburg DS, Cleary TG. The effect of human milk on the adherence of entero-hemorrhagic E. coli to rabbit intestinal cells. In: Mestecky J, ed. Immunology of Milk and the Neonate, 173-7, Plenum Press, New York, 1991

8 Atisook K, Madara JL. An oligopeptide permeates intestinal tight junctions at glucose-elicited dilatations. Gastroenterology, 100, 719-24, 1991

9 Bach Knudsen KE, Hessov I. Recovery of inulin from Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.) in the small intestine of man. British Journal of Nutrition, 74, 101-13, 1995

10 Bahr U, Karas M. Differentiation of 'isobaric' peptides and human milk oligosaccharides by exact mass measurements using electrospray ionization orthogonal time-of-flight analysis. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 13,1052-8, 1999

11 Bahr U, Karas M, Hillenkamp F. Analysis of biopolymers by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 348, 783-91, 1994

12 Bailey D, Davies MJ, Routier FH, Bauer C, Feeney J, Hounsell EF. 1H NMR analysis of novel sialylated and fucosylated lactose-based oligosaccharides having linear GlcNAc(β1-6)Gal and Neu5Ac(α2-6)GlcNAc sequences. Carbohydrate Research, 300, 289-300, 1997

13 Ballard ST, Hunter JH, Taylor AE. Regulation of tight-junction permeability during nutrient absorption across the intestinal epithelium. Annual Review of Nutrition, 15, 35-55, 1995

14 Barr RG, Hanley J, Patterson DK, Woolridge J. Breath hydrogen excretion in normal newborn infants in response to usual feeding patterns: evidence for "functional lactase insufficiency" beyond the first month of life. Journal of Pediatrics, 104, 527-33, 1984

15 Basson MD, Emenaker NJ, Hong F. Differential modulation of human (Caco-2) colon cancer cell line phenotype by short chain fatty acids. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 217, 476-83, 1998

16 Beaudry M, Dufour R, Marcoux S. Relation between infant feeding and infections during the first six months of life. Journal of Pediatrics, 126, 191-7, 1995

17 Bezerra JA, Thompson SH, Morse M, Koldovsky O, Udall JN Jr. Intestinal permeability to intact lactose in newborns and adults. Biology of the Neonate, 58, 334-42, 1990

18 Birch EE, Hoffman DR, Uauy R, Birch DG, Prestidge C. Visual acuity and the essentiality of docosahexaenoic acid and arachidonic acid in the diet of term infants. Pediatric Research, 44, 201-9, 1998

19 Boulenc X. Intestinal cell models: their use in evaluating the metabolism and absorption of xenobiotics. S.T.P. Pharma Sciences, 7, 259-69, 1997

20 Brand-Miller JC, McVeagh P, McNeil Y, Messer M. Digestion of human milk oligosaccharides by healthy infants evaluated by the lactulose hydrogen breath test. Journal of Pediatrics, 133, 95-8, 1998

21 Brand Miller J, Bull S, Miller J, McVeagh P. The oligosaccharide composition of human milk: temporal and individual variations in monosaccharide components. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 19, 371-6, 1994

22 Carlson SE. N-Acetylneuraminic acid concentrations in human milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation. American Journal of Clinical Nutrition, 41, 720-6, 1985

23 Catassi C, Bonucci A, Coppa GV, Carlucci A, Giorgi PL. Intestinal permeability during the first month: effect of natural versus artificial feeding. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 21, 383-6, 1995

24 Charlwood J, Tolson D, Dwek M, Camilleri P. A detailed analysis of neutral and acidic carbohydrates in human milk. Analytical Biochemistry, 273, 261-77, 1999

25 Chaturvedi P, Sharma CB. Goat milk oligosaccharides: purification and characterization by HPLC and high-field 1H-NMR spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta, 967, 115-21, 1988

26 Chaturvedi P, Warren CD, Ruiz-Palacios G, Pickering LK, Newburg DS. Milk oligosaccharide pofiles by reversed-phase HPLC of their perbenzoylated derivatives. Analytical Biochemistry, 251, 89-97, 1997

27 Chierici R, Sawatzki G, Thurl S, Tovar K, Vigi V. Experimental milk formulae with reduced protein content and desialylated milk proteins: influence on the faecal flora and the growth of term newborn infants. Acta Paediatrica, 86, 557-63, 1997

28 Ciesielski MJ, Fenstermaker RA. Synergistic cytotoxicity, apoptosis and protein-linked DNA breakage by etoposide and camptothecin in human U87 glioma cells: dependence on tyrosine phosphorylation. Journal of Neurooncology, 41, 223-34, 1999

29 Clemens J, Elyazeed RE, Rao M, Savarino S, Morsy BZ, Kim Y, Wierzba T, Naficy A, Lee YJ. Early initiation of breastfeeding and the risk of infant diarrhea in rural Egypt. Pediatrics, 104, E3, 1999

30 Cogburn JN, Donovan MG, Schasteen CS. A model of human small intestinal absorptive cells. 1. Transport barrier. Pharmaceutical Research, 8, 210-6, 1991

31 Coppa GV, Gabrielli O, Giorgi P, Catassi C, Montanari MP, Varaldo PE, Nichols BL. Preliminary study of breastfeeding and bacterial adhesion to uroepithelial cells. The Lancet, 335, 569-71, 1990

32 Coppa GV, Gabrielli O, Pierani P, Carlucci A, Giorgi PL. Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. Pediatrics, 91, 637-41, 1993

33 Coppa GV, Gabrielli O, Pierani P, Giorgi PL. Oligosaccharides in human milk and their role in bacterial adhesion. In: Renner B, Sawatzki G, eds. New perspectives in infant nutrition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 43-9, 1993

34 Coppa GV, Pierani P, Zampini L, Carloni I, Carlucci A, Gabrielli O. Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. Acta Paediatrica, Suppl. 430, 89-94, 1999

35 Crane JK, Azar SS, Stam A, Newburg DS. Oligosaccharides form human milk block binding and activity of the Escherichia coli heat stable enterotoxon (STa) in the T84 intestinal cells. Journal of Nutrition, 124, 2358-64, 1994

36 Cravioto A, Tello A, Villafán H, Ruiz J, del Vedovo S, Neeser JR. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to Hep-2 Cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. The Journal of Infectious Diseases, 1247-55, 1991

37 Crisp EA, Czolij R, Messer M. Absence of β-galactosidase (lactase) activity from intestinal brush borders of suckling macropods: implications for mechanism of lactose absorption. Comparitive Biochemistry and Physiology, B 88, 923-7, 1987

38 Cummings JH, Roberfroid MB et al. A new look at dietary carbohydrates: chemistry, physiology and health. European Journal of Clinical Nutrition, 51, 417-23, 1997

39 Darragh AJ, Moughan PJ. The three-week-old piglet as a model animal for studying protein digestion in human infants. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 21, 387-93, 1995

40 Dejana E, Cordada M, Lampugnani MG. Endothelial cell-to-cell junctions. FASEB Journal, 9, 910-8, 1995

41 Delie F, Rubas W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: Advantages and limitations of the Caco-2 model. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 14, 221-86, 1997

42 Den Tandt WR, Adriaenssens K, Scharpé S. Characteristics of human intestinal acid sialidase. Enzyme, 37, 155-8, 1987

43 Dewit O, Dibba B, Prentice A. Breast-milk amylase activity in English and Gambian mothers: effects of prolonged lactation, maternal parity, and individual variations. Pediatric Research, 28, 502-6, 1990

44 Dickson JJ, Messer M. Intestinal neuraminidase activity of suckling rats and other mammals. Biochemical Journal, 170, 407-13, 1978

45 Donald AS, Feeney L. Separation of human milk oligosaccharides by recycling chromatography. First isolation of lacto-N-neo-difucohexaose II and 3'-Galactosyllactose from this source. Carbohydrate Research, 178, 79-91, 1988

46 Douwes AC, Oosterkamp RF, Fernandes J, Los T, Jongbloed AA. Sugar malabsorption in healthy neonates estimated by breath hydrogen. Archives of Disease in Childhood, 55, 512-5, 1980

47 Dubey UK, Mistry VV. Effect of bifidogenic factors on growth characteristics of bifidobacteria in infant formula. Journal of Dairy Science, 79, 1156-63, 1996

48 Duffy LC, Faden H, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D. Exclusive breastfeeding protects against bacterial colonization and day care exposure to otitis media. Pediatrics, 100, E7, 1997

49 Egge H. The diversity of oligosaccharides in human milk. In: Renner B, Sawatzki G, eds. New perspectives in infant nutrition. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 12-26, 1993

50 Erney RM, Malone WT, Skelding MB et al. Variability of human milk neutral oligosaccharides in a diverse population. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 30, 181-92, 2000

51 Fiat AM, Chevan J, Jollès P, De Waard P, Vliegenhart JFG, Piller F, Cartron JP. Structural variability of the neutral carbohydrate moiety of cow colostrum κ-casein as a function of time after parturtition. European Journal of Biochemistry, 173, 253-9, 1988

52 Fiat AM, Jollès P. Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: structural and physiological aspects. Molecular and Cellular Biochemistry, 87, 5-30, 1989

53 Finke B, Stahl B, Karas M, Daniel H, Sawatzki G. Analysis of high-molecular-weight oligosaccharides from human milk by liquid chromatography and MALDI-MS. Analytical Chemistry, 71, 3755-62, 1999

54 Fogh J, Trempe G. New human tumor cell lines. In: Fogh J, ed. Human tumor cells in vitro, Plenum Press, New York, 115-41, 1975

55 Fröleke H. Die Ernährung des Säuglings. In: Fröleke H, Günster KH, eds. Alters- und leistungsabhängige Ernährung, Pädagogischer Verlag, Baltmannsweiler, 11-42, 1989

56 Fuller R, Gibson GR. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 32, Suppl. 222, 28-31, 1997

57 Gardner ML. Gastrointestinal absorption of intact proteins. Annual Review of Nutrition, 8, 329-50, 1988

58 Gebert A, Rothkotter HJ, Pabst R. M cells in Peyer's patches of the intestine. International Review of Cytology, 167, 91-159, 1996

59 Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition, 125, 1401-12, 1995

60 Gibson PR, Rosella O, Wilson AJ, Mariadason JM, Rickard K, Byron K, Barkla DH. Colonic epithelial cell activation and the paradoxical effects of butyrate. Carcinogenesis, 20, 539-44, 1999

61 Goldman AS, Chheda S, Garofalo R. Evolution of immunologic functions of the mammary gland and the postnatal development of immunity. Pediatric Research, 43, 155-62, 1998

62 Gordon AE, Saadi AT, MacKenzie DA, James VS, Elton RA, Weir DM, Busuttil A, Blackwell CC. The protective effect of breast feeding in relation to sudden infant death syndrome (SIDS): II. The effect of human milk and infant formula preparations on binding of Clostridium perfringens to epithelial cells. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 25, 167-73, 1999

63 Greenwell P. Blood group antigens: molecules seeking a function ? Glycoconjugate Journal, 14, 159-73, 1997

64 Grüttner R, Schöch G. Ernährung von Neugeborenen und Säuglingen. In: Bachmann KD, Ewerbeck H, Kleihauer E, Rossi E, Stalder G, eds. Pädiatrie in Praxis und Klinik, Band I, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 497-507, 1989

65 György P. Effect of carbohydrates on intestinal flora. In: Sipple HL, McNutt KW, eds. Sugars in Nutrition, Academic Press, New York, 215-26, 1974

66 György P. The uniqueness of human milk - Biochemical aspects. American Journal of Clinical Nutrition, 24, 970-5, 1971

67 Hacker J. Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of Escherichia coli infections. Canadian Journal of Microbiology, 38, 720-7, 1992

68 Hakansson A, Zhivotovsky B, Orrenius S, Sabharwal H, Svanborg C. Apoptosis induced by a human milk protein. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92, 8064-8, 1995

69 Hallgren P, Lindberg BS, Lundblad A. Quantitation of some urinary oligosaccharides during pregnancy and lactation. The Journal of Biological Chemistry, 252, 1034-40, 1977

70 Hamosh M. Enzymes in milk: Their function in the mammary gland, in milk, and in the infant. In: Hanson LA, ed. Biology of Human Milk, Nestlé Nutrition Workshop Series 15, Raven Press, New York, 45-62, 1988

71 Hamosh M. Nutrition during lactation. In: Porrini M, Walter P, eds. Bibliotheca Nutritio Dieta, No. 53, Nutrition in Pregnancy and Growth, S. Karger AG, Basel, 23-36, 1996

72 Hanson LA, Ahlstedt S, Andersson B, Carlsson B, Fällström SP, Mellander L, Porras O, Söderström T, Svanborg-Edén C. Protective factors in milk and the development of the immune system. Pediatrics, 75 (Suppl.), 172-6, 1985

73 Hanson LA, Carlsson B, Jalil F, Hahn-Zoric M, Hermodson S, Karlberg J, Mellander L, Khan SR, Lindblad B, Thiringer K, Zaman S. Antiviral and antibacterial factors in human milk. Biology of the Neonate, 15, 141-57, 1988

74 Harvey DJ. Quantitative aspects of the matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of complex oligosaccharides. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 7, 614-9, 1993

75 Heitlinger LA, Lee PC, Dillon WP, Lebenthal E. Mammary amylase: a possible alternate pathway of carbohydrate digestion in infancy. Pediatric Research, 17, 15-8, 1983

76 Heyman M, Desjeux JF. Significance of intestinal food protein transport. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 15, 48-57, 1992

77 Hokama T, Sakamoto R, Yara A, Asato Y, Takamine F, Itokazu K. Incidence of Haemophilus influenza in the throats of healthy infants with different feeding methods. Pediatrics International, 41, 277-80, 1999

78 Hopfer U, Nelson K, Perotto J, Isselbacher KJ. Glucose transport in isolated brush border membrane from rat intestine. Journal of Biological Chemistry, 248, 25-32, 1973

79 Horiuchi T, Kurokawa T. New enzymatic endpoint assay of serum sialic acid. Clinica et Chimica Acta, 182, 117-22, 1989

80 Horiuchi T, Suzuki T, Hiruma M, Saito N. Purification and characterization of L-fucose (L-galactose) dehydrogenase from Pseudomonas sp. No. 1143. Agriculture, Biology and Chemistry, 53, 1493-1501, 1989

81 Hosomi O, Takeya A. The relationship between the (beta 1-3) N-acetyl-glucosaminyltransferase and the presence of oligosaccharides containing lacto-N-triose II structure in bovine and human milk. Japanese Journal of Veterinary Sciences, 51, 1-6, 1989

82 Howie PW, Forsyth JS, Ogston SA, Clark A, Florey CD. Protective effect of breast feeding against infections. British Medical Journal, 300, 11-6, 1990

83 Hydro Agri Dülmen GmbH, ed. Faustzahlen für Landwirtschaft und Gartenbau. Landwirtschaftsverlag, Münster-Hiltrup, 1993

84 Karlsson KA. Glycobiology: a growing field for drug design. Trends in Physiological Sciences, 12, 265-72, 1991

85 Karlsson KA. Microbial recognition of target-cell glycoconjugates. Current Opinion in Structural Biology, 5, 622-35, 1995

86 Kitagawa H, Nakada H, Numata Y, Kurosaka A, Fukui S et al. Occurence of tetra- and pentasaccharides with the sialyl-Le(a) structure in human milk. Journal of Biological Chemistry, 265, 4859-62, 1990

87 Kobata A, Yamashita K, Tachibana Y. Oligosaccharides from human milk. In: Ginsburg V, ed. Methods in Enzymology, Vol. 50, Complex Carbohydrates (Part C), 216-20, 1978

88 Kobata A. Isolation of oligosaccharides from human milk. In: Ginsburg V, ed. Methods in Enzymology, Vol. 28, Complex Carbohydrates (Part B), 262-71, 1972

89 Kobata A. Structural changes induced in the sugar chains of glycoproteins by malignant transformation of producing cells and their clinical application. Biochimie, 70, 1575-85, 1988

90 Kobata A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. European Journal of Biochemistry, 209, 483-501, 1992

91 Kuhn NJ, Carrick DT, Wilde CJ. Lactose synthesis: the possibilities of regulation. Journal of Dairy Science, 63, 328-36, 1980

92 Kunz C. Oligosaccharide, Proteine und Glykoproteine in Frauenmilch und im Urin von Frühgeborenen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1994

93 Kunz C, Rudloff S. Biological functions of oligosaccharides in human milk. Acta Paediatrica, 82, 903-12, 1993

94 Kunz C, Rudloff S. Strukturelle und funktionelle Aspekte von Oligosacchariden in Frauenmilch. Zeitschrift für Ernährungswissenschaft, 35, 22-31, 1996

95 Kunz C, Rudloff S, Schad W, Braun D. Lactose-derived oligosaccharides in the milk of elephants: comparison with human milk. British Journal of Nutrition, 82, 391-9, 1999

96 Kuo SM. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. Cancer Letters, 110, 41-8, 1996

97 Langhendries JP, Detry J, Van Hees J, Lamboray JM, Darimont J, Mozin MJ, Secretin MC, Senterre J. Effect of a fermented infant formula containing viable Bifidobacteria on the fecal flora composition and pH of healthy full-term infants. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 21, 177-81, 1995

98 Lebenthal E, Hatch TF, Lee PC. Development of disaccharidase in premature, small-for-gestational-age and full-term infants. In: Lebenthal E, ed. Textbook of Gastroenterology and Nutrition in Infancy, Vol. I, Gastrointestinal Development and Perinatal Nutrition, Raven Press, New York, 413-22, 1981

99 Lentze MJ. Ernährung des Neugeborenen, des Säuglings und des Kleinkindes. In: Schulte FJ, Spranger J, eds. Lehrbuch der Kinderheilkunde, G. Fischer Verlag, Stuttgart, 75-81, 1993

100 Lifschitz CH, O'Brian Smith E, Garza C. Delayed complete functional lactase sufficiency in breast-fed infants. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2, 478-82, 1983

101 Lis H, Sharon N. Protein glycosylation: Structural and functional aspects. European Journal of Biochemistry, 218, 1-27, 1993

102 Lönnerdal B. Effects of milk and milk components on calcium, magnesium, and trace element absorption during infancy. Physiological Reviews, 77, 643-69, 1997

103 Lönnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. Annual Review of Nutrition, 15, 93-110, 1995

104 Lücke H, Haase W, Murer H. Amino acid transport in brush border membrane vesicles isolated from human small intestine. Biochemical Journal, 168, 529-32, 1977

105 Lundblad A, Chester MA. Blood group active haptens in urine and faeces. In: Wu AM, ed. Advances in Experimental Biology and Medicine, Vol. 228, The molecular immunology of complex carbohydrates, Plenum Press, New York, 73-81, 1988

106 Lundblad A. Oligosaccharides from human urine. In: Ginsburg V, ed. Methods in Enzymology, Vol. 50, Complex carbohydrates (Part C), 226-36,1978

107 Lundblad A. The persistence of milk oligosaccharides in the gastrointestinal tract of infants. In: Renner B, Sawatzki G, eds. New perspectives in infant nutrition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 66-73, 1993

108 Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. American Journal of Clinical Nutrition, 69, 1035S-45S, 1999

109 Mahmood DA, Feachem RG, Huttly SR. Infant feeding and risk of severe diarrhoe in Basrah city, Iraq: a case-control study. Bulletin of the World Health Organization, 67, 701-6, 1989

110 Mathers JC. Digestion of non-starch polysaccharides by non-ruminant omnivores. Proceedings of the Nutrition Society, 50, 161-72, 1991

111 Matsuda T, Nakamura R, Nakashima I, Hasegawa Y, Shimokata K. Human IgE antibody to the carbohydrate-containing third domain of chicken ovomucoid. Biochemical and Biophysical Research Communications, 129, 505-10, 1985

112 McVeagh P, Brand Miller J. Human milk oligosaccharides: Only the breast. Journal of Pediatrics and Child Health, 33, 281-6, 1997

113 Messer M, Nicholas KR. Biosynthesis of marsupial milk oligosaccharides: characterization and developmental changes of two galactosyltransferases in lactating mammary glands of the tammar wallaby, Macropus eugenii. Biochimica et Biophysica Acta, 1077, 79-85, 1991

114 Mizuma T, Awazu S. Intestinal Na+/glucose cotransporter-mediated transport of glucose conjugate formed from disaccharide conjugate. Biochimica et Biophysica Acta, 1379, 1-6, 1998

115 Mollé D, Léonil J. Heterogenity of the bovine k-casein caseinomacropeptide, resolved by liquid chromatography on-line with electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 708, 223-30, 1995

116 Montreuil J. The saga of human milk gynolactose. In: Renner B, Sawatzki G, eds. New perspectives in infant nutrition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 3-11, 1993

117 Moscarello MA, Mitranic MM, Vella G. Stimulation of bovine milk galactosyltransferase activity by bovine colostrum N-acetylglucosaminyltransferase I. Biochimica et Biophysica Acta, 831, 192-200, 1985

118 Nakamura T, Urashima T, Nakagawa M, Saito T. Sialyllactose occurs as free lactones in ovine colostrum. Biochimica et Biophysica Acta, 1381, 286-92, 1998

119 Nakhla T, Fu D, Brodsky NL, Hurt H. Neutral oligosaccharide content of preterm human milk. British Journal of Nutrition, 82, 361-7, 1999

120 Neville MC, Allen JC, Archer PC, Casey CE, Seacat J, Keller RP, Lutes V, Rasbach J, Neifert M. Studies in human lactation: milk volume and composition during weaning and lactogenesis. American Journal of Clinical Nutrition, 54, 81-92, 1991

121 Newburg DS, Pickering LK, McCluer RH, Cleary TG. Fucosylated oligosaccharides of human milk protect suckling mice from heat-stable enterotoxin of Escherichia coli . Journal of Infectious Diseases, 162, 1075-80, 1990

122 Newburg DS. Do the binding properties of oligosaccharides in milk protect human infants from gastrointestinal bacteria ? Journal of Nutrition, 127, 980S-4S, 1997

123 Newburg DS. Human milk glycoconjugates that inhibit pathogens. Current Medicinal Chemistry, 6, 117-27, 1999

124 Newburg DS. Oligosaccharides and glycoconjugates in human milk: their role in host defense. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 1, 271-83, 1996

125 Nicholas KR. Asynchronous dual lactation in a marsupial, the tammar wallaby (Macropus eugenii). Biochemical and Biophysical Research Communications, 154, 529-36, 1988

126 Nommsen LA, Lovelady CA, Heinig MJ, Lönnerdal B, Dewey KG. Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: the DARLING Study. American Journal of Clinical Nutrition, 53, 457-65, 1991

127 Oddy WH, Holt PG, Sly PD, Read AW, Landau LI, Stanley FJ, Kendall GE, Burton PR. Association between breast feeding and asthma in 6 year old children: findings of a prospective birth cohort study. British Medical Journal, 319, 815-9, 1999

128 O'Rourke M, Shi X, Gisolfi C, Schedl H. Effect of absorption of D-glucose and water on paracellular transport in rat duodenum-jejunum. American Journal of Medical Sciences, 309, 146-51, 1995

129 Pappenheimer JR, Dahl CE, Karnovsky ML, Maggio JE. Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D amino acids. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91, 1942-5, 1994

130 Parkkinen J, Finne J. Isolation of sialyl oligosaccharides and sialyl oligosaccharide phosphates from bovine colostrum and human urine. In: Ginsburg V, ed. Methods in Enzymology, Vol. 138, Complex Carbohydrates (Part E), 289-300, 1987

131 Pfenninger A, Karas M, Finke B, Sawatzki G. Matrix optimization for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of oligosaccharides from human milk. Journal of Mass Spectrometry, 34, 98-104, 1999

132 Pisacane A, Graziano L, Zona G, Granata G, Dolezalova H, Cafiero M, Coppola A, Scarpellino B, Ummarino M, Mazzarella G. Breast feeding and acute lower respiratory infections. Acta Paediatrica, 83, 714-8, 1994

133 Piscane A, Graziano L, Mazzarella G, Scarpellino B, Zona G. Breast-feeding and urinary tract infection. Journal of Pediatrics, 120, 87-9, 1992

134 Playford RJ, Floyd DN, Macdonald CE, Calnan P, Adenekan RO, Johnson W, Goodlad RA, Marchbank T. Bovine colostrum is a health food supplement which prevents NSAID induced gut damage. Gut, 44, 653-8, 1999

135 Raibaud P. Factors controlling the bacterial colonization of the neonatal intestine. In: Hanson LA, ed. Biology of Human Milk, Nestlé Nutrition Workshop Series 15, Raven Press, New York, 205-19, 1988

136 Reynolds S, Rajagopal S, Chakrabarty S. Differentiation-inducing effect of retinoic acid, difluoromethylornithine, sodium butyrate and sodium suramin in human colon cancer cells. Cancer Letters, 134, 53-60, 1998

137 Rhodes JM, Gallimore R, Elias E, Allan RN, Kennedy JF. Faecal mucus degrading glycosidases in ulcerative colitis and Crohn's disease. Gut, 26, 761-5, 1985

138 Roberts AK, Chierici R, Sawatzki G, Hill MJ, Volpato S, Vigi V. Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin: 1. Effect on the infant faecal flora. Acta Paediatrica, 81, 119-24, 1992

139 Rubaltelli FF, Biadaioli R, Pecile P, Nicoletti P. Intestinal flora in breast- and bottle-fed infants. Journal of Perinatal Medicine, 26, 186-91, 1998

140 Rudloff S, Pohlentz G, Diekmann L, Egge H, Kunz C. Urinary excretion of lactose and oligosaccharides in preterm infants fed human milk or infant formula. Acta Paediatrica, 85, 598-603, 1996

141 Saadi AT, Gordon AE, MacKenzie DA, James VS, Elton RA, Weir DM, Busuttil A, Blackwell CC. The protective effect of breast feeding in relation to sudden infant death syndrome (SIDS): I. The effect of human milk and infant formula preparations on binding of toxigenic Staphylococcus aureus to epithelial cells. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 25, 155-65, 1999

142 Sabharwal H, Nilsson B, Chester MA, Lindh F, Grönberg G, Sjöblad S, Lundblad A. Oligosaccharides from faeces of a blood-group B, breast-fed infant. Carbohydrate Research, 178, 145-54, 1988

143 Sabharwal H, Nilsson B, Chester MA, Sjöblad S, Lundblad A. Blood group specific oligosaccharides from faeces of a blood group A breast-fed infant. Molecular Immunology, 21, 1105-12, 1984

144 Sabharwal H, Nilsson B, Grönberg G, Chester MA, Dakour J, Sjöblad S, Lundblad A. Oligosaccharides from feces of preterm infants fed on breast milk. Archives of Biochemistry and Biophysics, 265, 390-406, 1988

145 Sabharwal H, Sjöblad S, Lundblad A. Affinity chromatographic identification and quantification of blood group A-active oligosaccharides in human milk and feces of breast-fed infants. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 12, 474-9, 1991

146 Sabharwal H, Sjöblad S, Lundblad A. Sialylated oligosaccharides in human milk and feces of preterm, full-term, and weaning infants. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 12, 480-4, 1991

147 Sadler JE, Beyer TA, Oppenheimer CL, Paulson JC, Prieels JP, Rearick JI, Hill RL. Purification of mammalian glycosyltransferases. In: Ginsburg V, ed. Methods in Enzymology, Vol. 83, Complex carbohydrates (Part D), 458-515, 1982

148 Saint L, Smith M, Hartmann PE. The yield and nutrient content of colostrum and milk of women from giving birth to 1 month post-partum. British Journal of Nutrition, 52, 8-95, 1984

149 Salariya EM, Robertson CM. Relationships between baby feeding types and patterns, gut transit time of meconium and the incidence of neonatal jaundice. Midwifery, 9, 235-42, 1993

150 Sánchez-Díaz A, Ruano MJ, Lorente F, Hueso P. A critical analysis of total sialic acid and sialoglycoconjugate contents of bovine milk-based infant formulas. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 24, 405-10, 1997

151 Schauer R, Veh RW, Wember M. Demonstration of neuraminidase activity in human blood serum and human milk using a modified, radioactively labelled alpha1-glycoprotein as substrate. Hoppe Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie, 357, 559-66, 1976

152 Schmidt E. Ernährung des Säuglings. In: Betke K, Künzer W, Schaub J eds. Lehrbuch der Kinderheilkunde, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 39-50, 1991

153 Semenza G, Auricchio S. Small-intestinal disaccharidases. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly AL, Valle D, eds. Metabolic basis of inherited disease, Part II, McGraw-Hill, New York, 2975-97, 1989

154 Sevenhuysen GP, Holodinsky C, Dawes C. Development of salivary alpha-amylase in infants from birth to 5 months. American Journal of Clinical Nutrition, 39, 584-8, 1984

155 Shahani KM, Kwan AJ, Friend BA. Role and significance of enzymes in human milk. American Journal of Clinical Nutrition, 33, 1861-6, 1980

156 Shimada I, Shoji M, Futatsuya R, Katoh T, Kominanto Y, Sakamoto T, Fujikura T. Elevation of ratio of urinary N-acetylneuraminlactose to free sialic acid in some advanced cancer patients. Journal of Gastroenterology, 30, 21-7, 1995

157 Skovbjerg H, Noren O, Sjöström H, Danielsen EM, Enevoldsen BS. Further characterization of intestinal lactase/phlorizin hydrolase. Biochimica et Biophysica Acta, 707, 89-97, 1982

158 Smith DF, Zopf DA, Ginsburg V. Sialyl oligosaccharides from milk. In: Ginsburg V, ed. Methods in Enzymology, Vol. 50, Complex Carbohydrates (Part C), 221-6, 1978

159 Stahl B, Thurl S, Zeng J, Karas M, Hillenkamp F. Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Analytical Chemistry, 223, 218-26, 1994

160 Strömqvist M, Falk P, Bergström S, Hansson L, Lönnerdal B, Normark S, Hernell O. Human milk k-casein and inhibition of Helicobacter pylori adhesion to human gastric mucosa. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 21, 288-96, 1995

161 Svanborg C, Aniansson G, Mestecky J, Sabharwal H, Wold A. Anti-adhesive molecules in human milk. In: Mestecky J, Blair C, Ogra PL eds. Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 310, Immunology of Milk and the Neonate, Plenum Press, New York, 167-71, 1991

162 Tanaka Y, Taki Y, Sakane T, Nadai T, Sezaki H, Yamashita S. Characterization of drug transport through tight-junctional pathway in Caco-2 monolayer: Comparison with isolated rat jejunum and colon. Pharmaceutical Research, 12, 523-8, 1995

163 Teele DW, Klein JO, Rosner B. Epidemiology of otitis media during the first seven years of life in children in greater Boston: a prospective, cohort study. Journal of Infectious Disease, 160, 83-94, 1989

164 Thurl S, Henker J, Siegel M, Tovar K, Sawatzki G. Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides. Glycoconjugate Journal, 14, 795-9, 1997

165 Thurl S, Henker J, Taut H, Tovar K, Sawatzki G. Variations of neutral oligosaccharides and lactose in human milk during feeding. Zeitschrift für Ernährungswissenschaft, 32, 262-9, 1993

166 Thurl S, Müller-Werner B, Sawatzki G. Quantification of individual oligosaccharide compounds from human milk using high-pH anion exchange chromatography. Analytical Biochemistry, 235, 202-6, 1996

167 Thurl S, Offermanns J, Müller-Werner B, Sawatzki G. Determination of neutral oligosaccharide fractions from human milk by gel permeation chromatography. Journal of Chromatography in Biomedical Applications, 568, 291-300, 1991

168 Tram TH, Brand Miller J, McNeil Y, McVeagh P. Sialic acid content of infant saliva: comparison of breast fed with formula fed infants. Archives of Disease in Childhood, 77, 315-8, 1997

169 Uauy-Dagach R, Mena P. Nutritional role of omega-3 fatty acids during the perinatal period. Clinics in Perinatology, 22, 157-75, 1995

170 Urashima T, Messer M, Bubb WA. Biosynthesis of marsupial milk oligosaccharides II: characterization of a galactosyltransferase in lactating mammary glands of the tammar wallaby, Macropus eugenii. Biochimica et Biophysica Acta, 1117, 223-31, 1992

171 Urashima T, Saito T, Kimura T. Chemical structures of three neutral oligosaccharides obtained from horse (throughbred) colostrum. Comparitive Biochemistry and Physiology, 100 B, 177-83, 1991

172 Urashima T, Saito T, Nishimura J, Ariga H. New galactosyllactose containing alpha-glycosidic linkage isolated from ovine (Booroola dorset) colostrum. Biochimica et Biophysica Acta, 992, 375-8, 1989

173 Urashima T, Saito T, Ohmisya K, Shimazaki K. Structural determination of three neutral oligosaccharides in bovine (Holstein-Friesian) colostrum, including the novel trisaccharide GalNAc alpha 1-3Gal beta 1-4Glc. Biochimica et Biophysica Acta, 1073, 225-9, 1991

174 Vachon PH, Perreault N, Magny P, Beaulieu JF. Uncoordinated, transient mosaic patterns of intestinal hydrolase expression in differentiating huaman enterocytes. Journal of Cellular Physiology, 166, 198-207, 1996

175 Van Beers EH, Al RH, Rings EHHM, Einerhand AWC, Dekker J, Büller HA. Lactase and sucrase-isomaltase gene expression during Caco-2 cell differentiation. Biochemical Journal, 308, 769-75, 1995

176 Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. Glycobiology, 3, 97-130, 1993

177 Veh RW, Michalski JC, Carfield AP, Sander-Wewer M, Gies D, Schauer R. New chromatographic system for the rapid analysis and preparation of colostrum sialyloligosaccharides. Journal of Chromatography, 212, 313-22, 1981

178 Viverge D, Grimmonprez L, Cassanas G, Bardet L, Bonnet H, Solere M. Variations of lactose and oligosaccharides in milk from women of blood types secretor A or H, secretor Lewis, and secretor H/nonsecretor Lewis during the course of lactation. Annals of Nutrition and Metabolism, 29, 1-11, 1985

179 Viverge D, Grimmonprez L, Cassanas G, Bardet L, Solere M. Discriminant carbohydrate components of human milk according to donor secretor types. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 11, 365-70, 1990

180 Viverge D, Grimmonprez L, Cassanas G, Bardet L, Solere M. Variations in oligosaccharides and lactose in human milk during the first week of lactation. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 11, 361-4, 1990

181 Viverge D, Grimmonprez L, Solere M. Chemical characterization of sialyl oligosaccharides isolated from goat (Capra hircus) milk. Biochimica et Biophysica Acta, 1336, 157-64, 1997

182 Wachtel K. Ernährung von gesunden Säuglingen und Kleinkindern: Nährstoff- und Energiegehalt von Frauenmilch. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 98-125, 1990

183 Wang X, Gibson GR. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. Journal of Applied Bacteriology, 75, 373-80, 1993

184 Wiederschain GY, Newburg DS. Compartmentalization of fucosyltransferase and α-L-fucosidase in human milk. Biochemical and Molecular Medicine, 58, 211-20, 1996

185 Wiederschain GY, Newburg DS. Human milk fucosyltransferase and α-L-fucosidase activities change during the course of lactation. Journal of Nutritional Biochemistry, 6, 582-7, 1995

186 Wikman-Larhed A, Artursson P. Co-cultures of human intestinal goblet (HT29-H) and absorptive (Caco-2) cells for studies of drug and peptide absorption. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 3, 171-83, 1995

187 Wilson AC, Forsyth JS, Greene SA, Irvine L, Hau C, Howie PW. Relation of infant diet to childhood health: seven year follow up of cohort of children in Dundee infant feeding study. British Medical Journal, 316, 21-5, 1998

188 Zopf DA, Ginsburg V, Hallgren P, Jonsson AC, Lindberg BS, Lundblad A. Determination of Le^b-active oligosaccharides in urine of pregnant and lactating women by radioimmunoassay. European Journal of Biochemistry, 93, 431-35, 1979

189 Zopf DA, Roth S. Oligosaccharides as anti-infective agents. The Lancet, 347, 1017-21, 1996

190 Zweibaum A, Laburthe M, Grasset E, Louvard D. Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. In: Frizzel RA, Field M, eds. Handbook of Physiology, The Gastrointestinal System IV, Cultured intestinal cells, American Physiological So-ciety, Bethesda, 223-55, 1991

Danke …

... an alle, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben !!!

Ganz besonders möchte ich mich bedanken

bei meiner Betreuerin Prof. Hanni Daniel für ihre große Kreativität
und Diskussionsbereitschaft

bei den „Grauen Eminenzen“ und „Guten Geistern“ des Instituts
Frau Professor G. Rehner und Alwin Kratz

bei der Giessener Fraktion der Arbeitsgruppe
Beate, Elisabeth, Uli, Martina und Sabine

bei den Neu-Weihenstephanern
Uwe, Frank, Stephan, Michael und Isabel

bei Carmen und Ingo für die “tierischen Aspekte“ dieser Arbeit

bei Petze und ihrer Arbeitsgruppe (der Kaffee ist fertig ...)

bei Totti, Oli, Andreas und Christian für die Hilfe
bei allen Computerschrecken

bei der Milupa Research Group,
hier vor allem bei Beate Müller-Werner, Marko Mank sowie Dr. G. Sawatzki

und bei meiner Familie.