

C. Kunz
S. Rudloff

Strukturelle und funktionelle Aspekte von Oligosacchariden in Frauenmilch

Structural and functional aspects of oligosaccharides in human milk

Zusammenfassung Um die Jahrhundertwende beobachtete man, daß bei gestillten Kindern die Keimbesiedlung des Darmtraktes vorwiegend aus Bifidusbakterien besteht. Bei sog. Flaschenkindern dagegen fand man eine wesentlich ungünstigere Zusammensetzung der Darmflora mit vorwiegend pathogenen Keimen. Mitte der 50er Jahren wurde nachgewiesen, daß dieses Wachstum auf Oligosaccharide in Frauenmilch, die Aminozucker enthalten, zurückzuführen ist. Mittlerweile sind mehr als 130 Oligosaccharide in Frauenmilch charakterisiert worden, die teilweise fucosyliert und/oder sialyliert sind. Die Konzentrationen einzelner

Komponenten wie der Lacto-N-Traose und der beiden Lacto-N-Fucopentaosen I und II schwanken zwischen 0,5 und 2 g/L. Da der Gesamtgehalt zwischen 3–6 g/L liegt, muß man sie zu den Hauptmilchhaltsstoffen zählen. Unterschiede sowohl im Gehalt als auch im Muster zwischen Milch von Frauen mit Früh- und solchen mit Reifgeborenen wurden bisher nicht festgestellt. Es gibt immer mehr Hinweise darauf, daß Oligosaccharide in Frauenmilch potentielle Inhibitoren der Anhaftung von Bakterien und Viren an Epithelzellen sind, wodurch der erste Schritt eines Infektionsvorgangs beeinflußt werden könnte. Daher werden solche Oligosaccharide als lösliche Rezeptoranaloge zu Kohlenhydratstrukturen auf Epithelzellen angesehen, die möglicherweise zu einer besseren Infektabwehr von Neugeborenen führen, die mit Frauenmilch ernährt werden.

Eingegangen: 10. Juli 1995
Akzeptiert: 27. Oktober 1995

mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (KU 781/2-1 und /2-2)

PD Dr. C. Kunz (✉) · S. Rudloff
Forschungsinstitut für Kinderernährung
Heinstück 11
44225 Dortmund

Allgemeines

Nationale und internationale Gremien stimmen überein, daß Frauenmilch (FM) im allgemeinen die beste Art der

growth factors for a specific strain of *Bifidobacterium*. Meanwhile, more than 130 lactose-derived oligosaccharides have been identified in human milk. Some of these oligosaccharides like Lacto-N-Tetraose and Lacto-N-Fucopentaose I and II do not occur in minute amounts but in concentrations up to 1–2 g/L. As the total amount of complex oligosaccharides is between 3–6 g/L those components have to be considered as major human milk constituents. There is striking evidence that human milk oligosaccharides are potent inhibitors of bacterial adhesion to epithelial surfaces, an initial stage of infective processes. Therefore, these oligosaccharides are considered to be soluble receptor analogues of epithelial cell surfaces participating in the non-immunological defense system of human milk-fed infants.

Summary About a century ago, pediatricians observed that in feces of breast-fed infants, compared to those of bottle-fed infants, *Bifidobacterium bifidum* was the predominant microorganism. It was shown thereafter that aminosugar-containing oligosaccharides are

Schlüsselwörter Oligosaccharide – Frauenmilch – Kuhmilch – Säuglingsformulae

Key words Lactose-derived oligosaccharides – human milk – bovine milk – infant formula

Ernährung für den Säugling in den ersten 4–6 Lebensmonaten ist (1–5). Für Reifgeborene, die nicht gestillt werden, stehen verschiedene Säuglingsmilchnahrungen zur Verfügung, bei deren Herstellung man sich an der Zu-

sammensetzung der FM orientiert. Daher ist es erforderlich, strukturelle und funktionelle Eigenschaften bestimmter Inhaltsstoffe der Milch von Frauen mit Reifgeburten zu untersuchen. Außerdem stellen sich heute aufgrund der medizinischen Fortschritte in der Intensivmedizin und der somit höheren Überlebensrate von Frühgeborenen die Fragen, wie die Milch der Frauen von Frühgeborenen zusammengesetzt ist und inwieweit man sich bei der Herstellung von Säuglingsformulae (SF) für Frühgeborene ebenfalls an FM orientieren sollte. Die bisher vorliegenden Daten verschiedener Arbeitsgruppen konzentrieren sich auf Studien zu Proteinen, Fett, Mineralstoffen und Spurenelementen. Aufgrund neuerer Untersuchungen zur Kohlenhydratzusammensetzung von FM wird vermutlich in Kürze auch die Problematik der Anreicherung von SF mit anderen Kohlenhydraten, außer der Lactose, diskutiert werden.

Hintergrund dieser Überlegungen sind u.a. Beobachtungen, daß bei gestillten Säuglingen Infektionen des respiratorischen und des gastrointestinalen Traktes im Vergleich zu Kindern, die eine Säuglingsmilchnahrung erhalten, seltener bzw. weniger stark ausgeprägt auftreten (6–8). Dies trifft vor allem auf die Situation in Entwicklungsländern zu. Neuerdings werden die positiven Einflüsse der FM auch in Zusammenhang mit kürzeren Infektionsverläufen im Bereich des Urogenitaltraktes diskutiert (9–10). Verantwortlich hierfür dürften neben immunologisch aktiven Substanzen auch nicht immunologische Abwehrfaktoren in FM sein, wobei vor allem letztere bisher nur teilweise identifiziert sind. Dazu gehören Oligosaccharide, Glykolipide und Glykoproteine, die als potentielle Rezeptoranaloga in der Lage sind, die Anhaftung von pathogenen Keimen sowie die Wirkung bakterieller Toxine zu verhindern (11).

Im folgenden werden wir nach einem kurzen historischen Überblick auf den Aufbau von Oligosacchariden, auf deren Zusammensetzung und Menge in Milch von Frauen mit Früh- oder Reifgeburten und auf funktionelle Aspekte eingehen.

Historische Übersicht

Im Gegensatz zur Milch aller bisher untersuchten Säugetiere enthält FM eine relativ hohen Anteil an sogenannten komplexen Oligosacchariden, die sich durch eine sehr große strukturelle Vielfalt auszeichnen (12–14).

Die ersten Arbeiten hierzu wurden bereits 1888 von Esbach und von Deniges durchgeführt, die bei einem Vergleich von Lactoseserum aus Kuhmilch (Kh) und aus FM beobachteten, daß das optische Verhalten beider Seren unterschiedlich war (zitiert nach 12). Dies führte zu dem Schluß, daß im Lactoseserum von FM weitere Bestandteile enthalten sein müssen, welche die geringe Rechtsdrehung verursachen. Erst etwa 50 Jahre später isolierten Polonovski und Lespagnol eine neue, stickstoffhaltende Fraktion, die sie „Gynolactose“ nannten (15)

und die sich aus mehr als 10 Oligosacchariden zusammensetzte (16).

Diese Ergebnisse waren insofern interessant, da man zu der damaligen Zeit versuchte, den sogenannten Bifidusfaktor in FM zu identifizieren (Tab. 1).

Aus Untersuchungen von Tissier und von Moro um die Jahrhundertwende war bekannt, daß bei gestillten Kindern die Keimbesiedlung des Darmtraktes vorwiegend aus Bifidusbakterien besteht (17, 18). Bei sog. Flaschenkindern dagegen fanden sie eine wesentlich ungünstigere Zusammensetzung der Darmflora mit vorwiegend potentiell pathogenen Keimen. Moros Folgerung einige Jahre später war, daß FM einen Wachstumsfaktor für Bifidobakterien enthält, der sich nach Schönfeld in der Nicht-Protein-Stickstoff-Fraktion von Frauenmilch befindet (19). György und Mitarbeiter haben dann in den 50er Jahren zahlreiche Experimente mit einer Bifidusmutante durchgeführt, um diese Wachstumsfaktoren näher zu definieren (20, 21).

Tabelle 1 Säuglingernährung und Bifidusflora

Tissier (1900) und Moro (1900): Bifidobakterien überwiegen im Stuhl von gestillten Säuglingen
Moros Folgerung (1905): Frauenmilch enthält einen „Wachstumsfaktor“ für Bifidobakterien
Schönfeld (1926): „Wachstumsfaktor“ befindet sich in der Nicht-Protein-N-Fraktion
György und Mitarbeiter (1954): Experimente mit einer Bifidus-Mutante (Bifidobacterium bifidum subspecies <i>Pennsylvanicum</i>)

Neben der möglichen Bedeutung dieser Oligosaccharide für die Entwicklung einer Bifidobakterium *bifidum*-Flora (22) fanden diese Oligosaccharide besonderes Interesse bei Hämagglyutinationsstudien, die schließlich zur Charakterisierung verschiedener Blutgruppendifferenzanten (H , Le^a und Le^b) führten (23, 24). Die Gründe für das Vorliegen von Blutgruppendifferenzanten in FM-Oligosacchariden waren lange nicht bekannt, bis man schließlich feststellte, daß dieselben Glycosyltransferasen, welche die antigenen Determinanten der Blutgruppen synthetisieren, auch für die Bildung der Oligosaccharide in FM verantwortlich sind (25).

Grundstrukturen von FM-Oligosacchariden

Die Grundstrukturen sind aus wenigen Monosacchariden aufgebaut, und zwar aus Glucose, Galactose, den beiden Aminozuckern N-Acetylglucosamin und N-Acetylgalactosamin, Fucose und N-Acetylneuraminsäure (Tab. 2).

Baustein der Grundstrukturen ist die Lactose, aus der durch enzymatisch bedingte Verknüpfung von Fucose

Tabelle 2 Monosaccharidbausteine von Oligosacchariden in Frauenmilch

Trivialname	Abkürzung	Struktur
Glucose	Glc	
Galactose	Gal	
N-Acetylglucosamin	GlcNAc	
N-Acetylgalactosamin	GalNAc	
Fucose	Fuc	
N-Acetylneuraminsäure	NeuAc	

und/oder N-Acetylneuraminsäure kleinere Oligosaccharide wie 2'-Fucosyl-Lactose oder 3-Fucosyl-Lactose oder die beiden Sialyl-Lactosen entstehen. Ausgangspunkt der komplexen Oligosaccharide ist die Lacto-N-Tetraose, von der ausgehend durch wiederholte Verknüpfungen von

Lactosamin ($\text{Gal}\beta 1\text{-}3/\text{GlcNAc}$) Grundstrukturen verschiedener Kettenlänge wie Hexaosen, Octaosen bis schließlich Dodecaosens gebildet werden (Tab. 3).

Diese Grundstrukturen, die an sich schon sehr komplex sein können, nehmen durch zusätzliche Fucosyllierungen und Sialylierungen an ganz bestimmten Stellen innerhalb dieser Ketten stark zu (13, 26, 27). Dies ist ein Grund, weshalb bisher mehr als 130 neutrale und saure Oligosaccharide in FM nachgewiesen wurden. Diese Zahl wird sich in den nächsten Jahren durch immer sensitivere Nachweismethoden weiter erhöhen. Die Frage stellt sich daher, welche spezifischen Funktionen diese Oligosaccharide für den mit FM ernährten Säugling haben. In diesem Zusammenhang ist natürlich auch die individuelle Zusammensetzung und die Konzentration von Oligosacchariden in FM von Interesse.

Qualitative und quantitative Aspekte

Charakterisierung

Bei unseren Untersuchungen zur Charakterisierung und Quantifizierung von Oligosacchariden in biologischen Flüssigkeiten verwenden wir ein spezielles Nachweisverfahren zur Trennung und Detektion von Kohlenhydraten (High pH Anion Exchange Chromatographie with Pulsed Amperometric Detection, HPAE-PAD) in Verbindung mit Kieselgel-Dünnschichtchromatographie (Silica-HPTLC) und Massenspektrometrie (FAB-MS) (28, 29). Die Silica-HPTLC ermöglicht einen ersten Überblick über die Zusammensetzung der Kohlenhydratfraktionen. Abbildung 1 zeigt beispielhaft, daß nach Gelfiltration einer Probe sowohl sialinsäurehaltige als auch neutrale Zucker vorliegen. Zum Beispiel enthält Fraktion 8 aus Abbildung 1 (Spalte 2) eine Vielzahl an sauren Komponenten, wie die nachfolgende HPAE-PAD-Analyse verdeutlicht (Abb. 2). Daher ist eine Trennung von sauren und neutralen Kohlenhydraten mittels eines Ionenaustauschers erforderlich.

Abb. 1 Kieselgel-HPTLC von Oligosacchariden nach Sephadex G 25-Gelfiltration. Anfärbung mit Orcin (50). Laufmittel: Butanol/Essigsäure/H₂O (2,5/1/1; v/v/v)

Spalte	1: Sephadex-	Fraktion 7
	2:	Fraktion 8
	3:	Fraktion 9
	4:	Fraktion 10
	5:	Fraktion 11
	6:	Fraktion 12
	7:	Fraktion 13
	8:	Fraktion 14
	9:	Lactose-Standard

(FucLac: Fucosyl-Lactose; LNT:
Lacto-N-Tetraose; Fuc-LNT;
Fucosyl-Lacto-N-Tetraose;
NeuAc-Lac: N-Acetylneuraminyll-
Lactose; Fuc₂-LNT: Difucosyl-
Lacto-N-Tetraose)

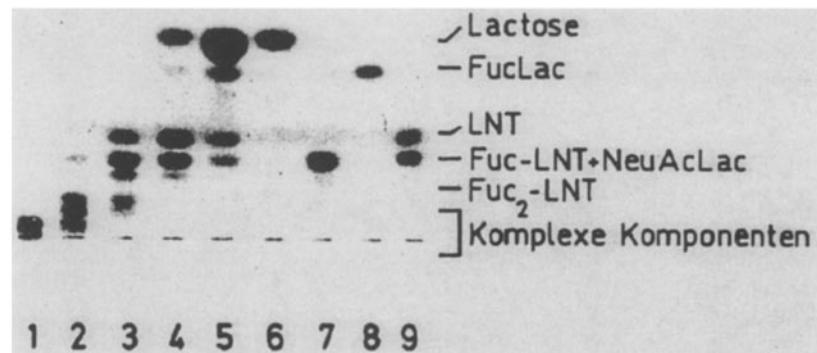
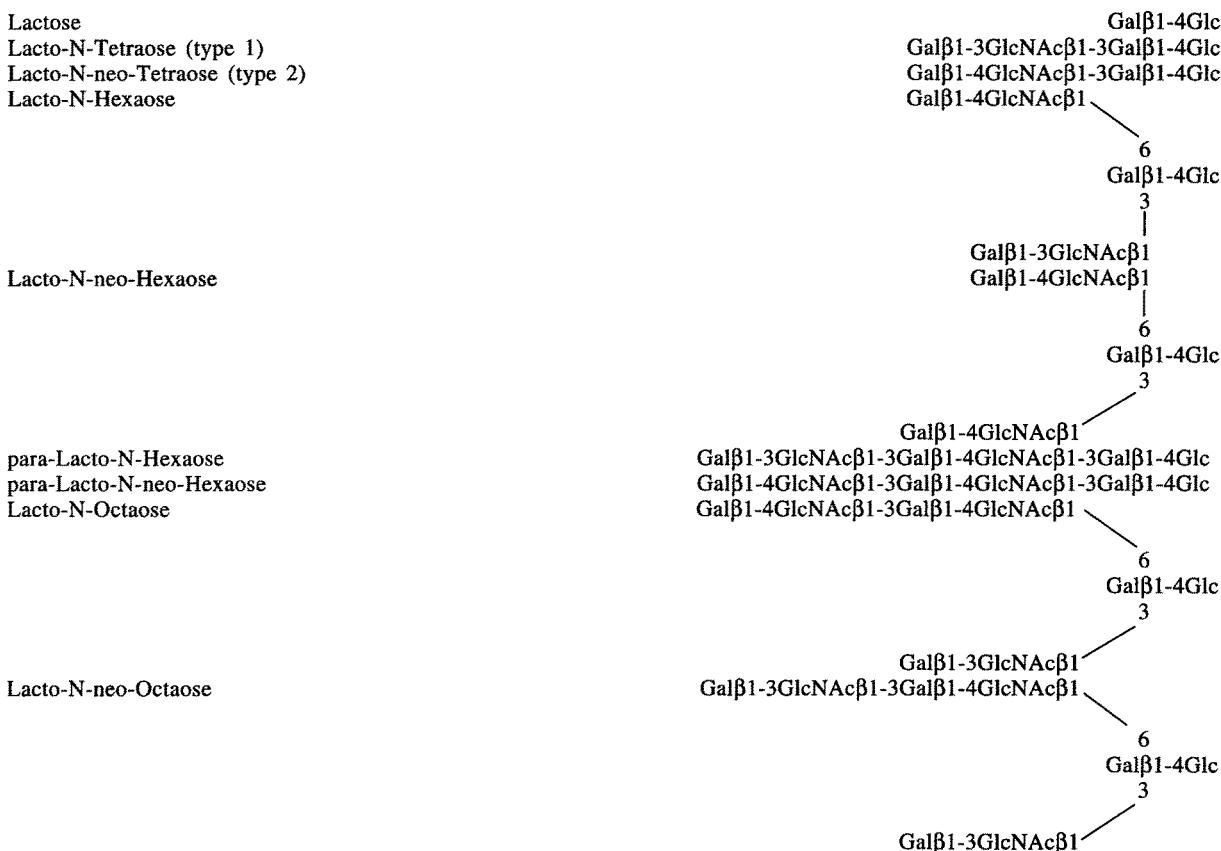


Tabelle 3 Grundstrukturen von Oligosacchariden in Frauenmilch



Eine Kombination der genannten Methoden ermöglichte den Nachweis der in Tabelle 4 gezeigten Komponenten in Milch von Frauen mit Früh- oder Reifgeburten. 2'- und 3-Fucosyl-Lactose, Difucosyl-Lactose, Lacto-N-Tetraose und Lacto-N-neo-Tetraose, Lacto-N-Fucopentaose I, II, III und V, unterschiedlich fucosyierte Hexaosen und Octaosen sowie die sialylierten Derivate von Lactose

(α 2-3 und 2-6), Sialyl-Lacto-N-Tetraosen (LST a, b und c), Sialyl-Fucosyl-Lacto-N-Tetraosen und Disialyl-Lacto-N-Tetraosen sind regelmäßig vorkommende Oligosaccharide in FM. Unterschiede zwischen Milch von Frauen mit unterschiedlicher Gestationsdauer haben wir bisher nicht beobachtet.

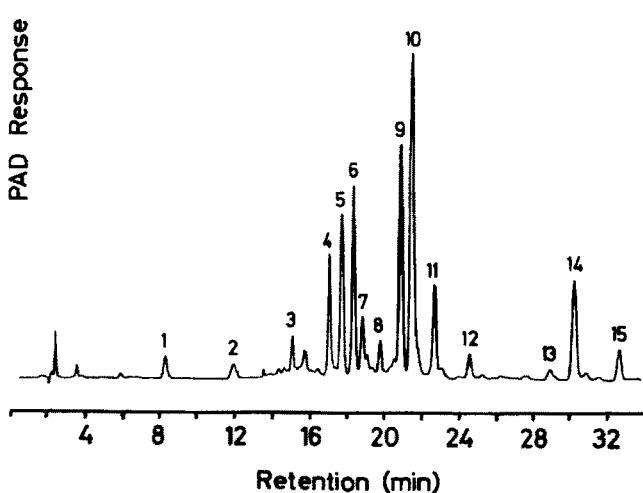


Abb. 2 HPAE-PAD von Fraktion 8 aus Abb. 1 (Spalte 2)

- | | |
|------|-----------------------------------------------------------------------|
| Peak | 1: Retention von 3-Fuc-Lactose |
| | 2: Retention von Lactose |
| | 3: Retention von Lacto-N-Tetraose |
| | 4: isomere Struktur zu 5? |
| | 5: NeuAc-Fuc-Lacto-N-Tetraose |
| | 6: NeuAc-Fuc-Lactose |
| | 7: isomere Struktur 5 |
| | 8: NeuAc-Lacto-N-Tetraose (LST c) |
| | 9: NeuAc2-6Lactose |
| | 10: NeuAc2-3Lactose |
| | 11: NeuAc-Lacto-N-Tetraose (LST a) |
| | 12 + 13: fucosyierte und gleichzeitig mehrfach sialylierte Strukturen |
| | 14: NeuAc2-Lacto-N-Tetraose |
| | 15: mehrfach sialylierte Hexaosen und komplexe Oligosaccharide |

(Erklärungen der Abkürzungen: siehe Abbildung 1 und Tabelle 4)

Tabelle 4 Oligosaccharide in Milch von Frauen mit Früh- oder mit Reifgeburten

allgemeine Bezeichnung	Abkürzung	Struktur
Lactose	Lac	Galβ1-4Glc
2'-Fucosyl-Lactose	2'-Fuc-Lac	Fucα1-2Galβ1-4Glc
3-Fucosyl-Lactose	3-Fuc-Lac	Galβ1-4Glc 3 1 Fucα
3'-Sialyl-3-Fucosyl-Lactose	3'-NeuAc-3-Fuc-Lac	NeuAcα2-3Galβ1-4Glc 3 1 Fucα
Difucosyl-Lactose	Fuc ₂ Lac	Fucα1-2Galβ1-4Glc 3 1 Fucα
Lacto-N-Tetraose (type 1)	LNT	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc
Lacto-N-neo-Tetraose (type 2)	neo LNT	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc
Lacto-N-Fucopentaose I	LNFP I ¹⁾	Fucα1-2Galβ1-3GlcNacβ1-3Galβ1-4Glc
Lacto-N-Fucopentaose II	LNFP II ¹⁾	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 4 1 Fucα
Lacto-N-Fucopentaose III	LNFP III ¹⁾	Galβ1-4GlcNAcβ1-3 Galβ1-4Glc 3 1 Fucα
Lacto-N-Fucopentaose V	LNFP V ¹⁾	Galβ1-3GlcNAcβ1-3 Galβ1-4Glc 3 1 Fucα
Lacto-N-Difuco-Hexaose I (= Difucosyl-Lacto-N-Tetraose)	LNDFH I	Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 4 1 Fucα
Lacto-N-Difuco-Hexaose II (= Difucosyl-Lacto-N-Tetraose)	LNDFH II	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 4 1 Fucα Fucα
Sialyl α2-3 Lactose	NeuAc α2-3 Lac	NeuAcα2-3Galβ1-4Glc
Sialyl α2-6 Lactose	NeuAc α2-6 Lac	NeuAcα2-6Galβ1-4Glc
Sialyl-Lacto-N-Tetraose a	LST a	NeuAcα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc
Sialyl-Lacto-N-Tetraose b	LST b	Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 6 2 NeuAcα
Sialyl-Lacto-N-Tetraose c	LST c	NeuAcα2-6Gaβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc
Sialyl-Fucosyl-Lacto-N-Tetraose I	NeuAc-Fuc-LNT I	-2)
Sialyl-Fucosyl-Lacto-N-Tetraose II	NeuAc-Fuc-LNT II	-2)
Disialyl-Lacto-N-Tetraose	NeuAc ₂ LNT	NeuAcα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc 6 2 NeuAcα

¹⁾ = Fucosyl-Lacto-N-Tetraose)²⁾ noch nicht bestimmt

Quantifizierung

Die Quantifizierung von LNT, den beiden LNFP I und II, den sialylierten Derivaten der LNT, LST a und LST c, sowie von Disialyl-LNT ergab die in Tabelle 2 zusammengefaßten Daten (28).

Tabelle 5 Oligosaccharide in Frauenmilch (FM) und in Kuhmilch (KM)

	FM ¹⁾ g pro Liter	KM ²⁾
Lactose	55–70	40–50
Oligosaccharide		
Lacto-N-Tetraose	0.5–1.5	Spuren
Lacto-N-Fucopentaose I	1.0–1.5	–
Lacto-N-Fucopentaose II	0.5–1.0	–
NeuAc(α 2-6)Lactose	0.3–0.5	0.03–0.06
NeuAc(α 2-3)Lactose	0.1–0.3	
NeuAc-Lacto-N-Tetraose a	0.03–0.2	Spuren
NeuAc-Lacto-N-Tetraose c	0.1–0.6	Spuren
NeuAc ₂ -Lacto-N-Tetraose	0.2–0.6	Spuren
Oligosaccharide gesamt	3.0–6.0	Spuren

¹⁾ eigene Untersuchungen (28)

²⁾ nach Kobata A, Method: Enzymol 28:262 (1972); Parkkinen und Finne, Methods Enzymol 138:289 (1987)

Die Konzentrationen der neutralen Zucker schwanken zwischen 2–4 g/L (LNT, 1,0–1,5 g/L; LNFP I und LNFP II, 1,0–1,5 g/L bzw. 0,5–1,0 g/L).

Auffallend bei den bisher von uns analysierten Proben ist, daß neben der LNT, die allgemein als eines der quantitativ und auch qualitativ wichtigen Oligosaccharide angesehen wird, der Gehalt an LNFP I und LNFP II relativ hoch ist. Diese beiden Fucopentaosen machen zusammen mit der LNT etwa 50 bis 70 % des Gesamtgehalts an Oligosacchariden aus. Weitere fucosyierte Komponenten wurden dabei aufgrund ihrer Komplexität bei unseren Quantifizierungen nicht berücksichtigt.

Der Rest verteilt sich auf komplexe neutrale Oligosaccharide sowie auf NeuAc α 2-3Lactose und NeuAc α 2-6 Lactose, NeuAc-LNT (LST a und LST c) und NeuAc α 2-LNT. Die Konzentrationen der sauren Komponenten liegen etwa zwischen 0,1 und 0,60 g/L.

Tabelle 5 zeigt auch einen Vergleich zwischen reifer FM und KM, die häufig als Ausgangsprodukt für die Herstellung von SF dient. Die Konzentration von Lactose ist in FM höher als in KM. Im Gegensatz zu FM fehlen in KM die neutralen Oligosaccharide LNT, LNFP I und II fast vollständig, während die sialylierten Derivate, wenn auch in geringerer Konzentration als in FM, nachgewiesen werden können.

Der Gesamt-Oligosaccharidgehalt in FM liegt nach unseren Untersuchungen zwischen 3–6 g/L. Er beträgt

also etwa 5–10 % des Lactosegehalts. Eine beachtliche Menge an Oligosacchariden, wenn man bedenkt, daß diese bisher als vernachlässigbar angesehen wurden.

Ein Vergleich von FM, KM und SF zeigt, daß nur in FM eine Vielzahl verschiedener Oligosaccharide in relativ hohen Konzentrationen vorliegt (Tabelle 6). In SF ist, wie in KM, vorwiegend Sialyl-Lactose nachzuweisen.

Tabelle 6 Komplexe Oligosaccharide in Frauenmilch, Kuhmilch und Säuglingsformulae

in Frauenmilch
– hoher Gehalt
– zahlreiche nicht-modifizierte sowie deren fucosyierte und/oder sialylierte Derivate (> 100)
in Kuhmilch
– niedriger Gehalt
– vorwiegend Sialyl-Lactose (NeuAc α 2-3 Lac und NeuAc α 2-6 Lac)
in Säuglingsformulae auf Kuhmilchbasis
– wie in Kuhmilch

Berücksichtigt man das Bestreben von nationalen und internationalen Gremien, SF möglichst der FM anzupassen, wie dies beim Protein- und Fettgehalt oder bei Vitaminen und Mineralstoffen versucht wird, dann stellt man fast zwangsläufig die Frage: Wie sieht es mit einem Zusatz von Oligosacchariden aus? Die Frage der Supplementierung läßt sich zum heutigen Zeitpunkt nicht eindeutig beantworten. Die auf dem europäischen Markt erhältlichen SF sind offensichtlich recht gut, da sich die meisten Reifgeborenen, auch wenn sie keine FM und damit auch kaum Oligosaccharide erhalten, gut entwickeln, beurteilt nach den zur Zeit geltenden Kriterien. Es ist jedoch auch bekannt, daß gut entwickelte Kinder in aller Regel nicht so anfällig sind gegen zusätzliche Belastungen wie Kinder, die zu sog. Risikogruppen gehören. Hierzu zählen beispielsweise Frühgeborene oder Neugeborene mit zu niedrigem Geburtsgewicht.

Es ist zu klären, welche der vielen Komponenten in FM zugesetzt werden sollte und in welcher Konzentration. Daher sind dringend Studien erforderlich, die zur Klärung der erwähnten Problematik beitragen können.

Funktionelle Aspekte

Glykoproteine und Oligosaccharide

Nach Beachey (1981) spielt die Adhäsion von Bakterien an bestimmte Wirtszellen eine zentrale Rolle beim Infektionsvorgang (30). Die Anhaftung an Epithelzellen der Darmmukosa ermöglicht den Mikroorganismen, die

Darmwand zu besiedeln und nicht durch die Peristaltik zusammen mit dem Mucus ausgeschieden zu werden (31, 32).

Escherichia coli gehört zu den Mikroorganismen, die sich bezüglich ihrer Pathogenität sehr verschieden verhalten, d.h. es existieren pathogene und nicht pathogene Stämme. Pathogene Formen können durch Gewebsinvasion strukturelle Schäden an Intestinalzellen hervorrufen. Die Pathogenität von nichtinvasiven *E. coli* Stämmen dagegen wird jedoch maßgeblich von seiner Fähigkeit bestimmt, hitzelabile und/oder hitzestabile Enterotoxine zu bilden (33).

Die Bindung von Bakterien an Epithelzellen erfordert außer sogenannten Adhäsien auf der Bakterienzelle auch das Vorhandensein komplementärer Liganden auf der Epithelzellmembran. Von Oligosacchariden aus FM konnte gezeigt werden, daß sie ähnliche Strukturen besitzen wie Liganden auf Epithelzellen, an die verschiedene Bakterien, bakterielle Toxine oder Viren binden (30, 32, 33).

In vivo-Versuche von Otnaess und Svennerholm (1982) mit Dünndarmschlingen von Kaninchen zeigten, daß Milchkomponenten in der Lage sind, die Flüssigkeitssekretion in das Darmlumen zu verhindern, die durch das hitzelabile Toxin von *E. coli* ausgelöst wird (34). Die Autoren führen die toxinhemmende Aktivität der FM nicht in erster Linie auf die Immunglobuline zurück, da die größte inhibitorische Wirkung von der Fraktion mit einem Molekulargewicht > 400 kD ausging, die frei von Immunglobulinen war. Inwieweit die hemmende Wirkung z.B. auf Mucine zurückgeht, die bekanntlich ein sehr hohes Molekulargewicht haben, ist nicht untersucht worden. Schrotten konnte vor kurzem zeigen, daß Mucine aus

Milchfettkügelchen in der Lage waren, die Anhaftung von clonierten S-Fimbrien von *E. coli* an buccale Epithelzellen zu verhindern (35).

Wie im Gastrointestinaltrakt sind auch bei der bakteriellen Besiedlung des Respirationstraktes Adhäsionsvorgänge von Bedeutung. In vitro-Tests zeigten, daß FM die Anhaftung von *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae* an menschliche Epithelzellen des Pharynx und der Mundhöhle hemmt (36). Bei Milchzugabe wurde die Adhäsion von *S. pneumoniae* auf weniger als 5 % und die von *H. influenzae* auf ca. 20 % im Vergleich zur Adhäsion in einer Kontrollösung (Puffer) reduziert (37). Der antiadhäsive Effekt von FM gegen *Streptococcus pneumoniae* konnte sowohl in der Milchfraktion mit hohem Molekulargewicht als auch in der mit niedrigem Molekulargewicht (LMW-Fraktion) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde die Anhaftung von *H. influenzae* durch die LMW-Fraktion nicht blockiert. Die inhibitorische Aktivität in der LMW-Fraktion wurde zum Teil durch den Gehalt an Oligosacchariden erklärt. Diese entsprechen dem Kohlenhydratanteil der Neolactoserien von Glykolipiden, welche als Rezeptoren für anhaftende Pneumokokken angenommen wurden (37). Von verschiedenen getesteten Oligosacchariden waren sowohl Lactose als auch N-Acetylglucosamin inaktiv, während die neo-LNT ($\text{Gal}\beta 1\text{-}3\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}3\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{Glc}$) und LNT ($\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}3\text{Gal}\beta 1\text{-}4\text{Glc}$), die zu den Hauptkomponenten der Milcholigosaccharide gehören, die beste Inhibitionswirkung zeigten.

In Tabelle 7 sind zusammenfassend verschiedene Bakterien und Viren aufgeführt, deren Liganden in löslicher Form auch in FM vorkommen.

Tabelle 7 Pathogene Mikroorganismen und deren Liganden in Frauenmilch

Liganden in Frauenmilch	Mikroorganismen
Mannose-enthaltende Glykoproteine	<i>E. coli</i> (Typ 1-Fimbrien)
Fucosylierte Oligosaccharide	<i>E. coli</i> (hitze-stabiles Enterotoxin)
Fucosylierte Tetra- und Pentasaccharide	<i>E. coli</i>
$\text{Sialyl}(\alpha 2\text{-}3)\text{-Lactose}$ und -Glykoproteine	<i>E. coli</i> (S-Fimbrien)
Neutrale Oligosaccharide (LNT, neo LNT)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
$\text{Fuc } \alpha 1\text{-}2 \text{ Gal-Epitope}$	<i>Candida albicans</i>
$\text{Gal}(\beta 1\text{-}4)\text{GlcNAc}$ or $\text{Gal}(\beta 1\text{-}3)\text{GlcNAc}$	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Sialyl-Lactose	<i>Campylobacter pylori</i>
Sialyl-Lactose	<i>Streptococcus sanguis</i>
Sialyl-Lactose und sialylierte Glykoproteine	<i>Campylobacter pylori</i>
Sialylierte Glykoproteine ($\alpha 2\text{-}3$ -verknüpft)	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Sialylierte Poly-N-Acetyllactosamin-Glykane	" "
Sialylierte ($\alpha 2\text{-}3$) Poly-N-Acetyllactosamin-Glykane	<i>Streptococcus suis</i>
Sialyl($\alpha 2\text{-}6$)Lactose	Influenza Virus A
Sialyl($\alpha 2\text{-}3$)Lactose	" " B
9-O-Ac von NeuAc($\alpha 2\text{-}3$)R	" " C

Beispielhaft sei erwähnt, daß von den verschiedenen *E. coli*-Spezies einige nur mit Mannose-enthaltenden Glykoproteinen reagieren, andere dagegen bevorzugen fucosyierte bzw. sialylierte Komponenten. Parkkinen et al. (1983) und Korhonen et al. (1985) haben nachgewiesen, daß sialylierte Milcholigosaccharide in vitro in der Lage waren, die Bindungsaktivität von *E. coli*, die spezifische Infektionen bei Neugeborenen wie Meningitis und neonatale Sepsis verursachen, zu verhindern (38, 39).

Die sehr feinen Erkennungsmechanismen bezüglich Zusammensetzung und Verknüpfung der Zucker verdeutlicht das Influenza Virus. Typ A reagiert nur mit Sialyl- α 2-6-Lactose, Typ B nur, wenn die Neuraminsäure in α 2-3 Position vorliegt und Typ C nur mit der 9-O-acetylierten Form von Neuraminsäure in α 2-3-Position in Glykokonjugaten (51).

Verschiedene Oligosaccharide in FM sind somit strukturanaalog zu Kohlenhydratketten der Oberflächen von Epithelzellen und damit potentielle Inhibitoren der Anhaftung von Bakterien und Viren.

Liganden von Zelladhäsionsmolekülen

Seit wenigen Jahren werden von biochemischer und zellbiologischer Seite sehr intensiv Zelladhäsionsmoleküle und deren Liganden untersucht, die z.B. bei Entzündungsprozessen oder bei der Entwicklung von Tumoren eine Rolle spielen (40, 41). Hierzu gehören die Selektine, die

u.a. die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in extravasives Gewebe beeinflussen. Selektine sind außerdem an der Regulation der Lymphozytenrezirkulation oder der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregation beteiligt (42, 43). Leukozyten erkennen zunächst spezifisch Selektine an der Endothelzelloberfläche. Hierdurch wird eine Interaktion mit Integrinen der Endothelzellen ermöglicht, die zum Abflachen der Leukozyten führt. Dies wiederum ermöglicht es den Leukozyten, in das Gewebe vorzudringen.

Die Liganden von Selektinen sind Kohlenhydratstrukturen auf Endothelzellen oder auf Leukozyten (Tab. 8). Es gibt immer mehr Hinweise darauf, daß die Liganden für ELAM-1 (endothelial-leukocyte adhesion molecule-1, E-Selectin) und GMP 140 (granule membrane protein, P-Selectin) Sialyl Le^x ($\text{NeuAc}\alpha\text{2-3Gal}\beta\text{1-4(Fuc}\alpha\text{1-3)GlcNAc-R}$) oder Sialyl Le^a -Strukturen ($\text{NeuAc}\alpha\text{2-3Gal}\beta\text{1-3(Fuc}\alpha\text{1-4)GlcNAc-R}$) enthalten oder zumindest sehr ähnlich zusammengesetzt sind (44, 45). Übereinstimmung besteht darin, daß diese Liganden α 2-3-gebundene N-Acetylneuraminsäure und α 1-3/4-gebundene Fucose besitzen. Dies sind Komponenten, die regelmäßig in Frauenmilch vorkommen (46, 47). Die LNFP III (Tab. 4), die auch in FM vorkommt und die das Le^x -Epitop besitzt, wurde kürzlich als potenter Inhibitor von Zellen, die P-Selektine exprimieren nachgewiesen. Die LNFP I und II (Tab. 4), die eine sehr ähnliche Struktur wie LNFP III haben, zeigten dagegen keine Wirkung.

Tabelle 8 Oligosaccharide als Liganden für die Selectine ELAM-1 und GMP-140

		Abkürzung
ELAM-1		
NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc-	3	3-Sialyl-Lewis x
Fuc α 1		
NeuAc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc-	3	3-Sialyl-Lewis a
Fuc α 1		
NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1	3 3	3-Sialyl-di-Lewis x
Fuc α 1 Fuc α 1		
GMP-140		
Gal β 1-4GlcNAc β 1-	3	Lewis x
Fuc α 1		
NeuAc α 2-6 (3) Gal β 1-4GlcNAc β 1-	3	3/6-Sialyl-Lewis x
Fuc α 1		
Abkürzungen:	NeuAc N-Acetylneuraminsäure	
	Gal D-Galactose	
	GlcNAc N-Acetylglucosamin	
	Fuc L-Fucose	

Zelladhäsionsmoleküle tragen im menschlichen Immunsystem auch dazu bei, daß ein unkontrollierter Angriff von Leukozyten auf körpereigene Zellen verhindert wird (48). Ob Liganden von Zelladhäsionsmolekülen in FM diese Funktionen beeinflussen, läßt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht beantworten. Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, daß wir intakte Oligosaccharide aus FM auch im Urin von FM-ernährten Kindern nachgewiesen haben, nicht dagegen bei Frühgeborenen, die

eine Säuglingsmilchnahrung erhielten (49). Dies bedeutet nach heutigen Kenntnissen, daß einige FM-Oligosaccharide offensichtlich in intakter Form absorbiert werden, im Blut zirkulieren und schließlich mit dem Harn ausgeschieden werden. Insofern besteht grundsätzlich, neben einer lokalen Wirkung im Gastrointestinaltrakt, die Möglichkeit der Wechselwirkung mit Endothelzellen bzw. Adhäisionsmolekülen.

Literatur

- American Academy of Pediatrics, Committee on Nutrition (1976) Commentary on breast-feeding and infant formulas, including proposed standards for formulas. *Pediatrics* 57:278–285
- Committee on American Nutrition, Academy of Pediatrics (1985) Pediatric nutrition handbook, 2nd ed. American Academy of Pediatrics, Elk Grove Village, Illinois
- Ernährungskommission der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde (1979) Richtlinien für die Zusammensetzung von Säuglingsmilchnahrungen auf Kuhmilcheiweiß-Basis für gesunde Säuglinge. *Monatsschr Kinderheilkd* 127:644
- ESPGAN Committee of Nutrition (1982) Guidelines on infant nutrition. III. Recommendations for infant feeding. *Acta Paediatr Scand Suppl* 302
- World Health Organization (1981) International code of marketing of breast-milk substitutes. World Health Organization, Geneva
- Adlerberth I, Carlsson B, de Man P, Jalil F, Khan SR, Larsson P, Mellander L, Svartberg C, Wold AE, Hanson LA (1991) Intestinal colonization with Enterobacteriaceae in Pakistani and Swedish hospital-delivered infants. *Acta Paediatr Scand* 80:602–610
- Kovar MG, Sedula MK, Marks JS, Frase DW (1984) Review of the epidemiologic evidence for an association between infant feeding and infant health. *Pediatrics* 74:615–638
- Dewey KG, Heinig MJ, Nommsen-Rivers LA (1995) Differences in morbidity between breast-fed and formula-fed infants. *J Pediatr* 126:696–702
- Marild S, Jodal U, Hanson LA (1990) Breast-feeding and urinary tract infection. *Lancet* 336:942
- Pisacane A, Graziano L, Mazzarella G, Scarpellino B, Zona G (1992) Breast-feeding and urinary tract infection. *J Pediatr* 120:87–90
- Kunz C, Rudloff S (1993) Biological functions of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatr* 82:903–912
- Wiegandt H, Egge H (1970) Oligosaccharide der Frauenmilch. *Fortschr Chem Org Naturst* 28:404–428
- Montreuil J, Mullet S (1960) Etude des variations des constituants glucidiques du lait de femme au cours de la lactation. *Bull Soc Chim Biol* 42:365–377
- Kobata A (1977) Milk glycoproteins and oligosaccharides. In: *The glycoconjugates*. Vol 1. Horowitz MI, Pigman W (eds) Academic Press, New York, pp 423–440
- Polonovski M, Lespagnol A (1933) Nouvelles acquisitions sur les composés glucidiques du lait de femme. *Bull Soc Chim Biol* 15:320–349
- Polonovski M, Montreuil J (1954) Etudes chromatographie des polyosides du lait de femme. *C R Hebdo Séances Acad Sci* 238:2263
- Moro E (1900) Morphologische und bakteriologische Untersuchungen über die Darmbakterien des Säuglings: Die Bakteriumflora des normalen Frauenmilchstuhls. *Jahrb Kinderh* 61:686–734
- Tissier H (1900) Recherches sur la flore intestinale des nourrissons. Diss., Université de Paris
- Schönfeld H (1926) Über die Beziehungen der einzelnen Bestandteile der Frauenmilch zur Bifidusflora. *Jahrb Kinderheilkd* 113:19–60
- György P, Kuhn R, Rose CS, Zilliken F (1954) Bifidus factor II: its occurrence in milk from different species and in other natural products. *Arch Biochem Biophys* 48:202–208
- György P, Jeanloz RW, von Nicolai H, Zilliken F (1974) Undialyzable growth factors for *Lactobacillus bifidus* var. *Pennsylvanicus*. *Eur J Biochem* 43:29–33
- Bezkorovainy A, Miller-Catchpole R (1989) Biochemistry and physiology of bifidobacteria. Boca Raton, FL: CRC Press
- Morgan WTJ (1960) A contribution to human biochemical genetics: the chemical basis of blood-group specificity. *Proc R Soc London B* 151:308–347
- Watkins WM (1978) Genetics and biochemistry of some human blood groups. *Proc R Soc London B* 202:31–53
- Grollman EF, Kobata A, Ginsburg V (1969) An enzymatic basis for Lewis blood types in man. *J Clin Invest* 48:1489–1494
- Egge H (1993) The diversity of oligosaccharides in human milk. In: Renner B, Sawatzki G (eds) *New perspectives in infant nutrition*. Thieme, Stuttgart, pp 12–26
- Yamashita K, Mizuuchi T, Kobata A (1982) Oligosaccharides of human milk. In: Gisburg V (ed) *Methods in enzymology*. Academic Press, New York, pp 105–126
- Kunz C (1994) Oligosaccharide, Proteine und Glykoproteine in Frauenmilch und in Urin von Frühgeborenen: analytische, strukturelle und funktionelle Aspekte. Thieme Copythek, Stuttgart
- Kunz C, Rudloff S, Pohlentz G, Egge H (1992) Characterization of neutral oligosaccharides in human milk by HPLC and pulsed amperometric detection. *FASEB J* 6:A1115
- Beachey EH (1981) Bacterial adherence: adhesin-receptor inter-actions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J Infect Dis* 143: 325–345
- Ofek I, Beachey EH (1980) General concepts and principles of bacterial adherence in animals and man. In: Beachey EH (ed) *Receptors and recognition*. Vol 6. Chapman and Hall, London, pp 3–29
- Mirelman D (1986) Microbial lectins and agglutinins: properties and biological activities. Wiley, New York
- Karlsson KA (1989) Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Annu Rev Biochem* 58:309–350
- Otnaess AB, Laegreid A, Ertresvag K (1983) Inhibition of enterotoxin from *E. coli* and *V. cholerae* by gangliosides from human milk. *Infect Immun* 40:563–569
- Schroten H, Plogmann R, Hanisch FG, Hacker J, Nobis-Bosch R, Wahn V (1993) Inhibition of adhesion of S-fimbriated *E. coli* to buccal epithelial cells by human skim milk is predominantly mediated by mucins and depends on

- the period of lactation. *Acta Paediatr* 82:6–11
36. Andersson B, Porras O, Hanson LA, Svanborg Edén C, Leffler H (1985) Non-antibody-containing fractions of breast milk inhibit epithelial attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *Lancet* 1:643
37. Andersson B, Porras O, Hanson LA, Lagergard T, Svanborg Edén C (1986) Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides. *J Infect Dis* 153:232–237
38. Parkkinen J, Finne J, Achtmann M, Vaisanen V, Korhonen TK (1983) *E. coli* strains binding neuraminy 2-3 galactosides. *Biochem Biophys Res Commun* 111:456–461
39. Korhonen TK, Valtonen MV, Parkkinen J, Vaisanen-Rhen V, Finne J, Orskov F, Orskov I, Svenson SP, Makela PH (1985) Serotypes, hemolysin production and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infect Immun* 48:486–491
40. Osborn L (1990) Leucocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* 62:3–6
41. Magnani JL (1991) The tumor markers, Sialyl Le^a and Sialyl Le^x bind ELAM-1. *Glycobiol* 1:318–320
42. Springer TA (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425–434
43. Kaldjian EP, Stoolman LM (1993) Lymphocyte recirculation and recruitment. Shimizu Y (ed) *Lymphocyte adhesion molecules*. R.G. Landes Company, Austin, pp 151–172
44. Brandley BK, Kiso M, Abbas S, Nikrad P, Srivasatava O, Foxall C, Oda Y, Hasegawa A (1993) Structure-function studies on selectin carbohydrate ligands. Modifications to fucose, sialic acid and sulphate as a sialic acid replacement. *Glycobiol* 3:633–639
45. Varki A (1994) Selectin ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7390–7397
46. Wierszeski J-M, Chekkor A, Bouquelet S, Montreuil J, Strecker G, Peter-Katalinic J, Egge H (1985) Structure of two new oligosaccharides isolated from human milk: Sialylated lacto-N-fucopentaose I and II. *Carbohydr Res* 137:127–138
47. Schwertmann A, Rudloff S, Kunz C (1995) High molecular weight glycoproteins in human milk as carriers of Lewis X-, Lewis Y-, Sialyl-Lewis A- and Sialyl-Lewis X-Epitopes. FEBS Meeting, Basel
48. Granger DN, Kubis P (1994) The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukocyte Biol* 55:662–675
49. Rudloff S, Kunz C, Pohlentz G, Diekmann L, Egge H (1996 im Druck) Urinary excretion of lactose and oligosaccharides in preterm infants fed human milk or infant formula. *Acta Paediatr*
50. Dische Z (1962) General color reactions. In: Whistler RL, Wolfrom ML (eds) *Methods in carbohydrate chemistry*, Vol 1. Academic Press, New York, pp 484–494
51. Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC (1988) Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* 333:426–431