**Streszczenie**

rozprawy doktorskiej pt.:

**Fukozylacja białek mleka ludzkiego w odniesieniu do etapów dojrzewania mleka**

Jolanta Lis-Kuberka

*Katedra i Zakład Chemii i Immunochemii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, ul. Bujwida 44a, 50-345 Wrocław, Polska*

***Wprowadzenie:*** Mleko ludzkie jest bogatym źródłem glikoprotein zawierających L-fukozę, które poza wartością odżywczą stanowi istotny element odporności wrodzonej przekazywanej dziecku podczas naturalnego karmienia. Fukozylowane glikoproteiny mogą brać udział w ochronie noworodków i niemowląt przed bakteryjnymi i wirusowymi infekcjami. Fukozylowane glikotopy glikoprotein mleka ludzkiego mogą uczestniczyć w promowaniu wczesnego rozwoju prawidłowej mikroflory bakteryjnej przewodu pokarmowego i postnatalnym dojrzewaniu aktywności jelitowej. Ponadto, mogą być źródłem egzogennej fukozy, która wykorzystana do syntezy nowo powstających glikokoniugatów błon synaptycznych w mózgu moduluje komunikację między neuronami. W związku z powyższym celem pracy była analiza względnej reaktywności fukozo-swoistych lektyn z eksponowanymi resztami α1,2-, α1,3-, i α1,6-związanej fukozy na glikoproteinach mleka ludzkiego, w tym immunoglobuliny G (IgG) w odniesieniu do etapów dojrzewania mleka, a w przypadku IgG także w odniesieniu do okołoporodowych czynników ryzyka, takich jak poród przedwczesny i matczyna infekcja.

***Materiały i metody:*** Próbki mleka kobiet w wieku 21-38 lat, które urodziły w terminie (n=186, 38-41 tydzień ciąży) oraz przed terminem (n=106, 26-37 tydzień ciąży) uzyskano z I Katedry i Kliniki Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz Katedry i Kliniki Neonatologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Zebrane próbki mleka podzielono na: wczesną siarę 1-3 dzień, siarę 4-7 dzień, mleko przejściowe 8-14 dzień oraz mleko dojrzałe 15-55 dzień laktacji. Dodatkowo próbki mleka pochodzące od kobiet, które urodziły przed terminem podzielono ze względu na występowanie u matki infekcji (n=50) i matki zdrowe (n=56). Analizę ekspresji α1,2-, α1,3- i α1,6-fukozylowanych glikotopów wykonano przy użyciu lektyno-blotingu i lektyno-IgG-ELISA z użyciem fukozo-swoistych lektyn (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA), odpowiednio: *Ulex europaeus* agglutinin (UEA), *Tetragonolobus purpureus* agglutinin (LTA) i *Lens culinaris* agglutinin (LCA). Zastosowanie fukozo-swoistych lektyn w blotingu i enzymatycznym teście fazy stałej (lektyno-IgG-ELISA) jest pomocne w uzyskaniu informacji o ekspresji biologicznie aktywnych glikotopów w ich konformacyjnie natywnej formie, które mogą reagować z endogennie występującymi selektynami, obecnymi na powierzchni komórek nabłonkowych noworodka/niemowlęcia i/lub egzogennymi bakteryjnymi lektynami. Ponadto, testy z wykorzystaniem lektyn pozwalają na jednoczesną analizą dużej ilości próbek, a także na uniknięcie skomplikowanych i kosztownych procedur związanych z izolacją poszczególnych glikoprotein z próbek mleka.

***Wyniki:*** W wyniku rozdziału SDS-PAGE prób odtłuszczonego mleka ludzkiego wykryto obecność pasm o masach cząsteczkowych w zakresie od 30 do 310 kDa (260-310 kDa; 220-225 kDa, 160-175 kDa, 155 kDa, 133 kDa, 78-86 kDa, 70-75 kDa, 63-67 kDa, 50 kDa i 30-35 kDa). Półilościowa analiza profilu fukozylacji pasm białkowych uzyskanych w wyniku lektynoblotingu wykazała spadek UEA- i LCA-reaktywnych glikotopów (α1,2- i α1,6- Fuc) podczas 47 dni laktacji, podczas gdy ekspresja LTA-reaktywnych glikotopów nie była skorelowana z etapami dojrzewania mleka.

Średnie stężenie IgG w mleku pochodzącym od matek, które urodziły przed oraz w terminie, były najwyższe (41.74 ± 17.3 mg/L oraz 27.85 ± 23.2 mg/L) dla wczesnej siary (1-3 dzień), w 4-7 dniu laktacji (siara) stężenie okazało się niższe, a w mleku przejściowym (8-14 dzień) i dojrzałym (15-55 dzień) utrzymywało się na zbliżonym poziomie w przedziale 16-18 mg/L. Analiza profilu fukozylacji IgG mleka kobiet, które urodziły w terminie oraz przed terminem (33-36 tydzień ciąży) wykazała wysoką względną zawartość UEA, LTA i LCA- reaktywnych glikotopów w przeciwieństwie do słabo lub nie rozpoznawanych przez fukozo-swoiste lektyny cząsteczek IgG osocza matek karmiących. Ponadto, IgG mleka matek, które urodziły przedwcześnie w 28-32 tygodniu ciąży wykazały niską α1,2- i α1,6- oraz wyższą α1,3-fukozylację w porównaniu do IgG mleka matek, które urodziły w terminie. Dodatkowo, wykazano, że niska względna zawartość α1,2- i wysoka α1,3- fukozylowanych glikowariantów IgG mleka matek, które urodziły przed terminem była związana z matczyną infekcją. Powyższe wyniki prac doświadczalnych opublikowano: 1) Lis-Kuberka et al.: Lectin-based analysis of human milk immunoglobulin G fucosylated variants in relation to milk maturation and perinatal risk factors. J. Appl. Biomed., 2018; DOI:10.1016/j.jab.2018.02.001 oraz 2) Lis-Kuberka et al: Lectin-based analysis of fucosylated glycoproteins of human skim milk during 47 days of lactation. Glycoconjugate J., 2015; 32:665-674; DOI 10.1007/s10719-015-9615-5, a omawiającej aktualny stan wiedzy w pracy przeglądowej: Lis-Kuberka and Orczyk-Pawiłowicz M.: Znaczenie fukozylowanych glikokoniugatów mleka ludzkiego w żywieniu noworodków i niemowląt. Post. Hig. Med. Dośw., 2015; 69:811-829; DOI: 10.5604/17322693.1162561.

***Wnioski:*** Fukozylowane glikoproteiny mleka ludzkiego mogą być rozpoznawane i wiązane przez fukozo-zależne lektyny patogenów blokując ich adhezję i wiązanie do powierzchni komórek nabłonkowych noworodka. W związku z powyższym, bogato fukozylowane glikoproteiny mleka mogą być uważane jako dodatkowy element wrodzonej odporności przekazywanej noworodkom podczas karmienia piersią. Dla noworodków urodzonych przedwcześnie i/lub urodzonych przez matkę z infekcją, mleko ludzkie jest pierwszym, bezpiecznym lekiem. Szczegółowa charakterystyka wzoru fukozylacji glikoprotein może zapewnić dodatkowe wytyczne, które mogłyby przyczynić się do właściwego doboru deponowanego mleka w Bankach Mleka najwyższej jakości, a także poprawy jakości składu sztucznych mieszanek mlecznych.

### Abstract

### of doctoral thesis entitled:

### Fucosylation of human milk proteins in relation to milk maturation stages

### Jolanta Lis-Kuberka

*Department of Chemistry and Immunochemistry, Wrocław Medical University, ul. Bujwida 44a, 50-345 Wrocław, Poland*

***Background:*** Human milk is a rich source of glycoprotein variants decorated by L-fucose. They have not only nutrition value but also constitute an essential element of innate immunity passed to the newborns during breastfeeding. Fucosylated glycoproteins may take part in the protection of the newborn and infant from bacterial and viral infections. Additionally, fucosylated glycotopes of human milk glycoproteins might promote of early development of normal bacterial flora in the newborn’s gastrointestinal tract and postnatal maturation of intestinal motor activity and also might be an exogenous source fucose used for synthesis new glycoconjugates of synaptic membrane in brain, which might facilitate communication between neurons. The aim of the study was to analyse of relative reactivity of fucose-dependent lectin with exposed unit of α1,2-, α1,3-, and α1,6-linked fucose on human milk glycoproteins and immunoglobulin G (IgG) during milk maturation stages, and also on IgG in relation to perinatal risk factors, such as preterm delivery and maternal infection.

***Materials and methods:*** Samples of term (n=186) and preterm milk (n=106) collected from mothers (from 21 to 38 years old) after term (38 to 41 weeks) and preterm (26 to 37 week) delivery, were obtained from 1st Department and Clinic of Gynecology and Obstetrics at Wroclaw Medical University and Department and Clinic of Neonatology at Wroclaw Medical University. They were classified as: early colostrum 1-3 days, colostrum 4-7 days, transitional milk 8-14 days and mature milk 15-55 days. Additionally the samples of preterm milk were divided into samples of preterm milk from mothers with (n=50) and without (n=56) infections. The expression of α1,2-, α1,3- and α1,6-fucosylated glycotopes was analyzed by the lectin-based blotting and ELISA with the use of fucose-specific *Ulex europaeus* (UEA), *Tetragonolobus purpureus* (LTA) and *Lens culinaris* (LCA) agglutinins (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA), respectively. The using of fucose-specific lectins in lectin-blotting and enzyme-linked immunosorbent assay (lectin-IgG-ELISA) was especially helpful in obtaining information about the expression of biologically active glycotopes in their conformational native form, exposed and ready to react with endogenous selectins, present on epithelial cells of newborns/infants and/or exogenous bacterial lectins. Moreover, a lectin-based test allowed for simultaneous analysis of large number of samples and avoided a labor- and cost intensive procedure of isolation of glycoproteins from human milk samples.

***Results:*** The performed SDS-PAGE of human skim milk revealed the presence of ten milk protein bands showing molecular masses ranging from 30 to 310 kDa (260–310 kDa, 220–225 kDa, 160–175 kDa, 155 kDa,133 kDa, 78–86 kDa, 70–75 kDa, 63–67 kDa, 35–50 kDa and 30 kDa).The semi-quantitative analysis of fucosylation profile of milk protein bands showed the gradual decrease of UEA- and LCA-reactive glycotopes (α1,2- and α1,6- Fuc, respectively) during 47 days of lactation, while the expression of LTA-reactive glycotope was not correlated with milk maturation stages.

The mean concentrations of human preterm and term milk IgG were the highest for early colostrum (1-3 day of lactation), at 4-7 day (colostrum) the concentrations decreased and remained at a similar level 16-18 mg/L at 8-14 day (transitional milk) and 15-55 day of lactation (mature milk). The fucosylation pattern of the IgG showed the high relative amount of UEA, LTA, and LCA- reactive glycotopes of term and preterm milk (33-36 week of gestation) IgG, whereas the maternal plasma IgG poorly or lacked them. It was also found that IgG from milk of mothers who delivered very preterm (28-32 week of gestation) showed a lower degree of α1,2- and α1,6- and higher α1,3- fucosylation compare to IgG from term milk. Additionally, it was found, that the presence of low α1,2- and high α1,3- fucosylated glycovariants of IgG in preterm milk was associated with maternal infection. The above data were published in: 1) Lis-Kuberka et al.: Lectin-based analysis of human milk immunoglobulin G fucosylated variants in relation to milk maturation and perinatal risk factors. J. Appl. Biomed., 2018; DOI:10.1016/j.jab.2018.02.001oraz 2) Lis-Kuberka et al: Lectin-based analysis of fucosylated glycoproteins of human skim milk during 47 days of lactation; DOI 10.1007/s10719-015-9615-5: Glycoconjugate J., 2015; 32:665-674; DOI 10.1007/s10719-015-9615-5, and reviewed in: Lis-Kuberka and Orczyk-Pawiłowicz M.: The significance of fucosylated glycoconjugates of human milk in nutrition of newborns and infants. Post. Hig. Med. Dośw., 2015; 69:811-829; DOI: 10.5604/17322693.1162561.

***Conclusion:*** Fucosylated glycans of milk glycoproteins might serve as soluble decoys for fucose-dependent pathogens via lectin-carbohydrate interaction and prevent adhesion to the newborns epithelial cells. In view of the foregoing, the highly fucosylated milk glycoproteins might be considered as additional element of the innate immunity transferred to newborns during breastfeeding. For newborn delivered very preterm and/or delivered by mother with infection, milk is served as biotherapeutic. Detailed characterization of fucosylation pattern of glycoproteins can provide additional guidelines for milk banking and a construction the new type of formula milk.