

Untersuchungen zur immunmodulatorischen Wirkung von
Kuhmilch auf primäre humane periphere mononukleäre
Blutzellen

von Lili Marisa Flad

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchungen zur immunmodulatorischen Wirkung von
Kuhmilch auf primäre humane periphere mononukleäre
Blutzellen

von Lili Marisa Flad
aus Ehingen (Donau)

München 2026

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Cornelia A. Deeg

Korreferent/in: Priv. -Doz. Dr. Andrea Stockmaier-Didier

Tag der Promotion: 07. Februar 2026

Meinen Lieben

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATUR	3
2.1	Kuhmilch.....	3
2.1.1	Allgemeine Milchzusammensetzung.....	3
2.1.2	Genetische Varianzen des bovinen Beta-Kaseins	6
2.1.3	Auswirkungen von Kuhmilch und Milch verschiedener Beta-Kasein- Varianten auf das Immunsystem	8
2.2	Periphere mononukleäre Blutzellen	13
2.2.1	Zusammensetzung der humanen PBMC	13
2.2.2	Einsatz von PBMC im Zusammenhang mit immunmodulatorischen Substanzen.....	15
2.2.2.1	Reaktion von PBMC auf Mitogene	15
2.2.2.2	Proteomische Charakterisierung der Immunantwort	18
3	MATERIAL UND METHODEN.....	23
3.1	Probenmaterial.....	23
3.2	Aufbereitung der Milch.....	23
3.2.1	Puffer und Lösungen zur Aufbereitung der Milch.....	23
3.2.2	Aufbereitung der Milch.....	24
3.3	Aufbereitung der Blutproben und Isolierung der PBMC	26
3.3.1	Puffer und Lösungen zur PBMC-Aufbereitung.....	26
3.3.2	Gewinnung und Isolierung von PBMC	26
3.3.3	Zählung der isolierten Zellen.....	27
3.4	PBMC-Zellproliferationsassay	27
3.4.1	Lösungen für die Zellstimulation und radioaktive Markierung	27
3.4.2	<i>In vitro</i> Stimulation und radioaktive Markierung	28
3.4.3	Statistische Auswertung der Zellproliferationsraten	30
3.5	Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen	31
3.5.1	Puffer und Lösungen für die Zellstimulation.....	31

3.5.2	Polyklonale Stimulation von PBMC für die massenspektrometrische Analyse	31
3.5.3	Puffer und Lösungen für den FASP-Verdau	33
3.5.4	Probenverdau für die Massenspektrometrie	35
3.5.5	Puffer und Lösungen für die massenspektrometrische Analyse	36
3.5.6	Massenspektrometrische Analyse	36
3.5.7	Proteinidentifikation, MS-Label-freie Quantifizierung	37
3.5.8	Statistische Analyse.....	38
3.5.9	Darstellung der massenspektrometrischen Daten zur Proteinidentifikation	40
3.5.9.1	Volcano-Plots	40
3.5.9.2	Venn-Diagramme	40
3.5.9.3	Nutzung von Datenbanken.....	41
3.5.10	Verfügbarkeit der massenspektrometrischen Daten	41
4	ERGEBNISSE	42
4.1	Milchfraktionen mit hohem molekularem Gewicht hemmten die ConA-induzierte Proliferation humaner PBMC.....	42
4.2	Proteomische Analyse der sekretierten Proteine nach ConA-Stimulation und Ko-Inkubation der Milchfraktionen.....	44
4.2.1	Das Sekretom humaner PBMC nach der Ko-Inkubation mit den Milchfraktionen umfasste 2640 humane Proteine	44
4.2.2	Identifikation von differenziell abundanten Proteinen im PBMC-Sekretom nach Ko-Inkubation mit der A1- und A2-HMGF	44
4.2.3	Identifikation von posttranslationalen Modifikationen.....	48
4.2.4	TOM1 zeigte eine signifikant erhöhte Abundanz im PBMC-Sekretom nach Ko-Inkubation mit der A1- und A2-HMGF	48
4.3	Funktionelle Verifikation von TOM1	53
5	DISKUSSION	56
6	ZUSAMMENFASSUNG	80
7	SUMMARY	82
8	LITERATURVERZEICHNIS	84

9 DANKSAGUNG	96
---------------------------	-----------

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
³ H	Tritium
ACSL1	<i>engl.</i> Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1
AP-1	Aktivator-Protein 1, <i>engl.</i> Activator protein 1
Aqua dest.	destilliertes Wasser
APCs	Antigen-präsentierende Zellen
BCM-7	β-Casomorphin-7
BRCC3	<i>engl.</i> Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36
BrdU	Bromdesoxyuridin, <i>engl.</i> 5-bromo-2-deoxyuridine
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester, <i>engl.</i> Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CD	<i>engl.</i> Cluster of differentiation
CLTC	Clathrin schwere-Kette 1
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ConA	Concanavalin A
cpm	Einheit für die [³ H] -Aktivität, <i>engl.</i> Counts per minute
DDA	datenabhängige-Erfassung, <i>engl.</i> Data-dependent acquisition
DIA	datenunabhängige-Erfassung, <i>engl.</i> Data-independent acquisition
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>engl.</i> Deoxyribonucleic acid
EdU	Ethinyldesoxyuridin, <i>engl.</i> 5-ethynyl-2-deoxyuridine
ELISA	<i>engl.</i> Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<i>engl.</i>	Englisch
EPB41	<i>engl.</i> Protein 4.1
ESI	Elektrospray-Ionisierung
FACS	Durchflusszytometrie, <i>engl.</i> Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum, <i>engl.</i> Fetal calf serum
HCD	kollisionsinduzierter Dissoziation, <i>engl.</i> Higher-energy collisional dissociation
HEK	humane embryonale Nieren (-Zellen), <i>engl.</i> Human embryonic kidney (cells)
HELA	humane Epithelzelllinie aus einem Zervixkarzinom
HMGF	Milchfraktion mit hohem Molekulargewicht (≥ 100 kDa)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, <i>engl.</i> High performance liquid chromatography
HVEM	Herpesvirus Eintritts-Mediator, <i>engl.</i> Herpesvirus entry mediator
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1R	IL-1 Rezeptor
IRAK	IL-1R-assoziierte Kinase
KCL	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KYAT3	<i>engl.</i> Kynurenine-oxoglutarate transaminase 3
KYNA	Kynurensäure
KS	Kolmogorov-Smirnov
l	Liter
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographische Tandem-Massenspektrometrie, <i>engl.</i> Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry
log2	Binärer Logarithmus
log10	Dekadischer Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mCi	Millicurie
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
	Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1
MCP-1	Myeloid-Differenzierungsfaktor
MD	Milchfettkügelchenmembran, <i>engl.</i> Milk fat globul membrane
MFGM	
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, <i>engl.</i> Major histocompatibility complex
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ms	Millisekunden
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
n	Stichprobengröße
NaCl	Kochsalz
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NH ₃ HCO ₃	Ammoniumbicarbonat
NF- κ B	Nukleärer Faktor Kappa B, <i>engl.</i> Nuclear factor kappa B
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen, <i>engl.</i> Nuclear factor of activated T-cells

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nl	Nanoliter
NMGF	Milchfraktion mit niedrigem Molekulargewicht (< 100 kDa)
ns	nicht signifikant
p	Maß der statistischen Wahrscheinlichkeit
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen <i>engl.</i> Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, <i>engl.</i> Phosphate buffered saline
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PHA	Phytohämagglutinin
Pi	Proliferationsindex
Ppm	Parts per million
PTM	Posttranslationale Modifikationen
PWM	Pokeweed-Mitogen
RPMI	Zellkulturmedium, <i>engl.</i> Roswell Park Memorial Institute
SPR	Oberflächen-Plasmonresonanz, <i>engl.</i> Surface plasmon resonance
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α , <i>engl.</i> Tumor necrosis factor- α
TOLLIP	<i>engl.</i> Toll-interacting protein
TOM1	<i>engl.</i> Target of Myb protein 1
TRAF	TNF- α -assoziiierter-Faktor
v/v	Volumenprozent
x g	Relative Zentrifugalkraft
α	Alpha
α_{s1}	Alpha-s1
α_{s2}	Alpha-s2
β	Beta
γ	Gamma
κ	Kappa

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Herstellung der Milchfraktionen ≥ 100 kDa (HMGF) und < 100 kDa (NMGF) der A1- und A2-Milch.....	25
Abbildung 2: Ablauf der Probenaufbereitung für die massenspektrometrische Messung und der Analyse der MS-Daten.....	39
Abbildung 3: Effekte der NMGF und der HMGF von A1- und A2-Milch auf die ConA-induzierte Proliferation humaner PBMC (n = 10).....	43
Abbildung 4: Differenziell abundante Proteine im PBMC-Sekretom nach ConA-Stimulation und Ko-Inkubation mit der A1-HMGF sind als Volcano-Plot dargestellt.....	45
Abbildung 5: Differenziell abundante Proteine im PBMC-Sekretom nach ConA-Stimulation und Ko-Inkubation mit der A2-HMGF sind als Volcano-Plot dargestellt.....	46
Abbildung 6: Proteine mit verminderter Abundanz im PBMC-Sekretom nach ConA-Stimulation und Ko-Inkubation mit der A1- bzw. A2-HMGF.....	47
Abbildung 7: TOM1 wurde als einziges Protein nach Ko-Inkubation mit der A1- und der A2-HMGF mit erhöhter Abundanz im Sekretom der PBMC identifiziert.	51
Abbildung 8: Aminosäuresequenz des humanen TOM1-Proteins.	52
Abbildung 9: Effekt aufsteigender TOM1-Konzentrationen auf die ConA-induzierte Proliferation humaner PBMC (n = 9).	54

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Proteine mit signifikant erhöhter Abundanz im PBMC-Sekretom nach Ko-Inkubation mit der A1-HMGF.....	49
Tabelle 2: Proteine mit signifikant erhöhter Abundanz im PBMC-Sekretom nach Ko-Inkubation mit der A2-HMGF.....	50

1 EINLEITUNG

Milch dient schon seit mehreren Jahrtausenden als Nahrungsmittel des Menschen (EVERSHED et al., 2008; EVERSHED et al., 2022), wobei heutzutage Kuhmilch den größten Anteil der Konsummilch ausmacht (CIMMINO et al., 2023; JAYAMANNA MOHOTTIGE et al., 2025; OECD/FAO, 2025). Trotz dieser langen Verwendung von Milch als Lebensmittel, sind immer noch nicht alle Auswirkungen des Milchkonsums auf den menschlichen Organismus bekannt. Neben ihrer reinen ernährungsphysiologischen Bedeutung werden Kuhmilch inzwischen weitere Einflüsse auf die Gesundheit und dabei auch auf das Immunsystem des Menschen zugesprochen (BORDONI et al., 2017; BOGAHAWATHTHA et al., 2018; PERCEGUETTI et al., 2024). Ein besonderer Fokus liegt hier auf den aus der Kuhmilch stammenden Proteinen, die sich zum Großteil aus den vier Untergruppen der Kaseine und den Molkenproteinen zusammensetzen (LOKUGE et al., 2024). Dabei waren unter anderem die Kaseine Bestandteil von bisherigen Untersuchungen, da vor allem den beiden verbreitetsten Varianten des Beta (β)-Kaseins, der A1- und A2-Variante (JANN et al., 2002), jeweils unterschiedliche positive sowie negative Effekte auf die menschliche Gesundheit zugeschrieben wurden (GONZALES-MALCA et al., 2023; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2025). Allerdings setzen sich die Milchproteine neben den hochabundanten Hauptkomponenten zusätzlich aus unzähligen weiteren, niedrig abundanten Proteinen zusammen (MAITY et al., 2020; DAS et al., 2022; CHE et al., 2025). Da Milch aufgrund ihrer hochkomplexen Zusammensetzung und der sehr großen Spannweite der Protein-Abundanzen ein schwierig zu analysierendes Medium darstellt (GREENWOOD & HONAN, 2019; DAS et al., 2022; ACQUAVIA et al., 2025), sind viele dieser niedrig abundanten Proteine noch nicht bekannt und zusätzlich bereits identifizierte Proteine funktionell nicht charakterisiert (DAS et al., 2022; STASTNA, 2024; CHE et al., 2025), so dass diese potenziell Effekte auf den menschlichen Organismus und im Speziellen das Immunsystem haben könnten. Dabei sind sowohl die Wirkung der Milch beider β -Kasein-Varianten auf das humane Immunsystem als auch die zugrundeliegenden Mechanismen bislang unzureichend verstanden.

Deshalb war es Ziel dieser Doktorarbeit, die Wirkung von Kuhmilch beider β -Kasein Varianten auf das humane Immunsystem auf zellulärer Ebene detaillierter zu

charakterisieren. Der Auslöser eines bereits beschriebenen anti-inflammatorischen Effekts sowohl von A1- als auch von A2-Milch auf Concanavalin A (ConA) -stimulierte humane periphere mononukleäre Blutzellen (*engl.* Peripheral blood mononuclear cells, PBMC) *in vitro* (GARD et al., 2024) sollte dabei anhand der Auftrennung von Milchproteinen nach molekularem Gewicht in je zwei Fraktionen weiter eingegrenzt werden. Mit einem funktionellen *in vitro* Ansatz und einem hochauflösenden proteomischen Ansatz sollte dabei die Immunantwort der PBMC auf die Milchfraktionen detaillierter untersucht werden, um den zugrundeliegenden Mechanismus des anti-inflammatorischen Effekts (GARD et al., 2024) näher zu untersuchen.

2 LITERATUR

2.1 Kuhmilch

2.1.1 Allgemeine Milchzusammensetzung

Kuhmilch wird weltweit als Lebensmittel verwendet (OECD/FAO, 2025). Aufgrund ihrer vielfältigen Nährstoffe liefert sie eine Vielzahl ernährungsphysiologisch bedeutender Inhaltsstoffe (ACQUAVIA et al., 2025). Dazu zählen zum einen Makronährstoffe, darunter hochwertige Proteine mit einem wertvollen Aminosäureprofil, MilCHFett mit seiner spezifischen Zusammensetzung aus kurzkettigen und langkettigen Fettsäuren, Kohlenhydrate in Form von Laktose und zum anderen essenzielle Mikronährstoffe wie Kalzium, Phosphor und verschiedene Vitamine (MÄRTLBAUER & BECKER, 2016; DAS et al., 2022; ACQUAVIA et al., 2025; ZHANG et al., 2025b). Neben den enthaltenen Makro- und Mikronährstoffen mit klassischer Nährstofffunktion enthält Milch darüber hinaus eine Vielzahl bioaktiver Komponenten wie Hormone, Enzyme, Immunglobuline und Peptide (ZHANG et al., 2025b). Kuhmilch besteht durchschnittlich zu 87 % aus Wasser und enthält des Weiteren 4,6 % Kohlenhydrate, 4,3 % Fett, 3,4 % Protein, 0,7 % Mineralien und 0,01 % Vitamine, sowie sonstige Inhaltsstoffe (LINDMARK-MÅNSSON et al., 2003). Durch verschiedene Faktoren wie Rasse, Jahreszeit, Standort und Fütterung kann die prozentuale Verteilung der Inhaltsstoffe jedoch schwanken (FRANZOI et al., 2019; ZOU et al., 2024). Die Milchproteine stellen aufgrund ihres Aminosäureprofils und ihrer guten Verfügbarkeit den wichtigsten nutritiven Bestandteil der Milch dar (MCGREGOR & POPPITT, 2013; DAS et al., 2022; CHE et al., 2025) und bestehen zu ungefähr 80 % aus Kaseinen, zu ungefähr 18-20 % aus Molkenproteinen und zu 1 – 4 % aus Proteinen assoziiert mit der MilCHFettkügelchenmembran (*engl.* Milk fat globule membrane, MFGM) (CERBULIS & FARRELL, 1975; NING et al., 2023; STASTNA, 2024). Die Kaseine umfassen vier Untergruppen (FARRELL et al., 2004; CHE et al., 2025), deren Gene gebündelt in einem Abschnitt von 250 Kilobasen auf Chromosom sechs liegen (THREADGILL & WOMACK, 1990; DE VASCONCELOS et al., 2023). Dabei kodieren die Gene CSN1S1, CSN1S2, CSN2, und CSN3 jeweils für das Alpha-s1 (α_{s1}) -, Alpha-s2 (α_{s2}) -, Beta (β) - und Kappa (κ) -Kasein (THREADGILL & WOMACK, 1990). Prozentual

betrachtet machen die vier Kaseine jeweils 28,4 % für α_{s1} -Kasein, 9,6 % für α_{s2} -Kasein, 30,2 % für β -Kasein und 16,4 % für κ -Kasein am Gesamtprotein der Kuhmilch aus (MOTA et al., 2023). Die Molkenproteine als zweitgrößte Fraktion der Milchproteine umfassen eine Vielzahl an globulären Proteinen, wobei β -Laktoglobulin mit 12,3 % und α -Laktalbumin mit 2,7 % des Gesamtproteingehaltes der Kuhmilch den größten Anteil ausmachen (MOTA et al., 2023). Die MFGM umgibt Fetttröpfchen in der Milch und stellt eine heterogene Mischung aus Lipiden und diversen Proteinen dar (BRINK & LONNERDAL, 2020; NING et al., 2023), wobei die Proteine der MFGM in Kuhmilch größtenteils membranassoziierte Proteine umfassen (REINHARDT & LIPPOLIS, 2006). Sowohl die Zusammensetzung der Kaseine als auch die Anteile der Molkenproteine unterliegen rassebedingten, saisonalen und fütterungsbedingten Abweichungen und sind zudem abhängig vom Laktationsstatus der Kuh (FRANZOI et al., 2019; ZOU et al., 2024). Die Synthese der Milchproteine bestimmt neben der Milchfettsynthese hauptsächlich die Laktationskapazität (ZHANG et al., 2025b). Die physiologische Grundlage der Milchbildung liegt in der hochspezialisierten Funktion des Eutergewebes, insbesondere der Alveolarepithelzellen (CHE et al., 2025), die während des Übergangs von Trächtigkeit zur Laktation sekretorisch aktiv werden und diesen sekretorisch aktiven Zustand während der Laktation beibehalten (JASWAL et al., 2022; KWON et al., 2024). Ein wesentlicher Teil der Milchproteine wird *de-novo* in diesen Zellen synthetisiert (MÄRTLBAUER & BECKER, 2016). Dazu zählen alle vier Untergruppen der Kaseine sowie die Molkenproteine wie β -Laktoglobulin und α -Laktalbumin, die über Exozytose in die Milch abgegeben werden. Ergänzend gelangen Proteine wie Serumalbumin und Immunglobuline aus dem Blutplasma durch transzelluläre Transportmechanismen in die Milch (MÄRTLBAUER & BECKER, 2016). Die Regulation der Milchproteinsynthese unterliegt vielfältigen Faktoren, wobei der hormonelle Status und die Aminosäureverfügbarkeit essenziell sind (ZHANG et al., 2025b). Zentral ist hierbei die Aminosäureverfügbarkeit und damit die Aktivierung intrazellulärer Signalwege, die direkt in die Transkriptions- und Translationsprozesse eingreifen und die Expression der Gene der Milchproteine steuern (ZHANG et al., 2025b). Trotz dieser detaillierten Kenntnisse und der langen Verwendung von Milch als Lebensmittel bleibt die Milchmatrix in vielen Aspekten noch unvollständig charakterisiert (IMPERIALE et al., 2023; STASTNA, 2024). So sind insbesondere niedrig abundante Proteine bislang nicht vollständig erfasst (STASTNA, 2024). In

aktuellen proteomischen Untersuchungen wurde versucht, das Proteom der Milch weiter zu charakterisieren und durch sich stetig entwickelnde Methoden und Techniken wurden dabei immer mehr Proteine in der Milch entdeckt (STASTNA, 2024; VESHKINI et al., 2024; ACQUAVIA et al., 2025). Allerdings stellt Milch als zu untersuchende Matrix aufgrund der hohen biologischen Variabilität, den verschiedenen genetischen Varianten der Proteine (DAS et al., 2022) und generell das breite Spektrum der Komponenten auch hinsichtlich Molekülgröße und Konzentration eine komplizierte und dynamische Probe dar (GREENWOOD & HONAN, 2019; ACQUAVIA et al., 2025). Eine besondere Herausforderung stellt dabei die große Spannbreite der Protein-Abundanzen der Milch dar, wobei die hoch abundanten Proteine wie Kaseine die Detektion der niedrig abundanten Proteine ausgesprochen kompliziert machen (GREENWOOD & HONAN, 2019; DAS et al., 2022). In einer Datenbank für bovine Milchproteine wurden erstmals 2019 alle in bisherigen Publikationen veröffentlichten Proteine der Milch gesunder Kühe erfasst, wobei sich die Anzahl auf 4654 identifizierte Milchproteine belief (DELOSIERE et al., 2020). Eine weitere Datenbank fasste im gleichen Jahr ebenfalls die bis zu diesem Zeitpunkt identifizierten Milchproteine aus den veröffentlichten Publikationen händisch zusammen und kam auf eine Zahl von 3159 Proteinen (MAITY et al., 2020). Nach drei Jahren wurde diese Datenbank aktualisiert, wobei diesmal 7459 neu identifizierte Proteine ergänzt wurden und sich so eine Gesamtzahl von 10642 identifizierter Milchproteine ergab (DAS et al., 2022). Das verdeutlicht die stetige Entwicklung der analytischen Techniken und das wachsende Interesse am Milchproteom, wobei die Anzahl der bis zum heutigen Zeitpunkt identifizierten Proteine unklar ist, da diese Datenbanken (DELOSIERE et al., 2020; DAS et al., 2022) seitdem nicht mehr aktualisiert wurden. Von den bis zum Jahr 2022 identifizierten 10642 Proteinen wurden in der Datenbank 1789 Proteine als „defined proteins“ kategorisiert (DAS et al., 2022). Dies bedeutet, dass weitere Informationen, wie beispielsweise zur biologischen Protein-Funktion in der Datenbank, bezogen aus veröffentlichter Literatur, zur Verfügung stehen (DAS et al., 2022). Die Datenbank (MAITY et al., 2020; DAS et al., 2022) zeigt deutlich, wie viele Proteine der Milch nicht bekannt waren und dass wahrscheinlich viele Proteine noch bis heute unbekannt sind. Zudem wird ersichtlich, wie viele bereits identifizierte Proteine in der Milch noch unzureichend charakterisiert sind und deren potenzielle Funktionen, Interaktionspartner und Wirkungen, auch im Hinblick auf den Konsum durch den

Menschen, weiterhin fraglich sind.

2.1.2 Genetische Varianzen des bovinen Beta-Kaseins

Die Kaseine machen mit rund 80 % den größten Anteil am Gesamtprotein der Kuhmilch aus (CERBULIS & FARRELL, 1975). Dabei entfallen rund 30 % des Gesamtproteins auf das β -Kasein, das eine der vier Untergruppen des Kaseins darstellt (MOTA et al., 2023). Die vier Kaseinuntergruppen kommen alle in verschiedenen Varianten vor, die durch genetischen Polymorphismus bedingt sind (NADUGALA et al., 2022). Genetischer Polymorphismus bezeichnet das Vorkommen mehrerer Allele eines Genes an einem Gen-Locus und kann durch Ereignisse wie Substitution, Insertion oder Deletion von einzelnen oder mehreren Nukleotiden im Genom vorkommen (NADUGALA et al., 2022). Das führt zu ähnlichen Aminosäuresequenzen der Kaseine, die durch Austausch, Einfügen oder Löschen einer oder mehrerer Aminosäuren geringgradig voneinander abweichen (FARRELL et al., 2004; NADUGALA et al., 2022).

Für das β -Kasein sind bisher 17 dieser genetisch bedingten Varianten bekannt, die sich jeweils in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden: A1, A2, A3, A4, B, B2, C, D, E, F, G, H1, H2, I, J, K und L (NADUGALA et al., 2022). Dabei sind die A1- und die A2-Variante die am häufigsten vorkommenden Varianten in der Population der Milchrinder in Europa (FARRELL et al., 2004; MASSELLA et al., 2017). Es wird angenommen, dass die A2-Variante dabei die „Ur-Variante“ darstellt, da in ursprünglichen Rinderrassen wie zum Beispiel dem Zebu ausschließlich das β -Kasein der A2-Variante vorliegt (AYAZ et al., 2023). Man geht daher davon aus, dass aus der A2-Variante die weiteren Varianten entstanden sind, unter anderem auch die A1-Variante (JIMENEZ-MONTENEGRO et al., 2022; RAMAKRISHNAN et al., 2023). Die A1- und A2-Variante unterscheiden sich nur durch einen Aminosäureaustausch an Position 67 im β -Kasein (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2025; WANG et al., 2025), ausgelöst durch eine Basenmutation im CSN2, dem kodierenden Gen für das β -Kasein (THREADGILL & WOMACK, 1990; WANG et al., 2025). Bei der Basenmutation handelt es sich um einen Basenaustausch im Nukleotid, bei der Cytosin im Basentriplett CCT, das für die Aminosäure Prolin kodiert, gegen Adenosin

ausgetauscht wird und somit das für Histidin kodierende Basentriplett CAT entsteht (DAI et al., 2016). Somit befindet sich bei der A1-Variante des β -Kaseins an Position 67 nicht wie bei der A2-Variante die Aminosäure Prolin, sondern Histidin (WANG et al., 2025). Auch andere β -Kasein Varianten unterliegen dieser Mutation und werden aufgrund des vorliegenden Histidins anstelle des Prolins an Position 67 auch dem A1-Subtyp zugeordnet (SEBASTIANI et al., 2020; WANG et al., 2025). Dazu gehören die Varianten B, C, F und G, die sich allerdings durch mindestens eine weitere Aminosäuresubstitution von der A1-Variante abgrenzen (SEBASTIANI et al., 2020). Alle β -Kaseine mit Prolin an Position 67 werden im Umkehrschluss dem A2-Subtyp zugeordnet (UL HAQ et al., 2014; SEBASTIANI et al., 2020). In anderen Spezies, wie auch dem Menschen existiert nur die A2-Variante des β -Kaseins (PRATELLI et al., 2024).

Rinder können je nach Genetik entweder homozygote oder heterozygote Träger der β -Kasein CSN2 Gen Allele sein (SEBASTIANI et al., 2020; DE VASCONCELOS et al., 2023). In Holstein-Friesian Rindern in Italien wurde eine Verteilung von 3 homozygoten und 10 heterozygoten Varianten entdeckt, wobei A2/A2 mit 37,0 % und A1/A1 mit 9,9 % die dominierenden homozygoten Genotypen darstellten und A1/A2 mit 35,8 %, A2/B mit 7,6 % und A2/I mit 3,9 % den Großteil der heterozygoten Genotypen ausmachten (SEBASTIANI et al., 2020). In einer anderen Rinderpopulation derselben Rasse in Pakistan wurde im Gegensatz dazu eine Verteilung von 17 % A2/A2, 50 % A1/A1 und 33 % A1/A2 festgestellt (AYAZ et al., 2023). Ebenso bei der Rasse Holstein-Friesian wurde bei einer Population in der Türkei eine Verteilung von 29 % A2/A2, 24 % A1/A1 und 47 % A1/A2 und im Simmentaler Rind eine Verteilung von 28 % A2/A2, 16 % A1/A1 und 56 % A1/A2 festgestellt (SAHIN & BOZTEPE, 2023). Jersey Rinder hatten in dieser Studie zum Großteil den Genotyp A2/A2 mit 60 % und gleichzeitig den geringsten Anteil des Genotyps A1/A1 mit 3 % (SAHIN & BOZTEPE, 2023). Jersey Rinder in Pakistan zeigten gegensätzlich dazu zu 68 % den Genotyp A1/A1 und den Genotyp A2/A2 nur zu 14 %, die restlichen 18 % entfielen auf den Genotyp A1/A2 (AYAZ et al., 2023). Die Verteilung der Allele kann also stark zwischen den untersuchten Populationen variieren. Für die Milch der Rinder bedeuten die Genotypen, dass homozygote A1/A1 Rinder nur A1 β -Kasein und homozygote A2/A2 Rinder nur A2 β -Kasein in die Milch abgeben (MASSELLA et al., 2017), was im Folgenden entsprechend als A1-Milch oder A2-Milch bezeichnet wird. Heterozygote

Rinder mit dem Genotyp A1/A2 können dagegen beide β -Kasein Varianten in die Milch abgeben (RAFIQUE et al., 2019).

2.1.3 Auswirkungen von Kuhmilch und Milch verschiedener Beta-Kasein-Varianten auf das Immunsystem

Neben der Funktion von Kuhmilch als wichtige Quelle wertvoller Nährstoffe (ACQUAVIA et al., 2025), werden ihr weitere Wirkungen auf den menschlichen Organismus und dabei auch auf das Immunsystem zugesprochen (BORDONI et al., 2017; PRATELLI et al., 2024). In den letzten Jahren wurden bereits mehrere Studien durchgeführt, die einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Konsum von Milch und Milchprodukten und immunologischen Effekten am gesunden Menschen untersuchten. Diese Untersuchungen basierten überwiegend auf Umfragen oder epidemiologischen Erhebungen, die methodisch häufig lückenhaft waren und nur eingeschränkte Rückschlüsse auf konkrete immunmodulatorische Wirkungen von Milch zulassen (PANAGIOTAKOS et al., 2010; BAARS et al., 2019).

Beispielsweise wurden mittels retrospektiver Umfrage in der US-amerikanischen Bevölkerung die Auswirkungen einer Ernährungsumstellung von verarbeiteter Milch und Milchprodukten auf Rohmilch und Rohmilch-Produkte unter anderem auf den Immunstatus untersucht (BAARS et al., 2019). Die insgesamt 171 gesunden Teilnehmer bewerteten dabei ihren Immunstatus vor der Umstellung und nach der mindestens 2 Monate andauernden Umstellung auf Rohmilch und Rohmilch-Produkte selbstständig (BAARS et al., 2019). Anhand eines Fragebogens wurde erfasst, wie häufig die Teilnehmer an Beschwerden wie beispielsweise Erkältung, plötzlichem Fieber oder Muskel- und Gelenkschmerzen litten und aus diesen Angaben der Immunstatus bestimmt (BAARS et al., 2019). Unter diesen Teilnehmern konnte durch die Umstellung auf den Konsum von Rohmilch und Rohmilch-Produkte eine signifikante Verbesserung des Immunstatus festgestellt werden, wobei nicht angegeben wurde, welche Beschwerden durch die Umstellung als seltener auftretend bewertet wurden (BAARS et al., 2019). Welche Mechanismen durch die Ernährungsumstellung ausgelöst wurden, die zur subjektiven Verbesserung des Immunstatus führten, wurden ebenfalls nicht untersucht (BAARS et al., 2019). Wie von den Autoren selbst angemerkt, hätte ein Doppelblind-Versuch und eine Investigation

ab dem Zeitpunkt der Ernährungsumstellung aussagekräftigere Ergebnisse hervorbringen können, und es sollten weitere, prospektive oder experimentelle Studien zur Bestätigung der Ergebnisse durchgeführt werden (BAARS et al., 2019), die es seitdem aber nicht gab. Ein ebenfalls positiver Effekt durch Rohmilch konnte in einer epidemiologischen Studie festgestellt werden, in welcher der Zusammenhang zwischen Rohmilch-Konsum im frühen Kindesalter und dem Auftreten von Asthma und Allergien bei Kindern in Europa, unter anderem in Süddeutschland, untersucht wurde (LOSS et al., 2011). Die Daten zum Milch-Konsum der 8334 sechs bis zwölf Jahre alten Kinder wurden mittels Fragebögen, die durch die Eltern ausgefüllt wurden, erhoben. Zudem wurden von 7606 dieser Kinder Blutproben für einen IgE-Test zur Verfügung gestellt (LOSS et al., 2011). Die Auswertung der Daten zeigte, dass der Konsum von Rohmilch im Vergleich zum Konsum von kommerziell verarbeiteter Milch im frühen Kindesalter einen signifikanten protektiven Effekt auf die Ausbildung von Asthma, Atopie und Heuschnupfen hatte (LOSS et al., 2011). Durch zusätzliche Analyse von 800 Milchproben aus den teilnehmenden Haushalten, wurde ein Zusammenhang zwischen hohen Gehalten von drei Molkenproteinen (bovines Serumalbumin, α -Laktalbumin und β -Laktoglobulin) und verringerter Entwicklung von Asthma, jedoch nicht Atopie, ermittelt (LOSS et al., 2011). Dieser festgestellte Zusammenhang wurde in dieser Studie aber nicht tiefergehend erforscht (LOSS et al., 2011). Zudem wurden der spezifische Mechanismus und die auslösenden Faktoren hinter dem festgestellten protektiven Effekt der Rohmilch in dieser Studie nicht detaillierter untersucht und konnten auch in anderen Untersuchungen bis heute nicht endgültig identifiziert werden (LOSS et al., 2011; WEBER et al., 2024). Neben diesen epidemiologischen Studien, in denen ein rein anti-inflammatorischer Effekt von Rohmilch festgestellt wurde, wurde *in vitro* die Wirkung von entfetteter, nicht-hitzebehandelter Milch auf humane PBMC untersucht (BOGAHAWATHTHA et al., 2018). Dabei konnte eine veränderte Zytokinsekretion mit anti- und pro-inflammatorischen Zytokinen nachgewiesen werden (BOGAHAWATHTHA et al., 2018). Hierfür wurden PBMC über 96 Stunden mit entfetteter nicht-hitzebehandelter Milch inkubiert und die sekretierten Zytokine anschließend mittels quantitativem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt, wobei PBMC ohne Milch-Inkubation als Negativ-Kontrolle dienten (BOGAHAWATHTHA et al., 2018). Unter diesen Bedingungen wurde nach Milch-Inkubation ein signifikanter Anstieg des

immunregulatorischen Zytokins Interleukin (IL) -10 und ein geringer, wenn auch nicht signifikanter Anstieg des pro-inflammatorischen Zytokins Interferon- γ (IFN- γ) festgestellt (BOGAHAWATHTHA et al., 2018). Der auslösende Faktor aus der verwendeten Milch oder zelluläre Mechanismen, die zu dieser Veränderung in der Zytokinsekretion führten, wurden nicht untersucht, sondern von den Autoren als T-Helfer (Th) 2-Zellen vermittelte Antwort hypothetisiert (BOGAHAWATHTHA et al., 2018). Im Gegensatz zu dieser gemischten Zytokinsekretion (BOGAHAWATHTHA et al., 2018) konnte in anderen Immunzellen, der murinen Makrophagen-Zelllinie Raw 264.7, eine rein pro-inflammatorische Zytokinsekretion nach Rohmilch-Inkubation nachgewiesen werden (PERCEGUETTI et al., 2024). Die Zellen wurden für vier Stunden mit roher Milch inkubiert, wobei Zellen ohne Milch-Inkubation unter sonst identischen experimentellen Bedingungen als Negativ-Kontrolle dienten (PERCEGUETTI et al., 2024). Nachfolgend wurden die Mengen der pro-inflammatorischen Marker Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und IL-6 im Sekretom der Zellen mittels ELISA ermittelt (PERCEGUETTI et al., 2024). Dabei konnte eine hochsignifikante Steigerung der beiden Entzündungsmarker TNF- α und IL-6 nach Rohmilch-Inkubation ermittelt werden (PERCEGUETTI et al., 2024). Die vorausgewählten Parameter dieser Studie umfassten ausschließlich pro-inflammatorische Zytokine und eine Messung von beispielsweise immunregulatorischen Zytokinen wurde nicht durchgeführt (PERCEGUETTI et al., 2024). Auch tiefergehende Untersuchungen zur ermittelten Zytokin-Sekretion fehlen, so dass der auslösende Faktor und die dahinterliegenden zellulären Prozesse unerforscht blieben (PERCEGUETTI et al., 2024). Diese unterschiedlichen Ergebnisse sowohl der *in vivo* als auch *in vitro* Studien legen nahe, dass Kuhmilch vielfältige Effekte auf das Immunsystem haben kann. Die Bestimmung von Zytokin-Werten in den *in vitro* Untersuchungen gaben Hinweise auf immunregulatorische sowie pro-inflammatorische Vorgänge, jedoch ist eine holistische Untersuchung der sekretierten Stoffe durch die Messung von vorausgewählten Parametern nicht gegeben (MCGUIRE et al., 2008). Es wird zudem klar, dass weder die Faktoren der Milch, die zu den beschriebenen Effekten führten, noch die dahinterliegenden Mechanismen identifiziert sind.

Auch die Effekte von A1- und A2-Milch bzw. den A1- und A2- β -Kaseinen auf das Immunsystem waren bereits Bestandteil verschiedener Untersuchungen

(GONZALES-MALCA et al., 2023; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2025). Allerdings lag der Fokus dabei vor allem auf den verdauten Kaseinen, denn durch den Aminosäureaustausch an Position 67 des β -Kaseins soll es beim Konsum der A1-Milch im Vergleich zur A2-Milch während des Verdauvorganges vermehrt zur enzymatischen Spaltung an dieser Stelle des A1- β -Kaseins kommen (DE VASCONCELOS et al., 2023). Dadurch wird das Peptid β -Casomorphin-7 (BCM-7), das aus sieben Aminosäuren besteht, freigesetzt (BRANTL & TESCHEMACHER, 1979; CIESLINSKA et al., 2007; ASLEDOTTIR et al., 2018). Die vermehrte Freisetzung aus dem A1- β -Kasein im Gegensatz zum A2- β -Kasein wurde bereits in mehreren *in vitro* Verdau-Simulationen nachgewiesen (ASLEDOTTIR et al., 2018; GARD et al., 2024), wobei die konkreten Mengen deutlich schwanken (ASLEDOTTIR et al., 2018; LAMBERS, 2021; CATTANEO et al., 2023; GARD et al., 2024). Seit BCM-7 entdeckt wurde, war es Teil von Studien, in denen die Auswirkungen des Peptids, der A1-Milch und der A2-Milch auf die humane Gesundheit untersucht werden (ELITSUR & LUK, 1991; GONZALES-MALCA et al., 2023; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2025). BCM-7, und damit die A1-Milch, wurde dabei mit verschiedenen Erkrankungen und negativen gesundheitlichen Effekten in Zusammenhang gebracht, wohingegen der A2-Milch positive Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit zugeschrieben wurden (BROOKE-TAYLOR et al., 2017; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2025; NOVIKA et al., 2025). Allerdings konnten diese Zusammenhänge bisher nicht ausreichend belegt werden (DE VASCONCELOS et al., 2023; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2025) und die Datenlage ist mangelhaft, was auch dazu führte, dass die Bewertung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit im Jahr 2009 keinen Zusammenhang zwischen BCM-7 bzw. der A1-Milch und den negativen gesundheitlichen Auswirkungen feststellen konnte (GROUP, 2009). Untersuchungen, die Auswirkungen auf das Immunsystem der A1- bzw. A2-Variante des β -Kaseins behandelten, bestanden meist aus *in vivo* Fütterungsversuche mit Mäusen oder Ratten (BARNETT et al., 2014; UL HAQ et al., 2014; YADAV et al., 2020; LIU et al., 2022). Beispielsweise wurden in Swiss-Albino Mäusen die Effekte von aus Milch isoliertem β -Kasein verschiedener Varianten (A1/A1, A1/A2, A2/A2) auf die Darm-Immunantwort untersucht (UL HAQ et al., 2014). Nach 30-tägiger Fütterung mit einer der drei isolierten Kasein-Varianten wurden die Werte verschiedener festgelegter Parameter wie Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1 (MCP-1), IL-4, IgG, IgE und IgA in der

Darmflüssigkeit mittels quantitativem ELISA bestimmt (UL HAQ et al., 2014). Die Werte für IgA zeigten keine Veränderung nach Fütterung mit allen drei Varianten im Vergleich zu den nicht mit Kasein gefütterten Mäusen (UL HAQ et al., 2014). Dahingegen kam es zu einem signifikanten Anstieg des pro-inflammatorischen MCP-1 nach Fütterung mit allen drei Varianten im Vergleich zu den nicht mit Kasein gefütterten Mäusen, wobei nach A1/A1-Fütterung die höchsten MCP-1-Werte gemessen wurden (UL HAQ et al., 2014). Ausschließlich nach Fütterung mit der A1/A1- und A1/A2-Variante wurde ein signifikanter Anstieg von IL-4, IgE und IgG im Vergleich zu den nicht mit Kasein gefütterten Mäusen ermittelt (UL HAQ et al., 2014). Aufgrund der erhöhten Parameter wie beispielsweise IL-4 wurde hypothetisiert, dass die A1-Varianten durch Aktivierung des Signalwegs der Th2-Zellen zur Inflammation im Darm führten (UL HAQ et al., 2014), jedoch wurde der Mechanismus hinter der unterschiedlichen Anreicherung der gemessenen Parameter innerhalb dieser Studie nicht untersucht (UL HAQ et al., 2014). Die pro-inflammatorische Wirkung der A1-Varianten konnten in einer anderen Studie, ebenfalls durchgeführt an Mäusen, nicht bestätigt werden. Nach vierwöchiger Fütterung der Mäuse, entweder mit einer A1/A2- oder einer A2/A2-Milch-Diät, ergaben sich nach A1/A2-Fütterung keine Unterschiede im Immunstatus im Vergleich zu nicht mit Milch gefütterten Mäusen (LIU et al., 2022). Ausschließlich nach A2/A2-Fütterung wurden signifikant höhere Serumkonzentrationen an IgE und IgG im Vergleich zu nicht mit Milch gefütterten Mäusen festgestellt (LIU et al., 2022). Bei den Serumwerten der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-5 ergab sich weder nach Fütterung mit A1/A2- noch mit A2/A2-Milch ein Unterschied zu den nicht mit Milch gefütterten Mäusen (LIU et al., 2022). Der exakte Mechanismus hinter der Erhöhung der IgG- und IgE-Serumwerte konnte in dieser Untersuchung nicht ermittelt werden (LIU et al., 2022) und die alleinige Messung vorausgewählter Zytokine und Inflammationsmarker mittels ELISA in beiden Studien (UL HAQ et al., 2014; LIU et al., 2022) ermöglichte keinen umfassenden Blick auf die sekretierten Produkte (MCGUIRE et al., 2008). Es zeigt sich also, dass nicht nur die Studienlage zur allgemeinen Wirkung der Milch auf das humane Immunsystem lückenhaft und teilweise widersprüchlich ist, sondern ebenso die Untersuchungen zu den Effekten der A1- und A2-Milch, wobei Studien, zum direkten Effekt der beiden Varianten auf humane Zellen fehlten. Unsere Arbeitsgruppe hat sich deshalb ebenfalls mit der Wirkung von A1- und A2-Milch auseinandergesetzt und die Wirkung von Milch

beider β -Kasein-Varianten auf humane Immunzellen *in vitro* untersucht (GARD et al., 2024). In diesen Untersuchungen wurde die Proliferationsrate der Zellen unter verschiedenen Bedingungen mittels [^3H] -Thymidin-Inkorporation bestimmt (GARD et al., 2024). Dafür wurde die A1- und A2-Milch einem *in vitro*-Verdau unterzogen und nachfolgend in PBMC-Zellproliferationsassays eingesetzt (GARD et al., 2024). Die humanen PBMC wurden *in vitro* für 48 Stunden mit ConA polyklonal stimuliert und mit der verdauten A1- bzw. A2-Milch ko-inkubiert (GARD et al., 2024). Dabei konnte weder durch die verdaute A1-Milch noch durch die verdaute A2-Milch ein signifikanter Effekt auf die ConA-induzierte Proliferation festgestellt werden (GARD et al., 2024). Zusätzlich wurde unverdaute, also lediglich entfettete und nicht-hitzebehandelte A1- und A2-Milch unter identischen experimentellen Bedingungen in Zellproliferationsassays getestet (GARD et al., 2024). Dabei wurde festgestellt, dass sowohl die A1-Milch als auch die A2-Milch einen hochsignifikanten anti-proliferativen und dadurch anti-inflammatorischen Effekt auf die ConA-stimulierten humanen PBMC ausübte (GARD et al., 2024). Interessanterweise konnten beide Milchvarianten diesen Effekt hochsignifikant und dabei gleich stark vermitteln (GARD et al., 2024). Der Mechanismus hinter diesem hochsignifikanten anti-inflammatorischen Effekt der A1- bzw. A2-Milch war nicht Bestandteil dieser Untersuchungen und ist bisher nicht geklärt (GARD et al., 2024). Weitere Studien, in denen die getrennte Wirkung von A1- bzw. A2-Milch auf humane, polyklonal stimulierte PBMC untersucht wurde, existieren bis heute nicht (PubMed-Recherche, Stand: 28.09.2025). Zusammenfassend wird deutlich, dass Informationen zu Auswirkungen von Milch im Allgemeinen sowie der A1- bzw. A2-Milch auf das humane Immunsystem fehlen und es dabei insbesondere an Einblicken in zelluläre Mechanismen hinter den vermittelten Effekten mangelt. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, den beschriebenen anti-inflammatorischen Effekt von A1- bzw. A2-Milch auf polyklonal stimulierte humane PBMC näher zu charakterisieren.

2.2 Periphere mononukleäre Blutzellen

2.2.1 Zusammensetzung der humanen PBMC

Das humane Blut stellt nicht nur ein Transportsystem für Sauerstoff, Nährstoffe und

Abfallprodukte dar, sondern spielt auch eine zentrale Rolle im Immunsystem. Mit dem Blutfluss zirkulieren sowohl naive als auch spezialisierte Immunzellen im Körper, können so zwischen Geweben und Organen wandern und werden dabei systemisch sowie lokal freigesetzten Faktoren ausgesetzt (DE SOUSA et al., 2023). Leukozyten sind die zellulären Effektoren der Immunabwehr im Blut (MARGRAF & PERRETTI, 2022) und lassen sich in verschiedene Subpopulationen unterteilen (BUNTING, 1922; KENNETH MURPHY 2018). Die zahlenmäßig dominierenden Leukozyten im humanen Blut sind die Granulozyten, womit der Mensch physiologisch ein granulozytäres Blutbild aufweist (AWASTHI & SARODE, 2024; ROSZCZYK et al., 2024). Eine weitere Untergruppe der Leukozyten stellen die PBMC dar, die sich durch ihr Vorhandensein im peripheren Blut und den Besitz eines einzelnen runden Zellkerns auszeichnen (SEN et al., 2018; ZHANG et al., 2020). Somit können sie klar von den mit einem segmentierten oder gelappten Zellkern ausgestatteten Granulozyten (SKINNER & JOHNSON, 2017; AWASTHI & SARODE, 2024) abgegrenzt werden. PBMC bestehen zum Großteil aus Lymphozyten und Monozyten sowie einer geringen Anzahl dendritischer Zellen (LI et al., 2022). Dabei machen die Lymphozyten zwischen 70 % und 90 % und die Monozyten zwischen 10 % und 20 % aus (KLEIVELAND, 2015). Dendritische Zellen liegen mit einem Anteil von 1 % bis 2 % in der Population der PBMC vor (KLEIVELAND, 2015). Innerhalb der Lymphozytenpopulation finden sich physiologisch 70 % bis 85 % „Cluster of differentiation“ (CD) 3⁺ T-Zellen, 5 % bis 10 % B-Zellen und 5 % bis 20 % Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), wobei sich die CD3⁺ T-Zellen aus CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen zusammensetzen (KLEIVELAND, 2015). Die PBMC stellen aufgrund dieser heterogenen Zusammensetzung aus angeborenen und adaptiven Immunzellen einen zentralen Teil des Immunsystems dar (KONCAREVIC et al., 2014) und spielen eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung angeborener und adaptiver Immunantworten sowie der Regulierung von Entzündungen und der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase (LI et al., 2022; ELKHAMARY et al., 2024). Sie spiegeln damit den zellulären und humoralen Immunstatus des menschlichen Körpers wider (LI et al., 2022; ALEXOVIC et al., 2024; ELKHAMARY et al., 2024). Aufgrund dieser Eigenschaften werden sie oft in immunologischen *in vitro* Versuchen als Zell-Modell eingesetzt, um Immunreaktionen wie beispielsweise Inflammation zu untersuchen, den Effekt von immunmodulatorischen Substanzen zu bewerten und Entzündungsmarker zu

analysieren (CHEN et al., 2017; LI et al., 2022; ALEXOVIC et al., 2024). Dabei ist vor allem der Aspekt hervorzuheben, dass PBMC sowohl Zellen der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort enthalten und somit die Reaktionen beider Immunphasen sowie deren Interaktionen *in vitro* abbilden können (ANDERSON et al., 2019; TAPIA-CALLE et al., 2019). Beispielsweise sind T-Zellen, die einen Großteil der PBMC ausmachen, bei der Aktivierung ihrer nativen, zirkulierenden Form auf Antigen-präsentierende Zellen (APCs), wie dendritische Zellen oder Monozyten, angewiesen (YAMANE & PAUL, 2013; BOWLEY et al., 2025), die ebenfalls Bestandteil der PBMC sind (LI et al., 2022). Das zeigt, dass die heterogene PBMC-Population die Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen ermöglicht (TAPIA-CALLE et al., 2019), die bei der Verwendung von isolierten Zellpopulationen fehlen könnten (HARVEY et al., 2022).

2.2.2 Einsatz von PBMC im Zusammenhang mit immunmodulatorischen Substanzen

2.2.2.1 Reaktion von PBMC auf Mitogene

Für Untersuchungen von PBMC und deren funktionellen Reaktionen *in vitro* werden häufig polyklonale Mitogene als Stimulanzen eingesetzt (DEGROOTE et al., 2021; KLEINWORT et al., 2022; GARD et al., 2024). Mitogene, die Zellen unabhängig von deren Antigen-spezifität zur Mitose anregen, induzieren eine unspezifische polyklonale Aktivierung der PBMC und rufen somit eine Entzündungsreaktion und Immunantwort hervor, die sich in Zellproliferation und Zytokinproduktion zeigen kann (KENNETH MURPHY 2018). Dabei wirken Mitogene bevorzugt auf einzelne Subpopulationen der PBMC, wie B- oder T-Zellen, und aktivieren verschiedene Signaltransduktionswege (OGATA et al., 2000; KENNETH MURPHY 2018). Häufig eingesetzte Mitogene sind Lipopolysaccharid (LPS), Pokeweed-Mitogen (PWM), Phytohämagglutinin (PHA) und ConA (ERIKSEN et al., 2009; KLEINWORT et al., 2022; ELKHAMARY et al., 2024; GARD et al., 2024; BRAVO-PARRA et al., 2025). LPS ist ein Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien und besteht aus Lipid A, dem Kern-Oligosaccharid und dem O-spezifischen Polysaccharid (ADEREM & ULEVITCH, 2000; AKIRA & TAKEDA, 2004). Reines LPS ist unter den genannten Stimulanzen das einzige Mitogen, das

primär B-Zellen stimuliert, wobei insbesondere murine B-Zellen hochsensibel auf LPS reagieren (XU et al., 2008). Das Lipid A des LPS bindet dabei an den Toll-like-Rezeptor (TLR) 4 und einen Komplex aus dem Protein RP105 und Myeloid-Differenzierungsfaktor (MD) 1 oder an einen Komplex aus TLR4 und MD2 auf der Zelloberfläche von B-Zellen, wie bei murinen B-Zellen gezeigt wurde (OGATA et al., 2000) und führt über verschiedene intrazelluläre Signalwege zur Proliferation und Aktivierung der B-Zellen sowie zur Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine (OGATA et al., 2000; KAWAI & AKIRA, 2010). TLR4 wird auf murinen B-Zellen stark exprimiert, wohingegen es auf humanen B-Zellen nicht oder nur schwach exprimiert wird (KETLOY et al., 2008; VAURE & LIU, 2014).

Das Mitogen PWM, ein pflanzliches Lektin gewonnen aus den Wurzeln der Amerikanischen Kermesbeere, kann sowohl B-Zellen als auch T-Zellen stimulieren (MELLSTEDT, 1975; STEVENSON et al., 1983). In humanen primären Monozyten wurde gezeigt, dass es seine Wirkung *in vitro* initial über eine Zucker-spezifische Bindung an die Oberfläche der Monozytenmembran vermittelt (STEVENSON et al., 1983). Über darauffolgende Interaktion der Monozyten mit Lymphozyten kommt es zur T- und B-Zell-Aktivierung, wie es in humanen Blutzell-Populationen mittels Monozyten-Depletion nachgewiesen wurde (STEVENSON et al., 1983). Das zeigt deutlich, wie wichtig die Interaktion der Blutzellen ist, wobei der Mechanismus hinter diesen Interaktionen und die detaillierte Wirkung des PWM auf die Monozyten unklar ist (STEVENSON et al., 1983). Die B-Zell-Aktivierung in humanen peripheren Blutlymphozyten durch PWM ist T-Zell-abhängig und aktiviert dosisabhängig auch T-Zellen, wobei es bei niedrigen Konzentrationen nur zur B-Zell-Aktivierung, und in höheren Konzentrationen zudem zu einer T-Zell-Aktivierung kommt (MELLSTEDT, 1975).

Ein weiteres Mitogen und pflanzliches Lektin ist PHA, das aus roten Kidneybohnen gewonnen wird (GOOSSENS et al., 1994) und *in vitro* vorrangig T-Zellen stimulieren kann (HOMBURG et al., 2025), dessen Mechanismus aber noch nicht vollständig geklärt ist. PHA bindet direkt an den TCR-Komplex humaner Lymphozyten (CHILSON et al., 1984) und dabei vor allem an die 20 kDa Epsilon Kette von CD3, wie in den humanen T-Zelllinien HPB und Molt-3 gezeigt wurde (VALENTINE et al., 1985; BURGESS et al., 1991). In humanen T-Zellen wurde gezeigt, dass PHA *in vitro* auch über die Bindung an CD2, das auf T-Zellen exprimiert wird, zur T-Zell-Stimulation

führen kann (LECA et al., 1986; SEGGEWISS et al., 2005).

Das Mitogen ConA ist ebenfalls ein pflanzliches Lektin, das aus der Jackbohne hergestellt wird und seit langem speziesübergreifend als T-Zell-Stimulanz eingesetzt wird (WEISS et al., 1987; PANG et al., 2012; BRAVO-PARRA et al., 2025). Der genaue, durch ConA ausgelöste Aktivierungsmechanismus ist dennoch bislang nicht vollständig aufgeklärt (ANDO et al., 2014). Man weiß jedoch, dass ConA an Mannosereste an der Zelloberfläche und dabei auch an die des TCR-Komplexes der T-Zellen bindet, wie es in der humanen T-Zelllinie Jurkat gezeigt wurde (WEISS et al., 1987; PANG et al., 2012). Die Aktivierung von T-Zellen durch ConA erfolgt zusätzlich zur Bindung des TCR-Komplexes über ko-stimulatorische Moleküle (ANDO et al., 2014). In murinen T-Zellen wurde erstmals beschrieben, dass die ConA-medierte T-Zell Stimulation über CD28 erfolgt, ein Molekül, das auf T-Zellen exprimiert wird und in diesem Fall als ko-stimulatorischer Faktor agiert (PERRIN et al., 1997). CD28 interagiert dabei mit den auf APCs lokalisierten Molekülen CD80 und CD86 (PERRIN et al., 1997). Ein weiterer Ko-Stimulator scheint der Herpesvirus Eintritts-Mediator (*engl.* Herpesvirus entry mediator, HVEM) zu sein (ANDO et al., 2014). In murinen T-Zellen konnte eine Inhibierung der ConA-induzierten T-Zell-Proliferation nach spezifischer Hemmung des HVEM bewirkt werden (ANDO et al., 2014). HVEM ist sowohl auf T-Zellen als auch auf anderen Immunzellen exprimiert und je nach Bindungspartner für positive oder negative Regulation der T-Zell Proliferation bekannt (ANDO et al., 2014). Der genaue Mechanismus hinter der Ko-Stimulation durch HVEM bei ConA-induzierter T-Zell-Aktivierung ist allerdings noch unklar (ANDO et al., 2014) und bisher nicht in humanen T-Zellen beschrieben.

Um diese Mitogen-induzierte Reaktion der PBMC und vor allem der primär stimulierten Zellen, wie beispielsweise der T-Zellen durch ConA-Stimulation (WEISS et al., 1987; BRAVO-PARRA et al., 2025), zu erfassen, können verschiedene Methoden eingesetzt werden. Eine etablierte Methode, um die Aktivierung und damit die Mitogen-induzierte Proliferation der Zellen zu messen, stellen Zellproliferationsassays dar. Dabei können unterschiedliche methodische Verfahren eingesetzt werden, unter anderem Farbstoffverdünnung mit Carboxyfluorescein-Succinimidylester (*engl.* Carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE), Bromdesoxyuridin (*engl.* 5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU) / Ethinyldesoxyuridin (*engl.* 5-ethynyl-2-deoxyuridine, EdU) - Inkorporation oder [³H] -Thymidin-Inkorporation.

Bei der Farbstoffverdünnung mit CFSE wird fluoreszierender Farbstoff intrazellulär gebunden und die Intensität der Fluoreszenz wird mit jeder Zellteilung halbiert, wodurch die Proliferationsrate mittels Durchflusszytometrie (*engl.* Fluorescence-activated cell sorting, FACS) ermittelt werden kann (DEEG et al., 2004; GANESAN et al., 2023; AMERATUNGA et al., 2025). Es wurde allerdings gezeigt, dass es durch CFSE je nach verwendeter Konzentration zu erhöhten Zell-Sterberaten bei humanen PBMC kommt (LAST'OVICKA et al., 2009; LASTOVICKA et al., 2016).

Eine weitere Methode zur Messung der Proliferation stellt die BrdU-Inkorporation dar, bei der das Thymidin-Analogon BrdU in die replizierende Desoxyribonukleinsäure (DNA) während der S-Phase der Zellteilung eingebaut wird und nach erfolgter DNA-Denaturierung detektiert werden kann (GANESAN et al., 2023). Dabei werden Anti-BrdU-Antikörper eingesetzt, die mittels FACS, ELISA oder auch Immunzytochemie detektiert werden können und anhand derer Signale die Proliferationsrate bestimmt werden kann (GANESAN et al., 2023). Die EdU-Inkorporation beruht auf einem ähnlichen Prinzip, bei dem allerdings keine Antikörper, sondern eine bestimmte kupferkatalysierte Click-Technologie verwendet wird, um die Proliferationsrate zu bestimmen (YU et al., 2009; RAAPHORST et al., 2025).

Die häufigste und am längsten eingesetzte Methode zur Messung der Zell-Proliferation stellt jedoch die Thymidin-Inkorporation mit [^3H] -Thymidin dar (GANESAN et al., 2023). Dabei werden Zellen nach erfolgter Stimulation mit [^3H] -Thymidin inkubiert und das radioaktiv markierte Thymidin wird während der Zellteilung in der S-Phase der Mitose in die DNA eingebaut (GANESAN et al., 2023). Die Proliferationsrate kann anhand der radioaktiven Strahlung der Zellen, was die [^3H] -Thymidin Aufnahme widerspiegelt, gemessen werden (AMERATUNGA et al., 2025). Dieses Verfahren bietet eine sehr hohe Sensitivität und macht eine exakte quantitative Auswertung möglich (AMERATUNGA et al., 2025). Darüber hinaus ist die Thymidin-Inkorporation schon sehr lange etabliert und insgesamt hervorragend geeignet, um die Lymphozyten-Proliferation zu messen (GANESAN et al., 2023).

2.2.2.2 Proteomische Charakterisierung der Immunantwort

Der Begriff des Proteoms wurde 1994 durch den Wissenschaftler Marc Wilkins geprägt (WILKINS et al., 1996; HAMACHER & MEYER, 2005) und beschreibt die Gesamtheit

aller Proteine, die zu einem definierten Zeitpunkt in einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus exprimiert werden (WILKINS et al., 1996). Dabei bleibt das Proteom dennoch ein direktes Produkt des Genoms und spiegelt dessen Expression wider (WILKINS et al., 1996), ist aber im Gegensatz zum Genom hochdynamisch und verändert sich durch externe sowie interne Reize (HUTTLIN et al., 2021). Für Immunzellen, wie T-Zellen als Teil der PBMC, ist die Dynamik des Proteoms ausgesprochen relevant, da ihre Aktivierung mit tiefgreifenden Veränderungen einhergeht, die die komplexen Prozesse der Immunantwort reflektieren (HOWDEN et al., 2019). Dabei ist das Sekretom als Teil des Proteoms besonders spannend, denn es beschreibt die Gesamtheit aller von einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt in den extrazellulären Raum ausgeschiedenen Proteine (HATHOUT, 2007; BEUTGEN et al., 2024). Beispielsweise spiegelt das Sekretom bei PBMC nicht nur die Kommunikation der Zellen untereinander wider (KNECHT et al., 2023) sondern auch die je nach aktivierter Subpopulation verschiedenen freigesetzten pro- oder anti-inflammatorische Zytokine (SUN et al., 2023; GHEITASI et al., 2024). Zudem könnten durch proteomische Analysen des Sekretoms durch die stetige Verbesserung der proteomischen Techniken (KNECHT et al., 2023) potenzielle unbekannte Biomarker für die Immunantwort der T-Zellen oder PBMC entdeckt werden, wie es beispielsweise anhand krankheitsassoziierten Biomarker im Proteom anderer Zellen gezeigt wurde (DEGROOTE et al., 2023; FLEISCHER et al., 2025). Ein wesentlicher Vorteil proteomischer Ansätze liegt in der unvoreingenommenen und umfassenden Analyse der gesamten Proteinzusammensetzung der Probe unter den gewählten Bedingungen (SMITH et al., 2019; SINHA & MANN, 2020). Während klassische Methoden wie ELISA ausschließlich die zielgerichtete Quantifizierung einzelner und vorab definierter Proteine oder Marker erlauben (MCGUIRE et al., 2008), ermöglicht die proteomische Analyse die gleichzeitige und umfassende Detektion und Quantifizierung der Probe (SINHA & MANN, 2020; CUI et al., 2022). Somit kann mit einem proteomischen Ansatz der Fokus weg von bekannten isolierten Markern und hin zu einem systemischen Verständnis immunologischer Reaktionen erweitert werden, was neue Erkenntnisse und Hypothesen zu bislang unbekannten Signalwegen oder Markern ermöglicht (SINHA & MANN, 2020; CUI et al., 2022; REPETTO et al., 2023). Besonders die differenzielle Proteomanalyse ist hierbei von zentraler Bedeutung, denn sie ermöglicht

nicht nur die qualitative Identifikation von Veränderungen im Sekretom oder Proteom, sondern auch die quantitative Bewertung in Relation zwischen verschiedenen Proben oder biologischen Zuständen (SINHA & MANN, 2020; REPETTO et al., 2023; BANG et al., 2025). Damit erlaubt die differenzielle Proteomik den qualitativen und quantitativen Vergleich der ausgelösten Veränderung im Sekretom oder Proteom derselben Zellpopulation unter Einfluss von verschiedenen Bedingungen, wie beispielsweise die Stimulation mit immunmodulatorischen Substanzen (DEGROOTE et al., 2021; KLEINWORT et al., 2022). Zur Messung des Proteoms und des Sekretoms werden heutzutage meistens massenspektrometrische Methoden angewandt (HATHOUT, 2007; FEDOROV et al., 2024).

Die massenspektrometrische Proteomanalyse stellt ein hochauflösendes Verfahren dar und beruht auf der Bestimmung des Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) ionisierter Moleküle, deren Auftrennung (SHUKEN, 2023) und der nachfolgenden Detektion der Ionen (ROZANOVA et al., 2021; JIANG et al., 2024). Ein Massenspektrometer besteht deshalb aus einer Ionenquelle, um die Peptide zu ionisieren, einem Massenanalysator zur Messung des m/z der Ionen und zur Auftrennung nach deren m/z sowie einem Detektor zur Bestimmung der Ionenanzahl pro m/z (SHUKEN, 2023). Bei der sogenannten „Bottom-up-Proteomik“ werden die Proteine der Probe vor der eigentlichen massenspektrometrischen Messung unter Verwendung von Enzymen in kleinere Peptide zerlegt (JIANG et al., 2024). Dafür können verschiedene Enzyme verwendet werden, allerdings wird am häufigsten Trypsin oder LysC eingesetzt, die Peptidbindungen jeweils gezielt C-terminal der Aminosäuren Lysin und Arginin oder nur C-terminal von Lysin schneiden, wodurch ein typisches Spaltmuster entsteht, was die nachgeschaltete Peptididentifizierung vereinfacht (SHUKEN, 2023; JIANG et al., 2024). Oft werden diese beiden Enzyme auch kombiniert eingesetzt, was eine effiziente Methode des enzymatischen Verdaus bietet (SHUKEN, 2023; JIANG et al., 2024). Die häufigsten verwendeten Techniken zur Ionisierung der Proteine und Peptide sind die Elektrospray-Ionisierung und die matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisierung (ROZANOVA et al., 2021; JIANG et al., 2024). Sie bieten gegenüber anderen Methoden den Vorteil, dass mit ihnen große Moleküle analysiert werden können (ROZANOVA et al., 2021). Danach können die ionisierten Peptide nach ihrem m/z aufgetrennt werden, wobei hier die Leistungsfähigkeit des Massenanalysators, also dessen Fähigkeit Ionen präzise

voneinander zu trennen, die Auflösung des Massenspektrometers bestimmt (ROZANOVA et al., 2021). Häufig werden Quadrupole, Ionenfallen wie Orbitrap, Time-of-Flight-Analysatoren oder Fourier-Transform-Ion-Cyclotron-Resonanz als Massenanalysator eingesetzt (ROZANOVA et al., 2021; SHUKEN, 2023).

Es gibt zudem die Möglichkeit, mehrere Massenanalysatoren zu koppeln, was eine höhere Sensitivität ermöglicht, da es nacheinander zu mehreren Ionentrennungen kommt (ROZANOVA et al., 2021; JIANG et al., 2024). Dieses Verfahren nennt sich Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) (ROZANOVA et al., 2021; SHUKEN, 2023) und wird oft als Flüssigkeitschromatographische MS/MS (*engl.* Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry, LC-MS/MS) eingesetzt (SHUKEN, 2023). Bei der LC-MS/MS werden die Peptide vor der MS/MS chromatographisch, also anhand ihrer Hydrophobizität, aufgetrennt, was die Analyse komplexer Proben optimiert (SHUKEN, 2023). Nachfolgend kommt es bei der MS/MS zuerst zu einem Vorscan, bei dem alle Peptide in der Probe gemessen werden und ein Massenspektrum (MS1) mit allen m/z Signalen erstellt wird (SHUKEN, 2023). Daraus werden gezielt Ionen ausgewählt, die weiter in MS2 analysiert werden, wobei diese Ionen weiter fragmentiert und erneut nach dem m/z analysiert werden, was dann das MS2-Spektrum ergibt (SHUKEN, 2023). Die Auswahl der Ionen, die in MS2 gemessen werden, kann dabei auf zwei Arten erfolgen: datenabhängige-Erfassung (*engl.* Data-dependent acquisition, DDA) oder datenunabhängige-Erfassung (*engl.* Data-independent acquisition, DIA) (ROZANOVA et al., 2021). Bei der DDA werden ausschließlich die Ionen mit dem stärksten Signal aus MS1 für die Fragmentierung in MS2 ausgewählt, was eine genaue Sequenzbestimmung ermöglicht aber auch die Gefahr des Verlustes von niedrig abundanten Peptiden birgt (ROZANOVA et al., 2021; SHUKEN, 2023). Bei der DIA werden systematisch alle Ionen in einem m/z Bereich, auch Massen-Fenster genannt, für MS2 ausgewählt (ROZANOVA et al., 2021). Das führt zu komplexeren Datensätzen, in denen auch sehr niedrig abundante Peptide erfasst werden können und im Vergleich zur DDA eine exaktere Quantifikation der Proteine bietet (ROZANOVA et al., 2021), was den Trend zur DIA lenkt (GUZMAN et al., 2024). Um die Proteine zu identifizieren, werden die am Detektor gemessenen Massenspektren (JIANG et al., 2024) mit Proteinsequenzdatenbanken abgeglichen (ZHANG et al., 2013; SINHA & MANN, 2020).

Zur Quantifizierung der Peptide gibt es zwei Methoden: label-frei oder label-basiert

(ROZANOVA et al., 2021; ADIO et al., 2025; GARIBOVA et al., 2025). Im label-basierten proteomischen Ansatz werden Markierungsreagenzien eingesetzt, wodurch mehrere biologische Proben im selben Massenspektrum quantifiziert werden können (SHUKEN, 2023). Dabei können verschiedene Varianten von labeln verwendet werden (ROZANOVA et al., 2021; VIRÁG et al., 2024; ADIO et al., 2025), wie beispielsweise Isotopen-label (ROZANOVA et al., 2021). Sie gilt als die potenziell präzisere Variante, bringt allerdings Nachteile, wie limitierte Probenanzahl, aufwändige Probenvorbereitung und hohe Kosten, mit sich (ROZANOVA et al., 2021; GARIBOVA et al., 2025). Bei der label-freien Quantifizierung wird die relative Protein- oder Peptidmenge über die Signalintensität der chromatographischen Peaks, also Höhe oder Fläche unter der Kurve, im MS1 Spektrum bestimmt, ohne dass Markierungen oder Isotope verwendet werden (SHUKEN, 2023). Für den Vergleich von mehreren Proben ist eine Normalisierung der Gesamtproteinmenge nötig (ROZANOVA et al., 2021). Diese Technik ermöglicht die Messung einer unbegrenzten Probenanzahl und wird wegen des geringeren technischen Aufwandes und der Kosteneffizienz oft verwendet (ROZANOVA et al., 2021). Zudem ist es bei dieser Methode möglich, die Proteine unverändert, ohne den Einfluss der hinzugefügten Moleküle der label-basierten Quantifizierung, zu identifizieren (ROZANOVA et al., 2021).

Wie in den Kapiteln 2.1.1 und 2.1.3 beschrieben, sind sowohl die in der Kuhmilch enthaltenen Proteine (DAS et al., 2022; STASTNA, 2024) als auch die Auswirkungen von Kuhmilch auf das humane Immunsystem unzureichend erforscht und die Diskussion um die potenziellen unterschiedlichen Effekte der A1- und A2-Milch auf die humane Gesundheit bleibt weiterhin bestehen (GONZALES-MALCA et al., 2023; WEBER et al., 2024; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2025). Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, den Faktor des bereits beschriebenen anti-inflammatorischen Effekts der A1- sowie der A2-Milch auf ConA-stimulierte humane PBMC *in vitro* (GARD et al., 2024) weiter einzugrenzen und die Immunantwort der humanen PBMC auf Milch näher zu charakterisieren.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Probenmaterial

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden venöse Blutproben von 15 gesunden Menschen verwendet, welche als freiwillige Spender zur Verfügung standen. Alle Spender wurden schriftlich über den Zweck der Studie informiert und gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an dieser Studie. Die Spender stellten die im Rahmen einer unabhängig von dieser Studie durchgeführten ärztlichen Untersuchung gewonnen Blutproben freiwillig zur Verfügung. Des Weiteren wurden Milchproben von Kühen des Lehr- und Versuchsgutes in Oberschleißheim verwendet. Hierfür wurden jeweils drei gesunde Kühe der Rasse Simmental, die entsprechend homozygot für die A1- (A1/A1) beziehungsweise die A2-Variante (A2/A2) des β -Kasein Gens waren, händisch gemolken. Die Kühe wurden unter identischen Bedingungen in einer Herde gehalten, so dass die Zusammensetzung der Futterration und die Umweltbedingungen dieselben waren. Pro Kuh wurden am gleichen Tag jeweils 500 ml Milch gewonnen und diese wurde direkt nach dem Melkvorgang bis zur Aufbereitung bei 4 °C gelagert. Die Aufbereitung erfolgte am selben Tag nach maximal zwei Stunden.

3.2 Aufbereitung der Milch

3.2.1 Puffer und Lösungen zur Aufbereitung der Milch

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4

NaCl ¹ (136,9 mM)	8,00 g
KCl ¹ (2,6 mM)	0,20 g

¹ Carl Roth, Karlsruhe

KH_2PO_4^2 (1,4 mM)	0,20 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}^3$ (8,1 mM)	1,45 g

in 1000 ml Aqua dest. lösen, pH-Wert auf 7,4 einstellen.

3.2.2 Aufbereitung der Milch

Um die sechs Milchproben zu entfetten, wurden sie vier Mal hintereinander bei 4 °C und 1000 x g für jeweils 5 min zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde die entstandene Fettschicht abgenommen. Die entfetteten A1- und A2- Milchproben wurden nachfolgend mittels filtergestützter Zentrifugation in zwei Fraktionen aufgetrennt: Dafür wurden die Milchproben mit Molekulargewichtsfiltren³ mit einer Ausschlussgrenze von 100 kDa bei 4 °C mit 4000 x g für insgesamt 60 min zentrifugiert. Dabei wurde die Zentrifugation alle 20 min unterbrochen, um die Milch im Filter zu resuspendieren. Die Fraktion, die im Filter verblieb, stellte dabei die Fraktion ≥ 100 kDa dar und ergab somit die Fraktion mit hohem molekularem Gewicht (HMGF). Die Fraktion, die als Filtrat durch den Filter hindurchgelangte, ergab dabei die Fraktion < 100 kDa und stellte somit die Fraktion mit niedrigem molekularem Gewicht (NMGF) dar. Um eine künstliche Anreicherung von Proteinen durch filtergestützte Zentrifugation zu vermeiden, wurden die Fraktionen anschließend mit PBS auf ihr ursprüngliches Volumen rekonstituiert, um die Vergleichbarkeit der Bedingungen sicherzustellen und dabei eine volumenbasierte Verwendung der Milch zu ermöglichen. Anschließend wurden die Fraktionen jeder Milchprobe entsprechend dem β -Kasein Genotyp und dem Molekulargewicht gepoolt, so dass vier verschiedene Pools entstanden. Diese enthielten jeweils die Milch von drei Kühen: A1 ≥ 100 kDa (A1-HMGF), A1 < 100 kDa (A1-NMGF), A2 ≥ 100 kDa (A2-HMGF) und A2 < 100 kDa (A2-NMGF) (siehe Abbildung 1). Die Milchproben wurden danach bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Auftrennung der A1- und A2-Milch in die zwei Fraktionen (HMGF und NMGF) basierte auf Vorversuchen: Zunächst wurden vier Fraktionen < 100 kDa (< 3 kDa,

² Merck, Darmstadt

³ Pan Biotech, Aidenbach

< 10 kDa, < 50 kDa und < 100 kDa) sowie eine Fraktion ≥ 100 kDa wie beschrieben hergestellt. In den Vorversuchen zeigten jedoch alle Fraktionen < 100 kDa einen einheitlichen Effekt, so dass der Fokus für die weiteren Versuche auf dem Vergleich zwischen den Fraktionen < 100 kDa (NMGF) und ≥ 100 kDa (HMGF) lag.

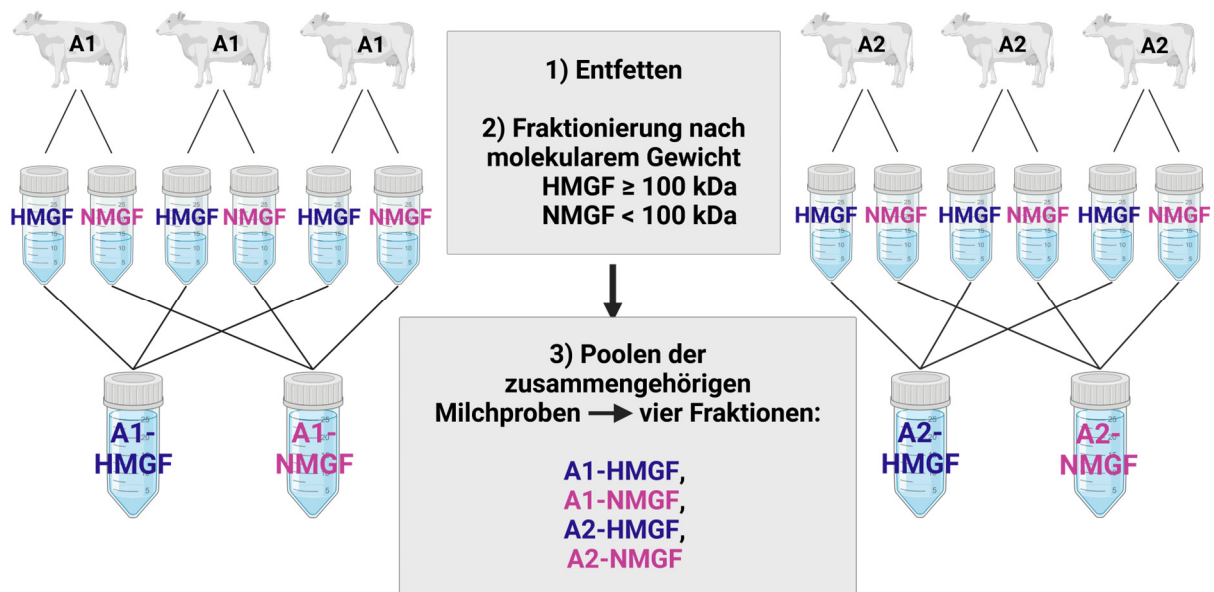


Abbildung 1: Herstellung der Milchfraktionen ≥ 100 kDa (HMGF) und < 100 kDa (NMGF) der A1- und A2-Milch. Nach dem Entfetten wurden die sechs Milchproben nach ihrem molekularen Gewicht aufgetrennt. Danach erfolgte das Poolen der fraktionierten Milchproben nach β -Kasein-Variante und molekularem Gewicht, so dass pro A1- und A2-Variante eine HMGF und eine NMGF entstand.

3.3 Aufbereitung der Blutproben und Isolierung der PBMC

3.3.1 Puffer und Lösungen zur PBMC-Aufbereitung

Trennlösung zur Isolierung von PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation

Pancoll Trennlösung³ (Dichte 1,077 g/ml), gebrauchsfertig.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4

Siehe Kapitel 3.2

3.3.2 Gewinnung und Isolierung von PBMC

Venöse Blutspenden von insgesamt 15 gesunden freiwilligen Spendern wurden in Natrium-Heparin-beschichteten Monovetten vorgelegt. Die gesamte folgende Aufbereitung des Blutes erfolgte unter sterilen Bedingungen. Das gewonnene Blut wurde im Verhältnis 1:2 in PBS (Raumtemperatur) verdünnt. Das verdünnte Blut wurde in 15 ml Röhren⁴ auf Pancoll Trennlösung geschichtet. Hierbei wurden jeweils 7 ml Blut auf 4 ml Pancoll geschichtet und die geschichteten Röhren bei Raumtemperatur für 25 min bei 500 x g (Bremse ausgeschaltet) zentrifugiert. Die PBMC wurden nachfolgend aus der entstandenen Leukozyten-reichen Interphase, die sich zwischen Plasma- und Pancollschicht befindet, entnommen. Diese Phase enthielt Lymphozyten und Monozyten. Anschließend wurden die PBMC zweimal mit PBS bei 4 °C und 800 x g für jeweils 10 min gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet erneut in PBS resuspendiert. Danach wurde die Zellzahl der entstandenen Zellsuspension mittels Zählung bestimmt.

⁴ Sarstedt, Nümbrecht

3.3.3 Zählung der isolierten Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau⁵ gemischt (Verdünnung 1:2) und anschließend 10 µl der Mischung in einer Neubauer-improved Zählkammer⁶ (Kammertiefe 0,1 mm) pipettiert. Bei einer Zellzahl von über 100 Zellen in den fünf diagonalen Gruppenquadraten wurde diese zur Berechnung der Gesamtzellzahl verwendet. Bei weniger als 100 Zellen wurden alle 25 Gruppenquadrate ausgezählt (Fläche pro Gruppenquadrat 0,04 mm²), um eine präzisere Zellzahl zu ermitteln.

Zur Berechnung der Zellzahl diene folgende Formel:

$$\text{Zellen pro } \mu\text{l Suspension} = \frac{\text{gezählte Zellzahl}}{\text{ausgezählte Fläche [mm}^2\text{]} \times \text{Kammertiefe [mm]} \times \text{Verdünnung}}$$

3.4 PBMC-Zellproliferationsassay

3.4.1 Lösungen für die Zellstimulation und radioaktive Markierung

RPMI-Gebrauchsmedium

RPMI 1640 Medium mit Glutamin⁷

+ 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin⁸ (Pen/Strep)

+ 10 % (v/v) fetales Kälberserum⁹ (FCS)

⁵ VWR, Darmstadt

⁶ NeoLab, Heidelberg

⁷ Pan Biotech, Aidenbach

⁸ Sigma-Aldrich, Darmstadt

⁹ Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund

[³H]-Thymidin-Lösung (0,05 mCi/ml)

[Methyl-³H] Thymidin¹⁰ (1,0 mCi/ml) 0,50 ml

ad 10 ml RPMI 1640 Medium mit Glutamin.¹¹

Szintillationslösung

Rotiszint, gebrauchsfertig.¹²

3.4.2 *In vitro* Stimulation und radioaktive Markierung

Für die PBMC-Zellproliferationsassays wurden die Zellen nach der Präparation polyklonal stimuliert. Nach Resuspension der PBMC in RPMI-Gebrauchsmedium wurden Triplicate von jeweils 2×10^5 humanen PBMC pro Delle mit $1 \mu\text{g/ml}$ ConA¹³ in 96-Lochboden Platten für Suspensionszellen¹⁴ stimuliert. Die ConA-stimulierten PBMC wurden zusätzlich mit den Milchfraktionen ko-inkubiert, wobei die Endkonzentration der Milch pro Delle 1 % (v/v) betrug.

Eine weitere Variante der Ko-Inkubation der ConA-stimulierten PBMC erfolgte mit dem aufgereinigten humanen Protein „Target of Myb protein 1“ (TOM1)¹⁵. TOM1 wurde dabei in aufsteigenden Konzentrationen von 0,1 ng/ml bis zu 1000 ng/ml eingesetzt. Für jeden Spender dienten unstimulierte PBMC, also nur in RPMI-Gebrauchsmedium inkubierte PBMC als Negativkontrolle und alleinig mit ConA-stimulierte PBMC ohne weitere Ko-Inkubation als Vergleichswert für die polyklonale Stimulation (Positivkontrolle). Die Inkubation der Platten erfolgte im Brutschrank¹⁶ bei 37 °C und 5 % CO₂ für insgesamt 48 Stunden bis zur Ernte der Zellen, wobei 8 Stunden vor Ernte eine radioaktive Markierung der proliferierenden Zellen durchgeführt wurde. Die Zellen

¹⁰ PerkinElmer, Rodgau

¹¹ Pan Biotech, Aidenbach

¹² Carl Roth, Karlsruhe

¹³ Sigma-Aldrich, Darmstadt

¹⁴ Sarstedt Nümbrecht

¹⁵ Biomol, Hamburg

¹⁶ Eppendorf, Hamburg

wurden dabei mit radioaktiver [^3H]-Thymidin-Lösung (1 $\mu\text{Ci/Delle}$) versetzt und für die weiteren 8 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Die Zellen bauen das radioaktive Nukleotid [^3H]-Thymidin während der S-Phase des Zellzyklus in ihre DNA ein, wodurch neu synthetisierte DNA radioaktiv markiert wird (GANESAN et al., 2023). Nach der 8-stündigen Inkubationsphase wurden die Zellen mithilfe des "Cell-Harvester" (Zellernte-Gerät)¹⁷ geerntet, wobei die Zellen mit Aqua dest. aus den Dellen gespült wurden und so auf spezielle Glasfaserfilter¹⁷ übertragen wurden. Die Glasfaserfilter wurden für 30 min bei 80 °C im Trockenschrank¹⁸ getrocknet und nachfolgend in Omni-Filterkassetten¹⁷ eingespannt. Die eingespannten Glasfaserfilter wurden nachfolgend mit 25 μl Szintillationslösung pro Delle versetzt und die Kassette dann mit einer selbstklebenden Folie¹⁷ luftdicht versiegelt. Anschließend erfolgte die [^3H]-Aktivitäts-Messung mittels Beta-Zähler (Microbeta2)¹⁷ in „counts per minute“ (cpm).

Folgende Substanzen wurden verwendet:

Substanz	Herkunft	Eingesetzte Endkonzentration
Concanavalin A (ConA)	Sigma-Aldrich, Darmstadt	1 $\mu\text{g/ml}$
A1-HMGF	LVG Oberschleißheim	1 %
A1-NMGF	LVG Oberschleißheim	1 %
A2-HMGF	LVG Oberschleißheim	1 %
A2-NMGF	LVG Oberschleißheim	1 %
Target of Myb protein 1 (TOM1)	Biomol, Hamburg	0,1 ng/ml
Target of Myb protein 1 (TOM1)	Biomol, Hamburg	1 ng/ml

¹⁷ PerkinElmer, Rodgau

¹⁸ Memmert, Schwabach

Target of Myb protein 1 (TOM1)	Biomol, Hamburg	10 ng/ml
Target of Myb protein 1 (TOM1)	Biomol, Hamburg	100 ng/ml
Target of Myb protein 1 (TOM1)	Biomol, Hamburg	1000 ng/ml

3.4.3 Statistische Auswertung der Zellproliferationsraten

Für die statistische Auswertung der Zellproliferationsraten wurden aus den cpm-Werten zunächst Proliferationsindizes (P_i) berechnet. Hierfür wurden zunächst Mittelwerte aus den cpm-Werten jedes Triplikates gebildet. Um die Reaktion der einzelnen PBMC-Donor auf ConA zu evaluieren, wurde der Mittelwert der ConA-stimulierten PBMC (Positivkontrolle) durch den jeweiligen Mittelwert der unstimulierten Negativkontrollen geteilt. Dadurch konnte der reine Anstieg der Proliferation infolge der polyklonalen Stimulation berechnet werden. Nur im Falle eines mindestens 15-fachen Proliferationsanstiegs nach ConA-Stimulation der PBMC wurden die jeweiligen Donor in die Analyse miteinbezogen. Dadurch ergab sich eine Gesamtzahl von 14 einbezogenen Spendern (biologisches $n = 14$), bei denen die ConA-Stimulation im Durchschnitt zu einem 37,5-fachen (Standardabweichung (SD) $\pm 23,4$; technisches $n = 17$) Anstieg der Proliferation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Negativkontrolle) führte.

Zur Quantifizierung der Effekte der Milchfraktionen und von TOM1 auf die Proliferation der PBMC wurde der cpm-Mittelwert der ko-stimulierten PBMC durch den jeweiligen Mittelwert der ConA-stimulierten PBMC (Positivkontrolle) geteilt. Der Mittelwert der ConA-stimulierten Triplikate (Positivkontrolle) jedes Spenders wurde dabei auf 100 gesetzt (siehe Formel).

$$Proliferationsindex (P_i) = \frac{\text{Mittelwert ConA}}{\text{Mittelwert ConA} + \text{Ko} - \text{Inkubation}} \times 100$$

Diese Berechnung diente dazu, die Effekte der Milchfraktionen oder TOM1 relativ zur polyklonalen Stimulation darzustellen und einen Spender-übergreifenden Vergleich zu

ermöglichen.

Die ermittelten Proliferationsindizes aller Spender wurden mittels Kolmogorov-Smirnov (KS) -Test auf ihre Normalverteilung geprüft, es wurde also ermittelt, ob die Daten der Gaußschen Normalverteilung entsprechen. Da alle generierten Daten der Zellproliferationsassays normalverteilt waren (KS-Test > 0,05), wurde im nächsten Schritt der Student's *t*-Test für die weitere statistische Analyse genutzt. Die statistische Signifikanz wurde mit $p \leq 0,05$ festgelegt. Für die statistischen Berechnungen und die Visualisierung der Proliferationsdaten wurde GraphPad Prism Version 5.04 für Windows¹⁹ verwendet.

3.5 Massenspektrometrische Identifikation von Proteinen

3.5.1 Puffer und Lösungen für die Zellstimulation

FCS-freies RPMI

RPMI 1640 Medium mit Glutamin²⁰

+ 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin²¹ (Pen/Strep)

3.5.2 Polyklonale Stimulation von PBMC für die massenspektrometrische Analyse

Um die zelluläre sekretorische Reaktion der PBMC auf die HMGF und die NMGF der A1- bzw. A2-Milch zu messen und um zu prüfen, inwiefern sich die Antwort auf die verschiedenen Fraktionen und zwischen den beiden Milchvarianten unterscheidet, wurde das Sekretom von humanen ConA-stimulierten PBMC nach Ko-Inkubation mit diesen Milchfraktionen massenspektrometrisch untersucht. Nach Resuspension der

¹⁹ GraphPad Software, Boston, USA

²⁰ Pan Biotech, Aidenbach

²¹ Sigma-Aldrich, Darmstadt

Zellen in FCS-freiem RPMI wurden die zuvor isolierten PBMC von drei Spendern in 6-Lochboden-Platten für Suspensionszellen²² mit einer Zellzahl von jeweils 1×10^7 pro Delle ausgebracht. Die hohe Konzentration an Serumproteinen und das Vorhandensein von bovinen Zytokinen im FCS kann mit freigesetzten Proteinen aus den PBMC interferieren und die Detektion von niedrig abundanten, sezernierten Peptiden maskieren (SHIN et al., 2019). Deshalb wurde für die folgende massenspektrometrische Untersuchung von sezernierten Peptiden FCS-freies Medium gewählt. Für jeden Spender erfolgte eine Stimulation der PBMC mit $1 \mu\text{g/ml}$ ConA⁸ und eine gleichzeitige Ko-Inkubation mit 1 % (v/v) der zuvor beschriebenen Milchfraktionen (A1-HMGF, A1-NMGF, A2-HMGF, A2-NMGF) im Brutschrank²³ bei 37 °C und 5 % CO₂ für 48 Stunden. Daraus resultierten vier verschiedene Ko-Inkubationen pro Spender und eine Gesamtmenge von 12 Proben.

Nach 48 Stunden wurden die Sekretome mittels Zentrifugation bei 4 °C mit 800 x g für 10 min von den Zellen separiert und nachfolgend mit einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 4 °C mit 1000 x g für 10 min aufgereinigt und dabei von möglicherweise verbliebenen Zellen getrennt.

Die Proben wurden bei -80 °C aufbewahrt, bis die massenspektrometrische Analyse erfolgte.

²² Sarstedt, Nümbrecht

²³ Eppendorf, Hamburg

Folgende Substanzen wurden verwendet:

Substanz	Herkunft	Eingesetzte Endkonzentration
Concanavalin A (ConA)	Sigma-Aldrich, Darmstadt	1 µg/ml
A1-HMGF	LVG Oberschleißheim	1 %
A1-NMGF	LVG Oberschleißheim	1 %
A2-HMGF	LVG Oberschleißheim	1 %
A2-NMGF	LVG Oberschleißheim	1 %

3.5.3 Puffer und Lösungen für den FASP-Verdau

Trichloressigsäure

Trichloressigsäure²⁴ gebrauchsfertig.

Ammoniumbikarbonat-Puffer

NH_3HCO_3 ²⁴ (50 mM) 3,95 mg

in 1000 µl HPLC-Wasser lösen.

100 mM Dithiothreitol

Dithiothreitol²⁵ (100 mM) 15,42 mg

in 1 ml HPLC-Wasser lösen.

²⁴ Sigma-Aldrich, Darmstadt

²⁵ SERVA, Heidelberg

Urea A-Puffer

Harnstoff ²⁶ (8 M)	14,41 g
1 M Tris-HCl ²⁷ pH 8,5 (100 mM)	3,00 ml
ad 30 ml HPLC-Wasser.	

300 mM Iodacetamid

2-Iodacetamid ²⁸ (300 mM)	55,48 mg
in 1 ml HPLC-Wasser lösen, dunkel lagern.	

Lys-C

Lysyl Endopeptidase ²⁹ (0,2 mg/ml)	20,00 µg
in 100 µl HPLC-Wasser lösen.	

Trypsin

Trypsin ³⁰ (0,5 mg/ml)	20,00 µg
in 40 µl HPLC-Wasser lösen.	

Ammoniumbikarbonat-Puffer (50mM) mit 2 % Acetonitril

Ammoniumbikarbonat-Puffer

+ 2 % Acetonitril²⁶

²⁶ Sigma-Aldrich, Darmstadt

²⁷ Carl Roth, Karlsruhe

²⁸ Merck, Darmstadt

²⁹ Wako, Neuss

³⁰ Promega, Mannheim

Trifluoressigsäure (0,5 %)

Trifluoressigsäure³¹

15,00 µl

ad 3 ml HPLC-Wasser.

3.5.4 Probenverdau für die Massenspektrometrie

Zur Aufbereitung der Proben für die Messung am Massenspektrometer wurden die sekretierten Proteine zunächst gefällt und pelletiert. Hierfür wurde Trichloressigsäure mit einer Endkonzentration von 25 % (v/v) zu den Sekretomen zugegeben und bei 4 °C für 10 min inkubiert. Mittels Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 14000 x g für 5 min wurde ein Proteinpellet generiert und der Überstand verworfen. Das Proteinpellet wurde drei Mal mit eiskaltem Aceton gewaschen und anschließend für 10 min in Ammoniumbikarbonat-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert, wonach 20 mM Dithiothreitol zugegeben und die Probe weitere 30 min bei 60 °C inkubiert wurde. Nach Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur und Zugabe von 40 mM Iodacetamid, folgte die Inkubation der Probe für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Durch anschließende Zugabe von 40 mM Dithiothreitol, konnten die Proben mit freiem Iodacetamid reagieren. Tryptische Peptide wurden proteolytisch aus den Zellkulturüberständen gewonnen, indem die sekretierten Proteine mit Trypsin und Lys-C verdaut wurden und durch einen Filter³² zentrifugiert wurden (modifiziertes „Filter-Aided Sample Preparation Protocoll“ (FASP)) (WISNIEWSKI et al., 2011). Dazu wurden die Proben im Anschluss mit 0,1 µg Lys-C für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über Nacht bei 37 °C mit 1 µg Trypsin verdaut. Vollständig verdaute Peptide wurden im Anschluss durch einen Filter zentrifugiert, der nur durchlässig für verdaute Peptide, nicht aber für unverdaute Proteine ist. Die Ansäuerung der Proteine erfolgte mit Trifluoressigsäure.

³¹ Sigma-Aldrich, Darmstadt

³² Sartorius, Göttingen

3.5.5 Puffer und Lösungen für die massenspektrometrische Analyse

Matrix

α -Cyano-4-Hydroxyzimtsäure ³³	2,50 mg
Acetonitril ³³ (70 %)	700,00 μ l
Trifluoressigsäure ³³ (0,1 %)	1,00 μ l
ad 1 ml HPLC-Wasser.	

Puffer A

Acetonitril ³³ (2 %)	20,00 ml
Ameisensäure ³⁴ (0,1 %)	1,00 ml
ad 1 l HPLC-Wasser.	

Puffer B

Acetonitril ³³ (98 %)	980,00 ml
Ameisensäure ³⁴ (0,1 %)	1,00 ml
ad 1 l HPLC-Wasser.	

3.5.6 Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrische Analyse mittels LC-MS/MS wurde in Kooperation mit dem Metabolomics and Proteomics Core des Helmholtz Zentrums München unter der Leitung von Frau Dr. Stefanie Hauck durchgeführt. Die Analyse der aufgereinigten und

³³ Sigma-Aldrich, Darmstadt

³⁴ Ratiopharm, Ulm

angesäuerten Peptide erfolgte an einem Q-Exactive HF-X Massenspektrometer³⁵, welches online mit einem Ultimate 3000 RSLC nano-HPLC³⁶ gekoppelt ist. Die Proben wurden automatisch in die C18-Trap-Säule³⁵ injiziert und geladen, nach 5 min eluiert und dann mit einer Flussrate von 250 nl/min und einem 90-minütigen nicht-linearen Acetonitril-Gradienten auf die C18-Analysesäule (Acquity UPLC M-Class HSS T3 Column, 1,8 µm, 75 µm x 250 mm)³⁶ separiert. Die Aufzeichnung der MS-Spektren umfasste eine Auflösung von 60,000 mit einem AGC Soll von 3×10^6 , einer maximalen Injektionszeit von 30 ms und dem m/z Bereich von 300 bis 1500 m/z. Die 15 Peptid-Ionen mit der höchsten Abundanz wurden automatisch ausgewählt und mittels Hochenergie kollisionsinduzierter Dissoziation (*engl.* Higher-energy collisional dissociation, HCD) fragmentiert. Diese Fragmentation erfolgte mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 28, einem Isolationsfenster von 1,6 m/z und einem dynamischen Ausschlusszeitraum von 30 Sekunden. MS/MS-Spektren wurden im Anschluss bei einer Auflösung von 15000 mit einem AGC Soll von 1×10^5 und einer maximalen Injektionszeit von 50 ms aufgezeichnet. Spektren mit undefinierten Ladungen und Ladungen von + 1 und > 8 wurden von der Auswahl der Vorläuferionen für die HCD-Fragmentierung ausgeschlossen.

3.5.7 Proteinidentifikation, MS-Label-freie Quantifizierung

Die Peptid- und Proteinidentifikation wurde mittels Proteome Discoverer 2.5³⁵ durchgeführt. Als Suchmaschine wurde Sequest HAT genutzt und eine Datenbanksuche mit der humanen SwissProt Datenbank (veröffentlicht Februar 2020; 20432 Sequenzen) und der bovinen Ensemble Datenbank (veröffentlicht Februar 2014 UMD3.1; 22118 Sequenzen) durchgeführt. Für die Datenbanksuche wurde die volle tryptische Spezifität, mit maximal einer erlaubten Fehlspaltung, gewählt. Die Vorläuferionen-Massetoleranz wurde mit 10 ppm, und die Fragment-Massetoleranz mit 0,02 Da festgelegt. Außerdem wurde als statische Modifikation die Carbamidomethylierung von Cystein definiert. Als dynamische Modifikationen wurden sowohl die Deamidierung von Asparagin und Glutamin als auch die Methionin-

³⁵ Thermo Fisher Scientific, Bremen

³⁶ Waters, Rydalmere, NSW, Australia

Oxidation und der Methioninverlust durch N-terminale Acetylierung angegeben. Die Peptid-Spektrum-Zuordnungen sowie die identifizierten Peptide wurden mittels Percolator validiert. Dabei wurde pro Spektrum ausschließlich der Treffer mit dem höchsten Score berücksichtigt. Nur Identifikationen mit einer Fehlentdeckungsrate (*engl.* False discovery rate) von $< 1\%$ und einer posterioren Fehlerwahrscheinlichkeit von $< 0,05$ wurden akzeptiert. Der Sequest HT Xcorr Filter Schwellenwert wurde auf 1,6 festgelegt, wodurch die weitere Analyse auf Peptid-Treffer mit hoher Konfidenz reduziert werden konnte. Die Proteininferenz erfolgte nach dem strikten Parsimonieprinzip, wobei bei diesem Prinzip nur Proteine als identifiziert gelten, die durch mindestens ein proteinspezifisches Peptid gestützt sind. Proteine, die ausschließlich Peptide teilen und keine proteinspezifischen Peptide aufweisen, werden nicht gelistet, so dass nur das minimale Set an Proteinen entsteht. Die finale Auflistung der Proteine entsprach somit dem strikten Parsimonieprinzip. Zusätzlich wurde zur Kontrolle einer potenziellen Redundanz zwischen humanen und bovinen Sequenzen eine ergänzende Analyse ohne strikte Parsimonie durchgeführt, die bestätigte, dass Schlüsselproteine konsequent durch proteinspezifische Peptide gestützt wurden. Die Quantifizierung basierte auf den Intensitätswerten der drei am besten bewerteten Peptide, welche wiederum an der Gesamtabundanz normalisiert wurden, um mögliche Probenladefehler auszugleichen. Die Perseus Software (Version 1.6.14.0)³⁷ (TYANOVA et al., 2016) wurde genutzt, um eine log₂ Transformation der Abundanz-Werte und eine Imputation fehlender Werte mit niedrig-abundanten Werten durchzuführen. Dabei wurden die vom Hersteller zur Verfügung gestellten Standardeinstellungen genutzt. Um Replikate zu normalisieren, welche als anormale Datenpunkte identifiziert wurden, wurde eine Limma-Batch Korrektur durchgeführt. Im Anschluss wurde der Student's-*t*-Test zur statistischen Analyse angewendet.

3.5.8 Statistische Analyse

Das Ziel der proteomischen Datenanalyse war die Identifikation von Proteinen mit verändertem Vorkommen in den Sekretomen von polyklonal stimulierten PBMC nach

³⁷ Max-Planck-Institut für Biochemie, Planegg

Inkubation mit der A1- oder A2-HMGF im Vergleich zur Inkubation mit der NMGF der entsprechenden Milchvariante. Dafür wurden die Abundanzen der identifizierten Proteine in den PBMC-Sekretomen nach der Ko-Inkubation mit der HMGF direkt mit den korrespondierenden Abundanzen nach Ko-Inkubation mit der NMGF der gleichen Milch-Variante (A1 oder A2) verglichen. Sofern explizit nicht anders angegeben, beziehen sich alle Änderungen der Abundanz, welche im Zuge dieser Arbeit genannt werden, auf diese beiden Vergleiche: Ratio A1-HMGF / A1-NMGF und Ratio A2-HMGF / A2-NMGF (siehe Abbildung 2).

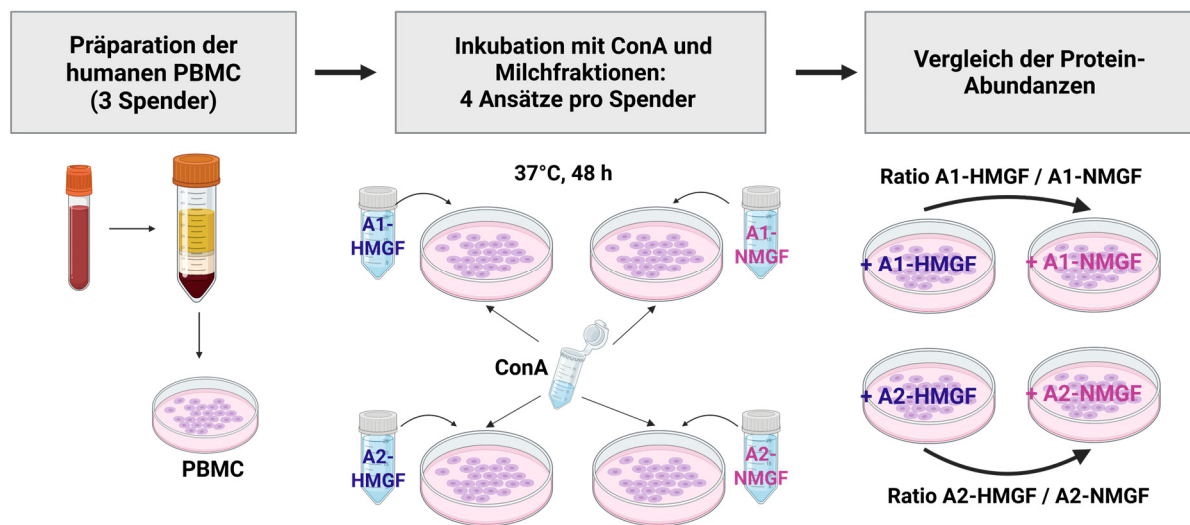


Abbildung 2: Ablauf der Probenaufbereitung für die massenspektrometrische Messung und der Analyse der MS-Daten. Die isolierten humanen PBMC wurden für 48 Stunden mit ConA stimuliert und jeweils einzeln in vier Ansätzen pro Spender mit den vier Milchfraktionen ko-incubiert. Nach erfolgter LC-MS/MS-Analyse wurde die Auswertung der MS-Daten durchgeführt. Dabei wurde die Ratio der Protein-Abundanzen immer innerhalb einer Milchvariante mit einem Vergleich zwischen der Ko-Inkubation mit der HMGF und der NMGF errechnet: Ratio A1-HMGF / A1-NMGF und Ratio A2-HMGF / A2-NMGF.

Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit reproduzierbar sind, wurden in weiterführenden Analysen ausschließlich Proteine berücksichtigt, die in sechs von zwölf Sekretomen identifiziert wurden und die zusätzlich mit mindestens zwei unterschiedlichen proteinspezifischen Peptiden identifiziert wurden. Für weiterführende Analysen wurde sich auf Proteine konzentriert, welche in den PBMC-

Sekretomen nach Ko-Inkubation mit der HMGF verglichen mit der Ko-Inkubation der NMGF der gleichen Milchvariante eine mindestens zweifache Änderung der Abundanz (Ratio ≥ 2 bzw. $\leq 0,5$) aufwiesen.

3.5.9 Darstellung der massenspektrometrischen Daten zur Proteinidentifikation

3.5.9.1 Volcano-Plots

Um einen Überblick über die analysierten identifizierten Proteine und die Darstellung einzelner Schlüsselproteine zu ermöglichen, können Volcano-Plots verwendet werden. In Volcano-Plots wird das Verhältnis von statistischer Signifikanz ($p \leq 0,05$) zur Veränderung der Abundanzen in verschiedenen Zuständen dargestellt. Die x-Achse zeigt die $\log_2$ transformierten Ratios aller in die Analyse einbezogener identifizierter Proteine. Die y-Achse zeigt die korrespondierenden negativen $\log_{10}$ transformierten Signifikanzwerte (p-Werte). Dadurch werden Proteine, mit einer hohen statistischen Signifikanz und hohem differentiellen Faktor hervorgehoben und somit im oberen Bereich des Plots angezeigt. Die weitere Analyse fokussierte sich auf die Proteine, die einem p-Wert $\leq 0,05$ entsprachen und mit einer mindestens 2-fachen differentiellen Proteinabundanz vorlagen, wobei diese Grenzwerte in den Volcano-Plots durch Linien markiert wurden. Zur Erstellung der Volcano-Plots wurde GraphPad Prism Version 5.04 für Windows³⁸ verwendet.

3.5.9.2 Venn-Diagramme

Für die separate Analyse der sekretierten Proteine mit signifikanter differentieller Veränderung der Abundanz als Reaktion auf die Ko-Inkubation mit der A1- oder A2-HMGF wurden Venn-Diagramme erstellt. Dabei wurde jeweils ein Venn-Diagramm für die Proteine mit verminderter Abundanz und eines für die mit erhöhter Abundanz erstellt, um sowohl die Unterschiede der Zell-Reaktion auf die A1- oder A2-Milch als

³⁸ GraphPad Software, Boston, USA

auch die Schnittmenge zwischen den beiden Ko-Inkubationen zu ermitteln. Für die Erstellung der Venn-Diagramme wurde „InteractiVenn“ (HEBERLE et al., 2015) (<https://www.interactivenn.net/index.html>, zuletzt abgerufen am 02. Juni 2025) verwendet.

3.5.9.3 Nutzung von Datenbanken

Um mehr Informationen über ausgewählte Proteine zu bekommen, wurden öffentlich zugängliche Datenbanken einbezogen. Die Datenbank „The Human Protein Atlas“ (UHLEN et al., 2010) wurde verwendet, um Informationen über bekannte exprimierte Proteine in humanen PBMCs und deren Subtypen zu erhalten (<https://www.proteinatlas.org>, zuletzt abgerufen am 13. September 2025). Für den Erhalt von Informationen über spezifische Peptid- und Proteinsequenzen sowie Molekulargewichte einzelner Proteine wurde „UniProt“ (UNIPROT, 2025) als Datenbank verwendet (<https://www.uniprot.org>, zuletzt abgerufen am 23. September 2025). Für Informationen über bereits bekannte Protein-Protein-Interaktionen, wurde die Datenbank „STRING Version 12.0“ verwendet (<https://string-db.org>, zuletzt abgerufen am 11. September 2025). Informationen über Phosphorylierungen einzelner Proteine wurde über die Datenbank „PhosphoSitePlus“ (HORNBECK et al., 2015) eingeholt (<https://www.phosphosite.org>, zuletzt abgerufen am 21. September 2025). Um Proteine zu identifizieren, die bereits in Kuhmilch detektiert wurden, wurde die Datenbank „BoMiProt 2.0“ (MAITY et al., 2020; DAS et al., 2022) verwendet (<https://bomiprot.org>, zuletzt abgerufen am 12. September 2025).

3.5.10 Verfügbarkeit der massenspektrometrischen Daten

Die Daten der massenspektrometrischen Messung wurden der vorliegenden Arbeit als Anhang in digitaler Form beigelegt. Auszüge aus den Daten werden in Kapitel 4 zur Verfügung gestellt, um Informationen über wichtige, ausgewählte Proteine bereitzustellen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Milchfraktionen mit hohem molekularem Gewicht hemmten die ConA-induzierte Proliferation humaner PBMC

Um den auslösenden Faktor eines bereits beschriebenen anti-proliferativen Effektes von A1- und A2-Milch auf ConA-stimulierte humane PBMC (GARD et al., 2024) einzugrenzen, wurde die A1- und A2-Milch von jeweils drei Kühen, anhand ihres molekularen Gewichts in zwei Fraktionen (< 100 kDa = NMGF und ≥ 100 kDa = HMGF) aufgetrennt. Die funktionelle Wirkung dieser Milchfraktionen auf die ConA-induzierte Proliferation wurde mittels PBMC-Zellproliferationsassays *in vitro* untersucht. Nach 48-stündiger Inkubation mit den Milchfraktionen der A1- (siehe Abbildung 3, hellblaue Säulen) bzw. der A2-Milch (siehe Abbildung 3, graue Säulen) zeigten sich deutliche Unterschiede in der Reaktion ConA-stimulierter humaner PBMC ($n = 10$). Während die NMGF der A1- und der A2-Milch keinen Einfluss auf die Proliferation hatten, führten sowohl die A1-HMGF ($P_i 33,1 \pm 9,3$ SD; $p < 0,0001$; siehe Abbildung 3) als auch die A2-HMGF ($P_i 32,9 \pm 10,7$ SD; $p < 0,0001$; siehe Abbildung 3) zu einer hochgradig signifikanten Hemmung der ConA-induzierten Zellproliferation. Da kein signifikanter Unterschied dieses anti-inflammatorischen Effekts durch die HMGF der A1- bzw. A2-Milch vorlag, konnte die HMGF der Milch beider β -Kasein-Varianten den anti-inflammatorischen Effekt gleich gut bewirken (siehe Abbildung 3).

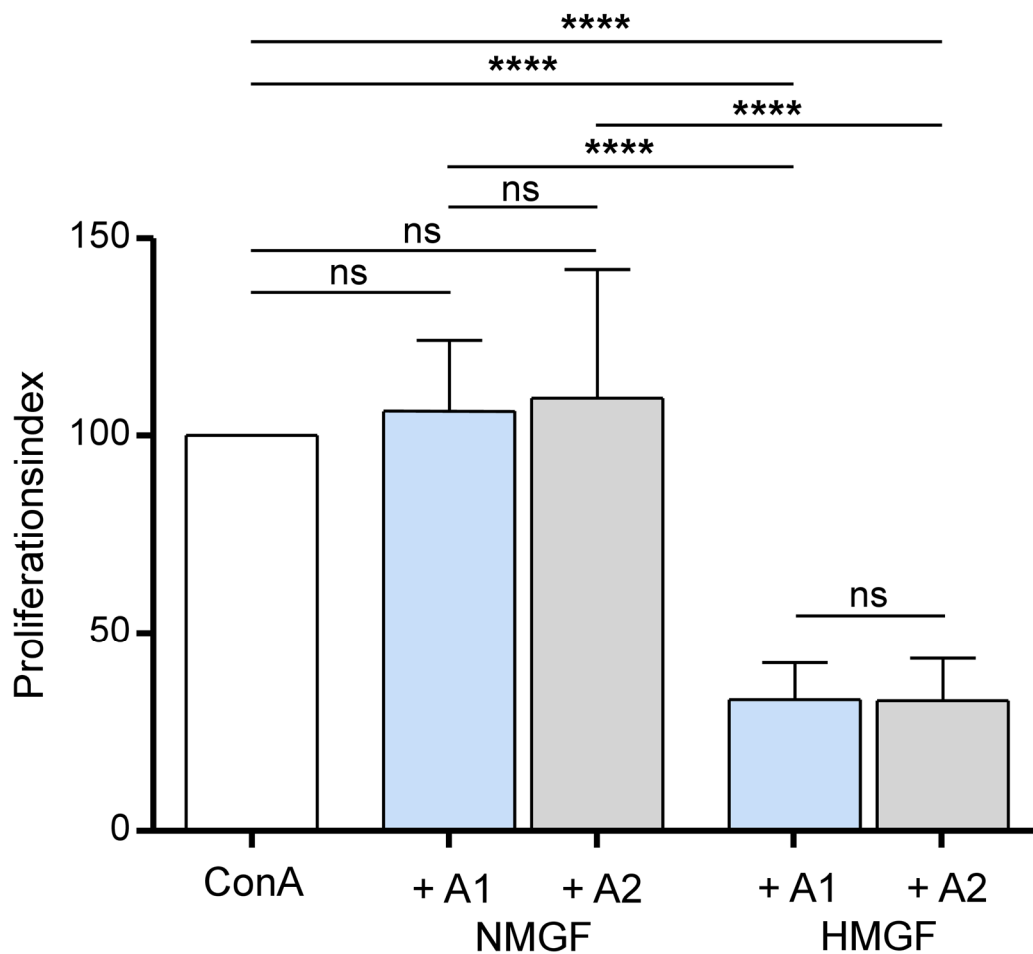


Abbildung 3: Effekte der NMGF und der HMGF von A1- und A2-Milch auf die ConA-induzierte Proliferation humaner PBMC (n = 10). Dargestellt sind die Proliferationsindizes (Pi) polyklonal stimulierter humaner PBMC nach Ko-Inkubation mit der NMGF oder der HMGF der A1- (hellblau) und A2-Milch (grau) in einer Endkonzentration von 1 %. ConA-stimulierte PBMC ohne Ko-Inkubation mit einer Milchfraktion dienten als Kontrolle und wurden auf 100 gesetzt (weiß). Zwischen der NMGF und der HMGF zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied (**** = $p \leq 0,0001$). Während die NMGF der A1- und A2-Milch keinen inhibitorischen Effekt aufwies, führte die HMGF beider Milch-Varianten zu einer hochsignifikanten Hemmung der ConA-induzierten Proliferation (**** = $p \leq 0,0001$). Zwischen den Effekten der A1- und A2-Milch wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (ns = $p > 0,05$).

4.2 Proteomische Analyse der sekretierten Proteine nach ConA-Stimulation und Ko-Inkubation der Milchfraktionen

4.2.1 Das Sekretom humaner PBMC nach der Ko-Inkubation mit den Milchfraktionen umfasste 2640 humane Proteine

Um den anti-proliferativen Effekt der HMGF beider Milch-Varianten auf ConA-stimulierte humane PBMC im Vergleich zur NMGF auf Proteinebene zu untersuchen und Einblicke in die durch die HMGF ausgelösten zellulären Mechanismen zu gewinnen, wurde ein proteomischer Ansatz gewählt. Mittels LC-MS/MS-Analyse wurden insgesamt 3199 Proteine im Sekretom der ConA-stimulierten PBMC nach Ko-Inkubation mit der HMGF und NMGF von A1- bzw. A2-Milch detektiert, von denen 2640 als human identifiziert wurden. Um eine potenzielle Überlappung zwischen humanen und bovinen Sequenzen zu berücksichtigen, wurden die Proteininferenzen mit zwei verschiedenen Auswertungsprinzipien auf Peptidebene überprüft und die Anzahl der proteinspezifischen Peptide in die Auswertung miteinbezogen, was zusammen sicherstellte, dass die identifizierten Peptide der richtigen Spezies zugeordnet wurden. Um die Veränderungen im Sekretom durch die Ko-Inkubation und dadurch die zellulären Reaktionen der PBMC zu untersuchen, wurde die Auswertung der Sekretomdaten auf die humanen Proteine beschränkt. Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit wurden nur Proteine miteinbezogen, die in mindestens sechs von zwölf Sekretomen identifiziert und zusätzlich durch die Identifikation von mindestens zwei unterschiedlichen proteinspezifischen Peptiden bestätigt wurden. Insgesamt erfüllten 2129 humane Proteine diese Kriterien und wurden in die nachfolgenden Analysen einbezogen.

4.2.2 Identifikation von differenziell abundanten Proteinen im PBMC-Sekretom nach Ko-Inkubation mit der A1- und A2-HMGF

Um zu untersuchen, welche differenziellen Veränderungen im PBMC-Sekretom durch die inhibitorische HMGF beider Milchvarianten ausgelöst wurden, lag der Fokus auf Proteinen im PBMC-Sekretom, die eine mindestens 2-fach differenzielle Abundanz ($\text{Ratio A1-HMGF} / \text{A1-NMGF} \geq 2$ bzw. $\leq 0,5$ und $\text{Ratio A2-HMGF} / \text{A2-NMGF} \geq 2$ bzw.

$\leq 0,5$) und statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$) aufwiesen. Ziel war es, sekretierte Proteine zu identifizieren, die zur festgestellten Hemmung der Proliferation beigetragen haben könnten. Unter den 2129 relevanten humanen Proteinen zeigten 99 eine signifikant veränderte Abundanz nach Ko-Inkubation mit der A1-HMGF: Davon zeigten 97 Proteine eine verminderte (siehe Abbildung 4, lila Punkte) und nur zwei Proteine eine erhöhte Abundanz (siehe Abbildung 4, orange Punkte).

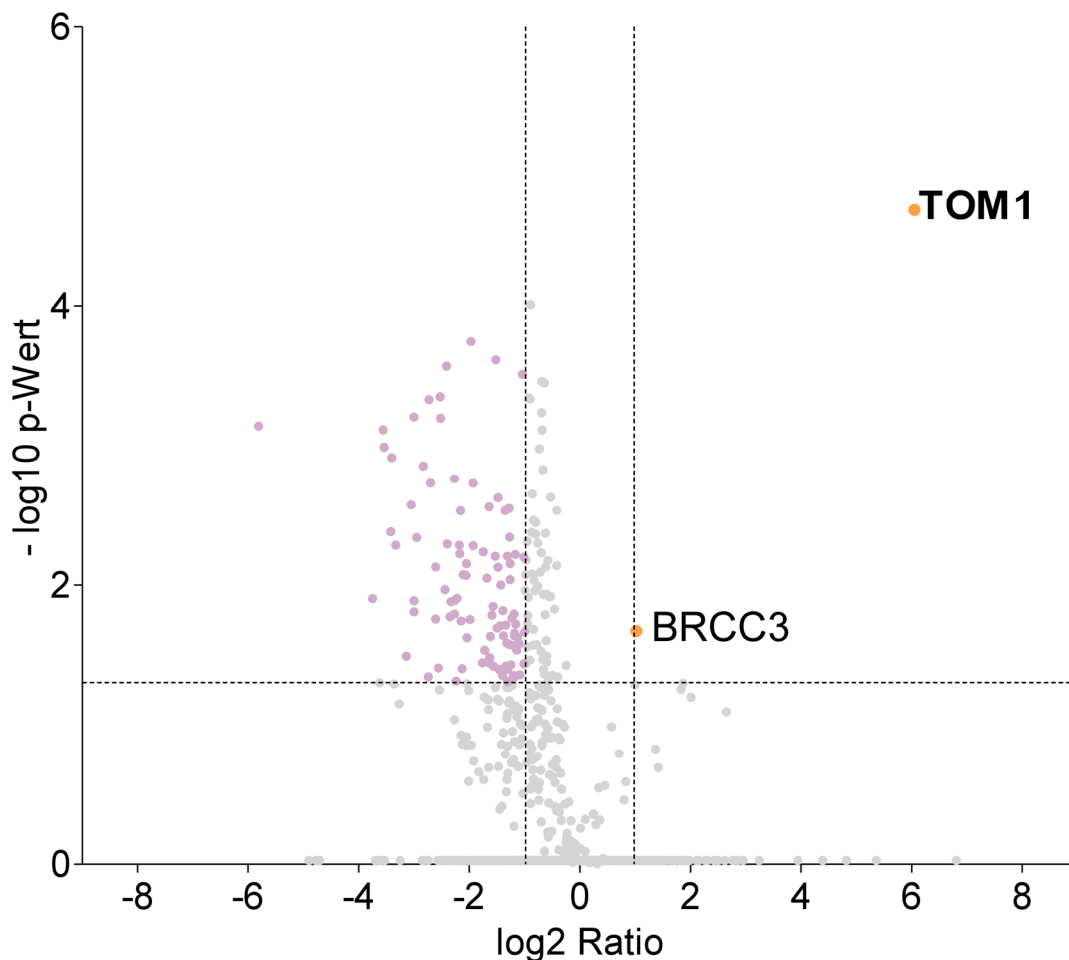


Abbildung 4: Differenziell abundante Proteine im PBMC-Sekretom nach ConA-Stimulation und Ko-Inkubation mit der A1-HMGF sind als Volcano-Plot dargestellt. Der Volcano-Plot bildet das zweidimensionale Verhältnis von mindestens 2-fach differenzieller Abundanz (vertikale gestrichelte Linien) und statistischer Signifikanz mit einem p-Wert $\leq 0,05$ (horizontale gestrichelte Linie) ab. Unter den identifizierten Proteinen zeigten 97 Proteine eine verringerte Abundanz nach Ko-Inkubation mit der A1-HMGF (lila Punkte). Nur zwei Proteine lagen mit erhöhten Abundanz nach Ko-Inkubation mit der A1-HMGF vor: BRCC3 und TOM1

(orange Punkte).

Die Ko-Inkubation mit der A2-HMGF ergab 136 Proteine mit signifikant differenzieller Abundanz, darunter 132 mit reduzierter (siehe Abbildung 5, lila Punkte) und vier mit erhöhter Abundanz (siehe Abbildung 5, orange Punkte).

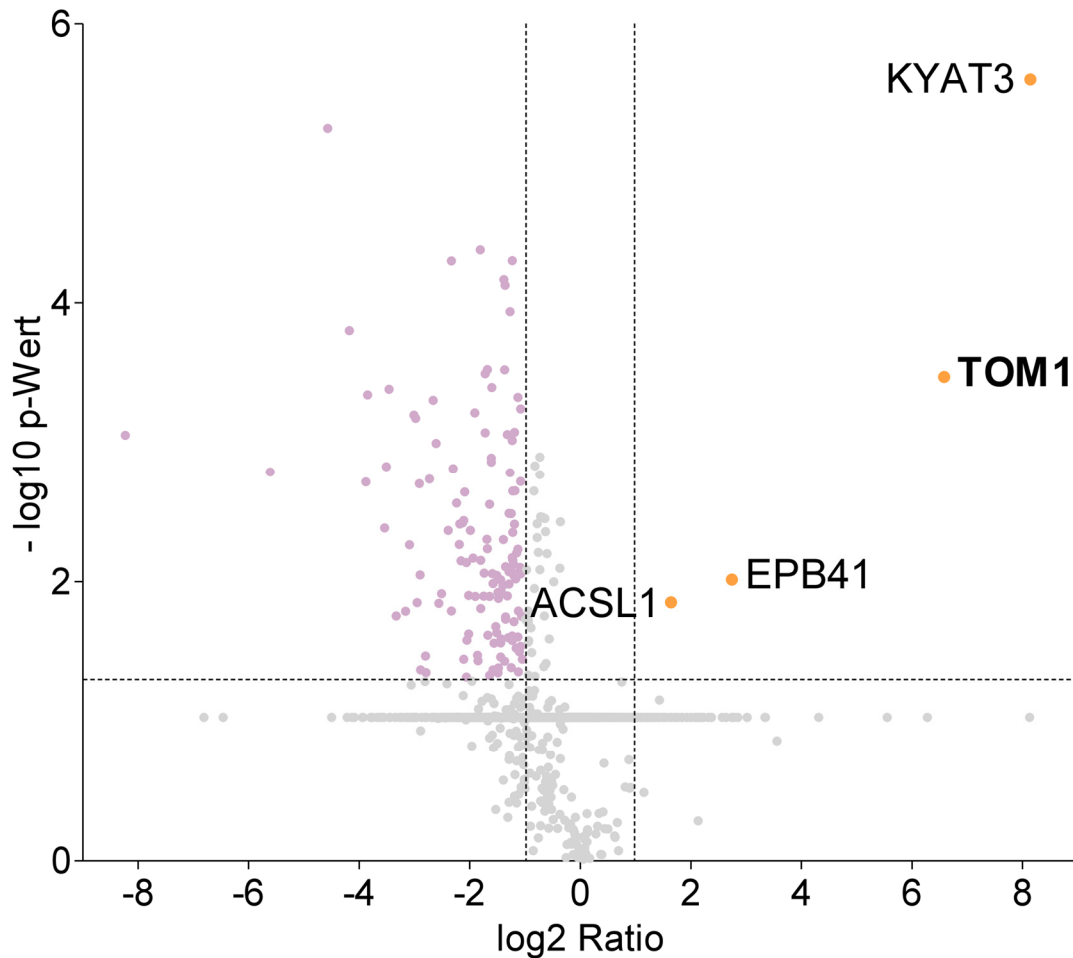


Abbildung 5: Differenziell abundante Proteine im PBMC-Sekretom nach ConA-Stimulation und Ko-Inkubation mit der A2-HMGF sind als Volcano-Plot dargestellt. Der Volcano-Plot bildet das zweidimensionale Verhältnis von mindestens 2-fach differenzieller Abundanz (vertikale gestrichelte Linien) und statistischer Signifikanz mit einem p-Wert $\leq 0,05$ (horizontale gestrichelte Linie) ab. Unter den identifizierten Proteinen zeigten 132 Proteine eine verringerte Abundanz nach Ko-Inkubation mit der A2-HMGF (lila Punkte). Nur vier Proteine lagen mit erhöhter Abundanz nach Ko-Inkubation mit der A1-HMGF vor: ACSL1,

EPB41, TOM1 und KYAT3 (orange Punkte).

Insgesamt zeigte somit nur eine kleine Gruppe der im PBMC-Sekretom identifizierten Proteine eine statistisch signifikante Zunahme der Abundanz in Reaktion auf die Ko-Inkubation mit der HMGF der A1- bzw. A2-Milch. Im Gegensatz dazu ergab die Auswertung der niedriger abundanten Proteine im PBMC-Sekretom eine Anzahl von insgesamt 176 Proteinen mit signifikant verminderter Abundanz, wobei Unterschiede in der Anzahl der differenziellen Proteine zwischen der Ko-Inkubation mit der A1- (siehe Abbildung 6, hellblau) und der A2-HMGF (siehe Abbildung 6, grau) festgestellt werden konnten.

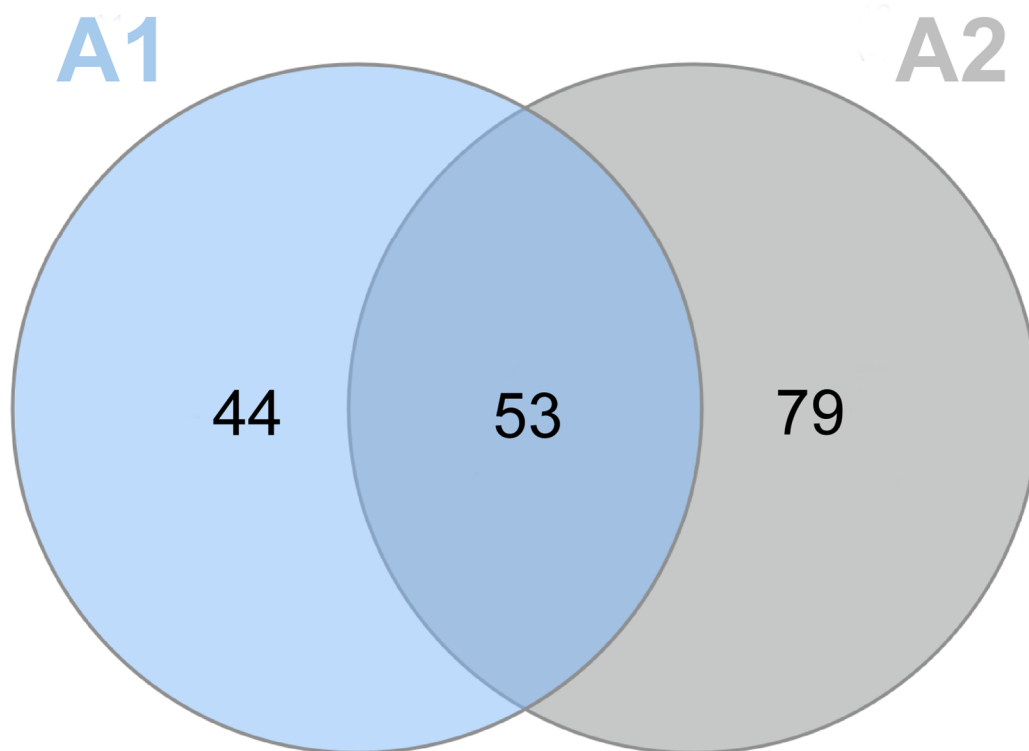


Abbildung 6: Proteine mit verminderter Abundanz im PBMC-Sekretom nach ConA-Stimulation und Ko-Inkubation mit der A1- bzw. A2-HMGF. Das Venn-Diagramm veranschaulicht die Verteilung der 176 Proteine, die im PBMC-Sekretom nach der Ko-Inkubation mit der A1- bzw. A2-HMGF signifikant niedriger abundant waren. Nach Ko-Inkubation mit der A1-HMGF (hellblau und dunkelblau) zeigten 97 Proteine eine verminderte Abundanz. Die Ko-Inkubation mit der A2-HMGF (grau und dunkelblau) führte zu einer signifikanten Abnahme von 132 Proteinen. Insgesamt wurden 53 Proteine nach der Ko-

Inkubation mit den HMGF beider Milchvarianten nachgewiesen (dunkelblau).

4.2.3 Identifikation von posttranslationalen Modifikationen

Zusätzlich zu den Peptid- und Proteinidentifikationen wurde eine Analyse der im Datensatz enthaltenen posttranslationalen Modifikationen (PTM) durchgeführt. Dabei konnten mehrere Modifikationen konsistent nachgewiesen werden: N-terminaler Methionin-Verlust in Kombination mit Acetylierung, Deamidierungen von Asparagin- und Glutamin-Resten sowie Oxidationen. Darüber hinaus wurde eine Anzahl von 69 phosphorylierten Peptiden mit Modifikationen an Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Resten unter den analysierten 2129 humanen Proteinen identifiziert. In manchen Fällen trat die Phosphorylierung zusammen mit weiteren PTM wie beispielsweise Deamidierungen auf. Diese Phosphorylierungen können beispielsweise Informationen über den funktionellen Zustand eines Proteins wie dessen Aktivierung oder Deaktivierung liefern, wobei nicht für alle bekannten Proteine eine Phosphorylierung beschrieben ist (BILBROUGH et al., 2022; MUNEER et al., 2025).

4.2.4 TOM1 zeigte eine signifikant erhöhte Abundanz im PBMC-Sekretom nach Ko-Inkubation mit der A1- und A2-HMGF

Besonders relevant waren die Proteine, die nach Ko-Inkubation mit der HMGF einer der beiden Milchvarianten eine signifikant erhöhte Abundanz aufwiesen, da anzunehmen ist, dass der inhibitorische Effekt über aktivierte und damit verstärkt nachweisbare Proteine vermittelt wird.

Nach Ko-Inkubation mit der A1-HMGF konnten lediglich zwei Proteine mit erhöhter Abundanz identifiziert werden, während es nach der A2-HMGF Exposition vier waren. Angesichts des vergleichbaren inhibitorischen Effekts der HMGF beider Milchvarianten auf die ConA-induzierte PBMC-Proliferation lag der Fokus der weiteren Analyse auf Proteinen, die unter beiden Bedingungen konsistent vermehrt sekretiert wurden, da sie als potenzielle Mediatoren oder Marker des Effekts und somit beteiligter Signalwege in Frage kamen. Nach A1-HMGF-Ko-Inkubation war insbesondere die

„Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36“ (BRCC3) und „Target of Myb protein 1“ (TOM1) signifikant erhöht im Sekretom der PBMC nachweisbar (siehe Tabelle 1, siehe Abbildung 7 hellblau und dunkelblau).

Gen	Protein Name	p-Wert
BRCC3	Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36	0,0213
TOM1	Target of Myb protein 1	$2,569 \times 10^{-5}$

Tabelle 1: Proteine mit signifikant erhöhter Abundanz im PBMC-Sekretom nach Ko-Inkubation mit der A1-HMGF. Nur zwei Proteine zeigten eine erhöhte Abundanz: BRCC3 und TOM1. Die Spalten zeigen (1) die Genbezeichnung, (2) die zugehörigen Protein Namen und (3) den statistischen Wert der Protein-Anreicherung, dargestellt als p-Wert für jedes Protein.

Im Gegensatz dazu führte die Ko-Inkubation mit der A2-HMGF zu einer signifikant gesteigerten Abundanz von „Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1“ (ACSL1), „Protein 4.1“ (EPB41), „Kynurenine-oxoglutarate transaminase 3“ (KYAT3) und TOM1 (siehe Tabelle 2, siehe Abbildung 7 grau und dunkelblau).

Gen	Protein Name	p-Wert
ACSL1	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1	0,0140
EPB41	Protein 4.1	0,0097
TOM1	Target of Myb protein 1	0,0003
KYAT3	Kynurenine-oxoglutarate transaminase 3	$2,4877 \times 10^{-6}$

Tabelle 2: Proteine mit signifikant erhöhter Abundanz im PBMC-Sekretom nach Ko-Inkubation mit der A2-HMGF. Vier Proteine zeigten eine erhöhte Abundanz: ACSL1, EPB41, TOM1 und KYAT3. Die Spalten zeigen (1) die Genbezeichnung, (2) die zugehörigen Protein Namen und (3) den statistischen Wert der Protein-Anreicherung, dargestellt als p-Wert für jedes Protein.

Hervorzuheben ist, dass ausschließlich TOM1 unter beiden Ko-Inkubationen konsistent und signifikant höher abundant war (siehe Tabelle 2 und 3, Abbildung 7 dunkelblau). Dabei konnte ein 66,1-facher Anstieg der Abundanz nach Ko-Inkubation mit der A1-HMGF ($p = 0,00002$) und ein 95,4-facher Anstieg nach Ko-Inkubation mit der A2-HMGF ($p = 0,0003$) nachgewiesen werden (siehe Tabelle 2 und 3).

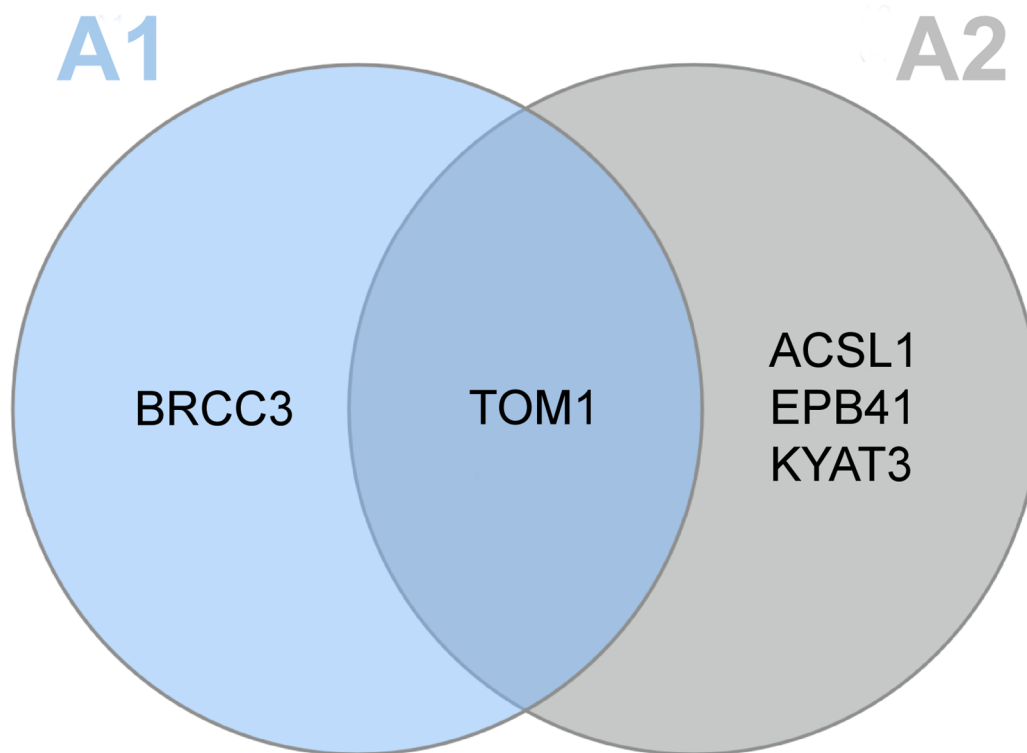


Abbildung 7: TOM1 wurde als einziges Protein nach Ko-Inkubation mit der A1- und der A2-HMGF mit erhöhter Abundanz im Sekretom der PBMC identifiziert. Das Venn-Diagramm veranschaulicht die fünf Proteine, die im PBMC-Sekretom mit erhöhter Abundanz identifiziert wurden. Nach A1-HMGF Exposition waren BRCC3 und TOM1 signifikant erhöht (hellblau und dunkelblau). Die Ko-Inkubation mit der A2-HMGF führte zu einer signifikanten Anreicherung von ACSL1, EPB41, KYAT3 und TOM1 (grau und dunkelblau). Nur TOM1 war durch die Ko-Inkubation mit der HMGF beider Milchvarianten signifikant angereichert (dunkelblau).

Für zwei dieser höher abundanten Proteine im Sekretom waren im Datensatz auch Hinweise auf Proteomform-Variationen zu finden. So wurde ACSL1 in allen untersuchten Sekretomen mit einer Phosphorylierung an Serin135 identifiziert. Das Protein TOM1, das aufgrund der Anreicherung nach der Ko-Inkubation sowohl mit der A1- als auch mit der A2-HMGF besonders spannend war, wurde in allen Sekretomen nach HMGF-Exposition konsistent mit einem deamidierten Peptid (YEAPQATDGLAGALDAR, Peptid 386-402) mit einer Deamidierung an Glutamin390 (Q5) identifiziert, was auf eine robuste Modifikation hindeutet. Obwohl der Datensatz

ERGEBNISSE

gezielt nach phosphorylierten TOM1-Peptiden durchsucht wurde, konnte keine Phosphorylierung dieses Proteins nachgewiesen werden. Entscheidend für die Identifikation von TOM1 war zudem, dass TOM1 durch mehrere proteinspezifische Peptide identifiziert werden konnte, darunter auch Sequenzen, die ausschließlich spezifisch für das humane Protein sind und sich im bovinen Homolog durch Austausch von Aminosäuren unterscheiden (beispielsweise SSPDLTGVVTIYEDLRR, FHVLVASQDFVESVLVR und VLELIPQIANEQLTEELLIVNDNLNNVFLR; siehe Abbildung 8).

MDFLLGNPFSSPVGQRIEKATDGSLSQSEDWALNMEICDIINETEEGPKDALRAVKKRIVG	1-60
<i>85-101</i>	
NKNFHEVMLALTVLETVCVKNCGHRFHVLVASQDFVESVLVRTILPKNNPPTIVHDKVLNL	61-120
<i>117-129</i> <i>130-145</i> <i>130-146</i>	
IQSWADAFR SSPDLTGVVTIYEDLR RKGLEFPMTDLDMLSPIHTPQRTVFNSETQSGQDS	121-180
VGTDSSQQEDSGQHAAPLPAPPILSGDTPIAPTPEIQIKLRSELEMVSGNVRVMSEMLTE	181-240
<i>268-297</i>	
LVPTQAEPADLELLQELNRTCRAHQQRVLELIPQIANEQLTEELLIVNDNLNNVFLRHER	241-300
FERFRTGQTTKAPSEAEPADLIDMGPDPAATGNLSSQLAGMNLGSSSVRAGLQSLEASG	301-360
RLEDEFDMFALTRGSSSLADQRKEVKYEAPQATDGLAGALDARQQSTGAIPVTQACLMEDI	361-420
<i>457-488</i>	
EQWLSTDVGNDAAEPKGVTSSEFDKFLEERAKAADRLPNLSSPSAEGPPGPPSGPAPRKK	421-480
TQEKDDDMLFAL	481-492

Abbildung 8: Aminosäuresequenz des humanen TOM1-Proteins. Abgebildet ist die aus 492 Aminosäuren bestehende Sequenz des humanen TOM1-Proteins. Die ausschließlich im humanen TOM1 enthaltenen und in dieser proteomischen Analyse identifizierten sechs verschiedenen Peptidsequenzen sind in rot markiert und werden durch die jeweilige Position der einzelnen Peptidsequenzen in der gesamten Sequenz ergänzt (rot kursiv). Sequenz bezogen aus „Uniprot“ (UNIPROT, 2025) (<https://www.uniprot.org>, abgerufen am 23. September 2025).

Die eindeutige und hochsignifikante Anreicherung von TOM1 im PBMC-Sekretom nach HMGF-Ko-Inkubation beider Milchvarianten machte dieses Protein zum potenziellen Mediator des festgestellten inhibitorischen Effekts auf die ConA-induzierte Proliferation und damit zum zentralen Kandidaten für weitere Untersuchungen.

4.3 Funktionelle Verifikation von TOM1

Um zu prüfen, ob TOM1 selbst einen anti-proliferativen Effekt ausüben kann und um seine funktionellen Eigenschaften näher zu charakterisieren, wurden ConA-stimulierte humane PBMC ($n = 9$) mit dem aufgereinigten humanen TOM1-Protein in aufsteigenden Konzentrationen ko-inkubiert (siehe Abbildung 9, graue Säulen) und die Proliferation der PBMC gemessen. Während TOM1 in der niedrigsten Konzentration von 0,1 ng/ml keinen messbaren anti-proliferativen Effekt zeigte, führte bereits eine Konzentration von 1 ng/ml zu einer signifikanten Hemmung der ConA-induzierten Proliferation ($P_i: 88,31 \pm 14,56$ SD; $p = 0,043$; siehe Abbildung 9). Bei 100 ng/ml konnte ein hochsignifikanter inhibitorischer Effekt festgestellt werden ($P_i: 57,45 \pm 20,47$ SD; $p = 0,0002$; siehe Abbildung 8). In der höchsten Konzentration von 1000 ng/ml unterdrückte TOM1 die ConA-induzierte Proliferation um mehr als 50 % ($P_i: 47,40 \pm 19,26$ SD; $p < 0,0001$; siehe Abbildung 9).

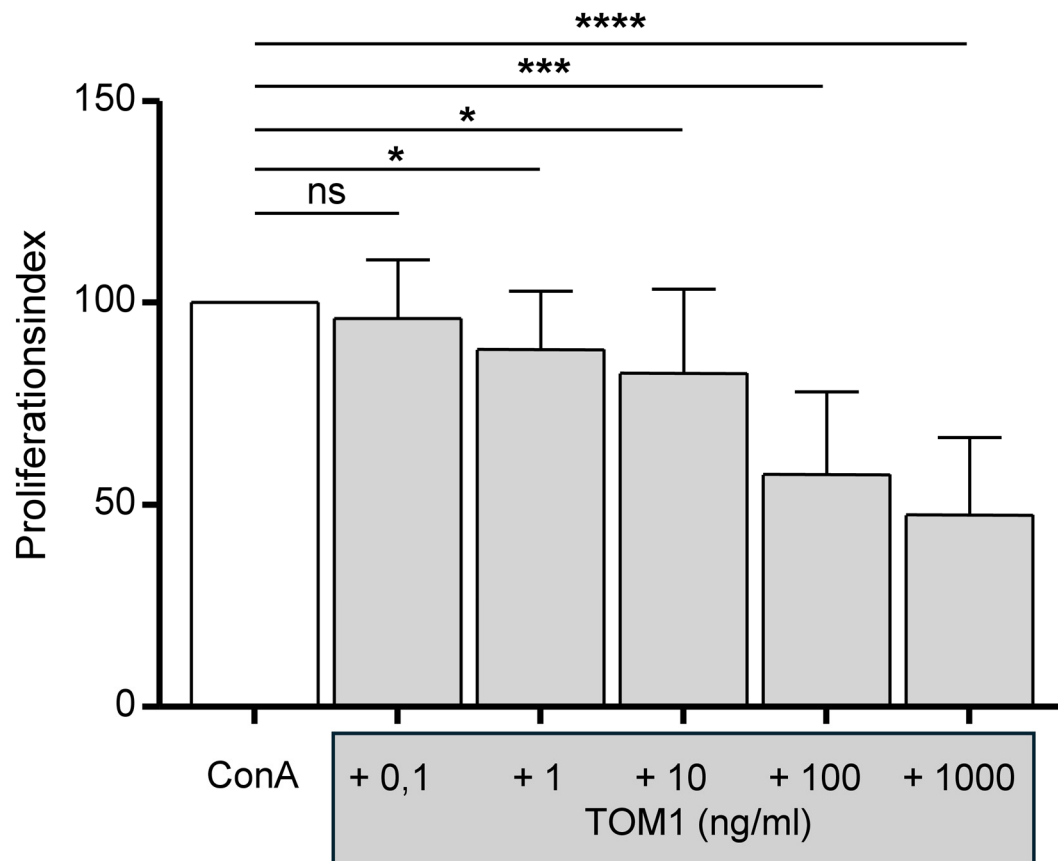


Abbildung 9: Effekt aufsteigender TOM1-Konzentrationen auf die ConA-induzierte Proliferation humaner PBMC (n = 9). Das Säulendiagramm zeigt die Proliferationsindizes (Pi) polyklonal stimulierter humaner PBMC nach Ko-Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von TOM1 (grau). ConA-stimulierte PBMC ohne Ko-Inkubation mit TOM1 dienen als Kontrolle und wurden auf 100 gesetzt (weiß). Bereits ab einer Konzentration von 1 ng/ml zeigte TOM1 einen signifikanten inhibitorischen Effekt (* = $p \leq 0,05$). Mit höheren TOM1-Konzentrationen verstärkte sich der inhibitorische Effekt deutlich und führte bei 1000 ng/ml zu einer Suppression der Proliferation um mehr als 50 % (**** = $p \leq 0,0001$). ns = $p > 0,05$; *** = $p \leq 0,001$.

TOM1 zeigte also selbstständig einen anti-inflammatorischen Effekt auf die ConA-stimulierten PBMC *in vitro*, der von der Intensität bei einer Konzentration von 1000 ng/ml mit dem anti-inflammatorischen Effekt der A1- und A2-HMGF vergleichbar war.

Insgesamt wurde gezeigt, dass ausschließlich die HMGF beider Milchvarianten einen

anti-inflammatorischen Effekt auf die ConA-stimulierten humanen PBMC ausüben konnte und TOM1 einen vielversprechenden Kandidaten als Mediator für den vermittelten Effekt dieser Fraktionen darstellt.

5 DISKUSSION

Milch stellt seit Jahrhunderten einen zentralen Bestandteil der menschlichen Ernährung dar und ist in fast allen Teilen der Welt als Lebensmittel tief verankert (EVERSHED et al., 2008; EVERSHED et al., 2022; OECD/FAO, 2025). Deshalb ist es wichtig, die Auswirkungen des Milchkonsums auf den menschlichen Organismus zu verstehen und tiefergehend zu untersuchen. Der Einfluss von Milch auf das menschliche Immunsystem ist immer noch Bestandteil verschiedener Untersuchungen, da die Auswirkungen darauf noch nicht vollständig verstanden sind. Auch in dieser Arbeit wurde der Einfluss von Kuhmilch auf einen Teil des humanen Immunsystems, den Immunzellen untersucht. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen bereits beschriebenen anti-inflammatorischen Effekt von Milch auf *in vitro* mit ConA stimulierte humane PBMC (GARD et al., 2024) näher zu charakterisieren und den auslösenden Faktor der Milch weiter einzugrenzen. In diesen vorherigen Experimenten wurde die Auswirkung von Milch der A1- und A2- β -Kasein-Variante verglichen, wobei kein Unterschied in deren Wirkung festgestellt werden konnte, sondern eine einheitliche hochsignifikante Hemmung beider Milchvarianten auf die ConA-induzierte Proliferation humaner PBMC (GARD et al., 2024). Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht-hitzebehandelte Milchproben der A1- und der A2-Variante anhand ihres molekularen Gewichts in jeweils zwei Fraktionen aufgetrennt und deren Auswirkung getrennt auf die Proliferation von ConA-stimulierten humanen PBMC *in vitro* mittels Zellproliferationsassay untersucht. Diese Versuche offenbarten, dass die Milch-Fraktion mit niedrigem molekularem Gewicht (< 100 kDa, NMGF) keinen Effekt auf die Proliferationsrate hatte. Im Gegensatz dazu konnte ein hochgradig signifikanter Proliferations-hemmender und somit anti-inflammatorischer Effekt der Fraktion mit hohem molekularem Gewicht (≥ 100 kDa, HMGF) auf die polyklonal stimulierten humanen PBMC *in vitro* ermittelt werden. Dabei lag sowohl in der Wirkung der NMGF als auch der HMGF kein Unterschied zwischen der A1- und der A2-Variante vor (siehe Abbildung 3). Diese Arbeit beschreibt somit zum ersten Mal, dass der anti-inflammatorisch wirkende Faktor der HMGF der Milch zugeordnet werden kann. Dies deutet darauf hin, dass der hemmende Faktor entweder selbst ein molekulares Gewicht von mindestens 100 kDa besitzen muss oder in Komplexen vorliegt, die dieses molekulare Gewicht erreichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die humanen PBMC *in vitro* mit 1 $\mu\text{g/ml}$ ConA polyklonal stimuliert und mit der HMGF

oder NMGF der nicht-hitzebehandelten A1- oder A2-Milch in einer Konzentration von 1 % für 48 Stunden ko-inkubiert. Vergleichbare funktionelle Studien mit Milch, fraktioniert nach molekularem Gewicht, existieren bisher nicht. Durch Ko-Inkubation von humanen PBMC mit unfraktionierter und nicht-hitzebehandelter Milch der A1- und A2-Variante unter sonst identischen Bedingungen wurde in früheren Experimenten durch uns bereits der generell durch Milch ausgelöste anti-inflammatorische Effekt beschrieben, wobei der zugrunde liegende Mechanismus nicht untersucht wurde (GARD et al., 2024). In einem anderen funktionellen Ansatz, bei dem humane PBMC für 72 Stunden mit ConA stimuliert und mit einer vergleichbaren Milch-Konzentration von 1,7 % ko-inkubiert wurden, konnte kein Einfluss der Milch auf die Proliferation der PBMC festgestellt werden (ERIKSEN et al., 2009). Da sowohl eine Differenz in der Inkubationszeit besteht als auch detaillierte Informationen über die Aufbereitung der entfetteten Milch sowie über die verwendete ConA-Konzentration fehlen (ERIKSEN et al., 2009), ist ein direkter Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Vor allem die undefinierte Konzentration des Mitogens ConA stellt einen kritischen Punkt dar. ConA, ein pflanzliches Lektin aus der Jackbohne, wird schon lange speziesübergreifend als T-Zell-Stimulanz eingesetzt (WEISS et al., 1987; PERRIN et al., 1997). Es bindet an Mannose-Reste auf der T-Zelloberfläche und interagiert dabei auch mit dem TCR-Komplex, wie es bereits bei der humanen T-Zelllinie Jurkat demonstriert wurde (WEISS et al., 1987; PANG et al., 2012). In murinen Modellen wurde zudem gezeigt, dass die durch ConA induzierte T-Zell-Stimulation durch ko-stimulatorische Interaktion des T-Zell-Rezeptors CD28 mit den auf APCs lokalisierten Molekülen CD80 und CD86 sowie über den HVEM erfolgte (PERRIN et al., 1997; ANDO et al., 2014). Die genaue Wirkkaskade von ConA ist beim Menschen noch nicht ganz geklärt, dennoch ist ausreichend belegt, dass ConA speziesübergreifend T-Zellen stimulieren kann (HEDFORS et al., 1975; WEISS et al., 1987; BRAVO-PARRA et al., 2025). Eine Signalübertragung wie bei den murinen Zellen über Interaktion der T-Zellen mit APCs (PERRIN et al., 1997) könnte aber auch bei der ConA-Stimulation humaner T-Zellen eine entscheidende Rolle spielen, da es Hinweise auf eine Monozyten-abhängige Aktivierung humaner T-Zellen gibt (HEDFORS et al., 1975). Aus diesem Grund wurden in unseren Untersuchungen PBMC als Zellpopulation gewählt, da diese sowohl T-Zellen als auch APCs wie beispielsweise Monozyten enthalten (KLEIVELAND, 2015; LI et al., 2022) und die

denkbar benötigten Zell-Zell-Interaktionen somit möglich wären. Die Verwendung von PBMC bei Untersuchungen zur T-Zell-Antwort ist zudem lange etabliert und häufig eingesetzt (TORRE & OLIVER, 1989; TAPIA-CALLE et al., 2019). Durch ConA als eingesetztes Mitogen liegt es nahe, dass auch die inhibierende Wirkung der HMGF der A1- bzw. A2-Milch gegen die T-Zellen gerichtet ist. Um diese Hypothese weiter zu prüfen, erscheint es sinnvoll, weitere Studien, in denen ConA in Kombination mit Milch eingesetzt wurde, zu betrachten. Bei bovinen PBMC wurde in niedrigeren Milch-Konzentrationen, vergleichbar mit den in unseren Experimenten eingesetzten 1 %, nach 90-stündiger Inkubation kein inhibitorischer Effekt auf die ConA-induzierte Proliferation der bovinen PBMC festgestellt (TORRE & OLIVER, 1989). Eine Hemmung der PBMC-Proliferation konnte allerdings bei einer Milch-Konzentration von 20 % ermittelt werden (TORRE & OLIVER, 1989). Da der zugrundeliegende Mechanismus und auch die durch die Milch- und ConA-Inkubation beeinflussten Zelltypen innerhalb der PBMC nicht untersucht wurden, konnte in dieser Studie nicht auf eine T-Zell-Antwort geschlossen werden (TORRE & OLIVER, 1989). Diese Ergebnisse (TORRE & OLIVER, 1989) deuten aber darauf hin, dass der anti-proliferative Effekt der Milch nicht Spezies-spezifisch ist, sondern vielmehr auf einer konservierten, intrinsischen Eigenschaft der Milch und ihrer Bestandteile beruht, wobei dabei die experimentellen Bedingungen entscheidend erscheinen. Um herauszufinden, ob der anti-proliferative Effekt der Milch und ihrer HMGFs bei den humanen PBMC mit dem verwendeten Mitogen zusammenhängt und Faktoren aus der Milch dabei möglicherweise mit Mitogen-spezifischen induzierten Signalwegen zur T-Zell-Aktivierung interagieren, könnten in nachfolgenden Untersuchungen andere T-Zell-Stimulanzien wie beispielsweise PHA (HOMBURG et al., 2025) eingesetzt werden. Nicht nur das eingesetzte Stimulanz, sondern auch die Aufbereitung der verwendeten Milch könnte entscheidend sein, denn durch verschiedene Präparationstechniken wäre es denkbar, dass Milch-Bestandteile verloren gehen, verändert werden oder es im Fall von Proteinen zur Denaturierung und somit zu einem möglichen Funktionsverlust kommt (VAN LIESHOUT et al., 2020). Dafür spricht, dass durch Hitzebehandlung von experimentell verwendeter Milch in einem *in vitro* Ansatz mit humanen PBMC eine Veränderung in der Sekretion von Zytokinen im Gegensatz zur Verwendung von nicht-hitzebehandelter Milch festgestellt werden konnte (BOGAHAWATHTHA et al., 2018). Dabei wurden humane PBMC *in vitro* ohne Zusatz

eines Mitogens mit entfetteter Milch in einer Konzentration von 10 % inkubiert, die entweder einer Hitzebehandlung von 100 °C für 30 Sekunden oder keiner Hitzebehandlung unterzogen wurde (BOGAHAWATHTHA et al., 2018). Als Negativ-Kontrolle wurden PBMC verwendet, die mit Medium ohne Milch inkubiert wurden und deren Zytokinproduktion als Basislinie eingesetzt wurde (BOGAHAWATHTHA et al., 2018). Mittels Zytokin-ELISA wurden ausgewählte sekretierte Zytokine im Zellkultur-Überstand der PBMC nach 96 Stunden Inkubation gemessen (BOGAHAWATHTHA et al., 2018). Durch Inkubation mit nicht-hitzebehandelter Milch wurden signifikant höhere Werte für die Zytokine IL-10 und IFN- γ in Relation zur Negativ-Kontrolle gemessen (BOGAHAWATHTHA et al., 2018). Nach Hitzebehandlung der Milch konnte eine signifikante Verringerung der IL-10 und IFN- γ Sekretion der PBMC in Relation zur Sekretion durch nicht-hitzebehandelte Milch detektiert werden (BOGAHAWATHTHA et al., 2018). Diese Änderung im Zytokin-Profil wurde als veränderte Wirkung der denaturierten Milchproteine interpretiert, wobei der Mechanismus hinter der Zytokin-Sekretion und deren Veränderung nicht untersucht wurde (BOGAHAWATHTHA et al., 2018). Da die PBMC ohne Zusatz von ConA *in vitro* kultiviert wurden (BOGAHAWATHTHA et al., 2018), ist ein direkter Rückschluss von den gemessenen sekretierten Zytokinen auf unsere Ergebnisse der Zellproliferationsassays nicht möglich, jedoch lässt sich ein deutlicher Einfluss der Hitzebehandlung von Milch auf deren Wirkung auf die PBMC erkennen (BOGAHAWATHTHA et al., 2018). In weiterführenden Versuchen wäre darum auch die Untersuchung der Wirkung von hitzebehandelter Milch auf ConA-stimulierte humane PBMC mittels Zellproliferationsassays spannend, um den funktionellen Effekt der Hitzebehandlung unter diesen Bedingungen erörtern zu können. In keiner der annähernd vergleichbaren Studien, wurde weder der Mechanismus hinter den beschriebenen Effekten durch die Milch untersucht noch ein Faktor in der Milch als potenziell Effekt-auslösendes Agens bestimmt (TORRE & OLIVER, 1989; ERIKSEN et al., 2009; BOGAHAWATHTHA et al., 2018). Das könnte darin begründet sein, dass Milch unter anderem auf Grund ihrer Komponenten auch hinsichtlich Molekülgröße und Konzentration eine hochkomplexe und schwierig zu untersuchende Matrix darstellt (GREENWOOD & HONAN, 2019; ACQUAVIA et al., 2025). Zusätzlich führt die große Spannbreite der Protein-Abundanzen der Milch dazu (DAS et al., 2022), dass hoch abundanten Proteine wie beispielsweise Kaseine die Detektion der niedrig abundanten Proteine erschweren

können (GREENWOOD & HONAN, 2019). In einer Datenbank wurden 2019 und 2022 die bis zu diesen Zeitpunkten identifizierten Milchproteine aus veröffentlichten Publikationen händisch zusammengefasst, wobei zu den im Jahr 2019 3159 erfassten Proteinen in diesem Zeitraum 7459 Proteine ergänzt wurden, was zu einer Gesamtzahl von 10642 Proteinen führte (MAITY et al., 2020; DAS et al., 2022). Von diesen Proteinen konnten nur 1789 Proteinen weitere Informationen zugeordnet werden, was verdeutlicht, wie wenig charakterisiert viele Milchproteine sind (DAS et al., 2022). Das geringe Wissen über die Funktionen der uncharakterisierten Milchproteine und somit auch über potenzielle Faktoren in der Milch, die den *in vitro* festgestellten anti-proliferativen Effekt der HMGF der A1- und A2-Milch auf ConA-stimulierte PBMC vermitteln, macht eine tiefergehende Untersuchung der Wirkung der Milchfraktionen auf die ConA-stimulierten PBMC unabdingbar.

Um diesen Zusammenhang besser verstehen zu können und um die Immunantwort der PBMC und der denkbar durch ConA angesprochenen T-Zellen auf die Milchfraktionen genauer zu charakterisieren, wurde neben dem funktionellen Ansatz mittels Zellproliferationsassays zusätzlich ein hochsensibler proteomischer Ansatz auf molekularer Ebenen gewählt. Dabei wurde das Sekretom der ConA-stimulierten und mit den A1- bzw. A2-Milchfraktionen ko-inkubierten humanen PBMC nach 48 Stunden Inkubation mittels label-freier LC-MS/MS analysiert. Somit konnten wir den ersten hochauflösenden proteomischen Datensatz des Sekretoms von humanen PBMC unter ConA-Stimulation und Ko-Inkubation mit verschiedenen Milchfraktionen generieren. Zu dieser spezifischen Wechselwirkung waren bisher keine Daten verfügbar. In unserer proteomischen Untersuchung konnten insgesamt 2640 sekretierte humane Proteine identifiziert werden, was die hochauflösende Analysetiefe hervorhebt (siehe Anhang Tabelle1). Da es keine vergleichbaren proteomischen Studien mit humanen PBMC unter ConA-Stimulation oder Milch-Inkubation gibt, ist es sinnvoll, Studien mit anderen Stimulanzen oder PBMC anderer Spezies heranzuziehen. So wurden nach neunstündiger Stimulation humaner PBMC mit einer Kombination aus LPS und PHA 1375 humane Proteine im Sekretom nach LC-MS/MS-Analyse detektiert (ELKHAMARY et al., 2024). Dies stellt eine deutlich geringere Anzahl an identifizierten Proteinen als in unserem proteomischen Ansatz dar. Auch bei der Inkubation von ovinen PBMC unter kombinierter LPS- und PHA-Stimulation wurden bei der proteomischen Sekretom-Analyse nach neun Stunden nur eine Gesamtzahl von 1913

Proteinen identifiziert (ELKHAMARY et al., 2024). Das verdeutlicht die Analysetiefe unseres Ansatzes durch die hochauflösende proteomische Technik. Im Rahmen der durchgeführten Analyse konnte zudem über die reine Proteinidentifizierung hinaus ein breites Spektrum an PTM erfasst werden und damit Informationen auf Proteoform-Ebene erstellt werden. So konnte N-terminaler Methionin-Verlust in Kombination mit Acetylierung, Deamidierung und Methionin-Oxidation konsistent in zahlreichen Peptiden nachgewiesen werden (siehe Anhang Tabelle 2). Darüber hinaus wurden phosphorylierte Serin-, Threonin- und Tyrosin-Reste, teilweise in Kombination mit anderen PTM nachgewiesen (siehe Anhang Tabelle 3). Der Nachweis dieser Modifikationen verdeutlicht, dass die nach Milch-Ko-Inkubation beobachtete, inhibitorische Immunantwort in ein komplexes regulatorisches Proteoform-Netzwerk eingebettet ist. In unserem proteomischen Ansatz haben wir uns auf die Analyse des Sekretoms fokussiert, da vor allem bei Immunzellen das Sekretom wertvolle Informationen über die Zell-Zell-Kommunikation und sekretierte Proteine wie beispielsweise Zytokine liefert (KNECHT et al., 2023; GHEITASI et al., 2024). Deshalb stellt die proteomische Analyse des Sekretoms im Zusammenhang mit Immunzellen (MEISSNER et al., 2013; ERDOGAN et al., 2016; GHEITASI et al., 2024) aber auch mit anderen Zellen inzwischen eine gängige Methode dar (HODGSON-GARMS et al., 2025; PINHEIRO-MACHADO et al., 2025). Häufig wird in proteomischen Ansätzen auch eine kombinierte Analyse des Sekretoms und des Zell-Proteoms verwendet (HAUDEK-PRINZ et al., 2012; DEGROOTE et al., 2021; KLEINWORT et al., 2022), was in weiterführenden Untersuchungen die Ergebnisse unseres bisherigen verwendeten proteomischen Ansatzes ergänzen und ein noch umfassenderes Verständnis für die Reaktion der PBMC liefern könnte. Das Ziel der vorliegenden proteomischen Untersuchung war es, die Immunantwort der PBMC, ausgelöst durch die Milch, näher zu charakterisieren. In den Zellproliferationsassays mit ConA-stimulierten PBMC wurde eine hochgradige Hemmung der Proliferation nur durch die A1- und A2-HMGF, nicht aber durch die NMGF beider Milchvarianten ausgelöst. Deshalb waren für uns die Proteine, die als differenziell höher abundant im Sekretom der PBMC nach HMGF-Inkubation im Vergleich zur NMGF-Inkubation der gleichen Milchvariante identifiziert wurden, von besonderem Interesse. Um eine fokussierte Auswertung dieser angereicherten Proteine zu ermöglichen, wurden nur Proteine, die als sicher identifiziert eingestuft wurden, nachfolgend analysiert. Somit wurden von

den 2640 identifizierten humanen Proteinen im Sekretom der PBMC 2129 in die weiteren Analysen einbezogen. Zur Analyse des Datensatzes wurde ein manueller Auswertungsansatz gewählt. Diese Herangehensweise wurde gewählt, um eine unvoreingenommene sowie umfassende Charakterisierung der Immunantwort und die Identifikation neuer, bisher noch nicht entdeckter potenzieller Marker, die im Zusammenhang mit dem festgestellten anti-inflammatorischen Effekt stehen könnten zu ermöglichen. Unter den 2129 Proteinen konnten 2049 Proteine unter Ko-Inkubation sowohl mit der A1-HMGF als auch mit der A2-HMGF identifiziert werden. Besonders bedeutend erschienen die Proteine, die unter Exposition einer der beiden HMGF eine signifikant erhöhte Abundanz aufwiesen, da der inhibitorische Effekt vermutlich über ein aktiviertes und damit vermehrt vorhandenes Protein vermittelt wurde. Nur eine kleine Gruppe von insgesamt fünf Proteinen war nach HMGF-Ko-Inkubation im Sekretom der PBMC signifikant erhöht: Nach der Ko-Inkubation mit der A1-HMGF wurden zwei Proteine und nach der Ko-Inkubation mit der A2-HMGF vier Proteine mit signifikant erhöhter Abundanz identifiziert (siehe Abbildung 4 und 5). Während die Unterschiede bei den wenigen höher abundanten Proteinen im PBMC-Sekretom zwischen A1- und A2-HMGF-Inkubation nicht so stark ausfielen, zeigten die sekretierten Proteine mit signifikant verringerter Abundanz eine deutlichere Diversität zwischen der A1- und A2-Variante: Während insgesamt 176 Proteine mit verringerter Abundanz identifiziert wurden, entfielen 44 dieser Proteine auf die Ko-Stimulation mit der A1-HMGF und 79 auf die Ko-Stimulation mit der A2-HMGF (siehe Abbildung 6). Da diese niedrig abundanten Proteine im PBMC-Sekretom nach HMGF-Inkubation ebenfalls wichtige funktionelle Auswirkungen haben könnten, die möglicherweise mit dem entdeckten anti-inflammatorischen Effekt in Zusammenhang stehen könnten, sollte man sich in künftigen Untersuchungen zusätzlich sowohl mit der biologischen Relevanz der insgesamt reduzierten Proteine als auch mit den Mechanismen, die dem zwischen der A1- und A2-Variante festgestellten Unterschied zugrunde liegen, beschäftigen. Dennoch ist der bei der Auswertung gesetzte Fokus auf eine direkte Analyse der höher abundanten Proteine in Auswertungen quantitativer proteomischer Datensätze nicht unüblich und wird in anderen proteomischen Datensatz-Analysen für eine fokussierte Auswertung der unter einer Bedingung höher abundanten Proteine ebenfalls aufgrund der Fragestellung verwendet (ZHAI et al., 2024). Die unterschiedlich induzierten niedrig und hoch abundanten Proteine nach A1- oder A2-

HMGF Ko-Inkubation lassen vermuten, dass sich die HMGF der A1- und A2-Variante nicht nur alleinig durch den Aminosäureaustausch im β -Kasein (WANG et al., 2025), sondern möglicherweise in weiteren, bisher unbekannten Faktoren unterscheiden. Für Unterschiede zwischen A1- und A2-Milch, abgesehen vom β -Kasein, spricht auch eine Analyse des Milchproteoms, bei der Milch von jeweils 12 chinesischen Holstein Kühen der Genotypen A1/A1 und A2/A2 mittels LC-MS/MS analysiert wurde (WANG et al., 2021). Dabei zeigte sich, dass Coeruloplasmin und Cathelicidin-2 in Milch der A1-Variante und „CD5 molecule-like“ und Laktoferrin in Milch der A2-Variante die Proteine mit der höchsten Abundanz waren (WANG et al., 2021). Für diese differenziellen Abundanzen der Proteine in der Milch der beiden Genotypen sind die genetischen Gründe noch nicht geklärt (WANG et al., 2021). Sie deuten aber darauf hin, dass sich der genetische Unterschied der Rinder in der Milch nicht nur im Aminosäureaustausch an Position 67 des β -Kaseins (WANG et al., 2025), sondern auch in der Zusammensetzung anderer Proteine und ihrer Häufigkeit äußert. Da die Zusammensetzung der Kuhmilch unter anderem durch die Rasse sowie die Herkunft der Kühe beeinflusst wird (ZOU et al., 2024) und die Abundanz eines Milchproteins keinen Rückschluss auf seine ausgeübte Funktion zulässt, kann von den detektierten differenziell abundanten Proteinen in der A1- und A2-Milch (WANG et al., 2021) nicht auf mögliche auslösende Faktoren in unseren Untersuchungen zur Wirkung der HMGF und NMGF der A1- und A2-Milch auf die humanen PBMC geschlossen werden. Allerdings wäre es denkbar, dass auch die in unseren Untersuchungen verwendeten A1- und A2-Milchproben Unterschiede in den Abundanzen verschiedener Proteine unabhängig vom Aminosäureaustausch im β -Kasein aufweisen und allein dies bereits einen Einfluss auf die Abundanz der sekretierten Proteine der PBMC hat. Die beiden höher abundanten Proteine nach der A1-HMGF Exposition waren in unserem Datensatz „Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36“ (BRCC3) und „Target of Myb protein 1“ (TOM1) (siehe Abbildung 4 und Tabelle 1). Dagegen zeigten nach der Ko-Inkubation mit der A2-HMGF vier Proteine eine signifikant erhöhte Abundanz im PBMC-Sekretom: „Kynurenine-oxoglutarate transaminase 3“ (KYAT3), „Protein 4.1“ (EPB41), „Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1“ (ACSL1) und ebenfalls TOM1 (siehe Abbildung 5 und Tabelle 2). Diese Proteine wurden im Rahmen dieser Arbeit unter den genannten Ko-Inkubationen erstmals im Sekretom humaner PBMC identifiziert und dabei im Zusammenhang mit einer anti-inflammatorischen Antwort während der ConA-

induzierten T-Zell-Aktivierung nachgewiesen. Obwohl es Hinweise für die Expression von BRCC3 (siehe Abbildung 4 und Tabelle 1) in humanen PBMC gibt (UHLEN et al., 2010) (<https://www.proteinatlas.org>, zuletzt abgerufen am 13. September 2025), ist seine Funktion in primären humanen Immunzellen bislang völlig unerforscht. Bisher wurde BRCC3 nur mit pro-inflammatorischen Effekten in nicht-lymphoiden Zellen assoziiert, etwa mit der Aktivierung des Nukleärer Faktor Kappa B (*engl.* Nuclear factor kappa B, NF- κ B) -Signalwegs in humanen Zahnpulpa-Zellen (ZHANG et al., 2025a) oder der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in murinen Peritoneal-Makrophagen durch Deubiquitinierung (PY et al., 2013). In humanen PBMC wurde BRCC3 bisher nicht als sezernierter Faktor beschrieben, so dass wir BRCC3 im Rahmen dieser Arbeit erstmalig im Sekretom primärer humaner PBMC unter ConA- und A1-HMGF-Inkubation nachweisen konnten. Dieser Nachweis erfolgte unter Bedingungen einer inhibierten T-Zell-Proliferation und deutet somit auf eine bislang nicht bekannte Rolle von BRCC3 in einem anti-inflammatorischen Zusammenhang hin. Das extrazelluläre Vorkommen des Proteins könnte sowohl auf eine aktive Sekretion als auch auf eine Vesikel-vermittelte Freisetzung zurückzuführen sein. Auch wenn die zugrundeliegenden Mechanismen unklar bleiben, legt die Identifikation von BRCC3 in diesem Zusammenhang nahe, dass BRCC3 zu den immunmodulatorischen Effekten beitragen könnte und potenziell ein neuartiger Regulator in PBMC sein könnte. Nach Ko-Inkubation mit der A2-HMGF konnte das Protein KYAT3 vermehrt im Sekretom der ConA-stimulierten humanen PBMC nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5 und Tabelle 2), was einen interessanten Befund darstellt: Bisher wurde KYAT3 nicht als sezerniertes Protein beschrieben, wobei Hinweise für sein Vorkommen in humanen PBMC existieren (UHLEN et al., 2010) (<https://www.proteinatlas.org>, zuletzt abgerufen am 13. September 2025). KYAT3 ist ein Enzym des Tryptophanmetabolismus und trägt zur Bildung von Kynurensäure (KYNA) beim Menschen bei (YU et al., 2006; ZHEN et al., 2022). Während die Funktion von KYAT3 in Immunzellen noch nicht charakterisiert ist, sind die immunmodulatorischen Eigenschaften seines Metaboliten KYNA bereits beschrieben. KYNA kann sowohl über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor 35 als auch über den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor wirken, die beide ein anti-inflammatorisches Zytokinprofil fördern (WIRTHGEN et al., 2017). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass KYNA über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor 35 die Kalzium-Mobilisierung hemmt, wodurch die Aktivierung des NLRP3-

Inflammasoms unterdrückt und die IL-1 β -Produktion in murinen Makrophagen reduziert wurde (SUN et al., 2022). Diese Mechanismen legen nahe, dass KYAT3 über die Bildung von KYNA zu dem in unserem experimentellen Ansatz festgestellten anti-inflammatorischen Milieu beigetragen haben könnte. Wie KYAT3 gehört auch EPB41 zu den Proteinen, die im Sekretom der ConA-stimulierten PBMC nach Ko-Inkubation mit der A2-HMGF mit erhöhter Abundanz nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 5 und Tabelle 2) und bislang nicht mit einer anti-inflammatorischen Antwort dieser Zellen in Verbindung gebracht wurde. Zwar gibt es Hinweise auf die Expression von EPB41 in humanen PBMC (UHLEN et al., 2010) (<https://www.proteinatlas.org>, zuletzt abgerufen am 13. September 2025), seine Funktion ist dabei jedoch bislang nicht erforscht. EPB41 wurde bereits in humanen T-Zelllinien nachgewiesen (TANG et al., 1988) und agierte in murinen Modellen als negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung (KANG et al., 2009; FAN et al., 2019). Knockout-Studien zeigten, dass EPB41 die Phosphorylierung des „Linker for activation of T cells“ in T-Zellen hemmt und damit die Proliferation sowohl von CD8+ als auch CD4+ T-Zellen *in vitro* und *in vivo* unterdrückt (KANG et al., 2009; FAN et al., 2019). Ob EPB41 eine ähnliche Rolle in humanen primären T-Zellen und damit auch innerhalb der PBMC-Population übernimmt, bleibt noch zu klären. Im Zusammenhang mit unseren Ergebnissen erscheint ein Beitrag dieses Proteins zur anti-proliferativen Wirkung auf die humanen PBMC und dabei vermutlich auf die T-Zellen aber wahrscheinlich, möglicherweise über einen konservierten Regulationsmechanismus analog zu dem in Mäusen beschriebenen (KANG et al., 2009; FAN et al., 2019). Das dritte Protein, das im PBMC-Sekretom nach A2-HMGF Ko-Inkubation mit erhöhter Abundanz identifiziert wurde, ist ACSL1 (siehe Abbildung 5 und Tabelle 2). Im Zusammenhang mit einer anti-inflammatorischen Antwort humaner PBMC oder T-Zellen wurde ACSL1 bisher nicht beschrieben. In humanen Monozyten-angereicherten (> 90 %) PBMC und THP-1-abgeleiteten Monozyten wurde ACSL1 jedoch bereits nachgewiesen und dort mit pro-inflammatorischen Phänotypen in Verbindung gebracht (AL-RASHED et al., 2023). Bei Mäusen ist das Vorkommen von ACSL1 auch bereits in CD4+ T-Zellen beschrieben (LIU et al., 2024). Alle bisherigen Beschreibungen von ACSL1 deuten auf pro-inflammatorische Funktionen hin (KANTER et al., 2012). In hochinflammatorischen humanen und murinen Makrophagen lag ACSL1 hoch abundant vor und ein ACSL1-Defizit führte in einem diabetischen Mausmodell zur Verhinderung verstärkter

inflammatorischer Phänotypen in Monozyten und Makrophagen (KANTER et al., 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals einen anti-inflammatorischen Zusammenhang für ACSL1 auf. Spannend ist zudem, dass ein phosphoryliertes Peptid von ACSL1 mit einer Phosphorylierung an Serin135 identifiziert wurde. Da diese Phosphorylierung in der Literatur bisher nicht beschrieben ist (HORNBECK et al., 2015) (<https://www.phosphosite.org>, zuletzt abgerufen am 21. September 2025), lässt die Identifikation der Phosphorylierung somit keinen Rückschluss auf die Funktion von ACSL1 im Zusammenhang mit dem anti-inflammatorischen Effekt zu. Die Funktionen von vielen Phosphorylierungen sind bisher noch unbekannt, sie können aber beispielsweise ein Zeichen von Protein-Deaktivierung sein (BILBROUGH et al., 2022; MUNEEER et al., 2025), was in diesem Zusammenhang denkbar wäre. Der Wirkmechanismus in diesem Zusammenhang bleibt unklar, doch könnte sein extrazelluläres Vorkommen möglicherweise darauf hindeuten, dass ACSL1 im Zuge eines regulatorischen Mechanismus von den Zellen freigesetzt wurde, um den inflammatorischen Zustand abzuschwächen.

Da sich die Anzahl der unter beiden Ko-Inkubationen vorhandenen Proteinen auf 2049 aus den 2129 analysierten Proteinen belief, liegt die Vermutung nahe, dass der anti-inflammatorische Effekt der A1- und A2-HMGF über den gleichen Mechanismus vermittelt wurde. Zudem konnte in den zuvor durchgeführten Zellproliferationsassays kein signifikanter Unterschied zwischen der Intensität des vermittelten Effekts der A1- und A2-HMGF festgestellt werden, da die HMGF der beiden Milchvarianten die Proliferation in einem vergleichbaren Maß inhibierten (siehe Abbildung 3). Deshalb wurde der Fokus auf die Überschneidungen der signifikanten hoch abundanten Proteine im PBMC-Sekretom nach A1- und A2-HMGF Ko-Inkubation gelegt. Nur das Protein TOM1 zeigte dabei nach beiden Ko-Inkubationen eine erhöhte Abundanz (siehe Abbildung 7), was es zu einem vielversprechenden Kandidaten als Mediator im Zusammenhang mit dem festgestellten anti-inflammatorischen Effekt macht. Diese Arbeit beschreibt zum ersten Mal das Vorkommen von TOM1 im Sekretom humaner PBMC nach ConA-Stimulation und HMGF-Ko-Inkubation beider Milchvarianten. Zudem ist TOM1 als sekretiertes Protein von PBMC und T-Zellen in der Literatur bisher nicht beschrieben und seine Funktionen sind in diesen Zellen weder beim Menschen noch bei anderen Spezies bekannt. Somit stellt die Identifikation von TOM1 im Sekretom von humanen PBMC im Zusammenhang mit einer anti-inflammatorischen

Reaktion, vermutlich in der T-Zell-Population, einen völlig neuen Befund dar, der eine mögliche bisher unbekannte immunologische Rolle von TOM1 in humanen PBMC und T-Zellen denkbar macht. Um seiner möglichen Rolle innerhalb dieser Zellen näher zu kommen, ist es sinnvoll, die bekannten und mit immunologischen Prozessen verbundenen Funktionen von TOM1 in anderen Zelltypen und Spezies heranzuziehen. In humanen embryonalen Nieren (*engl.* Human embryonic kidney, HEK) -Zellen (YAMAKAMI et al., 2003) und einer humanen Epithelzelllinie, gewonnen aus einem Zervixkarzinom (HELA) (KATOH et al., 2004), formte TOM1 zusammen mit dem Toll-interagierenden Protein (*engl.* Toll-interacting protein, TOLLIP) intrazelluläre Komplexe (YAMAKAMI et al., 2003; KATOH et al., 2004). In den HEK-Zellen wurde zudem nachgewiesen, dass TOM1 über seine GAT-Domäne an TOLLIP bindet und zusätzlich Ubiquitin und Clathrin (YAMAKAMI et al., 2003) sowie Endofin zu seinen Bindungspartnern zählen (SEET et al., 2004). Eine TOM1-Überexpression in HEK-Zellen führte zu einer verminderten IL-1 β -induzierten Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und Aktivator-Protein 1 (*engl.* Activator protein 1, AP-1) (YAMAKAMI & YOKOSAWA, 2004). NF- κ B und AP-1 stellen als Transkriptionsfaktoren essenzielle Faktoren für die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine dar und können durch den IL-1 β -Signalweg aktiviert werden (ZHUKOVA et al., 2024). Wenn IL-1 β an den IL-1 Rezeptor (IL-1R) 1 bindet, wird das akzessorische Protein des IL-1R1 als Ko-Rezeptor rekrutiert (ZHUKOVA et al., 2024), wodurch diese einen trimeren Komplex bilden und eine Signalkaskade aktiviert wird (ZHUKOVA et al., 2024). Wie in HEK-Zellen gezeigt wurde, kommt es zur Rekrutierung des Adapter-Proteins „Myeloid differentiation primary response 88“ (WESCHE et al., 1997) und zudem zur Rekrutierung von Formen der IL-1R-assoziierten Kinase (IRAK) (CAO et al., 1996a), was ebenso für die murinen Th-Zelllinien D10N und EL-4 beschrieben wurde (MARTIN et al., 1994). Nachfolgend kommt es zur schnellen Phosphorylierung der IRAKs und dadurch zur Rekrutierung und Oligomerisierung des TNF- α -assoziierten-Faktors (TRAF) 6 (WEBER et al., 2010), eine Interaktion, die ebenfalls bereits für HEK-Zellen beschrieben wurde (CAO et al., 1996b). TRAF6 interagiert im weiteren Verlauf des Signalwegs mit zusätzlichen Faktoren, wobei die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase 7 und deren bindendes Protein TAB2 in HEK-Zellen eine wichtige Rolle spielte (TAKAESU et al., 2001). Nachfolgend kommt es zur Aufspaltung des Signalwegs (WEBER et al., 2010; ZHANG et al., 2017; ZHUKOVA et

al., 2024). Einerseits kommt es über die Aktivierung des IKK-Komplexes zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (GUO et al., 2024) und andererseits über die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen-Kaskade zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 und somit nachfolgend zur Bildung von pro-inflammatorischen Zytokinen (WEBER et al., 2010; ZHANG et al., 2017; ZHUKOVA et al., 2024). Da es durch eine TOM1-Überexpression in HEK-Zellen zu einer verminderten IL-1 β -induzierten Aktivierung sowohl von NF- κ B als auch von AP-1 kam, erscheint es möglich, dass TOM1 seine Wirkung oberhalb der Teilung des Signalweges vermittelte (YAMAKAMI & YOKOSAWA, 2004). Zudem wurde auch bei der TNF- α -induzierten Aktivierung von NF- κ B und AP-1 eine Hemmung durch die TOM1-Überexpression in HEK-Zellen festgestellt, wobei hier eine Interaktion oberhalb von TRAF2 als Verzweigungspunkt dieser Kaskade vermutet werden könnte (YAMAKAMI & YOKOSAWA, 2004). Der genaue Mechanismus hinter der Hemmung der beiden Signalwege durch TOM1 wurde nicht untersucht (YAMAKAMI & YOKOSAWA, 2004). Durch Verwendung von fragmentiertem TOM1 in HEK-Zellen wurde festgestellt, dass die VHS-Domäne von TOM1 essenziell für die vermittelte Hemmung der Transkriptionsfaktoren-Aktivierung durch IL-1 β und TNF- α war (YAMAKAMI & YOKOSAWA, 2004). Die GAT-Domäne, an der auch TOLLIP gebunden wird (YAMAKAMI et al., 2003), war dagegen nicht nötig, um die Wirkung von TOM1 zu vermitteln (YAMAKAMI & YOKOSAWA, 2004), was auf eine TOLLIP-unabhängige Hemmung der beiden Signalwege durch TOM1 hindeutet (YAMAKAMI & YOKOSAWA, 2004). TOM1 konnte in HEK-Zellen zusätzlich dazu durch Rezeptor-Abbau zur Hemmung des IL-1 β -Signalwegs beitragen (BRISSONI et al., 2006). Nach Bindung von IL-1 β an auf HEK-Zellen exprimierten IL-1R1 kam es zur Ubiquitinierung des IL-1R1 (BRISSONI et al., 2006), der in dieser Form abgebaut werden kann und es somit zur Degradierung des wichtigsten Rezeptors für IL-1 β kommt (ROACH et al., 2021). TOM1 band dabei sowohl mit als auch ohne TOLLIP an den IL-1R1 (BRISSONI et al., 2006). In Maus Embryo Fibroblasten-Zellen vom Wildtyp als auch mit TOLLIP-Defizienz akkumulierte der IL-1R1 nach Absenkung des TOM1-Levels in späten Endosomen, was die Beteiligung von TOM1 an der Degradation des IL1-R1 auch in diesen Zellen bestätigte (BRISSONI et al., 2006). Die Funktion von TOLLIP zum Abbau des IL-1R1 wurde in diesem Zell-Modell ebenfalls nachgewiesen (BRISSONI et al., 2006). TOM1 ist also zusammen mit TOLLIP am endosomalen Transport und somit

am lysosomalen Abbau des IL-1R1 beteiligt und beeinflusst damit auch die Verfügbarkeit des Rezeptors auf der Zelloberfläche, was die zelluläre Reaktionsbereitschaft auf IL-1 β verringern und damit zu einer raschen Beseitigung einer Entzündung beitragen kann (BRISSONI et al., 2006; ROACH et al., 2021). Da die Funktionen von TOM1 nicht in humanen PBMC oder T-Zellen im Speziellen untersucht wurden (YAMAKAMI et al., 2003; KATOH et al., 2004; SEET et al., 2004; YAMAKAMI & YOKOSAWA, 2004; BRISSONI et al., 2006), ist ein direkter Rückschluss auf die Rolle von TOM1 und die ausgelösten Mechanismen in unseren Untersuchungen rein spekulativ. Der Nachweis von TOM1 im Sekretom der ConA-stimulierten PBMC unter anti-inflammatorischen Bedingungen weist jedoch auf eine bislang nicht bekannte Funktion in PBMC, denkbar im Rahmen der T-Zell-Regulation, hin. Während die hohe Abundanz von TOM1 eine nachgeschaltete Hemmung des intrazellulären IL-1 β -Signalwegs widerspiegeln könnte, wäre es ebenso denkbar, dass TOM1 aktiv extrazelluläre Effekte vermitteln kann, beispielsweise über Interaktionen mit Oberflächenrezeptoren der Zellen oder die Modulation der Zell-Zell-Kommunikation. Interessanterweise konnten wir ein deamidiertes Peptid von TOM1 in allen PBMC-Sekretomen nach HMGF-Ko-Inkubation identifizieren (siehe Anhang Tabelle 2). Eine Deamidierung ist in der Literatur für TOM1 bisher nicht beschrieben und es ist unklar, ob diese zusätzliche Regulationsebene tatsächlich eine Rolle in der anti-inflammatorischen Antwort der PBMC spielt. Die bekannten intrazellulären Funktionen von TOM1, insbesondere die Förderung des IL-1R1-Abbaus (BRISSONI et al., 2006) und die Hemmung der IL-1 β -Signalweiterleitung (YAMAKAMI & YOKOSAWA, 2004), deuten auf eine regulatorische Rolle in anti-inflammatorischen Prozessen hin. Für eine Beteiligung von TOM1 am IL-1 β -Signalweg bei den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit könnte die geringgradige, wenn auch nicht signifikante Reduktion der Abundanz von IL-1 β nach A1- und A2-HMGF Ko-Inkubation im Sekretom der humanen PBMC sprechen (siehe Anhang Tabelle 1). IL-1 β spielt als pro-inflammatorisches Zytokin nicht nur innerhalb des physiologischen Rahmens, sondern auch bei mehreren Krankheitsbildern, wie zum Beispiel der neurodegenerativen Erkrankung Alzheimer, eine Rolle (MARTINI et al., 2019; BORASCHI, 2022). Alzheimer steht im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen im Gehirn und ist zusätzlich zu kognitiven Einbußen durch die Akkumulation von Amyloid- β im Gehirn gekennzeichnet (MARTINI et al., 2019;

ROACH et al., 2021), was möglicherweise mit einem Anstieg von IL-1 β in Zusammenhang steht (KITAZAWA et al., 2005; MARTINI et al., 2019). In Hippocampi von Alzheimer-Patienten wurde TOM1 im Vergleich zu nicht an Alzheimer Erkrankten signifikant niedriger exprimiert, während TOLLIP unverändert vorlag (MARTINI et al., 2019). Die niedrigere Expression von TOM1 ging dabei mit einer erhöhten Expression des IL-1R1 einher (MARTINI et al., 2019), was mit der Funktion von TOM1 als Mediator der IL-1R1-Degradierung in Maus Embryo Fibroblasten-Zellen zusammenpasst (BRISSONI et al., 2006). Auch in den Gehirnen von Mäusen eines transgenen Alzheimermodells konnten niedrigere TOM1-Level aber dafür erhöhte Werte für den IL-1R1 und IL-1 β gemessen werden (MARTINI et al., 2019). Durch Vektor-Injektion ausgelöstem TOM1-Knock-Out in den transgenen Alzheimer Mäusen, wurde der Effekt des fehlenden TOM1 untersucht (MARTINI et al., 2019). Knock-Out von TOM1 führte dabei zu vermehrten Amyloid- β -Ablagerungen sowie zur Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten der Mäuse (MARTINI et al., 2019). TOM1 scheint also auch bei neurodegenerativen Erkrankungen mit anti-inflammatorischen Prozessen über den IL-1 β -Signalweg in Zusammenhang zu stehen (MARTINI et al., 2019). Diese Ergebnisse unterstreichen die anti-inflammatorische Rolle von TOM1 in verschiedenen Zelltypen und Spezies, eine Funktion, die wir auch im Zusammenhang mit der starken Hemmung der Proliferation in den *in vitro* Assays bei humanen PBMC für möglich halten. Die essenzielle Rolle von TOM1 im immunologischen Kontext wurde auch durch eine dominante TOM1-Missense-Mutation deutlich, die bei einer Mutter und ihrem Sohn diagnostiziert wurde, die beide unter Autoimmunerkrankungen und kombinierter Immundefizienz litten, wobei der Sohn deutlich schwerwiegendere klinische Symptome entwickelte (KESKITALO et al., 2019). Beide Betroffenen wiesen eine geringe Anzahl an NK-Zellen, dendritischen Zellen und B-Gedächtniszellen sowie eine starke Hypogammaglobulinämie auf (KESKITALO et al., 2019). Das veränderte T-Zell-Kompartiment mit einer vermehrten Anzahl naiver T-Zellen und geringer Anzahl von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen deutete auf eine beeinträchtigte T-Zell-Reifung hin (KESKITALO et al., 2019). Die Mutation beeinflusste die Protein-Protein-Wechselwirkungen, wie im Rahmen von Untersuchungen zu dieser Autoimmunerkrankung in HEK-Zellen entdeckt wurde (KESKITALO et al., 2019). In transfizierten HEK-Zellen zeigte das mutierte TOM1 signifikant weniger Interaktion mit TOLLIP und Ubiquitin, was zu einem defekten Proteintransport in Endosomen führte

(KESKITALO et al., 2019). Da endolysosomaler Protein-Abbau in enger Verbindung zur Autophagie steht, ist es spannend, dass in primären PBMC der von der Mutation betroffenen Beeinträchtigungen hinsichtlich der Autophagosomen-Bildung *in vitro* festgestellt werden konnten (KESKITALO et al., 2019). In humanen Zelllinien wurde gezeigt, dass TOM1 an Myosin VI und weitere Autophagie-Rezeptoren bindet und der dabei entstehende Komplex die Fusion von Autophagosomen mit Endosomen fördert, wobei ein TOM1-Knock-out zur Verhinderung der Autophagosom-Lysosom-Bildung in HELA-Zellen führte (TUMBARELLO et al., 2012; HU et al., 2019). Die Ergebnisse dieser Studien (TUMBARELLO et al., 2012; HU et al., 2019; KESKITALO et al., 2019) deuten auf eine essenzielle Rolle von TOM1 in humanen PBMC im Zusammenhang mit der Autophagosom-Lysosom-Bildung hin und liefern dadurch Hinweise auf seine Funktion in den primären humanen PBMC. Diese Fallstudie zeigt deutlich, wie wichtig TOM1 im Zusammenhang mit intakten Immunfunktionen ist (KESKITALO et al., 2019). Durch die Beeinträchtigung verschiedener Immunzellen durch die TOM1-Mutation (KESKITALO et al., 2019), wurde TOM1 in den T- und B-Zellen funktionell analysiert, was erste Hinweise auf seine essenzielle Rolle in diesen Zelltypen liefert. Zudem lässt die gestörte Bildung der Autophagosomen in den PBMC der Patienten (KESKITALO et al., 2019) eine Rolle von TOM1 in primären PBMC analog zu seiner Rolle in humanen Zelllinien (TUMBARELLO et al., 2012; HU et al., 2019) vermuten. Ein direkter Nachweis in den T- und B-Zellen oder in anderen Populationen der PBMC erfolgte jedoch ebenso wenig, wie die Untersuchung der genauen Mechanismen hinter den Auswirkungen der durch die Mutation hervorgerufenen Pathologien (KESKITALO et al., 2019).

Die Rolle von TOM1 in anti-inflammatorischen Prozessen wurde also in vielen Zelltypen gezeigt (YAMAKAMI & YOKOSAWA, 2004; BRISSONI et al., 2006; MARTINI et al., 2019), die sich allerdings nicht direkt auf die Rolle von TOM1 im Sekretom der PBMC nach ConA-Stimulation und HMGF-Ko-Inkubation übertragen lassen. Um zu untersuchen, ob TOM1 als direkter Auslöser der anti-inflammatorischen Reaktion oder als nachgeschalteter Interaktor oder Marker einer bisher unbekannten Reaktion agiert, charakterisierten wir TOM1 in einem funktionellen Ansatz mittels Zellproliferationsassays. Dafür wurden humane PBMC *in vitro* mit ConA stimuliert und mit aufsteigenden Konzentrationen an aufgereinigtem TOM1 (0,1 - 1000 ng/ml) ko-inkubiert. Nach 48 Stunden wurde die Proliferationsrate der PBMC im direkten

Vergleich zur reinen Stimulation mit ConA bestimmt. Dabei wurde ein hoch-signifikanter anti-proliferativer und somit anti-inflammatorischer Effekt von TOM1 auf die PBMC festgestellt (siehe Abbildung 9). TOM1 war dabei in der Lage, den bereits durch die HMGF beider Milch-Varianten ausgelösten anti-proliferativen Effekt in seiner Intensität zu reproduzieren. Diese Arbeit beschreibt somit zum ersten Mal, dass TOM1 selbstständig einen starken anti-inflammatorischen Effekt auf humane PBMC und basierend auf der Funktion von ConA als T-Zell-Stimulanz vermutlich auf die T-Zellen *in vitro* ausüben kann. Vergleichbare Studien, die den Effekt von TOM1 auf die Zellproliferation *in vitro* untersucht haben, existieren bis heute nicht (PubMed-Recherche, Stand: 28.09.2025). Die Funktionen von TOM1 sind in humanen PBMC sowie primären T-Zellen bisher nicht charakterisiert, weshalb weiterhin unklar ist, wie TOM1 den anti-inflammatorischen Effekt vermitteln könnte und welche bekannten Signalwege dabei eine Rolle spielen könnten. Die Beteiligung von TOM1 an bekannten Signalwegen wie dem IL-1 β -Signalweg wurde in HEK-Zellen (YAMAKAMI & YOKOSAWA, 2004; BRISSONI et al., 2006) und Maus Embryo Fibroblasten-Zellen (BRISSONI et al., 2006), allerdings nicht in primären T-Zellen gezeigt. Auch die Beteiligung am TNF- α -Signalweg wurde nicht in primären T-Zellen sondern in HEK-Zellen beschrieben (YAMAKAMI & YOKOSAWA, 2004). Dabei wirkte TOM1 in beiden Signalwegen als anti-inflammatorischer Mediator, der zum einen zum Abbau des IL-1R1 beitrug (BRISSONI et al., 2006) und zum anderen eine verringerte Aktivierung der pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 bewirkte (YAMAKAMI & YOKOSAWA, 2004). Somit werden unsere Ergebnisse, die TOM1 als anti-inflammatorischen Effektor der untersuchten PBMC verifizierten, durch die Funktionen von TOM1 in anderen Zelltypen gestützt, wobei wir zum ersten Mal eine Rolle von TOM1 als extrazellulären Mediator der Immunfunktion beschreiben. Wie TOM1 seine Wirkung vermittelt und ob das Protein dabei an bekannten Signalwegen beteiligt ist, könnte Teil nachfolgender Untersuchungen sein. Mittels FACS könnte man die Expression des IL-1R1 auf der Oberfläche von primären T-Zellen charakterisieren und dabei eine mögliche Veränderung der Expression nach TOM1-Inkubation der Zellen ermitteln. Zudem könnte die Beteiligung von TOM1 am IL-1 β - und TNF- α -Signalweg in T-Zellen untersucht werden, indem die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen von IL-1 β - oder TNF- α -stimulierten Zellen im Vergleich zu zusätzlich mit TOM1 ko-inkubierten Zellen ermittelt wird. Dabei könnte das Sekretom der Zellen

mittels Zytokin-ELISA oder quantitativen Western-Blot-Analysen auf die pro-inflammatorischen Zytokine hin untersucht werden. In Kombination dazu könnte die möglicherweise verminderte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 unter Verwendung von Antikörpern, die deren Phosphorylierung detektieren, in den Zell-Lysaten im Western Blot untersucht werden. Diese Untersuchungen könnten wertvolle Informationen über den Mechanismus hinter der von TOM1 vermittelten anti-inflammatorischen Wirkung auf die T-Zellen innerhalb der PBMC-Population geben.

TOM1 wurde durch funktionelle *in vitro* Untersuchungen als Effektorprotein einer starken anti-inflammatorischen Wirkung charakterisiert. Die Kombination aus funktionellen Zellproliferationsassays und einem molekularen proteomischen Ansatz ermöglichen die Hypothese, dass TOM1 zur anti-inflammatorischen Wirkung der HMGF der A1- und A2-Milch beiträgt. Dennoch ist der aus der Milch stammende Auslöser der TOM1-Sekretion nach HMGF-Ko-Inkubation der ConA-stimulierten PBMC weiter unklar. Um zu untersuchen, welche Proteine in den ≥ 100 kDa HMGF mit TOM1 interagieren könnten, wurden zusätzlich öffentlich zugängliche Datenbanken durchsucht. Basierend auf der Hypothese einer Inter-Spezies Protein-Interaktion, wurde davon ausgegangen, dass TOM1 über einen Spezies-übergreifenden Signalweg aktiviert werden könnte. Deshalb wurden die bisher bekannten Proteine, die sowohl mit dem humanen TOM1 als auch mit dem bovinen TOM1 interagieren, identifiziert (<https://string-db.org>, zuletzt abgerufen am 11. September 2025). Von den fünf identifizierten Proteinen erschienen Clathrin schwere-Kette 1 (CLTC; ~ 192 kDa) und Myosin VI (~ 150 kDa) (UNIPROT, 2025) (<https://www.uniprot.org>, zuletzt abgerufen am 23. September 2025) auf Grund ihres molekularen Gewichts und der Interaktion mit TOM1 in bekannten Signalwegen als vielversprechendste Kandidaten (KATOH et al., 2006; TUMBARELLO et al., 2012; HU et al., 2019). Myosin VI bildet mit TOM1 und anderen Autophagie-Rezeptoren einen Komplex, der die Fusion von Autophagosomen mit Endosomen fördert und damit den Abbau beschädigter Zell-Organellen oder pathogener Komponenten ermöglicht (TUMBARELLO et al., 2012; HU et al., 2019). Zudem wurde in humanen PBMC zweier Patienten mit TOM1-Mutation eine gestörte Autophagosomen-Bildung beobachtet (KESKITALO et al., 2019), die möglicherweise durch die fehlende Interaktion von Myosin VI und TOM1 hervorgerufen wurde und somit einen Hinweis auf diesen Zusammenhang in primären PBMC liefert. Zwar wurde bislang nicht untersucht, ob

dieser Mechanismus zu den in PBMC nach HMGF-Exposition beobachteten anti-inflammatorischen Effekten beiträgt, doch legen diese mechanistischen Hinweise nahe, dass Myosin VI ein potenzieller Kandidat wäre. CLTC und Myosin VI konnten zudem bereits in Kuhmilch identifiziert werden, wie es in der öffentlichen Datenbank „BoMiProt2.0“ hinterlegt ist (MAITY et al., 2020; DAS et al., 2022) (<https://bomiprot.org>, zuletzt abgerufen am 12. September 2025). Die Identifikation der TOM1-Interaktoren, die tatsächlich in den HMGF vorkommen und funktionell aktiv sind, könnte wichtige mechanistische Einblicke in die Aktivierung von TOM1 liefern, die beispielsweise über endozytotische Transportwege oder IL-1 β -Signalwege zur anti-inflammatorischen Wirkung auf die PBMC beitragen könnten. Deshalb sind weitere Untersuchungen zum auslösenden Faktor und möglichen TOM1-Interaktor in der HMGF der Kuhmilch nötig. Die Milch als hochkomplexes Gemisch verschiedener Komponenten und die Zusammensetzung der Milchproteine mit der großen Spannbreite der Protein-Abundanzen mit hochabundanten Proteinen wie den Kaseinen und unzähligen niedrig abundanten Proteinen (GREENWOOD & HONAN, 2019; DAS et al., 2022; STASTNA, 2024; ACQUAVIA et al., 2025), machen die Suche nach dem auslösenden Faktor kompliziert. Deshalb ist es ebenfalls denkbar, dass das interagierende Milchprotein noch nie identifiziert oder trotz Identifikation in proteomischen Milch-Analysen noch nicht charakterisiert wurde (DAS et al., 2022). Ein spannender Ansatz für nachfolgende Auswertungen wäre deshalb die Analyse der zusätzlich 522 identifizierten bovinen Proteine unseres hochauflösenden Datensatzes, die aus den als Ko-Inkubation zugegebenen Milchfraktionen der A1- und A2-Milch stammen. Das könnte wertvolle Informationen über vorhandene Faktoren und mögliche Interaktionspartner von TOM1 in den verwendeten A1- und A2-Milchfraktionen liefern, die potenziell Auslöser der TOM1 Sekretion oder Ko-Faktoren bei der immunmodulatorischen Wirkung durch TOM1 sein könnten. Dabei sollte beachtet werden, dass die auslösenden Faktoren mutmaßlich mit den PBMC interagieren und dadurch möglicherweise teilweise oder vollständig abgebaut oder verstoffwechselt wurden, was die Analyse der identifizierten bovinen Proteine und die Suche nach den Interaktoren in der HMGF erschweren würde. Daher wäre es zusätzlich sinnvoll die weiteren Untersuchungen durch die Analyse der Interaktionspartner von TOM1 mittels Immunpräzipitation mit nachfolgender LC-MS/MS zu ergänzen. Die Kombination dieser beiden Methoden könnte eine unvoreingenommene Identifikation von Protein-Interaktionspartnern

ermöglichen, denn während die Immunpräzipitation nur den Nachweis einer Bindung erlaubt, liefert die anschließende MS-Analyse eine breite Charakterisierung der gebundenen Proteine (KIM & NITA-LAZAR, 2024). Eine weitere Möglichkeit zur Identifikation von TOM1-Bindungspartnern wäre der Einsatz von Oberflächen-Plasmonresonanz (*engl.* Surface plasmon resonance, SPR) zur Bindung der TOM1-Interaktor-Proteine, auch als „direct molecular fishing“ bezeichnet, mit nachfolgender MS-Analyse zur Identifikation der gebundenen Proteine (IVANOV et al., 2016; FLORINSKAYA et al., 2018). SPR könnte aber auch nach erfolgter Identifikation der Interaktor-Proteine durch Immunpräzipitation und LC-MS/MS zur Interaktions-Analyse eingesetzt werden (BUTT, 2025). Dabei könnte SPR weitere Informationen über die Protein-Protein-Bindungen wie Affinität und Kinetik in Form von Assoziations- und Dissoziationsraten in Echtzeit liefern und dabei zusätzlich die identifizierten Bindungspartner validieren (BUTT, 2025). Mit diesen Methoden könnten wertvolle Informationen sowohl über Interaktionspartner von TOM1 aus der Milch als auch in den PBMC selbst identifiziert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Ergebnisse deuten möglicherweise auf eine anti-inflammatorische Wirkung von Milch auf das humane Immunsystem hin, wobei die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus *in vitro* Experimenten auf den *in vivo* Zustand begrenzt ist (ELKHAMARY et al., 2024). Dabei muss berücksichtigt werden, dass es sich bei *in vitro* PBMC-Kulturen um isolierte Zellen handelt, die außerhalb ihres physiologischen Milieus und Gewebekontextes untersucht wurden, so dass wesentliche Aspekte wie die Interaktion verschiedener Organe und Organsysteme, die Zellmigration sowie metabolische Einflüsse in unseren Untersuchungen unberücksichtigt blieben. Gleichzeitig lag der wesentliche Vorteil des gewählten *in vitro* Ansatzes in der Möglichkeit, durch kontrollierte Kultivierung und Stimulation der Zellen systemische Einflussfaktoren und andere Störfaktoren zu umgehen und die Untersuchung somit auf die zellulären Mechanismen zu fokussieren (BOWLEY et al., 2025). Einen weiteren Vorteil stellte die Spezies-Spezifität durch die Verwendung von PBMC der Zielspezies, die in dieser Arbeit der Mensch war, dar. Durch Differenzen in der Immunantwort zwischen dem Menschen und verschiedenen Tierspezies kam es beispielsweise in Tiermodellen zu Ergebnissen, die nicht auf den Menschen übertragbar waren, und in den ersten klinischen Anwendungen am Menschen zu Todesfällen bei den Probanden führten, obwohl diese tierexperimentellen Modelle im

Gegensatz zu *in vitro* Kulturen einen vollständigen Organismus darstellten (ATTARWALA, 2010; MORROCCHI et al., 2024). Deshalb sind auch *in vitro* Untersuchungen mit humanen PBMC seit Langem als wertvolles Instrument etabliert (RAJAMANICKAM et al., 2024), um Einblicke in die Immunantwort zu liefern (SEN et al., 2018; PIERZCHALSKI et al., 2023), wie es in dieser Arbeit mittels Detektion der Proliferationsraten und Identifikation der sekretierten Proteine nach Milch-Ko-Inkubation erfolgte. Diese Arbeit konzentrierte sich auf die Antwort von PBMC auf eine ConA-induzierte Stimulation und Ko-Inkubation mit Milchfraktionen über einen Zeitraum von 48 Stunden. Dieser experimentelle Aufbau ermöglichte es, Schlüsselproteine mit immunmodulatorischem Potenzial zu identifizieren, liefert jedoch nur eine Momentaufnahme der umfassenden Immunantwort. Unterschiedliche Aktivierungspfade, alternative Stimulationsbedingungen oder Analysen zu früheren oder späteren Zeitpunkten könnten zusätzliche Faktoren aufzeigen, die an der Milch-induzierten Immunmodulation beteiligt sind. Darüber hinaus erlaubt die Verwendung heterogener PBMC-Populationen keine eindeutige Zuordnung der Effekte zu einzelnen Zelltypen, wobei der festgestellte anti-proliferative Effekt aufgrund des eingesetzten spezieübergreifenden T-Zell-spezifischen Mitogens ConA (WEISS et al., 1987; PERRIN et al., 1997; BRAVO-PARRA et al., 2025) wahrscheinlich eine T-Zell-gesteuerte Antwort widerspiegelt. Zukünftige Untersuchungen, die andere Mitogene, weitere Mess-Zeitpunkte und gereinigte Immunzell-Subpopulationen wie beispielsweise CD4⁺ T-Zellen einbeziehen, sollten deshalb vorgenommen werden, um die Ergebnisse dieser Arbeit zu erweitern und dabei auf den gelegten Grundstein aufzubauen. Zusätzlich sollte erwähnt werden, dass die erfolgte Exposition von humanen PBMC mit intakten Milchproteinen in unserem *in vitro* Ansatz, *in vivo* über die Aufnahme der intakten Proteine nach Milchkonsum in die Blutbahn erfolgen müsste. Die Struktur der Proteine und der Lebensmittel, die Verdaulichkeit und auch die Struktur, die die Proteine während der Verdauung einnehmen, beeinflussen die entstehenden Verdauprodukte (YANG et al., 2025). In mehreren Untersuchungen wurde festgestellt, dass Proteine und dabei auch Milchproteine trotz ihrer hohen Verdaulichkeit (ZHAO et al., 2025; ZHOU et al., 2025) nach abgeschlossenen Verdauphasen intakt vorliegen können (GENSBERGER-REIGL & ZENKER, 2025; SUTANTAWONG et al., 2025). In einem humanen *in vitro* Verdau-Modell für Erwachsene und in einer *in vivo* Studie an Erwachsenen wurde die Verdauung von

Molkenprotein-Isolat untersucht (SUTANTAWONG et al., 2025). Die Menge des intakten β -Laktoglobulin betrug nach der kombinierten Magen-Darm-Phase des *in vitro* Modells 0,4 % und nach dem vierstündigen *in vivo* Verdau im Jejunum-Inhalt 1 % (SUTANTAWONG et al., 2025). Es wurde zudem festgestellt, dass von den ursprünglich 87 identifizierten Proteinen im Molkenprotein-Isolat 70 Proteine nach der *in vitro* Magen-Phase identifiziert werden konnten (SUTANTAWONG et al., 2025). Hiervon lag eine Gruppe von 42 Proteinen nahezu unverändert vor, was auf eine mögliche Resistenz dieser Proteine gegenüber der Magen-Verdau-Phase schließen ließ (SUTANTAWONG et al., 2025). Nach der kombinierten *in vitro* Magen-Darm-Phase konnten noch 52 Proteine identifiziert werden, wenn auch in sehr geringen Mengen (SUTANTAWONG et al., 2025). Es zeigte sich also, dass Milchproteine trotz durchlaufender Verdauphasen intakt identifiziert wurden und somit auch nach einem Verdauvorgang unverdaut vorliegen können (SUTANTAWONG et al., 2025). *In vivo* gelangen die Proteine nach dem Konsum von proteinhaltigen Lebensmitteln wie Milch zuerst in den Magen, wo sie durch den niedrigen pH-Wert und Pepsin vor allem zu langen Polypeptiden gespalten werden (YANG et al., 2025). Durch den Konsum von abpuffernden Lebensmitteln, wie es Milch ist, kann der pH-Wert im Magen allerdings ansteigen (HORSTMAN & HUPPERTZ, 2023), wobei direkt nach dem Konsum von 300 ml Milch beim Menschen ein Anstieg auf einen pH von ungefähr sechs festgestellt wurde (GAO et al., 2002). Dies kann die Aktivität von Pepsin stark beeinflussen und den Proteinabbau im Magen einschränken (YANG et al., 2025). Es wäre also denkbar, dass der durch Milchkonsum oder Konsum anderer abpuffernder Lebensmittel verursachte Anstieg des pH-Wertes im Magen (GAO et al., 2002) zur verminderten Spaltung der Proteine führt (YANG et al., 2025) und somit intakte Proteine in den Dünndarm gelangen könnten. Physiologisch werden Proteine und Peptide im Dünndarm dann weiter in Aminosäuren sowie Di- und Tripeptide gespalten, die nachfolgend über Enterozyten resorbiert werden (HORSTMAN & HUPPERTZ, 2023; LOVEDAY, 2023). Gelangen nun durch die Abpufferung im Magen intakte Proteine in den Dünndarm, könnten sie durch die Dünndarm-Enzyme möglicherweise ungespalten resorbiert werden, wie es mit intakten Makromolekülen (bovinem Serumalbumin) in einem *in vivo* Modell bei Ratten gezeigt wurde (WARSHAW et al., 1974). Dabei konnte bovines Serumalbumin sowohl in der Lymphflüssigkeit als auch im Blut der Ratten nach direkter Eingabe in das Duodenum nachgewiesen werden

(WARSHAW et al., 1974). Bei einer Verdaustudie mit acht Erwachsenen, konnte nach dem Konsum einer Ei-Buttermilch Mischung das Ovalbumin bei sieben Menschen im Serum nachgewiesen werden, wobei bei den meisten Probanden im Zeitraum von 120 - 300 min nach Verzehr die höchsten Werte gemessen wurden (HUSBY et al., 1985). Dabei wurde das Serum der Probanden auch auf β -Laktoglobulin untersucht, was wiederum nicht im Serum nachgewiesen werden konnte (HUSBY et al., 1985). Zudem konnte in einem *in vitro* Modell, in dem Zellen der humanen Zelllinie CaCo-2 zu M-Zellen-ähnlichen Zellen differenziert wurden, der Transport von intakten Proteinen (Scrapie-Prionen) durch die Darmwand auf die basolaterale Seite gezeigt werden (HEPPNER et al., 2001). Nach der Aufnahme und basolateralen Freisetzung der Proteine (WARSHAW et al., 1974; HUSBY et al., 1985) könnten solche Proteine mit Immunzellen wie den PBMC im Blutkreislauf interagieren und möglicherweise Reaktionen auslösen. In welchem Ausmaß die Resorption von intakten Proteinen unter physiologischen Bedingungen erfolgt, ist jedoch weiterhin unklar. Somit wäre eine Exposition der humanen PBMC *in vivo* denkbar möglich, wenn auch die resorbierten Proteine und deren Menge unbekannt sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Immunantwort der *in vitro* ConA-stimulierten humanen PBMC unter Ko-Inkubation mit Milch genauer charakterisiert. In früheren Untersuchungen wurde bereits der anti-inflammatorische Effekt der Milch auf die ConA-stimulierten PBMC nachgewiesen, wobei die A1- und A2-Variante diesen Effekt gleichermaßen bewirkte (GARD et al., 2024). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass der anti-inflammatorische Faktor unabhängig von der β -Kasein-Variante in der HMGF der Milch zu finden ist. Mittels hochauflösender LC-MS/MS konnte die Reaktion der PBMC auf die Ko-Inkubation mit der A1- und A2-HMGF weiter analysiert werden, wobei erstmals eine Proteinlandkarte des Sekretoms humaner PBMC unter diesen Bedingungen erstellt wurde. Unter den 2640 identifizierten humanen Proteinen lagen nach Ko-Inkubation mit der A1- oder A2-HMGF entsprechend jeweils zwei oder vier Proteine mit signifikant erhöhter Abundanz im humanen PBMC-Sekretom vor. Interessanterweise war nur das Protein TOM1 nach beiden Ko-Inkubationen signifikant höher abundant. Durch weitere funktionelle Charakterisierung von TOM1 konnte bewiesen werden, dass TOM1 einen hoch-signifikanten anti-proliferativen und somit anti-inflammatorischen Effekt auf die ConA-stimulierten PBMC vermitteln kann. Diese Ergebnisse zeigen, dass TOM1 als verifizierter Kandidat ein Mediator des anti-

inflammatorischen Effekts der Milch ist.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Milch wird seit Jahrhunderten als Nahrungsmittel genutzt, wobei Kuhmilch den überwiegenden Anteil der Konsummilch ausmacht. Neben ihrem ernährungsphysiologischen Wert rücken zunehmend auch ihre potenziellen Einflüsse auf die Gesundheit und dabei auch auf das Immunsystem in den Fokus. Insbesondere Proteinen aus der Milch werden immunmodulatorische Eigenschaften zugeschrieben, wie beispielsweise der A1- und A2-Variante des hochabundanten β -Kaseins. Allerdings sind aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Milch und der dadurch schwierigen Analyse niedrig abundanter Bestandteile bis heute noch nicht alle enthaltenen Proteine identifiziert, und die Funktionen vieler Milchproteine sind bislang unzureichend verstanden. Auch die Wirkung von Milch auf das Immunsystem ist bislang ungeklärt. Unsere Vorarbeiten zeigten, dass Milch die Proliferation polyklonal stimulierter humaner peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) hemmte, während die zugrunde liegenden Mechanismen unklar blieben.

Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, die Immunantwort humaner ConA-stimulierter PBMC auf Milch der A1- und A2-Variante detaillierter zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurde Milch von je drei homozygoten A1- oder A2-Rindern aus demselben Betrieb in jeweils zwei Fraktionen aufgetrennt: Mittels Filter-gestützter Zentrifugation konnte von jeder Variante eine Fraktion mit niedrigem Molekulargewicht (< 100 kDa, NMGF) und eine Fraktion mit hohem Molekulargewicht (≥ 100 kDa, HMGF) generiert werden.

Um einzugrenzen, welche Fraktion den inhibitorischen Effekt vermitteln kann, wurde in einem ersten Schritt die Wirkung der Milchfraktionen auf die ConA-induzierte Proliferation der humanen PBMC untersucht. Für die NMGF ließ sich weder eine Hemmung der PBMC-Proliferation nachweisen noch ein Unterschied zwischen der A1- und A2-Variante. Im Gegensatz dazu zeigte die HMGF beider Varianten (A1 und A2) einen hochsignifikanten anti-proliferativen und damit anti-inflammatorischen Effekt auf ConA-stimulierte PBMC *in vitro*. Dabei wurde für beide Milchvarianten eine gleiche, hochsignifikante Hemmung der ConA-induzierten PBMC-Proliferation festgestellt. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass der Effekt-auslösende Faktor entweder selbst ein molekulares Gewicht von ≥ 100 kDa besitzt oder in Komplexen vorliegt, die dieses Molekulargewicht erreichen. Um den Faktor zu identifizieren, der den anti-

inflammatorischen Effekt der A1- und der A2-HMGF in den PBMC vermittelt, wurde nachfolgend ein proteomischer Ansatz gewählt. Dabei konnte unter Verwendung hochauflösender, label-freier, differenzieller Proteomanalyse mit LC-MS/MS erstmals eine umfassende Proteinlandkarte des Sekretoms humaner ConA-stimulierter PBMC nach Ko-Inkubation mit der NMGF und der HMGF der A1- oder der A2-Varianten erstellt werden. Insgesamt wurden dabei 2640 humane Proteine im PBMC-Sekretom identifiziert. Interessanterweise waren davon zwei Proteine nach Ko-Inkubation mit der A1-HMGF und vier Proteine nach der Ko-Inkubation mit der A2-HMGF höher abundant. Bemerkenswerterweise wurde lediglich das Protein TOM1 nach der Ko-Inkubation mit der A1-HMGF und der A2-HMGF signifikant vermehrt sekretiert. Das aufgereinigte Protein TOM1 wurde nachfolgend in einer Verdünnungsreihe von 0,1 bis 1000 ng/ml in Zellproliferationsassays untersucht. Es zeigte sich, dass TOM1 bereits bis zu einer Konzentration von 1 ng/ml die ConA-induzierte Proliferation humaner PBMC signifikant inhibierte. Diese funktionelle Charakterisierung wies darauf hin, dass TOM1 alleine einen ausgeprägten anti-inflammatorischen Effekt auf ConA-stimulierte humane PBMC *in vitro* ausübt. Bei einer Konzentration von 1000 ng/ml war der hemmende Effekt von TOM1 gleich mit dem der A1- oder A2-HMGF. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass TOM1 ein Mediator des anti-inflammatorischen Effekts der Milch in primären polykonal stimulierten PBMC ist.

Offen bleibt, über welche Mechanismen TOM1 diesen Effekt vermittelt, welche Faktoren aus der Milch dabei mit TOM1 interagieren und ob weitere differenziell sekretierte Proteine eine Rolle spielen. Zukünftige Untersuchungen sind daher notwendig, um diese Faktoren der Milch zu identifizieren sowie die zugrunde liegenden Signalwege in den PBMC zu identifizieren und so die immunmodulatorischen Eigenschaften von Milch umfassender zu verstehen.

7 SUMMARY

Milk has been used as a foodstuff for centuries, with cow's milk accounting for the majority of milk consumed. In addition to its nutritional value, its potential effects on health, including the immune system, are increasingly coming into focus. Milk proteins in particular are believed to have immunomodulatory properties, such as the A1 and A2 variants of the highly abundant β -casein. However, due to the complex composition of milk and the resulting difficulty in analyzing low-abundance components, not all of the proteins it contains have been identified to date, and the functions of many milk proteins are still poorly understood. The effect of milk on the immune system also remains unclear. Our preliminary work showed that milk inhibited the proliferation of polyclonally stimulated human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), while the underlying mechanisms remained unclear.

Therefore, the aim of this study was to characterize the immune response of human ConA-stimulated PBMC to A1 and A2 milk variants in greater detail. For this purpose, milk from three homozygous A1 or A2 cows from the same herd was separated into two fractions: Using filter-aided centrifugation, a low molecular weight fraction (< 100 kDa, NMGF) and a high molecular weight fraction (≥ 100 kDa, HMGF) were generated from each variant.

In order to narrow down which fraction could mediate the inhibitory effect, the effect of the milk fractions on ConA-induced proliferation of human PBMC was investigated in a first step. For NMGF, neither inhibition of PBMC proliferation nor a difference between the A1 and A2 variants could be demonstrated. In contrast, HMGF from both variants (A1 and A2) showed a highly significant anti-proliferative and thus anti-inflammatory effect on ConA-stimulated PBMC *in vitro*. The same highly significant inhibition of ConA-induced PBMC proliferation was observed for both milk variants. This was the first time it had been shown that the effect-triggering factor either has a molecular weight of ≥ 100 kDa itself or is present in complexes that reach this molecular weight. A proteomic approach was then used to identify the factor that mediates the anti-inflammatory effect of A1 and A2 HMGF in PBMC. Using high-resolution, label-free, differential proteome analysis with LC-MS/MS, it was possible for the first time to create a comprehensive protein landscape of the secretome of human ConA-stimulated PBMC after co-incubation with NMGF and HMGF of the A1

or A2 variant. A total of 2640 human proteins were identified in the PBMC secretome. Interestingly, two proteins were more abundant after co-incubation with A1 HMGF and four proteins were more abundant after co-incubation with A2 HMGF. Remarkably, only the protein TOM1 was significantly more abundant after co-incubation with A1 HMGF and A2 HMGF. The purified protein TOM1 was subsequently tested in a dilution series from 0,1 to 1000 ng/ml in cell proliferation assays. It was found that TOM1 significantly inhibited ConA-induced proliferation of human PBMC at concentrations as low as 1 ng/ml. This functional characterization indicated that TOM1 alone exerts a pronounced anti-inflammatory effect on ConA-stimulated human PBMC *in vitro*. At a concentration of 1000 ng/ml, the inhibitory effect of TOM1 was equal to that of A1 and A2 HMGF. These results show for the first time that TOM1 is a mediator of the anti-inflammatory effect of milk in primary polyclonally stimulated PBMC.

It remains unclear which mechanisms TOM1 uses to mediate this effect, which factors in milk interact with TOM1, and whether other differentially secreted proteins are involved. Future studies are therefore needed to identify these factors in milk and the underlying signaling pathways in PBMC in order to gain a more comprehensive understanding of the immunomodulatory properties of milk.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Acquavia MA, Villone A, Rubino R, Bianco G. A Comprehensive Review of Milk Components: Recent Developments on Extraction and Analysis Methods. *Molecules* 2025; 30
- Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406: 782-7.
- Adio AA, Uko SO, Lawal JM, Malami I, Lawal N, Jega AJY, Abubakar B, Bello MB, Ibrahim KG, Abubakar MB, Abdussamad AM, Abubakar MS, Imam MU. Comparative Label-Based Proteomics of Venoms from *Echis ocellatus*, *Naja nigricollis*, and *Bitis arietans*. *Proteomes* 2025; 13
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 2004; 4: 499-511.
- Al-Rashed F, Haddad D, Al Madhoun A, Sindhu S, Jacob T, Kochumon S, Obeid LM, Al-Mulla F, Hannun YA, Ahmad R. ACSL1 is a key regulator of inflammatory and macrophage foaming induced by short-term palmitate exposure or acute high-fat feeding. *iScience* 2023; 26: 107145.
- Alexovic M, Ulicna C, Sabo J, Davalieva K. Human peripheral blood mononuclear cells as a valuable source of disease-related biomarkers: Evidence from comparative proteomics studies. *Proteomics Clin Appl* 2024; 18: e2300072.
- Ameratunga R, Lim D, Longhurst H, Mehrtens J, Leung E, Lehnert K, Steele R, Woon ST. Reference intervals for functional lymphocyte proliferation studies using (3)H thymidine uptake in adults. *J Immunol Methods* 2025; 542: 113884.
- Anderson J, Toh ZQ, Reitsma A, Do LAH, Nathanielsz J, Licciard PV. Effect of peripheral blood mononuclear cell cryopreservation on innate and adaptive immune responses. *Journal of Immunological Methods* 2019; 465: 61-6.
- Ando Y, Yasuoka C, Mishima T, Ikematsu T, Uede T, Matsunaga T, Inobe M. Concanavalin A-mediated T cell proliferation is regulated by herpes virus entry mediator costimulatory molecule. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 2014; 50: 313-20.
- Asledottir T, Le TT, Poulsen NA, Devold TG, Larsen LB, Vegarud GE. Release of β -casomorphin-7 from bovine milk of different β -casein variants after ex vivo gastrointestinal digestion. *International Dairy Journal* 2018; 81: 8-11.
- Attarwala H. TGN1412: From Discovery to Disaster. *J Young Pharm* 2010; 2: 332-6.
- Awasthi D, Sarode A. Neutrophils at the Crossroads: Unraveling the Multifaceted Role in the Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences* 2024; 25
- Ayaz, Suhail SM, Ahmad I, Zeb MT, Khan R, Ijaz A, Ahmad I, Riaz MH, Ali F, Khan K, Khan A. Detection of A2A2 genotype of beta casein protein (CSN2) gene in local, exotic and cross bred cattle in Pakistan. *Anim Biotechnol* 2023; 34: 1462-73.
- Baars T, Berge AC, Garssen J, Verster JC. Effect of raw milk consumption on perceived health, mood and immune functioning among US adults with a poor and normal health: A retrospective questionnaire based study. *Complement Ther Med* 2019; 47: 102196.
- Bang W, You H, Park JM, Park J, Kang B, Ju M, Park Y, Lee H, Back S, Lew H. Tear Proteome Analysis with Patients with Primary Nasolacrimal Duct Obstruction. *International Journal of Molecular Sciences* 2025; 26
- Barnett MP, McNabb WC, Roy NC, Woodford KB, Clarke AJ. Dietary A1 β -casein affects gastrointestinal transit time, dipeptidyl peptidase-4 activity, and inflammatory status relative to A2 β -casein in Wistar rats. *Int J Food Sci Nutr* 2014; 65: 720-7.
- Beutgen VM, Shinkevich V, Porschke J, Meena C, Steitz AM, Pogge von Strandmann E, Graumann J, Gomez-Serrano M. Secretome Analysis Using Affinity Proteomics and Immunoassays: A Focus on Tumor Biology. *Mol Cell Proteomics* 2024; 23: 100830.
- Bilbrough T, Piemontese E, Seitz O. Dissecting the role of protein phosphorylation: a chemical biology toolbox. *Chemical Society Reviews* 2022; 51: 5691-730.

- Bogahawaththa D, Ashraf R, Chandrapala J, Donkor O, Vasiljevic T. In vitro immunogenicity of various native and thermally processed bovine milk proteins and their mixtures. *Journal of Dairy Science* 2018; 101: 8726-36.
- Boraschi D. What Is IL-1 for? The Functions of Interleukin-1 Across Evolution. *Frontiers in Immunology* 2022; 13
- Bordoni A, Danesi F, Dardevet D, Dupont D, Fernandez AS, Gille D, Nunes Dos Santos C, Pinto P, Re R, Remond D, Shahar DR, Vergeres G. Dairy products and inflammation: A review of the clinical evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017; 57: 2497-525.
- Bowley TY, Lenz KD, Shanker A, Kubicek-Sutherland JZ. Methods integrating innate and adaptive immune responses in human in vitro immunization assays. *Frontiers in Immunology* 2025; 16
- Brantl V, Teschemacher H. A material with opioid activity in bovine milk and milk products. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1979; 306: 301-4.
- Bravo-Parra M, Nelli RK, Yen L, Castillo G, Mora-Diaz JC, Castillo-Espinoza AF, Gimenez-Lirola LG. Proliferation Assay Using Cryopreserved Porcine Peripheral Mononuclear Cells Stimulated With Concanavalin A and Analyzed With FCS Express(TM) 7.18 Software. *Bio Protoc* 2025; 15: e5332.
- Brink LR, Lonnerdal B. Milk fat globule membrane: the role of its various components in infant health and development. *J Nutr Biochem* 2020; 85: 108465.
- Brissoni B, Agostini L, Kropf M, Martinon F, Swoboda V, Lippens S, Everett H, Aebi N, Janssens S, Meylan E, Felberbaum-Corti M, Hirling H, Gruenberg J, Tschopp J, Burns K. Intracellular trafficking of interleukin-1 receptor I requires Tollip. *Curr Biol* 2006; 16: 2265-70.
- Brooke-Taylor S, Dwyer K, Woodford K, Kost N. Systematic Review of the Gastrointestinal Effects of A1 Compared with A2 beta-Casein. *Adv Nutr* 2017; 8: 739-48.
- Bunting CH. The leukocytes. *Physiological Reviews* 1922; 2: 505-20.
- Burgess KE, Odysseos AD, Zalvan C, Druker BJ, Anderson P, Schlossman SF, Rudd CE. Biochemical identification of a direct physical interaction between the CD4:p56lck and Ti(TcR)/CD3 complexes. *Eur J Immunol* 1991; 21: 1663-8.
- Butt MA. Surface Plasmon Resonance-Based Biodetection Systems: Principles, Progress and Applications-A Comprehensive Review. *Biosensors-Basel* 2025; 15
- Cao Z, Henzel WJ, Gao X. IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 1996a; 271: 1128-31.
- Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996b; 383: 443-6.
- Cattaneo S, Masotti F, Stuknytė M, De Noni I. Impact of in vitro static digestion method on the release of β -casomorphin-7 from bovine milk and cheeses with A1 or A2 β -casein phenotypes. *Food Chem* 2023; 404: 134617.
- Cerbulis J, Farrell HM. Composition of Milks of Dairy-Cattle .1. Protein, Lactose, and Fat Contents and Distribution of Protein-Fraction. *Journal of Dairy Science* 1975; 58: 817-27.
- Che J, Yue Y, Lokuge GMS, Nielsen SD, Sundekilde UK, Purup S, Larsen LB, Poulsen NA. Cellular milk production: Proteins and minerals in secretomes from cultivated bovine milk-derived mammary cells. *Food Chem* 2025; 467: 142386.
- Chen R, Curran J, Pu F, Zhuola Z, Bayon Y, Hunt JA. In Vitro Response of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) to Collagen Films Treated with Cold Plasma. *Polymers (Basel)* 2017; 9
- Chilson OP, Boylston AW, Crumpton MJ. Phaseolus vulgaris phytohaemagglutinin (PHA) binds to the human T lymphocyte antigen receptor. *EMBO J* 1984; 3: 3239-45.
- Cieslinska A, Kostyra E, Sienkiewicz-Szlapka E. Beta-casomorphin 7 in raw and hydrolyzed milk derived from cows of alternative β -casein genotypes. *Milchwissenschaft-Milk Science International* 2007; 62: 125-7.

- Cimmino F, Catapano A, Villano I, Di Maio G, Petrella L, Traina G, Pizzella A, Tudisco R, Cavaliere G. Invited review: Human, cow, and donkey milk comparison: Focus on metabolic effects. *J Dairy Sci* 2023; 106: 3072-85.
- Cui M, Cheng C, Zhang L. High-throughput proteomics: a methodological mini-review. *Laboratory Investigation* 2022; 102: 1170-81.
- Dai R, Fang Y, Zhao W, Liu S, Ding J, Xu K, Yang L, He C, Ding F, Meng H. Identification of alleles and genotypes of beta-casein with DNA sequencing analysis in Chinese Holstein cow. *J Dairy Res* 2016; 83: 312-6.
- Das A, Giri K, Behera RN, Maity S, Ambatipudi K. BoMiProt 2.0: An update of the bovine milk protein database. *Journal of Proteomics* 2022; 267
- de Sousa ARS, Ottestad I, Gjevestad GO, Holven KB, Ulven SM, Christensen JJ. Associations between PBMC whole genome transcriptome, muscle strength, muscle mass, and physical performance in healthy home-dwelling older women. *Geroscience* 2023; 45: 3175-86.
- de Vasconcelos ML, Oliveira L, Hill JP, Vidal AMC. Difficulties in Establishing the Adverse Effects of β -Casomorphin-7 Released from β -Casein Variants-A Review. *Foods* 2023; 12
- Deeg CA, Reese S, Gerhards H, Wildner G, Kaspers B. The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 2286-92.
- Degroote RL, Korbonits L, Stetter F, Kleinwort KJH, Schilloks MC, Amann B, Hirmer S, Hauck SM, Deeg CA. Banana Lectin from *Musa paradisiaca* Is Mitogenic for Cow and Pig PBMC via IL-2 Pathway and ELF1. *Immuno* 2021; 1: 264-76.
- Degroote RL, Schmalen A, Hauck SM, Deeg CA. Unveiling Differential Responses of Granulocytes to Distinct Immunostimulants with Implications in Autoimmune Uveitis. *Biomedicines* 2023; 12
- Delosiore M, Pires JAA, Bernard L, Cassar-Malek I, Bonnet M. Dataset reporting 4654 cow milk proteins listed according to lactation stages and milk fractions. *Data Brief* 2020; 29: 105105.
- Elitsur Y, Luk GD. Beta-casomorphin (BCM) and human colonic lamina propria lymphocyte proliferation. *Clin Exp Immunol* 1991; 85: 493-7.
- Elkhamary A, Gerner I, Bileck A, Oreff GL, Gerner C, Jenner F. Comparative proteomic profiling of the ovine and human PBMC inflammatory response. *Scientific Reports* 2024; 14
- Erdogan O, Xie L, Wang L, Wu B, Kong Q, Wan Y, Chen X. Proteomic dissection of LPS-inducible, PHF8-dependent secretome reveals novel roles of PHF8 in TLR4-induced acute inflammation and T cell proliferation. *Sci Rep* 2016; 6: 24833.
- Eriksen EK, Vegarud GE, Langsrud T, Almaas H, Lea T. Effect of milk proteins and their hydrolysates on immune responses (vol 79, pg 29, 2008). *Small Ruminant Research* 2009; 82: 69-.
- Evershed RP, Payne S, Sherratt AG, Copley MS, Coolidge J, Urem-Kotsu D, Kotsakis K, Ozdogan M, Ozdogan AE, Nieuwenhuyse O, Akkermans PM, Bailey D, Andeescu RR, Campbell S, Farid S, Hodder I, Yalman N, Ozbasaran M, Bicakci E, Garfinkel Y, Levy T, Burton MM. Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding. *Nature* 2008; 455: 528-31.

- Evershed RP, Davey Smith G, Roffet-Salque M, Timpson A, Diekmann Y, Lyon MS, Cramp LJE, Casanova E, Smyth J, Whelton HL, Dunne J, Brychova V, Soberl L, Gerbault P, Gillis RE, Heyd V, Johnson E, Kendall I, Manning K, Marciniak A, Outram AK, Vigne JD, Shennan S, Bevan A, Colledge S, Allason-Jones L, Amkreutz L, Anders A, Arbogast RM, Balasescu A, Banffy E, Barclay A, Behrens A, Bogucki P, Carrancho Alonso A, Carretero JM, Cavanagh N, Classen E, Collado Giraldo H, Conrad M, Csengeri P, Czerniak L, Debiec M, Denaire A, Domboroczki L, Donald C, Ebert J, Evans C, Frances-Negro M, Gronenborn D, Haack F, Halle M, Hamon C, Hulshoff R, Ilett M, Iriarte E, Jakucs J, Jeunesse C, Johnson M, Jones AM, Karul N, Kiosak D, Kotova N, Krause R, Kretschmer S, Kruger M, Lefranc P, Lelong O, Lenneis E, Logvin A, Luth F, Marton T, Marley J, Mortimer R, Oosterbeek L, Oross K, Pavuk J, Pechtl J, Petrequin P, Pollard J, Pollard R, Powlesland D, Pyzel J, Raczky P, Richardson A, Rowe P, Rowland S, Rowlandson I, Saile T, Sebok K, Schier W, Schmalfuss G, Sharapova S, Sharp H, Sheridan A, Shevnina I, Sobkowiak-Tabaka I, Stadler P, Stauble H, Stobbe A, Stojanovski D, Tasic N, van Wijk I, Vostrovskaya I, Vukovic J, Wolfram S, Zeeb-Lanz A, Thomas MG. Author Correction: Dairying, diseases and the evolution of lactase persistence in Europe. *Nature* 2022; 609: E9.
- Fan D, Li J, Li Y, Guo Y, Zhang X, Wang W, Liu X, Liu J, Dai L, Zhang L, Kang Q, Ji Z. Protein 4.1R negatively regulates CD8(+) T-cell activation by modulating phosphorylation of linker for activation of T cells. *Immunology* 2019; 157: 312-21.
- Farrell HM, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, Hicks CL, Hollar CM, Ng-Kwai-Hang KF, Swaisgood HE. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science* 2004; 87: 1641-74.
- Fedorov, II, Protasov SA, Tarasova IA, Gorshkov MV. Ultrafast Proteomics. *Biochemistry (Mosc)* 2024; 89: 1349-61.
- Fleischer AB, Amann B, von Toerne C, Degroote RL, Schmalen A, Weisser T, Hauck SM, Deeg CA. Differential Expression of ARG1 and MRC2 in Retinal Müller Glial Cells During Autoimmune Uveitis. *Biomolecules* 2025; 15
- Florinskaya A, Ershov P, Mezentshev Y, Kaluzhskiy L, Yablokov E, Medvedev A, Ivanov A. SPR Biosensors in Direct Molecular Fishing: Implications for Protein Interactomics. *Sensors* 2018; 18
- Franzoi M, Niero G, Visentin G, Penasa M, Cassandro M, De Marchi M. Variation of Detailed Protein Composition of Cow Milk Predicted from a Large Database of Mid-Infrared Spectra. *Animals (Basel)* 2019; 9
- Ganesan N, Ronsmans S, Hoet P. Methods to Assess Proliferation of Stimulated Human Lymphocytes In Vitro: A Narrative Review. *Cells* 2023; 12
- Gao KP, Mitsui T, Fujiki K, Ishiguro H, Kondo T. Effect of lactase preparations in asymptomatic individuals with lactase deficiency--gastric digestion of lactose and breath hydrogen analysis. *Nagoya J Med Sci* 2002; 65: 21-8.
- Gard F, Flad LM, Weisser T, Ammer H, Deeg CA. Effects of A1 Milk, A2 Milk and the Opioid-like Peptide beta-Casomorphin-7 on the Proliferation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Biomolecules* 2024; 14
- Garibova LA, Gorshkov MV, Ivanov MV. On the question of correct use of replicates in quantitative label-free proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2025; 417: 4765-74.
- Gensberger-Reigl S, Zenker HE. Detection of intact bovine milk proteins after simulated gastrointestinal infant digestion using UHPLC - HRMS. *Food Chemistry* 2025; 465
- Gheitasi R, Roll D, Muller MM, Naseri M, Konig R, Slevogt H, Pletz MW, Makarewicz O. Exploring secretory proteome and cytokine kinetic of human peripheral blood mononuclear cells exposed to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms and planktonic bacteria. *Front Immunol* 2024; 15: 1334616.
- Gonzales-Malca JA, Tirado-Kulieva VA, Abanto-López MS, Aldana-Juárez WL, Palacios-Zapata CM. Worldwide research on the health effects of bovine milk containing A1 and A2 β -casein: Unraveling the current scenario and future trends through bibliometrics and text mining. *Current Research in Food Science* 2023; 7: 100602.

- González-Rodríguez N, Vázquez-Liz N, Rodríguez-Sampedro A, Regal P, Fente C, Lamas A. The Impact of A1-and A2 β -Casein on Health Outcomes: A Comprehensive Review of Evidence from Human Studies. *Applied Sciences-Basel* 2025; 15
- Goossens A, Geremia R, Bauw G, Van Montagu M, Angenon G. Isolation and characterisation of arcelin-5 proteins and cDNAs. *Eur J Biochem* 1994; 225: 787-95.
- Greenwood SL, Honan MC. Symposium review: Characterization of the bovine milk protein profile using proteomic techniques. *J Dairy Sci* 2019; 102: 2796-806.
- Group SRoEpbaDW (2009) Review of the potential health impact of β -casomorphins and related peptides. In: EFSA Scientific Report
- Guo Q, Jin Y, Chen X, Ye X, Shen X, Lin M, Zeng C, Zhou T, Zhang J. NF-kappaB in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. *Signal Transduct Target Ther* 2024; 9: 53.
- Guzman UH, Martinez-Val A, Ye Z, Damoc E, Arrey TN, Pashkova A, Renuse S, Denisov E, Petzoldt J, Peterson AC, Harking F, Ostergaard O, Rydbirk R, Aznar S, Stewart H, Xuan Y, Hermanson D, Horning S, Hock C, Makarov A, Zabrouskov V, Olsen JV. Ultra-fast label-free quantification and comprehensive proteome coverage with narrow-window data-independent acquisition. *Nat Biotechnol* 2024; 42: 1855-66.
- Hamacher M, Meyer HE. HUPO Brain Proteome Project: aims and needs in proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2005; 2: 1-3.
- Harvey AG, Graves AM, Uppalapati CK, Matthews SM, Rosenberg S, Parent EG, Fagerlie MH, Guinan J, Lopez BS, Kronstad LM. Dendritic cell-natural killer cell cross-talk modulates T cell activation in response to influenza A viral infection. *Front Immunol* 2022; 13: 1006998.
- Hathout Y. Approaches to the study of the cell secretome. *Expert Rev Proteomics* 2007; 4: 239-48.
- Haudek-Prinz VJ, Klepeisz P, Slany A, Griss J, Meshcheryakova A, Paulitschke V, Mitulovic G, Stockl J, Gerner C. Proteome signatures of inflammatory activated primary human peripheral blood mononuclear cells. *J Proteomics* 2012; 76 Spec No.: 150-62.
- Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR, Telles GP, Minghim R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* 2015; 16: 169.
- Hedfors E, Holm G, Pettersson D. Activation of human peripheral blood lymphocytes by concanavalin A dependence of monocytes. *Clin Exp Immunol* 1975; 22: 223-9.
- Heppner FL, Christ AD, Klein MA, Prinz M, Fried M, Kraehenbuhl JP, Aguzzi A. Transepithelial prion transport by M cells. *Nat Med* 2001; 7: 976-7.
- Hodgson-Garms M, Moore MJ, Martino MM, Kelly K, Frith JE. Proteomic profiling of iPSC and tissue-derived MSC secretomes reveal a global signature of inflammatory licensing. *NPJ Regen Med* 2025; 10: 7.
- Homburg M, Martin Monreal MT, Rasmussen AK, Nielsen CH, Frederiksen H, Morevati M, Feldt-Rasmussen U. Effects of triclosan on cytokine production by human immune cells in vitro. *Environ Int* 2025; 202: 109588.
- Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Research* 2015; 43: D512-D20.
- Horstman AMH, Huppertz T. Milk proteins: Processing, gastric coagulation, amino acid availability and muscle protein synthesis. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2023; 63: 10267-82.
- Howden AJM, Hukelmann JL, Brenes A, Spinelli L, Sinclair LV, Lamond AI, Cantrell DA. Quantitative analysis of T cell proteomes and environmental sensors during T cell differentiation. *Nature Immunology* 2019; 20: 1542-54.
- Hu S, Guo Y, Wang Y, Li Y, Fu T, Zhou Z, Wang Y, Liu J, Pan L. Structure of Myosin VI/Tom1 complex reveals a cargo recognition mode of Myosin VI for tethering. *Nat Commun* 2019; 10: 3459.
- Husby S, Jensenius JC, Svehag SE. Passage of Undegraded Dietary Antigen into the Blood of Healthy-Adults - Quantification, Estimation of Size Distribution, and Relation of Uptake to Levels of Specific Antibodies. *Scandinavian Journal of Immunology* 1985; 22: 83-92.

- Huttlin EL, Bruckner RJ, Navarrete-Perea J, Cannon JR, Baltier K, Gebreab F, Gygi MP, Thornock A, Zarraga G, Tam S, Szpyt J, Gassaway BM, Panov A, Parzen H, Fu S, Golbazi A, Maenpaa E, Stricker K, Guha Thakurta S, Zhang T, Rad R, Pan J, Nusinow DP, Paulo JA, Schweppe DK, Vaites LP, Harper JW, Gygi SP. Dual proteome-scale networks reveal cell-specific remodeling of the human interactome. *Cell* 2021; 184: 3022-40 e28.
- Imperiale S, Morozova K, Ferrentino G, Scampicchio M. Analysis of milk with liquid chromatography-mass spectrometry: a review. *European Food Research and Technology* 2023; 249: 861-902.
- Ivanov AS, Ershov PV, Molnar AA, Mezentsev YV, Kaluzhskiy LA, Yablokov EO, Florinskaya AV, Gnedenko OV, Medvedev AE, Kozin SA, Mitkevich VA, Makarov AA, Gilep AA, Luschik AY, Gaidukevich IV, Usanov SA. Direct molecular fishing in molecular partners investigation in protein-protein and protein-peptide interactions. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2016; 42: 14-21.
- Jann O, Ceriotti G, Caroli A, Erhardt G. A new variant in exon VII of bovine β -casein gene (CSN2) and its distribution among European cattle breeds. *J. Anim. Breed. Genet.* 2002; 119: 65-8.
- Jaswal S, Jena MK, Anand V, Jaswal A, Kancharla S, Kolli P, Mandadapu G, Kumar S, Mohanty AK. Critical Review on Physiological and Molecular Features during Bovine Mammary Gland Development: Recent Advances. *Cells* 2022; 11
- Jayamanna Mohottige MW, Juhasz A, Nye-Wood MG, Farquharson KA, Bose U, Colgrave ML. Beyond nutrition: Exploring immune proteins, bioactive peptides, and allergens in cow and Arabian camel milk. *Food Chem* 2025; 467: 142471.
- Jiang YM, Rex DAB, Schuster D, Neely BA, Rosano GL, Volkmar N, Momenzadeh A, Peters-Clarke TM, Egbert SB, Kreimer S, Doud EH, Crook OM, Yadav AK, Vanuopadath M, Hegeman AD, Mayta ML, Duboff AG, Riley NM, Moritz RL, Meyer JG. Comprehensive Overview of Bottom-Up Proteomics Using Mass Spectrometry. *Acs Measurement Science* 2024; 4: 338-417.
- Jimenez-Montenegro L, Alfonso L, Mendizabal JA, Urrutia O. Worldwide Research Trends on Milk Containing Only A2 beta-Casein: A Bibliometric Study. *Animals (Basel)* 2022; 12
- Kang Q, Yu Y, Pei X, Hughes R, Heck S, Zhang X, Guo X, Halverson G, Mohandas N, An X. Cytoskeletal protein 4.1R negatively regulates T-cell activation by inhibiting the phosphorylation of LAT. *Blood* 2009; 113: 6128-37.
- Kanter JE, Kramer F, Barnhart S, Averill MM, Vivekanandan-Giri A, Vickery T, Li LO, Becker L, Yuan W, Chait A, Braun KR, Potter-Perigo S, Sanda S, Wight TN, Pennathur S, Serhan CN, Heinecke JW, Coleman RA, Bornfeldt KE. Diabetes promotes an inflammatory macrophage phenotype and atherosclerosis through acyl-CoA synthetase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: E715-24.
- Katoh Y, Shiba Y, Mitsushashi H, Yanagida Y, Takatsu H, Nakayama K. Tollip and Tom1 form a complex and recruit ubiquitin-conjugated proteins onto early endosomes. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 24435-43.
- Katoh Y, Imakagura H, Futatsumori M, Nakayama K. Recruitment of clathrin onto endosomes by the Tom1-Tollip complex. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341: 143-9.
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* 2010; 11: 373-84.
- Kenneth Murphy CW (2018) *Immunity*
- Keskitalo S, Haapaniemi EM, Glumoff V, Liu XN, Lehtinen V, Fogarty C, Rajala H, Chiang SC, Mustjoki S, Kovanen P, Lohi J, Bryceson YT, Seppänen M, Kere J, Heiskanen K, Varjosalo M. Dominant TOM1 mutation associated with combined immunodeficiency and autoimmune disease. *Npj Genomic Medicine* 2019; 4
- Ketloy C, Engering A, Srichairatanakul U, Limsalakpetch A, Yongvanitchit K, Pichyangkul S, Ruxrungtham K. Expression and function of Toll-like receptors on dendritic cells and other antigen presenting cells from non-human primates. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 125: 18-30.
- Kim D, Nita-Lazar A. Progress in mass spectrometry approaches to profiling protein-protein interactions in the studies of the innate immune system. *J Proteins Proteom* 2024; 15: 545-59.

- Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2005; 25: 8843-53.
- Kleinwort KJH, Degroote RL, Hirmer S, Korbonits L, Lorenz L, Scholz AM, Hauck SM, Deeg CA. Bovine Peripheral Blood Derived Lymphocyte Proteome and Secretome Show Divergent Reaction of Bovine Immune Phenotypes after Stimulation with Pokeweed Mitogen. *Proteomes* 2022; 10
- Kleiveland C. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Verhoeckx K, Cotter P, Lopez-Exposito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, Wichers H, eds. Cham (CH): 2015: 161-7.
- Knecht S, Eberl HC, Kreis N, Ugwu UJ, Starikova T, Kuster B, Wilhelm S. An Introduction to Analytical Challenges, Approaches, and Applications in Mass Spectrometry-Based Secretomics. *Mol Cell Proteomics* 2023; 22: 100636.
- Koncarevic S, Lossner C, Kuhn K, Prinz T, Pike I, Zucht HD. In-depth profiling of the peripheral blood mononuclear cells proteome for clinical blood proteomics. *Int J Proteomics* 2014; 2014: 129259.
- Kwon HC, Jung HS, Kothuri V, Han SG. Current status and challenges for cell-cultured milk technology: a systematic review. *J Anim Sci Biotechnol* 2024; 15: 81.
- Lambers TT. Processing affects beta-casomorphin peptide formation during simulated gastrointestinal digestion in both A1 and A2 milk. *International Dairy Journal* 2021;
- Last'ovicka J, Budinsky V, Spisek R, Bartunkova J. Assessment of lymphocyte proliferation: CFSE kills dividing cells and modulates expression of activation markers. *Cell Immunol* 2009; 256: 79-85.
- Lastovicka J, Rataj M, Bartunkova J. Assessment of lymphocyte proliferation for diagnostic purpose: Comparison of CFSE staining, Ki-67 expression and (3)H-thymidine incorporation. *Hum Immunol* 2016; 77: 1215-22.
- Leca G, Boumsell L, Fabbi M, Reinherz EL, Kanellopoulos JM. The sheep erythrocyte receptor and both alpha and beta chains of the human T-lymphocyte antigen receptor bind the mitogenic lectin (phytohaemagglutinin) from *Phaseolus vulgaris*. *Scand J Immunol* 1986; 23: 535-44.
- Li Z, Sun C, Wang F, Wang X, Zhu J, Luo L, Ding X, Zhang Y, Ding P, Wang H, Pu M, Li Y, Wang S, Qin Q, Wei Y, Sun J, Wang X, Luo Y, Chen D, Qiu W. Molecular mechanisms governing circulating immune cell heterogeneity across different species revealed by single-cell sequencing. *Clin Transl Med* 2022; 12: e689.
- Lindmark-Månsson H, Fondén R, Pettersson HE. Composition of Swedish dairy milk. *International Dairy Journal* 2003; 13: 409-25.
- Liu B, Qiao W, Zhang M, Liu Y, Zhao J, Chen L. Bovine milk with variant β -casein types on immunological mediated intestinal changes and gut health of mice. *Front Nutr* 2022; 9: 970685.
- Liu Y, Zhang W, Wang H, Liu H, Yu Q, Luo X, Feng X, Yang P. Fine particulate matter potentiates Th17-cell pathogenicity in experimental autoimmune uveitis via ferroptosis. *Ecotoxicol Environ Saf* 2024; 284: 116979.
- Lokuge GMS, Larsen MK, Maigaard M, Wiking L, Larsen LB, Lund P, Poulsen NA. Effects of feeding whole-cracked rapeseeds, nitrate, and 3-nitrooxypropanol on protein composition, minerals, and vitamin B in milk from Danish Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 2024; 107: 5353-65.
- Loss G, Apprich S, Waser M, Kneifel W, Genuneit J, Buchele G, Weber J, Sozanska B, Danielewicz H, Horak E, van Neerven RJ, Heederik D, Lorenzen PC, von Mutius E, Braun-Fahrlander C, group Gs. The protective effect of farm milk consumption on childhood asthma and atopy: the GABRIELA study. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 766-73 e4.
- Loveday SM. Protein digestion and absorption: the influence of food processing. *Nutr Res Rev* 2023; 36: 544-59.
- Maity S, Bhat AH, Giri K, Ambatipudi K. BoMiProt: A database of bovine milk proteins. *J Proteomics* 2020; 215: 103648.
- Margraf A, Perretti M. Immune Cell Plasticity in Inflammation: Insights into Description and Regulation of Immune Cell Phenotypes. *Cells* 2022; 11

- Martin M, Bol GF, Eriksson A, Resch K, Brigelius-Flohe R. Interleukin-1-induced activation of a protein kinase co-precipitating with the type I interleukin-1 receptor in T cells. *Eur J Immunol* 1994; 24: 1566-71.
- Martini AC, Gomez-Arboledas A, Forner S, Rodriguez-Ortiz CJ, McQuade A, Danhash E, Phan J, Javonillo D, Ha JV, Tram M, Trujillo-Estrada L, da Cunha C, Ager RR, Davila JC, Kitazawa M, Blurton-Jones M, Gutierrez A, Baglietto-Vargas D, Medeiros R, LaFerla FM. Amyloid-beta impairs TOM1-mediated IL-1R1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; 116: 21198-206.
- Märtlbauer E, Becker H (2016) *Milchkunde und Milchhygiene*. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart. 368
- Massella E, Piva S, Giacometti F, Liuzzo G, Zambrini AV, Serraino A. Evaluation of bovine beta casein polymorphism in two dairy farms located in northern Italy. *Ital J Food Saf* 2017; 6: 6904.
- McGregor RA, Poppitt SD. Milk protein for improved metabolic health: a review of the evidence. *Nutrition & Metabolism* 2013; 10
- McGuire JN, Overgaard J, Pociot F. Mass spectrometry is only one piece of the puzzle in clinical proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2008; 7: 74-83.
- Meissner F, Scheltema RA, Mollenkopf HJ, Mann M. Direct proteomic quantification of the secretome of activated immune cells. *Science* 2013; 340: 475-8.
- Mellstedt H. In vitro activation of human T and B lymphocytes by pokeweed mitogen. *Clin Exp Immunol* 1975; 19: 75-82.
- Morrocchi E, van Haren S, Palma P, Levy O. Modeling human immune responses to vaccination in vitro. *Trends Immunol* 2024; 45: 32-47.
- Mota LFM, Bisutti V, Vanzin A, Pegolo S, Toscano A, Schiavon S, Tagliapietra F, Gallo L, Marsan PA, Cecchinato A. Predicting milk protein fractions using infrared spectroscopy and a gradient boosting machine for breeding purposes in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science* 2023; 106: 1853-73.
- Muneer G, Chen CS, Chen YJ. Advancements in Global Phosphoproteomics Profiling: Overcoming Challenges in Sensitivity and Quantification. *Proteomics* 2025; 25: e202400087.
- Nadugala BH, Pagel CN, Raynes JK, Ranadheera CS, Logan A. The effect of casein genetic variants, glycosylation and phosphorylation on bovine milk protein structure, technological properties, nutrition and product manufacture. *International Dairy Journal* 2022; 133
- Ning J, Yang M, Liu W, Luo X, Yue X. Proteomics and Peptidomics As a Tool to Compare the Proteins and Endogenous Peptides in Human, Cow, and Donkey Milk. *J Agric Food Chem* 2023; 71: 16435-51.
- Novika RGH, Sari AN, Nurhidayati S, Maulina R, Maulida LF, Wahidah NJ, Ilyas MF, Sumarno L, Prastowo S, Jevitt CM. Effect of beta-casein A2 cow milk supplementation on physical growth, inflammation, growth-related hormones, and nutritional biomarkers in stunted children. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2025; 30: 119-26.
- OECD/FAO (2025) *OECD-FAO Agricultural Outlook 2025-2034*. FAO, Paris and Rome
- Ogata H, Su I, Miyake K, Nagai Y, Akashi S, Mecklenbrauker I, Rajewsky K, Kimoto M, Tarakhovsky A. The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. *J Exp Med* 2000; 192: 23-9.
- Panagiotakos DB, Pitsavos CH, Zampelas AD, Chrysoshoou CA, Stefanadis CI. Dairy products consumption is associated with decreased levels of inflammatory markers related to cardiovascular disease in apparently healthy adults: the ATTICA study. *J Am Coll Nutr* 2010; 29: 357-64.
- Pang B, Shin DH, Park KS, Huh YJ, Woo J, Zhang YH, Kang TM, Lee KY, Kim SJ. Differential pathways for calcium influx activated by concanavalin A and CD3 stimulation in Jurkat T cells. *Pflugers Arch* 2012; 463: 309-18.
- Perceguetti EIP, Chiocchetti GDE, Baptista DP, Gigante ML, Macedo JA. Does milk prevent or promote inflammation? Insights from *in vitro* assays. *Food Bioscience* 2024; 57
- Perrin PJ, Davis TA, Smoot DS, Abe R, June CH, Lee KP. Mitogenic stimulation of T cells reveals differing contributions for B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulation. *Immunology* 1997; 90: 534-42.

- Pierzchalski A, Zenclussen AC, Herberth G. A comprehensive battery of flow cytometric immunoassays for the in vitro testing of chemical effects in human blood cells. *Front Immunol* 2023; 14: 1327960.
- Pinheiro-Machado E, de Haan BJ, Engelse MA, Smink AM. Secretome Analysis of Human and Rat Pancreatic Islets Co-Cultured with Adipose-Derived Stromal Cells Reveals a Signature with Enhanced Regenerative Capacities. *Cells* 2025; 14
- Pratelli G, Tamburini B, Badami GD, Lo Pizzo M, De Blasio A, Carlisi D, Di Liberto D. Cow's Milk: A Benefit for Human Health? Omics Tools and Precision Nutrition for Lactose Intolerance Management. *Nutrients* 2024; 16
- Py BF, Kim MS, Vakifahmetoglu-Norberg H, Yuan J. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Mol Cell* 2013; 49: 331-8.
- Raaphorst H, Loughheed S, Saou L, van Kleef ND, Rensink I, Ten Brinke A, Freen-van Heeren JJ, Turksma AW. Exploring the dynamics of T-cell responses: a combined approach using EdU incorporation and proliferation dye dilution assay. *Immunol Cell Biol* 2025; 103: 178-91.
- Rafique AW, Amin I, Asif M, Mansoor S. Genotyping Test Development and Genotyping Survey of Pakistani population of Holstein Friesian imported from Different Origins for A1/A2 SNP in Beta-casein Gene. 2019;
- Rajamanickam V, Desouza CV, Castillo RT, Saraswathi V. Blocking Thromboxane-Prostanoid Receptor Signaling Attenuates Lipopolysaccharide- and Stearic Acid-Induced Inflammatory Response in Human PBMCs. *Cells* 2024; 13
- Ramakrishnan M, Zhou X, Dydak U, Savaiano DA. Gastric Emptying of New-World Milk Containing A1 and A2 Beta-Casein Is More Rapid as Compared to Milk Containing Only A2 Beta-Casein in Lactose Maldigesters: A Randomized, Cross-Over Trial Using Magnetic Resonance Imaging. *Nutrients* 2023; 15
- Reinhardt TA, Lippolis JD. Bovine milk fat globule membrane proteome. *J Dairy Res* 2006; 73: 406-16.
- Repetto O, Vettori R, Steffan A, Cannizzaro R, De Re V. Circulating Proteins as Diagnostic Markers in Gastric Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2023; 24
- Roach TG, Lang HKM, Xiong W, Ryhanen SJ, Capelluto DGS. Protein Trafficking or Cell Signaling: A Dilemma for the Adaptor Protein TOM1. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 643769.
- Roszczyk A, Zych M, Soldacki D, Zagozdzon R, Kniotek MJ. Reference values of lymphocyte subsets from healthy Polish adults. *Cent Eur J Immunol* 2024; 49: 26-36.
- Rozanova S, Barkovits K, Nikolov M, Schmidt C, Urlaub H, Marcus K. Quantitative Mass Spectrometry-Based Proteomics: An Overview. *Methods Mol Biol* 2021; 2228: 85-116.
- Sahin Ö, Boztepe S. Assessment of A1 and A2 variants in the CNS2 gene of some cattle breeds by using ACRS-PCR method. *Animal Biotechnology* 2023; 34: 1505-13.
- Sebastiani C, Arcangeli C, Ciullo M, Torricelli M, Cinti G, Fisichella S, Biagetti M. Frequencies Evaluation of beta-Casein Gene Polymorphisms in Dairy Cows Reared in Central Italy. *Animals (Basel)* 2020; 10
- Seet LF, Liu N, Hanson BJ, Hong W. Endofin recruits TOM1 to endosomes. *J Biol Chem* 2004; 279: 4670-9.
- Seggewiss R, Lore K, Greiner E, Magnusson MK, Price DA, Douek DC, Dunbar CE, Wiestner A. Imatinib inhibits T-cell receptor-mediated T-cell proliferation and activation in a dose-dependent manner. *Blood* 2005; 105: 2473-9.
- Sen P, Kempainen E, Oresic M. Perspectives on Systems Modeling of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2018; 4
- Shin J, Rhim J, Kwon Y, Choi SY, Shin S, Ha CW, Lee C. Comparative analysis of differentially secreted proteins in serum-free and serum-containing media by using BONCAT and pulsed SILAC. *Sci Rep* 2019; 9: 3096.
- Shuken SR. An Introduction to Mass Spectrometry-Based Proteomics. *J Proteome Res* 2023; 22: 2151-71.

- Sinha A, Mann M. A beginner's guide to massspectrometry-based proteomics. *Biochem (Lond)* 2020; 42
- Skinner BM, Johnson EEP. Nuclear morphologies: their diversity and functional relevance. *Chromosoma* 2017; 126: 195-212.
- Smith BJ, Martins-de-Souza D, Fioramonte M. A Guide to Mass Spectrometry-Based Quantitative Proteomics. *Pre-Clinical Models* 2019; 1916: 3-39.
- Stastna M. Advances in separation and identification of biologically important milk proteins and peptides. *Electrophoresis* 2024; 45: 101-19.
- Stevenson HC, Miller PJ, Waxdal MJ, Haynes BF, Thomas CA, Fauci AS. Interaction of pokeweed mitogen with monocytes in the activation of human lymphocytes. *Immunology* 1983; 49: 633-40.
- Sun LA, Su YH, Jiao AJ, Wang X, Zhang BJ. T cells in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2023; 8
- Sun T, Xie R, He H, Xie Q, Zhao X, Kang G, Cheng C, Yin W, Cong J, Li J, Wang X. Kynurenic acid ameliorates NLRP3 inflammasome activation by blocking calcium mobilization via GPR35. *Front Immunol* 2022; 13: 1019365.
- Sutantawong S, Kim BJ, Qu Y, Dallas DC. Survival of intact bovine whey proteins across in vivo and simulated static in vitro models of the adult gastrointestinal tract. *Food Chem* 2025; 465: 142013.
- Takaesu G, Ninomiya-Tsuji J, Kishida S, Li X, Stark GR, Matsumoto K. Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 2475-84.
- Tang TK, Leto TL, Correias I, Alonso MA, Marchesi VT, Benz EJ, Jr. Selective expression of an erythroid-specific isoform of protein 4.1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 3713-7.
- Tapia-Calle G, Born PA, Koutsoumpli G, Gonzalez-Rodriguez MI, Hinrichs WLJ, Huckriede ALW. A PBMC-Based System to Assess Human T Cell Responses to Influenza Vaccine Candidates In Vitro. *Vaccines* 2019; 7
- Threadgill DW, Womack JE. Genomic Analysis of the Major Bovine-Milk Protein Genes. *Nucleic Acids Research* 1990; 18: 6935-42.
- Torre PM, Oliver SP. Suppression of Mitogenic Response of Peripheral-Blood Mononuclear-Cells by Bovine Mammary Secretions. *Journal of Dairy Science* 1989; 72: 219-27.
- Tumbarello DA, Waxse BJ, Arden SD, Bright NA, Kendrick-Jones J, Buss F. Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nature Cell Biology* 2012; 14: 1024-35.
- Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, Mann M, Cox J. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods* 2016; 13: 731-40.
- Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, Zwahlen M, Kampf C, Wester K, Hober S, Wernerus H, Bjorling L, Ponten F. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 1248-50.
- Ul Haq MR, Kapila R, Sharma R, Saliganti V, Kapila S. Comparative evaluation of cow beta-casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse gut. *Eur J Nutr* 2014; 53: 1039-49.
- UniProt C. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Res* 2025; 53: D609-D17.
- Valentine MA, Tsoukas CD, Rhodes G, Vaughan JH, Carson DA. Phytohemagglutinin binds to the 20-kDa molecule of the T3 complex. *Eur J Immunol* 1985; 15: 851-4.
- van Lieshout GAA, Lambers TT, Bragt MCE, Hettinga KA. How processing may affect milk protein digestion and overall physiological outcomes: A systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2020; 60: 2422-45.
- Vaure C, Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol* 2014; 5: 316.

- Veshkini A, Hammon HM, Vogel L, Viala D, Delosi re M, Tr scher A, D jean S, Ceciliani F, Sauerwein H, Bonnet M. The skimmed milk proteome of dairy cows is affected by the stage of lactation and by supplementation with polyunsaturated fatty acids. *Scientific Reports* 2024; 14
- Vir g D, Schlosser G, Borb ly A, Gell n G, Papp D, Kaleta Z, Dalmadi-Kiss B, Antal I, Lud nyi K. A Mass Spectrometry Strategy for Protein Quantification Based on the Differential Alkylation of Cysteines Using Iodoacetamide and Acrylamide. *International Journal of Molecular Sciences* 2024; 25
- Wang F, Ding M, Li R, Wang K, Zhao X, Li X, Li Z, Guo S, Deng L, Li J. Determination of A1 and A2 beta-casein in cow milk by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Dairy Sci* 2025; 108: 5361-71.
- Wang X, Yu Z, Zhao X, Han R, Huang D, Yang Y, Cheng G. Comparative proteomic characterization of bovine milk containing beta-casein variants A1A1 and A2A2, and their heterozygote A1A2. *J Sci Food Agric* 2021; 101: 718-25.
- Warshaw AL, Walker WA, Isselbacher KJ. Protein uptake by the intestine: evidence for absorption of intact macromolecules. *Gastroenterology* 1974; 66: 987-92.
- Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal* 2010; 3: cm1.
- Weber M, Hehn F, Huynh Y, Remkes A, Strunz-Lehner C, Hauser I, Hollunder S, Sharma S, Contento S, Mansmann U, von Mutius E, Ege MJ. Prevention of allergies and infections by minimally processed milk in infants-The MARTHA feasibility and safety trial. *Pediatr Allergy Immunol* 2024; 35: e14251.
- Weiss A, Shields R, Newton M, Manger B, Imboden J. Ligand-receptor interactions required for commitment to the activation of the interleukin 2 gene. *J Immunol* 1987; 138: 2169-76.
- Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997; 7: 837-47.
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1996; 13: 19-50.
- Wirthgen E, Hoeflich A, Rebl A, Gunther J. Kynurenic Acid: The Janus-Faced Role of an Immunomodulatory Tryptophan Metabolite and Its Link to Pathological Conditions. *Front Immunol* 2017; 8: 1957.
- Wisniewski JR, Zielinska DF, Mann M. Comparison of ultrafiltration units for proteomic and N-glycoproteomic analysis by the filter-aided sample preparation method. *Anal Biochem* 2011; 410: 307-9.
- Xu H, Liew LN, Kuo IC, Huang CH, Goh DL, Chua KY. The modulatory effects of lipopolysaccharide-stimulated B cells on differential T-cell polarization. *Immunology* 2008; 125: 218-28.
- Yadav S, Yadav NDS, Gheware A, Kulshreshtha A, Sharma P, Singh VP. Oral Feeding of Cow Milk Containing A1 Variant of beta Casein Induces Pulmonary Inflammation in Male Balb/c Mice. *Sci Rep* 2020; 10: 8053.
- Yamakami M, Yoshimori T, Yokosawa H. Tom1, a VHS domain-containing protein, interacts with tollip, ubiquitin, and clathrin. *J Biol Chem* 2003; 278: 52865-72.
- Yamakami M, Yokosawa H. Tom1 (target of Myb 1) is a novel negative regulator of interleukin-1- and tumor necrosis factor-induced signaling pathways. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 564-6.
- Yamane H, Paul WE. Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunol Rev* 2013; 252: 12-23.
- Yang MX, Yang Z, Everett DW, Gilbert EP, Singh H, Ye AQ. Digestion of food proteins: the role of pepsin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2025;
- Yu P, Li Z, Zhang L, Tagle DA, Cai T. Characterization of kynurenine aminotransferase III, a novel member of a phylogenetically conserved KAT family. *Gene* 2006; 365: 111-8.
- Yu Y, Arora A, Min W, Roifman CM, Grunebaum E. EdU incorporation is an alternative non-radioactive assay to [(3)H]thymidine uptake for in vitro measurement of mice T-cell proliferations. *J Immunol Methods* 2009; 350: 29-35.

- Zhang J, Macartney T, Pegg M, Cohen P. Interleukin-1 and TRAF6-dependent activation of TAK1 in the absence of TAB2 and TAB3. *Biochem J* 2017; 474: 2235-48.
- Zhang X, Song J, Shah BN, Nekhai S, Miasnikova G, Sergueeva A, Prchal JT, Gordeuk VR. Peripheral blood mononuclear cells show prominent gene expression by erythroid progenitors in diseases characterized by heightened erythropoiesis. *Br J Haematol* 2020; 190: e42-e5.
- Zhang XY, Zhang L, Zhou LF, Tao HH, Chen Z. BRCC3 aggravates pulpitis by activating the NF- κ B signaling pathway in dental pulp cells. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 2025a; 1871
- Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek MC, Yates JR, 3rd. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem Rev* 2013; 113: 2343-94.
- Zhang Y, Liang J, Zhang K, Su H, Wang D, Zhang M, Zhao F, Sun Z, Wu Z, Cao G, Zhang Y. The Effect of CDKN1A on the Expression of Genes Related to Milk Protein and Milk Fat Synthesis in Bovine Mammary Epithelial Cells. *Veterinary Sciences* 2025b; 12
- Zhao YW, Wu XH, Zhou ZT, Du GC, Chen J, Liu X. Comparative evaluation of antioxidant activity and protein digestion of plant-based milk from different sources under dynamic in vitro digestion models. *Food Bioscience* 2025; 65
- Zhen D, Liu J, Zhang XD, Song Z. Kynurenic Acid Acts as a Signaling Molecule Regulating Energy Expenditure and Is Closely Associated With Metabolic Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022; 13: 847611.
- Zhou ZT, Luo SJ, Jin YY, Wu XH, Liu X, Chen J. Comparative efficacy of amino acid availability and peptidomic analysis of alternative proteins from different sources under dynamic protein digestion. *Food Hydrocolloids* 2025; 159
- Zhukova JV, Lopatnikova JA, Alshevskaya AA, Sennikov SV. Molecular mechanisms of regulation of IL-1 and its receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2024; 80: 59-71.
- Zou YX, Chen YF, Meng QY, Wang YC, Zhang YL. Cow Milk Fatty Acid and Protein Composition in Different Breeds and Regions in China. *Molecules* 2024; 29

9 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Cornelia A. Deeg bedanken, die mich in diese tolle Arbeitsgruppe aufgenommen hat und es mir ermöglicht hat, in diesem spannenden und hochaktuellen Forschungsgebiet zu promovieren. Besonders möchte ich mich für Ihre Unterstützung und Erreichbarkeit zu jeder Tages- und Nachtzeit sowie die hilfreichen Gespräche und Kommentare bedanken. Dieses außergewöhnliche Engagement ist keineswegs selbstverständlich und ich weiß dies sehr zu schätzen.

Ich bedanke mich zudem herzlich bei Dr. Stefanie Hauck, unter deren Leitung die proteomische Analyse durchgeführt wurde, sowie bei Dr. Christine von Törne für ihre fachliche Unterstützung bei jeglichen proteomischen Fragestellungen. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Armin Scholz und den Mitarbeitern des Lehr- und Versuchsguts Oberschleißheim für die Milchproben bedanken.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an meine ehemaligen und aktuellen Kolleginnen und Kollegen der AG Deeg richten, auf die ich mich jeden Tag gefreut habe und die jeden Arbeitstag schöner gemacht haben: Dr. Adrian Schmalen, Dr. Amelie Fleischer, Dr. Anne Hoffmann, Barbara Riedel, Carolin Sprenzel, Dr. Felix Gard, Dr. Heidi Duda, Ismini Christofi, Jana Schreff, Jasmin Wassmann, Dr. Kristina Kleinwort, Lia Antczak, Dr. Marie Schilloks, Dr. Ronja Söth, Dr. Roxane Degroote, Sabrina Albinger, Salome Fischer und Dr. Ulrich Wilk. Ohne euch hätte ich diesen Weg nicht auf dieselbe Art gemeistert. Vielen Dank für die schöne Zeit – sowohl in der Arbeit als auch außerhalb!

Besonders danken möchte ich Krissi, an dich konnte ich mich mit jeder Frage zu jeder Zeit wenden und du hattest während der Schreibzeit immer einen guten Rat für mich. Danke für deinen fachlichen und dabei manchmal auch emotionalen Support! Vielen Dank auch an Adrian und Roxy, ihr hattet immer ein offenes Ohr für mich und habt mich bei allen Fragen unterstützt. Ein ganz besonderer Dank gilt Felix, du hast mir dein ganzes Wissen weitergegeben und im Labor war es immer fantastisch. Insbesondere Caro möchte ich danken! Du hast mit mir nicht nur das Büro geteilt, sondern auch all die Höhen und Tiefen während der Promotions- und vor allem Schreibzeit, was uns

sehr zusammengeschweißt hat. Vielen Dank, dass du immer für mich da warst und wir auch außerhalb der Arbeit immer eine lustige Zeit zusammen hatten. Ich werde die Zeit mit dir im Büro und den gelegentlichen Besuchen von Ulf sehr vermissen! Auch bei Uli, der immer eine Lösung für jedes technische Probleme parat hatte, sowie bei Jana, Jasmin, Lia und Salome, die hervorragende Korrekturleserinnen waren, möchte ich mich herzlich bedanken.

Ein großes Dankeschön gilt auch den ehemaligen und aktuellen TAs Bärbl Amann, Jonas Liedl, Lydia Hoffmann, Mirjam Telorac, Stefanie Püls, Tanja Weißer und Ursula Cramer, die mich immer mit großem Engagement unterstützt haben und mir mit ihrem Labor-Wissen zur Seite standen. Ganz besonders möchte ich dabei Tanja danken, du warst mir die gesamte Promotionszeit über eine riesige Hilfe und ich werde die unendlichen Pipettier-Partys in der S2 wirklich vermissen!

Ein großer Dank geht auch an meine Familie und Freunde. Besonders bedanken möchte ich mich bei Valentin, du warst immer für mich da und hast mich unterstützt, wo du konntest. Danke, dass du diese anstrengende Zeit mit mir durchgestanden hast, mir dabei immer gesagt hast wie stolz du auf mich bist und immer das Gute gesehen hast. Auch meiner Oma Dodo möchte ich herzlich danken, die mich während des gesamten Studiums und der Promotion unterstützt und bestärkt hat und in jeder schwierigen Phase mit mir gelitten hat.

Ganz besonders möchte ich schließlich meinen Eltern danken, ihr habt mir immer alle Möglichkeiten offengehalten, mir sowohl das Studium als auch die Promotion ermöglicht und wart mir dabei die größte Unterstützung – jederzeit und bedingungslos. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt, auch wenn ich es manchmal selbst nicht konnte, und ihr immer für mich da seid. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen und ich weiß dies sehr zu schätzen. Vielen Dank!