

Afslutningsrapport

Proteiner i fedtkuglemembranen II
Mejeribrugets ForskningsFond
Rapport nr. 2000-31

Maj 2000



mejeriforeningen
danish dairy board

**Afslutningsrapport til Mejeribrugets ForskningsFond
for FØTEK 2 projektet:**

Proteiner i fedtkuglemembranen II

Jan Trige Rasmussen
Torben Ellebæk Petersen

Laboratorium for Proteinkemi
Institut for Molekylær og Strukturel Biologi
Aarhus Universitet
Maj 2000

Projektleder og øvrige medarbejdere

Torben Ellebæk Petersen, lektor, lic. scient., (projektleder),
Jan Trige Rasmussen, forskningslektor, Ph.D., cand. scient (daglig leder),
Lars Berglund, forskningslektor, Ph.D., cand. scient. (indtil 31.03.98),
Mikkel Holmen Andersen, Ph.D. stud., cand. scient,
Rune Lehmann Nielsen, stud. scient.(start efterår 97),
Lone Tjener Pallesen, stud. scient.(start efterår 99),
Margit Skriver Rasmussen, laboratorietechniker (indtil 31.12.96),
Marian Dyrberg Andersen, laboratorietechniker,
Mitra Shamsali, praktikant og laborant (indtil 31.12.97),
Parisa Mabhout, praktikant og laborant (01.09 97 - 30.11.99),

Adresse og telefon:

Laboratorium for Proteinkemi
Aarhus Universitet
Gustav Wieds Vej 10C, 3.2
8000 Århus C

Tel: 89 42 50 94 Fax: 86 13 65 97

E-mail adresser:

Torben Ellebæk Petersen: tep@mbio.aau.dk
Jan Trige Rasmussen: trige@imsb.au.dk

Resumé

Fedt i mælk findes i form af fedtkugler, der er omgivet af en membran kaldet fedtkuglemembranen (MFGM). Fedtet syntetiseres centralt i mælkekirtelcellerne, hvor der frigives små fedtdråber til cytoplasmaet omgivet af et enkelt lag af fosfolipider. Dråberne fusionerer og bliver større på deres vej mod plasmamembranen, og umiddelbart inden udskillelsen dannes der et proteindæklag omkring fedtdråberne. Derefter frigives den færdige fedtkugle i en afsnøret del af cellens membran. Fedtkuglens overflade er derfor stort set identisk med den apikale plasmamembran på de mælkproducerende celler hvorfra de secernerer. Fedtkuglen består altså inderst af fedt omkranset af en enkeltlaget fosfolipidmembran, et dæklag af protein, en dobbeltlaget fosfolipidmembran, og yderst et lag af kulhydrat. Til dette membransystem er knyttet ukendt antal proteiner, fedtkuglemembranproteiner

Proteinerne i fedtkuglemembranen udgør kun ca. 1% af mælkens protein, men det til trods har de stor betydning for membranens integritet og derved afgørende indflydelse på mælkens egenskaber. Fedtkuglemembranens vigtigste opgave er selvfølgelig at holde mælkens fedt i opløsning. Vil man opnå en dybere forståelse af fedtkuglemembranens betydning og funktioner kræver det endvidere et indgående kendskab til membranens proteiner. I den forbindelse kan sammenligning med andre proteiner bringes os nærmere en opklaring af en eventuel funktion.

Af historiske grunde har proteinerne i fedtkuglemembranen fået navn efter deres størrelse og indhold af kulhydrat, vurderet ud fra analyse i elektroforese-geler. Det giver imidlertid ikke en fyldestgørende beskrivelse, idet proteinerne kan være kendt i anden sammenhæng. Det kunne være fra andet væv end mælkekirtlen eller sågar fra et andre dyr. Kendskab til proteinernes aminosyresekvens giver mulighed for på uimodsigelig vis at fastslå præcist hvilket protein man har at gøre med. Således har resultaterne opnået under FØTEK projektet medvirket til, at der kunne blive ryddet op i det vivar af navne, der gennem tiden er blevet foreslået for de selv samme proteiner.

Proteinerne fra fedtkuglemembranen kan opdeles i tre hovedgrupper: 1) Perifere løst associerede proteiner, 2) integrale membrangennemskærende proteiner og 3) proteiner stammende fra dæklaget. Vi har under dette projekt lavet studier på seks af de mest dominerende fedtkuglemembranproteiner; lactadherin (PAS 6/7) fra den første gruppe, MUC1, PAS 3 og CD36 fra anden gruppe samt xanthinoxidoreduktase og adipophilin fra den sidste gruppe af proteiner. proteiners struktur, samt

Indtil nu er der etableret oprensingsmetoder for alle seks proteiner, og ud fra de korresponderende cDNA er deres komplette aminosyresekvens bestemt (undtagen for PAS 3). Dertil kommer data, der til en hvis udstrækning beskriver proteinernes sekundære modification (glykosyleringer) og disulfidbroer. Endelig, beskriver studierne interessante aspekter af deres fysisk-kemiske egenskaber og mulige biologiske funktion, specielt hvad angår xanthinoxidoreduktase og lactadherin.

Summary

The fat droplets in milk are surrounded by a membrane generally called the milk fat globule membrane (MFGM). The membrane system arises during the process where intracellular lipid droplets are enveloped as they bud off from the apical membrane and are released into the milk. Proteins from MFGM constitute about 1% of all the protein in milk and are important for the integrity of the membrane.

Historically, the MFGM proteins have been named according to their mobility in SDS-PAGE gels and ability to be stained with either Coomassie blue and periodic acid/Schiff's reagent (PAS). However, in the literature this has led to misconceptions and problems of identity due to the use of different nomenclature for the same proteins. Availability of sequence data will enable an unambiguous identification of the specific proteins and they can be assigned more appropriate names. We have in this project been engaged in characterizing six of the major MFGM proteins, using a biochemical approach and molecular cloning techniques. The results acquired during this project might in future enable a more exact identification and description of MFGM proteins under study.

Bovine MFGM proteins can be divided into three categories: 1) Peripheral associated proteins, 2) integral membrane spanning proteins, and 3) proteins assigned to the electron dense coat material inside the phospholipid bilayer. Investigation has been performed on lactadherin (PAS-6/7) belonging to the first group of proteins, MUC1, PAS 3 and CD36 from the second group, and finally the coat proteins xanthine oxidoreductase and adipophilin.

So far there have been established purification methods for all six proteins together with deduction of the complete amino acid sequence from the corresponding cDNA's (except for PAS-3). Peptide mapping has given an ample amount of confirmatory evidence to the derived amino acid sequences. To some extent, data has been generated describing secondary modifications (glycosylations) along with disulfide bridge patterns. Finally, interesting aspects concerning physiological function and physicochemical properties have been dealt with, especially in relation to lactadherin and xanthine oxidoreductase.

Projektets hovedformål

Isolere, karakterisere og beskrive de proteiner, der findes i fedtkuglernes membran i bovin mælk. Det endelige mål vil være at opnå en detaljeret model for opbygningen af membranen, og at få en forståelse af membranproteinernes funktion i mælk. Det forventes, at projektet vil tilvejebringe ny viden om mælkenes proteiner, som vil kunne bidrage til øget forståelse af mælkenes mejeriteknologiske og ernæringsmæssige egenskaber samt skabe grundlag for produktion af nye produkter, der har mælk som basismaterialer.

Projektets forløb, resultater og kommentarer

Xanthinoxidoreduktase (XOD):

Analysen af cystein-interaktioner

Mammal XOD kan forekomme i to forskellige former. Intracellulært befinder enzymet sig som oftest på en dehydrogenaseform, hvor NAD⁺ er elektronacceptor, mens det udenfor dette reducerende miljø transformeres til en oxidaseform med molekylært ilt som elektronacceptor. Denne transformation finder også sted i mælken i den periode, der går fra fedtkuglen afsnøres til mælken benyttes. Faktisk er langt den overvejende del på oxidaseform allerede lige efter malkning. Vekselvirkningen mellem de to former kan kontrolleres med reaktive svovlforbindelse, hvilket antyder at der dannes eller ophæves disulfidbroer under processen.

De pågående studier har haft til formål at afdække dele af mekanismen bag denne omlejring, og eventuelt udpege nogle af de involverede cysteiner. Det viste sig muligt ved brug af reduktionsmidlet DTE, at genskabe dehydrogenaseaktivitet og efterfølgende opmærke de mest reaktive cysteiner. De teoretiske overvejelser og faktiske data har udmøntet sig i to arbejder (Rasmussen *et al.*, 1996 og Rasmussen *et al.*, 2000).

Interaktion med andre proteiner

For at undersøge eventuelle interaktioner/bindinger mellem XOD og først og fremmest butyrophilin, men også PAS 6/7 og CD36, blev der i første omgang lavet bindingsforsøg i mikrotitterbakker. Senere blev der udført eksperimenter med kemisk krydsbinding af proteinerne i fedtkuglemembranen (MFGM).

Andre har tidligere foreslået, at der skulle være interaktion mellem XOD og butyrophilin. Derfor var det intentionen at se om dette kunne verificeres i et immunoassay i mikrotitterbakker. De første forsøg tegnede lovende, men det viste sig senere, at det med denne teknik ikke var muligt at vise binding/interaktion mellem XOD og butyrophilin, ej heller til oprenset PAS 6/7 eller CD36.

Det næste skridt blev at se på, om bestemte proteiner ville kunne krydsbindes til XOD ved brug af en kemisk crosslinker. Hertil blev benyttet tre sæt udgangsmaterialer: a) Krydsbundet total fedtkuglemembran protein og isoleret materiale vha. anti-XOD søjle; b) krydsbundet oprenset XOD; og c) ikke krydsbundet XOD. Alle tre prøver blev efterfølgende reduceret, alkyleret og fordøjet med trypsin, for til sidst at analysere og sammenligne de fremkomne

peptider. Det var imidlertid ikke muligt at se nogen forskel på de 3 typer af krydsbundet materiale, hvilket viser, at der ved brug af denne metode ikke kunne vises interaktion mellem XOD og andre MFGM proteiner.

Strukturoptklaring ved røntgenkrystallografi

På trods af anvendelse af meget rene præparationer af XOD, var det ikke muligt at producere tilstrækkeligt ensartede krystaller af enzymet. Der blev endda forsøgt med en fraktion indeholdende et kompleks mellem XOD og en inhibitor, hvilket sommetider faciliterer dannelse af krystaller.

Plasmins betydning for enzymaktiviteten

Et pilotprojekt med nedbrydning af XOD med plasmin er udført som tidsstudie med efterfølgende monitorering via SDS-PAGE. Dette første eksperiment med fordøjelse af XOD med plasmin viser, at enzymet hurtigt nedbrydes fra et 150 kDa bånd til et ca 130 og et ca 20 kDa bånd. Efter 24 timer er der ikke mere af båndet ved 150 kDa. Dermed er proteinet ikke resistent overfor plasmin. Hvilken betydning plasmin dermed havde for aktiviteten, blev ikke undersøgt. Det er dog forventeligt, at fragmenteringen som følge af plasminaktivitet vil betyde, at enzymet fastholdes på sin oxidaseform, men at enzymet stadig er aktivt, eftersom det ikke nedbrydes totalt.

Karakterisering af sekundære modifikationer

Det har været foreslået, at XOD (samt CD36 og adipophilin) er acylerede med fedtsyrer, og at det har indflydelse på bindingen til membranen. Indledningsvis forsøgte vi om der kunne detekteres fedtsyrer direkte på oprenset XOD, CD36 og PAS 6/7 vha. basisk hydrolyse, ekstraktion og analyse på gaskromatograf. Det gav desværre ikke noget resultat. Konklusionen af det hidtidige arbejde er, at de tilgængelige metoder til undersøgelse af acyleringssites på proteiner ikke er tilstrækkelige. Det er derfor nødvendigt at udvikle nye metoder for dette, hvilket imidlertid er meget tidskrævende. Udviklingsarbejdet er påbegyndt, og den nuværende status for dette vil fremgå af Rune L. Niensens specialrapport.

Analyse af enzymet i mælkefraktioner

Det blev vurderet at XOD aktiviteten i mælk, mælkefraktioner og produkter i øvrigt var ganske godt undersøgt jvf. flg. publikationer: Kitchen *et al.*, J. Dairy Res. 37: 279-288, Zikakis & Wooters, J. Dairy Sci. 63: 893-904, og Girotti *et al.*, Analytical Lett. 29: 2097-2114.

Fysisk-kemiske egenskaber

I samarbejde med D. Kristensen (KVL) samt T. Nylander, M. Paulsson og A. Carlsson (alle Lund Universitet), er der blevet foretaget omfattende fysisk-kemiske studier af XOD's opførsel, specielt overfor fosfolipid i luft/vand overgangsfasen. Arbejdet resulterede i to arbejder (Krisensen *et al.*, 1996 og Kristensen *et al.*, 1998)

Ekspresion af XOD og fraktement heraf

Fragmenter af cDNA'en for XOD, der koder for domæne 1 og 2 blev syntetiseret med PCR-teknik, således at de kunne indsættes i den nye vektor pPICZ α -LB4. Gærkloner blev frembragt med henholdsvis XOD-domæne 1 og XOD-domæne 2 indsat i AOX1 genet. Dette gen er involveret i forbrænding af alkohol og kan induceres med methanol. Klonerne blev anvendt i en række fermenteringsforsøg under varierende betingelser, og det lykkedes at identificere et protein på et Western-blot, som reagerer med anti-XOD.

Konstruktionen af de forskellige kloner er et led i et samarbejde med Russ Hill, University of Medical Center, Ohio State University, der forsøger at give en mere detaljeret beskrivelse af de elektrontransporterende centre i XOD.

PAS 6/7 (lactadherin):

Analyse af glykosyleringer i hhv. PAS 6 og 7

Sammensætningen af kulhydratet fra de enkelte glykosyleringer på PAS-6 og 7 blev bestemt. Sammen med massespektrometriske analyser var det således muligt at foreslå hvilken type af kulhydratstruktur der er tale om. Resultaterne er offentliggjort (Hvaaregaard *et al.*, 1996).

Vævsfordeling

Reproducerbare immunologiske tests (Western blots) af PAS 6/7's tilstedeværelse i en lang række væv blev foretaget. Resultaterne viste, at PAS 6/7 findes i mange forskellige væv, med undtagelse af blod. Denne store udbredelse af PAS 6/7 antyder en mere generel funktion, som ikke udelukkende findes henlagt til mælkekirtelvæv. Resultaterne er offentliggjort (Hvaaregaard *et al.*, 1996).

Immunohistokemiske data vedrørende PAS 6/7 i lakterende væv viser, at proteinet primært findes ved epitelvævets apikale membran, og i mælken associeret med fedtkugler. Herved bekræftes antagelserne baseret på de strukturelle data. I øvrigt henvises til Mikkel H. Andersens specialrapport, hvori disse undersøgelser er nøjere beskrevet.

Analyse af interaktionen med membranen og eventuelt andre proteiner

PAS 6/7 kan binde til fosfolipider og til $\alpha_v\beta_5$ -integrinen:

Ved affinitetskromatografi har vi analyseret om der skulle findes en receptor for PAS 6/7 i yvervæv. Det var rent faktisk tilfældet, og det viste sig at være en $\alpha_v\beta_5$ -integrin-receptor. Omfattende studier er foretaget af PAS 6/7's binding til lipider og til $\alpha_v\beta_5$ -integrinen. Ved brug af et "solid phase ligand binding" assay er det lykkedes at demonstrere at bindingen mellem PAS 6/7 og $\alpha_v\beta_5$ -integrinen er afhængig af en lille tri-peptid sekvens arg-gly-asp (RGD). Desuden har vi vist, at PAS 6/7 binder til en overflade coated med negativt ladede fosfolipider. Allerbedst binder PAS 6/7 dog til lipid udvundet fra MFGM. Således er det vist, at PAS 6/7 er et protein, der optræder i flere væv, og at det kan binde til membraner vha. to forskellige mekanismer, 1) via en integrin og 2) via direkte fosfolipidinteraktion. Resultaterne er offentliggjort (Andersen *et al.*, 1997).

Kloning af den bovine $\alpha_v\beta_5$ -integrin receptor:

For præcist at kunne beskrive bindingen mellem PAS 6/7 og $\alpha_v\beta_5$ -integrin receptoren, er der gjort forsøg på at finde receptorens korresponderende cDNA i fire forskellige bovine biblioteker. Det er også lykkedes og resultaterne søges publiceret i løbet af år 2000. (Andersen, 2000).

Annexin V:

Det har vist sig, at et 35 kDa protein "følger med" når $\alpha_v\beta_5$ -integrinen oprenses vha. en PAS 6/7-affinitetssøjle. Det ligger nu fast at dette 35 kDa protein er identificeret som annexin V. Annexin V tilhører en familie af calcium- og fosfolipidbindende proteiner, som findes i en hel række celler og vævstyper. Det er et cytosolisk protein. Man kender ikke den fuldstændige funktion af annexin V, men det har været rapporteret at det skulle være involveret i membrantransport under exo- og endocytose. Det har også været foreslået, at det skulle deltage i regulation af ion-kanaler og inhibere blodkoagulation. Interaktionen mellem PAS 6/7, $\alpha_v\beta_5$ -integrinen og annexin V er et hidtil ubeskrevet fænomen.

Andre udførte eksperimenter viser, at annexinen binder til integrinen og ikke til PAS 6/7. Hermed er deres indbyrdes "roller" fordelt. Det er vist i et ligandblot, at annexin-V kan binde til β_5 subuniten af integrinen. Kun fosforylerede β_5 -fragmenter binder til annexin-V, hvilket muligvis har regulatorisk betydning i cellen. Resultaterne vedrørende annexin-V søges offentliggjort (Andersen *et. al.*, 2000b)

Funktionel analyse PAS 6/7's to bindingssite:

I forbindelse med studier af hvorledes PAS-6/7 bindes til fosfolipidmembraner, har vi undersøgt bindingen af PAS 6/7-fragmenter. Der er tale om domænerne C1C2 og C2 alene, begge fragmenter er fremstillet ved rekombinant ekspression. Resultaterne viser, at PAS-6/7 er bundet til membranen af fedt-kuglen via den C-terminale del af C2-domænet. Dette var før kun en antagelse.

Det har tidligere været vist at den humane homolog til PAS 6/7 interagerer med $\alpha_v\beta_5$ -integrinen, og vi har jo selv set binding af bovine PAS 6/7 til $\alpha_v\beta_5$ -integrinen. Vi har derfor undersøgt den præcise bindingspecificitet af bovin PAS 6/7. Til dette formål har vi benyttet et cellebindings-assay med forskellige celler, der udtrykker forskellige integriner. Resultaterne viser, at bovin PAS 6/7 er i stand til at binde til både $\alpha_v\beta_3$ - og $\alpha_v\beta_5$ -integriner. Vævsfordelingen af $\alpha_v\beta_5$ -integrinen har imidlertid samme profil som PAS 6/7, hvorfor det er sandsynligt, at interaktionen mellem netop disse to proteiner har størst fysiologisk signifikans. Resultaterne med analyse af de to bindingssites er offentliggjort (Andersen *et al.*, 2000a).

Krydsbindingsstudier:

På lignende vis, som beskrevet for XOD, blev der lavet forsøg med kemisk krydsbinding og PAS 6/7. Det blev gjort for på denne måde at se om PAS 6/7 interagerer med andre fedtkuglemembranproteiner. Krydsbindingsstudier viste, at PAS-6/7 krydsbinder til sig selv i meget svag grad, men det var ikke muligt med denne teknik at se association til andre partnere/proteiner fra fedtkugle-membranen (Andersen, 2000).

Disulfid-broer

Det samlede disulfidbromønster for PAS 6/7 er endeligt afklaret, og resultaterne er gengivet i en artikel (Hvaaregaard *et al.*, 1996), som i øvrigt beskriver de samlede strukturelle data opnået for PAS 6/7.

CD36 (PAS 4)

Isolation og indledende karakterisering

Etablering af en oprensingsmetode for bovin CD36/PAS-4 er opnået. Den involverer benyttelse af Triton X-114 til adskillelse af integrale og opløselige proteiner. Efterfølgende benyttes ionbytning og reverse phase kromatografi. Processen er gennem flere oprensninger blevet raffineret, så der kan oprensnes 4-6 mg fra 24 l mælk.

Bestemmelse af proteinets aminosyresekvens

Den isolerede fuldlængde CD36 cDNA koder for et protein på 472 aminosyrer. Sekventering af N-terminalen af proteinet viser at start-methioninen ikke findes på det modne protein. Aminosyresekventering af peptider fra kløvning af PAS-4 viste ingen afvigelser fra den translaterede cDNA sekvens, således er 43% af proteinet blevet sekventeret på proteinniveau. Det modne protein har 471 aminosyrerester og stor lighed (ca. 80 % identitet) med aminosyresekvensen fra human CD36.

Northern blot-analysen viste, at mRNA'en for bovin CD36 var på ca. 2800 nukleotider, hvilket viser, at den isolerede cDNA på 2772 nukleotider repræsenterer hele eller det meste af CD36 transkriptet. Intensiteten af det hybridiserende bånd var svagt, hvilket viser, at der ikke er den store ekspression af CD36 genet.

Aminosyresekvensen viste, at der er 8 potentielle N-glykosylerings-sites. Biokemiske analyser viste, at de alle er glykosyleret (se understående).

Analyse af glykosyleringer, disulfidbroer og interaktion med fedtkuglemembranen

Analyse af kulhydratet fra oprensede glykopeptider angiver, at bovin CD36 indeholder alle tre typer N-bundne kulhydrat-komplekser (også kaldet glykaner), komplekse-, hybride- og high mannose glykaner. Der optræder formodentlig også flere slags på samme site. Desuden ses det, at CD36 sandsynligvis har en GalNAc(β 1-4)GlcNAc siddende terminalt i kulhydratet fra 5 sites. Dette er tilsyneladende kendetegnende for N-glykosylerede fedtkuglemembranproteiner.

Analyse af aminosyresekvensen af bovin CD36 viste, at der er to meget hydrofobe områder i proteinet, et nær N-terminalen (6-28) og et nær C-terminalen (439-460). Disse områder er sandsynligvis ansvarlige for bindingen af CD36 til fedtkuglemembranen.

Alle ovenstående resultater omhandlende CD36 er gengivet i artikelform (Berglund *et al.*, 1996).

Med kortlæggelsen af disulfid-bromønsteret i CD36/PAS-4 blev opklaringen af den primære

struktur fuldbragt. Det er således sandsynligt, at fire af CD36's 10 cysteiner er acylerede, som befinder sig på indersiden af membranen. De resterende 6 cysteiner indgår i et I-III, II-VI og IV-V mønster. Dette mønster er ikke helt almindeligt. Disse resultater er udgivet i en artikel, som i øvrigt indeholder en længere diskussion af CD36's strukturelle karakteristika (Rasmussen *et al.*, 1998).

Adipophilin (ADRP)

Oprensning og indledende karakterisering

Vi har identificeret og oprenset adipophilin (ADRP) fra den "detergent uopløselige" fraktion af MFGM. Adipophilin var tidligere kun delvist beskrevet i bovin sammenhæng, mens det er bedre kendt i mus og lidt i menneske. Proteinet er en af de tidligste markører for differentiering af adipocyter. Den biologiske funktion af ADRP er imidlertid ukendt, men proteinet findes altså i MFGM, og i støkiometriske mængder i forhold til XOD og buyrophilin. Det anses derfor for sandsynligt, at disse tre proteiner optræder i en eller anden form for kompleks.

En oprensningsmetode er etableret til analytiske formål. Adipophilin er stort set uopløseligt, men en lidt hårdhændet behandling (10% SDS og 10 mM DTE ved 70°C i 4 timer) kan bringe det i opløsning. Herefter kan det isoleres på reverse-phase HPLC. Det oprensede protein blev fordøjet, og fra oprensede peptid-fraktioner er fremkommet information om ca. 30% af hele proteinets sekvens. Fra denne viden om dele af proteinets sekvens er det lykkedes at finde frem til en fuldlængde cDNA klon, hvorfra proteinets samlede aminosyresekvens kan deduceres. Den består af 1841 nukleotider, hvilket giver ophav til et protein på 470 aminosyrer. Den fremkomne aminosyresekvens er hhv. 87% og 80% identisk med sekvensen for det tilsvarende protein i menneske og mus.

Adipophilin menes at stamme fra proteincoaten, der befinder sig mellem den indre lipid-kerne og den omkringliggende fosfolipidmembran. Den lipidbindende del af adipophilin kan tænkes at hidrøre fra den N-terminale del af proteinet, idet der i denne region er stor lighed til proteinerne TIP47 og perilipin, som også er fosfolipidbindende. Det er sandsynligt, at adipophilin binder til den indre membran af lipidkernen vha. en amfipatisk α -helix. En artikel omhandlende de opnåede resultater er offentliggjort (Nielsen *et al.*, 1999).

MUC1 (PAS 1)

Oprensning og identifakation

Fedtkuglemembraner fra gnavere, drøvtyggere og primater indeholder alle (næsten) kraftigt glykosylerede mucin-lignende proteiner med høj molekylvægt. De er kendetegnet ved i SDS-geler at kunne farves med PAS-farve, men kun svagt, hvis overhovedet, med Coomassie Brilliant Blue.

Navnet "mucin" kommer af, at denne protein-type udgør en stor del af mucus, det lag som dækker luminale overflader af epitelceller. Overfladen udgør en selektiv barriere mellem det ekstracellulære miljø, plasmamembranen og cellens indre.

Den dominerende bovine mucin har strukturelle ligheder med den humane MUC1 mucin. Derfor er det foreslået, at det bovine protein også kaldes MUC1 i stedet for tidligere anvendte navne, som f.eks. PAS-1.

Vi har med held udviklet en metode til oprensning af bovin MUC1. På en SDS-gel ses MUC1 som et PAS-farvet bånd lige over XOD. Pga. allelisk polymorfi kan det optræde som et diffust bånd ved analyse af mælk fra flere køer, mens det ses som diskrete bånd fra individuelle dyr. I den kommercielle pool af mælk, som vi arbejder med, ses det som to tydelige bånd i området 160-180 kDa.

Vi har fået fastslået identiteten på det oprensede protein ved N-terminal sekventering direkte på det oprensede protein. Dertil kommer, at det, omend med besvær, er lykkedes at nedbryde proteinet med proteaser, for derefter at få partiel sekvensinformation fra de genererede peptider.

Bestemmelse af aminosyresekvens

Sekvensen for bovin MUC1 var tidligere kun delvist kendt. Den resterende del (N-terminalen/5'-enden) blev søgt isoleret vha. RT-PCR og PCR direkte på cDNA fra mælkekirtel mRNA. På nuværende tidspunkt er det lykkedes at klonere hele det kodende område. Disse resultater søges sammenfattet i artikelform (Pallesen *et al.*, 2000)

En oversigtsartikel omhandlende bla. MUC1 er under udarbejdelse til Mælkeritidende (Rasmussen & Petersen, 2000)

PAS 3

Oprensning og identifikation

Oprensningsmetoden for MUC1 gav endvidere en anden fraktion indeholdende et relativt rent glykoproteinprotein med mole-kylevægt lidt over 100 kDa. Det formodes at være ækvivalent med PAS-3. Udover at PAS-3 formodentlig også er en mucin vides der utroligt lidt om proteinet.

Ved brug af peptide-mapping og sekventering har vi fundet ca. 10 brudstykker af aminosyresekvensen. Til trods for at sekvenserne fremtræder som meget pålidelige, er det ikke lykkedes at finde korresponderende cDNA. Vi har således ikke fået den totale aminosyresekvens, og det har derfor ikke været muligt at afgøre om der er tale om et totalt ukendt protein, eller en homolog til et kendt fra andre arter. Arbejdet med at beskrive og eventuelt identificere dette "nye" protein kan forhåbentlig fortsættes.

Liste over publikationer

Artikler i internationale tidsskrifter

Andersen, M.H., Berglund, L., Rasmussen, J.T., and Petersen, T.E. (1997). Bovine PAS-6/7 binds $\alpha_V\beta_5$ -integrin and anionic phospholipids through two domains. *Biochemistry* 18, 5441-5446.

Andersen, M.H., Graversen, H., Fedosov, S.N., Petersen, T.E. and Rasmussen, J.T. (2000a) Functional analysis of two cellular binding domains of bovine lactadherin. *Biochemistry*, *in press*.

Berglund, L., Petersen, T.E., and Rasmussen, J.T. (1996). Structural characterization of bovine CD36 from the milk fat globule membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1309, 63-68.

Hvarregaard, J., Andersen, M.H., Berglund, L., Rasmussen, J.T., and Petersen, T.E. (1996). Characterization of glycoprotein PAS-6/7 from membranes of bovine milk fat globules. *Eur. J. Biochem.* 240, 628-636.

Kristensen, D., Nylander, T., Rasmussen, J.T., Paulsson, M., and Carlsson, A. (1996). Bovine milk sphingomyelin at the air/water interface and its interaction with xanthine oxidase. *Langmuir* 12,5856-5862.

Kristensen, D., Nylander, T., Rasmussen, J.T., Paulsson, M., and Birdi, K.S. (1998). Adsorbed and spread films of bovine milk xanthine oxidase at the air-water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 143, 221-231.

Nielsen, R.L., Andersen, M.H., Mabhout, P., Berglund, L., Petersen, T.E., and Rasmussen, J.T. (1999). Isolation of adipophilin and butyrophilin from bovine milk and characterization of a cDNA encoding adipophilin. *J. Dairy Sci.* 82, 2543-2549.

Rasmussen, J.T., Berglund, L., Rasmussen, M.S., and Petersen, T.E. (1998). Assignment of disulfide bridges in bovine CD36. *Eur. J. Biochem.* 257, 488-494.

Rasmussen, J.T., Rasmussen, M.S. and Petersen, T.E. (2000). Cysteines involved in the interconversion between dehydrogenase and oxidase forms of bovine xanthine oxidoreductase. *J. Dairy Sci.* 83, 499-506.

Indlæg ved kongresser, symposier o.l.

Proceedings:

Petersen, T.E., Rasmussen, L.K., Berglund, L., Sørensen, E.S., Rasmussen, J.T., Heegaard, C.W., Fedosov, S.N., Johnsen, L.B., Andersen, M.H., Larsen, L.B., and Benfeldt, C. (1999). Identification and characterization of new milk proteins. In: *Dairy Science and Technology*, pp. 194-199, Proceedings of 25th International Dairy Congress, Aarhus, The Danish National Committee of IDF.

Rasmussen, J.T., Berglund, L., and Petersen, T.E. (1996). Structural characterization of bovine xanthine oxidoreductase from the milk fat globule membrane. In: Flavins and Flavoproteins 1996 (eds. Stevenson, K.J., Massey, V., and Williams Jr., C.H.). pp. 847-850, University of Calgary Press, Calgary, Canada (ISBN 1-895176-94-8).

Konferencer:

25. årsmøde i Dansk Biokemisk Forening (okt. 1996), Fuglsø, DK. (M.H. Andersen & J.T. Rasmussen).

Poster 1: "Identification of two cellular binding domains in bovine PAS-6/7"

Poster 2: "Structural characterization of bovine xanthine oxidoreductase from the milk fat globule membrane".

Levnedmiddelkongres 1997 (jan. 1997), LMC, København, DK. (J.T. Rasmussen).

Poster: "Proteiner i fedtkuglemembranen". Præmieret som bedste poster.

26. årsmøde i Dansk Biokemisk Forening (okt. 1997), Fuglsø, DK. (M.H. Andersen).

Meeting on Molecular Biology of Cellular Inter-actions (nov. 1997), Granada, Spanien. (M.H. Andersen).

Poster: "Bovine PAS-6/7 binds $\alpha_v\beta_5$ -integrin and anionic phospholipids through two domains".

Mejeriforskningsdag 1997 (nov. 1997), Aarhus Universitet, Århus, DK. (L. Berglund, J.T. Rasmussen, T.E. Petersen). Foredrag og poster.

Poster: "Proteiner i fedtkuglemembranen".

Dairy Industry and Gene Manipulated Foods (jan. 1998), Danish Dairy Society Meeting, Brædstrup, DK. (L. Berglund & M.H. Andersen).

Levnedmiddelkongres 1998 (jan. 1998), DTU, København, DK. (T.E. Petersen). Poster.

25th Silver Jubilee FEBS Meeting, København (jul. 1998), DK. (R.L. Nielsen & J.T. Rasmussen).

Poster: "Structural characterization of bovine adipose differentiation-related protein from milk lipid globules".

25th International Dairy Congress (sep. 1998), Aarhus, DK. (J.T. Rasmussen & T.E. Petersen). Foredrag (se proceedings) og poster.

Poster: "Characterization of three major proteins from bovine milk fat globule membrane: Xanthine oxidoreductase, CD36 and PAS-6/7".

28. Årsmøde i Dansk Biokemisk Forening (okt. 1999), Gl. Avernæs, Fyn, DK. (R.L. Nielsen, M.H. Andersen & J.T. Rasmussen).

Poster 1: "Structural characterization of bovine adipose differentiation-related protein from milk lipid globules". Præmieret som bedste poster.

Poster 2: "Functional analysis of the two cellular binding domains of bovine PAS-6/7".

Faglige artikler

Rasmussen, J.T. and Petersen, T.E. (2000) Mulige gavnlige virkninger af kulhydratproteiner fra mælkens fedtkugle-membran. Mælkeritidende, *submitted for publication*.

Anden formidling

Efteruddannelseskursus for Mejeriingeniører mv. (mar. 1997), Dalum Landbrugsskole, Odense, DK. (L. Berglund & J.T. Rasmussen). Foredrag.

Seminar on milk proteins with rep. from Hannah Research Inst. (jan. 1999). (Scotland, UK), organized by Protein Chemistry Laboratory, Forskerparken, Århus, DK.
Foredrag: "Bovine PAS-6/7, a case story".

Planlagte publikationer og artikler

Andersen, M.H., Berglund, L., Rasmussen, J.T., and Petersen, T.E. (2000b) Annexin-V binds to the intracellular part of the beta-5 integrin receptor subunit. *In preparation*.

Pallesen, L.T., Andersen, M.H., Nielsen, R.L., Berglund, Petersen, T.E., Rasmussen, L.K. and Rasmussen, J.T. (2000). Isolation and characterization of MUC1 from bovine milk fat globule membrane. *In preparation*.

Videnskabelige afhandlinger

Andersen, M.H. (1997). Characterization of two cellular binding domains in bovine PAS-6/7. Cand.scient.-thesis, University of Aarhus.

Andersen, M.H. (1998). Bovine annexin-V co-purifies with alfa-v- beta-5 integrin receptor by PAS-6/7 affinity chromatography. Progress report, University of Aarhus.

Andersen, M.H. (2000). Functional analysis of bovine lactadherin binding to integrin receptors and plasma membranens. PhD-thesis, University of Aarhus, *in preparation*.

Nielsen, R.L. (2000). Structure and function of bovine adipophilin. Cand. scient.-thesis, Aarhus University, *in preparation*.

Redegørelse for forskeruddannelse herunder tilknyttede gæsteforskere og udstationering

Projektet vil danne baggrund for erhvervelse af en PhD-grad og tre kandidateksaminer. Alle funderet i studier af proteiner fra fedtkuglemembranen.

Mikkel Holmen Andersen, kandidat maj 1997, Ph.D.-eksamen sommer 2000

Studier af lactadherin (jvf. publikationslisten).

Rune Lehmann Nielsen, stud. scient., forventet kandidat efterår 2000.

Studier af adipophilin og proteinacylering (jvf. publikationslisten).

Lone Tjener Pallesen, stud. scient., forventet kandidat sommer 2001.

Under sin uddannelse har Mikkel H. Andersen været på følgende kurser:

- a. Molecular genetic of Yeast Course (Aug. 1995), held by Steen Holmberg, Department of molecular Biology, University of Copenhagen.
- b. EMBL Summer School (May 1997), Fuglsø, Denmark.
- c. PhD course in Biological Sequence Analysis and Protein Modelling (Apr. 1998), Held by Flemming S.Jørgensen, Department of Medicinal Chemistry, Royal Danich scholl of Pharmacy, and Søren Brunak, Centre for Biological Sequence Analysis, The technical University of Denmark.
- d. PhD UICC Advance Course on Cell Signalling and Cancer (Aug. 1999), held by UICC and Ludwig Institute for Cancer Resarch. Presented poster at the course.

Redegørelse for samarbejdsrelationer nationalt og internationalt

D. Kristensen, KVL, og T. Nylander, M. Paulsson samt A. Carlsson , alle Lund Universitet, Sverige. Samarbejde vedrørende fysisk-kemiske studier af XOD.

Statens Veterinære Serum Laboratorium, Århus. I forbindelse med immunokemiske analyser.

Russ Hill, Ohio State University, USA. Samarbejde vedrørende xanthinoxidoreduktase.

Christoffer Paul Wilcox i Harold Swaisgood's laboratorium, North Carolina State University, USA. Leveret oprenset CD36.

Sebastian Amigorena, Institut Curie, Paris, Frankrig. Sendt PAS-6/7 og anti PAS-7 antistof til studier af PAS-6/7's rolle i membrantransport.

Brian M. Cooke, Department of Microbiology, Monash University, Australia. Sendt protein og cDNA til studier i.f.m. malaria-infektioner.

Vurdering af resultaternes praktiske og videnskabelige betydning

I anvendelsesøjemed vurderes det, at den erhvervede viden om fedtkuglemembranproteinernes fysiske/kemiske egenskaber, og ikke mindst vedrørende deres fysiologiske funktion, vil give mejeriindustrien et godt håndtag, når der skal tages nye initiativer i retning af udvikling af mælkprodukter med særlige egenskaber eller fremstilles specialprodukter baseret på naturligt forekommende mælkeprotein.

I videnskabelig sammenhæng er der under projektet genereret en ikke ubetydelig mængde viden om fedtkuglemembranassocierede proteiner. Faktisk overstiger det alle forudgående forventninger. Resultaterne opnået under FØTEK projektet har desuden i høj grad medvirket til, at der kunne blive ryddet op i det virvar af navne, der gennem tiden er blevet foreslået for de selv samme fedtkuglemembranproteiner.

