

Afslutningsrapport

Proteolytiske enzymer og bioaktive peptider i mælk

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2000-33

Maj 2000



mejeriforeningen

danish dairy board

**Afslutningsrapport for FØTEK 2 projekt:
Proteolytiske enzymer og bioaktive peptider i mælk**

Projektleder:

Lektor Torben Ellebæk Petersen, lic.scient.
Laboratorium for Proteinkemi
Aarhus Universitet
Gustav Wieds Vej 10-C, 3.2
8000 Århus C.

Tel: 89 42 50 94

Fax: 86 13 65 97

Øvrige medarbejdere (Laboratorium for Proteinkemi):

Christian Würtz Heegaard, forskningsadjunkt.
Anni Boisen, laborant.
Laust Bruun Johnsen, Ph.D.studerende.
René Lametsch, specialestuderende.

Eksterne medarbejdere (Forskningscenter Foulum):

Lotte B. Larsen, seniorforsker.
Kristen Sejrsen, forskningsleder.
Stig Purup, seniorforsker.

Resumé

Proteolytiske enzymer har stor på indflydelse kvaliteten af forskellige mejeriprodukter, herunder ostemodningsprocessen, der er karakteriseret ved en gradvis nedbrydning af mælkeprotein. Med henblik på at øge kendskabet til, og muliggøre regulering af mælken naturlige indhold af proteolytisk aktivitet, er projektets første del centreret om cathepsin D- og plasminogenaktiveringssystemet. Foruden de proteolytiske proteiner indeholder mælk et stort antal bioaktive proteiner og peptider, hvis identitet og/eller biologiske betydning er ukendte. Projektets anden del omhandler identifikation og funktionelle studier af sådan proteiner, nemlig det nyligt identificerede mælkeprotein 20K og en formodet vækstfaktor.

I projektet er udviklet metoder til fremstilling og oprensning af rekombinante plasminogenaktivatorer af typerne streptokinase og vævstypeplasminogenaktivator. De to plasminogenaktivatorer er blev strukturelt og funktionelt karakteriseret. Endvidere har varmostabilitetsundersøgelser vist, at cathepsin D er katalytisk aktivt efter pasteurisering ved 72 °C. Analyser af UF-Feta har desuden sandsynliggjort at cathepsin D bidrager til den proteolytiske proces i dette produkt.

Baseret på aminosyresekvens, cDNA kloning og massespektrometriske analyser bestemtes primærstrukturen af 20K. Sammenlignende undersøgelser har vist, at 20K strukturelt ligner en familie af proteiner lokaliseret i epididymal- og sædvæske. Desuden har 20K en strukturel lighed med de to dominerende mide allergener Der f2 og Der p2. De funktionelle studier viste, at 20K er et kolesterolbindende protein.

Pleiotrophin blev isoleret fra tidligt mælkesekret og identificeret som en ny vækstfaktor, der stimulerer proliferation af yverceller *in vitro*. Fra samme kilde blev isoleret og klonet et nyt protein, der strukturelt har lighed med det humane fibroblast vækstfaktor bindende protein (FGF-BP). Funktionelle undersøgelser viste, at FGF-BP binder type-2 fibroblast vækstfaktoren og pleiotrophin. FGF-BP homologen alene havde ingen påviselig effekt på yvercellerne. Derimod kunne FGF-BP homologen inhibere pleiotrophins mitogene effekt.

Summary

Proteolytic enzymes influence the quality of various dairy products, including cheese ripening which is characterized by a gradual degradation of milk protein. To expand our knowledge about proteolytic activity in milk, the first part of the project concerns the role and regulation of endogenous cathepsin D and plasmin activity in milk. Besides the proteolytic enzymes, milk contains several bioactive proteins and peptides, which have not been identified and/or functionally characterized. The second part of the project is dedicated to the investigation of two such proteins, the recently discovered milk protein 20K and the identification of a potential new growth factor in prepartum milk like secretion.

Two recombinant plasminogen activators, a streptokinase and bovine tissue-type plasminogen activator, have been produced and purified. Both proteins capable of activating bovine plasminogen were structurally and functionally characterized. The presence and activity of cathepsin D in heated milk and UF-Feta was investigated. Residual activity of endogenous cathepsin D survived in milk heated for short-time periods of industrial relevance. It was also established that endogenous cathepsin D contributed to proteolysis in UF-Feta.

20K was isolated from bovine milk and characterized. The primary structure was determined by cDNA and protein sequencing combined with mass spectrometry. The protein displayed sequence similarity to a family of secretory protein of epididymis and the two mite allergens Der f2 and Der p2. Binding studies and gaschromatography revealed that 20K bound cholesterol.

Pleiotrophin was isolated from prepartum milk like secretion and was shown to stimulate proliferation of bovine primary mammary epithelial cells *in vitro*. From the same source the primary structure of a new protein was determined. The protein displayed sequence similarity to the human fibroblast growth factor binding protein (FGF-BP). Functional investigations revealed that FGF-BP binds type-2 fibroblast growth factor and pleiotrophin. On its own FGF-BP did not affect cell growth. However, FGF-BP inhibited the growth factor activity induced by pleiotrophin.

Formål

Formålet med projektet er at skaffe viden om proteolytiske enzymer og bioaktive peptider i mælk for at øge kendskabet til disses betydning for forskellige mejeriprodukter. Projektet udbygger og fortsætter det arbejde, der er påbegyndt under FØTEK 1. Grundet ny viden vedrørende en bakteriel bovin plasminogen aktivator, er delprojektet *Isolering af proteinaser fra mælk* ændret. Vi har, som det fremgår af afslutningsrapporten, i stedet inddraget karakteriseringen af en bakteriel plasminogen aktivator isoleret fra den mastitis inducerende *Streptococcus uberis*.

Projektets forløb, metoder og resultater

Procathepsin D

Undersøgelse af kommercielt tilgængelige enzymeres ind-virkning på procathepsin D med henblik på at finde potentielle aktivatorer

Vi har tidligere vist, at aspartat proteasen cathepsin D har en chymosin lignende substrat specificitet. Ud over at nedbryde α_{S1} -, α_{S2} -, β -kasein og α -lactalbumin, er cathepsin D i stand til at koagulere mælk gennem spaltning af Phe105-Met106 bindingen i κ -kasein. I frisk mælk findes cathepsin D primært på inaktiv form som procathepsin D. Ialt er fire forskelligt processerede former af procathepsin D identificeret i mælk. Den bagvedliggende enzymatiske proces og dertil hørende enzymer i processeringen af procathepsin D er uidentificeret. Forskellige lysosomale enzymer (cathepsin B, cathepsin H, cathepsin L) er testet for deres evne til at spalte propeptidet i procathepsin D. Analyse af det spaltede procathepsin D viser, at tilstedeværelsen af de aktive former af cathepsin D i mælk ikke skyldes procathepsin D-aktivering, katalyseret af de forskellige kombinationer af de testede lysosomale enzymer.

Undersøge om aktivatorerne bestemt under punkt (A) findes i mælk, og i givet fald om de kan aktivere procathepsin D

Det er ikke lykkedes eksperimentelt eller via litteraturstudier, at identificere procathepsin D aktiverende enzymer i mælk. Ved surt pH kan procathepsin D omdannes til en aktiv kortere form, pseudocathepsin D, og det er derfor muligt, at de identificerede former af cathepsin D i mælk skyldes en delvis autoaktivering.

Varmestabilitet af cathepsin D/procathepsin D

I samarbejde med Lotte B. Larsen, Afd. for Animalske Fødevarer, Forskningscenter Foulum, er procathepsin D/cathepsin D's varmostabilitet undersøgt. Fraktioneret kasein og mælkeserum blev behandlet ved 72 °C, 85 °C og 99 °C i hhv. 15 og 60 sek. Efterfølgende blev den resterende cathepsin D aktivitet monitoreret i et hæmoglobinassay. Endvidere blev denatureringsgraden af procathepsin D/cathepsin D undersøgt vha. immunoblotting med antistoffer specifikke for hhv. cathepsin D og cathepsin D's propeptid. Varmestabilitetsundersøgelsen viste, at 40-60% af enzymaktiviteten i serum er bevaret efter pasteurisering ved 72 °C. I kaseinfraktionen resulterede den tilsvarende behandling i genfindning af 20-30% enzymaktivitet. Ved højere temperaturer faldt enzymaktiviteten signifikant i serumfraktionen. Denne tendens var også gældende for kaseinfraktionen, omend faldet i enzymaktiviteten her var relativt mindre.

Vi undersøgte endvidere hvorvidt procathepsin D/cathepsin D er involveret i modning af ost fremstillet uden tilsætning af løbe. Vi konkluderede, at procathepsin D/cathepsin D aktivitet fandtes i UF-Feta. Forekomsten af α_{S1} -I og para- κ -kasein tydede desuden på, at cathepsin D bidrager til den proteolytiske proces i osten. En samlet gennemgang af de her omtalte data findes i artikelform (Larsen *et al.*, 2000).

20K

Proteinkemisk karakterisering af postsyntetiske modifikationer i 20K

20K blev oprenset fra valle ved hjælp af DEAE- og CM-Sepharose kromatografi. Baseret på den N-terminale sekvens konstrueredes oligonucleotide prober. En screening af et bovint yver cDNA bibliotek gjorde det muligt at isolere en fuldlængte klon, hvorfra aminosyresekvensen for 20K kunne bestemmes. Den kodende region består af 450 nukleotider, der giver ophav til et 19 aminosyre signal peptid efterfulgt af det 130 aminosyrer lange modne protein. Den deducerede aminosyresekvens, der er i overensstemmelse med peptid-mapping sekvenserne, har en høj grad af lighed med en gruppe af formodede kolesterol transporterende proteiner lokaliseret i epididymal- og sædvæske. Desuden er der sekvenslighed med mide allergenerne Der f2 og Der p2. Analyse af kulhydrat fra oprensede glykopeptider angiver at 20K indeholder ét N-bundet kulhydratkompleks. Ved at kombinere peptid-mapping, sekventering og massespektrometriske analyser har vi kortlagt disulfid-bromønstret i proteinet. En komplet beskrivelse af den primære struktur er sammenfattet i artikelform (Larsen *et al.*, 1997).

Undersøgelse af 20K's indvirkning på udvalgte enzymreaktioner

Med henblik på at finde en biologisk funktion for det nyligt identificerede mælkeprotein 20K, har vi undersøgt forskellige muligheder. Undersøgelser viste, at 20K ikke har alkalisk fosfatase aktivitet. Ej heller tydede vore undersøgelser på at 20K er en inhibitor af proteolytisk enzymaktivitet. Derimod har gaskromatografiske analyser vist, at 20K er et kolesterolbindende protein. Kvantitative aminosyre- og gaskromatografiske analyser viste, at 1 mol 20K bandt 0,84 mol kolesterol. Præliminære resultater omkring den kolesterolbindende egenskab er tidligere præsenteret i posterform (Larsen *et al.*, 1998).

Isolering af plasminogen aktivator fra Streptococcus uberis

Dyrkning af Streptococcus uberis isoleret fra bovin mastitis med henblik på isolering af en sekreteret plasminogen aktivator

Med henblik på at finde den bedst egnede stamme for isolering af den bakterielle plasminogen aktivator blev der indledt et samarbejde med Mogens Kilian og Knud Poulsen, Institut for Medicinsk Mikrobiologi og Immunologi, Aarhus Universitet. Følgende stammer isoleret fra kvæghold i Danmark og USA af *S. uberis* blev undersøgt: NCTC 3858, 120-295-1(=SK880), 137-391-1 (=SK881), 149-451-2 (=SK882), 156-162-1 (=SK883), 159-684-1 (=SK884), 5793-LR (9057-7)(=SK885), 9758-34-RR (=SK886), 27-RR (=SK887), 9057-14-LR (=SK888) og 9756-296-LF (=SK889). Stammernes identitet blev verificeret via standardteknikker, inkl. måling af glucuronidase og alkalisk phosphatase aktivitet. Plasminogen aktivator aktiviteten i de forskellige vækstmedier målt indirekte efter tilsætning af bovin plasminogen, som omsætning af plasminsubstratet S-2251 .

Oprensning og karakterisering af plasminogenaktivatoren

Det lykkedes med en kombination af ammoniumsulfat fældning, DEAE kromatografi, denaturerende Mono-S HPLC og reverse-phase HPLC, at oprense aktivatoren fra *S. uberis* NCTC 3858. Der oprensedes tilstrækkelige mængder af plasminogen aktivatoren til brug for en delvis sekvensanalyse.

Kloning og evt. ekspression af plasminogenaktivatoren

Baseret på dele af den tilvejebragte aminosyresekvens syntetiseredes primere til PCR på genomisk DNA isoleret fra *S. uberis* NCTC 3858. To PCR-produkter på hhv. ~400- og ~700 bp fremkom. Efter amplifikation blev de to PCR-produkter klonet og sekventeret. De to PCR-produkter overlappede og sammenlagt kodede de for aktivatoren. Det klonede streptokinase gen indeholdt en åben læseramme der koder for et protein på 286 aminosyrer, der ifølge den N-terminale sekventering inkluderer et 25 aminosyre langt signalpeptid. Den deducerede aminosyresekvens er cirka 25% identisk med streptokinasen isoleret fra *S. equisimilis* og *S. pyogenes*. *S. uberis* plasminogen aktivatoren er blevet udtrykt (30 mg/L) i intracellulære inclusion bodies i *Escherichia coli*, oprenset og testet positiv for aktivitet. Der er blevet konstrueret rekombinante *Lactococcus lactis* stammer der udskiller *S. uberis* aktivatoren i vækstmediet. I samarbejde med Hans Israelsen, Bioteknologisk Institut, er en rekombinant *L. lactis* stamme blevet dyrket i fermentor, hvor der er opnået et ekspressionsniveau på ~20 mg/L af aktivatoren.

Der er blevet foretaget en kinetisk karakterisering af streptokinase katalyseret aktivering af bovin plasminogen. Distribuering af rekombinant streptokinase tilsat kasein- og vallefraktioner er blevet undersøgt. Efter tilsætning af den rekombinant bakteriel plasminogen aktivator til mælk, blev denne lokaliseret i vallefraktionen. Ovenstående arbejde er blevet sammenfattet i to publikation (Johnsen *et al.*, 1999; Johnsen *et al.*, 2000).

Eksperimentelt arbejde omhandlende plasminogen aktivering i mælk

Proteolytiske enzymer har stor indflydelse på mejeriprodukter, herunder ostemodningsprocessen hvor kasein spaltes til peptider. Med henblik på, at øge kendskabet plasmins betydning for forskellige mejeriprodukter, og vurdering af om disse kan have en mulig praktisk betydning i mejeriprocesser/produkter, har vi fortsat vort arbejde med plasminsystemet i mælk. I samarbejde med Antonella Baldi's gruppe på Istituto di Alimentazione Animale, Facolta di Medicina Veterinaria, Universita degli Studi di Milano, har vi undersøgt forekomsten af plasminogen aktiveringssystemets komponenter i bøffelmælk (Fantus *et al.*, 1998). Desuden har vi undersøgt forekomsten af plasminogen aktiveringssystemets komponenter i human mælk (Heegaard *et al.*, 1997a). Vi konkluderede, at forekomsten og fordelingen af proteaserne hos begge arter er sammenlignelige med hvad vi tidligere har rapporteret for bovin mælk. Funktionelle studier af forskellige mælkeproteiner viste, at α_{S2} -kasein dimeren binder og accelerere t-PA katalyseret plasminogen aktivering (Heegaard *et al.*, 1997b). Endelig har vi klonet og udtrykt bovin t-PA i *pichia pastoris*. En grundig strukturel og kinetisk undersøgelse af det oprensede enzym er publiceret (Johnsen *et al.*, 1998).

Bioaktive peptider

Etablering og vedligeholdelse af cellesuspensioner

For at kunne isolere vækstfaktorer i tidligt mælkesekret er det nødvendigt at råde over et cellekultur-system til registrering af cellevækst. Ved sektion for Vækst- og Laktationsbiologi på forskningscenter Foulum har Kristen Sejrsen og Stig Purup etableret et *in vitro* system baseret på en bovin primær-kultur af epitelceller fra mælkekirtelvæv. Da udgangspunktet for isolering af vækstfaktorer var tidligt mælkesekret, valgte vi at gøre brug af ovennævnte *in vitro* assay. Den primære cellekultur blev fremstillet ved udskæring, findeling og enzymbehandling af yvervæv. Cellerne dyrkedes i en 3-dimensionel matrix af kollagen fremstillet af rottehaler. Vækstfremmende aktivitet blandt de fraktionerede proteiner målt som inkorporering af [methyl-³H]thymidin i DNA, der efter en passende inkubationstid blev isoleret fra cellerne. Som ønsket, responderede cellerne på forskellige vækstfaktorer, idet bl.a. insulin-like growth factor-I (IGF-1) inducerede organiseret cellevækst med morfologisk træk, som minder om *in vivo* situationen. Det har vist sig muligt at nedfryse og opbevare cellerne i N₂. Efter optøning udviser de stadig en høj overlevelse og konstant mitogent respons på IGF-1, der derfor blev inkluderet som intern standard i hvert enkelt celleforsøg.

Fraktionering af tidligt mælkesekret, og isolering af vækstfaktorer

Med henblik på isolering og identifikation af den søgte heparinbindende vækstfaktor indsamledes løbende tidligt mælkesekret fra Holstein besætningen på Forskningscenter Foulum. En tretrins oprensningsmetode af vækstfaktorer blev etableret og de resulterende fraktionerede proteiner blev testet for mitogen aktivitet. Denne procedure ledte frem til en vækstfremmende fraktion indeholdende ét detekterbart polypeptid (SDS-PAGE og sølvfarvning). Polypeptidet blev via elektroblotting identificeret ved N-terminal sekventering (se pkt. K). Oprensningsmetoden, der omfatter affinitets-, revers-phase HPLC, og inobytterchromatografi, resulterede desuden i oprensning og identifikation af en række forskellige heparinbindende proteiner fra sekretet (se pkt. K). Heriblandt et ikke tidligere identificeret protein, der grundet dets co-oprensning med vækstfaktoren blev genstand for yderligere strukturelle og funktionelle undersøgelser (se pkt. L).

Proteinsekventering af vækstfaktor

I jagten på vækstfaktorer blev en række af mælkesekretets heparinbindende proteiner identificeret via elektroblotting og N-terminal sekventering. Undersøgelserne viste, at det dominerende protein i sekretet er lactoferrin, der udgør mere end 90% af den totale mængde protein. Blandt de resterende proteiner identificeredes: 1) serine protease inhibatoren antithrombin III; 2) det vitamin B₁₂ bindende transcobalamin; 3) glycoprotein 39, hvis humane homolog binder lectin; 4) apolipoprotein E, der via binding til fedt og low density lipoprotein receptor familien medierer fedtoptagelse i celler; 5) α_{S2} -casein, der ikke tidligere er vist at binde heparin; 6) p7, et calcium bindende protein og substrat for proteinkinase C; 7) et 28-30 kDa heparin bindende serine protease homolog uden kendt proteolytisk aktivitet; 8) angiogenin, det eneste medlem af RNase superfamilie der stimulerer angiogenese; 9) et fragment, hvis aminosyresekvens har lighed med det IGF-1 bindende protein IGF-10; 10) histone H2B, der tidligere er detekteret i bovin mælk; 11) det calcium-binding protein in amniotic fluid-1, CAAF1, tilhørende S100 familien. S100 familien består af 19 proteiner der via et fælles strukturelt motiv (EF-hand motif) binder divalente kationer.

I den vækststimulerende fraktion identificeredes indledningsvist pleiotrophin (PTN) og midkine (MK). En efterfølgende oprensning kombineret med immunoblotting viste, at PTN er den principale vækstfaktor blandt de identificerede proteiner. PTN udgør, sammen med MK, en ny familie af heparinbindende vækst- og differentieringsfaktorer. PTN og MK er ikke tidligere fundet i mælk, og deres biologiske effekt er ikke entydigt klarlagt. Der er dog generel enighed om, at familien spiller en væsentlig rolle i modning af organer i fosterstadiet, herunder specielt udvikling af det centrale nervesystem. Hos raske voksne individer antages produktionen af vækstfaktorerne at være minimal, men hos cancerpatienter øges produktion af PTN/MK. Undersøgelser viser at PTN/MK stimulerer cancer induceret angiogenese. Fundet af vækstfaktorerne i tidligt mælkekirtelsekret peger på, at PTN og MK også spiller en rolle i fysiologiske processer, herunder specielt i udviklingen af mælkekirtelen.

Tilstedeværelse af en ukendt N-terminal aminosyresekvens i vækststimulerende fraktioner (omtalt under pkt. J), fik os til yderligere at udforske denne. Ved brug af peptide-mapping og sekventering lykkedes det at identificeret omkring 70% af hele proteinets aminosyresekvens. På denne baggrund viste en database søgning, at det hidtil uidentificerede protein har lighed med det fibroblast growth factor binding protein (FGF-BP), der tidligere er klonet fra menneske og mus. Bindings- og transfektionsstudier og ribozyme-targeting tyder på, at FGF-BP er en vigtig brik i angiogenese og tumorvækst, sandsynligvis via interaktioner med medlemmer af fibroblast growth factor (FGF) familien.

Kloning af vækstfaktor

Da primærstrukturen af FGF-BP ikke tidligere er undersøgt, anvendte vi den oprensede bovine FGF-BP homolog til dette formål. For en fuldstændig strukturel karakterisering af proteinet, anvendtes oligonukleotid prober baseret på dele af den tilvejebragte aminosyresekvens. Et bovint cDNA bibliotek etableret fra midtlakterende yvervæv blev screenet og positive kloner blev isoleret. Sekventering af klonerne resulterede i fundet af en fuldlængde klon, hvorfra en fuldstændig aminosyresekvens for den bovine FGF-BP homolog kunne bestemmes. Den kodende region består af 1170 nucleotider, hvilket giver ophav til et protein på 234 aminosyrer. Den deducerede aminosyresekvens, der er i overensstemmelse med peptide-mapping sekvenserne, var hhv. 60% og 53% identisk med sekvensen for det tilsvarende protein i menneske og mus. En yderligere sammenligning af den deducerede og sekventerede peptidsekvens vist, at N-terminalen af det oprensede protein er processeret. Analyse af kulhydrat fra oprensede glykopeptider angiver, at den bovine FGF-BP homolog indeholder hhv. ét N- og ét O-bundet kulhydratkompleks. Ved at kombinere peptid-mapping, sekventering og massespektrometriske analyser har vi kortlagt disulfid-bromønstret i proteinet. En komplet beskrivelsen af primærstrukturen er sammenfattet i artikelform (Lametsch *et al.*, 2000).

Funktionelle studier af FGF-BP

Funktionelle studier omfattende bindingsforsøg med ligand blotting har vist, at bovin FGF-BP binder FGF-2. Som noget nyt har vi fundet at FGF-BP også binder PTN og MK. Supplerende celleforsøg har vist, at tilstedeværelse af FGF-BP inhiberer PTN's mitogene effekt. På denne baggrund konkluderede vi, at FGF-BP's aktivitet ikke udelukkende er specifik for FGF familien, men også omfatter andre heparinbindende vækstfaktorer såsom PTN/MK familien. De observerede effekter af PTN og FGF-BP, sammenholdt med deres tilstedeværelse i sekretet, tyder på at vore resultater åbner en ny dør til forståelsen af vækstfaktorernes indflydelse på mælkekirtelens udvikling (Heegaard *et al.*, 2000).

Liste over publikationer mm.

Artikler i internationale tidsskrifter

Fantuz, F., Baldi, A., Dell'Orto, V., Polidori, F., Rossi, C.S., Politis, I. and Heegaard, C.W. (1998) Distribution of plasminogen activator forms in different fractions of buffalo milk. *J. Dairy Res.* 65:521-527.

Heegaard, C.W., Larsen, L.B., Rasmussen, L.K., Højberg, K.E., Petersen, T.E. and Andreasen, P.A. (1997a) Plasminogen activation system in human milk. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 25:159-166.

Heegaard, C.W., Andreasen, P.A., Petersen, T.E. and Rasmussen, L.K. (1997b) Binding of plasminogen and tissue-type plasminogen to dimeric α_{S2} -casein accelerates plasmin generation. *Fibrinolysis and Proteolysis* 11: 29-36.

Johnsen, L.B., Ravn, P., Berglund, L., Petersen, T.E., Rasmussen, L.K., Heegaard, C.W., Rasmussen, J.T., Benfeldt, C., Fedosov, S.N. (1998) A refined kinetic analysis of plasminogen activation by recombinant bovine tissue-type plasminogen activator indicates two interconvertible activator forms. *Biochemistry* 37:12631-12639.

Johnsen, L.B., Poulsen, K., Kilian, M. and Petersen, T.E. (1999) Purification and cloning of a streptokinase from *Streptococcus uberis*. *Infect. Immun.* 67:1072-1078.

Johnsen, L.B., Rasmussen, L.K., Petersen, T.E., Etzerodt, M. and Fedosov, S.N. (2000) Kinetic and structural characterization of a two-domain Streptokinase: dissection of domain functionality. *Biochemistry*, In press.

Lametsch, R., Rasmussen, J.T., Johnsen, L.B., Purup, S., Sejrsen, K., Petersen, T.E. and Heegaard, C.W. (2000) Structural Characterization of the fibroblast growth factor binding protein purified from bovine prepartum mammary gland secretion. *J. Biol. Chem.*, in press.

Larsen, L.B., Ravn, P., Boisen, A., Berglund, L. and Petersen, T.E. (1997) Primary structure of EPV20, a secretory glycoprotein containing a previously uncharacterized type of domain. *Eur. J. Biochem.* 243: 437-441

Larsen, L.B., Wirum, H., Benfeldt, C., Heegaard, C.W., Ardö, Y., Qvist, K.B. and Petersen, T.E. (2000) Bovine milk procathepsin D: Presence and activity in heated milk and in extracts of rennet-free UF-Feta cheese. *Int. Dairy J.*, in press.

Planlagte publikationer og artikler

Heegaard, C.W., Purup, S., Sejrsen, K. and Petersen, T.E. (2000) The fibroblast growth factor binding protein modulates pleiotrophin induced proliferation of undifferentiated primary mammary epithelial cells in vitro. In prep.

Heegaard C.W og Petersen, T.E. (2000) Plasmin et enzym der opløser blodpropper og modner ost. In prep.

Indlæg ved kongresser, symposier o.l.

Heegaard, C.W., Andreasen, P.A., Petersen, T.E. and Rasmussen, L.K. (1996) Dimeric ∇_{S2} -casein, a novel matrix for tissue-type plasminogen activator catalyzed plasminogen activation. Third International Workshop on the Biology of Lactation in Farm Animals, EAAP/ASAS meeting, Lillehammer 24th-25th of August (Oral presentation).

Heegaard, C.W., Andreasen, P.A., Petersen, T.E. and Rasmussen, L.K. (1996) Dimeric α_{S2} -casein, a novel matrix for tissue-type plasminogen activator catalyzed plasminogen activation. *Livest. Prod. Sci.*, 149-150.

Heegaard, C.W. (1999) The plasminogen activation system in milk. Istituto di Alimentazione Animale, Facolta di Medicina Veterinaria, Universita degli Studi di Milano (Oral presentation).

Heegaard, C.W. (2000) The plasminogen activation system and mammary gland - Overview and new findings. COST Action meeting on bioactive components in milk, Foulum 7th-8th of April (Oral presentation).

Johnsen, L.B., Heegaard, C.W., Mabhout P., og Petersen, T.E., (1997) Proteolytiske enzymer og bioaktive peptider I mælk: Recombinant fremstilling af plasminogen aktivatoren tPA. Abstract of paper presented at the Mejeriforskningsdag, Aarhus (abstract).

Johnsen, L.B., Fedossov, S., Heegaard, C.W. and Petersen, T.E. (1998) Bovine plasminogen activators. *The 25th International Dairy Congress, Aarhus 21th- 24th September*, (abstract).

Larsen, L.B., Heegaard, C.W., Benfeldt, C., Boisen A., og Petersen T.E. (1997) Proteolytiske enzymer og bioaktive peptider I mælk: Cathepsin D og procathepsin D. Abstract of paper presented at the Mejeriforskningsdag, Aarhus (abstract).

Larsen, L.B., Heegaard, C.W., Berglund, L., and Petersen, T.E. (1998). EPV20, a recently described bovine milk protein, binds cholesterol and is structurally related to dust mite allergens. The 25th FEBS Meeting, Copenhagen (abstract).

Larsen, L.B., Kelly, A.L., Hayes, M., McSweeney, P.L.H., Benfeldt, C., Heegaard, C.W., Wirum, H., Ardö, Y., Qvist, K.B. and Petersen, T.E. (2000) The milk aspartic proteinase cathepsin D: Functional and biological aspects. COST Action meeting on bioactive components in milk, Foulum 7th-8th of April (oral presentation).

Petersen, T.E., Rasmussen, L.K., Berglund, L.E., Sørensen, E.S., Rasmussen, J.T., Heegaard, C.W., Fedossov, S.N., Johnsen, L.B., Andersen, M.H., Larsen, L.B., and Benfeldt, C. (1998) Identification and characterization of new milk proteins. *Proceedings of the 25th International Dairy Congress, Aarhus 21th- 24th September*, 194-199.

Rasmussen, L.K., Larsen, L.B., Johnsen, L.B., Andreasen, P.A., Petersen, T.E., and Heegaard, C.W. (1997). Casein, a novel matrix for tPA-catalyzed plasminogen activation. Levnedsmiddelkongres, Copenhagen (abstract).

Videnskabelige Afhandlinger

Lametsch, R. (1999) Structural characterization of a bovine homolog of fibroblast growth factor binding protein. M.Sc.-thesis, University of Aarhus, August (1-69).

Johnsen, L.B. (1999) Structural and kinetic characterization of two plasminogen activators: bovine tPA and *S. uberis* streptokinase. Ph.D.-thesis, University of Aarhus, December (pp 1-68).

Redegørelse for forskeruddannelse, herunder tilknyttede gæsteforskere og udstationering

Med udgangspunkt i det i projektet udførte arbejde er Ph.D.-studerende Laust Bruun Johnsen og specialestuderende René Lametsch konfereret hhv. Ph.D.-graden og kandidatgraden. Med økonomisk støtte fra EU Cost Action besøgte forskningsadjunkt Christian W. Heegaard i perioden 03.05.99-07.05.99 Antonella Baldi's gruppe på Istituto di Alimentazione Animale, Facolta di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano.

Redegørelse for nationale og internationale samarbejdsrelationer

De forelagte resultater er produktet af et tæt samarbejde med seniorforsker Lotte B. Larsen, seniorforsker Stig Purup og forskningsleder Kristen Sejrsen fra Forskningscenter Foulum. Desuden bidrog professor Mogens Kilian og lektor Knud Poulsen, Institut for Medicinsk Mikrobiologi og Immunologi, Aarhus Universitet. Internationalt samarbejdedes med José Courty, Laboratoire de Recherche sur la Croissance Cellulaire, la Réparation et la Régénération Tissulaires (CRRET), Université Paris XII-Val de Marne, Frankrig og Antonella Baldi, Istituto di Alimentazione Animale, Facolta di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, Italien.

Vurdering af resultaternes praktiske og videnskabelige betydning

Ved brug af molekylærbiologiske metoder er det lykkedes at fremstille to rekombinante plasminogenaktivatorer, streptokinasen fra *S. uberis* og bovin vævstypeaktivator. Der er hermed skabt et nyt grundlag for at undersøge betydningen af en øget endogen plasminaktivitet i forskellige mælkeprodukter. Projektet har også vist, at cathepsin D bør inkluderes blandt de betydende proteolytiske enzymer i forarbejdning af visse mælkeprodukter. Desuden er beskrevet et nyt kolesterolbindende mælkeprotein, 20K, der strukturelt minder om mide allergener. Konstellationen er hidtil ukendt og muligvis fysiologisk og patologisk relevant. Pleiotropin er en ny komponent i rækken af vækstfaktorer der menes at regulere mælkekirtelens udvikling. Påvisning af et hidtil ukendt samspil mellem pleiotrophin og det nye mælkekirtel protein, bovin FGF-BP, er af basal betydning for vor forståelse af hvorledes heparinbindende vækstfaktorer stimulerer cellevekst.

