

Afslutningsrapport

MUC1's virkning som bakteriel receptoranalog

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2003-56

December 2003



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport for FØTEK 3 projektet:

MUC1's virkning som bakteriel receptoranalog

Periode 01.04.2001 – 30.09.2003

Projektansvarlige
Christian Würtz Heegaard
Jan Trige Rasmussen

Laboratorium for Proteinkemi
Molekylærbiologisk Institut
Aarhus Universitet
Gustav Wieds Vej 10C
8000 Aarhus C

Projektledelse og øvrige medarbejdere

Århus Universitet, Laboratorium for Proteinkemi

Margit Skriver Rasmussen, laboratorietekniker,

Anni Bojsen, laborant (fra marts 2002 efter barselsorlov),

Winnie Heidemann, laborant (barselsvikar),

Lone Tjener Pallesen, stud. scient (kandidat august 2002),

Anne Staudt Kvistgaard; stud. scient. (kandidat december 2002),

Christian Würtz Heegaard, lektor, cand. scient, Ph.D. (projektleder),

Jan Trige Rasmussen, lektor, cand. scient, Ph.D. (projektleder)

Danmarks JordbrugsForskning, Afd. for Husdyrernæring og Fysiologi

Lene Lind Mikkelsen, forsker,

Bent Borg Jensen, forskningsleder.

Resumé

Udbrud af levnedsmiddelbårne sygdomme og problematikken vedrørende bakteriel antibiotikaresistens, har de senere år sat fokus på antibiotikaanvendelse i dansk husdyrproduktion. Forebyggelse og bekæmpelse af husdyrsygdomme og zoonoser med en minimal anvendelse af antibiotika, må formodes at begrænse resistensudviklingen samt sikre en effektiv behandling af mennesker og husdyr i fremtiden. Med henblik på at lette overgangen til en mere restriktiv håndtering af antibiotika, sigtede det forelagte projekt mod at øge viden om naturligt forekommende antibakterielle komponenter i mælk. Projektet er interdisciplinært ved at kombinere molekylærbiologi/mikrobiologi og heldyrs-/organrelateret farmakologi. Den humane form af det kraftigt glykosylerede mælkeprotein MUC1 antages at inhibere adhæsion af patogene bakterier til tarmvæggen. Med henblik på at oprense og teste bovin MUC1's attenuerende egenskaber, undersøgte som udgangspunkt flowet af MUC1 i den industrielle forarbejdningsproces af bovin mælk. Ud fra funktionalistiske og økonomiske overvejelser konkluderer vi, at oparbejdet vallefedtkoncentrat (WFC) med et indhold på 0,32 vægtprocent MUC1 er den mest egnede industrielle kilde til proteinet. Bovin MUC1's adhæsionsinhiberende potentiale mod diverse patogene bakterier blev testet *in situ* i porcine intestinal organ kultur og *in vitro* ved agglutinationstests. Endvidere blev der gennemført *in vivo* tests omfattende studier af et det MUC1-holdige WFC's effekt i et kombineret fodrings og slagteforsøg, hvor ændringer i fire uger gamle fravænnede smågrises tilvækst, tarmflora og tarmmorfologi monitoreredes. På baggrund af disse undersøgelser konkluderer vi, at divergerende resultater relateret til metoderne, ikke har gjort det muligt entydigt at udtale sig om MUC1's potentiale som antibakteriel komponent. Med hensyn til undersøgelsen af MUC1-holdig WFC er vor foreløbige konklusion, at mælkepulveret i perioden efter fravænnning har en positiv effekt på mavetarmkanalens konditioner og mindsker tendensen til diarré.

Summary in English

In the last decade bacterial food-borne diseases have become an increasing problem in the industrialised world and are a major global health problem. The prevention and treatment of disease caused by these micro organisms are complicated by the increase in multidrug-resistant strains and the lack of an effective vaccine. Adhesion of bacteria to target cells are usually mediated by lectin-like molecules that recognize certain glycoproteins exposed on the host cell membrane. The milk fat globule membranes are of epithelial origin and exposes glycosylated proteins, which the pathogenic bacteria see as host cell membrane-docking sites from which to launch invasive infections. Thus, the bacteria are lured away from their intended target, *i.e.* the lining of the digestive tract. Human MUC1, a highly glycosylated milk fat globule membrane protein, has been found to inhibit bacterial adhesion to epithelial cells. The proposed project was designed to investigate whether or not the bovine homologue of MUC1 provides a similar decoy protection against intestinal bacterial infection. Considering quality and economical parameters we recommend the Whey Fat Concentrate (WFC) as the most suitable industrial derived milk fraction as source for the purification of MUC1. Investigation done by immunoassays shows that MUC1 constitute 0.32% (by weight) of WFC, whereas raw milk in comparison contains 0.02% of MUC1. The ability of MUC1 and a MUC1 enriched product to act as a receptor analogue and attenuate various pathogenic bacteria was investigated *in vitro* using a porcine intestinal organ culture model and agglutination assays. Unfortunately, conclusive data determining the attenuating potential of bovine MUC1 could not be gathered. In addition, we performed an *in vivo* study examining effects of administrating the MUC1-containing WFC in the diet of four weeks old weaning piglets. The changes in the piglets growth rate, colon morphology, and the colon microbial community was monitored. Suggestively, the results leads to the conclusion that WFC decreased the tendency of acquiring diarrhoea and generally improved conditions in the gastrointestinal tract.

Projektets Baggrund

Der er i de senere år registreret en markant stigning i hyppigheden af fødevarerelaterede bakterielle infektioner i den industrialiserede verden (1). I USA skønnes det, at ca. 76 mill. personer rammes hvert år. Af de resulterende ca. 5000 dødsfald, skyldes en stor del problemer med resistente bakterier. Herhjemme tilskrives ca. 3000 hospitalsindlæggelser og 40 dødsfald årligt levnedsmiddelbårede infektioner i mave-tarm kanalen.

Fødevarerelaterede infektioner forårsages som oftest af de patogene bakteriearter, *Eschericia*, *Salmonella*, *Campylobacter* og *Yersenia*. Infektionerne er karakteriseret ved, at bakterierne angriber de epitelceller på overfladen i mundhule, svælg og fordøjelsessystem for i værste fald efterfølgende at kolonisere blodbanen. De patogene bakteriers evne til at angribe værtscellerne afhænger af bakteriernes mulighed for initielt at binde til cellernes overflade. Flere typer patogene bakterier indleder deres angreb via genkendelse af og affinitet for distinkte glykoproteiner syntetiserede af- og eksponeret på værtscellernes overflade (2-5).

Mælkens fedtkuglemembraner (MFGM) er i forbindelse med bakteriel adhæsion interessant af flere grunde. Væsentligst er at fedtkuglemembranen dannes ved afsnøring af den apikale epitel-cellemembran i de mælkeproducerende alveoli. Epitelceller findes ligeledes på overfladerne i mundhule, svælg og resten af fordøjelsessystemet. Det er således muligt at genfinde fordøjelsessystemets membranproteiner, inklusive de bakteriebindende, i mælkens fedtkugle-membran. Tidligere arbejder har vist, at en del af fedtkuglens membranproteiner er svært nedbrydelige i tarmen, og de genfindes mere eller mindre intakte i human fæces (6). Nyere undersøgelser har vist, at modermælkens fedtkuglemembraner indeholder et antal ikke identificerede glykoproteiner, hvortil bl.a. sygdomsfremkaldende *E. coli* med S-fimbriæ binder sig (7-10). Sidste nyt fra dette felt er, at tilsvarende glykoproteiner også findes i valle fra human modermælk (11).

Indtil flere undersøgelser har vist, at amning beskytter den nyfødte mod en række bakterie infektioner. Dette formodes at have sammenhæng med human mælks indhold af bl.a. immunoglobulin og laktoferrin, der udøver en veldokumenteret gavnlige effekt ved at supplere den nyfødtes immunforsvar. Undersøgelserne viser endvidere, at modermælkserstatning ikke er nær så effektiv, når det gælder om at undertrykke disse infektioner. Sammenlignes børn, der får hhv. modermælk og modermælkserstatning, har sidstnævnte gruppe op mod dobbelt så mange og alvorligere infektioner som førstnævnte gruppe (12-16). Hypotetisk kunne man således forestille sig en årsagssammenhæng mellem højere incidens af bakterielle infektioner og det faktum, at fedtkuglens glykoproteiner ikke findes i nævneværdig grad i modermælks-erstatning, eller at glykoproteinerne under fremstillingsprocessen af erstatning denatureres.

Dette projekt tager udgangspunkt i forekomst af naturligt forekommende bakterielle receptor-analoger lokaliseret i mælkens fedtkuglemembraner, og er specielt centreret om det kraftigt glykosylerede protein MUC1. Glykoproteinet MUC1 findes i mælk associeret med fedtkuglemembraner og skummetmælksmembraner, hvor det er estimeret til at udgøre 40 mg/liter, mens det i human fuldmælk er målt til hele 800 mg/liter (17). Bovin MUC1 er specielt interessant, da dennes humane homolog, isoleret fra mælk og fæces, foruden at binde visse typer af *E. coli*, også er i stand til at displacere disse bakteriers binding til mundhulens epitelceller (6, 8, 9). Årsagen til dette skyldes, at bakterien forveksler MUC1 med det orale cellulære invasions-site.

Referencer:

1. Mølbak, K. (1999). Zoonotisk bakteriel gastroenteritis i Danmark. *Ugeskr. Læger* 161, 2796-2799.
2. Cassels, F.J. and Wolf, MK (1995). Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. *J. Ind. Microbiol.* 15, 214-226
3. Mouricout, M. (1997). Interactions between the enteric pathogen and the host. An assortment of bacterial lectins and a set of glycoconjugate receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 412, 109-123.
4. Hamada, S., Amano, A., Kimura, S., Nakagawa, I., Kawabata, S. and Morisaki, I. (1998). The importance of fimbriae in the virulence and ecology of some oral bacteria. *Oral Microbiol. Immunol.* 13, 129-138.
5. Meyer, T.F. (1999). Pathogenic neisseriae: complexity of pathogen-host cell interplay. *Clin. Infect. Dis.* 28, 433-441.

6. Peterson, J.A., Patton, S. and Hamosh, M. (1998a). Glycoproteins of the human milk fat globule in the protection of the breast-fed infant against infections. *Biol. Neonate* 74, 143-162.
7. Schrotten, H., Lethen, A., Hanisch F., Plogmann, R., Hacker J., Nobis-Bosch R. and Wahn, V. (1992a). Inhibition of adhesion of S-fimbriated Escherichia coli to epithelial cells by meconium and feces of breast-fed and formula-fed newborns: mucins are the major inhibitory component. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 15, 150-158.
8. Schrotten, H., Hanisch, F.G., Plogmann, R., Hacker, J., Uhlenbruck, G., Nobis-Bosch, R. and Wahn, V. (1992b). Inhibition of adhesion of S-fimbriated Escherichia coli to buccal epithelial cells by human milk fat globule membrane components: a novel aspect of the protective unction of mucins in the nonimmunoglobulin fraction. *Infect. Immun.* 60, 2893-2899.
9. Schrotten, H. (1998). The benefits of human milk fat globule against infection. *Nutrition* 14, 52-53.
10. Newburg D.S. (1999). Human milk glycoconjugates that inhibit pathogens. *Curr. Med. Chem.* 6, 117-127.
11. Schwertmann, A., Schrotten, H., Hacker, J. and Kunz, C. (1999). S-fimbriae from Escherichia coli bind to soluble glycoproteins from human milk. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 28, 257-263.
12. Andersson, B., Porras, O., Hanson, L.A., Lagergard, T. and Svanborg-Eden, C. (1986). Inhibition of attachment of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae by human milk and receptor oligosaccharides. *J. Infect. Dis.* 153, 232-237.
13. Howie, P.W., Forsyth, J.S., Ogston, S.A., Clark, A. and Florey, C.D. (1990). Protective effect of breast feeding against infection. *BMJ* 300, 11-16.
14. Cunningham, A.S., Jelliffe, D.B. and Jelliffe, E.F. (1991). Breast-feeding and health in the 1980s: a global epidemiologic review. *J. Pediatr.* 118, 659-666.
15. Dewey, K.G., Heinig, M.J. and Nommsen-Rivers, L.A. (1995). Differences in morbidity between breast-fed and formula-fed infants. *J. Pediatr.* 126, 696-702.
16. Rudloff, S. and Kunz, C. (1997). Protein and nonprotein nitrogen components in human milk, bovine milk, and infant formula: quantitative and qualitative aspects in infant nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 24, 328-344.
17. Mather, I.H. (2000). A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk fat globule membrane. *J. Dairy Sci.* 83, 203-247.

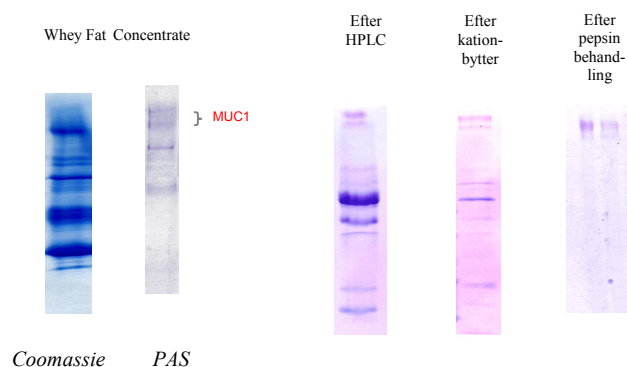
Projektets formål

Projektets mål er at vurdere det kraftigt glykosylerede mælkeprotein MUC1's evne til at inhibere adhæsion af patogene bakterier (attenuation). Med henblik på at udnytte denne formodede effekt af bovin MUC1 søges udvalgt en egnet mælkeprotein fraktion, der uden hensyn til resistens-problemer, på sigt delvist kan erstatte antibiotiske vækstfremmere og forbedre den sundhedsmæssige kvalitet af bl.a. modermælksersætning

Projektets forløb, resultater og kommentarer

Oprensning af glykoproteinet MUC1 fra bovin mælk

Under normale omstændigheder er udbyttet af en MUC1 oprensning omkring 0.1 mg/liter mælk, når vejen går over fremstilling af MFGM. Det blev estimeret, at der skulle bruges mellem 10-50 mg til de funktionsrelaterede forsøg. Oprensning af MUC1 fra ca. 100 liter mælk blev foretaget, men desværre ikke med det ønskede udbytte. Derfor blev muligheden af, at benytte sur valle eller det mejeriindustrielle vallepulver "Whey Fat Concentrate" (WFC) som udgangsmateriale undersøgt. Det sidste blev valgt som udgangsmateriale for fremstilling af MUC1. Proceduren baserer på separation direkte fra WFC vha. reverse phase HPLC med efterfølgende batch-inkubation med et kationbytter-materiale ved 0,1 M Na-acetat, pH 4,5 (Fig. 1). Den mest fremtrædende kontaminant er BSA.



Figur 1. Elektroforesegeler til renhedstest af oprenset MUC1 når WFC er blevet benyttet som udgangsmateriale. Se tekst for detaljer.

MUC1 er sædvanligvis meget resistent overfor proteaser (se senere). I overensstemmelse hermed fandt vi at anvendelse af pepsin undervejs i oprensningen faktisk gav helt rent MUC1 (Fig. 1). Dog betød behandlingen, at en mindre del af MUC1 ikke længere er helt intakt. Endvidere viste det sig, at man alternativt kan inddrage et ekstra reverse-phase HPLC trin på en ProRPC- søjle, og derved få helt rent MUC1. Det gælder imidlertid, at begge disse oprensningsmetoder kun giver mulighed for kvalitative og strukturelle analyser, idet udbytteerne er så beskedne og kræver for mange ressourcer.

Fremstilling af antistof mod bovin MUC1 og implementering af egnede immunologiske tests

Til brug for fremstilling af et polyklonalt antistof hos DAKO, er der blevet fremstillet ca. 2 mg meget rent MUC1. De tilsendte antisera er blevet specificitetstestet vha. westernblotting. I første omgang så det ud som om, at specificiteten var lidt dårlig, men i de følgende sera så det bedre ud. Vi vurderede imidlertid, at antistofferne ikke var egnede til kvantitativt brug i en ELISA. Vi indkøbte derfor software, som skulle muliggøre estimering af MUC1 ved at analysere ind-scannede Westernblotts.

Selektion af egnet udgangsmateriale til industriel oprensning af helt eller delvist rent MUC1

Indledningsvist blev flg. fraktioner undersøgt for tilstedeværelse af MUC1 ved alm. SDS-PAGE og PAS-farvning: a) MFGM, b) Whey Protein Isolate (WPI), c) konc. ostevalle (RUS) og d) Whey Fat Concentrate (WFC). Alene ud fra disse analyser ses det tydeligt, at MUC1 udgør en væsentlig del af proteinet i WFC, hvilket har ledt til ideen med at bruge denne fraktion som udgangsmateriale for vores oprensninger (se ovenfor).

Estimering af MUC1 i forskellige bovine mælkeprøver/fraktioner vha. Westernblotting gav flg. resultater:

Tabel 1. Estimering af MUC1 indhold ved densitetsscanning af Westernblots.

Prøve	Indhold (wt %)	Prøve	Indhold (wt %)
Rå mælk	0,02	Valle (proces, gul ost)*	0,09
Skummet*	0,01	Valle (sur, laboratorium)	0,10
MFGM*	1,21	WFC*	0,32
Kærne (smørkanon)	0,05	WPI	(below detection)

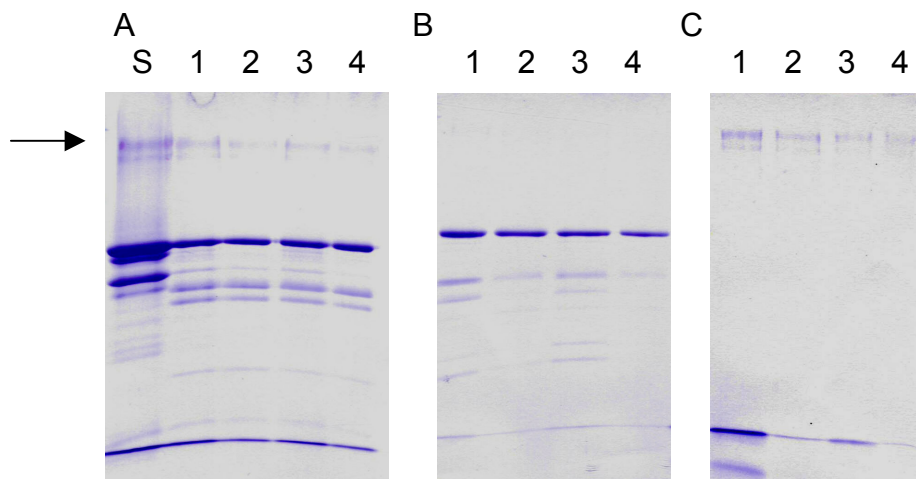
* Resultaterne er gengivet i Kvistgaard *et al.* (2003).

Der er MUC1 i alle de undersøgte fraktioner, dog mest i de lipidholdige, mens der er meget lidt, hvis overhovedet noget, i WPI. Derudover ses det, at WFC er et godt udgangsmateriale for oprensning i stor skala, eftersom det, modsat MFGM, findes i ”bulk” mængde.

Proteinkemisk karakterisering af oprenset MUC1 fra udvalgt(e) mælkefraktion(er)

Af de undersøgelser vi har gennemført, kan vi ikke se nogen forskel på MUC1 oprenset fra hhv. frisk mælk og WFC. Eksempelvis har MUC1 oprenset fra WFC stadig en intakt N-terminal, og har samme fremtoning i SDS-PAGE og Westernblotting.

Derudover har vi set på effekter af behandling med proteaserne trypsin, chymotrypsin og pepsin (Fig. 2). Hvad enten udgangsmaterialet er mælk eller WFC, viser MUC1 sig at være relativt resistent overfor fordøjelsesenzymerne trypsin og pepsin, men ikke chymotrypsin. Interessant er det, at der stort set kun er MUC1 tilbage efter pepsin behandling. Denne kendsgerning var afgørende for, at det var muligt at oprense rent MUC1 fra pepsinbehandlet WFC (se Fig. 1).



Figur 2. SDS-PAGE af den MUC1-holdige fraktion fra reverse-phase HPLC separation af WFC-protein (S) behandlet med trypsin, pH 8 (A); chymotrypsin, pH 8 (B) eller pepsin, pH 3 (C). Fordøjelse er foregået med et forhold (wt:wt) mellem protease og protein på 1:100 (1 og 2) eller 1:50 (3 og 4) i en periode på 3 timer (1 og 3) eller natten over (2 og 4). MUC1 markeret med en pil.

Effekter af MUC1 i agglutinerings-tests med relevante patogene og apatogene bakteriestammer

Binding af MUC1 (og andre fraktioner indeholdende MUC1) til forskellige bakteriestammer blev undersøgt ved agglutination tests. Hæmagglutination (HA) tests med blodceller (fra hest) og forskellige bakteriestammer er udført. I testen indgik *Salmonella* (stammerne: DT170, DT12, DT107, S5951, DT66 og S4598) og *E. coli* (stammerne: K12 og wild type). Tilstedeværelsen af MUC1 havde ikke en hæmmende effekt på bakteriernes HA-aktivitet. Der var derimod en tendens til øget HA-aktivitet ved tilstedeværelse af MUC1. En HA-inhibition kontrol test uden bakterier tilsat viste også at MUC1-BSA (2.5 mg/mL PBS) til dels agglutinerede blodceller. Efter en række eksperimenter, blev agglutinerings-testen vurderet uegnet til at undersøge denne form for vekselvirkning.

Som supplement blev en anden *in vitro* metode implementeret. I denne monitoreres bakteriens adhæsion til epitelceller høstet fra forskellige afsnit af tyndtarmen fra grise rent mikroskopisk. Metoden blev anvendt i forbindelse med PIOC-undersøgelserne (se nedenfor).

Displaceringsforsøg på segmenter af grisetarm - effekter af MUC1 overfor diverse relevante patogene bakteriestammer

Effekt af MUC1 (og andre fraktioner indeholdende MUC1) på binding af *Salmonella* eller *E. coli* til tyndtarmen fra smågrise er blevet undersøgt ved Pig Intestinal Organ Culture (PIOC) metoden. Der er dels udtaget tyndtarm fra almindelige smågrise og dels fra smågrise som er genetisk disponeret for infektion med *E. coli* O149:K88. Det har ikke med denne metode været muligt at vise en hæmmende effekt af MUC1 på binding af *Salmonella* og *E. coli* til tyndtarmen, om end der i nogle tilfælde var en lille tendens til en hæmmende effekt af MUC1 på binding af *E. coli* O149:K88 til tyndtarm fra *E. coli* O149:K88 disponerede smågrise. Et forsøg har dog givet en indikation på, at MUC1 kan hæmme binding af *E. coli* O149:K88, idet der i mikroskop kunne observeres at færre bakterieceller var bundet til epitelceller fra tyndtarm inkuberet med *E. coli* O149:K88 plus MUC1 end til epitelceller fra tyndtarm inkuberet med *E. coli* O149:K88 minus MUC1.

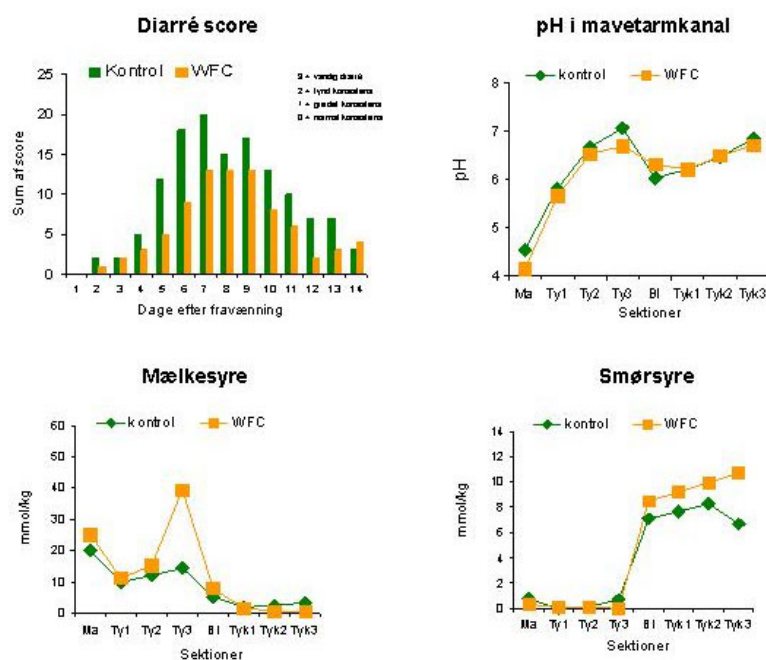
Nye eksperimenter med PIOC-model blev gennemført for at teste effekt af MUC1 i ren form samt WFC på binding af *E. coli* O149:K88 til jejunum. Resultaterne for PIOC-modellen

antydede, at MUC1 i oprenset form (1 mg/ml) hæmmer bindingen af *E. coli* O149:K88 til tyndtarmen (jejunum). Dette kunne nu ikke bekræftes af mikroskopien, som tydeligt viste binding mellem *E. coli* O149:K88 og epitelceller efter endt inkubation. WFC i koncentration på 0,1 g/ml viste ligeledes en mindre reduktion i binding af *E. coli* O149:K88 *in situ*. Denne tendens blev yderligere bekræftet ved mikroskopering, idet der blev observeret et fald i bindingen imellem bakterier og epitelceller i skrab af tarmceller inkuberet med WFC.

Vore data giver ingen klar dokumentation for, at MUC1 selvstændigt virker som “decoy” for *E. coli* O149:K88 eller andre af de undersøgte bakterier. Dette kan hænge sammen med, at det tidligere har været vist, at glykoprotein fra mælk (indeholdende MUC1) hæmmer infektioner henført til bakterietyper med S-fimbriæ, mens den benyttede PIOC-model testede for binding af bakteriestammer med F-fimbriæ. Det er imidlertid muligt, at der - som resultaterne antyder - findes komponenter i WFC, som kan hæmme bindingen af *E. coli* O149:K88 til tarmen. Vi valgte derfor til belysning af fedtkuglemembran- og evt. andre proteins funktionsrelaterede muligheder, at benytte WFC i fodringsforsøget (se nedenfor)

Effekt af MUC1 på grises tilvækst, foderudnyttelse, sundhedstilstand, tarmmorfologi og tarmøkologi

Et kombineret tilvækst- og slagteforsøg blev udført med smågrise for at undersøge effekt af 10% Whey Fat Concentrate (WFC) i fravænningsfoder på produktionsresultater samt på mave-tarm sundhed hos grise omkring fravæning. Resultaterne fra produktionsdelen viste ingen effekt af WFC i foderet på gennemsnitlig daglig tilvækst og foderudnyttelse i de første 14 dage efter fravæning (n = 20). I de efterfølgende 14-28 dage efter fravæning (n = 12) havde WFC-grisene imidlertid en signifikant lavere gennemsnitlig daglig tilvækst.



Figur 3. Resultater fra tilvækst- og fodringsforsøg.

Tilsætning af WFC i foderet medførte til gengæld en signifikant lavere gennemsnitlig diarré score over de første 14 dage efter fravæning, idet kontrolgrisene generelt havde mere lind gødningskonsistens end WFC-grisene (Fig 3.).

Resultaterne fra slagteforsøget (n = 8) viste ingen effekt af WFC på mavekarakteren og dermed på tendens til mavesår. Der blev fundet en tendens til lavere pH i maven og i sidste del af tyndtarmen hos grise fodret med WFC. Der blev ligeledes fundet en signifikant højere koncentration af mælkesyre i sidste del af tyndtarmen hos grise som havde fået tildelt WFC. Desuden havde WFC-grisene en signifikant højere koncentration af smørsyre, valerinsyre og iso-organiske syre i sidste del af tyktarmen. Der var ingen signifikant effekt af WFC på populationen af total anaerobe bakterier, mælkesyrebakterier eller coliforme bakterier, dog blev der fundet en tendens til flere mælkesyrebakterier i sidste del af tyndtarmen samt en svag tendens til færre coliforme bakterier i blindtarmen hos WFC-grisene. Der var ligeledes et øget antal gærceller i mavetarmkanalen hos WFC-grisene. Der var ingen effekt af WFC i foderet på *in vitro* binding af *E. coli* O149:K88 til tyndtarmen hos grise. Der var ligeledes ingen effekt af WFC på morfologien af krypt og villi i tyndtarmen, dog havde WFC-grisene en næsten signifikant mindre muskeltykkelse i sidste del af tyndtarmen.

Det kan ud fra resultaterne opnået i nærværende forsøg konkluderes, at WFC har en positiv effekt på mavetarmsundheden ved at øge koncentrationen af mælkesyre og sænke pH i sidste del af tyndtarmen hos grise. Dette kan formodes at have en hæmmende effekt på diarréfremkaldende bakterier i tarmen. Desuden kan det konkluderes, at grise som får tildelt WFC har mindre tendens til diarré i perioden efter fravæning. Til gengæld har WFC en negativ effekt på tilvækst hvis det tildeles ud over 14 dage efter fravæning.

Vi anbefaler at denne undersøgelse følges op af et større studium hos en svineproducent, der løbende har problemer med diarré. Dermed opnås et bedre statistisk materiale grundet det større antal smågrise, som desuden vil gå under normale forhold for husdyrbrug. Som supplement kunne man iagttage effekter hos smågrise provokerede med relevante diarrégivende bakterier.

Mucinlignende glykoprotein fra bovin mælk - PAS-3

Sideløbende med oprensningen af MUC1 er det lykkedes at oprense et protein tidligere kaldet PAS-3. Udover at PAS-3 formodentlig også er en mucin vides der kun lidt om proteinet. Arbejdet med at beskrive PAS-3 har resulteret i, at vi har isoleret og klonet en korresponderende cDNA. Hermed er hele proteinets aminosyresekvens bestemt. Øjensynlig findes der ikke et modsvarende protein i andre arter. PAS-3 er udtrykt i mange forskellige typer væv, og må således have en mere generel funktion.

“Human Genome Nomenclature Committee” har på vort forslag tildelt proteinet navnet MUC15. Endvidere er der på basis af de opnåede resultater med PAS-3/MUC15 blevet offentliggjort en artikel i Eur. J. Biochem..

Liste over publikationer

Artikler i internationale tidsskrifter

Pallesen, L.T., Andersen, M.H., Nielsen, R.L., Berglund, L., Petersen, T.E., Rasmussen, L.K. & Rasmussen, J.T. (2001) Purification of MUC1 from bovine milk-fat globules and characterization of a corresponding full-length cDNA clone. J. Dairy Sci. 84, 2591-8.

Pallesen, L.T., Berglund, L., Rasmussen, L.K., Petersen, T.E. & Rasmussen, J.T. (2002) Isolation and characterization of MUC15, a novel cell membrane-associated mucin. Eur. J. Biochem. 269, 2755-63.

Kvistgaard, A.S., Arias, C.F., López, S, Petersen, T.E., Heegaard, C.W. & Rasmussen, J.T. (2003). Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infections. Submitted.

Indlæg ved faglige kongresser, symposier o.l.

Lone Tjener Pallesen, Mikkel Holmen Andersen, Rune Lehmann Nielsen, Lars Berglund, Torben Ellebæk Petersen, Lone Kjær Rasmussen, and Jan Trige Rasmussen. (2002). "Membrane-associated mucin-type proteins in bovine milk" Poster abstract, 26th IDF Conference in Paris, Congrilaït.

Jan Trige Rasmussen, Lars Berglund, Lone Tjener Pallesen, and Torben Ellebæk Petersen (2002). "Proteins from the milk fat globule membrane" Poster abstract, 26th IDF Conference in Paris, Congrilaït

Jan Trige Rasmussen, Anne Staudt Kvistgaard, Lone Tjener Pallesen, Torben Ellebæk Petersen and Christian Heegaard (2003). Anti-microbial glycoproteins associated with bovine milk fat globules. Oral presentation, JTR. NorFa Conference; "Milk Proteins – Quality and Health Aspects". Norway.

Videnskabelige afhandlinger

Lone Tjener Pallesen (2002) Isolation and Characterization of MUC1 and MUC15 - Major Mucin-Type Glycoproteins of the Bovine Milk Fat Globule Membrane. Cand. Scient Thesis.

Faglige artikler

Rasmussen, J.T., and Petersen, T.E. (2000). Mulige gavnlige virkninger af kulhydratproteiner fra mælkens fedtkuglemembran. Mælketidende 16, 410-415.

Petersen, T.E., Sørensen, E.S., Rasmussen, J.T. , Heegaard, C.W., Fedosov, S.N, and Berglund, L. (2002) Den livsnødvendige mælk. Naturens Verden (Spec. Edition), 58-65.

Redegørelse for forskeruddannelse, herunder tilknyttede gæsteforskere og udstationeringer

Projektet har udgjort rammen for erhvervelse af kandidateksamen:

"Isolation and characterization of MUC1 and MUC15 – major mucin-type glycoproteins of the bovine milk fat globule membrane" af Lone Tjener Pallesen, juni 2002.

Redegørelse for samarbejdsrelationer nationalt og internationalt

Projektets resultater er produkt af et samarbejde mellem Lab f. Proteinkemi v. Århus Universitet, Mejeribrugets ForskningsFond og Danmarks JordbrugsForskning. DJF er repræsenteret ved forsker Lene Lind Mikkelsen og forskningsleder Bent Borg Jensen, Ffdeling for Husdyrernæring og Fysiologi.

Kristian Albertsen, Hans Bertelsen og Anne Staudt Kvistgaard, Arla Foods har formidlet leverance af industrielt forarbejdede mælkeproteiner.

Vurdering af resultaternes praktiske og videnskabelige betydning

Projektet har i overensstemmelse med FØTEK 3's målsætning været med til at bevare og udbygge det gode forskningssamarbejde, vi har med erhvervslivet. Herved er der sket en styrkelse af brobygningen mellem den offentlige og private sektor. Projektet er naturligvis i første omgang et produkt af det konstruktive samarbejde, vi har etableret med Mejeribrugets ForskningsFond. Dertil kommer, at repræsentanter fra mejeriindustrien, i anden sammenhæng, gentagne gange har konsulteret os i forbindelse med løsning af konkrete problemstillinger vedrørende mælkeproteiner.

Det er vores overbevisning, at nærværende projekt fagligt set har medvirket til at indsamle viden af grundlagsskabende karakter. Undersøgelser af anførte emner medvirker til, at der bliver sat øget fokus på betydningen af mælk, mælkekomponenter og/eller produkter heraf for ernæring og sundhed. Desuden forventes det, at den erhvervede viden vil have stor værdi, når levnedsmiddelindustrien planlægger at indføre ny og mere hensigtsmæssig teknologi, nye produkter, og når mælkens/mælkeprodukters kvalitet skal sikres.

Projektets relation til nye/andre mejerirelaterede samarbejdsprojekter

Nærværende projekt har sat fokus på mulige fysiologiske effekter af glykoproteinet MUC1 fra bovine fedtkuglemembraner og afdækket interessante effekter af et højmolekylært valleproteinprodukt (WFC). Ligeledes er der under dette projekt taget hul på studier af det nyopdagede protein MUC15. Arbejdet med at karakterisere og beskrive MUC15 yderligere fortsættes i projektet "Mælk, forekomst og mulige biologiske aktiviteter af fedtkuglemembranproteinet mucin 15", som finansieres via Mejeribrugets ForskningsFond og Innovationsloven.

