

Afslutningsrapport

Valleproteiner og kaseinmiceller

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2000-32

Maj 2000



mejeriforeningen

danish dairy board

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

Valleproteiner og kaseinmiceller

Lone Kjær Rasmussen
Esben Skipper Sørensen
Torben Ellebæk Petersen

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

Afslutningsrapport for FØTEK 2 projektet: Valleproteiner og kaseinmiceller

Projektleder og medarbejdere

Lektor Torben Ellebæk Petersen, lic. scient.
Laboratorium for Proteinkemi, Aarhus Universitet
Gustav Wieds Vej 10 C, 3.2
8000 Århus C
Tlf: 8942 5094
Fax: 8613 6597

Lone Kjær Rasmussen, Ph. D., cand. scient. (barselsorlov: marts 1998 – sep. 1998)
Esben Skipper Sørensen, Ph.D., cand. scient.
Lise Møller, laborant
Maria Vinther, laborant (indtil 15.3.1999)
Mads Bak, forskningsassistent (15.9.1996 – 31.3.1997) og Ph.D.-stud. (1.4.1997 – 31.12.1999)
Mette Skovbjerg, spec. stud. (fra 1.2.1998)

Resumé

NMR-studier af kaseinmiceller og fosforylerede fragmenters interaktion med inorganisk kalciumfosfat

Vi har benyttet ^{31}P faststof NMR med en lavere rotationshastighed for bedre at kunne bestemme forskellige typer af fosfater tilstede i kaseinmicellen. De opnåede eksperimentelle spektra er sammenlignet med spektra af modelforbindelser af uorganiske fosfater (brushit, hydroxyapatit m.v.) analyseret på samme måde og spektra af oprensede kaseiner (α_{s1} -kasein og β -kasein). Metoden giver flere informationer og dermed en forbedret tilordning af NMR signaler til de forskellige organiske/uorganiske fosfater i micellen. Endvidere støtter de nye resultater vore tidligere undersøgelser, der indikerer, at det micellare uorganiske kalciumfosfat ligner hydroxyapatit. Endvidere har vi deltaget i et samarbejde med MD Foods Udviklingscenter vedr. isolering (i processkala), karakterisering og identifikation af bioaktive fosfopeptider (CCP) fra et enzymatisk digest af kasein.

Proteiner associeret til kaseinmicellen; kaseiners effekt på den tPA-katalyserede plasminogenaktivering

Vi har undersøgt de enkelte kaseiners effekt på den tPA-katalyserede plasminogenaktivering, og har fundet at det udelukkende er α_{s2} -kasein dimer som er ansvarlig for stimuleringen af omdannelsen af plasminogen til plasmin. Endvidere har vi vist, at plasminogen binder til α_{s2} -kasein dimer og undersøgt de områder i tPA som er involveret i bindingen til dimeren. Resultaterne viser, at der er to områder i tPA-molekylet, kaldet 'finger-domænet' og 'kringle 2 domænet', der binder dimeren.

Strukturel og funktionel analyse af PP3

Ved hjælp af immunologiske analyser med antistoffer rettet specifikt mod PP3 har vi påvist at PP3 findes i fedtkuglemembranen og til dels i vallefraktionen af mælk. PP3 findes i mælk i homomultimeriske komplekser bestående af op til ti PP3 molekyler. Multimeriseringsmekanismen er ikke kendt. Analyse af PP3's aminosyresekvens indikerer tilstedeværelsen af en amphipatisk α -helix i PP3's C-terminale del og multimeriseringen kunne evt. medieres af interaktioner mellem sådanne helixer. NMR analyser af et syntetisk peptid designet ud fra sekvensen af PP3's C-terminal viser at peptidet faktisk danner en α -helix og at peptidet indsat i syntetisk fosfolipidmembraner orienterede sig med den amphipatiske helix parallelt med denne. Multimeriseringsforsøg med transglutaminase underbygger observationerne af PP3's multimeriske struktur.

"Large scale" oprensning af osteopontin

Med henblik på muligheden for kommerciel produktion og udnyttelse af osteopontin fra mælkeprotein, har vi udviklet et proces der er egnet til opskalering til industriel skala, og som ikke involverer bufferkomponenter, der er uønskede i forbindelse med produktion af fødevaringredienser. Osteopontin opkoncentreres fra sure vallepulvere ved en kombination af filtrerings- og ionbytningsteknikker til en koncentration, der er over hundrede gange den i udgangsmaterialet.

Transglutaminase-krydsbindingsstudier

Valleproteinerne β -lactoglobulin, α -lactalbumin, bovin serum albumin, lactoferrin, PAS 6/7 og PP3 er blevet oprenset og undersøgt som substrater for en kommercielt tilgængelig mikrobiel transglutaminase. Under native ikke-reducerende betingelser er β -lactoglobulin, α -lactalbumin og PP3 substrater for transglutaminase i et putrescin-inkorporerings assay, mens der i de øvrige proteiner ikke kunne detekteres nogen inkorporering af putrescinproben. Følgende reaktive glutaminrester er identificeret:

α -lactalbumin: Gln43

β -lactoglobulin: Gln155 (major site) og Gln5 (minor site)

PP3: Gln61 (major site) og Gln49 og Gln59 (minor sites)

Summary

Proteins associated with the casein micelle: The effect of individual caseins on the tPA catalyzed plasminogen activation

The effect of individual bovine caseins on the rate of plasminogen activation by tPA has been examined. Using a coupled peptidyl anilide plasminogen activation assay, we found that only dimeric α_{s2} -casein induced a concentration-dependent enhancement of the tPA-catalyzed plasminogen activation. Ligand blotting experiments showed binding of both plasminogen and tPA to dimeric α_{s2} -casein. Finally, we found that kringle 2 and the finger domain of tPA are involved in the binding to dimeric α_{s2} -casein.

NMR studies of casein micelles and interaction of phosphorylated fragments with inorganic calcium phosphate

We have used solid-state ^{31}P NMR analysis with a low rotation speed in order to gain more information about the different phosphates in the casein micelle. The obtained experimental spectra have been compared with ^{31}P NMR spectra for a series of inorganic calcium phosphates and spectra of purified bovine caseins. This method has proven very useful resulting in a better assignment of ^{31}P resonances to the different organic and inorganic phosphates in the micelle. The new improved results support our previous results which indicate that the micellar inorganic calcium phosphates exhibit structural similarities to hydroxyapatite. Furthermore, in collaboration with MD Foods Research & Development Center, we have isolated (process scale), characterized and identified bioactive phosphopeptides (CPP) from an enzymatic digest of casein.

Structural and functional analysis of PP3

By immunological techniques using antibodies raised against PP3, we have shown that PP3 is present in the milk fat globule membrane and the whey fraction of milk. PP3 occurs in milk in homomultimeric complexes of up to 10 molecules. The character of the multimer association is unknown. Analysis of the amino acid sequence indicates the presence of an amphipathic α -helix in the C-terminal of PP3, and the multimerization could be speculated to be mediated by the interaction between such helices. Liquid-phase NMR analyses of a synthetic peptide patterned on the C-terminal sequence show that the peptide actually assumes a helical conformation. Solid-phase NMR studies of the peptide in phospholipid membranes show that the peptide is oriented parallel with the membrane surface. Multimerization studies using transglutaminase support the observations of the multimeric nature of PP3.

“Large scale” purification of osteopontin

To pursue the possibility of commercial production and exploitation of osteopontin from milk protein, we have developed a purification process suitable for industrial scale production. The process does not involve chemicals unsuitable for food production. Osteopontin is concentrated from acidic whey by a combination of filtration and ion exchange chromatography to a concentration above one hundred times the concentration in the starting material.

Transglutaminase crosslinking studies

The whey proteins β -lactoglobulin, α -lactalbumin, bovine serum albumin, lactoferrin, PAS 6/7 and PP3 have been purified and analysed as substrates for a commercially available microbial transglutaminase. The analyses were performed under native non-reducing conditions and only β -lactoglobulin, α -lactalbumin and PP3 were found to be substrates for the transglutaminase in a putrescin assay. The following glutamines were identified as being reactive donor sites in the assay;

α -lactalbumin: Gln43

β -lactoglobulin: Gln155 (major site) and Gln5 (minor site)

PP3: three reactive glutamines were detected, Gln61 (major site) and Gln49 and Gln59 (minor sites)

Projektets hovedformål:

At videreføre den under FØTEK 1 påbegyndte strukturelle karakterisering af kaseinmiceller og valleproteiner. Dette arbejde ønskes udbygget til også at inkludere funktionelle studier af de to valleproteiner, PP3 og osteopontin.

Projektets forløb, resultater og kommentarer

NMR-studier af kaseinmiceller og fosforylerede fragmenters interaktion med inorganisk kalciumfosfat

Fast-stof NMR til eksperimenter med kaseinmiceller:

Vi har benyttet ^{31}P faststof NMR med en lavere rotationshastighed for bedre at kunne bestemme forskellige typer af fosfater tilstede i kaseinmicellen. Det er muligt at skelne og til dels kvantificere forskellige organiske og uorganiske typer fosfor på grund af deres forskellige elektroniske omgivelser og strukturelle mobilitet. De opnåede eksperimentelle spektra er sammenlignet med spektra af modelforbindelser af uorganiske fosfater (brushit, hydroxyapatit m.v.) analyseret på samme måde og spektra af oprensede kaseiner (α_{s1} -kasein og β -kasein). Metoden giver flere informationer og dermed en forbedret tilordning af NMR signaler til de forskellige organiske/uorganiske fosfater i micellen. Endvidere støtter de nye resultater vore tidligere undersøgelser, der indikerer, at det micellare uorganiske kalciumfosfat ligner hydroxyapatit. Resultaterne indgår i Mads Bak's Ph.d. afhandling, som er under udarbejdelse.

ERASMUS-udvekslingsstudent Anna Tsiora, Aristoteles University, Thessaloniki, Grækenland, har ligeledes været tilknyttet projektet i perioden 1. februar til medio juni 1997. Hun har primært arbejdet med kaseiner fra grisemælk. Endvidere har hun undersøgt κ -kasein fra gede- og fåremælk. Resultaterne er sammenfattet i to artikler (Rasmussen *et al.*, 1999; Rasmussen *et al.*, 2000).

Oprensning af GMP og identifikation af posttranslationelle modifikationer:

Denne fase udgår pga. flg.: Efter ansøgningen blev udarbejdet og sendt kom der flere publikationer omhandlende dette emne (Mollé & Leonil, 1995, J. Chromatography 708, 223-230; Mikiewicz *et al.*, 1996, J. Chromatography 743, 123-135). Endvidere blev der indgået et samarbejde med MD Foods Ingredients og Nam Yang Research & Development Center, Korea, i hvilken forbindelse Ph.d. Hyun Seok Jin har arbejdet med at karakterisere et specielt GMP produkt fra MD Foods Ingredients. Dette arbejde blev udført i vort laboratorium (okt. 1996 – feb. 1998).

Isolering og karakterisering af fosforylerede fragmenter til brug for strukturstudier (i FELFO-regi)

Fosforylerede kaseinfragmenter er blevet oprenset ved brug af ionbytning og reverse-phase HPLC og identificeret ved sekvensanalyse og massespektroskopi. Udgangsmaterialet har været CPP (MD Foods) og vi har isoleret β -kasein 1-25. For at isolere et kortere peptid indeholdende én "cluster sekvens": --SerP-SerP-SerP--- er der foretaget diverse enzymatiske kløvninger, separation af peptiderne og sekvens- og massespektroskopiske analyser af udvalgte peptider. Enzymatisk degradering ved brug af thermolysin var en velegnet metode, da β -kasein 12-20 kan isoleres fra dette dekrat kun ved brug af ionbytning.

Endvidere har vi deltaget i et samarbejde med MD Foods Udviklingscenter vedr. isolering (i processkala), karakterisering og identifikation af bioaktive fosfopeptider (CPP) fra et enzymatisk digest af kasein. Resultaterne fra dette arbejde er publiceret i en artikel (Ellegård *et al.*, 1999).

Identifikation og funktion af proteiner associeret til kaseinmicellen

Vi har undersøgt de enkelte kaseiners effekt på den tPA-katalyserede plasminogenaktivering, og har fundet at det udelukkende er α_{s2} -kasein dimer som er ansvarlig for stimuleringen af omdannelsen af plasminogen til plasmin. Endvidere har vi vist, at plasminogen binder til α_{s2} -kasein dimer og undersøgt de områder i tPA som er involveret i bindingen til dimeren.

Resultaterne viser, at der er to områder i tPA-molekylet, kaldet 'finger-domænet' og 'kringle 2 domænet', der binder dimeren. For at identificere det/de områder i dimeren som direkte er involveret i stimuleringen af omdannelsen af plasminogen til plasmin, blev proteolytiske fragmenter af proteinet genereret, isoleret og karakteriseret. Enzymet pepsin (kløvning i 5% HCOOH i 0.5 time ved 37 °C) blev valgt, da SDS-PAGE analyse viste at dette enzym resulterede i forholdsvis få og veldefinerede fragmenter. Det totale pepsin digest var stadig i stand til at stimulere dannelsen af pepsin. Ved brug af gelfiltrerings kromatografi (Superose 12 søjle i 50 mM NH₄HCO₃) var det muligt at opnå delvis oprensning af de forskellige fragmenter. Undersøgelse af de isolerede fragmenter ved brug af det etablerede plasminogen aktiveringsassay viste, at det ikke var muligt at identificere få pepsinfragmenter og dermed området/områder i dimerisk α_{s2} -kasein involveret i stimuleringen af plasminogen aktivering. Resultaterne er sammenfattet i to artikler (Heegaard *et al.*, 1997a,b).

Undersøgelse af osteopontins associering til kaseinmicellen:

Vask af isolerede kaseinmiceller med stimuleret mælkeultrafiltrat (SMUF) efterfulgt af Western-blotting analyse med antistoffer mod osteopontin viser, at osteopontin er associeret med kaseinmicellen. Tilsvarende vaskeforsøg med stigende koncentration af NaCl viste, at osteopontin stadig er associeret til kaseinmicellerne. Styrken af NaCl-buffere (op til 1 M) indikerer, at associationen/bindingen til kaseinmicellen ikke blot er en svag ionisk interaktion.

Strukturel og funktionel analyse af PP3

Karakterisering af glykosyleringer på PP3:

Denne fase udgår, da der efter glykosyleringen er udarbejdet og sendt er kommet en artikel der fuldstændig beskriver glykosyleringen af PP3 (Giradet *et al.*, 1995, Eur J. Biochem., 234, 939-946).

Undersøgelse af PP3's multimeriske natur og associering/binding til fedtkuglemembranen:

Ved hjælp af immunologiske analyser med antistoffer rettet specifikt mod PP3 har vi påvist at PP3 findes hovedsageligt i fedtkuglemembranen og til dels i vallefraktionen af mælk, mens der ikke kunne detekteres PP3 i kaseinfraktionen. Der har tidligere været rapporteret i litteraturen at PP3 skulle findes i multimeriske komplekser i mælk. For at undersøge denne multimerisering har vi foretaget kalibrerede gelfiltreringer af forskellige ubehandlede mælkeprøver og bestemt elueringsvolumenet og dermed den molekylære masse af de PP3-indeholdende fraktioner. Massespektroskopiske analyser viser at PP3 har en masse på 18,7 kDa, hvilket stemmer fint overens med den teoretiske masse af polypeptidkæden med tilhørende modifikationer.

Vi har under dette projekt vist, at PP3 under gelfiltrering af ubehandlet mælk eluerer i et volumen, der modsvarer en molekylær masse på ca. 190 kDa. Gelfiltreringen giver altså en masse der er ca. 10 gange større end den teoretiske, som er verificeret ved massespektrometrisk analyse. Denne massedifferens er for stor til at kunne forklares på andre måder end, at PP3 må forefindes i et multimerisk kompleks. Faktisk kunne PP3 iagttages som værende det første protein der eluerede fra gelfiltreringssøjlen, før immunoglobulinerne. Vi kender ikke den specifikke mekanismer eller binding med hvilken det multimeriske kompleks dannes, men det er interessant at bemærke, at analyse af proteose-pepton protein, altså kraftigt varmebehandlet mælkeprotein, ligeledes resulterer i et elueringsvolumen for PP3 der modsvarer en masse på ca. 190 kDa. Det kan altså konkluderes, at

interaktionen enten er varmemestabil (90 °C, 30 min) eller mere sandsynligt, at proteinerne er i stand til at reassocieres til det originale kompleks i opløsningen umiddelbart før gelfiltreringen. Manuskript omhandlende den multimeriske struktur og identifikation af PP3 i fåre- og gedemælk er publiceret (Sørensen *et al.*, 1997)

Som nævnt kendes multimeriserings teknikken ikke. Analyse af aminosyresekvensen viser mulighed for dannelse af en amphipatisk α -helix i PP3's C-terminale del. Multimeriseringen kunne evt. medieres af interaktioner mellem sådanne helixer, hvilket tidligere har været beskrevet for flere antimikrobielle peptider indeholdende amphipatiske α -helixer. For at teste denne hypotese har vi undersøgt et syntetisk peptid designet ud fra sekvensen af de sidste C-terminale 38 aminosyrer i PP3. Peptidet blev undersøgt vha. circular dichroism spektroskopi, væske-fase og fast-stof NMR spektroskopi i samarbejde med prof. Niels Christian Nielsen, Laboratorium for Biomolekylær NMR Spektroskopi, Aarhus Universitet. Væske-fase NMR og CD analyserne viste, at PP3 peptidet har en α -helix struktur med et "bend" omkring Lys19. Fast-stof NMR analyser af to ^{15}N berigede PP3 peptider indsat i syntetiske fosfolipidmembraner viste, at peptidet associerede til membranoverfladen med den amphipatiske helix orienteret parallelt med denne. Resultaterne er publiceret i én artikel (Bak *et al.*, 2000).

PP3 er et godt transglutaminase substrat, der indeholder både reaktive lysin og glutaminrester. Proteinet er derfor blevet benyttet som eksempel under forsøgene med lysin-prober omtalt under fase Q. I den forbindelse har vi observeret, at PP3 polymeriserer efter et tilsyneladende ordnet mønster. Vi har observeret at PP3 i tilstedeværelse af transglutaminase relativt hurtigt krydsbindes til tetramer-størrelse. Yderligere polymerisering til multimer af højere grad sker først efter lange inkubationstider. Dette underbygger vore tidligere resultater, der viser at PP3 forefindes i multimerer i ubehandlet mælk og valle. Den transglutaminase-medierede krydsbinding af tilsyneladende ordnede PP3 multimerer giver mulighed for karakterisering af de dele af PP3, der tager del i multimeriseringen. Det skulle således nu være muligt at teste hypotesen om en multimerisering medieret af PP3's C-terminale amphipatiske α -helix. Resultaterne fra multimeriseringsforsøgene indgår i Mette Skovbjerg's cand. scient. afhandling, som er under udarbejdelse.

ERASMUS-udvekslingsstuderende, Ida Lister, Imperial College, London, har været tilknyttet projektet i perioden oktober 1996 til juni 1997. Hun har arbejdet med PP3 fra gedemælk. PP3 er oprenset fra gedemælk og den primære struktur af proteinet er bestemt. Den caprine sekvens har meget stor identitet (88% på aminosyreniveau) med den bovine homolog. Resultaterne af arbejdet er publiceret i en artikel (Lister *et al.*, 1998).

Studier af PP3's effekt på lipolysen:

Der eksisterer i litteraturen en række arbejder, der indikerer at PP3 og PP3-indeholdende fraktioner har en inhiberende effekt på den naturlige lipolyse i mælk. Det var derfor vores intention at foretage en dybdegående analyse af højt-oprenset PP3's effekt på lipolysen.

I samarbejde med seniorforsker Jacob Holm Nielsen og seniorforsker Lotte Bach Larsen på Afdeling for Råvarekvalitet, Statens Husdyrbrugsforsøg, Forsøgscenter Foulum, har vi arbejdet med at etablere et pålideligt assay der direkte kunne benyttes til monitorering af forskellige komponenters effekt på lipolysen af triglycerider.

Det viste sig dog at være yderst vanskeligt at udarbejde en stabil emulsion af triglycerider med et lavt niveau af detergent og det er ikke lykkedes i projektperioden at få udviklet et stabilt assay.

Studier af PP3 som antibakteriel agent:

Oprensat og sterilfiltreret PP3 er blevet testet for antibakteriel aktivitet overfor følgende bakteriestammer: *Haemophilus influenzae* serotype b (stamme HK393), *Nesisseria meningitidis pneumoniae* (stamme NCTC7465) og *Streptococcus mitits* 1 (stamme SK607). Hæmningen er undersøgt ved påvisning af hæmningszoner omkring PP3 placeret på agarplader inokuleret med de respektive bakteriestammer i renkultur. Forsøgene er foretaget hos professor Mogens Kilian på Institut for Medicinsk Mikrobiologi og Immunologi, Aarhus Universitet. Analyserne viste ingen signifikant PP3-medieret hæmning af de undersøgte bakteriestammer.

Endvidere har vi testet PP3 for mitogen aktivitet i cellevækst-assays. Resultaterne har vist sig yderst interessante idet PP3 inhiberer mitogen aktivitet i primær kultur og cellelinier fra bovin yverepithel (Mac-T). Inhiberingen er koncentrationsafhængig og kan måles helt ned i det lave nanomolære område. Denne koncentration er signifikant lavere end koncentrationen af PP3 i råmælken, og vi må således formode at PP3 også har indflydelse på cellevæksten i yveret.

Kontroller med osteopontin og PAS 6/7 havde ingen effekt på cellevæksten.

PP3 præparationerne er blevet undersøgt for tilstedeværelse af andre specifikke inhibitorer af cellevækst. Specielt har vi vha. immunologiske analyser vist, at mammary derived growth inhibitor (MDGI) ikke er tilstede i de analyserede præparationer. Denne inhibitor er specielt interessant, da den er aktiv i subpicomolære koncentrationer og findes associeret med fedtfraktionen af mælk, hvor også PP3 findes.

Virkemekanismen for PP3's inhibering af den mitogene aktivitet er ikke kendt, men det er sandsynligt, at PP3 via den amphipatiske α -helix i C-terminalen kan permeabilisere cellemembranen og derved lysere cellerne (se ovenfor).

Strukturel og funktionel analyse af osteopontin

Karakterisering af glykosyleringer på osteopontin:

Under projektets forløb er "Large scale oprensning af osteopontin" blevet prioriteret som følge af intensiveret samarbejde med MD Foods Ingredients. Det har derfor ikke været muligt i projektperioden at fuldføre karakteriseringen af glykosyleringer på osteopontin.

"Large scale" oprensning analyse af osteopontin

Vi har under dette projekt arbejdet meget med oprensningen af osteopontin fra mælk. Både med henblik på oprensning af osteopontin til analyser her på laboratoriet og til diverse samarbejdspartnere. Forsøg med oprensning af osteopontin fra råmælk uden brug af varmebehandling og syrefældning giver ikke dét udbytte og den renhed, som kan opnås ved benyttelse af den tidligere publicerede metode (Sørensen *et al.*, 1993). Med henblik på muligheden for kommerciel produktion og udnyttelse af osteopontin fra mælkeprotein, har vi arbejdet på at udvikle en proces der er egnet til opskalering til industriel skala, og som ikke involverer bufferkomponenter, der er uønskede i forbindelse med produktion af fødevaringredienser. En række groft fraktionerede mælkeproteinfraktioner blev analyseret via Western blotting for indhold af osteopontin (og osteopontinfragmenter) og det kunne konkluderes, at de bedste udgangsmaterialer er sure vallepulvere, der ikke har været udsat for osteløbe induceret proteolyse. Analyse af oste-vallepulvere viste, at disse indeholdt store mængder af osteopontin fragmenter, som formentligt er genereret af enzymerne i osteløben. Lignende fragmenter kan i mindre grad observeres ved Western blot analyse af ubehandlet mælk, og må formodes at skyldes plasminaktivitet i mælken.

Anionbytning på Q-sepharose resin kan benyttes til oprensning af en osteopontin beriget valleproteinfraktion. Renheden af den oprensede osteopontin fraktion er dog ikke tilfredsstillende,

hvorfor Q-sepharose kromatografi må kombineres med andre filtrerings- og/eller kromatografiske trin for at opnå tilfredsstillende udbytter og renhed.

Vi har løbende evalueret osteopontin indhold i forskellige valleprøver fra pilotforsøg foretaget på MD Foods Ingredients (MDFI). Vi har analyseret flere forskellige metoder til oprensning af osteopontin, heriblandt anionbytning, ultrafiltrering og mineraladsorption. Ultrafiltrering og mineraladsorption er foregået ved MDFI's anlæg i Nr. Vium, mens anionbytningsforsøgene er foretaget i vort laboratorium. Her har vi udviklet en simpel one-step proces til oprensning af en kraftigt osteopontin-beriget proteinfraktion. Oprensningen er foretaget på en PA agarose anionbytter. Et resin som er yderst pH og trykstabil, og derfor velegnet til processkala oprensning. Processen udgøres i korte træk af en påsætning af prøven på søjlen (op til 50 g valle pr. 10 mL resin), efterfulgt af en vask med salt for at frigøre løst bundne proteiner, specielt β -lactoglobulin. Herefter elueres osteopontin-fraktionen med en stærk base, prøven neutraliseres og frysetørres. Ved denne proces elueres osteopontin i en proteinfraktion, der kun udgør ca. 0,6% af startmaterialet. Dette simple kromatografiske oprensningstrin resulterer altså i en over 100 gange opkoncentrering af osteopontin.

En oversigtsartikel omhandlende osteopontin er under udarbejdelse til "*Mælkeritidende*".

HER I VI KOMMET TIL

Transglutaminase krydsbindingsstudier

Oprensning af valleproteiner:

Valleproteinerne β -lactoglobulin, α -lactalbumin, bovine serum albumin, lactoferrin, PAS 6/7 og PP3 er blevet oprenset til brug i transglutaminase-studier. PAS 6/7 og PP3 er oprenset som tidligere beskrevet (Sørensen & Petersen, 1993, J. Dairy Res. 60, 189-197; Hvarregaard et al., 1996, Eur J Biochem. 240, 628-36). De øvrige valleproteiner er oprenset ved ionbytning og gelfiltrerings kromatografi.

Undersøgelse af valleproteiner som substrat for transglutaminaser:

Oprensede valleproteiner (β -lactoglobulin, α -lactalbumin, bovin serum albumin, lactotransferrin, PAS 6/7 og PP3) er blevet analyseret i et transglutaminase-putrescine assay for at undersøge om de er substrater for transglutaminase. Forsøget udførtes under ikke-denaturende og ikke-reducerende betingelser.

Ved inkubation med ^{14}C -mærket putrescine (en lysin-analog) i tilstedeværelse af en vævs-transglutaminase (Sigma) kunne der detekteres inkorporering i alle de analyserede proteiner. Dog er inkorporeringen af putrescin på proteinerne BSA, lactotransferrin og PAS 6/7 yderst ringe og det var ikke muligt at lokalisere de reaktive aminosyrer (se nedenfor). β -lactoglobulin, α -lactalbumin og PP3 var alle yderst gode substrater for vævs-transglutaminasen under ikke-reducerende betingelser. Senere i projektet modtog vi en mikrobiel transglutaminase fra Novo Nordisk. En transglutaminase af denne type er kommercielt tilgængelig og er fuldt ud kompatibel med fødevareproduktion, så det blev i samråd med DTU og KVL besluttet at benytte dette enzym i fremtidige studier af transglutaminering af mælkeproteiner. Det var oplyst at denne mikrobielle transglutaminase, modsat vævstype-analogen, skulle være uafhængig af kalcium-ioner. Undersøgelser af den mikrobielle transglutaminases reaktionsbetingelser viste at enzymets aktivitet nedsættes betydeligt, dog uden at være fuldstændigt hæmmet, i tilstedeværelse af EDTA. Dette indikerer at enzymet har en vis afhængighed af kalcium-ioner eller andre divalente metalioner.

Inkubation med β -lactoglobulin og α -lactalbumin med den mikrobielle transglutaminase i putrescine-assayet viste at disse proteiner var gode substrater for den mikrobielle transglutaminase.

Lokalisering af potentielle transglutaminase-reaktive aminosyrer:

Vi har vist at PP3 er substrat for vævstype-transglutaminase og indeholder både reaktive glutamin- og lysinrester, idet proteinet er i stand til at homopolymerisere i tilstedeværelse af transglutaminasen. Ved inkubering af PP3 med transglutaminase og molært overskud af [^{14}C]putrescine og efterfølgende enzymatisk kløvning af proteinet, separation af peptiderne og scintillationstælling af fraktionerne har vi identificeret en major (Gln61) og to minor (Gln49 og Gln59) transglutaminase-reaktive glutaminrester. Resultaterne er publiceret i en artikel (Sørensen *et al.*, 1999).

Oprensat lactotransferrin, bovin serum albumin og PAS 6/7 er blevet undersøgt som substrat for transglutaminase. Inkubering af proteinerne med transglutaminase og molært overskud af [^{14}C]putrescine viste, at begge proteiner var dårlige substrater både når den mikrobielle transglutaminase og vævstransglutaminase (fra marsvin) blev benyttet. Efterfølgende enzymatisk kløvning af proteinerne, separation af peptiderne og scintillationstælling af fraktionerne viste ingen opmærkning af glutaminrester. Lactotransferrin og bovin serum albumin har tilsyneladende ingen transglutaminase-reaktive glutaminrester, hvilket er i overensstemmelse med tidligere resultater i litteraturen (her er der benyttet vævstransglutaminase). Grunden til at der ikke kan detekteres nogle reaktive glutaminrester kan sikkert tilskrives proteinernes globulære strukturer og ikke transglutaminase specificitet.

Inkubering af α -lactalbumin, henholdsvis β -lactoglobulin med den mikrobielle transglutaminase og molært overskud af [^{14}C]putrescine viser at begge proteiner indeholder transglutaminase reaktive glutaminrester. Efterfølgende blev de opmærkede proteiner underkastet tryptisk proteolyse og de dannede peptider separeret ved reverse-phase HPLC. Scintillations tællinger af fraktioner af alle peptiderne viste hvilke peptider, der indeholdt reaktive glutaminer med den radioaktive tracer inkorporeret. Disse fraktioner blev genoprenset og karakteriseret ved aminosyresekventering.

α -lactalbumin: Inkorporering af putrescine er kun identificeret på en glutaminrest, Gln43.

β -lactoglobulin: Inkorporering af putrescine blev fundet på 2 glutaminrester: Gln155 og Gln5, hvor Gln155 stod for over 90% af radioaktiviteten. Interessant er det at bemærke, at ingen opmærkning blev observeret på Gln159, som befinder sig kun 4 aminosyrer fra C-terminalen. Denne observation er i modstrid med resultater publiceret af Coussons *et al.*, 1992; Biochem J. 283, 803-806, som netop rapporterer om opmærkning på både Gln155 og Gln159, med sidstnævnte som den foretrukne aminacceptor. Opmærkningen på Gln5 har ikke tidligere været publiceret. Manuskript er under udarbejdelse (Skovbjerg *et al.*, 2000).

Lokalisering af potentielle amidonor sites ved brug af en specifik probe har været problematisk. Vi har tidligere, med succes, benyttet en probe med en N-terminal dansylgruppe påhæftet (Dns-PGGQQIV). Dansylgruppen, som er fluorescerende, giver også en absorbans ved 354 nm, hvorved det er muligt at detektere inkorporeringen af proben samtidig med en monitorering af de enzymatisk fremkomne peptider (f.eks. 214 nm). Følsomheden er dog ikke tilstrækkelig, og vi har derfor brugt den samme probe, hvor dansylgruppen er blevet udskiftet med en radioaktiv mærket acetylgruppe ($^{14}\text{CH}_3\text{CO-PGGQQIV}$). Imidlertid har det vist sig, at denne probe hæmmer den mikrobielle transglutaminase således, at der ingen inkorporering sker. Den N-terminale dansylgruppe spiller altså en væsentlig rolle, hvis man vil benytte PGGQQIV peptidet som specifik probe til lokalisering af potentielle transglutaminasereaktive lysin rester. På baggrund af disse erfaringer fik vi

syntetiseret en dansyleret probe, hvor en af aminosyrene var radioaktivt mærket. Desværre viste denne probe sig heller ikke at kunne benyttes til lokalisering af reaktive lysinrester og det har derfor ikke været muligt at identificere disse aminosyrer i de testede proteiner.

Transglutaminase krydsbinding af native kaseinmiceller og krydsbinding af valleproteiner til kaseinmiceller:

Disse faser er endnu ikke nået at blive undersøgt.

Nye valleproteiner:

Der ikke identificeret nye valleproteiner.

Lister over publikationer:

1. Artikler i internationalt anerkendte tidsskrifter:

Heegaard, C. W., Andreasen, P. A., Petersen, T. E. & Rasmussen, L. K. (1997a) Binding of plasminogen and tissue-type plasminogen activator to dimeric α_{s2} -casein accelerates plasmin generation. *Fibrinolysis & Proteolysis* 11, 29-36.

Sørensen, E. S., Rasmussen, L. K., Møller, L. & Petersen, T. E. (1997) Localization and multimeric nature of component PP3 in bovine milk. Purification and characterization of PP3 in caprine and ovine milk. *J Dairy Sci.* 80,3176-318.

Rowatt, E., Sørensen, E. S., Triffitt, I., Viess, A. & Williams, R. J. (1997) An examination of the binding of aluminium to protein and mineral components of bone and teeth. *J Inorg. Biochem.* 68,235-238.

Lister, I. M. B., Rasmussen, L. K., Johnsen, L. R., Møller, L., Petersen, T. E. & Sørensen, E. S. (1998) Primary structure of caprine PP3: amino acid sequence, phosphorylation, and glycosylation of component PP3 from the proteose-peptone fraction of caprine milk. *J Dairy Sci.* 81,2111-2115.

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.

Sørensen, E. S., Rasmussen, L. K. & Petersen, T. E. (1999) Component PP3 of bovine milk is a substrate for transglutaminase. Sequence location of putative cross-linking sites. *J Dairy Res.* 66, 145-150.

Rasmussen, L. K., Johnsen, L. R., Tsiora, A., Sørensen, E. S., Thomsen, J. K., Nielsen, N. C., Jakobsen, H. J. & Petersen, T. E. (1999) Disulphide-linked caseins and casein micelles. *Int. Dairy J.* 9,215-218.

Tian, J. T., Sørensen, E. S., Butler, W. T., Lopez, C. A., Sy, M-S., Desai, N. K. & Denhardt, D. T. (1999) Regulation of NO synthesis included by inflammation mediators in RAW264,7 cells: Collagen prevents inhibition by osteopontin. *Cytokine*, in press

Ellegård, K. R., Gammelgård-Larsen, C., Sørensen, E. S. & Fedosov, S. (1999) The bioactive casein phosphopeptides (CPP). Process scale chromatographic isolation, characterization and identification of tryptic CPPs. *Int. Dairy J* 9, 639-652.

Bak, M., Sørensen, M. D., Sørensen, E. S., Rasmussen, L K., Sørensen, O. W., & Petersen, T. E. (2000) The structure of the membrane-binding 38 C-terminal residues from bovine PP3 determined by liquid- and solid-state NMR spectroscopy. *Eur. J Biochem.* 216, 1-13.

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

2. Indlæg ved kongresser, symposier 0.1..

Heegaard, C. W., Andreassen, P. A., Petersen, T. E. & Rasmussen, L K (1997b) Dimeric α_{s2} -casein, a novel matrix for tissue-type plasminogen activator catalyzed plasminogen activation. *Livest. Prod. Sci.* 50, 149-150.

Sørensen, E. S., Rasmussen, L K, Møller, L, Vinther, M. & Petersen, T. E. (1997) Valleproteiner og kaseinmiceller. Mejeriforskningsdag, Århus Universitet. 1997.

Sørensen, E. S., Rasmussen, L K., Møller, L, Vinther, M. & Petersen, T. E. (1998) Valleproteiner og kaseinmiceller. Levnedsmiddelkongres, Danmarks Tekniske Universitet, Lyngby, 1998

Petersen, T. E., Rasmussen, L K, Berglund, L E., Sørensen, E. S., Rasmussen, J. T., Heegaard, C. W., Fedosov, S. N., Johnsen, L B., Andersen, M. R, Larsen, L B. & Benfeldt, C. (1999) Identification and characterization of new milk proteins. Proceedings of 25th International Dairy Congress, 21-24 September, Aarhus, Denmark

4. Anden formidling:

The 6th International Summer School

(foredrag i Bio 1 - Protein Purification and Characterization, ESS) 5-16 august 1996

Jyväskylä, Finland

Besøgt Universitetet i Kuopio, Finland (foredrag, ESS)

14-15 august 1996

Department of Biochemistry and Biotechnology Kuopio, Finland, (ESS)

Hannah Symposium "Caseins and caseinates: Structures, interactions, networks" (foredrag, LKR)

21.-23. maj 1997

Ayr, Skotland.

Arrangeret og afholdt seminar i Forskerparken (Laboratorium for Proteinkemi) med Carl Holt, David J. Flint og Gordon J. Allan, Hannah Research Institute, Scotland, den 28. januar 1999.

Efteruddannelseskursus "Mælkeproteiner og mælkefedt. Ernæringsforhold"
(foredrag, LKR & ESS)

arrangeret af Dansk Mejeriingeniør Forening, Danmarks Mejeritekniske Selskab og Foreningen af mejeriledere og funktionærer, 12.-13. marts 1997 på Dalum tekniske Skole & Dalum Landbrugsskole, Odense

5. Planlagte publikationer & artikler:

Skovbjerg, M. Rasmussen, L. K., Petersen, T. E., Rasmussen, G., & Sørensen, E. S. (2000)
Localization of potential microbial transglutaminase-reactive sites in bovine β -lactoglobulin and α -lactalbumin.

Sørensen, E. S. et al. (2000) Osteopontin - et multifunktionelt mælkeprotein, Mælkeritidende.

Rasmussen, L. K., Tsiora, A., Sørensen, E. S. & Petersen, T. E. (2000) Multimeric forms of caseins from different species.

Redegørelse for forskeruddannelser, herunder tilknyttede gæsteforskere

I forbindelse med et samarbejde mellem MD Foods Ingredients og Nam Yang Research & Development Center, Korea, har Ph.D. Hyun Seok Jin arbejdet med at karakterisere et specielt GMP produkt fra MD Foods Ingredients. Dette arbejde er blevet udført i vort laboratorium (okt. 1996 - feb. 1998).

Esben S. Sørensen har deltaget i et post doc. kursus: EMBO Course "Advanced Methods in Biological Mass Spectrometry" arrangeret af prof. Matthias Mann 10-17 oktober 1997, EMBL, Heidelberg, Tyskland. Endvidere har ESS deltaget i Bruker MALDI user meeting i 1998 og 1999 i Sverige.

Mette Skovbjerg har været tilknyttet projektet fra 1.02.1998. Hendes cand. scient. afhandling er under udarbejdelse. Mads Bak har ligeledes været tilknyttet projektet siden 15.09.1996. Hans Ph.D.-afhandling er under udarbejdelse.

ERASMUS-udvekslingsstuderende, Ida Lister, Imperial College, London (i perioden oktober 1996 til juni 1997), og Anna Tsiora, Aristoteles University, Thessaloniki, Grækenland (i perioden 1. februar til medio juni 1997) har midlertidigt været tilknyttet projektet.

Redegørelse for samarbejdsrelationer nationalt og internationalt

Under dette FØTEK 2 projekt har vi forsynet en række forskningsgrupper med højt oprenset osteopontin til test og analyse i forskellige biologiske og medicinske forsøg. For to af samarbejdsprojekterne er der på nuværende tidspunkt kommet publikationer.

Rowatt *et al.* har undersøgt Al^{3+} bindingen til forskellige proteiner, der indgår som komponenter i knogler og tænder. Osteopontin bandt $32,63 \pm 8,0$ mol Al^{3+} /mol osteopontin med en dissociationskonstant på 0,140. Altså et relativt stort antal aluminiumsioner med en relativt svag affinitet. Dette minder om tidligere undersøgelser af calcium-ioners binding til osteopontin. Resultaterne er publiceret (Rowatt *et al.*, 1997).

Tian *et al.* har vist at osteopontin er involveret i reguleringen af makrofager under visse fysiologiske betingelser. Resultaterne er publiceret (Tian *et al.*, 2000)

Vi har under FØTEK 2-perioden haft samarbejde med flg. grupper:

Prof. Niels Chr. Nielsen og Ph.d.-stud. Mads Bak, Laboratorium for Biomolekylær NMR Spektroskopi, Aarhus Universitet.

Prof. Mogens Kilian, Institut for Medicinsk Mikrobiologi & Immunologi, Aarhus Universitet

Seniorforsker Lotte Bach Larsen og seniorforsker Jakob Holm Nielsen, Afdeling for Råvarekvalitet, Statens Husdyrbrugsforsøg, Forsøgscenter Foulum

Lektor Vibeke Barkholdt, DTU, København

Prof. Karsten B. Qvist, KVL, København

MD Foods Ingredients, Nr. Virum

MD Foods Udviklingscenter, Brabrand

Vurdering af resultaternes praktiske og videnskabelige betydning

Projektet har givet signifikant og ny grundlags skabende viden om mælkeproteiners struktur og funktion, og har således resulteret i publikation af en række videnskabelige artikler i internationalt anerkendte tidsskrifter.

Implementering af NMR teknikker har givet original viden om forskellige uorganiske og organiske fosfater i micellerne. Studier af de til micellen associerede proteiner, plasminogen og dens aktivator, tPA, har givet nye informationer om aktivering af plasminogen i mælk. Transglutaminase krydsbindingsstudier har givet ny viden om anvendelse af en mikrobiel transglutaminase til polymerisering af valleproteiner. Og studier af de to valleproteiner, PP3 og osteopontin har resulteret i en viden der potentielt kan anvendes i en mejeriindustriell udnyttelse af disse proteiner. Specielt har resultaterne af osteopontin delen af projektet givet ophav til igangsættelse af et samarbejdsprojekt mellem Laboratorium for Proteinkemi og MD Foods. Projektets grundlag er de resultater og erfaringer der er opnået under dette FØTEK 2-projekt.

