

# Afslutningsrapport

Mælkeprotein – undersøgelse og isolation af komponenter med potentielt forebyggende virkning mod virusinduceret diaré

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2007-82

*Januar 2007*



**mejeri**foreningen

danish dairy board

**Afslutningsrapport for Innovationslovsprojektet:**

**Mælkeprotein, undersøgelse og isolation af komponenter med potentielt forebyggende  
virkning mod virusinduceret diaré**

Periode: 01-05-2003 til 30-04-2006

Projektansvarlig  
Jan Trige Rasmussen

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

## **Projektledelse og øvrige medarbejdere**

### Projektledelse

Jan Trige Rasmussen, cand.scient., ph.d.  
Laboratorium for Proteinkemi, Aarhus Universitet.  
Tel. 89 42 50 93, Fax: 89 42 50 44.  
E-mail: [jatr@mb.au.dk](mailto:jatr@mb.au.dk).

### Øvrige medarbejdere:

Lone Tjener Pallesen, cand.scient., ph.d.-studerende,  
Margit Skriver Rasmussen, laboratorietekniker,  
Anni Bojsen, laborant,  
Mikkel Bjerg Kongsbak, præspeciale- og specialestuderende

## Resumé

Rotavirus er en vigtig årsag til diaré hos børn og kan føre til kraftige dehydreringer, sommetider med dødeligt udfald. Tidligere studier har vist at spædbørn, der ammes er langt bedre beskyttet mod symptomatiske infektioner, og det har været foreslået, at mælkefedtkuglemembranproteinet lactadherin kunne være delvist ansvarlig for denne effekt. *In vitro* studier har vist, at human lactadherin, modsat den bovine ortolog, er i stand til at inhibere rotavirus infektivitet. Derudover har bovint MUC1 og et kommercielt bovint valle proteinkoncentrat (WFC) vist sig at være effektive. Sigtet med dette projekt var at identificere de virksomme komponenter i WFC samt dokumentere den bagvedliggende biologiske mekanisme.

Nærværende rapport beskriver udførte eksperimenter, der viser, at WFC har en bredspektret effekt mod infektion af to humane intestinale cellelinier (Caco-2 og FHS74 Int) med fire forskellige rotavirusstammer. (Wa, RRV, YM og RF). Fra WFC kunne der isoleres en proteinfraktion (CM3Q3), som ligeledes effektivt hæmmer rotavirus *in vitro* infektivitet. Oprensningen er opnået ved brug af to på hinanden følgende ionbytningskromatografi-trin. Det er vist, at hovedkomponenten i CM3Q3 er IgG, og at bioaktiviteten højst sandsynligvis er knyttet til denne komponent.

Der er foretaget yderligere screeninger med henblik på at undersøge, om der skulle være andre proteiner med antirotavirusaktivitet i WFC. Der blev også gennemført tests med MUC15 og PP3. Der blev ikke identificeret yderligere kandidater, og det blev konkluderet, at det med de tilgængelige teknikker vil blive vanskeligt at identificere nye inhibitoriske komponenter.

Den biologiske aktivitet af det isolerede CM3Q3 viste sig at være relativt holdbar, idet der kun var begrænset effekt af ekstraktion med organiske solventer samt behandling med urinstof og frysetørring. Ikke desto mindre viser eksperimenterne, at WFC skal behandles på passende vis (temperatur) under fremstillingen.

Evnen til at inhibere rotavirus infektivitet *in vivo* blev analyseret ved brug af voksne BALB/c mus og den murine EMcN stamme i to forskellige mængder (10 og 100 gange mere end 50% viral shedding dosis). WFC, MUC1, lactadherin og CM3Q3 blev testet. Det var kun CM3Q3, der i signifikant grad var i stand til at påvirke afgivelse af rotavirus til afføringen, når den høje viruskoncentration blev anvendt. Detektion af specifikke rotavirusantistoffer i serum viste, at alle musene fra høj-dosis-gruppen var blevet inficeret. Eksperimenterne med den lave dosis rotavirus antydede, at alle de testede proteiner kunne påvirke infektiviteten. Det var dog kun MUC1, WFC and CM3Q3 der kunne forhindre tilstedeværelse af virale serumantistoffer.

Fordelene ved at bruge bovine immunoglobuliner til at inducere passiv immunitet mod rotavirus er allerede dokumenteret indgående. Der har dog været mest fokus på at bruge mælkederivater fra immuniserede køer, specielt kolostrum. Dette arbejde demonstrerer imidlertid tilstedeværelse af en betragtelig mængde antirotavirale komponenter i et almindeligt valle produkt, der kunne tænkes at blive et alternativ til kolostrumafledte produkter.

## Summary

Rotavirus is a major cause of infantile viral gastroenteritis and can lead to severe and sometimes lethal dehydration. Previous studies have shown that breastfed children are better protected against symptomatic infections, and that the milk fat globule protein, lactadherin, may be at least partly responsible for this effect. *In vitro* studies have shown that human lactadherin, in contrast to the bovine ortholog, could inhibit rotavirus infectivity, and that bovine MUC1 and a commercially available bovine whey protein concentrate (WFC) fraction proved to be effective. The aim of this project was to identify the active components in WFC, and document the involved biologic mechanism.

The present work describes the versatility of WFC against the infection of 2 human intestinal cell lines (Caco-2 and FHs 74 Int) by 4 different rotavirus strains (Wa, RRV, YM, RF). Isolation of a protein fraction (CM3Q3) from WFC that effectively inhibits rotavirus infectivity *in vitro* is documented. Purification was achieved by monitoring the rotaviral inhibitory activity in fractions obtained from two consecutive steps of ion-exchange chromatography. The major component of CM3Q3 was shown to be bovine IgG, and the attenuating capacity of this fraction is most properly linked to this component.

An additional screening was performed to see if there were other antirotaviral proteins in WFC. Tests were also performed with MUC15 and PP3. No additional candidates were identified, and it was concluded that it will be difficult to identify additional inhibitory components with the presently available experimental setup.

The bioactivity of the isolated CM3Q3 proved to be fairly stable, because it sustained treatment with organic solvents (extraction), urea and freeze-drying. Nevertheless, experiments show that the manufacturer needs to treat WFC gently (temperature) in order to retain the activity.

The capacity of WFC, MUC1, lactadherin, and the CM3Q3 fraction to inhibit the *in vivo* infectivity of rotavirus was analyzed in adult BALB/c mice by using the marine Men strain in 2 different amounts of virus (10 and 100 times more than 50% of the viral shedding doses). Only CM3Q3 was able to significantly affect the shedding of rotavirus in the stools of experimentally infected mice when the high viral dose was given. Detection of rotavirus-specific serum antibodies showed that the high dose infected all groups of mice. Experiments with the low dose of virus implied that all the tested milk proteins could affect the viral shedding in stools. However, only MUC1, WFC, and CM3Q3 prevented the appearance of serum viral antibodies.

The advantages of using bovine immunoglobulins to induce passive immunity against rotavirus have been substantially investigated, although studies have mainly focused on the use of derivatives from immunized cows, especially colostrum. Thereby, this report demonstrates presence of considerable antirotaviral components in an ordinary whey product, suggesting that there are alternatives to colostrum-derived products.

## 1. Projektets baggrund

Det er anerkendt, at infektioner forårsaget af rotavirus på verdensplan er den mest almindelige årsag til behandlingskrævende diaré. Allerede tilbage i 1980'erne viste danske undersøgelser, at diegivning beskytter smågrise mod rotavirusinfektion (Svensmark *et al.*, 1989). Nyere undersøgelser blandt småbørn konkluderer ligeså, at antallet af nul til et-årige med symptomer afledt af rotavirus er signifikant mindre i gruppen, der får modermælk (Naficy *et al.*, 1999). Resultaterne er i overensstemmelse med undersøgelser, der viser, at glykoprotein fraktioneret fra modermælk inhiberer rotavirus infektion *in vitro* samt modvirker diaré hos rotavirusinficerede mus. En proteinkemisk identifikation viste, at de isolerede glykoproteiner tilhører en type, der primært er lokaliseret i mælkens fedtkuglemembran (Yolken *et al.*, 1992). En lignende fraktion af glykoprotein, isoleret vha. ultrafiltrering af bovin-valle, har tilsvarende vist sig at inhibere human rotavirus infektioner *in vitro* (Kanamaru *et al.*, 1999). I løbet af de sidste ti år har der været flere bud på, hvilke proteiner/forbindelser der er den eller de virksomme forbindelser, det være sig både humane og bovine proteiner. Inspektion af den tilgængelige litteratur på området fortæller med al tydelighed, at der er et stort behov for klarhed og konklusive analyser.

Symptomerne på rotavirusinfektion er feber, kvalme, opkast og diaré. Næsten alle børn har rotavirus i fæces, men symptomerne er mest udtalte i tre til seks måneders alderen. Derefter falder incidensen, og hos voksne ses alvorlige tilfælde fortrinsvis hos personer med svækket immunforsvar. Globalt set vurderes det, at antallet af diarétilfælde er tre gange større blandt spædbørn, der får modermælkserstatning sammenlignet med dem, der er opfostret på modermælk. Så selvom komælksprotein udgør en meget betydelig del af proteinet i modermælkserstatning, mangler de antivirale forbindelser tilsyneladende helt eller delvist i de hertil anvendte ingredienser. En anden mulighed er, at fremstillingsprocessen for de bovine ingredienser ødelægger de aktive stoffer.

Under FØTEK III-projektet "Bovin lactadherin som antiviral komponent" har vi opbygget ekspertise i at udføre *in vitro* infektionsanalyser med rotavirus, og vi har benyttet assayet til at vurdere effekten af proteinblandinger og rene proteiner. Vores hidtidige undersøgelser har påvist antiviral effekt af bovint lactadherin i modsætning til humant lactadherin (Kvistgaard *et al.* 2004). Baggrunden herfor er ikke nærmere undersøgt, men formodes at skyldes strukturelle forskelle i de to mælkeproteiner. Undersøgelserne viste desuden, at det bovine fedtkuglemembran-protein MUC1 er en effektiv inhibitor af infektioner fra rhesusaberotavirus-stammen (RRV). MUC1 har derimod kun ringe effekt, når det gælder inhibering af den humane rotavirus-stamme (Wa). Undersøgelserne viste derudover, at WFC-fraktionen er en potent og bredspektret inhibitor af alle undersøgte virusstammer. Denne observation bygger på analyser af humane tarmceller inficeret med vira isoleret fra henholdsvis menneske (Wa), rhesusabe (RRV), svin (YM) og kvæg (RF). Undersøgelser til beskrivelse af WFC's indvirkning på rotavirusinfektioner antyder endvidere, at vallefraktionen er i stand til at forhindre penetration af cellulært bundet virus, ligesom co-inkubation af WFC og virus forhindrer infektion. Sigtet med projektet var dermed at bygge videre på de interessante resultater, vi allerede havde opnået, med fokus rettet specielt på WFC.

## 2. Projektets formål

Vore nyeste undersøgelser viser, at et valleprodukt (WFC), karakteriseret ved et højt indhold af fosfolipid, lipofile- og højmolekylære proteiner, er en potent inhibitor af rotavirusinfektioner *in vitro*. Idet der fra et produktionsmæssigt synspunkt knytter sig store muligheder til dette valleprotein-pulver, der indtil i dag stort set er blevet betragtet som et spildprodukt, undersøges mulighederne for anvendelse af WFC's bioaktive egenskaber til forebyggelse og behandling af rotavirusinfektioner. Målet er at identificere de virksomme komponenter i WFC samt dokumentere den bagvedliggende biologiske mekanisme. I samarbejde med mejeriindustrien vil vi med henblik på tilvejebringelse af en ingrediens med antiviral effekt undersøge, hvorledes termale og fysisk-kemiske påvirkninger influerer på bioaktiviteten. Endelig vil vi i et samarbejde med Valencia Universitet (Spanien) benytte en *in vivo*-model til at vurdere effekten af WFC og antivirale komponenter deriveret derfra.

## 3. Projektets forløb, resultater og kommentarer

### 3.1 Identifikation af virksomme proteiner i valleproteinpulver

Valleproteinpulveret (WFC), som er projektets omdrejningspunkt, fremstilles hovedsageligt fra valle stammende fra produktionen af gul ost, men derudover også fra sur valle fra kasein-separation.

Behandling af WFC fra hhv. sur- og ostevalle med proteasen pepsin, viste at den første type valle er væsentlig mere resistent over for denne protease. Dette var tydeligt i rotavirus-assayet. Ved analyse af fordøjelsesblandingerne med SDS-gelelektroforese, kunne man se nogle tilsyneladende intakte proteiner i sur WFC. Identifikation af disse proteiner kunne intuitivt give et fingerpeg i retning af at finde de rotavirusdæmpende komponenter. Men, selvom vi har gjort en omfattende indsats, har dette spor ikke givet nye væsentlige erkendelser.

En anden angrebsvinkel gik på at separere de virksomme komponenter i WFC rent kromatografisk. Grundet WFC's natur er det nødvendigt at anvende delvist denaturende betingelse for overhovedet at opnå nogen form for separation. Vi har opnået en fornuftig adskillelse ved brug af gelfiltrering i 8 M urea, mens 6 M ikke var kraftig nok. Lidt overraskende er det ikke godt at anvende 6 M guanidinium-HCl, hvilket normalt opfattes som et kraftigere chaotropisk salt end urea. Forsøg på at genfinde rotavirusinhibitorisk aktivitet viste sig umiddelbart vanskeligt efter gelfiltreringen. Derimod gav kation-bytteren (CM-sepharose) en fin adskillelse og præservation af hæmmende komponenter over for Wa-rotavirus. En yderligere fraktionering kunne opnås ved anionbytning med klar adskillelse i en enkelt pool med benævnelsen CM3Q3.

Analyse af poolen CM3Q3 ved SDS-PAGE viste, at den kun indeholdt en måske to hovedkomponenter. Størrelsen (ca 150 kDa) på det mest fremherskende bånd antydede, at der kunne være tale om immunoglobuliner. Behandling med reduktionsmiddel understøttede dette. En proteomisk analyse bekræftede tilstedeværelsen af IgG som den dominerende komponent (ca. 90% af de coomassie-farvende proteiner). Analysen pegede også på tilstedeværelsen af mindre mængder af andre proteiner (poly-IgG receptor, laktoferrin, lactadherin, beta-laktoglobulin).

Det er således sandsynliggjort, at der i WFC er en aktiv pool af IgG rettet mod rotavirus, men om det vitterlig er det virksomme stof, og om det er eneansvarlig for effekten var endnu ikke belyst. Derfor blev der udført en række kontrolforsøg m.v.

For at undersøge om den rotavirus-inhiberende aktivitet kan henføres til nogle af kontaminanterne, har vi afprøvet endnu et oprensningstrin (gel-filtrering, Superose 12). Eksperimentet viste, at det stadigvæk er IgG som er den dominerende faktor mod rotavirus infektion *in vitro*.

Andre har tidligere været inde på, at lactoferrin og lactadherin kunne være aktive mod rotavirus. CM3Q3 har også et lille indhold af disse proteiner. Ved brug af western-blotting kan vi imidlertid se, at den inhibitoriske virkning ikke følger de to proteiner. Der er derimod større sammenhæng mellem inhibitorisk aktivitet og indhold af bovin IgG.

Spørgsmålet om IgG er den eneste betydelige anti-rotavirus komponent i WFC, søgte vi at adressere ved at fjerne IgG og derefter teste for bioaktivitet. Dette kan være en vanskelig indfaldsvinkel, idet det altid er vanskeligt at fjerne noget selektivt og fuldstændigt fra en blanding. Det er imidlertid beskrevet, at Protein G binder IgG effektivt. Efter passage tre gange over en Protein G affinitetskromatografisøjle var det muligt at få en tilfredsstillende fjernelse af det bovine IgG. Det opnåede gennemløb blev testet for evne til at inhibere rotavirusinfektionsevne. Det var dog ikke krystalklart, hvorledes resultaterne skulle tolkes. Vores foreløbige konklusion blev derfor, at der er andre stoffer med rotavirusinhibitorisk aktivitet i WFC, når vi tester med stammerne Wa og RRV. Trods lidt vaklen søgte vi at isolere denne aktivitet ved anion-bytning (Q-Sepharose). Den inhibitoriske aktivitet kunne desværre ikke genfindes efter dette trin. Hvad der ligger til grund for dette er ikke helt klart. Men, der er flere muligheder: Der er tale om a) en kombinationseffekt, som ophører, når proteinerne adskilles; b) denaturering; c) kun en lille effekt udover hvad der kan tilskrives IgG, og dermed under detektionsgrænsen; d) aktiviteten findes uden for de testede fraktioner. Eller der er et helt andet scenarium, der gør sig gældende.

Det er således sandsynliggjort, at der i WFC er en aktiv pool af IgG rettet mod rotavirus. Endvidere har de opfølgende eksperimenter vist, at der formodentlig er andre stoffer med rotavirusinhibitorisk aktivitet i WFC. I vores første analyser afskrev vi størrelseskromatografi som første separations-trin på WFC. Nye eksperimenter viste derimod, at fraktionering af WFC ved gel-filtrering (Sepharose CL-6B) i urinstof (8 M), giver et interessant mønster af fraktioner med inhibitorisk aktivitet over for rotavirus. De aktive fraktioner blev successivt sat på en Q-sepharose (anion-bytter, under betingelser ækvivalent med ovenfor), og testet igen for tilstedeværelse af inhibitorisk aktivitet. Efter opdeling af eluatet i 6 pools, fandt vi mest aktivitet i pool 2 og 3 (altså relativt store molekyler). De videre analyser viste, at det med stor sandsynlighed var IgG, som var inhiberende i CL6B pool 3, mens det synes at være MUC1 der er ansvarlig for CL6B pool 2's hæmning. At bovin MUC1 er en potent inhibitor er tidligere blevet dokumenteret.

Vi finder det således vist, at WFC indeholder to komponenter med inhiberende virkning på rotavirusinfektionsevne, nemlig en relativt stor pool af IgG og en mindre af MUC1. Ligeledes vurderer vi, at det med de anvendte metoder vil være vanskeligt at identificere yderligere inhiberende komponenter i WFC.



### 3.2 Oprensning og analyse af individuelle proteiner

Reproducerbarheden af CM3Q3-isoleringen er blevet testet, og tre uafhængige oprensninger viste, at den etablerede metode er holdbar. Under denne fase har vi endvidere oprenset MUC1 og lactadherin med henblik på sammenlignende studier, samt til de neden for beskrevne *in vivo* forsøg.

Desuden har vi testet MUC15 og PP3 for at se, om de kunne have inhiberende virkning på rotavirusinfektivitet. MUC15 kunne tænkes at have virkning, idet det er et sialinsyre-holdigt mucin som MUC1. PP3 optræder som kontaminant i mange af vore oprensninger, så der kunne derfor også være attenuerende virkning forbundet med den. Resultaterne angav dog ikke, at der skulle være nogen virkning af MUC15 eller PP3

Som supplement har vi undersøgt, hvilke former for immunoglobulin der er til stede i mildt behandlet WFC. Ved brug af radial-immunodiffusion har vi kvantificeret indholdet af IgG, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgA og IgM. Som antaget udgør IgG den største del af immunoglobulinet i WFC (ca 8% af protein), mens niveauerne af IgA (0,5%) og IgM (0,2%) er forventeligt lavere. Der er dog intet i vores analyser, der tilskriver rotavirus-inhiberende effekt af nogle af disse sidste to former for immunoglobulin. Endeligt har vi set, at IgG<sub>1</sub> tegner sig for hoveddelen af IgG'et.

Det kan i flere tilfælde være interessant at kunne vurdere det antivirale potentiale i en given mælkeproteinblanding eller f.eks. i forbindelse med en procesoptimering. Med henblik på dette har vi gennemført "capture assays" og deciderede *in vitro* titeringseksperimenter. Resultaterne viste, at vi ikke kunne benytte set up's i stil med et "antibody capture assays", idet der tilsyneladende er for stor uspecifik binding til de anvendte mikrotitterplader. Senere så vi, at man med fordel kan lave sammenligninger ved brug af vores *in vitro* infektionsassay. Kontrolseksperimenter viste, at det inhiberende potentiale er størst i kolostrum fra immuniserede køer ("immunmælk"), derpå almindeligt kolostrum, CM3Q3 oprenset fra WFC, bovine IgG og til sidst WFC selv. Det er stort set en intuitivt forventelig rækkefølge. Vi har ikke testet forskellige WFC præparationer mod hinanden, men muligheden foreligger.

### 3.3 Effekter af forskellige virusstammer og værtsceller - MA104, Caco-2, FRS 74 Int

I denne del af processen har vi set på relationer mellem forskellige valleproteinprodukter (WPC, WPI og WFC) og vurderet muligheden for at have en gangbar negativ kontrol. Gentagne studier viser nu, at der kan spores lidt inhibitorisk aktivitet mod rotavirus i WPC. Det var faktisk ventet, eftersom WFC er en underfraktion af WPC. At vi tidligere ikke har kunnet se effekter skyldes sandsynligvis, at vi nu har anvendt højere koncentrationer. Som følge deraf kunne man da frygte, at effekten bare skyldes at assayet ikke kan "bære" så store koncentrationer af protein. For at tjekke det, har vi set på, om tilsvarende mængder af bovint serum albumin (BSA) har nogen effekt. BSA viste sig dog at være en glimrende negativ kontrol.

Det er kendt, at rotavirus primært angriber tyndtarmen. I vort normale testsystem benyttes cellelinien Caco-2, som er colon-deriveret, men med tyndtarmslignende egenskaber. Vi har derfor testet om tyndtarmscellelinien FHs 74 Int var et lige så godt eller bedre valg.

Den studerende (Mikkel Bjerg Kongsbak) som gennemførte disse analyser viste, at man med meget stor omhu godt kan anvende FHs 74 Int celler. Der var intet der tydede på, at der opnås misvisende resultater ved brug af Caco-2 celler.

Konklusionen er dog at Caco-2 er langt mere hensigtsmæssig at arbejde med, hvilket derfor var det primære valg.

### *3.4 Mekanistiske studier og effekter af fysisk-kemiske faktorer på den antivirale aktivitet*

Vi har undersøgt effekten af varme og lipidekstraktion på WFC's antivirale aktivitet. Det viste sig, at den inhibitoriske effekt over for rotavirus af WFC ikke forsvinder efter ekstraktion. Det gælder både den noget hårdhændede kloroform/methanol-ekstraktion og den mere skånsomme behandling med ethanol. Det tolkes derhen, at den inhibitoriske aktivitet stadigvæk skal henføres til proteinerne i WFC. Varmebehandling har i lighed med pepsin-behandling en væsentlig mindre effekt på sur WFC end på ostevalle WFC. Årsagen til dette er ikke umiddelbart indlysende.

Af foranstående kan man se, at den inhibitoriske effekt over for rotavirus af WFC ikke forsvinder efter behandling med urinstof, efterfølgende dialyse og frysetørring. Aktiviteten kan jo endvidere genfindes efter endnu en ionbytning og frysetørring. Således er den inhibitoriske aktivitet relativt robust, idet den i øvrigt også modstår den noget hårdhændede kloroform/methanol-ekstraktion og den mere skånsomme behandling med ethanol.

Under projektet indledte vi et samarbejde med Helen Blanchard, Institute for Glycomics, Griffith University, Queensland, Australien, hvor de molekylære detaljer af den mulige binding mellem MUC1 og VP8\*-proteinet fra den ydre kapsel på rotavirus er i fokus. Dr. Helen Blanchard er meget interesseret i detaljer vedrørende binding mellem rotavirus og proteiner samt hvilken betydning, kulhydratet har i denne forbindelse. Til dette formål har de udtrykt VP8\*. Vi har sendt bovin MUC1 til Australien og afventer at høre om deres observationer.

### *3.5 In vivo studier*

Sammen med vores spanske samarbejdspartner (Buesa *et al.*) har vi foretaget en række *in vivo* undersøgelser i mus, der bliver provokeret med rotavirus (McN-stamme). Flg. bovine fraktioner blev testet: a) WFC, b) CM3Q3, c) MUC1 og d) lactadherin. BSA benyttes som negativ kontrol. Fæces fra musene indsamles individuelt og undersøges for indhold af rotavirus. Vi har eksperimenteret med forskellige forhold mellem virus og protein. Benyttes høje mængder af virus observeres der ingen reduktion i mængden af virus i fæces eller nedsættelse af infektionstiden. Ved at mindske forholdet mellem virus og protein så vi, at alle mælkefraktionerne virkede dæmpende på infektioner provokeret med McN, når man så på fæces. Der kunne ikke detekteres antistoffer i mus behandlet med WFC, CM3Q3 og MUC1, modsat lactadherin og kontrolgruppen. Den foreløbige konklusion var således, at de testede mælkeproteiner alle inhiberer *in vivo* infektivitet af McN stammen, selvom effekten af lactadherin er noget tvivlsom. Hæves mængden af virus lidt til et mellemliggende niveau, ses der nu en meget tydelig effekt af CM3Q3.

Ud fra samtlige *in vivo* analyserne kan man således konkludere, at CM3Q3, WFC og MUC1 alle har en tydelig effekt på McN-virus infektionsevne, med CM3Q3 som den kraftigst virkende komponent. Derimod ses der i lighed med *in vitro* undersøgelserne ingen (eller kun ringe) effekt af bovin lactadherin.

#### 4. Liste over publikationer

##### 4.1 Artikler i internationale tidsskrifter

Bojsen, A., Buesa, J., Montava, R., Kvistgaard, A.S., Kongsbak, M.B., Petersen, T.E., Heegaard, C.W. & Rasmussen, J.T. (2007). Inhibitory activities of bovine macromolecular whey proteins on rotavirus infections in vitro and in vivo. *J. Dairy Sci.* 90: 66-74.

##### 4.2 Indlæg ved faglige kongresser, symposier o.l.

Rasmussen, J.T., Kvistgaard, A.S., Pallesen, L.T., Petersen, T.E. & Heegaard C.W. (2003). Anti-microbial glycoproteins associated with the bovine milk fat globules. *Milk Proteins – Quality and health aspects. NorFa Conference marts 2003, Wardahl, Norge.* Mundtlig præsentation.

Rasmussen, J.T., Kvistgaard, A.S., Pallesen, L.T., Petersen, T.E. & Heegaard, C.W. Potential beneficial effects of milk proteins against rotavirus infectivity. *Milk products and components in health and disease. NordForsk Conference august 2005, Den Blå Lagune, Island.* Mundtlig præsentation.

Kvistgaard, A.S., Petersen, T.E., Heegaard, C.W. & Rasmussen, J.T. "Potential beneficial effects of milk proteins against rotavirus infectivity", *The 2nd International Symposium on Milk Genomics & Human Health, Napa, Californien, november 2005.* Poster og mundtlig præsentation.

Rasmussen, J.T. (2006). Structural and functional studies of lactadherin: Role as an antiviral component, potent anticoagulant molecule or as non-invasive marker for apoptotic cells? *Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia and Hospital Clinico Universitario, Valencia, Spanien. januar 2006.* Mundtlig præsentation.

##### 4.3 Videnskabelige afhandlinger

Mikkel Bjerg Kongsbak (januar, 2004) Antimicrobial proteins in human milk with focus on effectors against rotavirus. "Præ"-speciale.

Mikkel Bjerg Kongsbak (maj, 2006) Purification and structural studies of human lactadherin. Speciale.

#### 4.4 Faglige artikler

Heegaard, C.W. & Rasmussen, J.T. (2003) Gunstig virkning af et højmolekylært valleprodukt mod rotavirusinduceret diaré. *Mælkeritidende* (2003) 12.

Rasmussen, J.T. (2007). Colostrum ”light?” *Mælkeritidende* (under udarbejdelse)

#### 5. Redegørelse for forskeruddannelse m.v.

Dele af projektet har udgjort rammen for Mikkel Bjerg Kongsbaks præspeciale og speciale. Endvidere har projektet også udgjort en del af Rebeca Montavas uddannelse i Valencia.

#### 6. Redegørelse for samarbejdsrelationer nationalt og internationalt

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

Javier Buesa, Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia og Hospital Clinico Universitario, Valencia, Spanien: *In vivo* infections-studier i mus.

Helen Blanchard, Institute for Glycomics, Griffith University (Gold Coast Campus), Queensland 9726, Australien: Studier af mulig interaktion mellem rotavirus og MUC1.

#### 7. Vurdering af resultaternes praktiske og videnskabelige betydning

Projektet er i første omgang et resultat af det konstruktive samarbejde, vi gennem årene har etableret med Mejeribrugets ForskningsFond. Dertil har projektet været med til en styrkelse af brobygningen mellem den offentlige og private sektor og til at bevare og udbygge de gode relationer vi har til erhvervslivet. Eksempelvis har mejeriindustrien i anden sammenhæng gentagne gange konsulteret os i forbindelse med løsning af konkrete problemstillinger vedrørende mælkeproteiner.

Nærværende projekt har fagligt set medvirket til at indsamle viden af grundlagsskabende karakter om virale inhibitorer i komælk. Størstedelen af resultaterne er i al væsentlig grad samlet i en artikel (*J. Dairy Sci.*, januar 2007). Undersøgelser af anførte emner er medvirkende til, at der bliver sat øget fokus på den ernærings- og sundhedsmæssige betydning af mælk, mælkekomponenter og/eller produkter heraf.

#### 8. Projektets relation til nye/andre mejerirelaterede samarbejdsprojekter

Dette og andre af vore projekter har nu konkret ført til dannelse af et mælkeproteinkonsortium (”Milk Protein Research Consortium”, [www.milkprotein.dk](http://www.milkprotein.dk)), der er et samarbejde mellem tre industrielle partnere og tre offentlige instanser; Arla Foods, Semper, UpFront, Staten, DTU og AU.

