

# Afslutningsrapport

Mælk, forekomst og mulige biologiske aktiviteter af  
fedtkuglemembranproteinet mucin 15

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2006-77

*September 2006*



**mejeri**foreningen

danish dairy board

**Afslutningsrapport for Innovationslovsprojektet:**

**Mælk, forekomst og mulige biologiske aktiviteter af  
fedtkuglemembranproteinet mucin 15**

Periode 01.07.2002 – 31.12.2005

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: 86 13 65 97.  
E-mail: [trige@imsb.au.dk](mailto:trige@imsb.au.dk) or [jatr@mb.au.dk](mailto:jatr@mb.au.dk).

### Øvrige medarbejdere:

Lone Tjener Pallesen, cand. scient, PhD-studerende,  
Margit Skriver Rasmussen, laboratorietekniker,  
Anni Bojsen, laborant,  
Marta Caridad Garcia (Esp), Erasmus-studerende (sept '02 - maj '03),  
Kate Novak, laborantpraktikant (01.09.2003 - 31.08.2004),  
Lise Refstrup Linnebjerg Pedersen (01.09.2004 -, speciale-studerende).

## Resumé

Mælkens lipid (fedtkugler) er omgivet af en kompleks membranstruktur, kaldet fedtkuglemembranen (MFGM). MUC15 (tidligere PAS-3) har historisk været beskrevet som et af syv dominerende glykoproteiner i MFGM. Indtil for nylig har der dog kun eksisteret begrænset viden om det protein. Med dette udgangspunkt sigtede projektet på at udvide den tilgængelige viden om MUC15, specielt med komælk og fedtkuglemembran som omdrejningspunkt.

Umiddelbart inden projektet tog sin begyndelse havde vi, som de første, oprenset proteinet MUC15 og bestemt dets aminosyresekvens. Det viste sig, at MUC15 (307 aminosyrer) var et total ukendt protein, med ingen synlig lighed til andre proteiner. Laboratoriets studier viser endvidere eksistensen af en human ortolog, og efter samråd med komiteen for nomenklatur af det humane genom, fik det navnet mucin 15 (MUC15). Endeligt kunne vi dokumentere, at MUC15 også findes i andre væv end mælkekirtlen.

Under dette projekt har vi gennemført studier af glykosyleringerne på MUC15. Enzymatiske deglykosylerings eksperimenter bekræfter tilstedeværelsen af både N- og O-bundne glykaner. Sekventeringer af genererede peptider viser glykosylering på 11 ud af 15 potentielle N-glykosylerings-sites. Kvantitative analyser viser at kulhydratet udgør ca. 65% af MUC15's samlede molekylvægt, og at glykanerne består af fukose, N-acetyl galaktosamin (GalNAc), N-acetyl-glukosamin (GlcNAc), galaktose, mannose og sialinsyre, i et 1:4:6:5:4:5 molært forhold. De O-bundne glykaner indeholdt et ligeligt molært indhold af GalNAc, GlcNAc, galaktose og sialinsyre. Fra studier med lektiner har vi indhentet flg. informationer om strukturen af proteinets glykosyleringer: a) En lille del af sialinsyre-resterne på de O-bundne glykaner er bundet (2-3) til galaktose, b) de N- og O-bundne glykaner har et højt indhold af (2-6)-Gal/GalNAc, c) af O-bundne glykaner i MUC15 er få usubstituerede core-1 og mange sialinsyresubstituerede core-1, d) der er mange kompleks- og hybrid-type glykaner med terminale laktosaminer og e) endvidere ses et højt indhold af N-bundne hybrid-type glykaner. Distribuerings- og kvantificeringsanalyser viser at MUC15 udgør 1,55 % (vægt) af de MFGM-associerede proteiner, samt at der ikke kun er MUC15 i de lipidholdige fraktioner, men også i skummetmælk og valle.

Studier af artsspredning viser at antistoffer mod bovin MUC15 også er i stand til at finde proteinet i mælk fra får, ged, gris og bøffel. Ortologer blev oprenset fra gede- og fåre-MFGM, og deres identitet blev bekræftet ved N-terminal sekventering. Eksistens af MUC15 blev ligeledes vist i human MFGM, hvor det blev estimeret til kun at udgøre 0,025 % af proteinet. Screening af "Multiple Expression Arrays" viste højt udtryk af MUC15 genet i moderkage, skjoldbruskkirtlen, spytkirtel, luftrøret, nyre og testikler. Dertil blev der observeret moderat ekspression i bugspytkirtlen, føtal og moden lunge, spiserøret, lymfeknuder, føtal og moden thymus, føtal nyre, ovarier, parietallapen (isselap) og leukæmi cellelinien K-562. En alternativ splejsvariant af human MUC15 (MUC15/S) blev fundet og registreret.

Indsatsen i den sidste del af dette projekt havde til formål at komme nærmere MUC15's funktion. I den forbindelse iværksatte vi eksperimenter rettet mod identifikation af mulige vekselvirkende proteiner. Her benyttede vi ioderet MUC15 til at gennemføre ligandblots og dot-blots. Endvidere gjorde vi forsøg på at isolere interactions-partnere vha. "pull-down assays". Desværre har vi endnu ingen konkret viden om eksistensen af eventuelle ligander eller vekselvirkende proteiner.

I sidste del af projekter undersøgte vi i samarbejde med Hanne Frøkiær's gruppe på DTU, om det sialinsyre-holdige protein MUC15 (og MUC1) er i besiddelse af en immunmodulerende effekt. Det blev gjort ved at teste MUC15 (og MUC1)'s effekt på lipopolysakkarid-induceret miltcelle-proliferation og dendritcellers cytokin-produktion (TNF- $\alpha$ , IL-10 og -12). De gennemførte analyser antydede, at der var effekter i begge typer assays. Desværre blev der ikke frembragt tilstrækkelig dokumentation for den eventuelle immunosuppressive effekt. Det må nye eksperimenter afdække.

Samlet set bidrager resultaterne fra dette projekt til den eksisterende viden om MFGM-proteinet MUC15. I arbejdet præsenteres en strukturel karakterisering af glykanerne på dette nye mucøse glykoprotein. Ekspressions- og præliminære funktionsrelaterede studier øger forståelsen af MUC15's betydning, selvom der endnu er et stykke vej til den fysiologiske funktion er helt klarlagt. Funktionen skal dog nok findes inden en eller flere af flg. tre områder: a) Beskyttelse af epiterielle celler, b) deltagelse i denne lipid-sekretoriske proces og/eller c) signal transduction (udefra og ind). Og det er uden at medregne eventuelle effekter ved indtagelse. Slutteligt, resultaterne fra dette projekt vil for en stor dels vedkommende søges offentliggjort i to manuskripter, der er under udarbejdelse.

## Summary

The lipid droplets in milk are surrounded by a complex multi-layered membrane commonly referred to as the milk fat globule membrane (MFGM). Initially, MUC15 (previously PAS-3) was described as one of the major MFGM-associated glycoproteins (> 100 kDa). Until recently the available information about this glycoprotein was very limited. In the present project the characterization of MUC15 was pursued, with the ultimate goal to create an improved basis for evaluating the function of the glycoprotein.

Shortly before this study, we described, for the first time, the isolation of MUC15 from bovine milk and cloning of the corresponding full-length cDNA. The newly identified glycoprotein (307 res) was recognized as a mucin-type molecule and named MUC15 by appointment of the HUGO Gene Nomenclature Committee. The existence of a human homologue was documented in mammary epithelium, and it was shown that expression of the protein neither is restricted to the mammary gland nor to epithelial cells.

During this project, compositional and structural studies of the carbohydrates of bovine milk MUC15 was carried out. Enzymatic deglycosylation experiments, demonstrated the presence of both N- and O-linked glycans, and by amino acid sequencing 11 of 15 potential N-glycosylation sites were found to be glycosylated. The carbohydrates constitute ~65% (w/w) of the total molecular weight of bovine MUC15. Quantitative monosaccharide composition analysis of native MUC15 showed that the attached oligosaccharides comprise N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine, galactose, mannose, and sialic acid in a 1:4:6:5:4:5 molar ratios. In addition, the O-linked glycans showed to have similar levels of N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine, galactose, and sialic acid. The glycan structures were further studied by lectin blotting and different endo- and exoglycosidases. The N-linked glycans showed to be sialylated and contain terminal polyN-acetylglucosamine structures. Furthermore, the N-linked glycans are mainly of the hybrid-type and do not include the high-mannose type. The O-linked glycans were found to constitute a large number of sialylated Core-1 structures (Galactose $\beta$ 1-3N-acetylgalactosamine), as well as more complex O-glycan structures. Distribution and quantification of MUC15 in bovine milk as well as various fractions hereof were investigated. MUC15 proved to constitute 1.55% (w/w) of the MFGM-associated proteins, and in addition to the fat-containing samples, the protein was also found in more aqueous milk samples like skim milk and whey.

Studies were performed to identify potential orthologues in milks of other species. Antibodies identified MUC15 in ovine, caprine, porcine, and buffalo milk samples. Orthologues were purified from caprine and ovine MFGM, and N-terminal amino acid sequencing proved their identities. Likewise, MUC15 (~150 kDa) was identified as human MFGM by Western blotting, where it was estimated to constitute only 0.025% of the protein. Screening a human Multiple Tissue Expression Arrays showed abundant MUC15 gene expression in placenta, thyroid gland, salivary gland, trachea, kidney, and testis. Furthermore, moderate expression was seen in the pancreas, adult and fetal lung, esophagus, lymph node, adult and fetal thymus, fetal kidney, ovary, parietal lobe, and the leukaemia K-562 cell line. The alternative splice variant MUC15/S was cloned and sequenced from the cellular fraction of human milk.

The last part of the project describes preliminary experiments conducted to shed light on the function of MUC15. Thereby, a search for potential protein-protein interactions was conducted using iodinated MUC15 and ligand blotting or dot-blotting techniques. Identification of interaction partners was also approached by affinity isolation using pull-down assays.

Unfortunately, the documentation for interaction of MUC15 with proteins from extracts of the bovine mammary gland or milk samples remains elusive.

The last part of the project aimed at examining if MUC15 isolated from bovine milk shows immunomodulatory activity. Two *in vitro* cell assays were used for this purpose: murine splenocyte proliferation and cytokine production by dendritic cells. In both models, cells were stimulated with lipopolysaccharide (LPS). The mucin inhibited to LPS-induced spleen cell proliferation in a dose-dependent manner. Furthermore, the LPS-induced cytokine production of dendritic cells was differentially affected by MUC 15 and caused a significant reduction in IL-10 and IL-12 production, whereas no effect on TNF- $\alpha$  was detected. These findings point to an immunosuppressive effect of the milk mucin.

The work presented in this project is a contribution to the knowledge about the MFGM-proteins MUC15. The work presents structural characterization of the glycans on this novel transmembrane mucin-type glycoprotein. Together with expression studies and preliminary functional studies this work adds to the understanding of MUC15. However, the physiological function of the glycoprotein is still to be revealed. Nevertheless, it is most likely that the function is to be found within one or more of the following areas: a) Protections of epithelial cells, b) being partner in the lipid secretion process, and/or c) functioning as a signal transduction molecule (outside/in). This is without counting eventual effects upon consumption. Finally, the majority of the results will be published in two manuscripts, which are currently under preparation.

## 1. Projektets baggrund

Interessen for mulige biologiske funktioner og virkemåder for proteinerne associeret med mælkens fedtkuglemembran er steget i takt med den øgede viden om identitet og struktur. Fokus har i høj grad været rettet imod nogle af kulhydratproteinerne, deriblandt lactadherin og MUC1. Ved projektstart var det totalt uvist om der knytter sig interessante egenskaber til det mucinlignende glykoprotein MUC15, tidligere kendt som PAS-3. Derfor var der også internationalt set enighed om, at der mangler fundamental viden om dette protein (Mather, 2000).

Celler fra levende organismer, der er i kontakt med omgivelserne, bliver til stadighed angrebet af fx. mikroorganismer, toksiner og miljøfremmede stoffer. Et lag af mucus fungerer som beskyttelse for cellerne. Sekreterede og forankrede proteiner kaldet muciner udgør en væsentlig del af mucus. Muciner har en meget vid definition: Glykoproteiner, for hvem 50-90 % af deres molekylære masse udgøres af kulhydrat (hovedsageligt O-bundet). Kulhydratet opsuger en hel del vand, hvorved mucus får sin meget viskøse fremtræden. I human sammenhæng er der til dato fundet 20 muciner (både sekreterede- og membranbundne (HUGO)). På basis af studier af proteiner associeret med mælkens fedtkuglemembran havde vi på Laboratorium for Proteinkemi (LFP) ved projektets begyndelse dokumenteret tilstedeværelsen af et nyt membranbundet mucin, MUC15/PAS-3 (Pallesen et al, 2002. J. Dairy Sci. 269).

Mælkens lipid sekreteres i form af globulære strukturer bestående af de intracellulært dannede lipiddråber omsluttet af en del af epitelcellens apikale membran, under et fedtkuglemembranen. Membranens proteiner blev oprindeligt navngivet i henhold til deres størrelse og evne til at farve med enten Coomassie Blue og/eller den kulhydratspecifikke perjodsyre Schiff's reagens (PAS-farve). I bovine fedtkuglemembraner ses syv PAS-proteiner. Undersøgelser foretaget af LFP dokumenterer, at PAS-3 er et unikt protein uden betydelig sekvenslighed med andre proteiner. Det viser sig at proteinet er transmembrant, består af 307 aminosyrer og at kulhydrat måske udgør en stor del af proteinets samlede vægt. Laboratoriets studier viser endvidere eksistensen af en human ortholog, og efter samråd med komiteen for nomenklatur af det humane genom har vi foranstaltet at PAS-3 således har fået tildelt navnet MUC15. Ved brug af antistoffer rettet mod MUC15 har andre set, at proteinet findes i stort omfang i sekretoriske epitelceller i mælkekirtlen. Desuden konkluderede man, at MUC15 findes i køer og geder, men tilsyneladende ikke i menneske, mus og marsvin (Kaetzel et al. 1987. Biochem. Soc. Trans. 15: 1117-1118). LFP's undersøgelser viste endvidere at MUC15 med stor sandsynlighed findes i andre væv end mælkekirtlen (Pallesen et al., 2002).

Det er endnu for tidligt at angive MUC15's mulige funktion, dertil er den tilgængelige viden om proteinet alt for sparsom. Det er også vanskeligt at vurdere eventuelle gavnlige, negative eller ubetydelige effekter som følge af MUC15 indtagelse. Det iværksatte projekt havde til hensigt at nå en nærmere forståelse af MUC15, og eventuelt få det indplaceret i mucinernes indbyrdes rollefordeling under den normale beskyttelse og associerede sygdomme i mavetarmkanalen.



## 2. Projektets formål

Det er hensigten at karakterisere og beskrive mucin 15 (MUC15) fra hovedsageligt bovin mælk. Dette søges opnået ved oprensning, lokaliseringsanalyser samt supplerende undersøgelser af proteinets struktur. Endvidere er det målet at identificere mulige vekselvirkende proteiner og undersøge mulige fysiologiske og biologiske effekter. Det endelige mål er at skabe et forbedret grundlag til vurdering af MUC15's tilstedeværelse i mælk, med henblik på at nå frem til proteinets sundhedsmæssige og fysiologiske signifikans. Viden der kan medvirke til at afgøre om det på sigt kan betale sig at udvinde MUC15 direkte fra mælk eller hvad der i dag betragtes som restprodukter i mejeriindustrien.

## 3. Projektets forløb, resultater og kommentarer

### 3.1 Forekomst i mælk og forskellige mælkefraktioner.

Det var hensigten ved immunologiske analyser at undersøge og kvantificere fordelingen af MUC15 i forskellige mælkefraktioner. Til dette fik vi fremstillet polyklonalt antistof på basis af MUC15 oprenset i laboratoriet. Det fremstillede polyklonale antistof viste sig desværre ikke at være helt specifikt. Det genkender tilsyneladende også andre proteiner, hvilket med stor sandsynlig skyldes at den benyttede antigen-præparation ikke har været helt ren. Antistoffet kunne dog sagtens benyttes til kvalitative og semikvantitative analyser ved westernblotting. ELISA-analyser var imidlertid udelukkede. Endvidere fik vi fremstillet et peptidantistof rettet mod den intracellulære del af MUC15. Trods et ringe udbytte viste antistoffet sig at være mere specifikt.

Til analyserne fik vi indsamlet/fremstillet flg. fraktioner: Rå mælk, skummetmælk, kærnemælk, fedtkuglemembran, centrifugeret kærnemælk, "sur" valle, vallepulver (WFC, WPC og WPI) og proceskærnemælk, samt fraktioner fra ultracentrifugeret skummemælk (serum, kasein og skummetmælksmembraner) og ultracentrifugeret kærnemælk (kærne-serum og membranfragmenter).

En oversigt over resultaterne af kvantificeringsanalyserne vises i tabel 1. Fordelingen er angivet relativt vurderet på baggrund af de respektive vægt-procenter. De præcise værdier vil fremgå af afledte publikation (Pallesen et al., 2006a, se pkt. 4).

Tabel 1.

| Fraktion           |       | Fraktion               |      | Fraktion            |       |
|--------------------|-------|------------------------|------|---------------------|-------|
| Rå mælk            | +     | Skummet                | +    | Valle (sur)         | +     |
| kærnemælk          | +++++ | Sup. centr. syr. kærne | +++  | MFGM fra syr. Kærne | +++++ |
| Valle/serum*       | +     | Skummet-membr*         | ++   | Kasein*             | -     |
| Sup. centr. kærne* | +++   | MFGM fra kærne*        | ++++ | WFC                 | +++   |
| WPC and WPI        | -     | Proceskærnemælk        | (+)  | Valle (gul ost)     | +     |

\* Ultracentrifugering

Resultaterne angiver, at MUC15 koncentrationen er højst i de lipid-holdige fraktioner. Det er endvidere interessant, at skummetmælk har et relativt højt indhold af MUC15. Det må skyldes rester af lipid-dråber og skummetmælksmembraner. Det kan endvidere tages som udtryk for, at der, i lighed med MUC1, findes en anseelig mængde opløselig MUC15. Desuden ved vi jo, at der findes en splejsvariant af MUC15, som mangler den transmembrane region. Hvor stor en del af det immunoreaktive MUC15 i skummetmælk, der hidrører denne variant er et åbent spørgsmål. I de testede mejeriindustrielle fraktioner ses WFC at indeholde mest MUC15 - omkring dobbelt så meget som MUC1.

Vi har endvidere undersøgt artsprædningen af MUC15, ved at se på mælkeprøver fra menneske, får, ged, gris og bøffel. Analyse med to forskellige polyklonale antistoffer (kanin anti-bovin IgG og et peptidantistof rettet mod human MUC15) påviser at MUC15 faktisk findes i human mælk. Proteinet er imidlertid kun til stede i mængder, der tillader sikre immunologiske observationer i kærnemælk og MFGM-præparationer. Estimerer af indholdet i human mælk forklarer, hvorfor forsøg på at oprense proteinet slog fejl.

Immunologiske analyser påviste også eksistensen af MUC15 i mælk fra får, ged, gris og bøffel. Det lykkedes at oprense MUC15 fra både fåre- og gedemælk samt dokumenteret deres identiteten ved N-terminal aminosyresekvensbestemmelse.

Under tiden oplever vi problemer med renheden af vore MUC15 præparationer. I projektperioden har vi gjort diverse tiltag. Vi har afprøvet et ekstra reverse-phase HPLC-oprensningstrin (diphenyl-søjle). Øget renhed af MUC15 præparationer kan opnås ved brug af diphenyl-søjlen. Af tids- og kapacitetsmæssige årsager er det ikke så hensigtsmæssigt, at gå denne vej for at få fremstillet rent MUC15. Endvidere har vi set på muligheden af at oprense MUC15 på en ganske anden måde, nemlig fra en restfraktion fra oprensning af fedtkuglemembranproteinet, lactadherin. Denne fraktion indeholder store mængder MUC1 og -15. Periodevis har vi med stor succes oprenset MUC15 fra denne supernatant, og med stor renhed. Dette sidste trin foregår på en stor ressource-søjle (10 ml). Udbytte og renheden svinger dog for meget. Det er dermed blevet klart, at der stadig er kapacitetsproblemer forbundet med de tilgængelige metoder til oprensning af MUC15 (og MUC1).

Det er imidlertid også blevet klart i løbet af denne periode, at MUC15 præparationer med høj renhed kan opnås når følgende iagttages: 1) Omhyggelig vask af fløden sikrer god fjernelse af kaseinerne, 2) foretage kvalitative test til at sikre korrekt fraktionering og 3) foretage kationbytter-trin ved pH 3.5 i forhold til 4.5 - sikre god fjernelse af butyrofilin.

### *3.2 Vævsspecificitet.*

Vævsspecifik ekspression blev vurderet ved brug af MTE cDNA-arrays. Kommercielt findes disse desværre kun afledt af humane væv. Vi ser, at MUC15 i høj grad er udtrykt i: Placenta, spytkirtel, thyroid kirtel, luftrøret, nyrer, testikler (samt leukemicellelinien K-562). I mindre grad findes det udtrykt i spiserøret, bugspytkirtlen, lungerne og fetal nyre. Dermed er det i høj grad i sekreterende væv, hvor vi ser ekspression af MUC15.

En analyse af de opnåede resultater viser, hvor vigtigt det er at foretage studier af den relative mRNA-ekspression MUC15.

Sammenlignes RT-PCR-analyserne med resultaterne fra MTE-arrayet ses det, at ekspressionsniveauet af MUC15 må være meget lille i tyktarmen, milten, perifere blodleukocytter, blærehalskirtlen, æggestokke og føtal lever, da mRNA her kun kan detekteres ved RT-PCR.

Sideløbende har vi fundet og karakteriseret en cDNA for den korte udgave af MUC15 (MUC15/S). Resultatet er rapporteret til den globale database GeneBank.

### *3.3 Posttranslationelle modifikationer.*

Glykosyleringer:

Vi har undersøgt om O-sialoglycoprotein endopeptidase (OSGE) kan nedbryde bovin MUC15. OSGE er en neutral metalloprotease fra *Mannheimia haemolytica*. Enzymet kløver proteiner, som bærer clustre af negativt ladede kulhydrater. O-sialoglykoproteiner og sulfaterede glykoproteiner er således gode substrater. Det udviser ikke specificitet for N-sialoglykoproteiner eller proteiner uden kulhydrat. MUC15 kan rent faktisk nedbrydes med OSGE, hvilket bekræfter tilstedeværelsen af O-glykosyleringer. Det kan vise sig nyttigt mhp. fastlæggelse af O-glykosylerings-site på MUC15 og ved anden karakterisering af dette celleoverflade-protein.

Ved analyse af mildt hydrolyserede MUC15 prøver vha. HPAEC-PED fandt vi, at de bundne glykaner indeholder seks forskellige monosakkarider: Fukose, N-acetyl galaktosamin (GalNAc), N-acetyl-glukosamin (GlcNAc), galaktose, mannose og sialinsyre, i et 1:4:6:5:4:5 molært forhold. Fjernelse af N-bundne glykaner med PNGase F viste at de O-bundne glykaner indeholdt et ligeligt molært indhold af GalNAc, GlcNAc, galaktose og sialinsyre. De kvantitative analyser af monosakkariderne viste endvidere at ca. 2/3-dele af MUC15's molekylvægt udgøres af kulhydrat.

Til yderligere dokumentation vedr. glykanerne på bovin MUC15 har vi endvidere foretaget en række deglykosylerings-eksperimenter vha. glykosidaser (sialidase, PNGase F, O-glykosidase, beta-galaktosidase og acetylglukosaminidase). Resultaterne blev visualiseret ved SDS-PAGE og Western-blotting. Behandlingerne med de forskellige glykosidaser viser, at MUC15 tilsyneladende indeholder både simple og komplicerede core-1 O-glykaner, core-2 O-glykaner og N-bundne glykaner. Hvilket understøttes af de opnåede resultater for MUC15's totale monosakkarid-sammensætning og for det PNGase F - behandlede protein.

Endvidere har vi foretaget studier af diverse lektiners binding til bovin MUC15. Lektiner er karakteriseret ved en meget specialiseret binding til bestemte sakkarider, hvilket giver information om strukturen af proteinets glykosyleringer. Flg. lektiner er blevet benyttet: MMA (*Maackia amurensis* agglutinin), SNA (*Sambucus nigra* agglutinin), PNA (Peanut agglutinin), GNA (*Galanthus nivulius* agglutinin) og DSA (*Datura stramonium* agglutinin). Konklusionerne på de udførte lektinblots er: MMA: En lille del af sialinsyre-resterne på de O-bundne glykaner er bundet (2-3) til galaktose; SNA: De N- og O-bundne glykaner har et højt indhold af (2-6)-Gal/GalNA; PNA: Af O-bundne glykaner i MUC15 er få usubstituerede core-1 og mange sialinsyre-substituerede core-1; DSA: Der er mange kompleks- og hybrid-type glykaner med terminale laktosaminer; GNA: Højt indhold af N-bundne hybrid-type glykaner. Vigtige skridt er således taget i retning af at bestemme strukturerne på det kulhydrat der er bundet til MUC15.

Eftersom patogene mikroorganismers initiale binding til celler ofte er lektinmedieret, så er den erhvervede viden vigtig. Signifikansen af de her beskrevne observationer er dog endnu ikke klar.

### *3.4 Interaktion med andre proteiner.*

Til at undersøge eksistensen af cellulære bindingsproteiner/receptorer/bindingsites for MUC15 mærkede vi proteinet med radioaktivt jod. Tre forskellige former for eksperimenter blev gennemført: i) *In vitro* studier med brug af to forskellige type tarmceller (Fhs 74 Int og Caco-2). ii) Ligand-blot med undersøgelse af forskellige proteinfraktioner udvundet fra yvervæv. iii) Samme yvervævsfraktioner undersøgt ved dot-blotting. Ingen af disse antydede dog tilstedeværelse dockingsites el.lign.

Blandt det store udbud af metoder til identifikation af protein-protein interaktion fladt valget derefter på et specielt "pull-down"-assay. Et grundigt gennemført studie gav heller ikke indikationer i retning af MUC15 vekselvirkende proteiner i et bredt spektrum af yvervævs-protein-ekstrakter. Med henblik på fremtidige studier kunne man vælge at prøve et gær-tohybrid-system.

### *3.5 Test af mulige biologiske aktiviteter*

Indledningsvist undersøgte vi om MUC15 havde nogen indvirkning på rotavirus infektivitet *in vitro*. Her kunne det konstateres at MUC15 ingen hæmmende virkning har.

I samarbejde med Hanne Frøkiær's gruppe på DTU valgte vi dernæst at undersøge om de sialinsyre holdige proteiner MUC15 (og MUC1) er i besiddelse af en immunmodulerende effekt. Det blev gjort ved at teste MUC15 (og MUC1)'s effekt på lipopolysakkarid-induceret miltcelle-proliferation og dendritcellers cytokin-produktion (TNF- $\alpha$ , IL-10 og -12). Systemer der tidligere været vist at kunne påvirkes af andre mælkeproteiner, f.eks. kappa-casein.

De gennemførte analyser viste effekter af de to proteiner i begge typer assays. Således kan det tænkes, at MUC15 og MUC1 har en immunmodulerende effekt. Af ressourcemæssige årsager nåede vi desværre ikke at generere nok og konklusive data. Det er dog vores klare overbevisning, at det ville være overordentligt interessant at kunne gennemføre nye eksperimenter til afdækning af de mulige effekter.

## **4. Liste over publikationer**

### *4.1 Artikler i internationale tidsskrifter*

Pallesen, L.T., Pedersen, L.R.L., Petersen, T.E. og Rasmussen, J.T. (2006). Characterization of Carbohydrate Structures and Distribution of MUC15 in Bovine Milk. (under udarbejdelse)

Pallesen, L.T., Pedersen, L.R.L., Petersen, T.E. og Rasmussen, J.T. (2006). Description of human MUC15 and the Identification of Orthologues in Ovine and Caprine Milk. (under udarbejdelse).

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

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

Jan Trige Rasmussen, Lars Berglund, Lone Tjener Pallesen, og Torben Ellebæk Petersen (2002). Proteins from the milk fat globule membrane. Posterabstrakt, 26. IDF konference, Congrilaït, Paris.

Pallesen, L.T. Petersen, T.E. og Rasmussen, J.T. (2004). "MUC15 a "New" milk protein". NorFa workshop 9.-11. juni 2004, Tallinn, Estland. Mundtlig præsentation.

Pallesen, L.T. Petersen, T.E. og Rasmussen, J.T. (2005). "Structure and function of a novel membrane-associated mucin, MUC15". NordForsk-konference, 20.-23. august 2005, Den Blå Lagune, Island. Mundtlig præsentation.

#### *4.3 Videnskabelige afhandlinger*

Pallesen L.T. Structural and Function of a Novel Membrane-Associated Mucin, MUC15. (2004) Ph.d. progress report.

Pedersen, L.R.L. Purification and Characterization of Caprine MUC15. (2005) Mol. Biol. Project III.

Pallesen L.T. Structural and Functional Studies of a Novel Membrane-Associated Mucin, MUC15. (2006) Ph.d.-afhandling.

#### *4.4 Faglige artikler*

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

Pallesen, LT og Rasmussen, JT. (2003) MUC15, et hidtil ukendt protein. Mælkeritidende 12 (2003).

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

Projektet har udgjort rammen for Lone Tjener Pallesen ph.d.-projekt, og Lise Refstrup Linnebjerg Pedersen's "præspective".

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

Dele af projektets er blevet gennemført som et samarbejde mellem Lab for Proteinkemi ved Århus Universitet, og Hanne Frøkiær's gruppe på BioCentrum-DTU.

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

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

Projektet har 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. Naturligvis er projektet i første omgang et produkt af det konstruktive samarbejde vi har etableret med Mejeribrugets ForskningsFond. Derudover har repræsentanter fra mejerieindustrien, i anden sammenhæng, gentagne gange konsulteret os i forbindelse med løsning af konkrete problemstillinger vedrørende mælkeproteiner. Samarbejdet med industrien har nu konkret ført til dannelsen af et mælkeproteinkonsortium ("Milk Protein Research Consortium", [www.milkprotein.dk](http://www.milkprotein.dk)), der er et samarbejde mellem, Arla Foods, Semper, UpFront, Staten, DTU og AU.

Nærværende projekt har fagligt set medvirket til at indsamle viden af grundlagsskabende karakter om MUC15. Undersøgelser af anførte emner er medvirkende til, at der bliver sat øget fokus på betydningen af mælk, mælkekomponenter og/eller produkter heraf for ernæring og sundhed.

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

Nærværende projekt har sat fokus på struktur og mulige fysiologiske effekter af glykoproteinet MUC15 fra bovine fedtkuglemembraner. Arbejdet med at karakteriserer søges naturligvis fortsat og vil muligvis indgå som en del af aktiviteterne i mælkeproteinkonsortiet.

