

Afslutningsrapport

Bioaktivt mælkeprotein – undersøgelse af EPV20's
cellepatologisk kolesterolphobning

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2006-80

November 2006



mejeriforeningen

danish dairy board

Afslutningsrapport for FØTEK 4 projekt:

**Bioaktivt mælkeprotein, undersøgelser af EPV20's effekt på cellepatologisk
kolesterolphobning**

Projektperiode 01.01.2003 – 31.12.2005

Projektansvarlig
Christian Würtz Heegaard

Laboratorium for Proteinkemi
Molekylærbiologisk Institut
Aarhus Universitet
Gustav Wieds Vej 10-C, 3.2
8000 Århus C.

Indholdsfortegnelse	side
1. Projektledelse og øvrige medarbejdere	3
2. Resume	4
3. Summary	6
4. Baggrund	8
5. Projektet formål	10
6. Projektets forløb, metoder og resultater	10
6.1 <i>Oprensning, modifikationer og strukturelle analyser af EPV20</i>	10
6.2 <i>Test af EPV20's biologiske aktivitet i Niemann-Pick C2 celleassay</i>	12
6.3 <i>Undersøgelse af EPV20's indflydelse på skumcelle dannelse</i>	13
6.4 <i>Museforsøg med EPV20</i>	14
6.5 <i>EPV20's interaktioner med andre proteiner undersøges</i>	16
6.6 <i>Immuncytokemisk lokalisation af internaliseret EPV20 i humane celler</i>	16
7. Liste over publikationer mm.	17
8. Redegørelse for forskeruddannelse, herunder tilknyttede gæsteforskere og udstationering	18
9. Redegørelse for nationale og internationale samarbejdsrelationer	19
10. Vurdering af resultaternes praktiske og videnskabelige betydning	19
11. Projektets relation til nye/andre mejerirelaterede samarbejdsprojekter	19

1. Projektledelse og øvrige medarbejdere

Projektledelse:

Christian Würtz Heegaard, cand. scient, Ph.D.
Laboratorium for Proteinkemi, Molekylærbiologisk Institut, Aarhus Universitet
Tel: 89 42 50 93 , Fax: 86 13 65 97, E-mail: cwh@mb.au.dk

Øvrige medarbejdere:

Laborant Lise Møller Fogh
Specialestuderende Marianne Skov Nielsen
Specialestuderende Lise Kristine Kvisgaard
Specialestuderende Kim Magnussen
Præspecialestuderende Gitte Krogh Nielsen

2. Resume

Kolesterol er for mange et negativt ladet ord på grund af dets status som risikofaktorer ved udvikling af åreforkalkning og blodpropper. Men kolesterol er også et livsnødvendigt og gavnligt fedtstof der indgår i opbygningen af cellevægge og nervebaner. Derudover er det en byggesten i syntesen af steroidhormoner, galdesyre og D-vitamin. Organismen danner selv kolesterol i leveren, binyrerne og tarmen i mængder, der er nøje afstemt efter kostens indhold af kolesterol. Kolesterol ikke er direkte opløseligt i vand, derfor transporteres kolesterol altid i kompleks med vandopløseligt proteiner. De bedst kendte af slagsen er de kolesterolbindende lipoproteiner, der i blodbanen fragter kolesterol imellem de perifere væv og leveren. Derimod er vor viden om, hvorledes kolesterol transporteres og fordeles mellem cellens lipidholdige organeller og membraner endnu yderst begrænset. Ikke desto mindre, på grund af de vigtige sundhedsmæssige aspekter udforskes mekanismerne bag cellernes transport og omsætning af kolesterol intensivt. Det er dog først indenfor de sidste fem år, at undersøgelser af den uhelbredelige kolesterol aflejringssygdomme Niemann-Pick C2 har kastet lys over identiteten af et kolesterol-bindende protein, der fungerer som universel kolesteroltransportør i kroppens celler. Niemann-Pick C2 patienternes celler er karakteriseret ved en manglende evne til at omsætte kolesterol importeret fra blodbanen via lipoprotein. Den resulterende kolesterol ophobning giver anledning til en forstørrelse af de indre organer, forskelligartede neurologiske forstyrrelser og tidlig demens. Sygdommen er uhelbredelig og patienterne dør almindeligvis i skolealderen. Biokemiske og genetiske undersøgelser har påvist, at Niemann-Pick C2 patienter har en defekt i, eller fravær af et protein kaldet NPC2. Hvorledes NPC2 forhindrer kolesterol i at ophobe sig i cellerne vides ikke, men glycosyleringsprofilen er vigtig idet evnen til via hexose derivatet mannose 6-fosfat, at binding til IGF-2/mannose 6-fosfat receptoren ser ud til at have stor klinisk betydning.

Hidtil er det kun lykkedes at isolere meget begrænsede mængder af humant NPC2 protein. Det er derfor bemærkelsesværdigt, at komælk indeholder relativt store mængder af det tilsvarende bovine protein, navngivet EPV20. Med baggrund i projektgruppens tidligere udarbejdede protokoller for oprensning af EPV20 og vort kendskab til proteinets strukturelle opbygning, har vi benyttet muligheden til ved hjælp af struktur-funktionsanalyser, at undersøge om EPV20 fra mælk og industrielt forarbejdede mælkefraktioner, har bevaret sin evne til deltagelse i opretholdelse af cellernes kolesterolbalance.

Immunhistokemiske undersøgelser af formalin fikserede vævssnit fra yver med antistof mod EPV20 viser, at EPV20 fortrinsvist findes i det sekretoriske epitel, hvorfra også syntese og udskillelse af mælkeprotein finder sted. Immunoblot analyse udført på diverse mælkefraktioner, herunder industrielt forarbejdede fraktioner, fastslår at EPV20 er et typisk valleprotein, der tillige findes i filtrater baseret på sur og sød valle. Desuden findes proteinet i skummetælks-lipidfraktionen, der fortrinsvis indeholder membranfragmenter fra fedtkuglerne og det sekretoriske væv i mælkekirtlen. Immuncytokemisk fluorescens mikroskop understøtter vor antagelse om at EPV20 internaliseres af humane celler.

For at afdække mekanismen bag EPV20's bidrag til opretholdelse af den nødvendige kolesterol ligevægt i kroppens celler, har vi gjort nye strukturelle og biokemiske studier på proteinet. Således er EPV20 med succes blevet krystalliseret i tilstedeværelse af deoxycholate. Krystalformen har vist sig at sprede røntgenstrålingen så godt, at det er lykkedes at beregne proteinets tredimensionelle struktur. Endvidere har vi forsøgt at identificere andre proteiner der reagerer med EPV20 i arbejde med at opretholde kolesterolbalancen i cellerne. EPV20-affinitets kromatografi og den efterfølgende proteinkemiske analyse viste, at IgG, lactoferrin, BSA og cyclophilin B elueres fra søjlen.

Implementeringen af nyt *in vitro* celleassay, til kvantitativ monitorering af kolesterol efflux viser, at EPV20 nedbringer indholdet af akkumuleret kolesterol i dyrkede Niemann-Pick C2 patienter celler med ca. 75%, til et niveau der ligger under det kolesterol vi finder i dyrkede celle fra kontrol personer. Også EPV20 oprenset fra et industriel fremstillet valleprotein-isolat er biologisk aktiv. En undersøgelse af EPV20's effekt på optag og akkumulering af oxideret-LDL kolesterol i aktiverede monocytter/makrofager isoleret fra humant blod er foretaget. Vi kan ikke entydigt påvise, at EPV20 påvirker skumcelledannelsen, idet vi dog i enkelte tilfælde monitorerede en moderat reducerende effekt af EPV20 på ophobning af kolesterol i de aktiverede immuncellerne.

In vivo undersøgelser på mus har vist, at intravenøs administration af radioaktivmærket EPV20 usædvanligt hurtigt cleares fra blodbanen. Da det ikke kan påvises, at EPV20 udskilles i urin eller fæces og ikke opkoncentreres i enkeltorganer eller væv, tolker vi undersøgelserne således at EPV20 optages og fordele sig jævnt i musen. EPV20 absorption fra tarmen er undersøgt *in vivo* hos museunger. Musene fik peroralt (gavage) doseret radiomærket EPV20 opløst i mælk. De efterfølgende analyser af blodprøver og organer indikerer, at intakt EPV20 kan passere tarmen. I lighed med hvad vi fandt efter

intravenøs administration, opkoncentreres EPV20 tilsyneladende ikke i specifikke væv men fordeles rundt i organismen.

3. Summary

Cholesterol is an indispensable component of mammalian cell membranes, which provides structural rigidity and aids in the selective permeability of the lipid bilayer. Cholesterol also serves as precursor for the synthesis of steroid hormones, vitamin D, and bile salts that are crucial substances for proper dietary nutrient absorption and reproductive biology. On the other hand, cholesterol accumulation is deleterious for cellular function and associated with a number of disorders. The latter is exemplified by the inborn errors of cholesterol trafficking as observed in Tangier disease and Niemann-Pick C, or the more common pathogenesis of atherosclerosis and possibly Alzheimer disease.

Due to the toxic effects of excess cellular cholesterol, cells normally exhibit tight control over their cholesterol content. They acquire cholesterol either by *de novo* biosynthesis in the endoplasmic reticulum or via lysosomal degradation of plasma-derived low-density lipoprotein (LDL) internalised by receptor-mediated endocytosis. Accumulation of free cholesterol is prevented by efficient down-regulation of these mechanisms. In addition, excess cholesterol is removed by delivery to extracellular cholesterol acceptors or by esterification, which convert cholesterol into a more soluble and inert form suitable for storage in intracellular lipid droplets. Although many details of receptor mediated uptake and plasma membrane export of cholesterol have been solved, we are still faced with the important unresolved questions about how endosomal LDL derived cholesterol is mobilised, made available for efflux to extracellular acceptors, and thus how cells maintain cholesterol homeostasis.

Recently studies of Niemann–Pick disease type C2, a rare lethal inherited lysosomal storage disorder that leads to accumulation of intracellular cholesterol in somatic cells, have shown that a soluble cholesterol binding protein, NPC2, that resides primarily in the lysosome is mandatory for efflux of LDL derived cholesterol. Although a whole body of evidence suggests that the NPC2 protein is vital for cellular cholesterol homeostasis, its precise function and relationship with other proteins remain unclear.

We have successfully purified the bovine NPC2 homologue, EPV20, from milk, which somewhat surprisingly was found to contain relatively high amounts for an alleged lysosomal protein. Our purification technique provides NPC2 levels sufficient for both structural and functional analysis. Thus, since currently milk is the only natural source from which human NPC2 is readily available we have studied the accessibility and functional potential of milk derived EPV20 in maintains of cholesterol homeostasis.

We establish that the purified protein binds cholesterol and the mannose-6-phosphate/IGF2 receptor. Since the latter mediates transport of extracellular proteins to the lysosomal compartments, the efficacy of extracellular NPC2 treatment for restoration of cholesterol homeostasis was investigated. These studies reveal that administration of the milk derived NPC2- protein efficiently eradicates lethal cholesterol accumulation in cultured Niemann-Pick C2 but not in oxidised LDL-loaded human macrophages.

Highly specific antigen-affinity purified polyclonal antibodies was raised against EPV20. Immunoblotting of separated milk fractions and industrial processed milk products revealed that EPV20 mainly merge with whey ingredients. Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of expression of EPV20 in bovine mammary gland, reveal pronounced staining in the secretory epithelium. Confocal fluorescence immunocytochemical studies in human fibroblasts indicate that EPV20 is taken up by the cells and partly resides in lysosome-associated membrane protein-2 vesicles. The data explains why EPV20 is relative abundant in bovine milk and imply that the bioactive protein may have a functional role in mammary gland and/or improve the competitive success of offspring that consume the sterol binding protein. In connection with the latter it is noteworthy that our *in vivo* investigation in mice indicate the intravenous administrated EPV20 is fast and widely distributed in the body and that EPV20 can be recovered from bold and tissue following administration by oral gavage.

Finding interactions between proteins involved in common cellular functions is a way to get a broader view of how they work co-operatively in a cell. Thus, analysis of the functional network of cholesterol transport in the cell has been undertaken by analysing EPV20 binding to other proteins. Experiments were performed in which immobilised EPV20 served as ligand for screening of possible interactions with other proteins from extract of bovine mammary gland. The experiments reveal EPV20 affinity towards IgG, lactoferrin, serum albumin, and cyclophilin B. Whether or not among these proteins lie functional meaningful information is yet to be proven.

The effectiveness of the preparation procedure fulfils the high quantitative needs of EPV20 to undertake crystallisation experiments as a first step towards structure determination. Thus, EPV20 crystals have successfully been made and diffracting at high resolution has been performed. The three-dimensional arrangement of EPV20 and its deoxycholate adjuvant has been obtained.

We conclude that EPV20 is readily available for removal of the cytotoxic pool of cholesterol in NPC2 fibroblasts and thus provides a useful tool to study the pathogenesis of the NPC2 disease and regulation of cellular cholesterol homeostasis in general.

4. Baggrund

Amning har mange positive effekter på barnets sundhed og udvikling. Blandt andet har flere undersøgelser bekræftet, at ammede børn klarer sig bedre i intelligens- og motoriske tests, har mindre risiko for at blive overvægtige og tendens til at lavere blodtryk senere i livet sammenlignet med ikke ammede børn. Baggrunden herfor er ikke entydigt belyst. Der er stor lighed i indholdet af aminosyre, mættet og umættet fedt i modermælk og modermælkserstatning. Derimod indeholder modermælk høje koncentrationer af kolesterol og langkædede flerumættede fedtsyrer sammenholdt med modermælkserstatning. En række undersøgelser har vist at, disse fedtstoffer medvirker ved opbygning af hjerne og nervesystem. Sammenholdt med at ammede børn generelt har et højere niveau af serum-kolesterol, udgør modermælken indhold af kolesterol og langkædede flerumættede fedtsyrer en mulig biologisk forklaring på de observerede forskelle i indlæring og motorik mellem ammede og ikke ammede børn. Kolesteroles betydning for den neurologiske udvikling understreges af, at medfødte defekter i kroppens kolesterol omsætning medfører alvorlige misdannelser i hjernen, forskelligartede neurologiske forstyrrelser, en hurtigt progredierende demens og præmatur død. Forsøg med tilsætning af kolesterol til modermælkserstatning viser at serum-kolesterol hos de undersøgte børn placerede sig mellem niveauet hos ammede børn og børn, der havde fået almindelig modermælkserstatning. Dette studie tyder på, at tilsætning af kolesterol til modermælkserstatning medfører en lipidprofil tættere på ammede børns. Samtidigt antyder forskellen i lipidprofil hos ammede børn og børn, der fik modermælkserstatning iblandet kolesterol, at kolesteroptag tilsyneladende påvirkes af

ukendte faktorer i modermælken.

Selv om et højt indhold af mættet fedt og kolesterol i barnets kost øger kolesterolindholdet i blodet, er niveauet imidlertid betydeligt lavere i barndommen end hos voksne. Da der ikke er kendte positive effekter af et højt indtag af kolesterol i sidstnævnte aldersgruppe, anses det for hensigtsmæssigt at begrænse indtaget af kolesterol. Dette skyldes primært, at plasma kolesterol niveauet er en risikofaktor for udvikling af åreforkalkning og udvikling af blodpropper i den voksne befolkning. Modsat kan kolesterolsænkning hos voksne lede til bivirkninger fra nervesystemet. Irritabilitet, selvmordsimpulser og aggressiv opførsel er nogle bivirkninger. Andre er impotens, hukommelsestab, smygende demens, samt smerter og lammelser. Med andre ord er evnen til at regulere kroppens omsætning af kolesterol er en betydningsfuld egenskab, der påvirker menneskets udvikling fra fødsel til død.

På grund af vigtige sundhedsmæssige aspekter udforskes mekanismerne bag kroppens optag, omsætning og udskillelse af kolesterol intensivt. Kolesterol indgår som byggesten mange steder i kroppen, bl.a. i hormoner, i galden og ikke mindst i cellevæggen. Hvorfor en af udfordringerne er vort manglende kendskab til hvorledes kolesterol transporteres blandt cellens organeller og samtidigt undgår fedtstoffets tendens til sammenklumpning og udfældning i cellens indre vandige miljø (cytosolen). Til afhjælpning af problemet med fedtstoffers ringe opløselighed findes i cytosolen fedtsyrebindende transport proteiner. Fedtbindingen til disse intracellulære transportproteiner skal dels forhindre udfældning og dels tjene til at føre fedtstoffets fra den én lokalitet i cellen mod dets endelige bestemmelsessted.

Nyligt har studier af den uhelbredelige sygdom Niemann-Pick C2 (NPC2) kastet lys over identiteten af en ny og vigtig brik i cellernes evne til at omsætte kolesterol. Niemann-Pick C2 patienter er karakteriseret ved at mangle evnen til at relokere kolesterol optaget fra blodbanen. Den resulterende abnorme ophobning af kolesterol i cellerne er fatal, og patienterne dør som oftest inden skolealderen. Genetiske undersøgelser har vist, at Niemann-Pick C2 syndromet skyldes en defekt i eller fravær af proteinet NPC2. Dette støttes af cellebiologiske eksperimenter, der viser, at celler fra Niemann-Pick C2 patienter behandlet med proteinet NPC2 ikke ophober kolesterol. Præcis hvorledes NPC2 beforder cellernes evne til at omsætte det uopløselige kolesterol vides ikke, men en mannose 6-fosfat (Man6P) glykosylering af NPC2 har vist sig at være en forudsætning for processen. Dette tilskrives, at

ekstracellulært NPC2 via Man6P bindes til celleoverfladens IGF-2/Man6P-receptor (IGF-2/Man6PR) der transporterer proteinet ind i cellerne til den ophobede kolesterol.

Det humane protein NPC2, er ikke kommercielt tilgængeligt og den aktive rekombinante form af NPC2 findes kun i laboratorier, der isolere meget begrænsede mængder af proteinet fra eukaryote celler. Det er derfor interessant at vi i forbindelse med et tidligere FØTEK projekt har vist, at NPC2's bovine homolog EPV20 kan oprenses fra komælk. Vore undersøgelser viser, at EPV20, ligesom sin humane homolog, er et kolesterolbindende protein, hvis forekomst ikke indskrænker sig til mælk men i meget små mængder også findes udbredt i alle organismens væv. Vore cellebiologiske eksperimenter har vist, at tilsætning af EPV20 ($>10^6$ gram/ml) til dyrkede kolesterolakkumulerende Niemann-Pick C2 patienter celler, fjernes det ophobede kolesterol, således disse optræder som celler fra normale kontrolpersoner. Udgangspunktet for det foreliggende projekt var således påvisningen af, at EPV20 oprenset fra bovin mælk kan substituere NPC2 og påvirke humane cellers evne til af omsætte kolesterol .

5. Projektet formål

Overordnet er projektets formål at bidrage med ny viden om bioaktive komponenter i mælk. Vi har tidligere påvist, at det findes stor strukturel lighed mellem den livsnødvendige cellulære kolesteroltransportør NPC2 og mælkens EPV20. Det er hensigten med projektet, at give en yderligere strukturel og funktionel karakterisering af mælkeproteinet. Forekomsten af biologisk aktivt EPV20 i industrielt forarbejdede mælkefraktioner undersøges mhp. eventuel etablering af industriel processkala oprensningmetode. Eksperimentelt inddrages dyreforsøg til, at belyse hvorledes proteinet opfører sig i organismen.

6. Projektets forløb, metoder og resultater

6.1 Oprensning, modifikationer og strukturelle analyser af EPV20.

EPV20 er i projektperioden løbende oprenset fra mælk. Hertil er anvendt den tidligere udarbejdede oprensningmetode omfattende henholdsvis anion- og kationbytter kromatografi.

Oprensset EPV20 er bl.a. brugt til affinitetsoprensning af polyklonale antistoffer rettet mod EPV20. Antistofferne er benyttet til vha. immunoblotting, at sammenligne indholdet af EPV20 i diverse mælkefraktioner, herunder rå mælk, skummetmælk, valle, fedtkuglemembran, kærnemælk, fraktioner af ultracentrifugeret skummetmælk (serum, kasein og skummetmælksmembraner), samt valleprodukterne whey fat concentrate (WFC) og whey protein isolate (WPI). Vi fandt, at EPV20 opfører sig som et typisk lavmolekylært valleprotein. Desuden findes proteinet i stor mængde i skummetmælksmembran-fraktionen, der fortrinsvis indeholder membranfragmenter afsnøret fra fedtkuglerne og mælkekirtlen. Skummetmælksmembranerne indeholder en del kolesterol, hvilket sandsynligvis forklarer hvorfor det kolesterolbindende protein EPV20 er opkoncentreret i fraktionen. Idet indholdet af EPV20 i ostevalle baseret WPI er sammenligneligt med, hvad vi finder i skummetmælk, har vi vha. en let modificeret oprensningssprocedure isoleret og undersøgt proteinet fra denne ostevalle baserede fraktion.

Enzymatisk deglykosylering af det oprensede EPV20 tyder på, at mælkeprotein præparationen er ensartet glykosyleret. Undersøgelsen viser desuden, at mælkens EPV20 har den specielle mannose 6-fosfat glykosylering, der formodes, at være en forudsætning for proteinets kanalisering til cellens organeller og opretholdelse af kolesterol balancen. Vi viser desuden, at det bovine protein genkendes og bindes til IGF-2/mannose 6-fosfat receptoren, der findes på overfladen af humane celler. Vore undersøgelser viser desuden, at oprenset kolesterol bindende EPV20 er særdeles modstandsdygtigt mod proteolytisk nedbrydning. Fjernes kolesterolet ændres den proteolytiske stabilitet af det oprensede protein markant og EPV20 bliver labilt i nærvær af pepsin og trypsin. Observationen tyder på, at kolesterol binding inducere en mere stabil struktur sammenlignet med apo-formen af proteinet. Set ud fra et funktionelt synspunkt er det derfor en fordel, at mælkens EPV20 primært findes i kompleks med kolesterol.

Den tredimensionelle struktur af det kolesterolbindende EPV20 er ikke tidligere bestemt. Med henblik på at få foretaget en krystal struktur analyse af det kolesterol bindende protein, har vi undersøgt egnede krystallisationsbetingelser for EPV20. I forbindelse hermed valgte vi at arbejde med den deglykosyleret form af EPV20, da proteiner uden sukkerstof oftest er nemmere at krystallisere. Kolesterol bindende EPV20 er derfor oprenset og behandlet med endoglycosidase H ser fraspalter mannose 6-fosfat glykosyleringen. EPV20 er derefter skilt fra enzym og kulhydrat delen vha. gelfiltrering. Det er lykkedes, at danne

EPV20 krystaller. En af krystalformerne har vist sig at sprede røntgenstrålingen så godt, at vi kan lave en meget nøjagtig strukturbestemmelse af proteinet.

6.2 Test af EPV20's biologiske aktivitet i Niemann-Pick C2 celleassay.

Som et supplement til den benyttede filipin farvning, anvendt kvalitativt til visualisering af intracellulært kolesterol, har vi implementeret en kvantitativ metode til monitorering af kolesterol efflux. Den nye metoden bygger på anvendelsen af isolerede lipoproteiner, der normalt fungerer som transportører af kolesterol i blodbanen. På lipoproteinernes overflade findes forskellige signal-proteiner som regulerer hhv. optagelse og udskillelse af fedtstoffer fra celler, en egenskab vi udnytter i *in vitro* efflux assayet. Som udgangspunkt for præparation af lipoproteinerne, bruges frisk EDTA behandlet donorblod (tilladelsen til anvendelse af donorblod er indhentet hos Den videnskabetiske Komité for Århus Amt). Efter tapningen skilles blodlegemerne fra plasmaet ved centrifugering. Lipoproteinerne VLDL, LDL og HDL adskilles ved sekventiel ultracentrifugering i en stigende kaliumbromid gradient. Ved diffusion inkorporeres radioaktivt mærket kolesterylester i LDL partiklerne. Det resulterende præparation af LDL beriget med radioaktivt kolesterylester ($[^3\text{H}]\text{CE-LDL}$) isoleres fra VLDL-deficient plasma ved ultracentrifugering. Niemann-Pick C2 (NPC2) patient celler dyrkes med tilsætning af hundrede $\mu\text{Ci } [^3\text{H}]\text{CE-LDL/ml}$ +/- EPV20. Efter endt inkubation fjernes overskydende $[^3\text{H}]\text{CE-LDL}$ og cellerne behandles på ny, denne gang med HDL +/- EPV20. Efter endt inkubation opsamles mediet og de behandlede cellers indhold af lipid ekstraheres med organiske solventer. Solventerne afdampes delvist, hvorefter ^3H aktiviteten i lipid ekstrakterne måles i scintillationstæller. Tælle tallene korrigeres for variationer i antallet af behandlede celler, idet proteinindholdet i de enkelte brønde bestemmes efter endt lipid ekstraktion. Protein opsamles i NaOH og koncentrationen bestemmes med Lowry metoden.

Ved brug af det ovenfor skitserede $[^3\text{H}]\text{CE-LDL}$ assay, er EPV20's effekt på kolesterol ophobning i fibroblastceller isoleret fra normale individer, Niemann-Pick C2- og Niemann-Pick C1-patienter sammenlignet. Behandling med EPV20 reducere Niemann-Pick C2 cellernes indhold af kolesterol/kolesterylester tracer med 70 – 80%. Den opnåede reduktion af tracer indholdet i patientceller viser tilmed, at kolesterol/kolesterylester mængden faldt til et niveau der er mindre end hvad der findes i fibroblastceller fra normale kontrolpersoner. Derimod har EPV20 ingen signifikant effekt på ophobning af kolesterol i

fibroblast celler fra Niemann-Pick C1 patienter. I modsætning til hvad der almindeligtvist observeres ved kolesterol efflux undersøgelser, finder vi ingen nævneværdig effekt HDL tilsætning i forbindelse med EPV20 induceret kolesterol efflux. Idet tilsat HDL binder uopløseligt kolesterol og derved forskyder ligevægten af kolesterol mod den ekstracellulære fase. Hvorvidt kolesterolbindende EPV20 eventuelt agere uafhængigt af den sædvanlige kolesterol efflux pathway (ATP-binding cassette transporter-1 (ABCA-1)/Apolipoprotein A1 (ApoA-1) pathwayen), er et spørgsmål vi vil forsøge at belyse i vort fortsatte arbejde med EPV20.

Filipin-kolesterol farvning af fikserede fibroblast celler der normalt bruges til klinisk diagnosticering af Niemann-Pick C støtter konklusionerne erhvervet vha. [³H]CE-LDL assayet.

6.3 Undersøgelse af EPV20's indflydelse på skumcelle dannelse.

De tidligste forandringer ved åreforkalkning består overvejende af kolesterol ophobning i blodkarrene. Årsagen hertil er en immunologisk proces, der foregår lige under karvæggens yderste lag (intima). Opmærksomheden er rettet mod kolesterolrige LDL-partikler, fordi disse kan oxideres i blodbanen. Den oxiderede form (oxLDL) transporteres ind og akkumulerer i intima, hvor immunceller (makrofager) opfatter lipoproteinet som et fremmed element, der skal fjernes. Makrofagerne optager via deres scavenger receptor det oxiderede LDL, men er ikke istand til at fordøje de kolesterolholdige partikler. oxLDL ophobes i makrofagerne som derved ændrer form og bliver til kolesterol fyldte skumceller, der ikke længere istand til at forlade karvæggen. Skumcellerne går til grunde og bliver liggende som forsnævrende fedtaflejringer. Aflejringen af kalk ses på et sent stadium i åreforkalkningslæsionens udvikling, og selvom denne kalk har givet anledning til benævnelsen åreforkalkning, tillægges fedtaflejringen den væsentligst betydning.

I et forsøg på at studere den initiale fase af åreforkalkningsprocessen har vi fra bloddonorer fraktioneret blodcellerne og isoleret immuncellerne. Buffy coatens immunceller opsamles, tælles og fordeles ligeligt i plasticbakker. Cellerne dyrkes i op til to uger med tilsætning af vækstfaktor, som fremmer differentiering og overlevelse af monocyt/makrofag fraktionen. Lipoproteinerne VLDL, LDL og HDL separeres ved sekventiel ultracentrifugering af plasmafraktionen i en stigende kaliumbromid gradient. Til brug for monitorering af immuncellernes kolesteroloftagelse via scavenger receptoren oxideredes [³H]CE-LDL med

CuSO₄ ([³H]CE-oxLDL). De selekterede immunceller dyrkes i lipoproteindeficient medie, der 48 timer efter tilsættes [³H]CE-oxLDL +/- EPV20. Mediet erstattes med HDL +/- EPV20. Efter 24 timers inkubation fjernes HDL-mediet, de behandlede cellers indhold af tracer bestemmes vha. ekstraktion og scintillationstælling. Indhold af kolesterol/kolesterylester normaliseres til antallet af eksponerede celler ved hver enkelte behandling, idet proteinindholdet i de tilhørende brøndene bestemmes som ovenfor beskrevet.

I modsætning til fibroblast cellerne finder vi, at celleassayet med primær monocytte/makrofager isoleret fra humant blod giver meget uensartede resultater. Grunden hertil beror primært på vanskeligheder med at modne og dyrke de uensartede og ustabile primærcellerne, der i meget varierende antal slipper underlaget som følge af de mange manipulationer de udsættes for. De opnåede resultater må derfor tages med et hvis forbehold. Undersøgelserne tyder på, at EPV20 ikke påvirker, eller kun i ringe grad påvirker internalisering og akkumulering af oxideret-LDL-kolesterol.

6.4 Museforsøg med EPV20.

Med henblik på en farmakokinetisk evaluering af oprenset EPV20, er EPV20 joderet med den radioaktive isotop jod-125. Ved joderingsproceduren er anvendt Iodo-Gen reagent (Pierce, Rockford, IL) og Na[¹²⁵I] (100 mCi/ml, 3.7 GBq/ml; Amersham). Med henblik på at undersøge clearance fra blodbanen, er EPV20 administreret intravenøs til otte uger gamle C57BL mus. Musene fik én bolus-injektion midt på halen i en af de laterale vener. Efterfølgende lægges distalt på halen et lille snit med skalpel på tværs, hvorved en halevene gennemskæres. Konsekutive blodprøver opsamles i hæmotokritrør der centrifugeres og det resulterende plasma indsamles. Plasmaproteinerne fældes ved tilsætning af trikloreddikesyre. Proteinpræcipitatet centrifugeres ned i 5 minutter og supernatant afpipetteres til nyt reagensglas. Aktiviteten i supernatanterne måles i en gammataeller og sammenlignes med aktiviteten i de tilhørende proteinpræcipitater. Den efterfølgende farmakokinetiske undersøgelse viser en initial genfindingen af små mængder tracer i trikloreddikesyre præcipitatet- og supernatant. Således resterer efter 2 minutter 5% og 1% i hhv. trikloreddikesyre præcipitatet og supernatanten af den oprindelige bolus. Allerede efter 15 minutter er blodets indhold af tracer væk. Ligeledes fandtes der 24 timer efter behandlingen ikke fandtes betydende mængde tracer i organerne. Det bemærkedes, at der efter perfusion og

udtagning af organer stadig kunne monitoreres radioaktivitet i resterne af de døde mus, i urin og fæces. Da tab af tracer til urin og fæces ikke alene kan forklare det drastiske fald i blodets indhold af tracer, observeret efter to minutter, antager vi at traceren hurtigt er bredt fordelt i dyrenes væv. Undersøgelsen er forenelig med en selektiv og særdeles hurtig optagelse af EPV20 fra blodbanen.

EPV20 absorption fra tarmen er undersøgt i fire uger gamle museunger. En enkelt dosis mælk indeholdende [^{125}I]EPV20, svarende til ca. 50 nanogram per gram kropsvægt, er doseret oralt med sonde (gavage) til de fastende mus. Forsøget omfattede en op til 8 timer lang periode, hvorunder dyrene kunne bevæge sig frit med ad libitum adgang til vand, men ikke til foder. I forsøgsdesignet indgår udtagning af blodprøver og urinopsamling i intervaller fra 0,5 - til 8 timer efter EPV20 doseringen. Blodprøver udtages ved øjenvenepunktur under bedøvelse. Umiddelbart herefter åbnes brystkassen i dyb anæstesi og dyrene perfunderes transkardial ved gennemskylning med 0,9 % NaCl opløsning via injektion i venstre hjertekammer og punktur af højre forkammer. Dette sikrer, at dyrene aflives og samtidigt drænes for blod. Forsøgene afsluttes med at organer og væv udtages, vejes og nedfryses ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ til videre analyse. Inden vejning og nedfrysning genskyller tyndtarmen med henblik på at fjerne rester af ufordøjet materiale. Organerne og væv homogeniseres og vævsfordelingen af ^{125}I -aktiviteten er bestemt kvantitativt og kvantitativt ved henholdsvis trikloreddikesyre fældning og autoradiografi. Indhold af ^{125}I i det uopløselige materiale og supernatanten adskilles og monitoreres i gammataeller. Supernatanten tilsættes trikloreddikesyre og det resulterende proteinpræcipitat centrifugeres ned. ^{125}I dosis i fældede og ikke-præcipiterede protein fraktioner bestemmes ved monitorering af gamma-stråling. Forudsat at [^{125}I]EPV20 findes i den fældede proteinfraktion, vaskes et parallel trikloreddikesyre fældes homogenat med acetone og opløses i SDS-prøvebuffer. Efter endt SDS-polyacrylamid gelelektroforese anvendes autoradiografi til verifikation af EPV20 tilstedeværelse i homogenaterne. Vævsfordelingen af ^{125}I -aktiviteten fra mærket EPV20 er konsistent i de undersøgte dyr. Vi fandt koncentrationen af fældbart ^{125}I i blodet holdt sig konstant gennem hele forsøgsperioden. Den autoradiografiske undersøgelse viste intakt EPV20 kunne genfindes i blodet. Det højeste niveau af radioaktivitet blev observeret i skjoldbruskkirtlen efter 8 timer, men tilstedeværelse af intakt EPV20 kunne detekteres i alle organer. Relative høje koncentrationer blev fundet i tyndtarmen og aorta. I lighed med de intravenøst behandlede mus konstateres, at hovedparten af det optagende protein ikke akkumuleres i enkelte organer,

med i stedet findes bredt fordelt i dyrene. Resultaterne tolkes således, at en del af EPV20 undgår first-pass metabolismen idet proteinet passere tarmvæg og lever og når det systemiske kredsløb. Absorptionsfraktion efter fire timer beregnes efter de givende forsøgsbetingelser til ca. 80%. Vi observere under forsøgsperioden ingen indikationer på, at musenes aktivitetsniveau påvirkes. Forekomst af tegn på stress (stritpels, sammenkrøbet stilling m.m.) eller dødsfald blandt musene blev ikke registreret. Vi konkludere af EPV20 hos ungmus kan optages over mave-tarm kanalen og dermed potentielt bidrage til intra- og ekstracellulær kolesterol transport i vævene.

6.5 EPV20's interaktioner med andre proteiner undersøges

Med henblik på at identificere proteiner, der eventuelt i samarbejde med EPV20 bidrager til opretholdelse af cellernes kolesterolbalance, er anvendt affinitetsoprensning. Yvervæv er homogeniseret og homogenatet brugt i bindingsforsøgene. EPV20's interaktion med andre proteiner er undersøgt vha. EPV20-affinitets-kromatografi og cuvette-based optical biosensor (IASys) analyse. Ved EPV20-affinitets-kromatografi er EPV20 immobiliseret på divinylsulfon aktiverede agarose partikler. Yvervævsekstraktet er dialyseret mod Tris-buffer (pH 7,5) og påsat EPV20-søjlen. Ikke bundet protein vaskes ud af søjlen med Tris-buffere og søjlen elueret med glycine pH 2,5. Ved IASys analysen kobles oprenset EPV20 til en glutaraldehyd aktiveret amino-coated chip (4 mm²). Små volumina af yvervævsekstrakt (100 µl) injiceres på EPV20-chipen, der efterfølgende vaskes med fosfatbuffer og elueres med 10 mM HCl. De eluerede proteiner fra EPV20-affinitets-kromatografi og IASys analyserne er separeret efter størrelse ved SDS-PAGE. Proteinerne identificeres ved farvning og proteinbåndene udskæres. Gelfragmenternes proteinhold trypsineres efter en in-gel digestion procedure og trypsinfragmenterne analyseres ved Masse Spektrometri (MS) og sekvensdatabase- og informationssøgning. Undersøgelserne viser, at IgG, lactoferrin, serum albumin og cyclophilin B elueres fra EPV20 overfladerne.

6.6 Immuncytokemisk lokalisering af internaliseret EPV20 i humane celler.

Idet resultater, der opnås med immunologiske metoder afhænger af kvaliteten af de antistoffer der anvendes, er specificiteten af EPV20 antistofferne øget ved hjælp af absorption til matrice koblet EPV20. Specificiteten af det absorptions oprensede antistof er undersøgt ved hjælp af immunoblotting. Undersøgelsen viser, at de oprensede antistoffer er af en kvalitet der er

anvendelig til brug for cyto- og histokemiske metoder. Desuden konstateredes, at antistofpræparationen også genkender EPV20's modsvarende humane protein, som er bestemt i sæd.

Til de cellebiologiske undersøgelser, der skal belyse lokalisering og EPV20 tageting i mammale celler, anvendes konfokal mikroskopi kombineret med immunofluorescence detektion. Metoden muliggør en visualisering af optiske "skiver," der bevæger ned igennem en celle. Fibroblast cellerne dyrkes i cellebakker i monolag på dækglass og stimuleres herefter til at optage EPV20. Efterfølgende bliver cellerne hurtigt fikseret, hvilket betyder at proteinernes øjeblikkelige placering i cellerne "fryses" og bevares. Hver brønd bliver herefter inkuberet med det absorptions oprensede EPV20-antistof eventuelt sammen med antistoffer rettet mod intracellulære markørproteiner. Herefter inkuberes der med fluorescensmærkede sekundære antistoffer, der genkender de anvendte primære antistoffer. Undersøgelserne tyder på, at tilsat EPV20 efter internalisering i cellerne er vidt distribueret i cellens cytoplasma. Anvendelsen af dobbelt-fluorescensmærkningsteknik, hvor detektion af forskellige proteiner associeret med diverse celleorganeller indgår som pejlemærker, tyder desuden på at en del af mælkeproteinet føres mod lysosomer, samme organeller hvori kolesterol hos Niemann-pick C patienter ophobes.

De immunohistokemiske undersøgelser viser, at indholdet af EPV20 er relativt højt i de mælkeproducerende celler i yvervæv fra køer og den øvre nyregange (proximale tubulus segment S1) hos rotter. I overensstemmelse hermed er segment S1 engageret i receptor aktiv reabsorption af proteiner og har et højt indehold af den EPV20 bindende IGF-2/mannose 6-fosfat receptoren.

7. Liste over publikationer mm.

Indlæg ved kongresser, symposier o.l.

Heegaard C.W. (2003) Effect of milk protein on cholesterol stuck in traffic: Correction of the Niemann-Pick C2 phenotype in cultured cells. The Nordic Academy of Advanced Study Conference: Quality and Health Aspects of Milk Components. Wadahl, Norway.

Heegaard C.W., Nielsen M.S., Petersen T.E. (2003) Effect of EPV20 derived from cow's milk on Niemann-Pick type C2 fibroblasts and subcellular localization of HE1 in normal

fibroblasts. The International Conference on Niemann-Pick Type c Disease, Tucson, Arizona, Abstract 37.

Heegaard, C.W. (2004) EPV20 – nyt bioaktivt mælkeprotein involveret i kolesterolmetabolisme. *Mælkeritidende* 15, 360-364

Heegaard, C.W. (2004) EPV20 in cholesterol transport. NORFA Workshop: Recent Progress in Quality and Health Aspects of Milk Components, Tallinn, Letland.

Kvistgaard, L.K., Nielsen, M.S., Heegaard, C.W. (2005) Milk derived EPV20 in intracellular cholesterol homeostasis. NordForsk Conference: Milk Products and Components in Health and Disease. Reykjavik, Iceland.

Videnskabelige Afhandlinger

Magnusson, K. (2003) Another way of cholesterol regulation. Præspective.

Nielsen, M.S., (2004) Decisive Structural Features and Function of EPV20/NPC2 Isolated from Bovine Milk. Cand. scient. specialrapport.

Kvistgaard L.K. (2004) Effect of EPV20 on cellular cholesterol homeostasis in Niemann-Pick type C. Præspective.

8. Redegørelse for forskeruddannelse, herunder tilknyttede gæsteforskere og udstationering

Med udgangspunkt i det i projektet udførte arbejde er Marianne Skov tildelt kandidatgraden i naturvidenskab. Kim Magnussen og Lise Kristine Kvisgaard har foreløbigt skrevet præspeciale og forventes snarest, at aflevere specialer med henblik på erhvervelse af kandidatgraden i naturvidenskab. Gitte Krogh Nielsen speciale arbejde fortsætter, idet vi samtidigt forsøger at skaffe midler til et forhåndsgodkendt ph.d. projekt under det sundhedsvidenskabelige fakultet på Aarhus universitet, omhandlende EPV20. Mariarosaria Napolitano, Laboratory of Metabolism and Pathological Biochemistry, Istituto Superiore di Sanita, Rome, Italy, har gæstet Laboratorium for Proteinkemi, AU, med henblik på

implementering af nyt celleassay.

9. Redegørelse for nationale og internationale samarbejdsrelationer

Dele af projektet er gennemført i samarbejde Frederik Dagnæs-Hansen, Institut for Medicinsk Mikrobiologi og Immunologi, Århus Universitet, Elena Bravo, Laboratory of Metabolism and Pathological Biochemistry, Istituto Superiore di Sanita, Rome, Italy og Lindsay Sawyer, Institute for Cell and Molecular Biology and Centre for Science at Extreme Conditions, The University of Edinburgh, Scotland. Kristian Albertsen og Hans Bertelsen, Arla Foods har formidlet industrielt forarbejdede mælkeproteinfraktioner.

10. Vurdering af resultaternes praktiske og videnskabelige betydning

Opdagelsen af EPV20's evne til at normalisere kolesterolbalancen i NPC2 patientceller er væsentlig, idet komælk idag er den eneste kilde hvorfra det aktive protein kan isoleres i betydelig mængde. Syntetisk fremstilling af EPV20's korresponderende humane protein kompliceres af kravet til en særlig glykosylering, som p.t. ikke honoreres af kendte large scale ekspressionssystemer. Brystbørn har højere serum-kolesterol (13-27%) og lavere eller samme HDL/LDL-kolesterol ratio sammenlignet med ikke-ammede børn. Studier har vist, at kolesterolindtaget hos ammede børn mindsker risiko for udvikling af overvægt og giver et lavere blodtryk i voksenalderen. Desuden formodes kolesteroloptagelsen hos nyfødte at have en positiv indflydelse på intelligens og motorisk udvikling. Regulering af kroppens kolesterol optag og forbrænding er derfor interessant ud fra såvel en fysiologisk som en patologisk synsvinkel. Fundet af et mælkeprotein der influerer på cellernes kolesterol omsætning er derfor interessant. Fastslås en sammenhæng mellem mælkens EPV20 og kolesterol optag over mave-tarm kanalen og/eller distribution og aflejring af kolesterol hos mennesker, er vejen åbnet for nye diætetiske og farmakologiske produkter, såvel som forbedringer af den sundhedsmæssige kvalitet af allerede kendte produkter bl.a. inden for infant formular.

11. Projektets relation til nye/andre mejerirelaterede samarbejdsprojekter

Efter dette projektets afslutning er det lykkedes Derek J. Symula, the New York State Department of Health's Wadsworth Center Gomics Institute, NY , USA, at fremstille genmanipulere Niemann-Pick C2 deficiente (knockout) out mus. Musene er karakteriserede ved patologisk ophobning af kolesterol i cellerne og udvikler symptomer som observeres hos

Niemann-Pick C2 patienter (indlæringsvanskeligheder, lungeemfysem og præmatur død). Undersøgelse af EPV20 inducerede effekter i Niemann-Pick C2 knockout musene må anses for at være den ultimative prækliniske test af mælkeproteinets indflydelse på organismen. Vi har derfor taget initiativ til et arrangement med dr. Symula, der har indvilget i at stille knockout mus til rådighed og selv deltage i et nyt projektsamarbejde. Det er vor hensigt hermed definitivt, at belyse hvorvidt optag af EPV20 over mave-tarm kanalen eller intravenøst, forhindre aflejring af kolesterol i organismen, stimulere de sensoriske og motoriske evner og forøger livslængden. Dette arbejde søges helt eller delvist gennemført i *Forskningskonsortium for Mælkeproteiner* - et samarbejde mellem Aarhus Universitet, Danmarks Tekniske Universitet og de tre industrielle partnere, Arla Foods a.m.b.a., Semper AB og UpFront Chromatography, støttet af Statens Teknisk-Videnskabelige Forskningsråd.

