

# Afslutningsrapport

Bovin lactadherin som antiviral komponent

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2003-47

*Februar 2003*



**mejeri**foreningen

danish dairy board

**Afslutningsrapport for FØTEK III-projektet:**

**Bovin lactadherin som antiviral komponent**

Periode: 01.10.2000 – 30.09.2002

Projektansvarlige  
Jan Trige Rasmussen  
Christian Würtz Heegaard

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

## RESUMÉ

Rotavirusinfektioner er på verdensplan den dominerende enkeltårsag til behandlingskrævende diaré. Undersøgelser blandt småbørn konkluderer, at antallet af nul- til etårige med symptomer afledt af rotavirus, er mindst i gruppen, der får modermælk. Resultaterne er i overensstemmelse med forsøg, der viser at glykoprotein fraktioneret fra modermælk inhiberer rotavirus-infektion *in vitro*, samt modvirker diaré hos rotavirus-inficerede mus. Proteinkemiske undersøgelser pegede på, at den antivirale effekt kan tilskrives en fraktion af glykoproteiner der typisk er lokaliseret i mælkens fedtkuglemembran. En sammenlignende klinisk undersøgelse indikerer at modermælks gavnlige effekt positivt er korreleret med mælkens indhold af fedtkuglemembranproteinet lactadherin.

Indledningsvis har vi derfor under dette projekt undersøgt forekomsten af lactadherin i industrielt forarbejdede mælkefraktioner. Desuden har vi med afsæt i bl.a. oprenset bovin lactadherin identificeret, evalueret og dokumenteret tilstedeværelsen af rotavirus-inhiberende komponenter i bovin mælk *in vitro*. Til dette formål er etableret to rotavirus-infektionsassays baseret på dyrkning, infektion og identifikation af rotavirusvironer i henholdsvis humane kolonceller (Caco-2-celler) og rhesusabe nyre (MA104) celler. De oprensede mælkefraktioners antivirale potentiale blev testet mod rotavirusstammer isoleret fra menneske (Wa), svin (YM), kvæg (RF) og rhesusabe (RRV).

Undersøgelserne viste, at human lactadherin, i modsætning til bovin lactadherin, besidder antiviral aktivitet. Desuden konstaterede vi, at det bovine fedtkuglemembranprotein MUC1 er en effektiv inhibitor af sialinsyre-afhængige RRV-rotavirusinfektioner. MUC1 har derimod ingen effekt når det gælder inhibering af sialinsyre-uafhængige Wa-rotavirusinfektioner. Foruden MUC1 fandt vi, at et i storskala produceret og relativt uudnyttet industrielt fremstillet vallefedtkoncentratpulver (WFC) effektivt begrænser antallet af infektioner *in vitro* (>90-95% ved 0,05% WFC-opløsning). WFC udmærker sig desuden ved at besidde en bredspektret effekt, idet pulveret hæmmer infektioner forårsaget af samtlige rotavirusstammer inkluderet i undersøgelsen.

Vi konkluderer at vallefedtkoncentratet (WFC), karakteriseret ved et højt indhold af fosfolipid, lipofile- og højmolekylære proteiner, er en potent inhibitor af rotavirusinfektioner *in vitro*. Opdagelsen betyder, at dette mælkepulverprodukt, der hidtil ikke i nævneværdig grad er udnyttet kommercielt, muligvis kan anvendes som en sundhedsbefordrende komponent. For eksempel vil WFC kunne komme i betragtning ved formulering af modermælkserstatning, babymad, diætetiske produkter og andre produkter, hvor mælkeprotein bliver brugt eller kan tænkes anvendt som ingrediens. Herunder også til forebyggelse af diaré hos kalve og smågrise, der er en væsentlig økonomisk belastning for husdyrbruget. Til yderligere belysning af WFC's anvendelighed som bioaktiv komponent, påbegyndes i et nyt projekt i nærmeste fremtid en detaljeret karakterisering af, hvad der i WFC forårsager den antivirale virkning.

## SUMMARY

Among etiologic agents, rotavirus is the major cause of severe dehydration diarrhoea in infant mammals. Besides breastfeeding, to date no conceivable interventions have proven to be effective or risk-free in preventing the spread of rotavirus infection. Here we present the results of an investigation carried out in order to identify bovine milk derivatives protective against rotavirus infections.

*In vitro* and *in vivo* studies indicate that human lactadherin inhibits rotavirus binding and infectivity. Clinical trials have shown that milk with high levels of lactadherin significantly protects breast-fed children against symptomatic rotavirus infection. The structural conservation of lactadherin among different species, its relatively high levels in milk, and resistance to digestion in the stomach of the infant suggests that bovine lactadherin may also be a source of antiviral protection. Thus, we set out to investigate a possible protective effect of lactadherin from cow's milk against rotavirus infections. Considering quality and quantity we also investigated the rotavirus inhibitory effect of suitable products or subfractions derived from the industrial processing of milk.

By means of human colon cancer (Caco-2) and rhesus monkey (MA104) cell lines the antagonistic effect of various milk fractions towards the virulence of human, porcine, bovine and primate rotavirus strains was investigated in an *in vitro* rotavirus assay. The experiments revealed that although human lactadherin reduced the infection rate, bovine lactadherin had no significant effect. However, the bovine milk fat globule membrane protein MUC1 efficiently inhibited RRV infection in the MA104 cell line. Since RRV infection is dependent upon the recognition of cellular exposed sialic acid, we subscribe the effect to the high content of sialic acid in MUC1. Notably, bovine whey fat concentrate (WFC) markedly inhibited all rotavirus strains tested, with no discriminating between sialic acid dependencies.

Our data indicate that a new line of biotherapeutic therapies based on the beneficial effect of the WFC fraction may constitute a promising avenue of research to combat rotavirus infections in mammals. As it is expectable that current infant formulas contain low levels of WFC derivatives, if at all, it is our proposal that WFC has a potential as fortifying antiviral ingredient in infant formula food and dietetic foods for patients with immunological disorders. Investigations are undertaken in order to test our hypothesis.

## PROJEKTETS BAGGRUND

Talrige undersøgelser viser, at amning beskytter nyfødte mod forskellige mikrobielle infektioner. På verdensplan anslås, at incidensen af diaré er tre gange større blandt spædbørn, der får modermælkserstatning i sammenligning med spædbørn der opfostres med modermælk. Modermælksens gavnlige effekt formodes bl.a. at have sammenhæng med mælksens indhold af pro- og prebiotiske komponenter, der modellerer kompositionen af tarmens mikroflora. Desuden indeholder mælken sekretorisk IgA og antibakterielle komponenter. Til sidstnævnte gruppe henregnes fedtkuglemembranens indhold af oligosakkarider og glykoprotein, der formodes at forhindre mikrobiel adhæsion til fordøjelsessystemets slimhinder. Intentionen med projektet "Bovine lactadherin som antiviral komponent" er at bidrage med basal viden om mælkeproteiners sundhedsmæssige betydning. De senere års forskning i mælksens fedtkuglemembranproteiner har afsløret tilstedeværelse af ikke-mælkespecifikke proteiner, hvoraf nogle katalyserer eller indgår i vigtige fysiologiske og patologiske processer. Til denne gruppe af proteiner hører lactadherin, der forekommer som overfladeprotein på diverse celler. Opdagelsen af at antiviral aktivitet knytter sig til lactadherin i modermælk samt fundet af et homologt protein i bovin mælk, danner baggrund for det foreliggende projekt.

Rotavirus blev i 1969 for første gang identificeret hos kvæg, og i dag er der isoleret rotavirusstammer fra de fleste arter blandt pattedyrene. De kliniske symptomer på rotavirus-infektion er feber, kvalme, opkast og diaré. Næsten alle børn har rotavirus i fæces, men symptomer er mest udtalte i 3- til 6-måneders alderen, hvorefter incidensen er jævnt faldende. Hos voksne individer ses alvorlige tilfælde fortrinsvis blandt alderdomssvækkede og syge, hvis immunforsvar i forvejen er kompromitteret. Med omkring 18 millioner tilfælde årligt af moderate eller svære symptomer, regnes rotavirus på verdensplan for den hyppigste årsag til diaré. Dehydrering forårsaget af rotavirus forårsager årligt 900.000 dødsfald, heraf 600.000 blandt de nul- til etårige børn. Alene i USA estimeres behandling af rotavirus-infektioner at koste omkring 788 millioner dollars årligt (beregning fra 1995). Da tilnærmelsesvis alle pattedyr er recipienter for rotavirus er infektionen også et økonomisk og dyrt velfærdsmæssigt problem i husdyrbrug, hvor den hyppigt forårsager diaré hos bl.a. kalve og smågrise.

Allerede tilbage i firserne viste danske undersøgelser, at diegivning beskytter smågrise mod rotavirus-infektion. Nyere undersøgelser blandt småbørn konkluderer ligeså, at antallet af nul- til etårige med symptomer afledt af rotavirus, er signifikant mindst i gruppen, der får modermælk. Resultaterne er i overensstemmelse med undersøgelser, der viser at glykoprotein fraktioneret fra modermælk inhiberer rotavirus-infektion *in vitro*, samt modvirker diaré hos rotavirus-inficerede mus. Sammenlignende kliniske undersøgelser af modermælks forskellige komponenter viser, at koncentrationen af lactadherin er negativt korreleret med incidensen af rotavirus-symptomer. Undersøgelserne indikerer for første gang, at spædbørns kliniske status direkte afhænger af modermælksens indhold af et enkelt glykoprotein.

## PROJEKTETS MÅL

Med henblik på at evaluere og udnytte lactadherins formodede antivirale effekt mod rotavirus, undersøges forekomsten af lactadherin i den industrielle forarbejdningsproces af mælk. Det oprensede lactadherins antivirale potentiale testes mod rotavirusstammer fra menneske og husdyr. Det forventes at projektet vil bidrage med ny viden, der kan anvendes til udvikling af en ny bioaktiv mælkebaseret ingrediens, der er sundhedsmæssig signifikant og økonomisk interessant.

## PROJEKTETS FORLØB, RESULTATER OG KOMMENTARER

### *Etablering af immunologiske metoder til bestemmelse af bovin lactadherin.*

Med henblik på kvalitativt og kvantitativt at vurdere indholdet af lactadherin i diverse mælkefraktioner, etablerede vi henholdsvis Western-blotting og Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay-teknikker (ELISA) rettet mod lactadherin. Som standardprotein anvendtes lactadherin oprenset fra bovin fedtkuglemembran. Biotinyleret polyklonalt anti-lactadherin IgG er fremstillet og anvendes som primær antistof i begge assays. Problemer hidrørende et relativt højt indhold af lipid i ELISA-prøverne er afhjulpet ved anvendelsen af detergent. Begge metoder fungerer tilfredsstillende.

### *Indsamling og screening af industrielt frembragte mælkefraktioner for indhold af lactadherin.*

Baseret på vort kendskab til lactadherins tilstedeværelse i fedtkuglemembranen, blev mængden af proteinet undersøgt i følgende industrielt fremstillede mælkefraktioner;

- a) Fuldmælk
- b) Proceskærnemælk fra smørfremstilling
- c) Ostevalle (RUS)
- d) Whey fat concentrate (WFC)
- e) Whey protein isolate (WPI)

Resultaterne blev sammenholdt med indholdet af lactadherin i skummetmælk og fedtkuglemembranfraktion fremstillet i laboratoriet.

En repræsentativ analyse viser følgende indhold af lactadherin i forhold til de enkelte fraktioners totale proteinindhold (w/w). Nedenstående resultat fra ELISA undersøgelserne bekræftes af tendensen bestemt semikvantitativt ved Westernblotting:

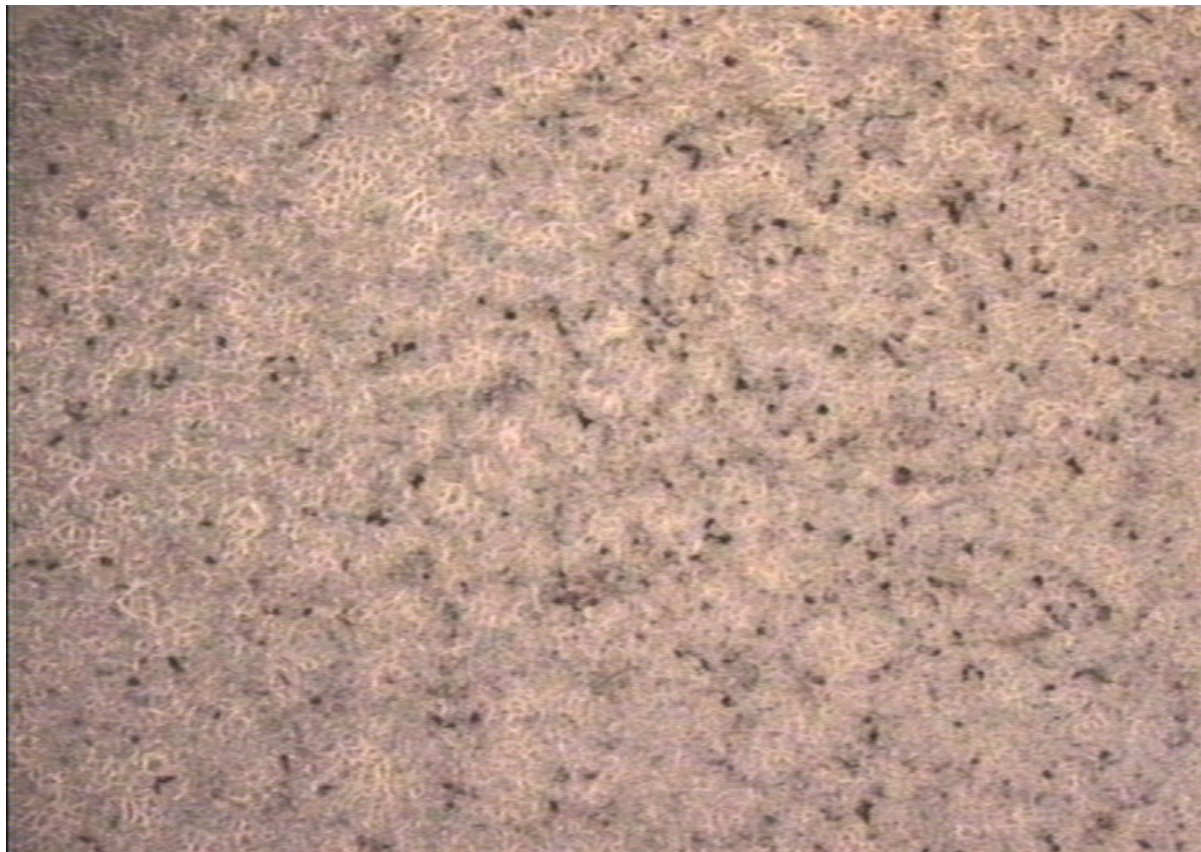
Kilde	lactadherin/protein-indhold (w/w %)
a Fuldmælk	0,37
b Proceskærnemælk	0,05
d WFC	0,17
e WPI	0,000004
Skummetmælk	0,17
Fedtkuglemembranfraktion	9,80

Sammenholdt bekræfter resultaterne at indholdet af lactadherin er størst i mælk og mælkefraktioner med et højt indhold af fedtkuglemembran. Det bemærkes at indholdet af lactadherin er lavt i WPI. WPI anvendes almindeligvis som ingrediens i bl.a. modernmælkeserstatning. Anvendes lactadherin som en indikator for et produkts indhold af fedtkuglemembranprotein må det forventes, at denne type modernmælkeserstatning ikke besidder de gavnlige egenskaber der i litteraturen tilskrives en del af fedtkuglemembranproteinerne.

### *Etablering af rotavirus assay*

Under studieophold i Cuernavaca, Mexico, har vi fået en praktisk erfaring med at håndtere rotavirus og udføre studier af virusets evne til at inficere rhesusabe-nyreceller (MA104) dyrket i kultur. Tilladelse til import, dyrkning og arbejde med rotavirus er opnået. Egnet

cellelaboratorium er opbygget og rotavirus-infektionsassayet er implementeret på Laboratorium for Proteinkemi (se figur 1). Udover MA104-cellerne anvendes humane kolon cancer celler (Caco-2) til *in vitro*-forsøgene. Forskelligt oprensede mælkeproteiners og mælkefraktioners antivirale potentiale er testet mod rotavirusstammer isoleret fra menneske (Wa), svin (YM), kvæg (RF) og rhesusabe.



Figur 1. MA104-celler dyrket i 96-huls plasticbakker. Efter 24-timers inkubation med rotavirus tilsat cellemediet vaskes overskydende viruspartikler bort. Cellerne fikseres og fraktionen af inficerede celler identificeres med antistof rettet mod rotavirus, efterfulgt af et antigenspecifikt antistof. Dette sekundære antistof er kovalent peroxidase-koblet og katalyserer omdannelsen af et peroxidasesubstrat, hvis reaktionsprodukt er farvet. Antigen-bundet primært antistof, og dermed rotavirus-inficerede celler, bliver via ELISA-teknikken visualiseret som mørke prikker.

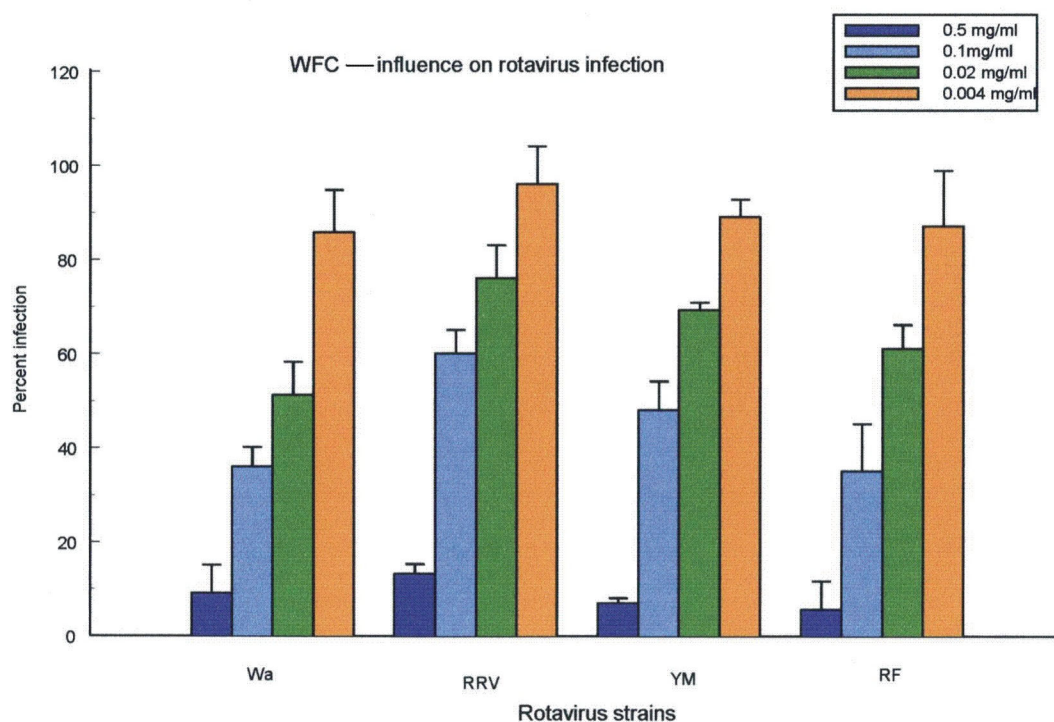
### ***Udvalgte mælkeproteiners og mælkefraktioners effekt på rotavirus infektivitet***

Vi har undersøgt hvorledes forskellige bovine og humane mælkefraktioner influerer på rotavirusinfektioner *in vitro*. Studierne omfatter foruden lactadherin også lactoferrin, isoleret fedtkuglemembran, skummetmælk, WPI, WFC og fedtkuglemembranproteinet MUC1. Vi har fundet at human lactadherin, i modsætning til bovin lactadherin, udøver en markant antiviral effekt. Undersøgelserne har vist, at fedtkuglemembranproteinet MUC1 er en effektiv inhibitor af infektioner med den sialinsyre-afhængige rhesusabe rotavirus (RRV) i MA104- og Caco-2-celler. MUC1 har derimod ingen effekt når det gælder inhibering af den sialinsyre-uafhængige humane rotavirus Wa's infektionsevne af Caco-2-celler. I modsætning til MUC1, har WFC tilsyneladende en bredspektret effekt, idet præparationen effektivt mindsker antallet af infektioner *in vitro* (>90-95% ved 0,5 mg/mL) i henholdsvis MA104 og Caco-2 inficeret med vira fra både menneske (Wa), rhesusabe (RRV), svin (YM) og kvæg (RF) (se figur 2). En inhibitorisk effekt kunne ikke monitoreres med WPI eller lactoferrin tilsat celleassayet. Fedtkuglemembranprotein isoleret fra human og bovin mælk har en inhibitorisk virkning,



human mere end bovin, om end ingen af dem tilnærmelsesvis er så effektive som MUC1 og WFC. WFC består primært af de højmolekylære og WPI af de lavmolekylære-bestanddele i opkoncentreret ostevalle (RUS). Undersøgelser der angiver forskelle og ligheder i proteinprofilen af de to komplementære fraktioner, peger i retning af at årsagen til WFC's kraftige inhibitoriske virke skal findes i et selektivt og relativt højt indhold af fedtkuglemembranproteiner.

En litteraturgennemgang viser, at de tidligere publicerede *in vitro*-undersøgelser, der fremhæver bovin lactadherin som en inhibitor af rotavirusinfektioner, baserer sig på forsøg med semioprenset lactadherin. Lactadherin-fraktionerne må her formodes at være kontamineret med andre typer af fedtkuglemembranproteiner. På baggrund af de ovenfor refererede resultater konkluderer vi, at det for bovin mælk gælder, at ét eller flere af fedtkuglemembranens proteiner, forskelligt fra lactadherin, besidder en potent antiviral effekt. Til belysning af nøjagtig hvilken eller hvilke faktorer, der danner baggrund for WFC's antivirale aktivitet *in vitro*, påbegyndes medio 2003 et nyt projekt under Innovationsloven i samarbejde med Mejeribrugets ForskningsFond. Det er hensigten med dette projekt "Mælkeprotein, undersøgelse og isolation af komponenter med potentielt forebyggende virkning mod virusinduceret diaré," at give en detaljeret proteinkemisk karakterisering af WFC, der sammenholdt med *in vivo*-undersøgelser, skal søge at identificere virksomme komponenter i WFC, samt udrede den bagvedliggende biologiske mekanisme.



Figur 2. Caco-2-celler inficeret med vira fra henholdsvis menneske (Wa), rhesusabe (RRV), svin (YM) og kvæg (RF). som indikeret i øverste højre hjørne af figuren, angiver de forskellige farver med hvilken koncentration af WFC, de forskellige vira er tilsat. Det viste resultat er baseret på minimum tre uafhængige forsøg alle udført med tredobbelt bestemmelse.



## **LISTE OVER PUBLIKATIONER**

### ***Artikler i internationale tidsskrifter***

Mikkel H. Andersen, Lars Berglund, Torben E. Petersen, Jan T. Rasmussen (2002) Annexin-V Binds to the Intracellular Part of the beta(5) Intergrin Receptor Subunit. *Biochemical and Biophysical Research Communication*; 292(2):550-557

Jialan Shi, Christian W. Heegaard, Jan T. Rasmussen, and Gary E. Gilbert. Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-L-serine and curvature strain. *In preparation*.

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

Jialan Shi, Christian W. Heegaard, Jan T. Rasmussen, Gary E. Gilbert (2002). Lactadherin Exhibits Specificity for Membranes Containing Phosphatidylserine. *The American Society of Hematology 44th Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, December 6-10, 2002*.

Anne Staudt Kvistgaard, Jan Trige Rasmussen, Torben Ellebæk Petersen, and Christian Würtz Heegaard (2002). Bovine milk derivatives in protection against rotavirus infections. *26<sup>th</sup> IDF Conference in Paris*.

### ***Videnskabelige afhandlinger***

Anne Staudt Kvistgaard (2002). Characterization of milk derivatives and their antiviral activity. Cand. Scient.- thesis, University of Aarhus

## **REDEGØRELSE FOR FORSKERUDDANNELSE HERUNDER TILKNYTTET GÆSTEFORSKERE OG UDESTATIONERINGER**

Projektet har udgjort ramme omkring erhvervelsen af kandidateksamen:

“Characterization of milk derivatives and their antiviral activity”

Anne Staudt Kvistgaard, Oktober 2002.

Jan Trige Rasmussen & Christian Würtz Heegaard har i perioden 28. januar – 5. februar 2001 været udstationeret på Departamento de Genetica y Fisiologia Molecular, Instituto de Biotecnologia, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Cuernavaca, Morelos, Mexico. Opholdet var tilegnet teoretiske overvejelser og indlæring af teknikken bag identifikation af rotavirusinfektioner *in vitro*.

Gary E. Gilbert, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA har i perioden 4 – 7 oktober 2002 gæstet Laboratorium for Proteinkemi. Dr. Gilbert berettede hvilke resultater man i Boston have opnået ved anvendelse af bovin lactadherin oprenset på Laboratorium for Proteinkemi.

## **REDEGØRELSE FOR SAMARBEJDSRELATIONER NATIONALE OG INTERNATIONALE**

Kristian Albertsen, Hans Bertelsen & Hans Burling, Arla Foods. Formidlet leverance af industrielt forarbejdede mælkefraktioner.

Susana López & Carlos F. Arias, Departamento de Genetica y Fisiologia Molecular, Instituto de Biotecnologia, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Cuernavaca, Morelos, Mexico. Stillet ekspertise, laboratorium og materialer (vira og antistoffer) til disposition for implementering af rotavirusassay i Danmark.

Gary E. Gilbert, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. Samarbejde vedrørende undersøgelser af mekanismen bag lactadherins nyopdagede antikoagulante virkning (manuskript under udarbejdelse).

#### **VURDERING AF RESULTATERNES PRAKTISKE OG VIDENSKABELIGE BETYDNING**

Dansk mejeribrug vil fremover satse på forskning indenfor sundhedsgavnige komponenter i mælk. Især vil fokus være rettet mod bioaktive mælkeproteiner og peptider. Det hænger sammen med, at det vurderes at netop dette emne på internationalt plan vil få en voksende bevågenhed og signifikant betydning, og derved også øgede afsætningsmuligheder. FØTEK III-projektet "Bovin lactadherin som antiviral komponent" har bidraget til implementeringen af en ny metode (rotavirusassayet), der fremtidigt kan anvendes til dokumentation af antiviral effekter af oprensede og semioprensede mælkefraktioner. Som det fremgår af denne rapport har metoden bidraget til at øge kendskab til hvilke mælkeproteiner, der influerer på rotavirusinfektioner *in vitro*. Ikke mindst er fundet af WFC's bredspektrede inhibitoriske effekt interessant.

Samlet kan projektet således få betydning for formulering af modernmælkserstatning, anden babymad, diætetiske produkter og andre produkter, hvor mælkeprotein bliver brugt eller kan tænkes anvendt som ingrediens. Eftersom forekomst af diaré hos kalve og smågrise er en væsentlig økonomisk belastning for husdyrbruget, kan WFC måske også få betydning her.

#### **PROJEKTETS RELATION TIL NYE MEJERIRELATEREDE SAMARBEJDSPROJEKTER**

I nærværende projekt påbegyndtes en karakterisering af, hvilke komponenter WFC indeholder. Trods en yderligere fraktionering har det hidtil ikke været muligt at fastslå præcist hvad der bidrager til WFC's antivirale effekt. Arbejdet vanskeliggøres primært af WFC-pulverets heterogene karakter. Med det nye projekt "Mælkeprotein, undersøgelse og isolation af komponenter med potentielt forebyggende virkning mod virusinduceret diaré" bevilget af Mejeribrugets ForskningsFond og Innovationsloven, håber vi bl.a. at kunne få klarhed over samtlige antivirale forbindelser i valle.

