

Kan förekomsten av antibakteriella proteiner i vissa blodceller användas som indikatorer för mjölkors motståndskraft mot mastit?

1. Bakgrund

Varje år behandlas ca 20 % av mjölkorna i Sverige av veterinär för mastit (1). Det är klarlagt att det finns en genetisk koppling mellan hög mjölkproduktion och mastit och att motståndskraften mot mastit kan påverkas genom avel (2). Ärftlig variation i immunförsvaret har observerats mellan avelstjurar och kolinjer inom Holstein-rasen (3) och skillnader i mastitförekomst kan också ses mellan kor av de två vanligaste svenska raserna SRB och SLB. Redan 1984 introducerades ett system där avelstjurar ges ett index för deras ärftliga motståndskraft mot mastit (mastitindex; MI). Detta index baseras på information om antalet veterinärbehandlade fall av mastit, mjölkens celltal och utslagning på grund av mastit hos tjurarnas döttrar (1). Om faktorer på molekylärnivå skulle kunna användas för beräkning av MI till avelstjurar och för utvärdering av mastitresistens på konivå skulle detta innebära att viktiga biologiska mekanismer bakom infektionsresistens hos nötkreatur upptäckts. Granulocyterna är de viktigaste försvarscellerna med förmåga att mediera kroppens primära försvar mot infektioner. Dessa celler syntetiserar ett stort antal baktericida proteiner som finns lagrade i granula i cellerna och används för att döda mikroorganismer. Små defekter i dessa granulaproteiner kan leda till ökad känslighet för infektioner (4). Kunskapen om bovina granulaproteiner och deras defekter är ganska begränsad. Det vanligaste av dessa proteiner är myeloperoxid (MPO). Under tidigt 1990-tal isolerade och renade vi bovint MPO (5) samt beskrev dess antibakteriella egenskaper och betydelse för mastit (5-12).

Projektets syften

1. Att optimera och validera metoder för analys av granulaproteiner från granulocyter med 2-DE och MALDI-ToF (se nedan) samt att kartlägga förekomsten av dessa proteiner hos friska nötkreatur.
2. Att identifiera skillnader i granulocyternas proteinmönster mellan avelstjurar av mjölkras med olika mastitindex.
3. Att identifiera skillnader i granulocyternas proteinmönster mellan avelstjurar av mjölkras (SRB och SLB).
4. Att identifiera och rena ett mindre antal protein som skiljer mellan grupperna i punkt 2 och 3 och att inleda studier för att ta fram metoder som gör det möjligt att närmre undersöka förekomst och funktion av dessa proteiner.
5. Att påbörja studier rörande den basala biokemiska strukturen hos vissa utvalda proteiner.
6. Att påbörja studier för att genomföra partiell aminosyresekvensering av utvalda proteiner vilket möjliggör kloning av gener som kodar för proteinerna.

2. Material och metoder

Granulocytgranula isolerades från vita blodkroppar från blodprov tagna från friska avelstjurar. Proteinerna extraherades och den komplexa proteinblandningen separerades och synliggjordes med hjälp av 2-dimensionell gelelektrofores (2-DE) (18). Denna teknik använder isoelektrisk fokusering (IEF) i kombination med natrium-dodecyl sulfat-polyacrylamid gelelektrofores (SDS-PAGE) för sortering av proteiner i komplexa blandningar (13). Med hjälp av Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-ToF-MS) identifierades proteiner separerade på 2-DE-geler (14-15). Med hjälp av 2-DE och MALDI-ToF-MS insamlades basal biokemisk information om enstaka granulaproteiner. För att jämföra uttryck av granulaproteiner hos olika avelstjurar användes speciell mjukvara för bildanalys (Image Master –GE Health Care).

När proteinerna identifierats togs aminosyrasekvensen fram (från flera databaser på WWW) och matchades med de sekvenser som vi fått fram och därigenom kunde insamlade proteiner identifieras (metoder beskrivs i 16). Gelfiltrering och kromatografiska metoder etablerades också för att kunna isolera utvalda proteiner i relativt stora kvantiteter.

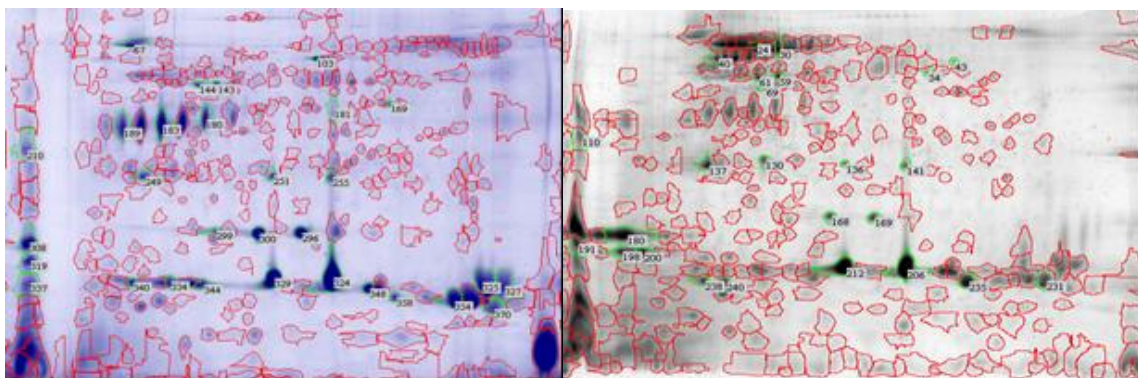
För jämförelser av tjurar med olika MI och av olika ras togs blodprov från avelstjurar vid Svensk Avel's tjurstationer. På grund av de komplicerade och långdragna laboratoriemetoder som var nödvändiga kunde vi bara ta emot prov från två djur per tillfälle. Vid varje tillfälle valdes två tjurar av samma ras men med olika MI vilka skulle skilja så mycket som möjligt (högt MI = >110; lågt MI = <95). Från början var avsikten att om möjligt analysera prover från ca 40 tjurar men på grund av svårigheter att finna lämpliga tjurar och komplikationer vid provtagning mm kunde vi enbart analysera prover från 24 tjurar (12 SLB, 12 SRB). Hälften av tjurarna inom vardera ras hade högt (MI=110-123) respektive lågt (MI=73-95) MI.

3. Resultat och Diskussion

I detta projekt har vi använt ett nytt angreppssätt för identifiering av molekyllära markörer associerade med mastit genom att studera baktericida proteiner i bovina granulocyter. Dessa undersökningar, gjorda med hjälp av 2-DE och MALDI-ToF MS, har resulterat i flera nya fynd.

3. 1. Optimering av 2-DE och MALDI-ToF metoder för studier av granulocytgranulaproteiner hos friska avelstjurar.

Granulaproteiner extraherade från blodgranulocyter från friska avelstjurar användes i denna delstudie. Proteinerna synliggjordes på 2-DE-geler (Figur 1) (för detaljerad metodbeskrivning se 16) och identifierades med MALDI-ToF MS och MS/MS (Tabell 1). Våra studier innebär möjligheten att studera en serie proteiner från bovina granulocytgranula på individnivå. Baserat på studier hos andra däggdjur (ffa människa) var förväntningen att granula skulle innehålla ett stort antal proteiner och peptider inblandade i antibakteriella försvarsprocesser. Visualisering av dessa proteiner i form av ett "fingeravtryck" för varje djur för att jämföra proteinuttrycket hos olika djur var dock inte möjligt tidigare.



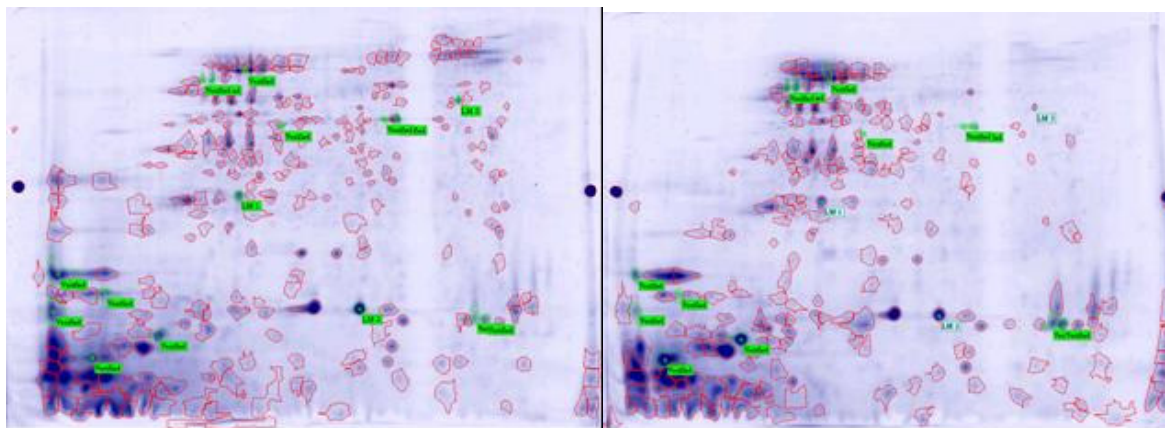
Figur 1. 2-DE-gelbild av Fraktion I (A) and II (B) extraherade från bovina granulocytgranula.

Tabell 1A. Bovina granulaproteiner identifierade med MALDI-ToF MS och MS/MS i Fraktion I			
Protein	Nr on gel	pI	Mass Da
Azurocidin 1 preproprotein	110	11.0	29772
Cathelicidin 7	191	11.0	19064
Cathelicidin 7	198	10.0	19064
Oligosaccharide-binding protein	180	9.90	21392
Cathelicidin 7	200	9.23	19064
Cathelicidin 1	212	7.50	17931
Cathelicidin 1	206	6.70	17931
Cathelicidin 4	235	4.70	16697
Cathelicidin 7	231	3.70	19064
Haptoglobin	169	7.00	45623
Haptoglobin	168	7.60	45623
Cathelicidin 1	141	6.70	17930
Cathelicidin 1	136	7.50	17931
Protenase 3	130	8.80	27961
Protenase 3	137	8.00	27961
Cathelicidin	240	8.70	18036
Cathelicidin	238	8.50	17931
Integrin α chain	69	8.00	12874
Fibrinogen β chain	61	8.20	49096
Fibrinogen β chain	59	7.90	49096
Lactoferrin	30	8.60	77129
Lactoferrin (de ferric)	24	8.70	78034
Lactoferrin	40	8.80	77125
Fibrinogen γ chain	54	5.50	50839
60 KDa Heat shock protein	43	5.40	61000

Tabell 1B. Bovine granulaproteiner identifierade med MALDI-ToF MS och MS/MS i Fraktion II			
Protein	Nr on gel	pI	Mass Da
Azurocidin 1 preproprotein	210	11.0	29772
Oligosaccharide-binding prot.	308	11.0	21392
Cathelicidin	317	11.0	19064
Lactoferrin	67	8.80	77125
Haptoglobin	180	7.00	45623
Haptoglobin	183	7.60	45623
Haptoglobin	189	8.80	45623
Villin	-	7.80	62000
Fibrinogen β chain	143	8.50	49096
Fibrinogen β chain	144	8.40	49096
Albumin	103	7.00	95000
Heat Shock cognate 71 kDa	24	6.50	96000
Fibrinogen γ chain	26	6.60	50839
Matrix metalloproteinase 9	27	6.00	98000
78 kDa glucose regulatory pr *	30	6.00	66000
β -Actin Profilin	169	5.10	44000
Cathelicidin 1	181	6.50	16697
β -Actin λ γ	39	7.00	32000
β -Actin λ γ	40	7.00	32000
Cathelicidin 1	255	7.20	17931
Cathelicidin 1	251	7.50	17931
Cathelicidin 1	334	8.00	17931
Cathelicidin 1	340	8.00	17931
Cathelicidin 1	444	8.00	17931
Haptoglobin	299	7.60	45623
Haptoglobin	300	7.50	45623
Haptoglobin	296	7.30	45623
Cathelicidin 1	329	7.30	16697
Cathelicidin 1	324	5.80	16697
Cathelicidin 1	348	4.80	16697
Cathelicidin 1	358	4.70	16697
Cathelicidin 4	325	4.40	18036
Cathelicidin 2	327	4.30	17931
Cathelicidin 7	354	4.80	17931
BMAP 28	370	4.30	17931

3. 2. Skillnader i granulatproteiner mellan avelstjurur med högt respektive lågt MI.

Granulatproteiner förevisade som ett “fingeravtryck” för varje individ kan användas för jämförelse mellan avelstjurur av proteiner listade i Tabell 1 genom användning av bildanalys. Gelbilder av avelstjurur med olika MI (högt/lågt) jämfördes och vissa skillnader i proteinuttryck observerades. Av bildanalysmjukvaran identifierade skillnader har markerats med “verified” vid sidan av aktuell proteinfläck (Figur 2). Identiteterna för de protein som tenderade skilja mellan grupperna ges i Tabell 2. Ytterligare studier behövs för att bekräfta funna skillnader.



A B
Figur 2. 2-DE-bild av proteinfraktion 2 (av 3) från SRB-tjur med högt (117) MI (A) respektive SRB-tjur med lågt (85) MI (B). Skillnader i uttryck har markerats med texten “verified” i grönt.

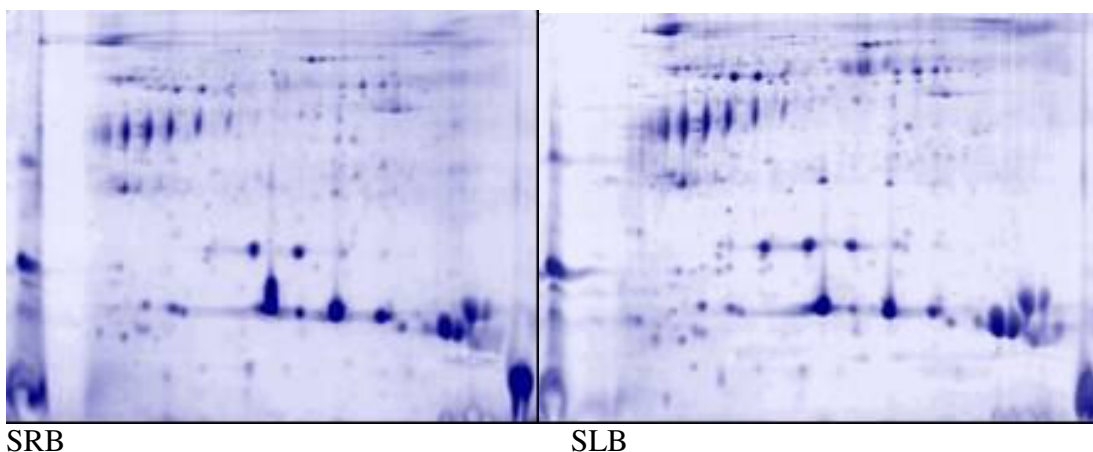
Tabell 2. Proteiner av intresse för vidare studier av skillnader mellan avelstjurur med olika mastitindex (MI)

<i>Protein</i>	<i>Kända effekter</i>	<i>Våra nya fynd</i>	<i>Undersökningar att genomföras i framtida projekt</i>
Haptoglobin	Akutfasprotein, mastitmarkör	Vanligt förekommande och hög grad av polymorfism	Konfirmera skillnader i uttryck, utvärdera samband med mastit
Cathelicidin	Baktericid, immunmodulerande	Högre diversitet inom bovint C-gruppen än andra däggdjur, differentierat uttryck	Diversitet på molekylärnivå, konfirmering av skillnad i uttryck
Laktoferrin	Baktericid	Högre molekylär diversitet	Diversitet bör konfirmeras
b-OBP	Baktericid	Differentierat uttryck mellan djur med olika MI	Konfirmera skillnader i uttryck
Azurocidin	Baktericid	Differentierat uttryck mellan djur med olika MI	Konfirmera skillnader i uttryck
BNL	Baktericid	Förekomst i bovina granulocyter	Biologisk signifikans för mastit

b-OBP = bovint oligonucleotidbindande protein; BNL = bovint neutrofil-lipocallin

3. 3. Skillnader i granulaproteiner mellan avelstjurar av olika raser (SRB och SLB).

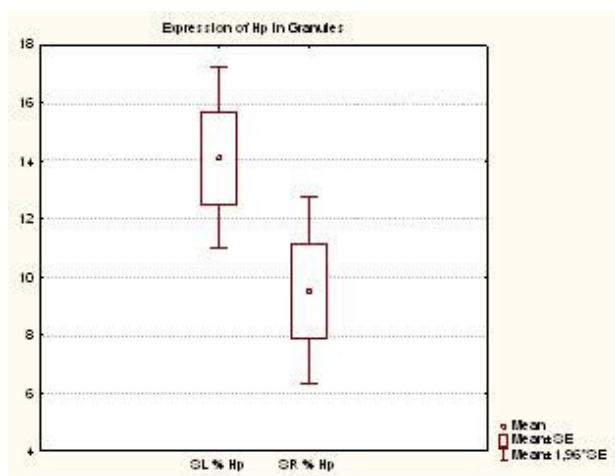
Hundratals proteiner återfanns i granulocytgranula av vilka många har baktericida egenskaper. Uttrycket av dessa proteiner kan variera mellan individer vilket kan resultera i olika känslighet för bakteriella infektioner t ex i samband med bovin mastit. Gelbilder av granulaproteiner från individuella tjurar av de två mjölkraserna jämfördes med varandra. Figur 3 visar gelbilder från en SRB-tjur och en SLB-tjur. Från bilderna framgår en tydlig likhet i de två polypeptid-fingeravtrycken. Uttrycket av vissa polypeptider skiljde emellertid. Inom detta projekt har vi ffa jämfört uttrycket av haptoglobin (Hp) mellan raserna. Data visade en tendens till skillnad mellan raserna med större mängd Hp i granulocytgranula från djur av SLB-ras jämfört med djur av SRB-ras (Figur 4). Orsakerna till denna skillnad är inte kända men kan vara viktiga faktorer vid värdering av skillnader i inflammationsrespons mellan individer i samband med mastit. Vi såg dock ingen skillnad i Hp-uttryck mellan tjurar med högt respektive lågt MI inom vardera ras. För att undersöka den biokemiska bakgrunden till den observerade skillnaden mellan raserna måste nya studier göras för att undersöka om det finns heterogeniteter av Hp-proteiner isolerade från de två raserna och om skillnaderna beror på post-translationella modifieringar eller på grund av skillnader på DNA-nivå.



SRB

SLB

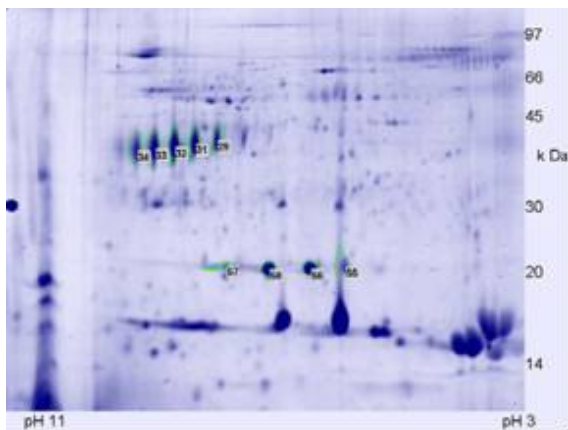
Figur 3. Granulaextrakt från bovina granulocyter från en SRB-tjur och en SLB-tjur preparerade under identiska förhållanden (pI 3 – 11, MW 4 – 96 kDa).



Figur 4. Uttryck av haptoglobin som % av den totala mängden granulaprotein hos SRB- och SLB-tjurar.

3. 4. Studier av vissa aspekter på den basala biokemiska strukturen av ett utvalt granulaprotein: Polypeptidstruktur hos Hp från bovina granulocyter.

Hp är ett av de viktigaste akutfasproteinerna hos nötkreatur och Hp-koncentrationen ökar kraftigt i både blod och mjölk vid akut klinisk mastit hos mjölkkor (17). Hp anses ffa produceras i hepatocyter men uttryck av Hp mRNA har också observerats i juvervävnad och vita blodkroppar från friska djur. Vår studie har för första gången visat att bovina granulocyter isolerade från perifert blod från friska nötkreatur innehåller rikliga mängder av Hp i granula. Ursprunget till det Hp som observerats i samband med bovin mastit har tidigare inte varit helt känt (16). Våra studier visar att bovint Hp från granulocyter återfinns som två kluster på 2-DE gelen (Figur 5). Kluster 1 (nummer 29 och 31–34) består av fem proteinfläckar på vardera ca 40 kDa och pI-värden från 8 till 9,5. Kluster 2 består av fyra proteinfläckar (nummer 55–58) på ca 20 kDa och pI-värden mellan 6 och 8. Molekylvikter och pI-värden på proteinfläckar identifierade som Hp var identiska hos alla undersökta tjurar. Mass-fingerprinting-spektra av trypsinklyvningar från de nio proteinfläckarna i de två klustren visade nästan identiska fragmenteringsmönster hos peptiderna i varje kluster.



Figur 5. 2-DE gel illustrerar två kluster av Hp-polypeptider (16)

3. 5. Initiering av masspektrometriska studier rörande primär struktur hos utvalda proteiner

Vi har använt aminosyrasekvensdata för Hp erhållen med hjälp av masspektrometri för att få information om den basala polypeptidstrukturen hos bovint Hp. Genom att jämföra bovina trypsinklyvda peptider från både lätta och tunga subenheter med humant Hp kunde vi visa att den lätta kedjan hos bovint Hp överensstämmer med den humana α -subenheten och att den tunga kedjan hos bovint Hp överensstämmer med den humana β -subenheten. Molekylär heterogenitet hos humant Hp har studerats i detalj vilket visat på tre huvudfenotyper vilka är genetiskt styrda av två alleler Hp 1 och Hp 2. Hos människa är β -kedjan identisk i alla tre fenotyperna medan α -kedjan visar polypeptidpolymorfism. Vår studie är den första som visar att bovint granulocyt-Hp består av α - och β -kedjor som består av fyra respektive fem polypeptid-subenheter. Ytterligare studier behövs för att bestämma olika fenotyper av bovint Hp och allelstrukturen bakom bovint Hp-protein.

Tabell 3 visar bovina Hp trypsinklyvda peptider från lätta och tunga subenheter relativt human Hp-peptid för att undersöka om bovina α - och β -subenheter förekommer som det gör hos humant Hp. De fem proteinfläckarna på ca 40 kDa och de fyra proteinfläckarna på ca 20 kDa identifierades som bovint Hp (NCBI accession number AAI09669) (Tabell 3). De peptider som matchade tillsammans med de sekvensområden (både lätta och tunga kedjor) som undersöktes visas med fet stil i Tabell 3. Sekvenserna för de trypsinklyvda peptiderna (åtta peptider, totalt 108 aminosyror) hos den lätta subenheten återfanns i N-terminal delen i

en region mellan aminosyror 32–155 av den 401 (sökning täckte 26.9 %) aminosyror långa sekvensen i NCBI Sequence Viewer (accession number AAI09669). Sekvenserna för de trypsinklyvda peptiderna (14 peptides, totalt 159 aminosyror) hos den tunga subenheten återfanns i C-terminal delen i en region mellan aminosyror 165–395 (sökning täckte 39.7 %) av den 401 aminosyror långa bovina Hp-sekvensen (accession number AAI09669) (Tabell 3). Vid vår sökning matchade den lätta och tunga kedjan tillsammans 67 % av den bovina Hp-sekvensen på NCBI Sequence Viewer (accession number AAI09669). De två serierna (lätta och tunga kedjor) av bovina trypsinklyvda Hp-peptider jämfördes också med aminosyrasekvensen för humant Hp (NCBI accession number NP_005134). Peptiderna från den bovina lätta kedjan återfanns mellan aminosyranummer 37 och 161 i N-terminal delen av humant Hp. Peptiderna från den bovina tunga kedjan återfanns mellan aminosyranummer 171 och 399 i C-terminal delen av den 406 aminosyror långa humana Hp-sekvensen (Tabell 3). Genom att jämföra bovina trypsinklyvda peptider från både den lätta och den tunga subenheten med humant Hp-protein kunde vi visa att den lätta kedjan hos bovin Hp överensstämde med den humana α -subenheten och att den tunga bovine Hp-kedjan överensstämde med den humana β -subenheten.

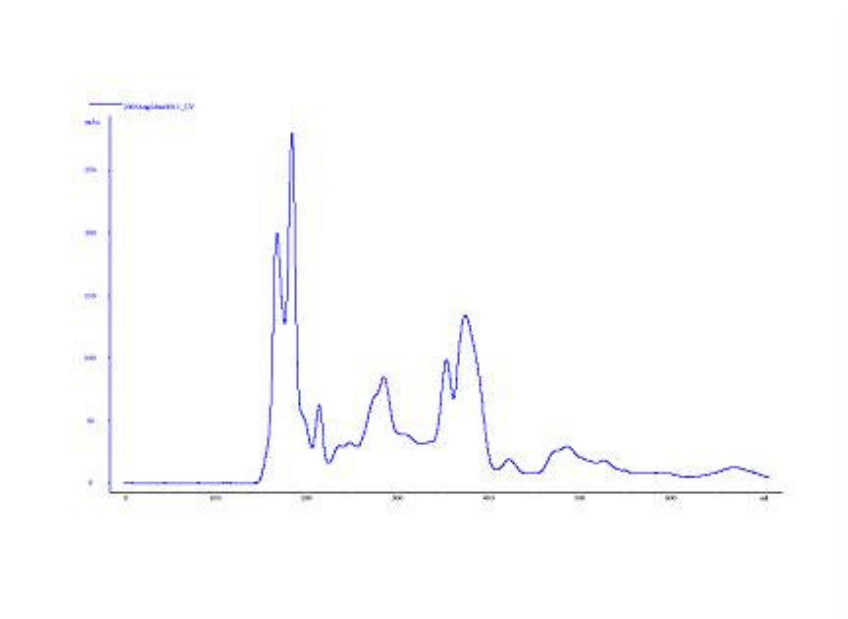
Tabell 3 Aminosyrasekvens hos bovin (B) och humant (H) Hp (accession nummer AAI09669) respektive bovin Hp (NP_005134). Fetstil visar placering av de trypsinklyvda peptider hos bovin Hp som undersöktes (16).

H	1	MSALGAVIALLLLWGQLFAVDSGNDVTDIADDGCPKPPEIAHGYVEHSVRYQCKNYYKLRT	60
		MSAL AV+ LLL GQL AV++G++ T D CPK PEIA+ +VE+SVRYQC YYKL	
B	1	MSALQAVVTLLLCGQLLAVETGSEATA---DSCPKAPEIANSHVVEYSVRYQCDKYYKLHA	57
H	61	EGDGVYTLNDKKQWINKAVGDKLPECEADDGCPKPPEIAHGYVEHSVRYQCKNYYKLRT	120
		G+GVYT N+K QWINK +G +LPECE DD CP+PP+I +GYVE+ VRYQCK YY LRT	
B	58	-GNGVYTFNNKKQWINKDIGQQLPECEEDDSCPEPPKIENGYVEYLVRYQCKPYITLRTC	115
H	121	GDGVYTLNNEKQWINKAVGDKLPECEAVCGKPKNPANPVQRILGGHLDAGSFPWQAKMV	180
		GDGVYT N++KQWINK +G KLPECEAVCGKPK+P + VQRI+GG LDAKGSFPWQAKMV	
B	116	GDGVYTFNSKKQWINKNIGQKLPECEAVCGKPKHPVDQVQRIIGGSLDAKGSFPWQAKMV	175
H	181	SHHNLTTGATLINEQWLLTTAKNLFNLHSENATAKDIAPTTLTYVGGKQLVEIEKVVLHP	240
		S HNL +GATLINE+WLLTTAKNL+L HS + AKDI PTL LYVGK QLVE+EKVVLHP	
B	176	SQHNLISGATLINERWLLTTAKNLYLGHSSDKKAKDITPTLRLTYVGGKQLVEIEKVVLHP	235
H	241	NYSQVDIGLIKLRQKQVSVNERVMPICLPSKDYAEVGRVGYVSGWGRNANFKFTDHLKYVM	300
		++S+VDIGLIKLR+QKV VN++VMPICLPSKDY +VGRVGYVSGWGRN NF FT+HLKYVM	
B	236	DHSKVDIGLIKLRQKVPVNDKVMPICLPSKDYVVKVGRVGYVSGWGRNENFNFTDHLKYVM	295
H	301	LPVADQDQCIRHYEGSTVPEKKTTPKSPVGVQPILNEHTFCAGMSKYQEDTCYGDAGSAFA	360
		LPVADQD+C++HYEG P+ KT KSPVGVQPILNE+TFC G+SKYQ+DTCYGDAGSAF	
B	296	LPVADQDKCVKHYESVDAPKNKTAKSPVGVQPILNENTFCVGLSKYQDDTCYGDAGSAFV	355
H	361	VHDL EEDTWYATGILSFDKSCA VA EYGVYVKVTSIQDWVQKTIAEN	406
		VHD E+DTWYA GILSFDKSCA VA EYGVYVKVTSI DWV+KTIA N	
B	356	VHDKEDDTWYAAGILSFDKSCA VA EYGVYVKVTSI LDWVVRKTIANN	401

3. 6. Etablering av metoder för isolering och rening av utvalda proteiner i tillräckliga mängder för att initiera aminosyrasekvensering för att lägga grunden för insamling av information rörande vilka gener som kodar för dessa proteiner.

Vi har i vårt laboratorium etablerat metoder för att isolera och rena utvalda proteiner i tillräckliga mängder för att kunna göra partiell aminosyrasekvensering av proteinerna. Figur 6

visar ett gelfiltreringskromatogram av proteiner isolerade från pooler av granula från flera djur där proteinerna separerats enligt storlek. Inom projektet har vi isolerat bovint neutrofilt lipocallin (BNL), bovint eosinofilt peroxidase (b-EPO) och bovint Hp med hjälp av gelfiltreringstekniker (5). Vi har också genomfört de första stegen i jonutbyteskromatografi för BNL och EPO. En Hp-innehållande pool har identifierats i gelfiltreringssteget vilken ska renas genom lämpliga procedurer för jonutbyteskromatografi. Vi har använt SDS-PAGE, MALDI-ToF-MS, Western blotting och immunfärgning för identifiering av gelfiltreringspooler innehållande ovan nämnda proteiner. Immundetektionen gjordes med hjälp av lämpliga antikroppar. I framtida projekt bör studier genomföras för att rena dessa proteiner ytterligare och för partiell sekvensering av peptiderna för att initiera studier för att klonera gener som kodar för dessa proteiner. Metoder för immundetektion av dessa proteiner i samband med bovin mastit bör också etableras.



Figur 6. Gelfiltreringskromatogram av bovina granulaproteiner ordnade efter storlek.

4. Referenser

1. Svensk Mjolk. Djurhälsovård 2002/2003. Redogörelse för husdjursorganisationens djurhälsovård. Svensk Mjolk, Eskilstuna (2003) pp 66.
2. Kehrlı ME Jr, Weigel KA, Freeman, AE, Thurston JR, Kelley DH. Bovine sire effects on daughters' in vitro blood neutrophil functions, lymphocyte blastogenesis, serum complement and conglutinin levels. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 27 (1991) 303-319.
3. Kelm SC, Detilleux JC, Freeman AE, Kehrlı ME Jr, Dietz AB, Fox LK, Butler JE, Kasckovics I, Kelley DH. Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle. *Journal of Dairy Science* 80 (1997) 1767-1775.
4. Klebanoff SJ, Clark RA. Anti-microbial systems. In: *The neutrophil: Function and clinical disorders*. North Holland, Amsterdam (1978) pp. 409 – 446.
5. Cooray R; Peterson CGB, Holmberg O. Isolation and purification of bovine myeloperoxidase from neutrophil granules. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 38 (1993) 261-272.

6. Cooray R. Use of bovine myeloperoxidase as an indicator of mastitis in dairy cattle. *Veterinary Microbiology* 42 (1994) 317-326.
7. Cooray R. Casein effects on the myeloperoxidase-mediated oxygen-dependent bactericidal activity of bovine neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 51 (1996) 55-65.
8. Cooray R; Peterson CGB, Moberg L, Båge R. A sensitive double-antibody enzyme-linked immunosorbant assay for bovine myeloperoxidase and its application to serum and neutrophil extracts. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 42 (1995) 481-491.
9. Cooray R, Peterson CGB, Grönvik KO. Preparation and characterisation of monoclonal antibodies against bovine myeloperoxidase. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 46 (1995) 211-221.
10. Cooray R. Use of bovine myeloperoxidase as an indicator of mastitis in dairy cattle. *Veterinary Microbiology* 42 (1994) 317-326.
11. Cooray R, Håkansson L. Defective polymorphonuclear neutrophil function in dairy cows showing enhanced susceptibility to intramammary infections. *Journal of Veterinary Medicine B* 42 (1995) 625 – 632.
12. Cooray R, Björck L. Bactericidal activity of the bovine myeloperoxidase system against bacteria associated with mastitis. *Veterinary Microbiology* 46 (1995) 427-434.
13. Matsudaira PA. *A practical guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing*, Academic Press, Inc., San Diego (1993).
14. Geromanose S, Castells P, Elicone C, Powell M, Tempst P. *In Techniques in Protein Chemistry V*. Crabb, J. W. Ed.; Academic Press: San Diego (1994) pp 143 – 150.
15. Wilm M, Houthaeve T, Talbo G, Kellner R, Mortensen P, Mann M. *In Mass Spectrometry in the Biological Sciences*, Burlingame, A. L.; Carr, S. A. Eds.; Humana Press: Clifton, NJ (1995) pp 245-265.
16. Cooray R, Persson Waller K, Venge P. Haptoglobin comprises about 10% of granule protein extracted from bovine granulocytes isolated from healthy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 119 (2008) 310-315.
17. Grönlund U, Hulten C, Eckersal, PD, Hogart C, Persson Waller K. Haptoglobin and serum ameloid A in milk and serum during acute and chronic experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.* 70 (2003), 379-386.

5. Publikationer och övrig resultatförmedling till näringen

Inom projektet har följande publikationer producerats:

- Cooray R, Persson Waller K, Venge P. Haptoglobin comprises about 10% of granule protein extracted from bovine granulocytes isolated from healthy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 119 (2007) 310-315.

Information om projektet har förmedlats i samband med workshop om mastitforskning vid SLU och resultat från projektet kommer att presenteras vid 5th IDF Mastitis Conference, 21-24/3 2010, Christchurch, Nya Zeeland.