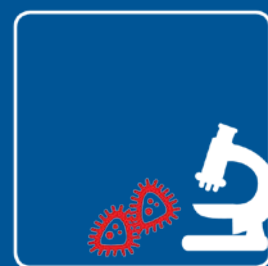


SLUTRAPPORT

NR. 2009-100

Osteopontins immunstimulerende effekter



Afslutningsrapport

Osteopontin's immunstimulerende effekter

Projektleder

Lektor Esben Skipper Sørensen

Laboratorium for Proteinkemi, Molekylærbiologisk Institut, Århus Universitet

Forskerparken, Gustav Wieds Vej 10, 8000 Århus C.

Tlf. 8942 5092

Email: ess@mb.au.dk

Øvrige deltagere

Lotte Schack ph.d., post-doc

Forskningsassistent Anne-Mette Kloster (1/8-2005 – 31/7-2006)

Forskningsassistent Mette Schou Nielsen (1/8-2006 - 31/1-2007)

Laborant Lise Møller Fogh (Barsel/orlov: maj 2005 – august 2006)

- alle på Laboratorium for Proteinkemi, Molekylærbiologisk Institut, Aarhus Universitet.

Samarbejdspartnere

Overlæge Aksel Lange, Pædiatrisk Afdeling, Skejby Sygehus, Aarhus Universitetshospital

Overlæge Jørgen Agnholt og Speciallæge Jens Kelsen, Medicinsk Afd. V. Aarhus Universitetshospital

Professor Per Höllsberg og Lektor Uffe Skov Sørensen, Institut for Medicinsk Mikrobiologi og Immunologi, Aarhus Universitet.

Finansieringskilder

MFF

Projektperiode

Januar 2005 – December 2008

Resume af det samlede projekt

Modermælkens indflydelse på den nyfødtes sundhedstilstand, på såvel kort som lang sigt, har været emnet for en lang række undersøgelser. Mælk har et stort indhold af naturlige antimikrobielle og immunstimulerende komponenter. Undersøgelser har vist at mælkens naturlige indhold af immunoglobuliner, laktoferrin, laktoperoxidase, lysosym og lactadherin influerer på immunforsvarets evne til at bekæmpe forskellige infektioner. Mælken indeholder imidlertid også et andet, mindre velbeskrevet, protein som er involveret i en lang række immunologiske processer; nemlig osteopontin.

I det nærværende projekt har vi etableret metoder til at måle indholdet af osteopontin i fysiologiske væsker. Gennemsnitligt indeholder human mælk 138 mg osteopontin per liter, med store individuelle variationer. Dette svarer til at osteopontin udgør mere end 2% af den totale proteinmængde i mælken. Til sammenligning indeholder komælk kun ca. 18 mg/L, hvilket svarer til omkring 0,05% af det totale protein i komælk. Modermælkserstatninger, der er baseret på proteiner udvundet af komælk, indeholder 5-13 mg osteopontin per liter, afhængigt af mærket. Ved fremstilling af en modermælkserstatning, der i proteinsammensætning skal ligne human mælk mest muligt, må man derfor aktivt gøre noget for at øge indholdet af osteopontin.

Osteopontin spiller en central rolle i mange immunologiske processer. I dette projekt har vi vist at osteopontin fra komælk kan stimulere human immunceller fra tyndtarmen til at udskille IL-12, som er en indikator for at det cellulære immunforsvar er aktiveret. Det kan således tænkes at det store osteopontin indhold i modermælken er et vigtigt signal for udviklingen eller modningen af spædbarnets immunforsvar.

I det nærværende projekt har vi vist at osteopontin er i stand til at binde til bakterier. Vi har også vist at osteopontin er i stand til at tiltrække monocytter, som er vigtige celler i immunforsvaret. Vi har ydermere vist at disse monocytter er i stand til at æde (fagocyttere) bakterier, der har bundet osteopontin til sig. Denne fagocytose induceres via en specifik receptor, $\alpha_X\beta_2$ integrinen, som først er beskrevet i forbindelse med dette projekt.

English summary

The influence of mother's milk on the newborns state of health has been the subject of many investigations. Milk has a high content of natural anti microbial and immune stimulating components. Investigations have shown that immunoglobulins, lactoferrin, lactorperoxidase, lysozyme and lactadherin influences on the immune systems ability to control and combat various infections. The milk also contains another, less well-described, protein which is involved in a several immunological processes; namely osteopontin.

In the present project, we have established a method to measure the content of osteopontin in physiological fluids. On average human breast milk contains 138 mg osteopontin pr liter, with huge individual variations. This means that more than 2% of the

total protein in human milk is osteopontin. In comparison, bovine milk only contains approximately 18 mg osteopontin per liter, which corresponds to 0.05% of the total protein in cow's milk. Infant formula's, which are based on cow's milk, contain 5-13 mg osteopontin per liter ready to use formula, depending on the manufacturer and brand. This means that by production of an infant formula intended to mimic human milk in protein composition, it is necessary to actively take steps to increase the content of osteopontin.

Osteopontin plays a central role in many immunological processes. In this project we have shown that osteopontin from cow's milk can induce expression of IL-12, which is an indicator for activation of the cellular immune response, in human immune cells isolated from the small intestine. It is therefore likely, that osteopontin in breast milk is an important signal involved in the development or maturation of the neonate's immune system.

In the present project we have shown that osteopontin binds bacteria. We have also shown that osteopontin is able to attract monocytes, which are important immune cells. We have shown that these monocytes are capable of internalizing (phagocytize) bacteria, which are bound to osteopontin. This phagocytosis is induced by a specific receptor, the $\alpha_X\beta_2$ integrin, which is a novel osteopontin receptor, first described during this project.

Projektets baggrund og mål

Modermælkens gavnlige indflydelse på den nyfødtes sundhedstilstand, på såvel kort som lang sigt, er veldokumenteret (Lawrence and Pane, 2007). Den gavnlige indflydelse kan blandt andet tilskrives at modermælken foruden dens store næringsmæssige værdi, har et stor indhold af naturligt forekommende antimikrobielle og immunstimulerende komponenter. Således har undersøgelser vist at mælkens indhold af immunoglobulin, laktoferrin, laktoperoxidase, lysosym og lactadherin influerer på den nyfødtes evne til at bekæmpe forskellige infektionssygdomme (Field, 2005). En række undersøgelser viser at endnu et protein, osteopontin (review; Sodek et al., 2000), der forekommer naturligt i mælken spiller en vigtig rolle i immunsystemet og derfor også kunne tænkes at have indflydelse på udviklingen af oral tolerance hos nyfødte. Osteopontin er ikke et mælkespecifikt protein, men syntetiseres af en række celletyper, heriblandt nogle af immunforsvarets celler.

I modsætning til de før omtalte proteiner, der har en direkte antimikrobiel effekt på mikroorganismer, virker osteopontin såvel ved direkte interaktion med bakterier, som ved at indvirke på reguleringen af den delikate balance mellem immunforsvarets celler. Osteopontin tilhører derfor en eksklusiv gruppe af naturligt forekommende peptider/proteiner, der fungerer som celledesignaleringsstoffer, de såkaldte cytokiner.

Laboratorieforsøg har vist at immunceller fra mus, der mangler osteopontin (OPN knock-outs) har en nedsat evne til at bekæmpe infektioner i forhold til mus der har et naturligt udtryk af osteopontin (Ashkar et al., 2000). Man har samtidig set at humane hvide blodlegemer kan stimuleres af osteopontin. Disse resultater har dannet fundamentet for projektets hypotese og formål; at undersøge hvorledes osteopontin påvirker immunforsvarets celler og dets interaktion med bakterier.

Resultater og diskussion

Kvantificering af osteopontin – meget høje koncentrationer i human mælk

Det har været kendt i nogen tid, at der i mælk er en relativt høj koncentration af osteopontin; men hidtil har den præcise mængde ikke været kendt. Et delmål med nærværende projekt har været at undersøge og sammenligne koncentration af osteopontin i mælk, infant formula mv. Til dette formål har vi udviklet ELISA'er mod såvel human som bovin osteopontin (Schack et al., 2009). Undersøgelser af human mælk viser at der er meget stor variation i OPN indholdet hos kvinder (Tabel 1).

Tabel 1. Osteopontin indhold i brystmælk fra 29 kvinder

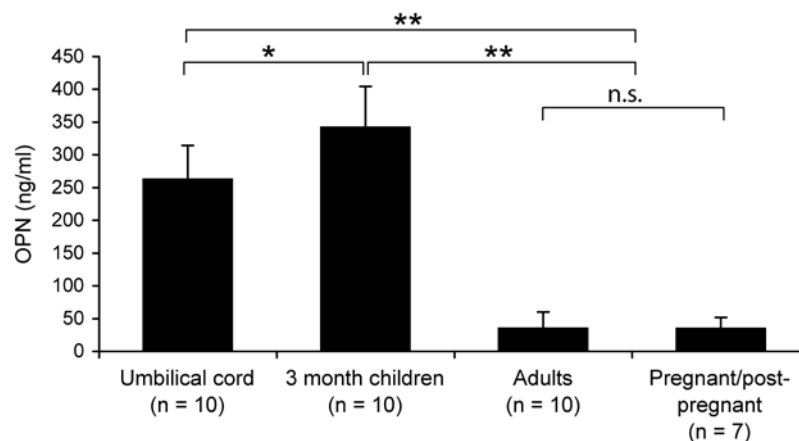
| Prøve | Kvindens alder (år) | Dage efter fødsel (d) | OPN konc. (mg/L) | Total protein konc. (mg/L) | OPN/total protein (v/v, %) |
|------------|---------------------|-----------------------|------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1 | 28 | 58 | 66 | 8550 | 0.77 |
| 2 | 35 | 13 | 257 | 8327 | 3.09 |
| 3 | 28 | 12 | 201 | 13268 | 1.51 |
| 4 | 25 | 6 | 65 | 11868 | 0.55 |
| 5 | 31 | 9 | 46 | 15430 | 0.30 |
| 6 | 25 | 12 | 22 | 11442 | 0.19 |
| 7 | 30 | 33 | 102 | 10000 | 1.02 |
| 8 | 31 | 39 | 114 | 10157 | 1.12 |
| 9 | 30 | 17 | 67 | 10328 | 0.65 |
| 10 | 23 | 12 | 212 | 10936 | 1.94 |
| 11 | 30 | 10 | 105 | 12576 | 0.83 |
| 12 | 31 | 27 | 157 | 5376 | 2.92 |
| 13 | 30 | 17 | 185 | 4459 | 4.15 |
| 14 | 31 | 37 | 103 | 5568 | 1.85 |
| 15 | 30 | 10 | 239 | 12628 | 1.89 |
| 16 | 22 | 15 | 100 | 6664 | 1.50 |
| 17 | 27 | 26 | 100 | 9706 | 1.03 |
| 18 | 30 | 14 | 102 | 3963 | 2.57 |
| 19 | 35 | 24 | 322 | 9660 | 3.33 |
| 20 | 32 | 15 | 18 | 2077 | 0.87 |
| 21 | 32 | 22 | 47 | 1834 | 2.56 |
| 22 | 35 | 28 | 171 | 5219 | 3.28 |
| 23 | 28 | 28 | 192 | 4602 | 4.17 |
| 24 | 30 | 17 | 245 | 8832 | 2.77 |
| 25 | 27 | 22 | 154 | 3426 | 4.50 |
| 26 | 30 | 11 | 206 | 4069 | 5.06 |
| 27 | 29 | 15 | 175 | 4738 | 3.69 |
| 28 | 37 | 15 | 40 | 6520 | 0.61 |
| 29 | 27 | 28 | 203 | 11562 | 1.76 |
| Gennemsnit | 29.6 | 20.4 | 138 | 8062 | 2.1 |
| SD | 3.5 | 11.3 | 79 | 3680 | 1.4 |

Gennemsnitligt indeholder human mælk 138 mg osteopontin per liter mælk, hvilket svarer til at osteopontin udgør mere end 2 % af proteinet i mælken. Til sammenligning indeholder bovin mælk kun ca. 18 mg/L, hvilket svarer til omkring 0,05 % af det totale protein i komælk. Modernmælkserstatninger, der er baseret på proteiner udvundet af komælk, fik målt et osteopontinindhold på 5-13 mg/L, afhængigt af mærket (Tabel 2). Vil man således fremstille en modernmælkserstatning, baseret på komælk, der i proteinsammensætning ligner human mælk mest muligt, må man aktivt gøre noget for at øge indholdet af osteopontin.

Tabel 2. Osteopontin indholdet i udvalgte mælkeerstatninger sammenlignet med human og bovin mælk

| Modermælkeerstatning/ mælk | OPN konc. (mg/L) |
|-------------------------------|---------------------|
| XO1 (Nam Yang) | 7.9 |
| Premium XO (Nam Yang) | 13.0 |
| Nan 1 (Nestlé) | 10.3 |
| Nidina 1 (Nestlé) | 5.3 |
| Allomin 2 (Beauvais) | 6.4 |
| Bovin mælk | 18 |
| Human mælk | 138 |

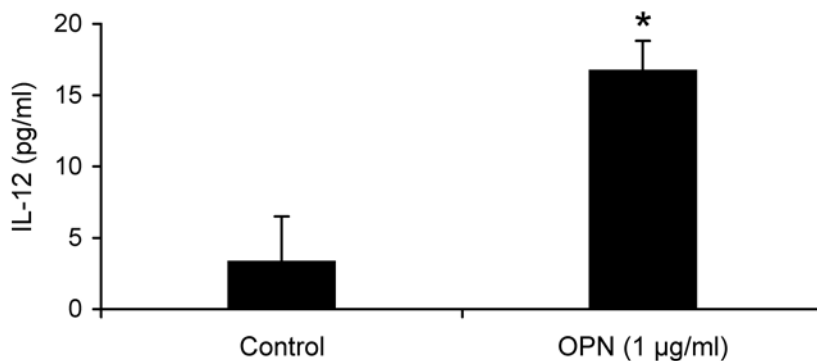
Den høje koncentration af OPN i human mælk kunne indikere at proteinet har en vigtig betydning i fx udvikling og modning af spædbørns immunforsvar. At proteinet skulle have en betydning for barnets udvikling underbygges af målinger af OPN indholdet i plasma fra navlestrengsblod, 3-måneders gamle spædbørn samt voksne. Disse målinger viste at spædbørn har et 7-10 gange højere niveau af OPN i plasma sammenlignet med voksne (Figur 1). Det kunne indikere at OPN spiller en rolle i det medfødte immunforsvar, da det både bliver produceret i højt niveau af børnene selv samt bliver tilført gennem mælken.



Figur 1. Osteopontin koncentrationen i plasma fra navlestrengsblod, tre-måneders spædbørn, voksne og gravide kvinder målt ved ELISA. *OPN indholdet i plasma fra tre-måneders gamle børn var signifikant højere end indholdet i navlestrengsblod ($P < 0,05$). **OPN indholdet i plasma fra navlestrengsblod og tre-måneders gamle børn var signifikant højere end indholdet voksne ($P < 0,01$).

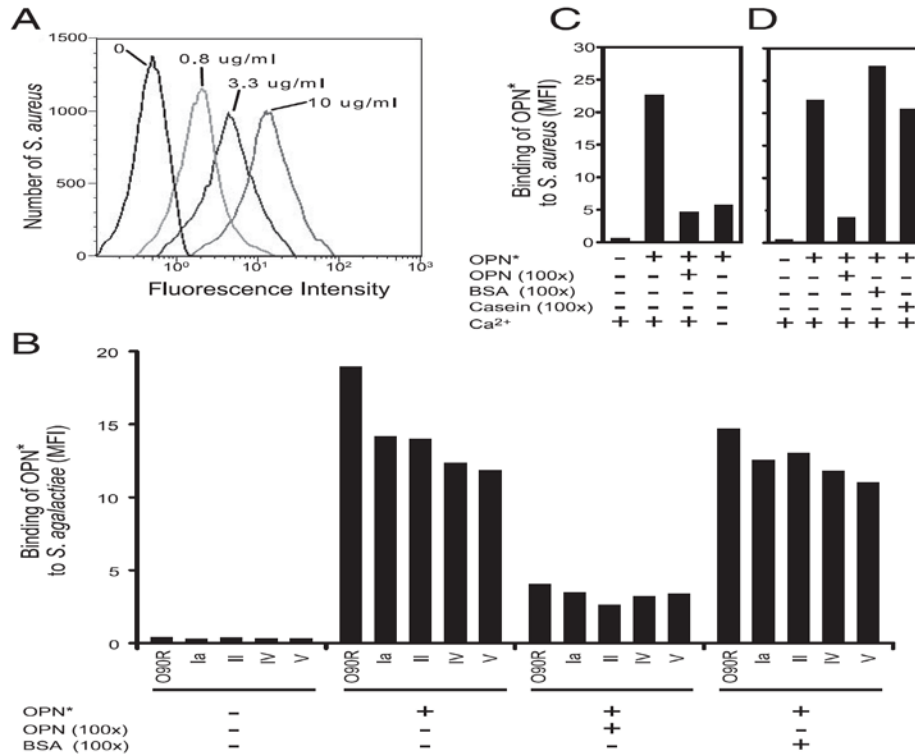
Osteopontins effekt på immunceller og fagocytose af bakterier

Det har i lang tid været velkendt at osteopontin har været involveret i reguleringen af et immunrespons, ved at fungere som et cellesignaleringsmolekyle, et såkaldt cytokin. Osteopontin er således blevet karakteriseret som en aktivator af det cellulære immunforsvar (Ashkar et al., 2000). Aktiveringen af denne del af immunforsvaret er blandt andet karakteriseret ved at immuncellerne opregulerer deres udtryk af IL-12 (interleukin 12) og nedregulerer udtrykket af IL-10. For at undersøge om osteopontin oprenset fra bovin mælk også kan tænkes at have en effekt på udtrykket af cytokiner hos humane immunceller, har vi testet udtrykket af IL-12 hos immunceller fra tarmen. (Figur 2



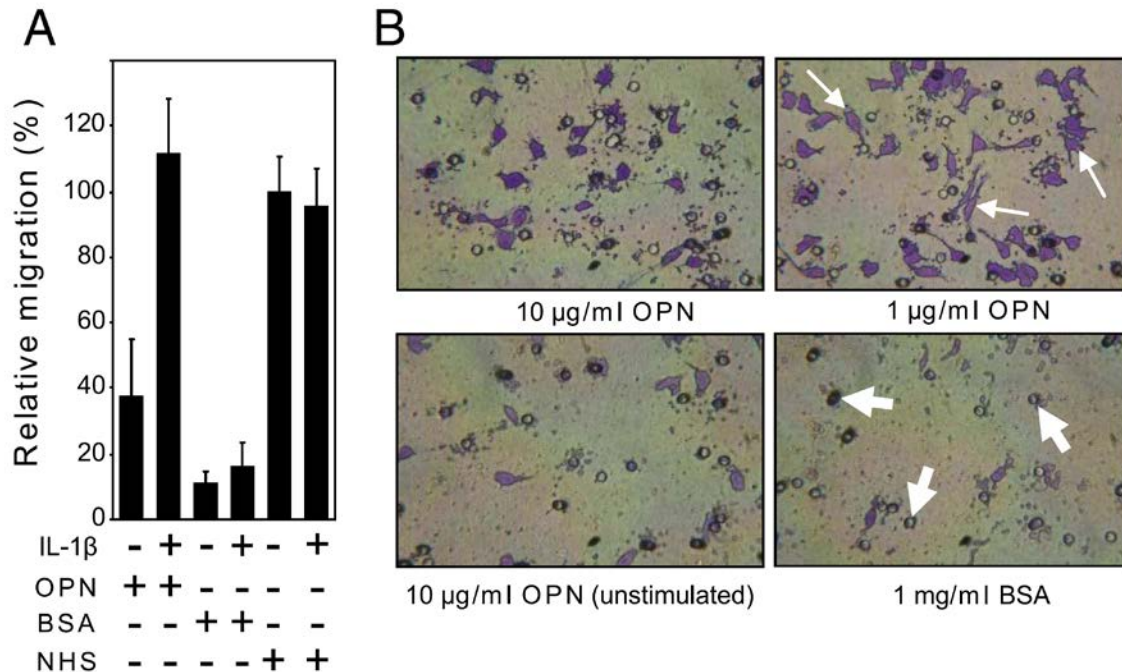
Figur 2. Osteopontin inducerer ekspression af IL-12 I humane lamina propria mononukleære celler (LPMNC). *IL-12 udtrykket efter behandling med osteopontin er signifikant højere end udtrykket hos ubehandlede LPMNC ($P < 0.01$).

Osteopontin produceres af de fleste hvide blodceller og denne produktion øges under en infektion. Samtidig ved man fra studier med mus som mangler proteinet, at disse mus udvikler sig og opfører sig normalt under ikke infektiøse forhold. Udsættes musene derimod for sygdomsfremkaldende bakterier eller virus, har de et atypisk immunrespons hvilket resulterer i en nedsat evne til at bekæmpe infektionen. For at undersøge om osteopontin er i stand til direkte at interagere med bakterier, har vi opmærket osteopontin med et fluorescerende stof (alexa fluor-488) og tilsat det mærkede protein til bakterier. På denne måde har vi ved flow cytometriske målinger vist at osteopontin på en dosis afhængig måde er i stand til at opsonisere alle kendte serotyper af *Streptokokkus agalactiae* og *Stafylokokkus aureus* (Figur 3). Bindningen blev desuden vist at være afhængig af tilstedeværelsen af calcium.



Figur 3. Osteopontin binder specifikt til bakterier. Bindingen af Alexa Fluor 488-konjugeret OPN (OPN*) til *S. aureus* or *S. agalactiae* blev undersøgt ved flow cytometry. (A) Binding af OPN* til *S. aureus* (stramme Wood). (B) Binding of OPN* til to the *S. agalactiae* stammerne Ia, II, IV, V og O90R. Bindingen blev undersøgt i tilstedeværelse eller fraværet af 100 gange overskud af ukonjugeret OPN eller BSA som indikeret. (C) Bindingens Ca²⁺ afhængighed blev undersøgt i tilstedeværelse eller fravær af Ca²⁺ eller 100-gange overskud af ukonjugeret OPN som indikeret (D) Specificiteten af bindingen til *S. aureus* blev testet i tilstedeværelse af 100-gange overskud af OPN, BSA eller kasein som indikeret.

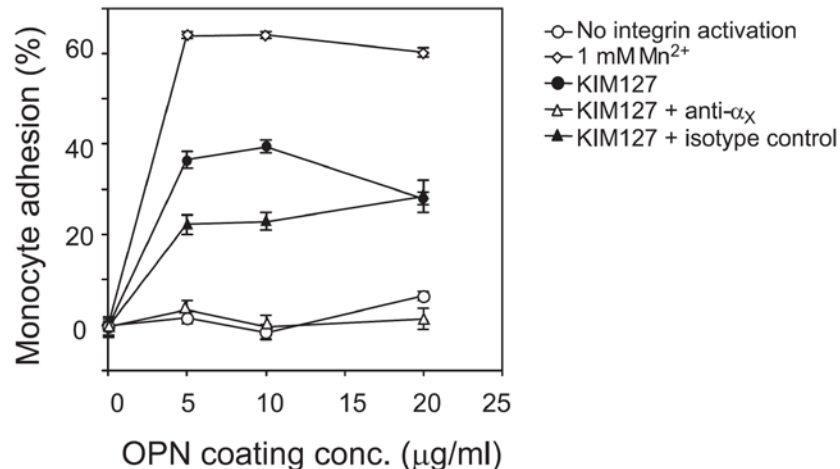
Opsonisering af mikroorganismer, som vist i figur 3., fremkalder normalt et immunrespons. Vi undersøgte derfor, med et migrationsassay, om monocytter kan tiltrækkes kemotaktisk af osteopontin (Figur 4). Resultatet viste at ikke-aktiverede monocytter kun i ringe grad reagerer på tilstedeværelsen af OPN, hvorimod IL-1 aktiverede monocytter er i stand til at migrere langs en gradient af osteopontin, og på denne måde finde vej til områder med høj osteopontin koncentration.



Figur 4. Osteopontin inducerer migration af IL-1 aktiverede humane monocytter. Migration mod osteopontin blev analyseret med et Boyden-chamber migrations assay. (A) Migration af IL-1 β -aktiverede eller ustimulerede monocytter mod 10 μ g/ml OPN, 1 mg/ml BSA, eller 10% NHS (normal human serum) er vist. Resultatet er udtrykt som relative migration i forhold til migration mod NHS uden IL-1 β aktivering. (B) Fotos \times 40 forstørrelse af migrerende humane monocytter. Tynde pile viser migrerende monocytter, tykke pile viser de membranporer cellerne migrerer gennem.

For at undersøge om monocytter også er i stand til at interagere direkte med OPN blev Alexa flour-488 mærket osteopontins (OPN*) binding til monocytter undersøgt ved flowcytometri. Resultatet viste at OPN er i stand til at binde til monocytter samt at denne binding er specifik for OPN, idet bindingen kun kunne udkonkurreres af umærket OPN og ikke af kontrol proteiner (BSA og kasein). Binding var desuden afhængig af tilstedeværelsen af Mn²⁺, hvilket tyder på at interaktionen formentlig sker via integriner. I forvejen er det kendt at OPN binder til en lang række integriner herunder α_v og β_1 integriner via en cellebindende arginin-glycin-aspartat (RGD) sekvens i OPN. Imidlertid kunne fragmenter af OPN, der ikke indeholder RGD sekvensen, også binde sig til monocytterne, hvilket tyder på at bindingen må ske gennem andre end de i forvejen kendte integriner. Monocytter vides at udtrykke et højt niveau af integriner af β_2 familien. Heraf er $\alpha_x\beta_2$ integrin receptoren af særlig interesse, da denne integrin menes at binde til negativt ladede ufoldede proteiner, hvilket netop er karakteristisk for OPNs (manglende) struktur. Derfor blev det vha. adhesions assays undersøgt om denne receptor kunne være en ligand for OPN (Figur 5). Studier med frisk oprensede monocytter viste at disse celler efter aktivering med enten Mn²⁺ (aktiverer alle integriner) eller KIM127 (et antistof der specifikt aktiverer alle integriner af β_2 typen) var i stand til at binde til OPN. Dette tyder altså på at bindingen til OPN foregår via β_2 integriner. For at undersøge om $\alpha_x\beta_2$

integrinet er det ansvarlige β_2 integrin for den observerede binding, blev bindingen forsøgt blokeret med et antistof mod α_X -subunitten. Dette resulterede i total blokering af OPNs binding til monocytter.

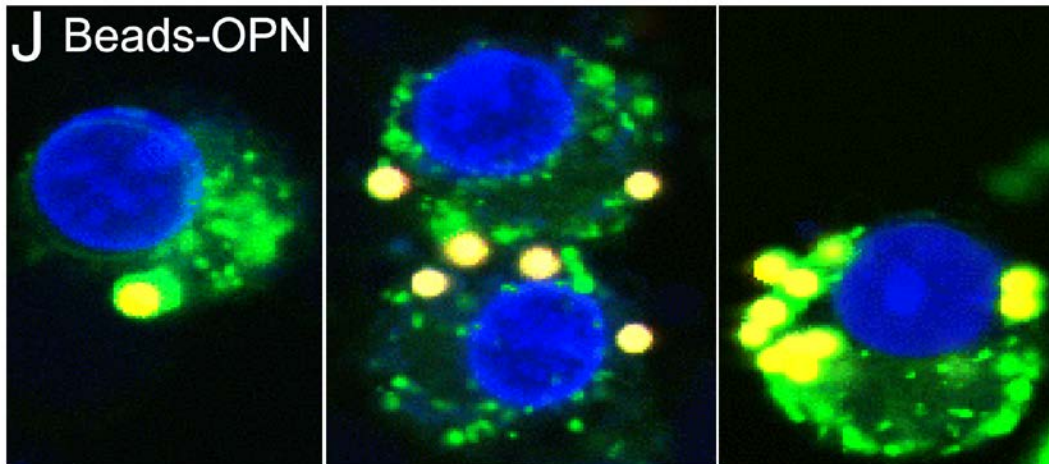


Figur 5. $\alpha_X\beta_2$ integrin er en ny receptor for OPN. Adhesion af humane monocytter til OPN blev testet i tilstedeværelse af Mn^{2+} (integrin aktiverende), KIM127 (β_2 -integrin aktiverende med og uden α_X blokerende antistoffer (anti- α_X) eller siotype kontrol IgG₁.

$\alpha_X\beta_2$ integrin receptorens involvering i for OPNs binding til monocytter blev desuden bekræftet ved at bruge en cellelinie der stabilt udtrykker enten $\alpha_X\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$ eller ingen af receptorerne. Her var resultatet det samme, kun celler der udtrykte $\alpha_X\beta_2$ var i stand til at binde til OPN. Disse studier viser derfor at $\alpha_X\beta_2$ integrinet er en ny receptor for OPN. Denne receptor er ikke tidligere vist at kunne binde til OPN, men man ved dog fra tidligere studier at receptoren ofte er involveret i fagocytose af bakterier.

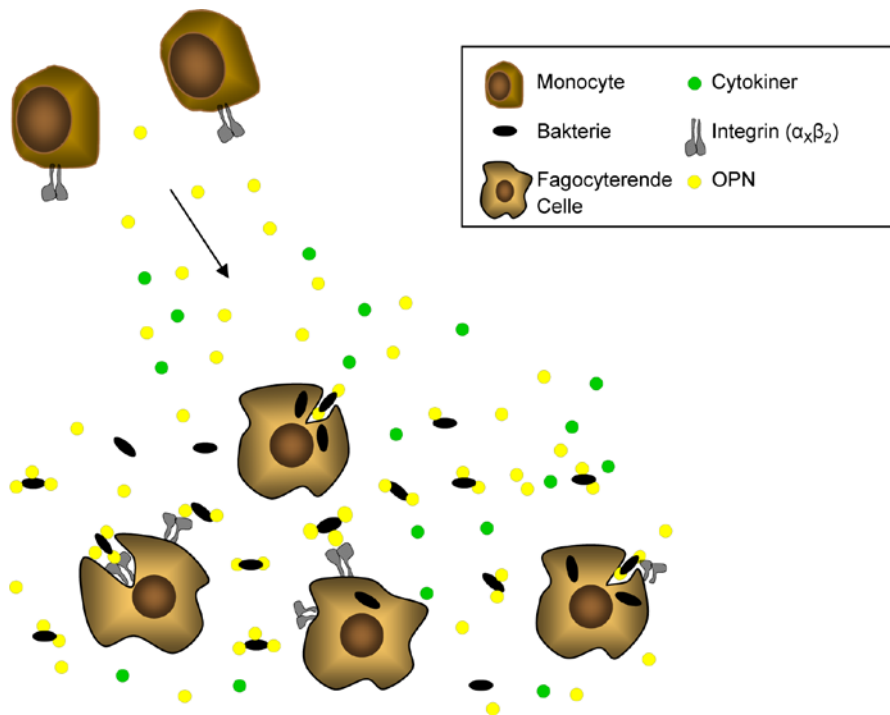
Da OPN kan binde både til den monocytiske $\alpha_X\beta_2$ integrin, såvel som til bakterier er det derfor nærliggende at undersøge om OPN kan fremme fagocytosen af bakterier via $\alpha_X\beta_2$ integrin receptoren. Til dette formål blev bakterierne mærket med et kemisk stof (CypHer5E), som under normale forhold ikke fluorescerer, men udsættes stoffet for lav pH, som f.eks. findes i fagosomer i fagocyterende celler, vil det fluorescere. Bakterierne blev herefter opsoniseret med enten OPN eller kontrol proteiner og derefter tilsat fagocyterende celler. Resultatet viste at bakterierne der var "mærket" med osteopontin blev hurtigere optaget af den fagocyterende celle end bakterier der enten var "mærket" med kontrolproteiner (BSA eller kasein) eller slet ikke var mærket med nogle proteiner. Alle celler fagocyterede dog meget hurtigt en stor mængde bakterier, hvilket er forventeligt da mange forskellige proteiner er involveret i bakteriel fagocytose. For at udelukke at den observerede effekt kunne stamme fra andre proteiner på bakteriens overflade, anvendte vi et modelsystem med fluorescerende latexkugler. Disse kugler har en kemisk modificeret overflade, der gør at man kan binde proteiner til dem. Disse latexkugler blev således behandlet med enten OPN, IgG1 (positiv kontrol), BSA (negativ kontrol) eller ingen proteiner. Disse studier viste at latexkugler med OPN bundet til sig

blev fagocyteret i samme grad som kugler der havde bundet den positive kontrol IgG1, som er kendt for at fremme fagocytosis. Derimod blev kugler uden protein, eller dem der havde BSA bundet til sig. Kun fagocyteret i ringe grad. I dette forsøg kunne vi blokere fagocytosen af latexkugler med OPN ved at tilsætte et antistof mod α_X subuniten, hvilket bekræfter at fagocytosen af OPN mærkede kugler eller bakterier sker via $\alpha_X\beta_2$ integrin receptoren.



Figur 6. OPN inducerer fagocytose af latexkugler via α_X integrin receptoren. På billedet ses hvorledes latexkuglerne, der er gule pga. opmærkningen med osteopontin, er blevet optaget af fagocyterende monocytter. Cellekernen er farvet blå og cytosolen er farvet grøn. Co-lokalisering af kuglerne (gul) med de cytosolære områder (grøn) viser at kuglerne er blevet fagocyteret af cellen.

En model/hypotese for en funktion af osteopontin i immunforsvaret kunne derfor være som skematiseret i figur 7.



Figur 7. Model over mulig funktion af osteopontin i immunresponsen. I forbindelse med en bakteriel infektion begynder immunforsvarets celler at producere OPN, som binder sig til bakterierne. Den høje koncentration af OPN tiltrækker herefter monocytter, som migrerer langs en gradient af OPN. Herefter binder monocytten til OPN via $\alpha_x\beta_2$ integrinet, hvorved bakterien hurtigt bliver fagocyteret og nedbrudt.

Samlet konklusion

Projektets hovedkonklusioner kan sammenfattes i følgende punkter.

- Osteopontin koncentrationen i human mælk er 10-15 gange højere end koncentrationen i bovin mælk og modermælksersatninger.
- Osteopontin koncentrationen i plasma fra navlestrengsblod og tre-måneders gamle spædbørn er 7-10 gange højere end koncentrationen i voksne.
- Bovin osteopontin oprenset fra mælk kan inducere udtryk af IL-12 hos humane immunceller fra tarmen, og derved aktivere det cellulære immunforsvar
- Osteopontin binder direkte, i en Ca^{2+} afhængig proces, til alle testede serotyper af *S. aureus* og *S. agalactiae*
- Osteopontin kan binde til monocytter gennem $\alpha_x\beta_2$ integrin receptorer, som er en ny identificeret receptor for osteopontin
- Osteopontin faciliterer kemotaktisk migration (tiltrækker) af aktiverede monocytter og inducerer fagocytose af bakterier

Referencer, som ikke er inkluderet i liste over projektets publikationer og offentliggørelser

Ashkar, S., Weber, G.F., Panoutsakopoulou, V., Sanchirico, M.E., Jansson, M., Zawaideh, S., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., Glimcher, M.J., and Cantor, H. (2000). Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 287, 860-864.

Field, C.J. (2005). The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr* 135, 1-4

Lawrence, R.M., and Pane, C.A. (2007). Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 37, 7-36.

Sodek, J., Ganss, B., and McKee, M.D. (2000). Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 11, 279-303.

Publikationer og præsentationer

Artikler i internationale tidsskrifter

Al-Shami, R., Sørensen, E.S., Andersson, G., Ek-Rylander, B., Carson, D.D., Farach-Carson, M.C. (2005) Osteopontin promotes migration of human choriocarcinoma cells via a p70 S6 kinase-dependent pathway. *J. Cell. Biochem.* 94:1218-33.

Agnholt, J., Kelsen, J., Schack, L., Hvas, C.L., Dahlerup, J.F., Sørensen, E.S. (2007) Osteopontin, a protein with cytokine-like properties, is associated with inflammation in Crohn's disease. *Scand. J Immunol.* 65:453-60

Christensen, B., Kazanecki, C., Petersen, T.E., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., Sørensen, E.S. (2007) Cell-type specific post-translational modifications of mouse osteopontin are associated with different adhesive properties. *J. Biol. Chem.* 282:19463-72

Gericke, A., Qin, C., Spevak, L., Fujimoto, Y., Butler, W.T., Sørensen, E.S., Boskey, A.L. (2005) Mechanism of regulation of biomineralization by osteopontin. *Calcif. Tissue Int.* 77: 45-54.

Schack, L., Lange, A., Kelsen, J., Agnholt, J., Christensen, B., Petersen, T.E., Sørensen, E.S. (2009) Considerable variation in the concentration of osteopontin in human milk, bovine milk and infant formulas. *J. Dairy Sci.* 92:5378-85.

Schack, L., Stapulionis, R., Christensen, B., Kofod-Olsen, E., Skov Sørensen, U.B., Vorup-Jensen, T., Sørensen, E.S., Höllsberg, P. (2009) Osteopontin enhances phagocytosis through a novel osteopontin receptor, the alphaXbeta2 integrin. *J. Immunol.* 182:6943-50.

Wine, E., Shen-Tu, G., Gareau, M.G., Licht, C., Ngan, B.-Y., Goldberg, H.A., Sørensen, E.S., Sodek, J., Zohar, R., Sherman, P.M. (2009) Osteopontin mediates *Citrobacter rodentium*-induced colonic epithelial cell hyperplasia and attaching-effacing lesions. Indsendt til *Am. J. Pathol.*

Populærvideenskabelige artikler

Schack, L., Sørensen, E.S. (2009) Osteopontin - et mælkeprotein med mange anvendelsesmuligheder. Indsendt til *Mælkeritidende*

Studenteropgaver

Lotte Schack (2005) Osteopontin in human immunity. Del A. Progress report

Indlæg ved faglige kongresser

Christensen, B., Kazanecki, C.C., Rittling, S.R., Denhardt, D.T. and Sørensen, E.S. 2007, "Osteopontin – numerous isoforms" ved *Gordon Research Conference on Small Integrin-Binding Proteins*, University of New England, Biddeford, Maine, 5.8.2007 - 10.8.2007.

Schack, L., Bertelsen, H., Kelsen, J., Agnholt, J., Sørensen, E.S. 2006, "Osteopontin in milk - implications in neonate immunity", fremlagt ved *IDF World Dairy Congress Shanghai 2006*, Shanghai, Kina, 20.10.2006 - 23.10.2006.

Schack, L., Christensen, B., Sørensen, E.S. 2006, "Osteopontin in milk - implications in neonate immunity?", fremlagt ved *Gordon Research Conference*, Big Sky, Montana, USA, 11.9.2005 - 16.9.2005.

Kazanecki, C.C., Kowalski, A., Christensen, B., Sørensen, E.S., Denhardt, D.T. 2005, "Differences in Post-Translational Modifications of Murine OPN", fremlagt ved *Gordon Research Conference on Small Integrin-Binding Proteins*, Big Sky, Montana, USA, 11.9.2005 - 16.9.2005.

Ek-Rylander, B., Christensen, B., Farach-Carson, M.C., Sørensen, E.S., Andersson, G. 2005, "Distinct phosphorylation sites regulate adhesion and migration of macrophages on human milk osteopontin", fremlagt ved *Gordon Research Conference on Small Integrin-Binding Proteins*, Big Sky, Montana, USA, 11.9.2005 - 16.9.2005.

Christensen, B., Nielsen, M.S., Schack, L., Sørensen, E.S. 2006, "Structural characterization of human osteopontin", fremlagt ved *Gordon Research Conference on Small Integrin-Binding Proteins*, Big Sky, Montana, USA, 11.9.2005 - 16.9.2005.

Schack, L., Sørensen, E.S. 2005, "Osteopontin - a milk protein with implications in immune regulation?", fremlagt ved *Milk Products and Components in Health and Disease*, Reykjavik, 2005

Heegaard, C.W., Rasmussen, J.T., Sørensen, E.S., Hobley, T.J., Tennefors, C., Lihme, A., Albertsen, K., Petersen, T.E. 2005, "Purification of Bioactive Milk Proteins", fremlagt ved *The 2nd International Symposium on Milk Genomics & Human Health*, Napa, CA, 10.11.2006 - 11.11.2006.

Forskeruddannelse

Ph.d.-projekt

Lotte Schack (2008) Osteopontin in human immunity. Ph.d. afhandling

Forskningsophold

I perioden april-juli 2006 har Ph.D stud. Lotte Schack været på udvekslingsophold hos Prof. David Denhardt, Rutgers University, New Jersey, hvor hun blandt andet har arbejdet med diverse celle assays og karakterisering af monoklonale antistoffer rejst mod osteopontin fra mælk.

Samarbejdsrelationer – nationalt og internationalt

I forbindelse med projektet har vi samarbejdet med flere nationale og internationale samarbejdspartnere.

I den del af projektet, der omhandlede kvantificering af osteopontin i mælk og immunstimulering af human immunceller fra tyndtarmen, har vi arbejdet sammen med Overlæge Jørgen Agnholt og Speciallæge Jens Kelsen, Gastro-Immuno Research Laboratory, Afd. V og Overlæge Aksel Lange, Pædiatrisk afdeling, Aarhus Universitetshospital

I forbindelse med udvikling og anvendelse af diverse celle assays til at måle osteopontin induceret adhesion og migration har vi arbejdet sammen med Professor David T. Denhardt, Rutgers University, NJ, USA og Associate Professor Susan R. Rittling, The Forsyth Institute, Boston, USA.

I forbindelse med undersøgelser og udvikling af assays til måling af osteopontin binding til bakterier og stimulering af fagocytose har vi arbejdet sammen med Professor Per Höllsberg og Lektor Uffe Skov Sørensen, Institut for Medicinsk Mikrobiologi og Immunologi, Aarhus Universitet.

Angående undersøgelser af osteopontins rolle i diverse immunrelaterede processer, har vi arbejdet sammen med en lang række personer hos Arla Foods i Viby J og i Nr. Vium.

Resultaternes praktiske og videnskabelige betydning for mejeribrug

Produktionen og anvendelsen af osteopontin i infant formulas og i formuleringer til benyttelse i oral hygiejneprodukter er patenteret af Arla Foods.

Osteopontin produceres og markedsføres af Arla Foods, som aktiv ingrediens i infant formulas. Doseringen af osteopontin i disse nye IF's er baseret på resultaterne af dette projekt. Ligeledes indgår de immunologiske resultater der er opnået i dette projekt som en del af argumentationen for anvendelse denne ingrediens i IF's.

Projektets resultater kan således i høj grad siges at have haft betydning for mejeribrug.

Relationer til andre/nye mejerirelaterede samarbejdsprojekter

Projektet byggede på undersøgelser foretaget i et foregående FØTEK-3 projektet "Osteopontin - en aktivator af det cellulære immunforsvar", hvor vi fandt at bovin mælke osteopontin havde indflydelse på immunmoduleringen hos murine immunceller. I det nærværende projekt har vi vist at osteopontin fra komælk i høj grad kan påvirke celler fra det humane immunforsvar og at OPN kan mærke bakterier for fagocytose af humane immunceller.

Undersøgelser af osteopontins struktur og funktion, herunder i immunologiske processer, indgår i flere af laboratoriets andre projekter. Ligeledes foregår der på Arla Foods projekter der blandt omhandler anvendelse af osteopontin i modermælkerstatninger.