

Afslutningsrapport

Osteopontin – en aktivator af det cellulære immunforsvar

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2004-57

Februar 2004



mejeriforeningen

danish dairy board

Osteopontin – en aktivator af det cellulære immunforsvar

FØTEK III afslutningsrapport

Projektleder og medarbejdere:

Esben Skipper Sørensen, lektor, ph.d.
Laboratorium for Proteinkemi, Aarhus Universitet
Gustav Wieds Vej 10C
8000 Århus C
Tlf 8943 5092
Fax 8613 6597

Christian Würtz Heegaard, lektor, ph.d.
Lise Møller Fogh, laborant
Tine Berg Hansen, laborant (barselsvikar for LMF frem til 1. februar 2002)
Mette Schou Nielsen, specialestuderende (Cand. Scient., 31/10-03)
Lotte Schack, specialestuderende
Brian Christensen, præspecialestuderende

Resumé

Nylige studier har vist, at et protein, der forekommer naturligt i mælken, osteopontin (OPN), påvirker immunforsvaret. OPN er ikke et mælkespecifikt protein, men syntetiseres af en række forskellige celletyper, heriblandt nogle af immunforsvarets celler. I modsætning til mælkens lactoferrin og immunoglobulin, der har en direkte antimikrobiel effekt på mikroorganismer, virker OPN ved at regulere den delikate balance mellem immunforsvarets celler. OPN tilhører derfor en eksklusiv gruppe af naturligt forekommende proteiner, der fungerer som cellesignaleringsstoffer, de såkaldte cytokiner, og medvirker på den måde i reguleringen af immunforsvaret. Hittidige resultater viser at OPN inducerer en aktivering af det cellulære immunforsvar, et Th-1 type respons. Tidligere undersøgelser af OPN's betydning for immunforsvaret er baseret på rekombinant OPN. Dette skyldes at tilgængeligheden af naturligt forekommende OPN er yderst begrænset. Det er derfor ikke klarlagt om OPN, som dagligt indtages i mejeriprodukter i store mængder er immunologisk aktivt og eventuelt kan have en stimulerende effekt på det cellulære immunforsvar ved oral indtagelse.

Det foreliggende projekts hovedformål er derfor at undersøge om OPN isoleret fra bovin mælk har en stimulerende effekt på immuncellers produktion af interleukin 12 (IL-12), som er en indikator på aktivering af det cellulære immunforsvar. Projektet har ligeledes som formål at undersøge *in vitro* fordøjelse, og optagelse af OPN

Sideløbende med det foreliggende projekt er der optimeret på proces-skala oprensning af OPN vallepulver produkt på Arla Foods i Nr. Vium. I projektet er metoden til oprensning af OPN optimeret til mejeriskala. Ligeledes er det muligt at producere proteinet i en endotoxinfri form, der er nødvendig for videre immunologiske forsøg. *In vitro* fordøjelsesforsøg med proteaser og mavesaft fra nyfødte har vist, at signifikante mængder OPN forbliver ufordøjet, eller kun fordøjes til større peptidfragmenter. Derved er det sandsynligt at et peptid, homologt til "NK-10", som er påvist at besidde den immunstimulerende effekt hos mus, også dannes ved fordøjelsen af bovin OPN. Det er vist, at bovin OPN er i stand til at stimulere udtrykket af IL-12 i human immunceller isoleret fra tarmen, hvilket indikerer aktivering af det cellulære immunforsvar. Fodring af mus med OPN viser at OPN eller større fragmenter heraf kan genfindes i musenes plasma to timer efter fodring. Fordøjelsesforsøgene og musefodringsforsøgene indikerer, at OPN og eller større fragmenter af dette protein penetrerer tarmbarrieren og optages i blodet hos konsumenten i en form, der kan muliggøre aktivering af det cellulære immunforsvar. Denne viden kan på sigt danne basis og dokumentation for mejeriindustriell udnyttelse af OPN.

English abstract

Recent studies have indicated that an endogenous milk protein, osteopontin (OPN), influences the function and regulation of immune system. OPN is not endemic to milk, but is synthesized by a number of different cell types, among which are cells of the immune system. While lactoferrin and immunoglobulins in the milk have a direct antimicrobial effect on microorganisms, OPN functions as a regulator of the delicate balance between immune cells. Thereby OPN belongs to a class of molecules known as cytokines. It has earlier been shown that OPN activates the cellular immune system, a Th-1 type response. Most of the studies on OPN functions are based on recombinant OPN, due to the poor availability of native OPN.

The main purpose of the present study is to elucidate whether OPN isolated from bovine milk has a stimulatory effect on the expression of interleukin 12 (IL-12) in immune cells. IL-12 is indicative of the induction of the cellular immune response. Furthermore, the project aims at describing the *in vitro* digestion and potential uptake of OPN after oral administration to OPN knock-out mice.

In parallel with the present project a method for dairy scale production of OPN has been optimized from existing protocols in collaboration with Arla Foods Ingredients. *In vitro* digestions with proteases and neonate gastric aspirate have shown that significant amounts of OPN remains intact or only partially digested. Thereby it is highly likely, that a peptide homologous to “NK-10” which has been shown to be immunologically active in mice is also formed by digestion of bovine OPN. It has been shown that bovine OPN is able to stimulate the expression of IL-12 in human immune cells isolated from the intestine, which indicate induction of a Th-1 type immune response. Analyses of murine plasma show that OPN, and/or large OPN fragments can be retrieved in the blood of mice 2 hours after feeding with bovine OPN. The digestion and feeding experiments indicates that OPN or larger peptide fragments of OPN penetrate the intestinal barrier and is present in the blood in a form that could possibly participate in immune stimulatory processes. This knowledge could potentially form the basis and documentation for industrial exploitation of milk OPN in new products.

Projektets hovedformål:

Hidtidige undersøgelser af OPN's betydning for immunforsvaret er baseret på rekombinant OPN. Dette skyldes at tilgængeligheden af naturligt forekommende (nativt) OPN er yderst begrænset. Det er derfor ikke klarlagt om OPN, som dagligt indtages i mejeriprodukter i store mængder er immunologisk aktivt og eventuelt kan have en stimulerende effekt på det cellulære immunforsvar ved oral indtagelse.

Det foreliggende projekts hovedformål er at undersøge om OPN isoleret fra bovin mælk har en stimulerende effekt på immuncellers produktion af interleukin 12 (IL-12), som er en indikator på aktivering af det cellulære immunforsvar. Ligeledes er det projektets mål at undersøge hvorledes OPN fordøjes *in vitro*, med henblik på at sandsynliggøre at bioaktive fragmenter og peptider når frem til tarmsystemet. Endelig undersøges om OPN eller fragmenter af OPN optages i blodbanen efter fodring af OPN knock-out mus.

Baggrund

Siden opdagelsen af mikroorganismer som årsag til infektionssygdomme og de første forsøg på behandling med antibiotika, har forholdet mellem en mikroorganismes virulens og patogenicitet og værtens modstandskraft været kendt som en vigtig faktor for udfaldet af en infektion. Mulighederne for at påvirke balancen mellem mikroorganisme og vært har primært været baseret på udvikling antibiotika, der dræber eller hæmmer de forskellige sygdomsfremkaldende organismer. Sidstnævnte udvikler imidlertid ofte resistens over for nye antibiotiske lægemidler, og der er derfor en voksende interesse for at udvikle midler, der i stedet for at påvirke mikroorganismene direkte, hjælper immunforsvaret til mest hensigtsmæssigt at reagere på de skadelige infektioner.

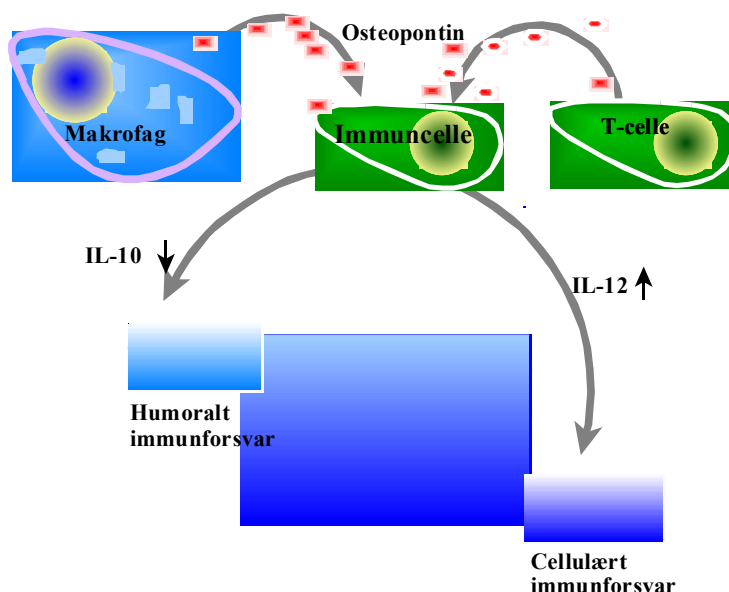
I denne forbindelse er det interessant, at en række undersøgelser har påvist modermælks gavnlige indflydelse på den nyfødtes sundhedstilstand. Dette tilskrives at modermælken - foruden dens store ernæringsmæssige værdi - har et stort indhold af naturligt forekommende antimikrobielle komponenter. Således har undersøgelser vist, at mælken indhold af immunoglobuliner (antistoffer), lactoferrin, lactoperoxidase, lysosym og lactadherin influerer på den nyfødtes evne til at bekæmpe forskellige infektionssygdomme.

Nye undersøgelser publiceret i det ansete amerikanske tidsskrift *Science* viser, at endnu et protein, der forekommer naturligt i mælken, OPN, påvirker immunforsvaret. (Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, Cantor H. (2000) Eta-1 (OPN): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science*. 2000 287:860-4). OPN er ikke et mælkespecifikt protein, men syntetiseres af en række celletyper, heriblandt nogle af immunforsvarets celler. I modsætning til før omtalte proteiner, der har en direkte antimikrobiel effekt på mikroorganismer, virker OPN ved at regulere den delikate balance mellem immunforsvarets celler. OPN tilhører derfor en eksklusiv gruppe af naturligt forekommende peptider/proteiner, der fungerer som celledesignaleringsstoffer, de såkaldte cytokiner, og medvirker på den måde i reguleringen af immunforsvaret.

Undersøgelser af OPN knock-out mus (mus, der vha. molekylære teknikker har fået ødelagt sit gen for OPN, mens resten af generne er intakte; OPN knock-out musen kan altså ikke selv danne OPN) har vist, at OPN har en cytokinlignende effekt.. Sammenlignet med normale mus, viste undersøgelserne at disse knock-out mus ikke havde et effektivt cellulært immunforsvar overfor virale og bakterielle infektioner (type-1 herpes simplex virus og *Listeria monocytogenes*). Immuncellernes manglende evne til at producere OPN bevirkede,

at de undersøgte mus havde en kraftigt nedsat evne til at producere celledsigneringsstoffet IL-12. Sammenhængen mellem manglende OPN, nedsat IL-12 produktion og et ineffektivt immunforsvar blev underbygget med celforsøg. Disse forsøg viste, at tilsætning af OPN til immunceller (makrofager), isoleret fra OPN knock-out mus, stimulerede cellerne til at producere IL-12 og begrænsede produktionen af IL-10. Tilsætning af OPN kunne altså reetablere det cellulære immunforsvar. En proteinkemisk undersøgelse viste, at responset kunne tilskrives et 10 kDa fragment af OPN, NK-10, som skulle være fosforyleret for at aktivere makrofagerne. Ændringen i IL-10 og IL-12 niveauerne betyder, at en Th-1-type reaktion fremmes og Th-2 reaktionerne hæmmes. Tilsætning af OPN kunne altså reetablere det cellulære immunforsvar, hvilket er en stærk indikation på proteinets nøgleposition i reguleringen af immunforsvaret.

Fordøjelsessystemet er under konstant angreb fra en række forskellige patogene mikroorganismer. Det er derfor ikke overraskende at tarmens slimhinde er hjemsted for en stor population af makrofager. Disse makrofager udgør tarmsystemets første forsvarssystem, som ved mødet med de patogene mikroorganismer aktiverer og former kroppens immunologiske respons. Det er således muligt at indtagelse af mejeriprodukter, der adskiller sig fra andre fødevarer ved at have et højt indhold af OPN, har indflydelse på tarmmakrofagernes produktion af IL-12/IL-10, og dermed indflydelse på immunresponsen lokalt i tarmen.



Figur 1. OPNs indvirkning på Th-1/Th-2 balancen. Opregulering af IL-12 udtrykket og nedregulering af IL-10 udtrykket er indikationer på aktivering af et Th-1 type immunrespons; aktivering af det cellulære immunforsvar.

Resultater og kommentarer

- Oprensning af OPN i laboratorie- og proces skala

Nativ bovin OPN er oprenset fra frisk mælk ved hjælp af varmeinduceret fældning, gelfiltrerings- og anionbytningskromatografi som tidligere beskrevet (Sørensen og Petersen, 1993. Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk. J. Dairy Res.60:189-97). Metoden er blevet optimeret i forhold til den publicerede metode, idet den nu afsluttes med et væskekromatografisk trin på en Mono Q FPLC-kolonne, som fjerner de sidste urenheder. Ved denne metode er det muligt rutinemæssigt at oprense OPN i mg skala til en renhedsgrad på 98%. Sideløbende er der optimeret på proces-skala oprensning af et OPN vallepulver produkt på Arla Foods i Nr. Vium. Det er dette produkt, der er anvendt i musefodringsforsøgene beskrevet senere. Den oprensede OPN-præparation er, efter mejeristandarder, yderst ren idet 90-95% af proteinet er OPN eller fragmenter der stammer fra OPN. Vi har under projektet haft nogle vanskeligheder med endotoxin/lipopolysakkarid (LPS) forurening i OPN præparationerne. LPS stammer fra bakteriemembraner, og udgør et stort problem i immunologiske test af proteiner mv., da LPS selvstændigt kan aktivere immunceller og inducere cytokinekspression hos disse. Ved at anvende nye søjlematerialer og foretage alle søjlekørsler i kølerum og efterfølgende sterilfiltrere eluatet, er det lykkedes os at fremstille OPN med et endotoxin niveau på 2,7 EU/mg, hvilket er under grænseværdien for anvendelse i immunologiske tests. Ligeledes har vi i samarbejde med Arla Foods været i stand til at fremstille OPN i proces skala med et meget lavt endotoxin niveau.

- *In vitro* fordøjelse af OPN og karakterisering af resulterende fraktioner.

Behandling af OPN med endoprotease Lys-C, pepsin og mavesaft fra spædbørn (gastric aspirat) er foretaget for at undersøge stabiliteten af OPN under fordøjelsen. Og specielt med henblik på at påvise eller sandsynliggøre, at der dannes et peptid homologt til det aktive murine OPN peptid, NK-10, som er påvist at besidde en immunstimulerende effekt. Peptiderne er fraktioneret ved kromatografiske teknikker (ionbytning, gelfiltrering og reverse-phase HPLC) og karakteriseret ved Edman-sekventering (aminosyresekvens) og MALDI-TOF massespektrometri.

Endo-Lys-C fordøjelse

Endo-lys-C fordøjelse (digest) af OPN resulterer i en række peptider. Ved separation af disse peptider på en C₁₈ reverse-phase kolonne og efterfølgende karakterisering ved Edman sekventering og MALDI-TOF massespektrometri har vi karakteriseret de fleste peptidkomponenter fra dette digest. Hovedkomponenten i digestet udgøres af et peptid med N-terminalen Gln-Asn-Thr-Leu-Pro, som svarer til et peptid med start ved Gln55 i bovin OPN. Peptidet strækker sig formentligt til Lys 145 ell Lys 149/150, som udgør thrombin-kløvningsstedet i OPN. Dermed kan dette peptid betragtes som den bovine homolog til det murine peptid "NK10" (aa54-137), som er vist at regulere interleukin ekspression hos makrofager. Sideløbende studier af human OPN har vist at et peptid (aa36-154), som er homologt til de ovenfor omtalte bovine og murine peptider, relativt simpelt kan oprenses ved Superdex Peptide gelfiltrering af et Endo-Lys-C digest. Denne metode antages at have

mindre denaturerende effekt og lettere umiddelbart kan opskaleres til større mængder materiale.

Pepsin fordøjelse

Fordøjelse med pepsin (1 % (w/w), 1 time), resulterer i en mængde små peptider såvel som en del større fragmenter med molekylvægte op til 20 kDa. Det er derfor sandsynligt, at et fragment homologt med det murine "NK10" (aa54-137), som er vist at regulere interleukin ekspresion hos makrofager (Ashkar *et al.*, 2000, Science 287:860-864), også er tilstede i tarmen efter indtagelse af OPN.

Fordøjelse med mavesaft (gastric aspirat) fra nyfødte

Inkuberingsforsøg med gastric aspirate fra nyfødte viser, at OPN er relativt resistent mod fordøjelse. Western blotting analyser af human mælk, inkuberet 1 time med gastric aspirat (pH 2,0) med OPN-specifikke antistoffer viser, at signifikante mængder OPN forbliver ufordøjet. Der kan observeres bånd ved ca. 78, 34 og 23 kDa, hvilket svarer til intakt human OPN og fragmenter, der kan dannes ved plasmin proteolyse i mælken. Når pH hæves til 4,0, som svarer til pH i maven hos nyfødte, ses et lignende mønster, dog er der større fordøjelse af fragmenterne på 34 og 23 kDa.

Analyse med bovine mælkeproteiner (valleproteinkoncentrat, WPC) viser, at OPN fordøjes på en lignende måde med gastric aspirate. Signifikante mængder fuld længde OPN (60 kDa) kan observeres efter inkubering i 1 time ved pH 6,5, 4,0 og 2,0. Ligeledes består en række fragmenter og store peptider der reagerer med antistofferne (45, 40 og 20 kDa).

Disse resultater viser at store mængder OPN passerer ufordøjet gennem maven, eller undergår meget svag fordøjelse. Derved er det meget sandsynligt, at et bovin OPN peptid, der modsvarer det murine "NK-10" peptid, findes i tarmen efter indtagelse af mejeriprodukter, der indeholder OPN.

- Undersøgelse af bovin mælke OPN's effekt på immuncellers ekspresion af IL-12

Det var planlagt i dette projekt at undersøge bovin OPN's rolle i induktionen af IL-12 sekretion i en primær cellekultur deriveret fra murine makrofager. Forsøget skulle følge den publicerede metode, beskrevet af vore samarbejdspartnere (Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, Cantor H. (2000) Eta-1 (OPN): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. Science. 2000 287:860-4).

Efter projektets start, kom det imidlertid frem, at der generelt havde været problemer med at reproducere disse forsøg i andre laboratorier. Ved konferencen "Third International Conference on OPN and Related Proteins" afholdt i Texas i maj 2002, blev problemerne med dette arbejde diskuteret meget intenst. Flere forklaringer kom frem, mest sandsynligt er det nok, at der ikke har været benyttet "rene" makrofager. Da disse udtages fra bughulen af mus er det formentlig svært at udtage disse uden at få andre celler med, som formentlig også spiller en rolle i induktionen af IL-12 ekspresionen. Projektet blev derfor udvidet til at omfatte OPN's indvirkning på IL-12 ekspresionen på flere typer af immunceller.

Makrofager:

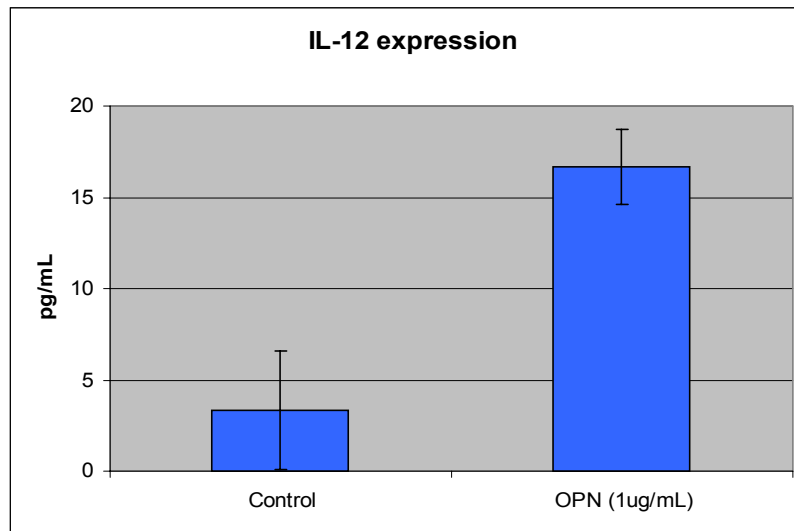
Det lykkedes ikke at få foretaget stabile IL-12 målinger på makrofager. I stedet blev der i samarbejde med Susan R. Rittling, New Jersey State University, foretaget indirekte målinger på udtrykket af CD40L receptoren, som er induceret på T-celler og interagerer med CD40 på makrofagerne, hvorved IL-12 ekspressionen induceres. Ifølge teorien skulle OPN inducere CD40L og deraf følgende makrofagernes IL-12 udtryk. Der blev etableret et stabilt assay, men meget overraskende viste resultaterne, at der i stedet var tale om en mindre nedregulering af CD40L-udtrykket. Efter projektets afslutning er der foretaget yderligere forsøg der viser, at hvis der også er B-celler tilstede i assayet, fås den forventede respons på OPN tilsætning. Det er således klart, at OPN har en kraftig indvirkning på ”makrofag kulturen”. Det er dog et krav at, denne også indeholder andre immunceller (T-celler og B-celler). Det er således ikke klart, om det er makrofagerne eller andre immunceller, der er ansvarlige for cytokinrepsonset.

Dendritceller:

Effekten af OPN på murine dendritiske celler blev undersøgt i samarbejde med Hanne Frøkiær og Vibeke Barkholt, Biochemistry and Nutrition Group, BioCentrum-DTU. Der fandtes ikke nogen målbar effekt af OPN-tilsætning på udtrykket af IL-12 og IL-6. Der observeredes en marginal øgning i IL-6 niveauet, som formentlig kan tilskrives en forurening af makrofager i dendritcellekulturen. Ifølge Hanne Frøkiær er det muligt, at det føtale kalveserum, der tilsættes mediet kan påvirke forsøgets udfald, idet der er observeret variationer i forbindelse med skift af batches. Dette underbygges af resultater fra andre laboratorier der viser, at OPN binder til komponenter i serum, for eksempel faktor H. Det er således meget problematisk at måle på effekten, da det er meget vanskeligt at holde immuncellelinier serumfri længe nok til, at pålidelige målinger kan foretages.

T-celler:

Under projektet blev der etableret et meget frugtbart samarbejde med Jens Kelsen og Jørgen Agnholt, V-laboratorium, Århus Kommnehospital angående OPN's effekt på immunceller isoleret fra human tarm. Kelsen og Agnholt benytter sig af ”T-cellekulturer” udvokset fra tarmbiopsier i T-celle selektive medier. Tilsætning af OPN til disse kulturer resulterer i et signifikant IL-12 respons (se figur 2). Efter projektets afslutning er samarbejdet udvidet til at omfatte målinger på en lang række yderligere cytokiner, og det står nu klart, at OPN inducerer et stærkt Th-1 type respons i tarmceller isoleret fra human tarm. Resultaterne fra disse forsøg forventes at skulle danne basis for snarlige kliniske forsøg.



Figur 2. Interleukin-12-udtryk hos immunceller isoleret fra human tarm efter stimulering med OPN fra bovin mælk.

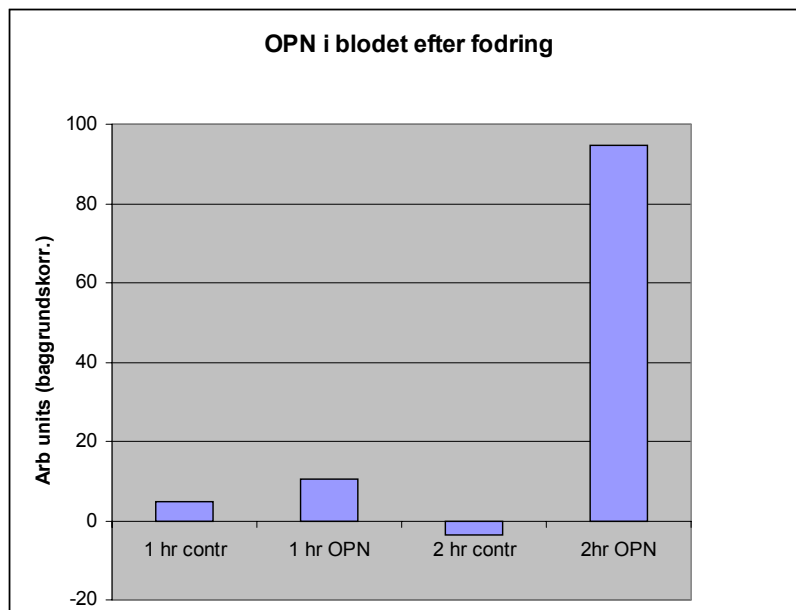
- Oral administration af bovin OPN til OPN knock-out mus.

For at undersøge om OPN og/eller større OPN fragmenter optages efter indtagelse af OPN eller mejeriprodukter der indeholder OPN, er der foretaget fodringsforsøg i musemodeller. Forsøgene er foretaget hos Susan R. Rittling, New Jersey State University, som har en bestand af OPN knock-out mus. Da knock-out musene ikke selv er i stand til at danne OPN, stammer det OPN der evt. findes i serumfraktionerne fra den orale administration af proteinet. Ved anvendelse af eget polyklonalt anti-bovin OPN IgG som primært antistof, vurderes kvalitativt indholdet af OPN i serum ved Western-blotting og ELISA. Anvendelsen af polyklonale antistoffer tillader identifikation af intakt såvel som fragmenteret OPN.

Musene blev fodret med en OPN-opløsning i "Yoohoo" kakaomælk, da dette erfaringsmæssigt får musene til at indtage alt materialet og oral gavage derved kan undgås.

Blodprøver blev udtaget fra mus der ikke havde fået OPN og mus der havde fået OPN til tiden 1 og 2 timer efter fodringen, da vi forventer en relativ hurtigt clearing af OPN fra blodbanen. Blodprøverne blev tilsat EDTA-HEPES, centrifugeret og de klare plasma prøver analyseret i et ELISA med antistoffer specifikke for bovin OPN.

Analyserne viste at bovin OPN og/eller OPN fragmenter var tilstede i musenes blod efter fodring i mængde og form der kunne måles ved ELISA.



Figur 3. OPN i plasma fra OPN knock-out mus fodret med bovin OPN. Serummet er udtaget fra kontroller og OPN fodrede mus til tiden 1h og 2h efter fodring.

Konklusion

I det foreliggende projekt er tidligere publicerede metoder til oprensning af OPN optimeret med henblik på opskalering og højere renhed. Ligeledes er det muligt at producere proteinet i en endotoxinfri form, der er nødvendig for videre immunologiske forsøg. *In vitro* fordøjelsesforsøg med proteaser og mavesaft fra nyfødte har vist, at signifikante mængder OPN forbliver ufordøjet, eller kun fordøjes til større peptidfragmenter. Derved er det sandsynligt at et peptid, homologt til "NK-10", som er påvist at besidde den immunstimulerende effekt hos mus, også dannes ved fordøjelsen af bovin OPN. Det er påvist at bovin OPN er i stand til at stimulere udtrykket af IL-12 i human immunceller isoleret fra tarmen, hvilket indikerer aktivering af det cellulære immunforsvar. Fodring af mus med OPN viser at OPN eller større fragmenter heraf kan genfindes i musenes plasma to timer efter fodring. Fordøjelsesforsøgene og musefodringsforsøgene indikerer, at OPN og/eller større fragmenter af dette protein, penetrerer tarmbarrieren og optages i blodet hos konsumenten i en form, der kan muliggøre aktivering af det cellulære immunforsvar. Denne viden kan på sigt danne basis og dokumentation for mejeriindustriell udnyttelse af OPN.

Publikationer og offentliggørelser:

1. Internationale tidsskrifter

Khan, S.A., Lopez-Chua, C.A., Zhang, J., Fisher, L.W., Sørensen, E.S., and Denhardt D.T. (2002) Soluble OPN inhibits apoptosis of adherent endothelial cells deprived of growth factors. *Journal of Cellular Biochemistry* 85:728-36

Chatterton, D.E.W, Rasmussen, J.T, Heegaard, C.W., Sørensen, E.S., and Petersen, T.E (2003) In vitro digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formulas: Identification of new biological functions. *Trends in Food Science and Technology*. In press

Gericke, A., Chunlin, Q., Spevak, L., Fujimoto, Y., Butler, W.T., Sørensen, E.S., and Boskey, A.L. (2004) Mechanism of regulation of biomineralization by osteopontin. In preparation.

2. Indlæg ved faglige kongresser o.l.

Esben S. Sørensen har fungeret som medarrangør af "Third International Conference on OPN and Related Proteins", San Antonio, Texas, 10-12 maj, 2002

Esben S. Sørensen deltog i denne konference med et foredrag med titlen "Structural studies on OPN"

Nielsen, M.S., Schack, L., Heegaard, C.W., Petersen, T.E., Thøgersen, I.B., Enghild, J.J., and Sørensen, E.S. (2002) A highly sensitive method for identification of OPN ligands and receptors. Abstract og Poster ved Third International Conference on OPN and Related Proteins, San Antonio, Texas, 10-12 maj, 2002.

3. Faglige artikler

Mette Schou Nielsen (2003) "Structural studies of bovine and human milk OPN - fragmentation, glycosylation and phosphorylation" Cand. Scient. afhandling.

Cand. scient.-afhandling af Lotte Schack er under udarbejdelse

4. Mødeindlæg

Esben S. Sørensen har deltaget i Norfa-møde i Liseleje, august 2002, med præsentationen "OPN – an immunoregulating protein"

Redegørelse for forskeruddannelse

To specialestuderende (Cand. Scient.) og en præspeciale student har været tilknyttet dele af projektet.

En cand. scient. i Biologi har skrevet sin specialeafhandling om OPN og er således uddannet i tilknytning til dette projekt.

Yderligere en Cand. Scient. afhandling i Molekylærbiologi tilknyttet dette projekt er under udarbejdelse.

Redegørelse for samarbejdsrelationer nationalt og internationalt

Under dette projekt har vi arbejdet sammen med en række forskere nationalt og internationalt. De vigtigste samarbejdspartnere, hvoraf de fleste indgår i nye samarbejder om OPN er nævnt herunder.

Internationale kontakter:

I forbindelse med de immunologiske forsøg og musefodringsforsøgene har vi arbejdet tæt sammen med Professor David T. Denhardt og Associate Research Professor Susan R. Rittling, New Jersey State University - Rutgers. ESS har i maj 2002 aflagt et besøg i laboratoriet på Rutgers og samarbejdet med dette laboratorium fortsætter efter dette projekt.

I forbindelse med OPN konferencen i Texas blev der indgået en del kontakter hvoraf nogle har udviklet sig til konkrete samarbejder omkring strukturelle og funktionelle analyser af OPN i forskellige systemer.

Samarbejde om fosforyleringen af OPN's indvirkning på osteoklast-funktionen:

Prof. Mary C. Farach-Carson, Department of Biological Sciences, University of Delaware.
Prof. Goran Andersson og Associate Professor Barbro Ek-Rylander, Karolinska Institutet, Huddinge University Hospital, Sverige

OPN's interaktioner med kalcium og calcium-krystaller og salte:

Prof. Charles W. Prince, Department of Nutrition Sciences, University of Alabama at Birmingham, AL og Prof. Jeffrey A. Wesson, Medical College of Wisconsin, Department of Veterans Affairs Medical Center, Milwaukee, WI

OPN i kaseinmiceller og mælk:

Director Adele L Boskey, Mineralized Tissues Laboratory, Hospital for Special Surgery, NY

Nationale:

Vi har indledt et meget frugtbart og produktivt samarbejde med Professor Jørgen Agnholt & ph.d.-stud. Jens Kelsen, V-laboratorium, Århus Kommunehospital, angående OPN's effekt på immunceller fra human tarmvæv. Dette samarbejde planlægger vi at fortsætte og udbygge fremover.

Hanne Frøkiær og Vibeke Barkholt har været meget behjælpelige med målinger på OPN's effekt på dendritceller.

Professor Stephen Hamilton, Patologisk Institut, Århus Kommunehospital, vil foretage immunohistokemiske farvninger af tarmvæv for at påvise OPN's interaktion med celler i dette.

Vurdering af resultaternes praktiske og videnskabelige betydning

Projektet har bidraget med ny grundlagsskabende viden om mælkeproteinet OPN's potentielle indvirkning på immunsystemets celler. Fordøjelsesforsøgene og musefodringsforsøgene har stærkt indikeret muligheden af, at OPN og/eller større fragmenter af dette protein penetrerer tarmbarrieren og optages i blodet hos konsumenten i en form, der kan muliggøre aktivering af det cellulære immunforsvar. Denne viden kan på sigt danne basis og dokumentation for mejeriindustriell udnyttelse af OPN.

Vurdering af, om projektet har relationer til andre/nye mejerirelaterede samarbejdsprojekter

De dele af projektet, der omhandler OPN's immunstimulerende effekt på immunceller fra human tarmvæv, søges fortsat i samarbejde med forsker fra Århus Kommunehospital. Ligeledes har projektet bidraget til at udbygge laboratoriets samarbejde med mejeriindustrien, således at visse dele af projektet søges videreført i nye samarbejder angående oprensning og anvendelse af OPN oprenset fra mælk.

