

# Afslutningsrapport

Karakterisering af immunmodulerende komponenter i mælk

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2003-52

April 2003



**mejeri**foreningen

danish dairy board

## Afslutningsrapport

# Karakterisering af immun-modulerende komponenter i mælk

Et FØTEK III-forskningsprojekt finansieret af Mejeribrugets ForskningsFond og  
Direktoratet for FødevarerErhverv.

1.januar 1999- 31.december 2002.

Projektledere: Lektor Hanne Frøkiær og lektor Vibeke Barkholt  
BioCentrum-DTU, Sektion for Biokemi og Ernæring

Øvrige deltagere : ph.d.-studerende Susanne Johansen  
Laborarietekniker Dorthe Nielsen  
Laborant Lisbeth Buus Larsen

## Resumé

Undersøgelser har vist, at nogle mælkeproteiner og peptider heraf kan påvirke immunforsvaret, for eksempel ved enten at stimulere eller hæmme celledeling.

Sådanne immun-modulerende aktiviteter kan have betydning både for det generelle immunforsvar overfor patogener og for det specifikke immunforsvar mod levnedsmiddelproteiner, for eksempel levnedsmiddelallergener. Undersøgelser af immun-modulerende effekter med henblik på en identifikation af de aktive komponenter og deres virkemåde er interessant på grund af den potentielle anvendelse af immun-stimulerende fraktioner i functional foods, såsom sportsdrikke og modernælkserstatninger.

Projektets formål er at identificere komponenter i mælk som har immun-modulerende egenskaber og desuden karakterisere de cellulære mekanismer der påvirkes af den immun-modulerende komponent.

Da det kan være svært at skelne mellem en specifik og en generel reaktion fra immunforsvaret, er det hensigtsmæssigt at arbejde med forsøgsdyr, da disse får en kontrolleret kost. Da al standardfoder indeholder skummetmælkspulver, har det været nødvendigt at avle mus på mælkefrit foder.

Musenes immunsvær imod mælkeproteinerne i foderet blev i denne forbindelse karakteriseret. Det blev demonstreret, at mælk i foderet påvirker det specifikke og i nogen grad også det generelle immunrespons og sandsynligvis også påvirker immunresponsen i første generation af mus avlet på mælkefrit foder.

En anden faktor af betydning for resultatet af undersøgelser af mælkekomponenters immun-modulerende effekter er endotoxin-forurening af de undersøgte præparater. Vi har i den forbindelse fremstillet endotoxinfri  $\beta$ -laktoglobulin fra rå mælk og viser at  $\beta$ -laktoglobulin ikke i sig selv udviser den i litteraturen beskrevne immun-stimulerende aktivitet. Under hensyntagen til endotoxin-indholdet i de anvendte proteinpræparationer kunne vi ikke identificere nogen proteiner fra mælk med immun-stimulerende aktivitet, men der sås en svag stimulerende effekt af peptider fremkommet ved proteolytisk spaltning af  $\beta$ -kasein.

Ved indgivelse af proteinet i en olieemulsion kunne endotoxin-indholdet i kommercielt tilgængeligt  $\beta$ -laktoglobulin *in vivo* påvirke det specifikke immunrespons mod  $\beta$ -laktoglobulin.

Projektet har bekræftet den tidligere beskrevne immun-supprimerende effekt af  $\kappa$ -kasein og det heraf afledte glykomakropeptid (GMP), og har yderligere påvist immun-supprimerende effekter af glykoproteinerne laktoferrin og proteose peptid 3 (PP3). Alle de immun-supprimerende proteiner er glykoproteiner der indeholder sialinsyre, som sandsynligvis spiller en rolle i immun-supprimeringen.

Samlet viser vores studier, at der fortrinsvis findes proteiner med immun-supprimerende egenskaber i mælk og at mælkekomponenter muligvis kan påvirke modningen af immunforsvaret i nyfødte/unge mus.

## Abstract

Various studies have shown that some milk proteins and peptides hereof have the capacity to affect the immune system, e.g. by stimulating or suppressing cell proliferation.

Such immune modulating activities may affect the innate immune defence against pathogens as well as the specific immune response against food proteins, e.g. food allergens. Due to the potential use of immune modulating fractions in functional food, such as sport beverages and milk formulas, studies on immune modulating effects aiming at identification of the active components and their mode of action are of interest.

This project aims at identifying components in milk, which posses immune modulating properties and, furthermore, to characterise the cellular mechanisms that are affected by the immune modulating components.

As a distinction between a reaction from the innate immune response and a specific immune response is difficult, experiments employing experimental animals are appropriate, as the animals receive a controlled diet. All standard feed contain skimmed milk powder, and therefore it was a prerequisite to breed mice on milk free feed. In this context, the immune response of the mice against milk proteins present in the feed was characterised. It was demonstrated that the milk present in the feed affects the specific immune response against  $\beta$ -lactoglobulin and  $\beta$ -casein and also to some extent the innate immune response, and, moreover, possibly affects the immune response of first generation of mice bred on milk free feed.

Another factor of importance for the result from investigations of the immune modulating effects of milk components is the endotoxin contamination of the samples under investigation. In this context, we have purified  $\beta$ -lactoglobulin from raw milk free of endotoxin and demonstrate that  $\beta$ -lactoglobulin as such does not possess any immune stimulating activity although several reports describe an immune stimulating effect of  $\beta$ -lactoglobulin. Taking the endotoxin content into account, we could not identify any milk proteins possessing immune stimulating activity,. However, a weak stimulating effect of peptides generated by proteolytic cleavage of  $\beta$ -casein was observed. By oral administration of the protein in an oil emulsion the content of endotoxin in the commercially available  $\beta$ -lactoglobulin was able to affect the specific immune response against  $\beta$ -lactoglobulin.

The project has confirmed the previously described immune suppressing effect of  $\kappa$ -casein and the glycomaclopeptide obtained upon cleavage of  $\kappa$ -casein, and we have furthermore demonstrated an immune suppressing effects of lactoferrin and PP3. All the identified immune suppressing proteins are glycoproteins containing sialic acid that probably is of importance for the immune suppressing property.

All together, our studies show that proteins possessing immune suppressing activities are present in milk, and that milk components possibly have the capacity to affect the maturations of the immune system in new born or young mice.

## Baggrund

Mælk indeholder en lang række af komponenter, der udviser mangfoldige biologiske aktiviteter, heriblandt immun-modulerende effekter. Blandt mælkeproteinerne er der i litteraturen beskrevet såvel immun-stimulerende som immun-supprimerende mælkeproteiner og –peptider.

Således er det vist at  $\beta$ -lactoglobulin,  $\beta$ -kasein og flere kaseinpeptider stimulerer både T- og B-celler, mens der for laktoferrin,  $\kappa$ -kasein og glycomakropeptidet heraf er demonstreret en hæmmende effekt.

Sådanne immun-modulerende aktiviteter kan have betydning både for det generelle immunforsvar overfor patogener og for det specifikke immunsvaret mod levnedsmiddelproteiner, for eksempel levnedsmiddelallergener. Undersøgelser af immun-modulerende effekter med henblik på en identifikation af de aktive komponenter og deres virkemåde er interessant på grund af den potentielle anvendelse af immun-stimulerende fraktioner i functional foods, såsom sportsdrikke og modernælkserstatninger.

De i litteraturen beskrevne immun-modulerende effekter af mælkeproteinerne er i de fleste tilfælde ikke særligt velunderbyggede og for at vurdere muligheden for at udnytte immunologisk aktive mælkeproteiner til fødevarer med 'added value', samtidig med at sikkerheden ved indtagelse af sådanne komponenter vurderes, er der et behov for at aktiviteten af allerede identificerede aktive proteiner og peptider karakteriseres nærmere, samt at om muligt identificere andre komponenter i mælk med immun-modulerende potentiale.

## Formål

Formålet med projektet var at dokumentere udvalgte mælkekomponenters påståede kapacitet til at stimulere eller supprimere immunologiske reaktioner.

## Resultater

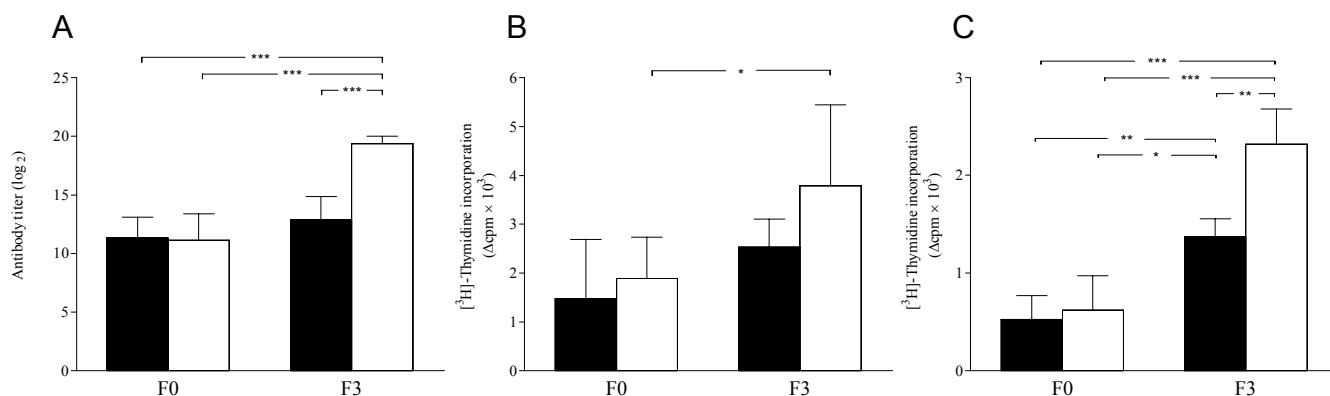
I projektet blev to faktorer, der påvirker det eksperimentelle arbejde i udtalt grad identificeret: Mælk i foderet/kosten og forurening af de anvendte proteinpræparationer har betydning for udfaldet i forbindelse med både *in vitro*- og *in vivo*-studier af mælkekomponenters immun-modulerende effekt.

### Betydningen af anvendelsen af dyr avlet på mælkefrit foder

Ved projektets begyndelse blev det erkendt, at alle standardfoderblandinger til forsøgsdyr indeholder varierende men væsentlige mængder af mælkeproteiner i form af skummetmælkspulver eller valleprotein. Det betyder, at mus, der anvendes til undersøgelse af immun-stimulerende eller –supprimerende mælkekomponenter, på forhånd er påvirket i deres immunsystem (primede) med mælkeproteiner, og resultater af forsøg med celler fra disse mus kan være vanskelige eller umulige at fortolke, idet der ikke kan skelnes mellem en antigenspecifik og en generel effekt. Mange af de effekter, der beskrives i litteraturen, er resultater af forsøg baseret på celler fra dyr fodret med standardfoder indeholdende mælk eller humane celler, hvor der ikke er taget højde for kostens potentielle indflydelse på immunresponsen.

Der blev derfor igangsat fremavl af mus, hvor standardfoderet blev udskiftet med et kommercielt tilgængeligt mælkefrit foder. I forbindelse med denne avl blev det undersøgt, om mælk i foderet gav anledning til et specifikt immunsvaret målt som et aktivt (produktivt) respons og/eller en induceret tolerance mod  $\beta$ -lactoglobulin. Forsøg i rotter med sojaprotein har vist, at et specifikt

immunrespons kan overføres fra moder til afkom. Derfor blev det i samme studium undersøgt om mælkeproteiner i kosten påvirkede immunresponsen i de efterfølgende tre generationer avlet på mælkefrit foder.



**Figur 1.** Effekten af oral indgivelse af  $\beta$ -laktoglobulin til mus (F0) avlet på standardfoder og 3. generation af mus avlet på kommercielt mælkefrit foder målt som det specifikke antistofrespons (A) og det cellulære respons (B, C).

Grupper af mus fra begge generationer fik  $\beta$ -laktoglobulin i drikkevandet (ca. 20 mg/dag, sorte søjler) i 3 dage eller almindeligt drikkevand (kontrol, hvide søjler), og alle mus blev efterfølgende immuniseret med  $\beta$ -laktoglobulin. Blodprøver blev testet for specifikke antistoffer mod  $\beta$ -laktoglobulin (A), og celler fra henholdsvis milt (B) og mesenteriale lymfeknuder (C) blev testet for specifik celleproliferation efter *in vitro*-stimulering med  $\beta$ -laktoglobulin.

Resultatet af dette 4-generationsforsøg viste, at såvel det produktive respons som det specifikt nedregulerede respons mod  $\beta$ -laktoglobulin var påvirket i de dyr, der havde fået standardfoder med mælk (F0-generationen) i forhold til 2. og 3. generation (F2 og F3). Det specifikt nedregulerede respons mod  $\beta$ -laktoglobulin var i særdeleshed påvirket, hvilket blev demonstreret ved sammenligning mellem F0- og F3-generationer, med og uden eksperimentelt induceret tolerance. For F0-generationen sås en kraftigere nedregulering af immunresponsen end for F3-mus (se Figur 1). Dette peger på at et dagligt indtag af et fødevarerprotein gennem længere tid fører til en tolerance som er mere udtalt end en eksperimentelt induceret tolerance med store mængder over få dage [1]. En lignende effekt blev observeret for  $\beta$ -kasein.

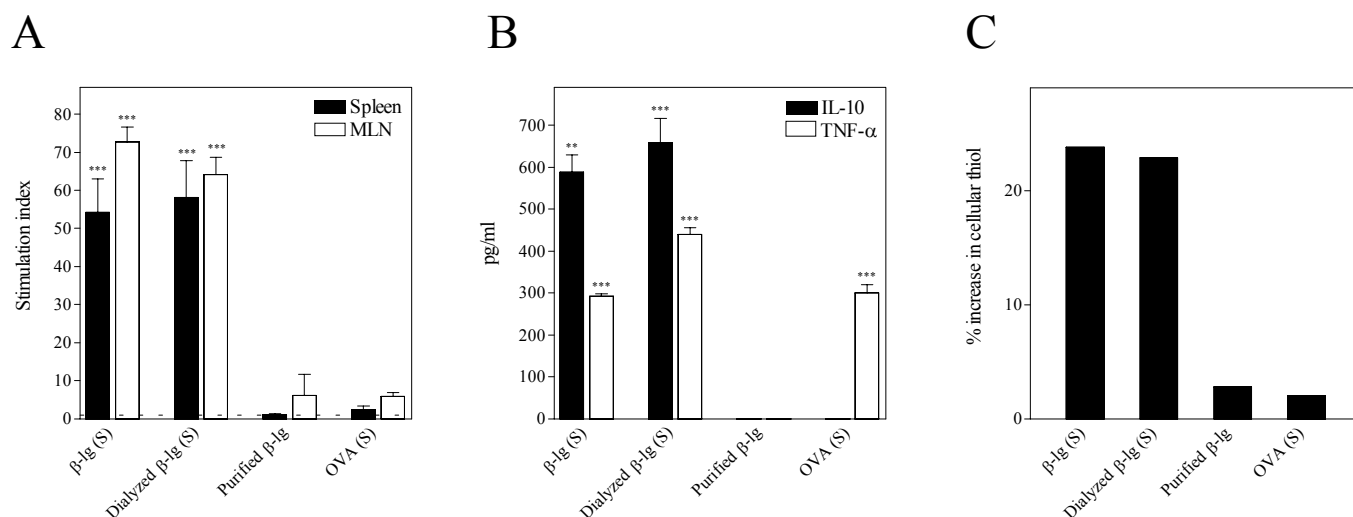
Desuden udviste første generation (F1) på mælkefrit foder et respons mod  $\beta$ -laktoglobulin, der var forskelligt fra såvel F0-generation som F2/F3-generationerne, hvilket giver baggrund for at anbefale avl af forsøgsdyr på mælkefrit foder i mindst to generationer før de anvendes til immunrelaterede undersøgelser.

En analyse af det anvendte kommercielt tilgængelige mælkefrie foder afslørede en forurening med små mængder mælkeprotein ( $\beta$ -laktoglobulin, 1  $\mu$ g/g). Denne lille koncentration i foderet påvirkede dog ikke musenes immunrespons [1].

Dette studium over avl på standardfoder versus mælkefrit foder viser tydeligt, at det specifikke immunrespons påvirkes hvis proteinerne er tilstede i foderet i en vis koncentration, og dette kan påvirke de resultater der opnås, når mælkeproteinerne generelle stimulerende eller suppresserende effekt undersøges.

## Tilstedeværelsen og betydningen af endotoxin i proteinpræparationer til celleforsøg

Ud over foderets indflydelse på de resultater, der opnås ved cellulære studier af mælkekomponenters immun-modulerende effekter, vil en endotoxin-forurening af for eksempel et oprenset mælkeprotein påvirke de opnåede resultater. Dette blev illustreret særdeles tydeligt ved at sammenligne effekten af kommercielt tilgængeligt  $\beta$ -laktoglobulin fra Sigma-Aldrich Co. med det  $\beta$ -laktoglobulin, vi selv havde oprenset fra dag-frisk mælk: Ved tilsætning til miltceller og mesenteriale lymfeknudeceller gav præparationen af  $\beta$ -laktoglobulin fra Sigma-Aldrich anledning til et kraftigt cellerespons sammenligneligt med responset efter LPS-stimulering, hvorimod  $\beta$ -laktoglobulin oprenset fra frisk mælk ikke gav anledning til et måleligt respons (se Figur 2). På samme vis gav kun  $\beta$ -laktoglobulin fra Sigma-Aldrich anledning til et øget cytokinrespons, blandt andet for interleukinerne IL-10, IL-6 og TNF- $\alpha$  (tumor nekrosis faktor), efter tilsætning til dendritiske celler. Effekten af  $\beta$ -laktoglobulin ændredes ikke ved dialyse (se Figur 2), hvilket sammen med det målte indhold af LPS (lipopolysakkarid) i de forskellige præparationer peger på, at den effekt af  $\beta$ -laktoglobulinpræparationen fra Sigma, der her ses overfor immunceller, alene skyldes forureningen med LPS [2].



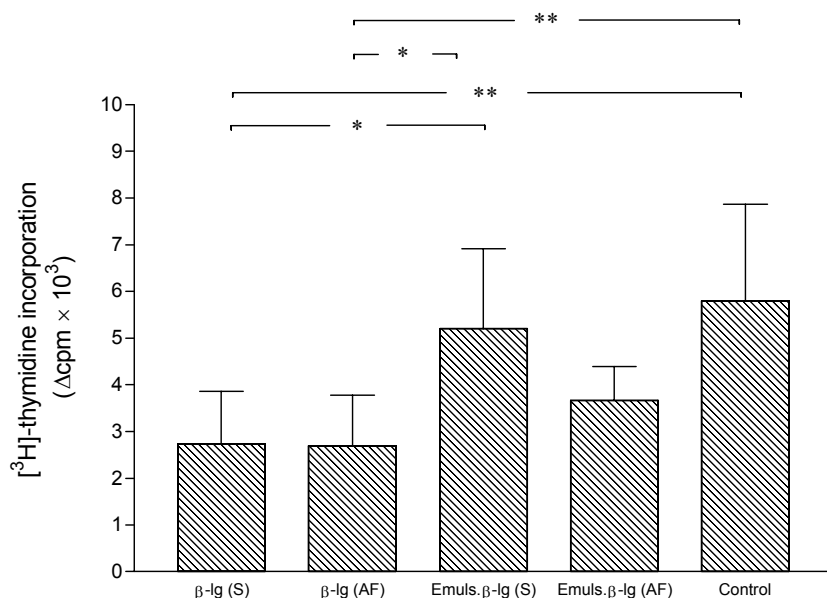
**Figur 2.**  $\beta$ -laktoglobulin oprenset fra råmælk udviser ingen immun-modulerende effekt. Celler fra milt og mesenteriale lymfeknuder fra mus avlet på mælkefrit foder blev dyrket med 1 mg/ml protein. **A** : Celleproliferation som respons på forskellige proteinpræparationer. **B**: Cytokinproduktion (IL-10 og TNF- $\alpha$ ) af miltceller, og **C**: Stigning i intracellulært glutathion (thiol).

Sammen med resultatet af vores studier af immunrespons hos mus på mælkefrit foder versus standardfoder antyder dette resultat, at resultater fra tidligere publicerede forsøg, der har vist en effekt af  $\beta$ -laktoglobulin på immunceller *in vitro* eller *ex vivo*, bør revurderes med hensyn til kilden af det anvendte  $\beta$ -laktoglobulin og de anvendte dyrs foder.

Et fodringsforsøg med forskellige præparationer af  $\beta$ -laktoglobulin viste, at LPS ikke påvirkede oralt indgivet  $\beta$ -laktoglobulins kapacitet til at inducere oral tolerance, når  $\beta$ -laktoglobulin indgives i en vandig opløsning, hvorimod LPS-forureningen forhindrede induktion af oral tolerance når  $\beta$ -laktoglobulin indgives i en vand/olie emulsion, se Figur 3 [3].

Dette *in vivo* forsøg understreger yderligere problematikken med anvendelsen af endotoxin-forurene proteiner (LPS) til eksperimentelt arbejde, og antyder tillige da absorptionen af proteiner

vides at afhænge af proteinpræparationens fysisk-kemiske egenskaber, at en *in vivo*-påvirkning af LPS afhænger af, hvorledes proteiner og LPS absorberes.



**Figur 3.** Proliferation af miltceller fra mus der oralt har fået forskellige præparationer af β-laktoglobulin eller vand (kontrol) og efterfølgende er immuniseret med rent β-laktoglobulin. En nedsat proliferation indikerer at der er induceret oral tolerance mod β-laktoglobulin, mens et proliferationsrespons på niveau med kontrollen indikerer, at der ikke er.

### Karakterisering af mælkepeptider

Med baggrund i de ovenfor beskrevne resultater kunne vi i en undersøgelse af en række mælkeproteiner ikke påvise nogen immun-stimulerende effekter af α-laktalbumin, β-laktoglobulin, laktoferrin, α-kasein, β-kasein og κ-kasein. Litteraturen beskriver imidlertid immun-stimulerende effekter af peptider fremkommet ved enzymatisk spaltning af β-kasein. Derfor undersøgte vi peptider af henholdsvis β-laktoglobulin og β-kasein fremstillet ved fordøjelse med henholdsvis pepsin og trypsin efterfulgt af pancreatin. Ved stimulering af immunceller fra milt og mesenteriale lymfeknuder sås ingen effekt af peptider fra β-laktoglobulin, mens der var en svag effekt af peptider fra β-kasein [4]. Det resterer at undersøge om en så relativt svag immun-stimulerende effekt på immunceller *in vitro* har nogen betydning *in vivo*.

### Identificering og karakterisering af immun-supprimerende mælkeproteiner

I modsætning til manglende identificering af immun-stimulerende komponenter har vores undersøgelser bekræftet litteraturens beskrivelse af κ-kasein og det heraf afledte glykomakropeptid som immun-supprimerende. Desuden har vores undersøgelser af laktoferrin og PP3 også identificeret disse peptider som værende immun-supprimerende. Undersøgelserne blev i første omgang foretaget på LPS-stimulerede miltceller, men resultaterne herfra er senere blevet bekræftet ved stimulering af dendritiske celler med proteinerne alene eller sammen med LPS og efterfølgende måling af cellernes cytokinproduktion. En del af dette arbejde er foregået inden for rammerne af et andet FØTEK-projekt under Mejeribrugets ForskningsFond, ”Sialinsyreholdige proteiner -

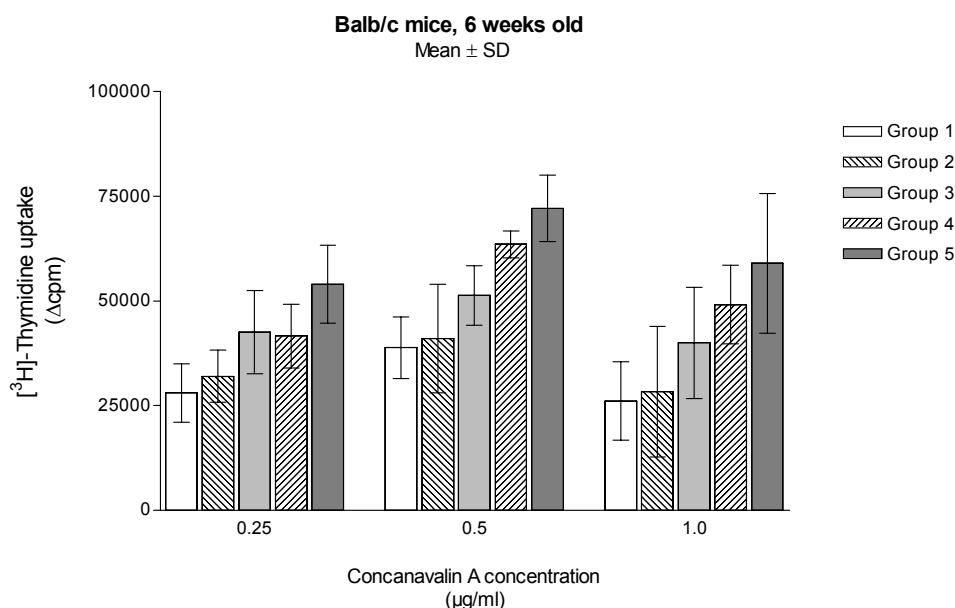


relationer mellem struktur og funktion”. Fælles for alle de mælkeproteiner, vi har kunnet måle en immun-supprimerende effekt af er, at de er glykoproteiner der indeholder kulhydratet sialinsyre. Vi mener derfor og med baggrund i litteraturen, at sialinsyredelen har betydning for den immun-supprimerende effekt. Dette undersøges nærmere i det andet ovenfor nævnte projekt.

### ***In vivo*-undersøgelser af mælks immun-modulerende effekter**

Ud over studierne af mus avlet på mælkefrit foder versus standardfoder er der foretaget tre fodringsforsøg med mælkeholdigt foder, valleproteinkoncentrat eller med  $\beta$ -laktoglobulin. I det første forsøg blev grupper af mus fodret med to forskellige mængder af  $\beta$ -laktoglobulin (fremstillet af Arla Foods amba og i praksis LPS-frit) i drikkevandet. Ved immunisering med ovalbumin og efterfølgende test for specifikt immunrespons mod ovalbumin kunne der ikke ses nogen effekt af det fodrede  $\beta$ -laktoglobulin i forhold til kontrolgrupperne, der fik enten samme mængde BSA eller rent drikkevand.

I det andet fodringsforsøg blev det undersøgt, om valleproteinkoncentrat eller mælk administreret til voksne mus i 6 uger i stedet for drikkevandet påvirkede det specifikke immunrespons mod ovalbumin. I det anvendte forsøgsdesign sås ingen effekt af hverken valleproteinkoncentrat eller mælk.



**Figur 4.** ConA-stimulering (concanavalin A) af miltceller fra afkommet af mus fodret på mælkeholdigt foder, der er overført til mælkefrit foder to uger før parring (gruppe 1), ved fødslen (gruppe 2), ved fravæning (gruppe 3), bibeholdt på mælkeholdigt foder (gruppe 4) eller holdt på mælkefrit foder gennem hele perioden (gruppe 5). ConA-stimuleringen er målt som stigningen i prolifération målt som inkorporering af (radioaktivt) tritiummærket thymidin i forhold til ustimulerede celler.

I det tredje fodringsforsøg undersøgte vi, om mælk i foderet påvirkede dels det specifikke immunrespons målt som tolerance mod  $\beta$ -laktoglobulin, dels det generelle immunrespons målt som proliferativt respons mod mitogenet concavalin A (ConA): Grupper af drægtige hunnus eller deres

afkom på mælkeholdigt standardfoder blev overført til mælkefrit foder ved parring, ved fødsel, ved afvænning eller blev holdt på mælkeholdigt standardfoder gennem hele forsøget. En gruppe fik mælkefrit foder gennem hele forsøget. To væsentlige resultater blev opnået ved forsøget: Specifik oral tolerance mod  $\beta$ -laktoglobulin blev opnået for afkom af mus fodret med mælkeholdigt foder indtil afvænning, men denne tolerance forsvandt hvis musene i en periode efter afvænning blev fodret med mælkefrit foder. Dette antyder at tolerance mod proteiner i kosten overføres via mælken til afkommet, men at denne tolerance ikke holder, hvis afkommet i den efterfølgende periode ikke udsættes for proteinet [5]. Et lignende resultat for sojaprotein har vi opnået i et andet projekt. Ved studiet af det generelle immunrespons blev det observeret, at miltceller responderede kraftigere på ConA jo længere tid musene fik mælkeholdigt foder (se Figur 4). Dette resultat skal vurderes i sammenhæng med, at vi kun har været i stand til at identificere immun-supprimerende effekter af mælkekomponenter *in vitro*.

## Konklusion

To eksperimentelle faktorer af stor betydning for det eksperimentelle arbejde vedrørende identificering og karakterisering af immun-modulerende komponenter i mælk er identificeret: Dels er mange mælkeproteinpræparationer forurenede med endotoxin, dels har et indhold af mælk i foderet/kosten betydning for de opnåede resultater. Med hensyntagen til disse to faktorer har arbejdet i dette projekt ikke kunnet bekræfte de i litteraturen beskrevne *in vitro* og *ex vivo* immunstimulerende effekter af mælkeprotein  $\beta$ -laktoglobulin.

Projektet har bekræftet den tidligere beskrevne immun-supprimerende effekt af  $\kappa$ -kasein og det heraf afledte glykomakropeptid (GMP), og har yderligere påvist immun-supprimerende effekter af glykoproteinerne laktoferrin og proteose peptid 3. Alle de immun-supprimerende proteiner er glykoproteiner med et sialinsyreindhold. De udførte fodringsforsøg antyder, at mælk i foderet kan påvirke det generelle immunrespons i afkommet.

Samlet viser vores studier, at der fortrinsvis findes proteiner med immun-supprimerende egenskaber i mælk og at disse muligvis kan påvirke modningen af immunforsvaret i nyfødte/unge mus.

## Publikationer og offentliggørelser i forbindelse med projektet

### Artikler i internationale tidsskrifter

1. S. Johansen, H.R. Christensen, V. Barkholt & H.Frøkiær (2002): Impact of maternal dietary cow's milk on the immune response to  $\beta$ -lactoglobulin in the offspring: A four generation study in mice. *Submitted to Int. Arch.Allergy Immunol.*
2. S. Johansen, L.Bovetto, R.Fritsché, V.Barkholt & H.Frøkiær (2003): Immunostimulatory potential of  $\beta$ -lactoglobulin preparations: Effects caused by endotoxin contamination. *J.Allergy Clin.Immunol. in press.*
3. S. Johansen, T.M.R.Kjær, V. Barkholt & H.Frøkiær (2003): LPS contamination co-administered with antigen orally or intraperitoneally affects the immune response against the antigen. *Manuscript (short communication) to be submitted to Int. Arch. Allergy Immunol.*
4. S. Johansen, O.H.Magyar, V. Barkholt & H.Frøkiær (2003): Immunostimulatory potential of bovine milk proeins: Milk in the diet affects bovine milk protein-induced *in vitro* proliferation of immune cells. *Manuscript submitted to J.Dairy Res.*

5. S. Johansen, H.R. Christensen, V. Barkholt & H. Frøkiær (2003): Maintenance of maternally-induced tolerance to  $\beta$ -lactoglobulin in adult mice is retained only when cow's milk protein is present in the diet provided after weaning. *Manuscript to be submitted to Scand. J. Immunol.*

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

Analysis of immunomodulating capacity of peptides from bovine  $\beta$ -casein. S. Johansen, V. Barkholt og H. Frøkiær, Milk Protein Conference, Vinstra, Norge, 30. maj – 2. april 2000 (oral).

Abolishment of maternally induced oral tolerance to  $\beta$ -lactoglobulin in adult mice by feeding a milk-free diet from weaning. S. Johansen, H.R. Christensen, V. Barkholt og Frøkiær, H., levnedsmiddelkongres, 2001- Kvalitet fra jord til bord. KVL (poster).

Transfer of tolerance to  $\beta$ -lactoglobulin from mothers to offspring: A four generation study in mice. S. Johansen, H.R. Christensen, V. Barkholt og H. Frøkiær, levnedsmiddelkongres, 2001- Kvalitet fra jord til bord. KVL (poster).

Abolishment of maternally induced oral tolerance to  $\beta$ -lactoglobulin in adult mice by feeding a milk-free diet from weaning. S. Johansen, H.R. Christensen, V. Barkholt og Frøkiær, H., 8<sup>th</sup> International symposium on immunological, chemical and clinical problems of food allergy, Venedig, Italien, 11-13. marts 2001 (oral).

Transfer of tolerance to  $\beta$ -lactoglobulin from mothers to offspring: A four generation study in mice. S. Johansen, H.R. Christensen, V. Barkholt og H. Frøkiær, 8<sup>th</sup> International symposium on immunological, chemical and clinical problems of food allergy, Venedig, Italien, 11-13. marts 2001 (poster).

Immunomodulatory effects induced by endotoxin present in some commercial  $\beta$ -lactoglobulin preparations: S. Johansen, L. Bovetto, R. Fritsche, V. Barkholt og H. Frøkiær, 2<sup>nd</sup> EACCI Davos Meeting in Basic Immunology on Allergy and Clinical Immunology, Davos, Schweiz, 30. januar – 2. februar 2003 (poster).

### **Faglige artikler:**

Johansen, S., Barkholt, V. and Frøkiær, H., 2000: Kan mælkeproteiner styrke vores immunforsvar? (Danish), *Mælkeritidende*, 13/14: 364-366.

### **Mødeindlæg:**

Characterisation of immunomodulating components in milk, S. Johansen, Födoämnesallergi nätverk, The Swedish Institute for Food and Biotechnology, Lund, Sverige, 23. november 2000.

### **Forskeruddannelse**

Projektet har inkluderet et ph.d. studium udført af civilingeniør Susanne Johansen. I forbindelse med det i ph.d.-studiet indlagte eksterne ophold har Susanne Johansen arbejdet i Nestlé's forskningslaboratorier i Lausanne, Schweiz, oktober 2001 til januar 2003.

## **Samarbejdsrelationer**

Nationalt har gruppen i dette projekt samarbejdet med Esben Skipper Sørensen m.fl. fra Laboratorium for Proteinkemi på Århus Universitet med hensyn til immun-modulerende effekter af blandt andet laktoferrin og PP3. Gitte Sørensen med flere fra Arla Foods amba har leveret oprenset  $\beta$ -laktoglobulin, valleproteinkoncentrat m.m. og Charlotte Madsen med flere fra Fødevarerdirektoratet med hensyn til dyremodeller.

Internationalt har gruppen samarbejdsrelationer til Dr. R. Fritsché og Dr. L. Bovetto, Nestlé Research Centre, Lausanne, Schweiz; Franco Bonomi og S. Iametti, University of Milano, Italien og T. Eiwegger, Universitätsklinik für Kinder und Jugendheilkunde, Wien, Østrig.

## **Resultaternes praktiske og videnskabelige betydning.**

Der er i projektet etableret en række metoder, der kan anvendes til studier af immun-modulerende komponenter i mælk, og to faktorer af stor betydning for fortolkning af resultater opnået i denne forbindelse er identificeret: Tilstedeværelsen af mælk i kosten eller foderet hos forsøgsdyr og den potentielle endotoxin-forurening af proteinpræparationer anvendt til eksperimentelt arbejde. På baggrund af disse resultater må vi konkludere, at vi ikke har kunnet identificere mælkekomponenter med et stort immun-stimulerende potentiale.

Fodringsforsøg med drægtige mus viser imidlertid at jo længere tid musene fik mælkeholdigt foder, des kraftigere responderede miltceller fra afkommet på mitogenstimulering med ConA. Hvilke komponenter der forårsager denne ændrede modningsprofil i immuncellerne hos mus er ikke afklaret, men kan være af både praktisk og videnskabelig interesse.

Via de anvendte metoder har vi påvist immun-supprimerende effekter af en række sialinsyreholdige glykoproteiner fra mælk, men det er stadig muligt, at der er flere proteiner med denne effekt. Hvorvidt effekten skyldes sialinsyreindholdet skal undersøges nærmere.

Til sidst skal nævnes, at projektet har demonstreret betydningen af fedt, emulsioner og endotoxiner for immunresponsen mod oralt indgivet protein. Dette aspekt i forhold til blandt andet fødevarerallergi er nyt og problematikken kan være kritisk i forbindelse med produktion af mælkeprodukter, såvel traditionelle som nye funktionelle fødevarer.

## **Projektrelationer til andre/nye projekter.**

Projektet videreføres delvist i MFF-samarbejdsprojektet 'Sialinsyreholdige mælkeproteiner - relationer mellem struktur og funktion', hvor metoderne anvendes til at se på immun-supprimerende effekter af glykoproteiner i mælk.

En del af den i projektet opnåede viden og de udviklede metoder anvendes til at se på immun-modulerende effekter af en gruppe af phospholipider i mælk betegnet gangliosider i MFF-samarbejdsprojektet 'Gangliosider fra vallefedt: Potentiale som sundhedsgavnige komponenter i modernælkserstatning'.

Ligeledes danner visse af metoderne og den opnåede viden basis for BioCentrum-DTU's del af MFF-samarbejdsprojektet 'Probiotiske bakterier: belysning af interaktioner med det cellulære immunsystem, stimulering af termepitelets forsvarsmekanismer og gavnlige indvirkning på spædbørns immun-status, tarmslimhinde og dermed sundhed', som udføres i samarbejde med Mogens Jacobsen fra Mejeri og Levnedsmiddelinstituttet og Kim Fleischer Michaelsen fra Institut for Human Ernæring, begge KVL.

Desuden samarbejder vi med Christian Heegaard, Jan Trige Rasmussen og Esben Skipper Sørensen med hensyn til afprøvning af vores metoder på immun-modulerende effekter af osteopontin og andre mælkeproteiner.

