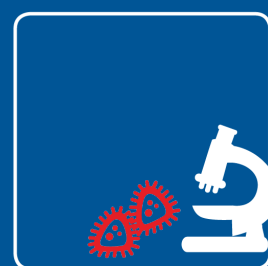


Esben Skipper Sørensen:
Fordøjelse og optag af sundhedsgavnige
mælkeproteiner

Digestion and absorption of health beneficial milk
proteins



Slutrapport

for samarbejdsprojekter under Mejeribrugets ForskningsFond (MFF)

1. Projektets titel

Dansk: Fordøjelse og optag af sundhedsgavnige mælkeproteiner

English: Digestion and absorption of health beneficial milk proteins

2. Projektleder

Professor Esben Skipper Sørensen, Institut for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet, Gustav Wieds Vej 10, 8000 Aarhus C. Tlf. 87 15 54 61 E-mail: ess@mbg.au.dk

3. Øvrige medarbejdere

Brian Christensen (bc@mbg.au.dk), Institut for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet.

Jan J. Enghild (jje@mbg.au.dk), Institut for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet

Annette Müllertz (Anette.Mullertz@sund.ku.dk), Farmakologisk Institut, Københavns Universitet

Albert J. Buitenhuis (bart.buitenhuis@qgg.au.dk), Center for Quantitative Genetics and Genomics, Aarhus Universitet

Marie Stampe Ostenfeld (marie.stampe.ostenfeld@arlafoods.com), Arla Food Ingredients

Lotte N. Jacobsen (lotte.neergaard.jacobsen@arlafoods.com), Arla Foods Ingredients

4. Finansieringskilder

Mælkeafgiftsfonden: 2.076 tkr.

Institut for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet: 1.152 tkr.

Farmakologisk institut, Københavns Universitet: 300 tkr.

Arla Foods Ingredients: 475 tkr.

5. Projektperiode

Projektperiode med MFF-finansiering: 01/2018 - 12/2019

6. Projektresume

Dansk sammendrag:

Mælk indeholder mange 'bioaktive' proteinkomponenter, hvis sundhedsgavnige egenskaber er dokumenteret i kliniske forsøg. De bagvedliggende mekanismer for disse positive egenskaber er kun i meget ringe grad belyst. I dette projekt undersøger vi med modelsystemer hvorledes de sundhedsgavnige mælkeproteiner, osteopontin (OPN), kaseinomakropeptid (CGMP) og alfa-laktalbumin, fordøjes i mave-tarm-systemet. Herefter undersøges, hvorledes de fordøjede proteiner påvirker tarmceller, og om dele af de fordøjede proteiner kan passere en model af tarmvæggen og potentielt finde vej ind i blodbanen.

I fordøjelsesmodellerne anvendte vi de fordøjelsesenzymer, syrer og baser, som et mælkeprotein møder gennem menneskets mave-tarm-system. Det blev påvist at større fragmenter af alle tre proteiner med potentiale for biologisk aktivitet 'overlevede' fordøjelsen og derved potentielt kan mediere gavnlige effekter i tarmens slimhinde eller måske transporteres over denne til blodbanen. I projektet påviste vi, at påhæftede kulhydrater på osteopontin beskyttede mod fordøjelse i mavesækken, hvorimod kulhydraterne på CGMP ikke havde samme beskyttende effekt. Specielt observerede vi, at et område i osteopontin, som er vigtigt for proteinets evne til at kommunikere med tarmceller, blev beskyttet mod fordøjelse af kulhydratgrupperne.

Efter de simulerede fordøjelser blev proteinerne undersøgt i en tarmcellemodel, baseret på celler fra menneskets tarm. Her undersøges, om peptiderne påvirker fx tætheden af tarmcellemodellen eller væksten af tarmens celler. Der blev observeret tendenser til, at fordøjet CGMP kan forbedre tætheden og integriteten af den udviklende tarmbarriere, samt havde en forbedrende virkning på en tarmbarriere, der var udsat for proinflammatoriske signalstoffer, som er en model for en betændelsestilstand i tarmen.

Vi undersøgte desuden hvilke gener, der påvirkes i tarmcellerne efter inkubation med de forskellige fordøjede mælkeproteiner i en såkaldt genekspressionsanalyse. OPN havde en signifikant indflydelse på genudtrykket i tarmcellerne, i det ca. 500 gener var udtrykt forskelligt mellem ubehandlede celler og celler behandlet med fordøjet osteopontin, hvorimod CGMP og alfa-laktalbumin ikke påvirkede cellerne. Dette kan give oplysninger om, hvilke biologiske processer, så som fx immunologiske processer eller vækstprocesser, som osteopontin påvirker i tarmen.

I projektet har vi påvist, at større fragmenter af osteopontin, dannet i fordøjelsesmodellerne af mave-tarm systemet eller naturligt tilstede i komælk, kunne transporteres over tarmmodellen, således at de kunne genfindes på den side, der repræsenterer blodbanen. Derved kan bioaktivt osteopontin potentielt påvirke fysiologiske processer rundt omkring i kroppen. Osteopontin krydsede tarmmodellen via optag over tarmcellens indre, en proces kaldet transcytose. Desuden kunne osteopontin detekteres i plasma fra nyfødte grise, der blev fodret med proteinet. Derimod kunne osteopontin ikke detekteres i blodet fra 5 dage gamle grise fodret med osteopontin.

I projektet er der genereret dokumentation for, hvorledes proteinkomponenterne OPN og CGMP fordøjes, og hvorledes de dannede peptider påvirker tarmens celler og potentielt optages over tarmen. Denne viden kan benyttes i dokumentation af, hvorledes bioaktive mælkeproteiner kan have gavnlige fysiologiske effekter.

English summary:

Milk contains many 'bioactive' protein components, the health beneficial properties of which have been documented in clinical trials. The underlying mechanisms of these positive properties are not well described. In this project, we investigate in model systems how the health-beneficial milk proteins osteopontin, CGMP and alpha-lactalbumin, are digested in the gastrointestinal system. Next, it is investigated how the digested proteins affect intestinal cells and whether parts of the digested proteins can pass a model of the intestinal wall and potentially find pass into the bloodstream.

In the digestive models, we used the digestive enzymes, acids, and bases that a milk protein encounters through the human gastrointestinal system. It was shown that larger fragments of all three proteins with potential for biological activity 'survived' digestion and thus could potentially mediate beneficial effects in the intestinal mucosa or perhaps be transported across it to the bloodstream. In the project, we demonstrated that attached carbohydrates on osteopontin protected the protein against digestion in the stomach, whereas there was no protective effect of the carbohydrates decorating CGMP. In particular, we observed that an area of osteopontin, which is important for the protein's ability to communicate with intestinal cells, was protected from digestion by the carbohydrate moieties.

After the simulated digestions, the proteins were examined in an intestinal cell model, based on cells from the human intestine. Here, it is investigated whether the peptides affect, for example, the tightness of the intestinal cell model or the growth of the intestinal cells. Trends were observed that digested CGMP can improve the density and integrity of the developing intestinal barrier, as well as had an improving effect on an intestinal barrier exposed to proinflammatory neurotransmitters, which is a model for an inflammatory condition of the intestine.

We also investigated which genes are affected in the intestinal cells after incubation with the various digested milk proteins in a so-called gene expression analysis. Osteopontin had a significant influence on the gene expression in the intestinal cells, and approx. 500 genes were expressed differently between untreated cells and cells treated with digested osteopontin, whereas CGMP and alpha-lactalbumin did not significantly affect the gene expression in the cells. This can provide information about which biological processes, such as immunological processes or growth processes, that osteopontin affects in the intestine.

In the project, we have shown that larger fragments of osteopontin, formed in the digestive models of the gastrointestinal system or naturally present in cow's milk, could be transported over the intestinal model so that they could be found on the side representing the bloodstream. Thereby, bioactive osteopontin can potentially affect physiological processes systemically in the body. Osteopontin crossed the intestinal model via uptake over the interior of the intestinal cell, a process called transcytosis. In addition, osteopontin could be detected in plasma from newborn pigs fed the protein. In contrast, osteopontin could not be detected in the blood of 5-day-old pigs fed osteopontin.

In the project, documentation has been generated for how the protein components OPN and CGMP are digested and how the peptides formed affect the intestinal cells and are potentially absorbed via the intestine. This knowledge can be used in documentation of how bioactive milk proteins can have beneficial physiological effects.

7. Projektets formål

Dansk: Projektets formål er at undersøge og dokumentere, hvorledes de sundhedsgavnige mælkeprotein-komponenter, osteopontin, kaseinomakropeptid (CGMP) og alfa-laktalbumin, fordøjes, og hvorledes de dannede peptider indvirker på tarmceller, optages over tarmen og derefter fordeler sig i blod, væv og organer i en dyremodel.

English: The purpose of the project is to investigate and document how the health beneficial milk proteins, osteopontin, caseinoglycomacropeptide (CGMP) and alpha-lactalbumin, are digested and how the resulting peptides influence on intestinal cells, how they are absorbed through the gut and how they are distributed in the blood and among the tissues and organs in an animal model.

8. Projektets baggrund

Mælk indeholder en række proteiner, der udover at have en rent næringsmæssig funktion som leverandør af aminosyrer, også besidder vigtige biologiske funktioner. Flere 'bioaktive' og sundhedsgavnlige proteiner kan i dag oprenses til stor renhed fra sidestrømme i moderne mejeriproduktion. Fx kan osteopontin og CGMP oprenses til >95% renhed i patenterede processer. Disse komponenter er sammen med alfa-laktalbumin vigtige proteinkomponenter, der allerede anvendes i, eller har potentiale til at indgå i, sundsgavnlige produkter. Dette giver dansk mejeribrug en unik position i forhold til internationale konkurrenter inden for udvikling og markedsføring af mælkebaserede produkter med sundhedsgavnlige egenskaber.

De helbredsgavnlige effekter af CGMP, alfa-laktalbumin og osteopontin er beskrevet i flere humane kliniske studier. De bagvedliggende mekanismer bag disse effekter er dog meget uklare. Forståelsen af, hvorledes disse komponenter virker fysiologisk, herunder hvorledes de fordøjes, i hvilken form de optages, og hvilke processer, de dannede peptider indvirker på, er grundlæggende for at udvikle produkter baseret på disse bioaktive mælkeproteiner.

Osteopontin er et bioaktivt protein, der findes i de fleste væv og fysiologiske væsker, men langt den højeste koncentration findes i mælk (Christensen and Sørensen, 2016). Osteopontin er involveret i mange vigtige processer fra knoglemineralisering til regulering og aktivering af immunprocesser, regenerering af muskelskader og sårheling. Fra et mælkeperspektiv er osteopontin specielt interessant, da der er involveret i tarmens udvikling og funktion hos spædbørn. For nyligt er der gennemført et dobbelt-blindet, randomiseret interventionsforsøg, som viste, at børn der fik infant formula (IF) med tilsat osteopontin havde færre feberdage og lavere indhold af den inflammatoriske markør TNF-a i blodet end kontrolgruppen der fik IF uden tilsat osteopontin (Lønnerdal et al., 2016). Et lignende forsøg med rhesusaber viste, at aber, der fik IF med osteopontin, havde en genekspressionsprofil i tarmvævet, der var signifikant mere lig profilen fra aber der fik mælk fra moderen, end profilen fra aber der fik IF uden tilsat osteopontin (Donovan et al., 2014). Der er således god klinisk evidens for, at indtag af osteopontin har en positiv effekt på tarmens funktion, men mekanismen bag dette er ikke kendt.

CGMP er et peptid på 64 aminosyrer, der frigives fra kappa-kasein under osteproduktion. Sød valle indeholder relativt store mængder CGMP (1,2-1,5 g/L), som oprenses rent hos Arla Foods Ingredients. CGMP har vist en gavnlig effekt i dyremodeller på tarminflammation. Studier antyder, at den gavnlige effekt af CGMP kan være en prebiotisk mekanisme (hvor gavnlige bakterier i tarmen vokser bedre), en forbedring af barrieren i tarmvæggen, og/eller en gavnlig effekt på inflammationstilstanden i hele kroppen (Robitaille and Champagne, 2014; Sawin et al., 2015). Dansk mejeriindustri har en interesse i at forstå, hvordan mejeriprodukter og specifikt oprensede proteiner kan gavne fordøjelsesubehag og deciderede tarmsygdomme. Mejeriindustrien har været involveret i kliniske forsøg, som viste, at CGMP havde en lige så gavnlig effekt som øgning af medicindosis ved tarmsygdommen Ulcerativ Colitis (Hvas et al., 2016) og forbedrede det fordøjelsesubehag, som ellers ses hos patienter med Følings syge (PKU) (Daly et al., 2017). Mekanismerne bag, hvordan CGMP fordøjes, påvirker tarmvæggen, og om det eventuelt optages i blodbanen, er ukendte. Den viden som generes i projektet kan potentielt bruges som en vigtig parameter i forretningsudviklingen af CGMP i en sund fordøjelse.

Alfa-laktalbumin udgør 25-35% af det totale proteinindhold i human mælk og den bovine form er derfor en meget vigtig komponent i IF. Mange kliniske studier har vist gavnlige effekter af alfa-laktalbumin i spædbørnsernæring (Lønnerdal, 2013). Blandt disse effekter kan nævnes, at alfa-laktalbumin reducerer fordøjelsesproblemer, såsom forstoppelse, reflux og opgylp (Davis et al., 2008). Desuden er der set en øgning af bifidobakterier ved tilstedeværelse af alfa-laktalbumin, samt forebyggelse af E. Coli-induceret diarré i et studie på rhesusaber (Brück et al., 2003). Viden om fordøjelsen af alfa-laktalbumin, samt den følgende genekspression de dannede peptider inducerer i tarmceller, er vigtig for forståelsen af proteints sundhedsgavnlige effekter.

9. Projektets delaktiviteter i hele projektperioden

Fase 1: Fordøjelse af de sundhedsgavnige mælkeproteiner osteopontin, CGMP og alfa-laktalbumin.

Fase 2: Karakterisering af dannede peptider og fragmenter.

Fase 3: Peptidernes effekt på tarmceller (Caco2 celler).

Fase 4: Transport over *in vitro* tarm-celle-barriere.

Fase 5: *In vivo* optag af peptider og fragmenter.

Tidsplan (X=1 måned):

| | 2018 | 2019 |
|--------|------------|-------------|
| Fase 1 | xxx | xxx |
| Fase 2 | xxxxxxxxxx | |
| Fase 3 | xxxxxxx | xxxxxxxxxxx |
| Fase 4 | xxx | xxxxxxxxxxx |
| Fase 5 | | xxxx |

10. Afvigelser

Det blev tidligt i projektet besluttet i følgegruppen at prioritere indsatsen på komponenterne osteopontin og CGMP, der blev således ikke foretaget lige så mange analyser på alfa-laktalbumin (som tidligt viste sig ikke at have målbare effekter).

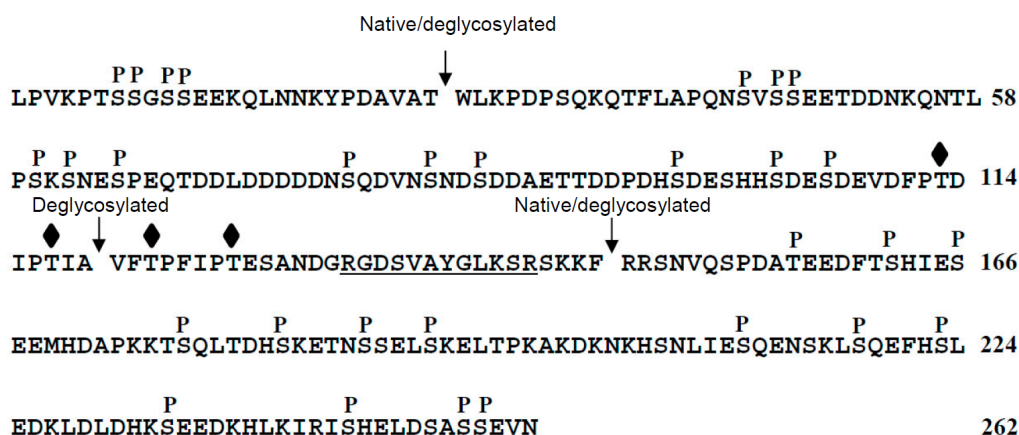
Der er ikke lavet analyser af optaget af CGMP i en dyremodel (Fase 5). Det blev vurderet umuligt at identificere CGMP eller peptider heraf, som evt. kunne transporteres over tarmbarrieren i en dyremodel vha. massespektrometri. Vi havde gode antistoffer mod OPN, som muliggjorde en identifikation af proteinet i griseplasma. Vi fik produceret antistoffer mod bovin CGMP, men disse viste sig ikke at være brugbare, da de var for uspecifikke.

11. Projektets resultater

Fase 1+2 fordøjelse og karakterisering af CGMP og osteopontin

CGMP

CGMP blev separeret via RP-HPLC, og fraktionerne blev analyseret via massespektrometri og SDS-PAGE, som blev PAS-farvet (farver proteiner der indeholder kulhydrat) (data ikke vist). Separationen af glykosyleret fra ikke-glykosyleret CGMP muliggjorde undersøgelser af glykosyleringernes indflydelse på fordøjelsen af CGMP. Glykosyleret og ikke-glykosyleret CGMP blev inkuberet med pepsin (1:50 w/w) ved pH 2,5 for at simulere den gastriske fordøjelse, og derefter med trypsin, chymotrypsin and elastase ved neutralt pH for at simulere den efterfølgende intestinale fordøjelse. De resulterende peptidfragmenter blev efterfølgende analyseret ved SDS-PAGE, RP-HPLC og massespektrometri (ikke vist). De identificerede kløvningssites er vist i Figur 1, som viser, at glykosyleringerne har indvirkning på fordøjelsen.



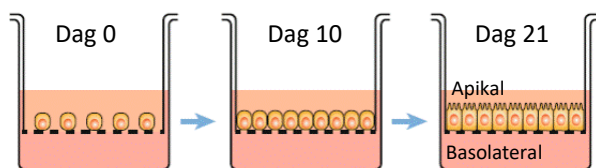
Figur 3. Identificerede kløvningsites efter gastrisk fordøjelse (pepsin) af nativt og deglykosyleret osteopontin.

Fase 1+2: Opsummering

CGMP og osteopontin bliver delvist nedbrudt i *in vitro* fordøjelsesmodellerne. CGMP blev adskilt i en glykosyleret og ikke-glykosyleret form, som blev fordøjet forskelligt. Glykosylering af osteopontin beskytter proteinet mod fordøjelse, og bevirker, at det når tarmen i en aktiv form, som indeholder dets cellebindende motiver, dvs. specielle sekvenser af aminosyrer, som er markeret med understregning i Figur 3.

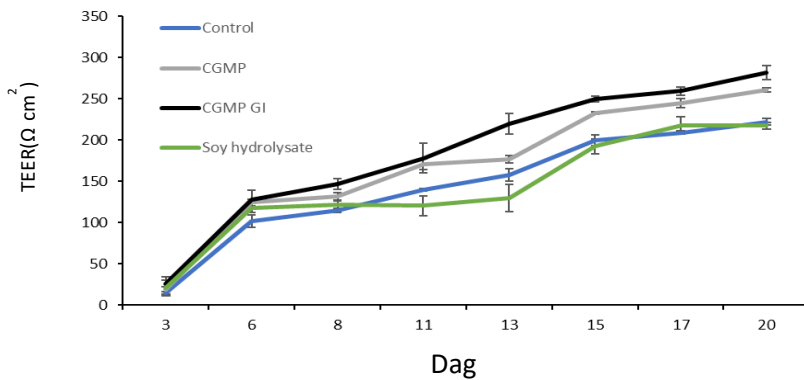
Fase 3: Peptidernes effekt på tarmceller (Caco2 celler)

I fase 3 (og fase 4) benyttede vi Caco-2 celler, som model for tarmbarrieren. Cellerne blev udsået i transwell inserts (Figur 4) og dyrket i 21 dage, til de danner et sammenflydende lag af polariserede celler, der har strukturelle og funktionelle egenskaber som modne tarmceller i tarmen.



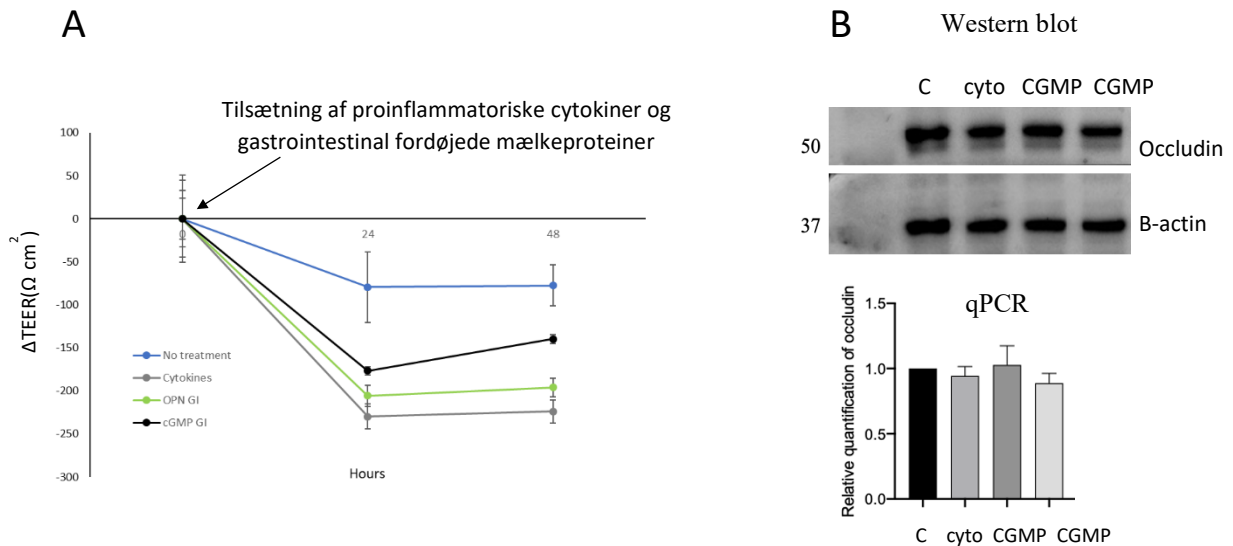
Figur 4. På figuren ses den benyttede *in vitro* model for tarmbarrieren bestående af Caco-2 celler, som er en human tarmcellelinje, der dyrkes i et såkaldt transwell filtersystem. På filtret dyrkes cellerne (på den apikale side, svarende til tarm-lumen) til de vokser sammen til en tæt membran og udvikler sig på tarmlignende måde med micovilli på tarmsiden. Under cellerne er det basolaterale kammer svarende til 'blod-siden'.

Effekten af ufordøjet CGMP og gastrointestinal-fordøjet CGMP på modningen af den voksende tarmcellebarriere blev undersøgt i denne fase. Caco-2-celler blev udsået i det apikale kammer i modellen (Figur 4) og blev dyrket i tilstedeværelsen af CGMP eller sojaproteinhydrolysat (negativ kontrol) i 21 dage, i serumfrit medium indeholdende insulin-transferrin-selen for at undersøge, om de forskellige behandlinger ændrede tarmcellemodellens permeabilitet. Udviklingen af tarmbarrieren blev fulgt ved at måle den elektriske modstand over membranen (TEER-værdi) hver 2-3 dag (Figur 5). En stigende TEER-værdi er en indikation af, at membranen udvikler sig som det ses i tarmen.



Figur 5. På figuren ses at tilstedeværelse af CGMP, og især gastrointestinal fordøjet CGMP har en positiv indflydelse på tætheden af en modnende tarmbarriere.

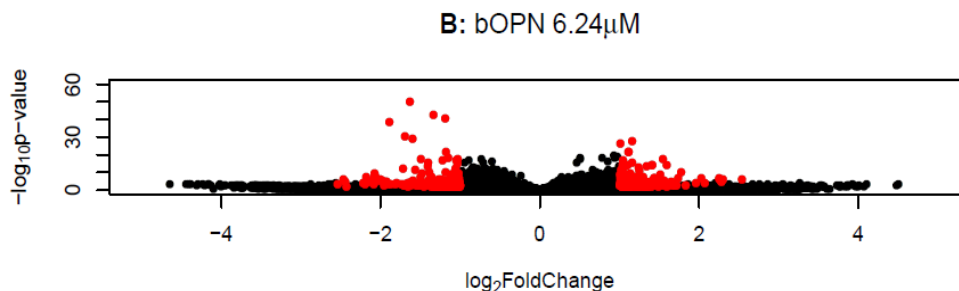
For at teste, om mælkeproteinerne påvirker inflammation, har vi modelleret en tarminflammation ved tilsætning af de inflammatoriske cytokiner IL-1 β , TNF- α , interferon- γ og LPS til Caco-2-cellemodellen. I denne model mindskede CGMP den inducerede inflammation (Figur 6A). Dette indikerer en positive effekt af CGMP på f.eks. inflammatoriske tarmsygdomme. Vi undersøgte desuden, om fordøjet CGMP havde en indflydelse på udtrykket af forskellige tight-junction proteiner såsom occludin, claudin-1 og claudin-2 (det er disse proteiner, der holder tarmcellerne sammen i tarmcellebarrieren), ved western blots og qPCR, 48 timer efter cellerne var behandlet med de pro-inflammatoriske cytokiner. Hverken i western blots eller qPCR blev der observeret en effekt af CGMP på udtrykket af occludin (Figur 6B). Lignende resultater blev observeret for claudin-1 og -2 (data ikke vist).



Figur 6. (A) Gastrointestinal-fordøjet CGMP (sort), men ikke osteopontin (OPN), nedsætter inflammation induceret af proinflammatoriske cytokiner i modellen for tarmbarrieren, da TEER-værdien stiger og nærmer sig kontrollen uden behandling med pro-inflammatoriske cytokiner. (B) Fordøjet CGMP påvirkede ikke udtrykket af tight-junction proteinet occludin i forhold til kontrol celler (C) eller Caco-2 celler behandlet med pro-inflammatoriske cytokiner (cyto).

Det blev desuden undersøgt hvordan gastrointestinal-fordøjet osteopontin påvirkede genudtrykket af differentierede Caco-2 celler ved RNA-sekventering. I alt 489 gener var forskelligt udtrykt mellem Caco-2 celler inkuberet med eller

uden osteopontin (Figur 7). De mest signifikante gener var NEAT1 (nuclear paraspeckle assembly transcript 1), SLC38A2 (solute carrier family 38, member 2), SOX9-AS1 (cytochrome b561), ILF2 (interleukin enhancer binding factor 2), VPS29 (vacuolar protein sorting 29 homolog (*S. cerevisiae*)), MIR22HG (kelch-like family member 36), og HSPE1 (heat shock 10kDa protein 1). CGMP og alfa-laktalbumin havde ingen indflydelse på gendtrykket i Caco-2 celler (data ikke vist).



Figur 7. Vulcano plot der viser differentielle udtrykte gener mellem ubehandlede Caco-2-celler og celler behandlet med fordøjet osteopontin. Y-aksen svarer til den negative log for p-værdien, og x-aksen viser log 2-fold ændringsværdien. Positive x-værdier repræsenterer opregulering og negative x-værdier repræsenterer nedregulering.

Fase 3: Opsummering

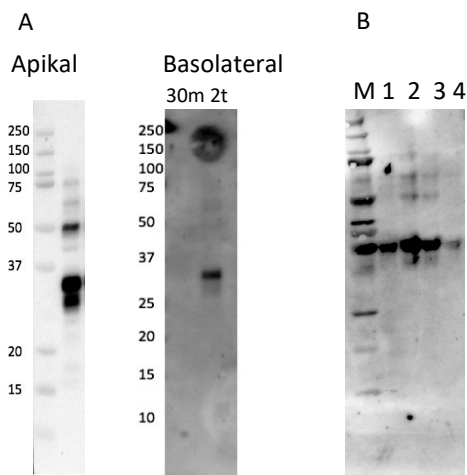
Fordøjet CGMP har en positiv effekt på tætheden af en modnende Caco-2 cellemodel for tarmbarrieren. Fordøjet CGMP kan muligvis modvirke inflammation i tarmen; dog ikke ved at påvirke udtrykket af tight-junction proteinerne occludin eller claudin-1 og -2. Fordøjet osteopontin havde en stor indflydelse på gendtrykket i differentierede Caco-2 celler.

Fase 4: Transport over *in vitro* tarm-celle-barriere

For at undersøge hvorvidt osteopontin kan transporteres over modellen af tarmbarrieren (Figur 4), tilsættes osteopontin i det øverste kammer (apikale kammer som repræsenterer den intestinale lumen) af tarmcellemodellen. Efter 2 timer undersøges transporten ved at analysere mediet i det nederste kammer (basolaterale kammer der repræsenterer blod-siden) for tilstedeværelse af osteopontin via western blotting (Figur 8). I det apikale kammer blev både fuld-længde og N-terminale fragmenter af osteopontin observeret, men kun fragmenterne (30 kDa), var tilstede i det basolaterale medium efter 2 timer, men ikke efter 30 minutter (figur 8). Tilsvarende kunne human mælke-osteopontin og gastrisk-fordøjet osteopontin også transporteres over modellen af tarmen (data ikke vist). I et kontrol eksperiment blev et andet mælkeprotein, PP3, ikke detekteret i det basolaterale medium efter 2 timer (data ikke vist). For at undersøge transportmekanismen blev effekten af forskellige inhibitorer evalueret (figur 8B). Baseret på intensitet i western blotting blev optagelsen ikke påvirket af Gly-Sar (inhibitor af peptidtransporter PepT1) eller af cytochalasin D (svækker tight junctions). Tilstedeværelsen af transcytose inhibitoren, wortmannin, hæmmede derimod transporten af OPN.

Fase 4: Opsummering

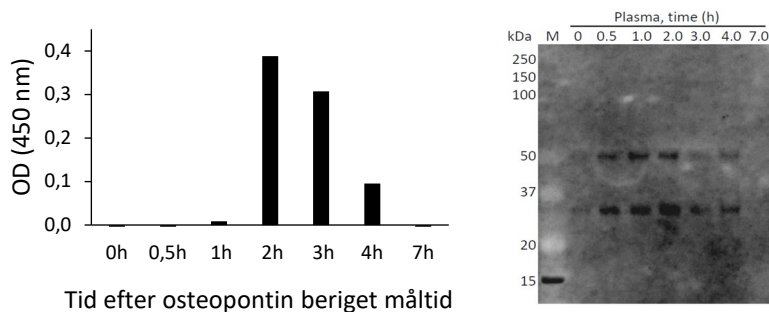
N-terminale fragmenter af osteopontin, samt gastrisk fordøjet osteopontin, kan aktivt transporteres over tarmmodellen via transcytose.



Figur 8. (A) Western blotting analyse af osteopontin transport fra apikal til basolateral side i Caco-2 cellemodellen af tarmbarrieren. (B) Inhibering af transporten med kontrol celler uden inhibitor (lane 1), Gly-Sar (lane 2), cytochalasin D (lane 3) og wortmannin (lane 4).

Fase 5: *In vivo* optag af peptider og fragmenter

For tidligt fødte grise blev fodret med kolostrum beriget med osteopontin fra komælk som deres første måltid. Efter forskellige tider blev der udtaget plasmaprøver, som vi analyserede for indhold af bovin osteopontin via ELISA og western blotting (Figur 9). Bovint osteopontin blev detekteret i plasmaet af nyfødte grise via både ELISA og western blotting 1t-4t efter måltidet, og efter 7t kunne osteopontin ikke detekteres. Til gengæld kunne osteopontin ikke detekteres i grise, der var 5 dage gamle efter et måltid beriget med osteopontin (data ikke vist). Kontrolforsøg viste, at de anvendte antistoffer specifikt genkendte bovin osteopontin og ikke endogent osteopontin i grisen (data ikke vist).



Figur 9. Detektion af OPN i plasmaprøver. (A) ELISA og (B) western blotting. For tidligt fødte grise blev fodret med råmælk beriget med bovin OPN, og plasma blev opsamlet ved forskellige tidspunkter efter indtagelse.

Fase 5: Opsummering

Bovin osteopontin indtaget i kosten kan sandsynligvis modstå gastrointestinal fordøjelse og transporteres over tarmen i nyfødte grise.

Konklusion

Det blev tidligt i projektet besluttet i følgegruppen at prioritere indsatsen på komponenterne osteopontin og CGMP, der blev således ikke foretaget lige så mange analyser på alfa-laktalbumin (som tidligt viste sig ikke at have målbare effekter). Det vurderes, at de fleste opstillede mål blev opnået i fase 1-5. CGMP og osteopontin blev fordøjet i forskellige modeller simulerende den human fordøjelse (fase 1). De fordøjede mælkeproteiner blev karakteriseret ved RP-HPLC, massespektrometri og western blots (osteopontin) med specifikke monoklonale antistoffer (fase 2). I fase 3, observerede vi en positiv effekt af fordøjet CGMP på en modnende model af tarmen, og CGMP havde en positiv effekt

på tætheden af tarmbarrieren under forhold simulerende inflammation i tarmen. Vi påviste, at osteopontin havde en stor effekt på genudtrykket i tarmen, da der var næsten 500 gener udtrykt forskelligt mellem kontrolceller og osteopontin-behandlede tarmceller. I fase 4, blev fragmenter af osteopontin indeholdende dets aktive motiver set transporteret over tarmmodellen via transcytose. Desuden kunne vi genfinde bovint mælkeosteopontin i plasmaet fra nyfødte grise fodret med et måltid beriget med osteopontin lige efter fødslen.

12. Resultaternes betydning, herunder for mejeribrug

Projektet er af meget grundvidenskabelig karakter, og det primære udbytte af projektet er ny grundlagsskabende viden om fordøjelse og optag af mælkeproteiner, studeret i *in vitro* modeller. Effekten af de bioaktive mælkekomponenter osteopontin og CGMP kan anvendes i dokumentation og markedsføring af disse, og mælk generelt.

Vi har vist, at osteopontin i mælk bevarer sin evne til at binde til cellereceptorer i tarmen efter passage gennem mavesækken og fordøjelsen med pepsin. Dette skyldes, at osteopontin fra mælk er dekoreret med kulhydratgrupper, som beskytter vigtige områder af osteopontin mod fordøjelse. Disse kulhydratgrupper er ikke til stede i osteopontin, der er rekombinant fremstillet i fx bakterier eller alger. Denne viden kan benyttes til markedsføring og effekt-dokumentation af specialiserede mælkeproteiningredienser, der indeholder OPN. Ligeledes kan viden om hvilke gener, der op- og nedreguleres i tarmceller som følge af OPN-påvirkning være vigtig i forhold til dokumentation af OPNs effekter.

Effekten af CGMP på inflammationsmodellen kan benyttes til dokumentation af CGMPs gavnlige effekter.

13. Formidling og vidensdeling vedr. projektet

Artikler i internationale tidsskrifter:

Brian Christensen, Niels J. Karlsen, Scheyla D. S. Jørgensen, Lotte N. Jacobsen, Marie S. Ostfeld, Steen V. Petersen, Anette Müllertz & Esben S. Sørensen. (2020). Milk Osteopontin Retains Integrin-Binding Activity After *in Vitro* Gastrointestinal Transit. *Journal of Dairy Science*, 103:42-51

Brian Christensen, Marie R. Sørensen, Nanna Raslow, & Esben S. Sørensen. "Uptake and transport of bovine milk osteopontin in intestinal cells" (working title) in preparation.

Bart Buitenhuis, Brian. Christensen, & Esben S. Sørensen. " Transcriptome Profiling of Caco2 Cell Lines: A Response to Human and Bovine Osteopontin" (working title) in preparation.

Populærvidenskabelige artikler:

Brian Christensen & Esben S. Sørensen. Mælkeproteiner der kan noget ekstra, Mælkeritidende, 2019

Studenteropgaver:

Separation, characterization and digestion of glycosylated and non-glycosylated casein glycomacropeptide and their effect on intestinal cells, Karoline Rusbjerg Sørensen, Specialrapport, juni 2020.

Uptake and transport of milk osteopontin in intestinal cells, Marie Rytter Sørensen, Specialrapport, juni 2020.

In vitro digestion of the casein glycomacropeptide and its effect on Caco-2 cells, Stine Camille Lund Jakobsen, Specialerapport, juni 2019.

Transport of Osteopontin across the Intestinal Barrier, Nanna Raslow, Bachelorrappport, juni 2019.

Simulated gastrointestinal digestion of osteopontin and its effect on intestinal cells, Niels Joakim Karlsen, Specialerapport, juni 2019.

Simulation of gastric digestion of osteopontin and the effect on its bioactivity, Marie Rytter Sørensen, Bachelorrappport, juni 2018.

Purification and digestion analysis of the milk protein α -Lactalbumin and its effect on intestinal Caco-2 cells, Karoline Rusbjerg Sørensen, Bachelorrappport, juni 2018.

Indlæg ved faglige kongresser, symposier etc.:

Posterpræsentation på International Milk Genomics Conference, Aarhus 2019 og ved Arla Foods for Health projektdag i 2019.

14. Bidrag til kandidat- og forskeruddannelse

Følgende studerende har været tilknyttet projektet:

Bachelorstuderende og Kandidatstuderende: Karoline Rusbjerg Sørensen, Marie Rytter Sørensen, Stine Camille Lund Jakobsen og Niels Joakim Karlsen.

Bachelorstuderende Nanna Raslow.

15. Referenceliste – slutrapporten

Brück, W.M., Kelleher, S.L., Gibson, G.R., Nielsen, K.E., Chatterton, D.E.W., and Lönnerdal, B. (2003). rRNA Probes Used to Quantify the Effects of Glycomacropeptide and α -Lactalbumin Supplementation on the Predominant Groups of Intestinal Bacteria of Infant Rhesus Monkeys Challenged with Enteropathogenic *Escherichia coli*: *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 37, 273–280.

Christensen, B., and Sørensen, E.S. (2016). Structure, function and nutritional potential of milk osteopontin. *International Dairy Journal* 57, 1–6.

Daly, A., Evans, S., Chahal, S., Santra, S., and MacDonald, A. (2017). Glycomacropeptide in children with phenylketonuria: does its phenylalanine content affect blood phenylalanine control? *J Hum Nutr Diet* 30, 515–523.

Davis, A.M., Harris, B.J., Lien, E.L., Pramuk, K., and Trabulsi, J. (2008). α -Lactalbumin-rich infant formula fed to healthy term infants in a multicenter study: plasma essential amino acids and gastrointestinal tolerance. *Eur J Clin Nutr* 62, 1294–1301.

Donovan, S.M., Monaco, M.H., Drnevich, J., Kvistgaard, A.S., Hernell, O., and Lönnerdal, B. (2014). Bovine osteopontin modifies the intestinal transcriptome of formula-fed infant rhesus monkeys to be more similar to those that were breastfed. *J. Nutr.* 144, 1910–1919.

Hvas, C.L., Dige, A., Bendix, M., Wernlund, P.G., Christensen, L.A., Dahlerup, J.F., and Agnholt, J. (2016). Casein glycomacropeptide for active distal ulcerative colitis: a randomized pilot study. *Eur J Clin Invest* 46, 555–563.

Lönnerdal, B. (2013). Bioactive proteins in breast milk: Bioactive proteins in breast milk. *J Paediatr Child Health* 49, 1–7.

Lönnerdal, B., Kvistgaard, A.S., Peerson, J.M., Donovan, S.M., and Peng, Y. (2016). Growth, Nutrition, and Cytokine Response of Breast-fed Infants and Infants Fed Formula With Added Bovine Osteopontin. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 62, 650–657.

Robitaille, G., and Champagne, C.P. (2014). Growth-promoting effects of pepsin- and trypsin-treated caseinomacropeptide from bovine milk on probiotics. *Journal of Dairy Research* 81, 319–324.

Sawin, E.A., De Wolfe, T.J., Aktas, B., Stroup, B.M., Murali, S.G., Steele, J.L., and Ney, D.M. (2015). Glycomacropeptide is a prebiotic that reduces *Desulfovibrio* bacteria, increases cecal short-chain fatty acids, and is anti-inflammatory in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 309, G590–G601.

Thomas, N., Richter, K., Pedersen, T.B., Holm, R., Müllertz, A., and Rades, T. (2014). In vitro lipolysis data does not adequately predict the in vivo performance of lipid-based drug delivery systems containing fenofibrate. *AAPS J* 16, 539–549.

16. Underskrift og dato

Projektet er formelt afsluttet, når projektleder og MFF-repræsentant (fx styregruppeformanden for den respektive styregruppe) har underskrevet slutrapporten.



Dato: 6. april 2021 Projektleders underskrift:



Dato: 6. april 2021 MFF-repræsentants underskrift: