

SLUTRAPPORT

NR. 2018-150

Brain Milk - mælkekomponenters optag og effekt på hjernens celler



Slutrapport

for samarbejdsprojekter under Mejeribrugets ForskningsFond (MFF)

1. Projektets titel

”Brain Milk – mælkekomponenters optag og effekt på hjernens celler”

”Brain Milk – milk components uptake and effects on brain cells”

2. Projektleder

Esben Skipper Sørensen, Inst. for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet (AU), Gustav Wieds Vej 10, 8000 Aarhus C. Tlf 8715 5461 / 2027 0979. Email: ess@mbg.au.dk

3. Øvrige medarbejdere

Brian Christensen, Jan Johannes Enghild og Carsten S. Scavenius, Inst. for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet, Gustav Wieds Vej 10, 8000 Aarhus C.

Morten Schallburg Nielsen, Institut for Biomedicin, AU

Torben Moos, Institut for Medicin og Sundhedsteknologi, Aalborg Universitet

4. Finansieringskilder

MFF: 1.856 tDKK

AU: 1.445 tDKK

Arla Foods Ingredients: 468 tDKK

5. Projektperiode

Projektperiode med MFF finansiering: 1. april 2015 – 31. marts 2017

Evt. revideret: 1. april 2015 – 31. december 2017

6. Projektresume

Projektets formål har været at etablere og anvende et modelsystem for blod-hjerne barrieren (BBB), og derefter undersøge endogene mælkepeptiders potentielle effekter på og eventuel passage over denne. I projektet etablerede vi procedurer til at oprense endogene peptider fra komælk til brug i de efterfølgende eksperimenter. En *in vitro* model af BBB bestående af primære endotelceller oprenset fra grisehjerne og assays til undersøgelse af vigtige signaleringskaskader i hjerneceller er etableret i projektet. En tendens til at endogene mælkepeptider havde en reducerende effekt på aktiveringen af ERK1/2, som er en vigtig del af intracellulær signalering, blev observeret ved immunkemiske teknikker. Desuden blev en mindre, men positiv tendens, af mælkepeptiderne på tætheden af BBB observeret ved modstandsmålinger over denne. Disse effekter var imidlertid ikke entydige over mange gentagelser af forsøget og en effekt kunne derfor ikke konkluderes. Specifikke mælkepeptider har i flere tilfælde vist sig at have en antioxidant effekt, og vi undersøgte derfor, om puljen af mælkepeptider kunne beskytte hjerneceller mod oxidativt stress *in vitro*. En sådan egenskab kunne ikke påvises, hvorimod peptiderne i eksperimenter uden celler udviste antioxidative egenskaber i overensstemmelse med litteraturen. I sidste del af projektet undersøgte passage af peptider over BBB. Her har vi gentagne gange observeret tilstedeværelsen af specifikke peptider fra kappa-kasein/cGMP og α s1-kasein på den abluminale side (hjerne-siden) af BBB-modellen. Disse resultater forfølges efter afslutningen af projektperioden. Sammenfattet har vi observeret interessante tendenser til at mælkepeptider forbedrede tætheden af BBB samt at disse havde indflydelse på intracellulær signalering i hjerneceller. Der har været problemer med reproducerbarheden af resultaterne, formentligt pga. forskelle i peptidsammensætning i de forskellige batches. Der er dog indikationer på, at to specifikke mælkepeptider kan passere BBB.

Engelsk resume

The purpose of the project has been to establish and apply a blood-brain barrier (BBB) model, and then examine the potential effects of endogenous milk peptides on and possible passage over this blood-brain barrier. In the project, we established procedures for purifying endogenous peptides from cow's milk for use in subsequent experiments. An *in vitro* model of BBB consisting of primary endothelial cells purified from pig brain and assays for the investigation of important signaling cascades in brain cells were established in the project. The tendency for endogenous milk peptides to have a reducing effect on the activation of ERK1/2, which is an important part of intracellular signaling, was observed by immunochemical techniques. In addition, a lesser positive trend of the milk peptides on the integrity of BBB was observed by resistance measurements over this. However, these effects were not reproducible over several experiments and therefore an effect could not be concluded. Specific milk peptides have been shown to have an anti-oxidative effect in several cases, and we therefore examined whether the pool of milk peptides could protect brain cells from oxidative stress *in vitro*. Such properties could not be shown, whereas the peptides in experiments without cells exhibited anti-oxidative properties in accordance with the literature. The final part of the project examined the passage of peptides over the BBB. Here, we have repeatedly observed the presence of specific peptides from kappa-casein/cGMP and α s1-casein on the abluminal side (brain side) of the BBB model. These results are pursued after completion of the project. In summary, we have observed interesting trends in that milk peptides improved the integrity of the BBB, and that these influenced on intracellular signaling in brain cells. There have been problems with reproducibility of the results, probably due to differences in peptide composition in the different batches. However, there are indications that two specific milk peptides can pass the BBB.

7. Projektets formål

Projektets hovedformål er at undersøge endogene mælkepeptiders transport over blod-hjerne barrieren og deres potentielle effekter på hjerneceller og dermed kognitiv udvikling og sundhed.

The main objective of the project is to study the transport of endogenous milk peptides across the blood-brain barrier and their potential effects on brain cells and thus cognitive development and health.

8. Projektets baggrund

Kostens indvirkning på kognitiv udvikling og sundhed er et område, der har fået stærkt øget fokus de senere år. Kan man påvirke spædbørns kognitive udvikling gennem kosten? Kan man spise sig til øget koncentration eller intellektuel kapacitet? Og kan man udskyde eller helt forhindre udviklingen af demenstilstande via diæten? Disse og lignende spørgsmål er har ført til begrebet "BrainFOOD" som er en tidspopulær fællesnævner for mere eller mindre veldokumenterede kostforslag og råd til øgning af den kognitive kapacitet. For at kostens komponenter kan have en direkte effekt på hjernens udvikling og funktion, skal en meget vigtig og speciel barriere, blod-hjerne barrieren, først overvindes.

Central-nerve systemets (CNS) neuroner og støttceller er beskyttet mod viral og bakteriel infektion bag en tæt blod-hjerne barriere (blood-brain barrier - BBB). Denne tætte barriere har den konsekvens, at kun meget små og hydrofobe molekyler kan diffundere passivt fra blodet og ind i hjernen (Abbot et al., 2010). Store molekyler som fx proteiner og peptider skal derimod aktivt transporteres over BBB. Til trods for disse begrænsninger antages det, at visse peptider, så som opioide peptider, fx beta-kasomorfiner, efter optag over tarmen til blodet, via ukendte mekanismer, kan trænge gennem BBB og udøve deres effekter på cellerne i hjernen (Sun et al., 2003; Umbah et al., 1985; Solokov et al., 2005). Ligeledes er det vist, at sialinsyre, som er en vigtig komponent af hjernegangliosider, kan gennemtrænge/transporteres over BBB (Wang, 2009).

Før mælkekomponenterne når til BBB skal de først optages i tarmen og ind i blodbanen. Mælk vides at indeholde en lang række peptider som følge af endogen proteolytisk aktivitet i mælken eller mammavævet. Det er vist, at mælkeproteiner, så som beta-laktoglobulin, kan måles i blodet hos børn efter mælkeindtagelse (Husby et al., 1987). Optag af mælkekomponenter via diæten er bla. vist at have effekt på blodtryksregulering og det cardio-vaskulære system (Fekete et al., 2013), regulering af blodsukker (Power et al., 2013), anti-cancerogene aktiviteter (Rittling et al., 2014), åreforkalkning (Nakamura et al., 2013) samt alkoholinducerede leverskader (Ge et al., 2013). Der er således evidens for, at flere mælkekomponenter kan gennemtrænge eller evt. aktivt optages over tarmepitelet ind i blodbanen. Der er derimod ikke lavet direkte undersøgelser af hvilke mælkekomponenter der kan gennemtrænge BBB. Trafikken over denne barriere er meget stramt reguleret og kun få komponenter får adgang over denne. Det kan fx være peptider, der har indflydelse på kognitiv udvikling og sundhed, indlæring, søvn- og humørmønstre, samt sialinsyreforbindelser og fosfolipider, der indgår i opbygningen af hjernegangliosider. Mælkekomponenter kan desuden tænkes at udøve en effekt på BBB ved at 'sende' et signal over barrieren, hvorved en effekt ville kunne opnås uden en aktiv transport. Fx påvirkes gennemtrængelighed og funktion af BBB af intracellulær signallering.

Identifikation af sådanne komponenter kræver etablering af et cellebaseret modelsystem, da screening i fx dyremodeller ikke er praktisk gennemførligt. Et af problemerne er, at testsubstanser, der stammer fra naturlige kilder som fx mælkeprotein/peptider, vil indeholde uendeligt mange komponenter, hvoraf kun meget få vil trænge igennem BBB. I kombination med at det sandsynligvis kun er en meget lille del af disse komponenter, der trænger over, vil identifikationen i et relativt stort organ som hjernen være meget besværlig.

9. Projektets delaktiviteter i hele projektperioden

1. Etablering af BBB modellen

2. Isolering og karakterisering af endogene peptider fra mælk

3. Endogene mælkepeptiders transport over BBB (ændret til at inkludere effekter på membranen og signalering i dennes celler)

4. Identificering af mælkekomponenter der passerer BBB

5. Transport af identificerede BBB mælkepeptider over tarmen til blodbanen:

Tidsplan (X=1 måned):

	2015	2016	2017	
Fase 1:	XXXXXXXXXX	XXXX		
Fase 2:	XXXXXXXXXX			
Fase 3:	XX	XXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXX	(Fed= forlængelse)
Fase 4:		XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXX	
Fase 5:		XXXXX	XXX	(ikke gennemført)

Pga. tekniske problemer med reproducerbarheden af mælkepeptidernes effekter på BBB, blev fase 5 ikke gennemført. I stedet blev der i projektets sidste år (de sidste tre måneder af den oprindelige projektperiode, samt de ni måneders forlængelse) fokuseret på at undersøge, om mælkepeptider kunne passere BBB, samt identifikation af disse peptider.

Fase 3 blev tidligt i projektet udvidet til hovedsagligt at omhandle mælkepeptiders effekt på cellerne, der indgår i BBB, og om disse kunne inducere et signal i disse (ERK-fosforylering) som evt. kunne påvirke hjernen.

10. Projektets resultater

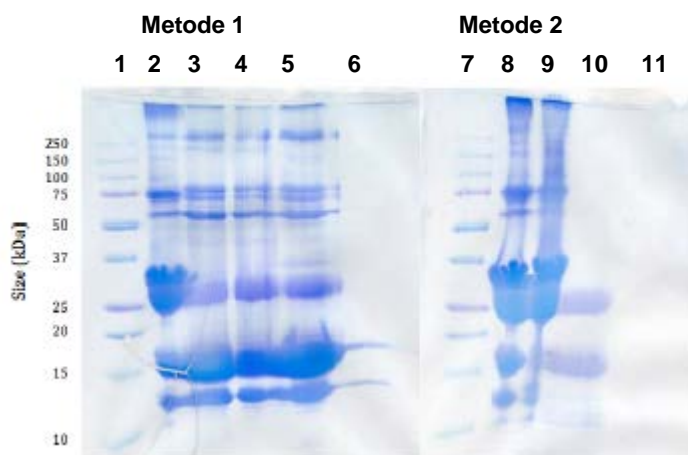
Fase 1.

I tæt samarbejde med Morten S. Nielsen (Institut for Biomedicin, AU) blev en model af blod-hjernebarrieren (BBB) etableret. Modellen består af et to-kammer-system, hvor de to kamre er adskilt af et syntetisk filter med små porer (0,4 μm). Primære endotelceller blev oprenset fra grisehjerner og påsættes det øverste kammer og danner den luminale side i et hjernekapilær (blodsiden), og astrocyt-konditioneret medium påsættes det nederste kammer og danner den abluminale side (hjernesiden). To dage efter cellerne er påsat tilføres de et differentieringsmedie indeholdende cAMP, hydrocortisone og 4-(3-Butoxy-4-methoxybenzyl)imidazolidin-2-one, hvilket modner cellerne, der derefter danner en tæt barriere. Tætheden af barrieren og dermed robustheden af modellen vurderes med modstandsmålinger, såkaldte TEER målinger samt passiv gennemtrængelighed (Papp koefficient) målt vha. ^{14}C -mannitol. Vi opnåede en BBB model med en TEER værdi på 500-1000 $\Omega \text{ cm}^2$, og en apparent permeability coefficient (Papp) på mellem $2,7 \times 10^{-6}$ - $5,03 \times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$.

Opsumering: Disse TEER- og Papp-værdier viser at det er en meget robust og tæt model for BBB, der er etableret (Patabendige et al., 2013). Denne BBB-model er derfor anvendelig til undersøgelse af de endogene peptiders effekter på denne, samt til transport assays (fase 3 og 4).

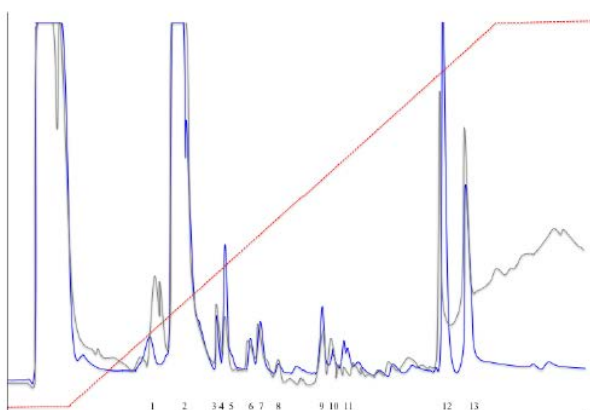
Fase 2.

Til isolering af endogene peptider fra komælk blev to forskellige metoder etableret. I den første metode skummes mælken, kaseinerne syrefældes og den resterende valle ultracentrifugeres. Supernatanten filteres herefter igennem et 10 kDa amicon filter for fjerne eventuelle proteiner og større peptidfragmenter. Den anden metode tager udgangspunkt i præparation af proteose peptonen fra mælk, ved at opvarme skummetmælk til 95 °C, hvorefter pH justeres til 4,5 efterfulgt af centrifugering for at fælde kaseiner og denaturerede valleproteiner. Herefter adskilles proteinerne i proteose peptonen fra peptiderne via gelfiltrering. Figur 1 viser de forskellige oprensningstrin fra de to metoder, de blanke lanes 6 og 11 repræsenterer oprensning af peptider, i det peptider vil migrere ud af gelen pga. lav molekylvægt.



Figur 1. SDS-PAGE af prøver fra hvert trin i oprensningen af mælkepeptider fra de to metoder. Lane 1-6 metode 1. Lane 1) mw markør; lane 2) skummetmælk; lane 3) forsuret valle; lane 4) ultracentrifugeret valle; lane 5) amicon-koncentrat og lane 6) gennemløb fra amicon. Lane 7-11 metode 2. Lane 7) mw markør; lane 8) skummetmælk; lane 9) kogt mælk; lane 10) forsuret valle; lane 11) topfraktion fra gelfiltrering.

Peptidfraktionen fra begge metoder (Figur 1, lane 6 og 11) blev analyseret via RP-HPLC (Figur 2). Hvor kromatogrammerne indikerende, at den samme pulje peptider fra komælk er oprenset ved begge metoder. Pga. højest udbytte i metode 1 baseret på absorptionsmålinger ved 205 nm fortsatte vi med peptider oprenset fra metode 1.



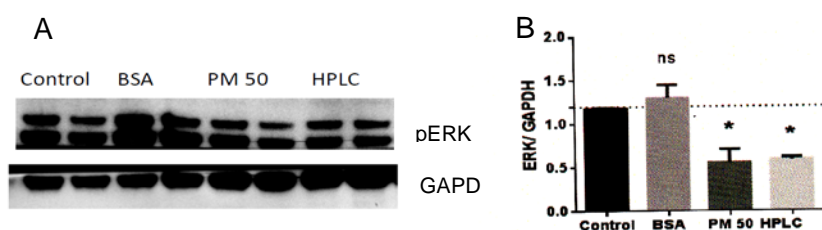
Figur 2. RP-HPLC af peptider fra komælk. Peptider fra metode 1 (lane 6, Figur 1) (Blå) og metode 2 (lane 11, Figur 1) (grå).

Vha. høj-sensitiv nano-LC-MS/MS massespektrometri blev 2-300 peptider identificeret, hvor de fleste stammede fra nedbrydning af kaseinerne, og hvor især peptider fra α 1-kasein dominerede.

Opsummering: Der er opnået metoder til oprensning af mælkepeptider, som kan anvendes i de følgende faser.

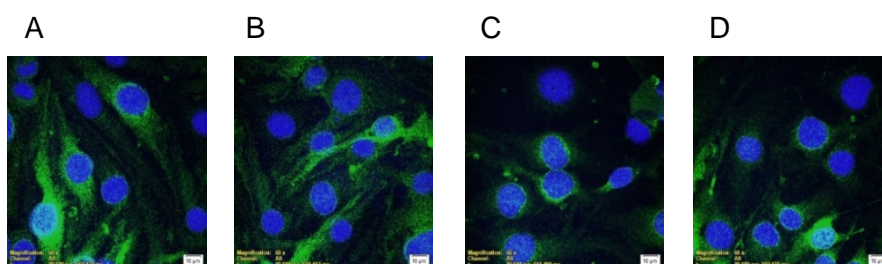
Fase 3.

For at belyse, hvorvidt mælkepeptider har direkte effekter på BBB, og/eller om de potentielt kan signalere over barrieren, blev undersøgelser af signaleringskaskader i hjerneendotelceller ("første lag" af BBB) efter stimulering med mælkepeptider påbegyndt. I disse assays blev den murine hjerne endotelcellelinje bEND3 benyttet. Disse celler er ofte benyttet til at modellere BBB, idet de udviser naturlige BBB karakteristika over mange passager (Brown et al., 2007). Via Western blotting blev det gentagne gange observeret, at stimulering af bEND3 cellerne med mælkepeptider resulterer i mindre fosforylering og dermed mindre aktivering af extracellulær signal-reguleret protein kinase (ERK) 1/2 (Figur 3). ERK1/2 er MAP kinaser, som er lokaliseret i cytoplasmaet, hvor de deltager i videresendelsen af signaler fra miljøet uden for cellen til cellens indre. Tilsvarende eksperimenter indikerer samme funktion i primære endotelceller oprenset fra grisehjerter (data ikke vist).



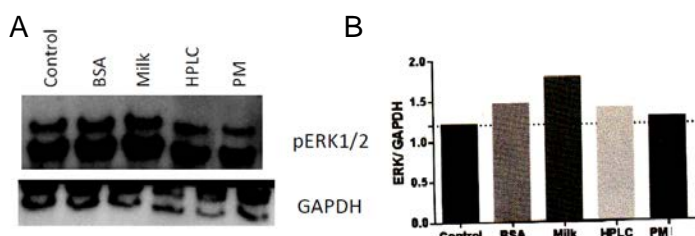
Figur 3. Mindre fosforylering af ERK1/2 i bEND3 celler efter stimulering med mælkepeptider. (A) Den murine hjerne endotelcellelinje bEND3 blev stimuleret med 50 ug/ml mælkepeptider (PM 50), mælkepeptider der har været over en ekstra reverse-phase søjle (HPLC) eller BSA peptider. Celler ikke tilsat peptider defineres som kontrollen. Efter stimulering med peptider lyses cellerne, og lysatet analyseres via Western blotting med antistoffer rettet mod fosforyleret ERK1/2 (p-ERK) eller GAPDH som kontrol. (B) intensiteten af båndene i (A) blev kvantificeret via IMAGEJ programmet og ratioen ERK/GAPDH er vist

Effekter på ERK1/2 fosforylering over BBB blev også analyseret via immuncytokemi, hvor reduceret farvningen af fosforyleret ERK1/2 også her indikerede, at stimulering med mælkepeptider kunne reducere aktiveringen af den signaleringskaskade (Figur 4).

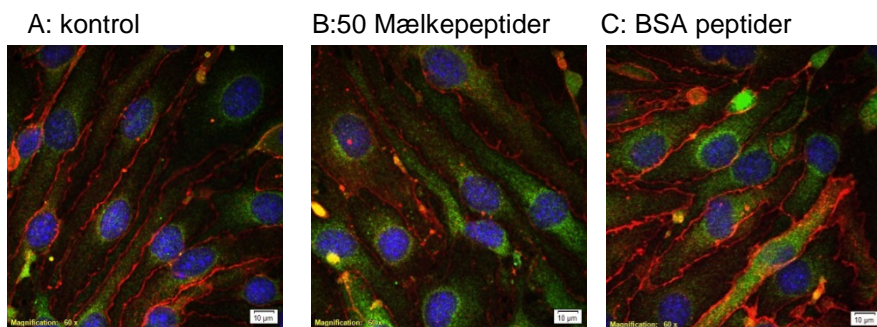


Figur 4. Fosforylering af ERK1/2 i bEND3 celler ikke tilsat mælkepeptider (A+B) og efter stimulering med mælkepeptider (C+D). Cellerne blev stimuleret med 50 ug/ml oprenset endogene mælkepeptider i 30 min. Derefter blev cellerne farvet med antistoffer mod fosforyleret ERK1/2.

Disse resultater viste sig svære at reproducere mellem forskellige oprensninger af mælkepeptiderne, og i den sidste del af projektet var den reducerede fosforylering af ERK1/2 ikke mulig at påvise (Figur 5 og 6).

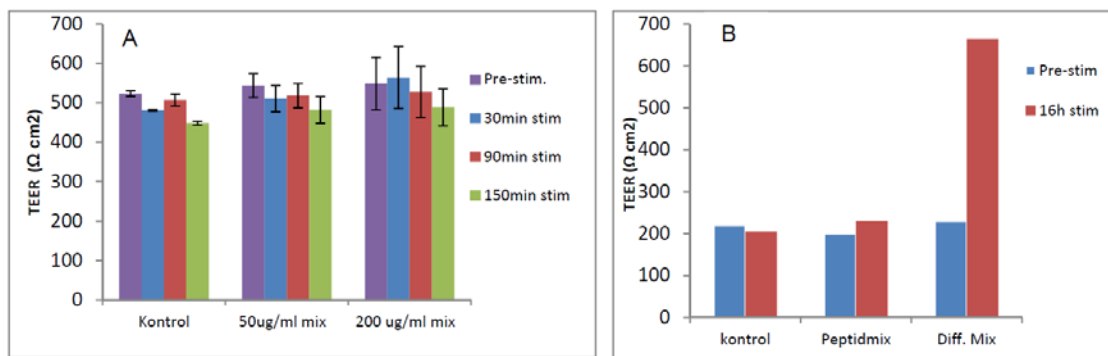


Figur 5. Ingen effekt på fosforylering af ERK1/2 i bEND3 celler efter stimulering med mælkepeptider. (A) Den murine hjerne endotelcellelinje bEND3 blev stimuleret med 50 ug/ml mælkepeptider (PM 50), mælkepeptider der har været over en ekstra reverse-phase søjle (HPLC), BSA-peptider eller ren mælk. via IMAGEJ-programmet og ratioen ERK/GAPDH er vist.



Figur 6. Fosforylering af ERK1/2 i bEND3 celler uden stimulering (A), efter 30 min stimulering med mælkepeptider (B) eller BSA-peptider (C). pERK1/2 er farvet grøn med antistoffer rettet mod fosforyleret ERK1/2 (p-ERK).

Mælkepeptiders effekt på tætheden/gennemtrængeligheden af endotelcellelaget i BBB blev undersøgt, da den nedsatte fosforylering af ERK1/2, som indikeret ovenfor, er rapporteret at have en positiv effekt på tætheden af BBB. Hertil benyttedes den i fase 1 opsatte model af BBB bestående af primære grise-endotelceller og astrocyte-konditioneret medium. Stimuleringen af BBB foregik ved tilsætning af mælkepeptider til endotelcelle-laget i to-kammer-systemet med efterfølgende måling af TEER-værdierne efter 30, 90 og 150 min (Figur 7A). Mælkepeptiderne blev ikke observeret at have en effekt på tætheden af BBB. Målinger af passiv diffusion vha. 14C-mannitol viste ligeledes ingen forøgelse af tætheden af BBB (tabel 1). Både TEER værdierne og den beregnede Papp (apparent permeability) (Figur 7 og tabel 1) viser, at det er en robust og brugbar model for BBB, vi arbejder med (Patabendige et al. 2013). Tilsvarende forsøg på en 'umodnet' BBB ikke differentieret med cAMP, hydrocortisone og 4-(3-Butoxy-4-methoxybenzyl)imidazolidin-2-one viste heller ikke nogen effekt af mælkepeptider på BBB (Figur 7B).

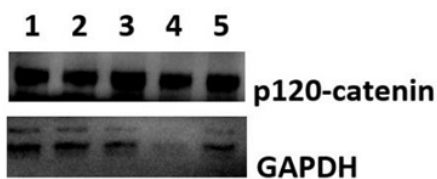


Figur 7. Effekter af mælkepeptider på TEER-værdier i primære grise hjerne endotelceller. (A) TEER-værdierne blev målt manuelt 30, 90 og 150 min. efter at cellerne blev stimuleret med serum-frit medie uden peptidmix eller indeholdende 50 eller 200 µg/ml peptidmix. (n=2). (B) Effekter af mælkepeptider på TEER-værdier i en 'umodnet' BBB model med primære grise hjerne endotelceller. Cellerne blev stimuleret 16 timer med eller uden mælkepeptider eller differentieringsmedie indeholdende cAMP, hydrocortisone og 4-(3-Butoxy-4-methoxybenzyl)imidazolidin-2-one (diff. mix). TEER værdier blev målt før (pre-stim) og 16 timer efter (16h stim) tilsætning.

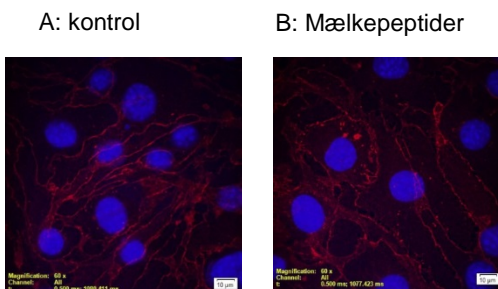
Table 1: Passiv gennemtrængelighed af ¹⁴C-mannitol

Treatment	Papp (cm x s ⁻¹)
Cell free	5,77 x 10 ⁻⁵
Control (no peptides)	1,37 x 10 ⁻⁶
1 mg/ml peptidmix	2,31 x 10 ⁻⁶

En anden indikator for tætheden af BBB er ekspresion af såkaldte tight junction- og adherens junction-proteiner. De murine hjerne-endotelceller bEND3 blev stimuleret med mælkepeptider og udtrykket og lokaliseringen af adherens junction proteinet p120 catenin blev analyseret ved Western blotting og immuncytokemi. Hverken Western blottet (Figur 8) eller immunfarvningen (Figur 9) indikerede nogen effekt af mælkepeptiderne på udtrykket af p120 catenin i forhold til den ustimulerede kontrol.

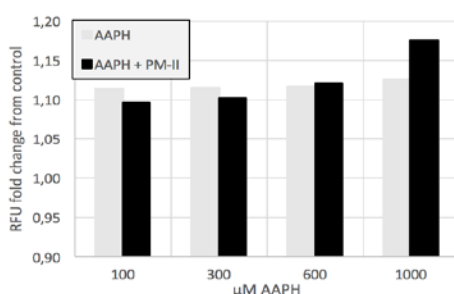


Figur 8. Ekspresion i bEND3 celler af p120 catenin efter stimulering med mælkepeptider analyseret via Western blotting med antistoffer rettet mod p120 catenin eller GAPDH som kontrol. Lane 1: kontrol (ingen mælkepeptider), lane 2-3: 50 µg/ml peptidmix og lane 4-5: 200 µg/ml mælkepeptider.



Figur 9. p120-catenin ekspresion i bEND3 celler uden stimulering (A), og efter stimulering med 200 µg/ml mælkepeptider (B) undersøgt vha. immuncytokemi.

Mælkepeptider er også i flere sammenhænge vist sig at besidde antioxidative effekter (Power et al., 2013). De oprensede mælkepeptider blev også observeret at udvise antioxidative effekter i celle-frie assays (data ikke vist). Tidligere er der påvist en sammenhæng mellem oxidativt stress af celler og en øget aktivering af MAPK kinase signalering via ERK1/2. Da mælkepeptiderne var observeret at have en inhiberende effekt på aktivering af ERK1/2 (Figur 3 og 4) samt besidde antioxidative egenskaber, blev det testet om disse også havde en antioxidativ effekt over for bEND3 hjerne-endotelceller udsat for oxidativt stress (Figur 10). Der blev ikke observeret en intracellulær reduktion i dannelsen af reaktive oxygen species ved tilsætning af mælkepeptiderne til cellerne, der var udsat for oxidativt stress.



Figur 10. bEND3 celler blev behandlet med 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) (AAPH) for at danne reaktive oxygen species (ROS). Dannelse af intracellulær ROS blev målt med 2',7'-dichlorofluorescein i celler behandlet med AAPH med eller uden tilsætning af mælkepeptider (PM).

Opsummering: I denne fase er effekter af mælkepeptider på hjerne-endotelceller blevet undersøgt. I den første del af projektet blev en inhiberende effekt af mælkepeptiderne flere gange observeret på aktivering af ERK1/2 kinase signaleringskaskaden. I den sidste del var disse resultater ikke mulige at reproducere. Forklaringen på dette er ikke klar, men det kan skyldes, at der har været små forskelle i sammensætningen af mælkepeptiderne i de forskellige batches. Den vigtigste funktion af BBB er at danne en tæt barriere, hvorved uønskede komponenter holdes ude af hjernen. Derfor undersøgte vi, om mælkepeptiderne kunne have en effekt på tætheden af BBB ved modstandsmålinger samt udtryk af adherens junction proteiner. En sådan effekt kunne ikke påvises. En velkendt funktion af visse mælkepeptider er deres antioxidative egenskaber. Det blev følgelig undersøgt, om mælkepeptider kunne have en antioxidativ effekt på hjerne endotelceller udsat for oxidativt stress, men en sådan effekt kunne ikke påvises.

Fase 4.

I denne fase blev passage/transport af mælkepeptider over BBB-modellen undersøgt. Mælkepeptider blev tilsat det øverste kammer (blodsiden) i BBB-modellen og efter 2,5 timer opsamles mediet fra det nederste kammer (hjernesiden). Det opsamlede medie analyseres ved nano-LC-MS/MS massespektrometri. I disse transport assays var TEER-værdierne på 600-800 Ω cm², og en apparent permeability coefficient (Papp) på mellem $2,7 \times 10^{-6}$ - $5,03 \times 10^{-7}$ cm x s⁻¹. Ud af de hundredvis af peptider i peptidmix'et tilsat det øverste kammer, blev der gentagne gange identificeret to specifikke peptider i det nederste kammer. Disse peptider stammer fra den C-terminale del af henholdsvis kappa-kasein/cGMP og α 1-kasein. Verificering af denne specifikke transport/passage er undervejs med syntetiske peptider.

Opsummering: Der er etableret et assay til analyse af transport over BBB-modellen og to potentielle mælkepeptider er identificeret på den abluminale side (hjernesiden).

Konklusion

Det vurderes, at fase 1, 2 og 4 opfylder de opstillede mål, idet en robust BBB-model er etableret (fase 1), en procedure til oprensning og karakterisering af endogene mælkepeptider er ligeledes etableret (fase 2) samt et transport assay er udviklet (fase 4), hvori der pt. arbejdes på at verificere transporten af to peptider. Trods flere forskellige analyser har vi ikke i fase 3 kunnet påvise en klar effekt af mælkepeptider på integriteten af BBB eller signalering over denne. Vi havde dog i projektets første tid meget stærke indikationer på en effekt på mælkepeptiders indflydelse på signaleringen, men disse resultater har ikke siden kunnet reproducere, formentlig pga. forskelle mellem batches af mælkepeptider.

Referencer

- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 37:13-25.
- Brown RC, Morris AP, O'neil RG. 2007. Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain Res* 1130:17-30.
- Fekete AA, Givens DI, Lovegrove JA. 2013. The impact of milk proteins and peptides on blood pressure and vascular function: a review of evidence from human intervention studies. *Nutr Res Rev.* 26:177-90.
- Ge X, Lu Y, Leung TM, Sørensen ES, Nieto N. 2013. Milk osteopontin, a nutritional approach to prevent alcohol-induced liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 304:G929-39.
- Husby S, Foged N, Høst A, Svehag SE. 1987. Passage of dietary antigens into the blood of children with coeliac disease. Quantification and size distribution of absorbed antigens. *Gut* 28:1062-72.
- Nakamura T, Hirota T, Mizushima K, Ohki K, Naito Y, Yamamoto N, Yoshikawa T. 2013. Milk-derived peptides, Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro, attenuate atherosclerosis development in apolipoprotein e-deficient mice: a preliminary study. *J Med Food.* 16:396-403.
- Patabendige A, Skinner RA, Morgan L, Abbott NJ. 2013. A detailed method for preparation of a functional and flexible blood-brain barrier model using porcine brain endothelial cells. *Brain Res.* 1521:16-30.
- Power O, Nongonierma AB, Jakeman P, Fitzgerald RJ. 2013. Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes. *Proc Nutr Soc.* 17:1-13.
- Rittling SR, Wejse PL, Yagiz K, Warot GA, Hui T. 2014. Suppression of tumour growth by orally administered osteopontin is accompanied by alterations in tumour blood vessels. *Br J Cancer.* doi: 10.1038/bjc.2014.10.

Sokolov OY, Pryanikova NA, Kost NV, Zolotarev YA, Ryukert EN, Zozulya AA. 2005. Reactions between beta-casomorphins-7 and 5-HT2-serotonin receptors. Bull Exp Biol Med. 140:582-4.

Sun Z, Zhang Z, Wang X, Cade R, Elmir Z, Fregly M. 2003. Relation of beta-casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. Peptides. 24:937-43.

Umbach M, Teschemacher H, Praetorius K, Hirschhäuser R, Bostedt H. 1985. Demonstration of a beta-casomorphin immunoreactive material in the plasma of newborn calves after milk intake. Regul Pept. 12:223-30.

Wang, B. 2009. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. Annu. Rev. Nutr. 29:177-222.

11. Afvigelser

11.1 Fagligt

Under projektet afveg fase 3 fra beskrivelsen i den indsendte interessetilkendegivelse. Udførelsen af fase 3 forudsatte, at specifikke komponenter (i fase 4) blev transporteret over BBB. Da transport over BBB er meget reguleret, blev det tidligt i projektet sammen med vore samarbejdspartnere på de medicinske institutter besluttet, at det ville være mere relevant at undersøge om mælkekomponenterne i første omgang havde en funktion på 'blod-siden' af BBB og evt. kunne signalere over den. Det ville ikke forudsætte en aktiv transport over den tætregulerede BBB. Derfor blev fase 3 ændret til at fokusere på om mælkepeptiderne kunne mediere intracellulær signalering i hjerne-endotelceller samt stimulere BBB-modellen til at blive tættere/mere robust. Derudover skulle det undersøges, om specifikke mælkekomponenter rent faktisk blev aktivt transporteret over BBB (i fase 4) før de resterende nævnte punkter i fase 3 skulle undersøges.

11.2 Økonomisk

Ingen afvigelser.

11.3 Tidsplan

Projektet blev forlænget til 31/12-17 (budgetneutralt).

12. Resultaternes betydning, herunder for mejeribrug

Projektet har været af meget grundvidenskabelig og eksplorativ karakter, og resultaterne har ikke umiddelbart direkte og praktisk betydning for mejeribrug.

Det er i projektet lykkedes at etablere og anvende en meget god model for blod-hjerne barrieren. Det viste sig bare, at det var meget vanskeligt at påvise en effekt af mælkepeptider på denne. Dog er der stadig undersøgelser i gang, der kan vise om specifikke mælkepeptider evt. kan transporteres over BBB. Den etablerede model kan anvendes i fremtidige undersøgelser af mælkekomponenters potentielle effekter og eventuelle adgang til hjernen. Det kunne fx være i undersøgelser af oligosakkarider og lipider, som vides at have meget lettere ved at få adgang til hjernen, end de i dette projekt undersøgte peptider.

13. Formidling og vidensdeling vedr. projektet

Artikler i internationale tidsskrifter:

Brian Christensen, Simone SE Nielsen, Andrea Toth, Carsten Scavenius, Jan Enghild, Morten S Nielsen, Esben S Sørensen. "Endogenous milk peptides and their effect on brain milk cells" (working title) in preparation.

Populærvideenskabelige artikler:

Brain Milk – mælkekomponenters optag og effekt på hjernens celler. Christensen, B., Elstrøm, S., Nielsen, M.S., Enghild, J.E., Moos, T., Sørensen, E.S. Mælkeritidende, december 2015.

Studereropgaver:

Purification of Bovine Milk Peptides and Their Effect on Brain Endothelial Cells, Andreas Møller Stokbro, Bachelor rapport, juni 2016.

Effects of milk peptides on Brain Cells. Simone Schandorf Elstrøm Nielsen, Specialerapport, juni 2016.
Signaling in brain endothelial cells mediated by endogenous bovine milk peptides. Ida Bobach, Bachelor rapport, december 2016.

Reaction of MAPK/ERK 1/2 pathway signalling after treatment with bovine milk peptides in brain cells. Anne Hendricks, Molekylærbiologisk projektrapport, december 2016.

Effects of bovine milk peptides on brain endothelial cells. Niels Joakim Karlsen, Molekylærbiologisk projekt, marts 2017.

Mødeindlæg:

Forelæsning ved Mejeriforskningens dag (Dairy Research Day), "Mælk til hjernen", Billund, marts 2017

Indlæg ved gruppemøder i neuro-grupper på Medicinsk biokemi, AU

Forelæsning ved tysk mejerikonference "Milk to the brain", Munchen, 11.-12. oktober 2018.

14. Bidrag til kandidat og forskeruddannelse

Følgende studerende har været tilknyttet projektet:

Bachelorstuderende: Ida Bobach, Andreas Møller Stokbro

Projektstuderende: Anna Hendricks, Niels Joakim Karlsen

Kandidatstuderende: Simone Schandorf Elstrøm Nielsen

15. Nye kontakter/projekter

Projektet har ført til et godt samarbejde med Morten Schallburg Nielsens gruppe på Institut for Biomedicin, AU. Arbejdet med udvikling af membranmodeller har ført til indgangsættelse af et nyt MFF/MAF projekt omhandlende blandt andet tarmcellemembranen, og det forventes at samarbejdet med de medicinske grupper involveret i dette projekt vil fortsætte i fremtidige projekter.

16. Underskrift og dato

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

Dato: 17/3-2018 Projektleders underskrift:



Dato: 26. marts 2018 MFF-repræsentants underskrift:

