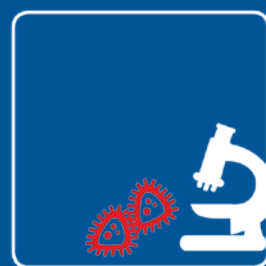


Fødevareallergener og aggregerede peptider – en ny hypotese for sensibilisering



Afslutningsrapport

Fødevareallergener og aggregerede peptider - en ny hypotese for sensibilisering

Projektleder

Charlotte Bernhard Madsen
Forskningsgruppeleder, DVM
Afdeling for Toksikologi og Risikovurdering
Fødevareinstituttet – DTU
Mørkhøj Bygade 19
2860 Søborg
Danmark
Tlf.: 35887563
E-mail: charm@food.dtu.dk

Projektperiode

01.01.07 – 31.03.12

Projektdeltagere

Katrine Lindholm Bøgh, Afdeling for Toksikologi og Risikovurdering, Fødevareinstituttet, DTU, kalb@food.dtu.dk, tlf. 35887092

Vibeke Barkholt, Enzym- og proteinkemi, Institut for Systembiologi, DTU, vb@bio.dtu.dk

E.N. Clare Mills, Manchester Interdisciplinary Biocentre, University of Manchester, UK, clare.mills@manchester.ac.uk

Finansieringskilder

Mejeribrugets forskningsfond (618.400 kr.)

Forskerskolen FOOD (500.000 kr.)

Ph.d.-stipendium fra DTU (504.000 kr.)

Dansk resumé af det samlede projekt

Formål: Projektet havde til formål at undersøge om nedbrydningsprodukter fra jordnøddeallergenet Ara h 1 samt komælksallergenet β -lactoglobulin (BLG) kan inducere allergi (sensibilisere). Undersøgelserne blev foretaget i Brown Norway rotter. Projektet havde derudover til formål at undersøge om aggregering af peptider i nedbrydningsprodukterne kan have indflydelse på det allergene potentiale.

Metoder: Jordnøddeallergenet Ara h 1 og komælksallergenet β -lactoglobulin blev nedbrudt i en *in vitro* model der efterligner den humane fordøjelsesproces. Yderligere blev β -lactoglobulin hydrolyseret efter samme forskrifter som det højt hydrolyserede valleproteinprodukt PEPTIGEN IF-3080. Fordøjet Ara h 1 og β -lactoglobulin, fraktioner af disse, samt hydrolyseret β -lactoglobulin og PEPTIGEN IF-3080, blev analyseret ved de protein-kemiske metoder; omvendt fase HPLC, gelfiltreringskromatografi, aminosyreanalyse og massespektrometri for karakterisering af peptidstørrelser, aminosyresammensætning samt aggregeringsstatus af peptiderne. Den sensibiliserende evne af intakt allergen, nedbrydningsprodukter samt fraktioner heraf blev undersøgt i grupper af Brown Norway rotter ved i.p. injektion. Det specifikke antistofrespons i serum blev bestemt ved forskellige immunologiske metoder (ELISA).

Resultater: Jordnøddeallergenet Ara h 1 blev fordøjet til små peptider af størrelser mindre end 2 kDa, hvoraf over halvdelen aggregerede til komplekser af størrelser på op til 20 kDa. Til trods for de små peptidstørrelser bibeholdt fordøjet Ara h 1 den sensibiliserende evne, hvilket sandsynligvis er et resultat af peptidernes aggregering til større komplekser. Den sensibiliserende evne af fordøjet Ara h 1 forsvandt dog ved en separation af de små peptider til to fraktioner. Komælksallergenet β -lactoglobulin viste sig at være svært fordøjeligt. 15% af proteinet forblev intakt efter endt fordøjelse. Det fordøjede β -lactoglobulin indeholdte peptider af størrelser mindre end 4,5 kDa, hvoraf omtrent 43% aggregerede til komplekser på op til 28 kDa. Til trods for de større peptider og de større aggregater havde fordøjet β -lactoglobulin ingen sensibiliserende evne. Evnen til at binde antistoffer var dog bibeholdt. Ved en samtidig immunisering med intakt og fordøjet β -lactoglobulin viste den sensibiliserende evne af intakt β -lactoglobulin sig at være stærkt reduceret i forhold til immunisering med intakt β -lactoglobulin alene. Dette resultat tyder på at fordøjet β -lactoglobulin inducerer tolerance. Hverken PEPTIGEN IF-3080 eller hydrolyseret β -lactoglobulin havde sensibiliserende evne, heller ikke når de blev injiceret sammen med adjuvans. Hydrolyseret β -lactoglobulin og PEPTIGEN IF-3080 kunne dog binde til IgG1 antistoffer fra dyr immuniseret med intakt β -lactoglobulin og adjuvans.

Konklusion: Dette projekt demonstrerer, at selv meget små peptider, som er anset for at være for små til at besidde allergene egenskaber, kan agere som allergener og at dette sandsynligt er et resultat af deres aggregering til komplekser af større størrelser. Nærværende projekt viser også, at nedbrydningsprodukter fra forskellige allergener opfører sig meget forskelligartet. Hvor det fordøjede jordnøddeallergen, Ara h 1, bibeholdt den sensibiliserende evne, medførte fordøjelse af komælksallergenet β -lactoglobulin en hæmning af den sensibiliserende evne. Fordøjelsesprodukter fra β -lactoglobulin bevarede dog deres reaktive evne. Dette studie tyder på, at fordøjelsesprodukter fra β -lactoglobulin kan inducere tolerance. Samlet viser disse studier at mens én blanding af peptider kan dirigere immunsystemet i én retning vil en anden blanding af peptider kunne dirigere immunsystemet i en anden retning. Konklusionen er, at der er flere egenskaber der er bestemmende for det allergene potentiale af et fødevarerallergen og at dette ikke kun er baseret på nedbrydeligheden af proteinet, men ligeledes på strukturen af nedbrydningsprodukterne, sandsynligvis i samspil med andre karakteristika.

English summary of the entire project

Aim: The aim of this project was to investigate the sensitising potential of degradation products from the peanut allergen Ara h 1 as well as the cow's milk allergen β -lactoglobulin (BLG) in a Brown Norway rat model. Further the project aimed to investigate the influence of aggregate formation of the degradation products.

Methods: The peanut allergen Ara h 1 and the cow's milk allergen β -lactoglobulin were digested in an *in vitro* model designed to mimic the human digestion process. In addition, the β -lactoglobulin was hydrolysed in accordance to the procedure used to produce PEPTIGEN IF-3080. Intact Ara h 1, intact β -lactoglobulin and digestion products hereof, as well as hydrolysed β -lactoglobulin and PEPTIGEN IF-3080 were thoroughly analysed by reverse phase HPLC, MALDI-TOF mass spectrometry, amino acid analysis and gel filtration chromatography for characterisation of peptide sizes, amino acid composition and aggregation profile. The sensitising as well as the immunogenic capacity of the intact allergens and degradation products hereof were analysed in a Brown Norway rat model by i.p. immunisation either with or without the use of adjuvant. Specific antibody responses were analysed by different ELISA's.

Results: The peanut allergen Ara h 1 was a labile protein, being digested to small peptide fragments of sizes less than 2 kDa, of which more than 50% were aggregated to complexes of sizes up to 20 kDa. In spite of being digested to such small peptides, digested Ara h 1 retained its sensitising capacity. This sensitising capacity was indicated to be a result of these small peptides being in larger complexes, probably resembling the intact Ara h 1 molecule. In contrast to Ara h 1, β -lactoglobulin was shown to be a protein rather stable to digestion, where around 15% β -lactoglobulin remained intact after termination of the digestion process. Digestion products of the β -lactoglobulin had sizes of up to 4.5 kDa of which around 43% were in aggregated complexes of up to 28 kDa. In spite of these digestion products being of sizes larger than that of Ara h 1, digested β -lactoglobulin had no sensitising nor immunogenic capacity in the Brown Norway rats, though the reactive capacity was retained. In contrast the present project indicates that digestion products of β -lactoglobulin may inhere some tolerogenic capacity. By a co-administration of intact β -lactoglobulin with digested β -lactoglobulin the sensitising capacity of the intact β -lactoglobulin was strongly reduced compared to an administration of the intact β -lactoglobulin alone. Neither hydrolysed β -lactoglobulin nor PEPTIGEN IF-3080 had sensitising or immunogenic capacity in the Brown Norway rats, even with the use of adjuvant. However, both hydrolysates retained the reactivity towards IgG1 antibodies raised in rats immunised with intact β -lactoglobulin with the use of adjuvant.

Conclusion: This project demonstrates that even very small peptides from food allergens, which in theory are too small to be allergenic, may retain their sensitising capacity. This was probably a result of the small peptides being in aggregates of larger sizes. In contrast to Ara h 1, degradation products from β -lactoglobulin had no sensitising capacity. Instead the digestion products from β -lactoglobulin were indicated to contain tolerogenic capacity. This indicates that while some peptide mixtures will direct the immune response in one direction other peptide mixtures may direct the immune response in the opposite direction. This demonstrates that degradation products from different allergens may act in different ways, and that several characteristics may collectively contribute to the allergenic potential, where not only size but also structure plays a significant role. In addition, the present study indicates that the way in which allergens are broken down may influence their allergenic potential.

Beskrivelse af del-projekter med mælkeproteiner:

Baggrund:

Prævalensen af fødevareallergi er 5-8% hos børn og 2-4% hos voksne [1;2], men vurderes til at være et voksende problem i den vestlige verden [3-6]. Fødevareallergi er oftest en IgE-medieret sygdom, hvor mælk er den største synder hos små børn, hvor omkring 2,5% lider af IgE-medieret allergiske reaktioner over for specifikke proteiner i visse mælkeprodukter og ingredienser. Hvorfor nogle fødevarer giver allergi og andre ikke gør vides endnu ikke og vores viden om hvilke egenskaber ved fødevareproteiner der er bestemmende for deres allergene potentiale er begrænset [7]. Flere bud på hvilke karaktertræk der potentielt kunne bidrage til det allergene potentiale er fremlagt i de senere år, hvoraf stabilitet over for nedbrydning er ét. Denne antagelse er bl.a. baseret på et studie, der viser at allergene fødevareproteiner generelt er mere stabile over for nedbrydning end fødevareproteiner der ikke vurderes at være allergene [8]. I de senere år er der dog sat spørgsmålstegn ved graden af sammenhæng mellem stabilitet over for nedbrydning og det allergene potentiale, da flere studier har vist at selv små peptider fra fødevareproteiner kan agere som allergener [9-12]. F.eks. kan fordøjelsesprodukter fra jordnødderallergenet Ara h 1, indeholdende peptider mindre end 2 kDa, agere som et "komplet" allergen og bibeholde evnen til både at reagere med IgE, sensibilisere og udløse et allergisk respons [12]. Dette synes umiddelbart overraskende da der teoretiske set er en nedre grænse på 3,5 kDa, hvorunder peptider ikke burde kunne være allergener. En sandsynlig forklaring er at peptiderne fra fordøjet Ara h 1 aggregerer til komplekser af større størrelser [9;12;13]. At det allergen potentiale af nedbrydningsprodukter kan være et resultat af kompleksdannelse er ligeledes blevet foreslået for allergener fra paranød og komælk [14-16].

Formål:

Projektet havde til formål at undersøge den sensibiliserende evne af nedbrydningsprodukter fra komælk i en Brown Norway rottemodel for fødevareallergi. Yderligere havde projektet til formål at undersøge kompleksdannelse indflydelse på en evt. sensibiliserende evne af nedbrydningsprodukterne.

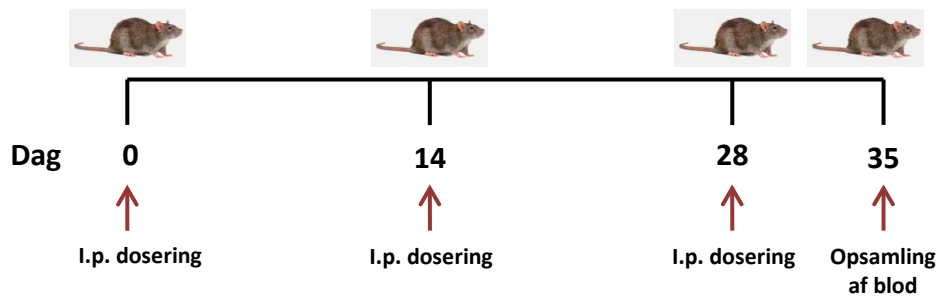
Del-projekt 1: At undersøge den sensibiliserende evne af intakt β -lactoglobulin, fordøjet β -lactoglobulin samt fraktioner heraf i Brown Norway rotter uden brug af adjuvans.

Del-projekt 2: At undersøge den sensibiliserende evne af intakt β -lactoglobulin, hydrolyseret β -lactoglobulin samt PEPTIGEN IF-3080 i Brown Norway rotter med og uden brug af adjuvans.

Metoder:

Del-projekt 1: Intakt β -lactoglobulin blev nedbrudt i en *in vitro* model designet til at efterligne den humane fordøjelsesproces og bestod af to fordøjelsesfaser. Fase 1 efterlignede fordøjelsen i ventriklen og foregik ved brug af immobiliseret pepsin i 120 minutter, ved pH 2,5 og 37 °C. Fase 2 efterlignede fordøjelsen i tolvfingertarmen og foregik ved brug af immobiliseret trypsin og chymotrypsin i omtrent 16 minutter ved pH 6,5 og 37 °C. Fraktioner af fordøjelsesprodukterne blev fremstillet ved en separation af peptiderne via gelfiltreringskromatografi i henhold til størrelser af peptider samt aggregater heraf. En grundig karakterisering af intakt β -lactoglobulin samt diverse fordøjelsesprodukter blev udført ved omvendt fase HPLC, MALDI-TOF massespektrometri, aminosyreanalyse samt gelfiltreringskromatografi. Den sensibiliserende evne af intakt β -lactoglobulin, fordøjet β -lactoglobulin samt fraktioner heraf blev undersøgt i grupper af Brown Norway rotter immuniseret i.p. uden brug af adjuvans (se figur 1). Det specifikke antistofniveau samt aviditeten af responset blev målt ved forskellige ELISA'er.

Del-projekt 2: Intakt β -lactoglobulin blev hydrolyseret efter forskrifterne for produktion af PEPTIGEN IF-3080. Hydrolyseret β -lactoglobulin og PEPTIGEN IF-3080 blev karakteriseret ved omvendt fase HPLC, MALDI-TOF massespektrometri, aminosyreanalyse samt gelfiltreringskromatografi. Den sensibiliserende evne af intakt β -lactoglobulin, hydrolyseret β -lactoglobulin og PEPTIGEN IF-3080 blev undersøgt i grupper af Brown Norway rotter immuniseret i.p. enten med eller uden brug af adjuvans (se figur 1).

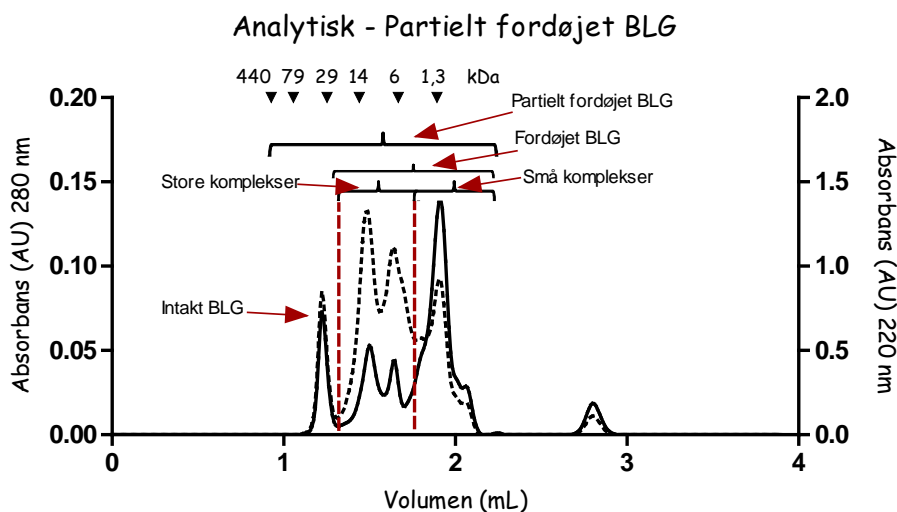


Figur 1. Doseringsregime af Brown Norway rotterne. Del-projekt 1: PBS (kontrolhold), 200 µg af intakt β -lactoglobulin, 30 µg intakt β -lactoglobulin, 200 µg partielt fordøjet β -lactoglobulin (indeholdende 30 µg af intakt β -lactoglobulin), 200 µg fordøjet β -lactoglobulin, 200 µg fraktion af store komplekser eller 200 µg fraktion af små komplekser uden brug af adjuvans. Del-projekt 2: PBS (kontrolhold), 200 µg intakt β -lactoglobulin, 200 µg hydrolyseret β -lactoglobulin eller 200 µg PEPTIGEN IF-3080 med eller uden brug af adjuvans.

Det specifikke antistofniveau samt aviditeten heraf blev målt ved forskellige ELISA'er.

Resultater:

Del-projekt 1: β -lactoglobulin viste sig at være svært fordøjeligt og forblev intakt ved 120 minutters nedbrydning i ventriklen, hvorimod 15% forblev intakt efter den intestinale nedbrydning. Det fordøjede β -lactoglobulin blev nedbrudt til peptider af størrelser op til 4,5 kDa. Med gelfiltreringskromatografiprofilen som grundlag, blev det besluttet at lave 4 forskellige pools af fordøjelsesprodukterne (se figur 2); Partielt fordøjet β -lactoglobulin, fordøjet β -lactoglobulin, fraktion af store komplekser samt fraktion af små komplekser.



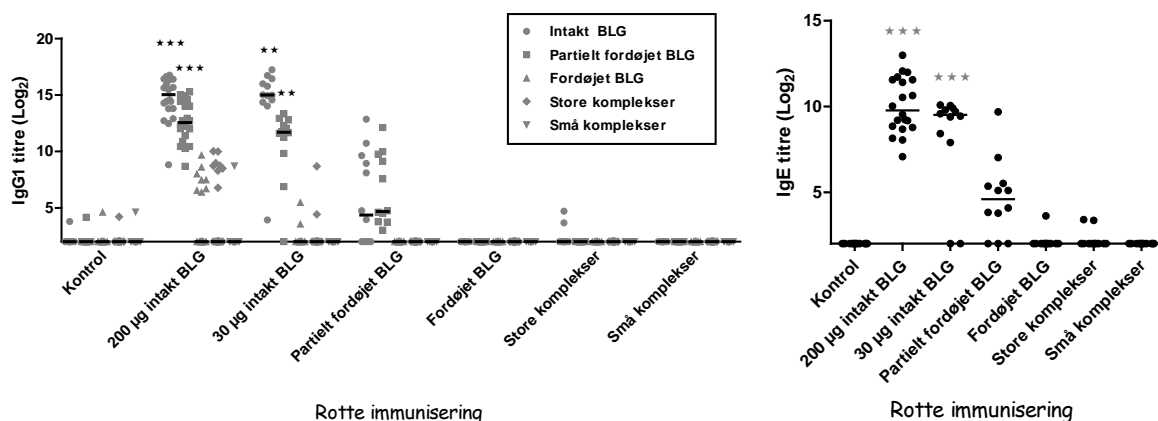
Figur 2. Gelfiltreringskromatografiprofil af gastro-intestinalt fordøjet β -lactoglobulin. Ud fra profilen blev det bestemt af lave 4 pools af fordøjelsesprodukterne; partielt fordøjet BLG, fordøjet BLG, fraktion af store komplekser samt fraktion af små komplekser.

Protein-kemiske analyser af fordøjelsesprodukterne blev udført og resultaterne er som vist i tabel 1.

Tabel 1.

Pool af fordøjet β -lactoglobulin	Aminosyrefordeling (%)			Peptidstørrelse (kDa)	Aggregeringsprofil		Mængde af intakt β -lactoglobulin (%)
	Hydrofobe	Polære	Ladede		Mængde (%)	Størrelse (kDa)	
Partielt fordøjet BLG	45,36	16,11	38,53	-	-	-	15
Fordøjet BLG	45,66	15,74	38,62	$\leq 4,5$	43	28	0
Fraktion af store komplekser	42,21	15,78	42,01	$\leq 4,5$	80	32	0
Fraktion af små komplekser	49,99	16,14	33,87	$\leq 3,0$	32	13	0

Analyser af det specifikke antistofrespons (figur 3) viste at begge doser af intakt β -lactoglobulin kunne inducere specifikt IgG1 og IgE, mens fordøjet β -lactoglobulin ikke kunne inducere et specifikt antistofrespons. Derimod bevarede fordøjet β -lactoglobulin samt fraktionen af store komplekser deres evne til at binde til specifikke immunoglobuliner. Mest interessant ses det at både den IgG1 inducerende samt sensibiliserende evne af intakt β -lactoglobulin er stærkt reduceret ved en samtidig immunisering med fordøjelsesprodukter sammenlignet med immunisering alene.



Figur 3. Specifikt IgG1 og IgE antistofrespons.

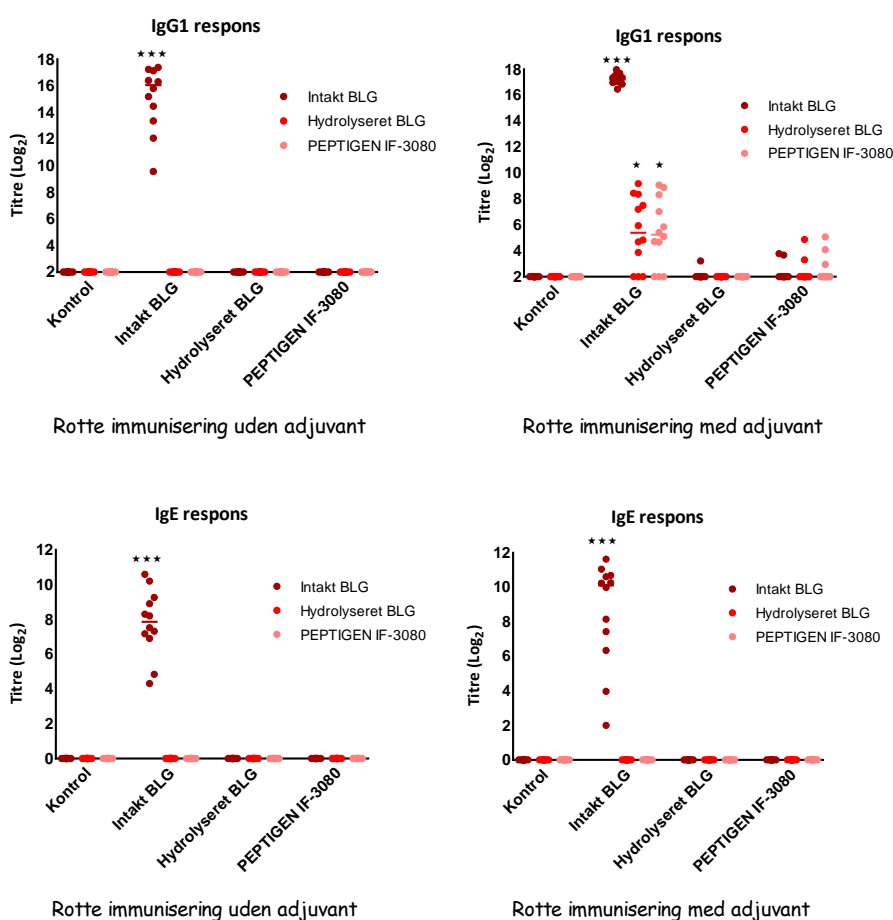
Del-projekt 2: Protein-kemiske analyser af hydrolyseret β -lactoglobulin og PEPTIGEN IF-3080 blev udført og resultaterne er som vist i tabel 2.

Tabel 2.

Valleprodukt	Aminosyrefordeling (%)			Peptidstørrelse (kDa)	Aggregeringsprofil		Mængde af intakt β -lactoglobulin (%)
	Hydrofobe	Polære	Ladede		Mængde (%)	Størrelse (kDa)	
Hydrolyseret BLG	37,64	13,64	48,75	$\leq 3,5$	> 40	29	0
PEPTIGEN IF-3080	36,98	17,53	45,46	$\leq 2,5$	> 50	22	0

Analyser af det specifikke antistofrespons (figur 4) viste at hverken hydrolyseret β -lactoglobulin eller PEPTIGEN IF-3080 kunne inducere specifikt antistof heller ikke med brug af adjuvans. Derimod bevarede

både hydrolyseret β -lactoglobulin og PEPTIGEN IF-3080 deres reaktive evne over for antistoffer fra rotter immuniseret med intakt β -lactoglobulin med brug af adjuvans.



Figur 4. Specifikt IgG1 og IgE antistofrespons.

Diskussion:

Del-projekt 1: Resultaterne med fordøjet β -lactoglobulin kan virke overraskende på baggrund af vores tidligere resultater med jordnøddeallergen Ara h 1. Her viste vi at fordøjet Ara h 1 indeholdende peptider under 2 kDa, hvoraf mere end 50% var aggregeret til komplekser af størrelser på op til 20 kDa, havde beholdt evnen til at sensibilisere i Brown Norway rotter [12]. Selv om fordøjet β -lactoglobulin indeholdt peptider med størrelser på op til 4,5 kDa hvoraf ca. 43% var aggregeret til komplekser af størrelser på op til 28 kDa, kunne disse produkter hverken inducere et specifikt IgG1 respons eller sensibilisere Brown Norway rotterne. Så selv om fordøjet β -lactoglobulin indeholdte større fragmenter som dannede komplekser af større størrelser end jordnøddeallergen Ara h 1, kunne disse ikke inducere allergi. Dette vidner om, at der ikke er en absolut sammenhæng mellem nedbrydeligheden af proteiner og deres allergen potentiale, ligesom der derved ikke er en absolut sammenhæng mellem størrelser af peptider og deres allergene potentiale. Dette peger på at flere karaktertræk er medbestemmende for det allergene potentiale af et fødevarerallergen og at dette ikke kun er baseret på størrelse, men ligeledes må være baseret på strukturen, sandsynligvis i samspil med andre karakteristika. På baggrund af nærværende studie kan det dog hverken

bekræftes eller afvises om en aggregering af fordøjelsesprodukter fra β -lactoglobulin og mælkeproteiner som helhed influerer på deres allergene. Tidligere studier indikerer imidlertid at måden hvorpå peptider aggregerer, er af afgørende betydning for deres allergene potentiale [13;17]. I modsætning til at have sensibiliserende evne, indikerer dette studie at fordøjelsesprodukterne fra β -lactoglobulin kan inducere tolerance, da der ved en samtidig immunisering med intakt β -lactoglobulin og fordøjelsesprodukter udløses et lang svagere specifikt IgG1 og IgE respons i forhold til immunisering med det intakte β -lactoglobulin alene. Sådanne resultater er ikke beskrevet tidligere og belyser en mulighed for at blandinger af intakte proteiner og fordøjelsesprodukter heraf kan inducere tolerancemekanismer. Ligeledes viser nærværende studie, at mens visse blandinger af fordøjelsesprodukter kan indeholde sensibiliserende evne, vil andre tilsvarende blandinger af fordøjelsesprodukter enten blive ignoreret af immunsystemet eller ligefrem kunne inducere tolerance.

Del-projekt 2: Dette studie viser, at hydrolyseret β -lactoglobulin samt PEPTIGEN IF-3080 hverken kan sensibilisere eller udløse et immunrespons når rotter immuniseres uden brug af adjuvans. Hos rotter immuniseret med brug af adjuvans kan antistoffer mod intakt β -lactoglobulin reagere med disse hydrolysater på en signifikant måde. Dette kan afspejle hvad man ser hos op til 20% af mælkeallergiske småbørn, hvor der er observeret reaktioner mod selv højthydrolyserede mælkeprodukter [18]. Det tænkes at den primære årsag til en sådan observeret reaktivitet til højt hydrolyserede modernælkserstatninger er et resultat af en utilstrækkelig hydrolyse af peptider fra mælkeproteinerne eller en dannelse af aggregater [19]. Om hvorvidt den reaktive kapacitet af hydrolyseret β -lactoglobulin og PEPTIGEN IF-3080 er et resultat af, at de små peptider heri aggregerer til større komplekser belyses ikke af dette studie.

Konklusion:

- Ved en fuldstændig *in vitro* fordøjelse af β -lactoglobulin ophæves det immunogene samt sensibiliserende evne, hvorimod dets reaktive evne bevares
- Små peptider fra fødevarerallergener kan agere meget forskelligt og der er derved ingen absolut sammenhæng mellem stabilitet over for fordøjelse og det allergene potentiale.
- Flere karaktertræk er medbestemmende for det allergene potentiale af et fødevarerallergen, en evne der foruden størrelsen af peptider ligeledes må være baseret på strukturen af disse, sandsynligvis i samspil med andre karaktertræk.
- Mens nogle peptideblandinger indeholder sensibiliserende evne, kan andre tilsvarende blanding af enten blive ignoreret af immunsystemet eller muligvis indeholde tolerogen kapacitet.
- En samtidig immunisering af fordøjet og intakt β -lactoglobulin reducerer den sensibiliserende evne af intakt β -lactoglobulin
- I tillæg til at undersøge den sensibiliserende evne af nedbrydningsprodukter kunne en undersøgelse af deres tolerogene evne tillige være af stor nytte
- Indflydelsen af aggregering af små peptider fra β -lactoglobulin kunne ikke belyses af dette studie
- Hydrolysater af valleprotein og β -lactoglobulin bevarer deres reaktive evne, men indflydelsen af en sådan evne kunne ikke belyses af nærværende studie

Referencer:

1. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. J Allergy Clin Immunol 2010; 125:S116-S125.

2. Cianferoni A, Spergel JM. Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergol Int* 2009; 58:457-66.
3. Grundy J, Matthews S, Bateman B, Dean T, Arshad SH. Rising prevalence of allergy to peanut in children: Data from 2 sequential cohorts. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:784-9.
4. Poulos LM, Waters AM, Correll PK, Loblay RH, Marks GB. Trends in hospitalizations for anaphylaxis, angioedema, and urticaria in Australia, 1993-1994 to 2004-2005. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:878-84.
5. Branum AM, Lukacs SL. Food allergy among children in the United States. *Pediatrics* 2009; 124:1549-55.
6. Branum AM, Lukacs SL. Food allergy among U.S. children: trends in prevalence and hospitalizations. *NCHS Data Brief* 2008;1-8.
7. Huby RDJ, Dearman RJ, Kimber I. Why are some proteins allergens? *Toxicol Sci* 2000; 55:235-46.
8. Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat Biotechnol* 1996; 14:1269-73.
9. Eiwegger T, Rigby NM, Mondoulet L, Bernard H, Krauth MT, Boehm A, Dehlink E, Valent P, Wal JM, Mills ENC, Szépfalusi Z. Gastro-duodenal digestion products of the major peanut allergen Ara h 1 retain an allergenic potential. *Clin Exp Allergy* 2006; 36:1281-8.
10. Diaz-Perales A, Blanco C, Sanchez-Monge R, Varela J, Carrillo T, Salcedo G. Analysis of avocado allergen (Prs a 1) IgE-binding peptides generated by simulated gastric fluid digestion. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:1002-7.
11. Vassilopoulou E, Rigby N, Moreno FJ, Zuidmeer L, Akkerdaas J, Tassios I, Papadopoulos NG, Saxoni-Papageorgiou P, van RR, Mills C. Effect of in vitro gastric and duodenal digestion on the allergenicity of grape lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:473-80.
12. Bøgh KL, Kroghsbo S, Dahl L, Rigby NM, Barkholt V, Mills EN, Madsen CB. Digested Ara h 1 has sensitizing capacity in Brown Norway rats. *Clin Exp Allergy* 2009; 39:1611-21.
13. Bøgh KL, Nielsen H, Madsen CB, Mills ENC, Rigby NM, Eiwegger T, Szepfalusi Z, Roggen EL. IgE epitopes of intact and digested Ara h 1: a comparative study in humans and rats. *Mol Immunol* 2011.
14. Rosendal A, Barkholt V. Detection of potentially allergenic material in 12 hydrolyzed milk formulas. *J Dairy Sci* 2000; 83:2200-10.
15. Qi W, Su RX, He ZM, Zhang YB, Jin FM. Pepsin-induced changes in the size and molecular weight distribution of bovine casein during enzymatic hydrolysis. *J Dairy Sci* 2007; 90:5004-11.
16. Moreno FJ, Mellon FA, Wickham MS, Bottrill AR, Mills EN. Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *FEBS J* 2005; 272:341-52.
17. Bøgh KL, Barkholt V, Rigby NM, Mills ENC, Madsen CB. Digested Ara h 1 loses sensitizing capacity when separated into fractions. *J Agric Food Chem* 2012.

18. Giampietro PG, Kjellman NI, Oldaeus G, Wouters-Wesseling W, Businco L. Hypoallergenicity of an extensively hydrolyzed whey formula. *Pediatr Allergy Immunol* 2001; 12:83-6.
19. Bahna SL. Hypoallergenic formulas: optimal choices for treatment versus prevention. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 101:453-9.

Publikationer og formidling

Peer-reviewed artikler

Bøgh KL, Kroghsbo S, Dahl L, Rigby NM, Barkholt V, Mills ENC, Madsen CB. Digested Ara h 1 has sensitizing capacity in Brown Norway rats. *Clin Exp Allergy* 2009; 39:1611-21

Bøgh KL, Barkholt V, Rigby N, Mills ENC, Madsen CB. Digested Ara h 1 loses sensitizing capacity when separated into fractions. *J Agric Food Chem* 2012; 60:2934-42

Bøgh KL, Nielsen H, Madsen CB, Mills ENC, Rigby N, Eiwegger T, Széfalusi Z, Roggen EL. IgE epitopes of intact and digested Ara h 1: A comparative study in humans and rats. *Mol Immunol* 2012; 51:337-46

Bøgh KL, Barkholt V, Madsen CB. Co-administration of intact and digested β -lactoglobulin may induce tolerance. (Indsendt til *Int Arch Allergy Immunol*)

Populærvideenskabelige artikler

Nielsen KK, Madsen C, Barkholt V. Mælkeproteiner og allergi. *Mælkeritidende* 2008; 10:252-4

Indlæg ved faglige kongresser, symposier, ect.

Nielsen KK, Kroghsbo S, Dahl L, Rigby N, Mills ENC, Madsen C. Degraded food allergens may retain their sensitizing capacity. Poster præsenteret ved: The 1st Arla Foods Research seminar, Århus, Danmark, 2007

Bøgh KL, Kroghsbo S, Dahl L, Barkholt V, Rigby NM, Mills C and Madsen C. Digested Ara h 1 retains its sensitising capacity in Brown Norway rats, Konferenceabstrakt og mundtlig præsentation ved: The 8th Nordic Symposium on Allergy, Sønderborg, Danmark, 2008

Bogh KL, Barkholt V, Rigby NM, Mills ENC, Madsen CB. Ara h 1-digesta lose sensitising activity when separated into fractions. Konferenceabstrakt, mundtlig præsentation og poster præsenteret ved: The XXX Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Istanbul, Tyrkiet, 2011

Bogh KL, Barkholt V, Madsen CB. Milk hydrolysis products may retain their allergenic reactivity. Konferenceabstrakt og poster præsenteret ved: The XXX Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Istanbul, Tyrkiet, 2011

Bogh KL, Barkholt V, Madsen CB. Digested BLG can induce tolerance when co-administered with intact BLG in Brown Norway rats. Konferenceabstrakt og mundtlig præsentation ved: The 2th Pediatric Allergy & Asthma Meeting, Barcelona, Spanien, 2011

Mødeindlæg

Data præsenteret ved møde hos Arla Foods Ingredients Group ved Grete Berntsen, Hans Bertelsen og John Sørensen, 5. december 2007 og 9. marts 2010.

Forskeruddannelse

Det MFF støttede projekt var et ph.d.-projekt ved Katrine Lindholm Bøgh med titlen: Sensitising capacity of peptides from food allergens. Projektet blev forsvaret 8. juni 2012.

I forbindelse med ph.d.-studiet blev der gennemført et eksternt forskningsophold på Institute of Food Research i Norwich, England.

Samarbejdsrelationer

I projektet har der været samarbejde med følgende institutioner:

Institute of Food Research, Norwich, England ved Clare Mills og Neil Rigby

Arla Foods Ingredients Group, Nr Vium, Videbæk, Danmark ved Grete Berntsen, Hans Bertelsen og John Sørensen

Resultaternes praktiske og videnskabelige betydning for mejeribruget

Resultaterne fra projektet bidrager til forståelsen af kompleksiteten af de mekanismer der er involveret i induceringen af fødevareallergi og belyser hvor forskelligartet virkningsmekanismen er for forskellige fødevareallergener. Projektet har bidraget til en mere detaljeret viden om hvilke egenskaber der er af betydning for proteineres allergene potentiale og i særdeleshed hvilke karakteristika der er af betydning for den allergene kapacitet af nedbrydningsprodukter af fødevareallergener. Dette er af særlig interesse i forbindelse med udviklingen og produktion af hypoallergene modermælkserstatninger og af specialprodukter ud fra mælkeingredienser.

Relationer til andre/nye samarbejdsprojekter

Nærværende projektet eller resultaterne opnået i dette projekt har ikke relationer til andre/nye mejerirelaterede samarbejdsprojekter.