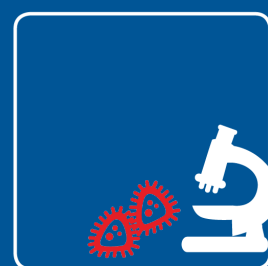


Jan Trige Rasmussen:

# PHLIP – Nye fosfolipidholdige fraktioner i mælk

PHLIP – New phospholipid fractions in milk



# Slutrapport

for samarbejdsprojekter under Mejeribrugets ForskningsFond (MFF)

## 1. Projektets titel

Dansk: Nye fosfolipidholdige fraktioner i mælk

English: New phospholipid fractions in milk (Acronym – PHLIP)

## 2. Projektleder

Jan Trige Rasmussen, seniorforsker, ph.d.

Aarhus Universitet, Institut for Molekylærbiologi & Genetik (<http://mbg.au.dk/>), Laboratorium for Molekylær Ernæring.

Tlf.: +45 28 83 51 04

E-mail: [jatr@mbg.au.dk](mailto:jatr@mbg.au.dk)

## 3. Øvrige medarbejdere

Maria Stenum Hansen, ph.d. (Alumne), Aarhus Universitet, Institut for Molekylærbiologi & Genetik.

## 4. Finansieringskilder

- a) Mejeribrugets ForskningsFond/Mælkeafgiftsfonden (45% af finansieringen)
- b) Institut for Molekylærbiologi & Genetik, Aarhus Universitet (44% af finansiering)
- c) Arla Food for Health (bidrag til Ph.d.-projekt, 11% af finansieringen)

## 5. Projektperiode

Projektperiode med MFF-finansiering: Januar 2019 – december 2021

## 6. Projektresume

Baggrund og formål: Fosfolipider udgør cellevægge og muliggør den vitale opdeling i intracellulære organeller. Ernæringsmæssigt er der fokus på fosfolipidet sfingomyelin, som regulerer cellevækst og er vigtig for nervefunktion. Sfingomyelin findes ikke i planter, men studier viser, at det forbedrer kognitiv udvikling og sundhed i tarm- og immunsystemet. Opfattelsen har været, at fosfolipidet i komælk hovedsageligt stammer fra fedtkuglemembraner (MFGM). Vores forskning udfordrer dette synspunkt. Komælk indeholder ~1% fosfolipid, hvoraf ~60% kommer fra MFGM. Resten findes i skummetmælk, hvor det tidligere har været kædet sammen med rester af MFGM, kaldet skummetmælksmembraner. Der findes imidlertid også fosfolipidpartikler kaldet ekstracellulære vesikler (EV) i mælk, som har en anden molekylær sammensætning end MFGM. Mejerifraktioner har varierende indhold af MFGM og EV, hvilket giver en heterogen fosfolipidsammensætning og forskellige biologiske egenskaber. Projektet PHLIP undersøger tilstedeværelsen af EV i mælkefraktioner og beskriver dem kvalitativt og kvantitativt i forhold til fedtkugler. Derudover opstilles en forskrift for analyse af fosfolipider i mejerifraktioner.

Opnåede resultater: Projektet og det associerede ph.d.-projekt har genereret betydelig viden og data, dokumenteret i 16 dimittend-rapporter, 6 konferenceindlæg, 1 bogkapitel og 5 fagfællebedømte artikler. Vi har udvidet vores viden om mælkeafledte ekstracellulære vesikler (MEV'er) og udviklet flere analysemetoder. Det er nu klarere, hvilke markører der afspejler den biologiske oprindelse af membranstrukturer i mælkefraktioner. Studier viser, at homogenisering medfører de største ændringer i MEV'ers integritet, mens cavitiation er mildere. Vi har også kortlagt optag af MEV'er i tarmceller og beskrevet MEV-lignende strukturer i mejeriindustrielle vallefraktioner. Flere studier evaluerer biologiske effekter af disse nye fosfolipidholdige fraktioner, fx MEV-effekter på makrofager. Dertil kommer dæmpende virkning på rotavirus infektivitet. Sammen med en forskergruppe fra Madrid har vi undersøgt, om MEV'er kan viderebringe regulativt materiale til en passende cellulær vært eller gennem kosten til mus, hvilket ser lovende ud. Opfølgende undersøgelser af MEV'ers biologiske effekter bør stadig foretages.

#### **English:**

Background and Purpose: Phospholipids form cell walls and enable the vital division into intracellular organelles. Nutritionally, there is a focus on the phospholipid sphingomyelin, which regulates cell growth and is important for nerve function. Sphingomyelin is not found in plants, but studies show that it improves cognitive development and health in the gut and immune system. It is assumed that the majority of phospholipids in cow's milk come from milk fat globule membranes (MFGM). Our research challenges this view. Cow's milk contains ~1% phospholipids, of which ~60% come from MFGM. The rest is found in skim milk, previously linked to MFGM remnants, called skim milk membranes. However, there are also phospholipid particles called extracellular vesicles (EV) in milk, which have a different molecular composition than MFGM. Dairy fractions have varying contents of MFGM and EV, resulting in a heterogeneous phospholipid composition and different biological properties. The PHLIP project investigates the presence of EV in milk fractions and describes them qualitatively and quantitatively in relation to milk fat globules. Additionally, a protocol for analyzing phospholipids in dairy fractions is established.

Achieved Results: The project and the associated Ph.D. project have generated significant knowledge and data, documented in 16 graduate reports, 6 conference presentations, a book chapter, and 5 peer-reviewed articles. We have expanded our knowledge of milk-derived extracellular vesicles (MEVs) and developed several analytical methods. It is now clearer which markers reflect the biological origin of membrane structures in milk fractions. Studies show that homogenization causes the most significant changes in MEV integrity, while cavitation is milder. We have also mapped the uptake of MEVs in intestinal cells and described MEV-like structures in dairy industrial whey fractions. Several studies evaluate the biological effects of these new phospholipid-containing fractions, such as MEV effects on macrophages. Additionally, there is a mitigating effect on rotavirus infectivity. Together with a research group from Madrid, we have investigated whether MEVs can transfer regulatory material to a suitable cellular host or through diet to mice, which looks promising. Studies on the biological effects of MEVs should still be conducted.

## **7. Projektets formål**

#### **Dansk:**

Mejerifraktioner har et varierende fosfolipidindhold, grundet tilstedeværelse af strukturer i form af fedtkugler og ekstracellulære vesikler, som hver især har sin egen fosfolipid-sammensætning og naturligvis forskellige biologiske egenskaber. I dette teknologisk fokuserede projekt ønsker vi at opnå et større kendskab til de

forskellige mælkeliipidpartikler i forskellige mejerifraktioner. Viden om fosfolipider i mælk og deres biologiske funktion vil således give ekstra vidnesbyrd om mælks særlige egenskaber. På sigt forventes fosfolipiderne at kunne udvindes og benyttes som funktionel ingrediens i mejeriprodukter og andre fødevarer. Projektet knytter sig stærkt til Modul 1 i Phd-projektet "Biological activities of dairy EVs", finansieret via et Arla and AU Framework og AUs PhD-skole GSNS, der i øvrigt beskæftiger sig med den biologiske forståelse af forefindende fosfolipid-fraktioner i mælk, især vesikler.

Projektets hovedformål er: 1) At undersøge og beskrive tilstedeværelsen af ekstracellulære vesikler i mælkefraktioner, og opnå en kvalitativ og kvantitativ beskrivelse af disse i forhold til forekomsten af fedt-kugler. 2) At opstille et paradigme for opgørelse og analyse af ophavet til fosfolipidet i relevante mejerifraktioner.

**English:**

Dairy fractions have varying phospholipid content due to the presence of structures such as fat globules and extracellular vesicles, each with its own phospholipid composition and distinct biological properties. This technology-focused project aims to gain a deeper understanding of the different milk lipid particles in various dairy fractions. Knowledge about phospholipids in milk and their biological functions will provide further evidence of milk's unique properties. In the long term, phospholipids are expected to be extracted and used as functional ingredients in dairy products and other foods. The project is closely linked to Module 1 of the PhD project "Biological activities of dairy EVs," funded by an Arla and AU Framework and AU's PhD school GSNS, which also deals with the biological understanding of existing phospholipid fractions in milk, especially vesicles.

Main project objectives: 1) To clarify the occurrence of extracellular vesicles in milk fractions, and reach a qualitative and quantitative description in relation to the appearance of MFG. 2) To establish a paradigm for analysis of EV and MFG in relevant dairy fractions.

**8. Projektets baggrund**

*Traditional vs. ny forståelse.* Den hidtidige opfattelse har været, at mælks fosfolipider primært stammer fra fedtkuglemembranen (MFGM). Nyere forskning tegner dog et andet billede: kun 60% kommer faktisk fra fedtkugler, mens de resterende 40% findes i skummetmælk (se figur 1). I årtier har man antaget, at fosfolipiderne i skummetmælk blot var rester fra fedtkuglemembraner. Denne forståelse er nu under forandring. Studier har vist, at mælk også indeholder andre fosfolipidholdige strukturer, kendt som ekstracellulære vesikler (EV).

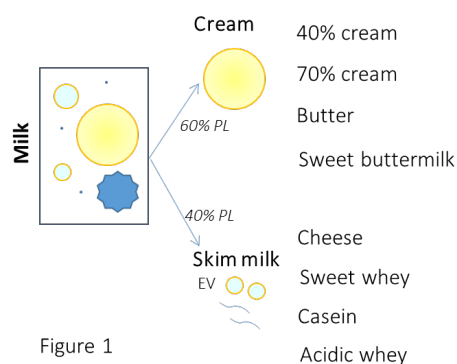


Figure 1

*Forskelle mellem fedtkugler og vesikler.* Mælks ekstracellulære vesikler (MEV) har en markant anden opbygning end fedtkuglerne. De har en anderledes proteinsammensætning og mangler den fedtkerne af triacylglycerol, som findes i fedtkugler. Desuden indeholder de mere af fosfolipiderne sfingomyelin og fosfatidylserin end fedtkuglernes membran.

*Sundhedsmæssig betydning.* Særligt interessant er sfingomyelin, som kun findes i animalske kilder. Dette stof spiller en vigtig rolle for cellemembraners funktion og er afgørende for nervesystemets udvikling. Forskning

peger på, at det kan have forebyggende virkning mod flere alvorlige lidelser som kræft, Alzheimers, mave-sygdomme, depression og multipel sklerose. Især lovende er studier der viser, at sfingomyelin-beriget mælk kan fremme den neurologiske udvikling hos for tidligt fødte børn. Denne viden åbner nye perspektiver for udvikling af specialiserede mælkeprodukter.

*To forskellige strukturer i mælk.* Konkret vides det, at fedtkuglerne er store strukturer på 0,1-15 mikrometer, som primært transporterer fedt. I kontrast er de ekstracellulære vesikler meget mindre - kun 50-300 nano-meter - og har et vandigt indre. De to strukturer har også forskellige sammensætninger af lipider, proteiner og nukleinsyrer, hvilket peger på, at de har forskellige funktioner i kroppen. Vi ved dog endnu ikke præcist hvilke sammensætningsmæssige forskelle der er imellem fedtkuglerne og de ekstracellulære vesikler i mælk. Denne viden kunne ellers hjælpe mejeriindustrien med at udvikle nye produkter med særlige sundhedsfrem-mende egenskaber

*Kommunikation mellem celler.* Forskningen viser nu, at ekstracellulære vesikler spiller en vigtig rolle i kom-munikation mellem celler i alle levende organismer. I modermælk formodes vesiklerne at overføre vigtige signaler til spædbarnets celler gennem deres indhold af nukleinsyrer. Det er særligt interessant, at disse ve-sikler ser ud til at kunne overleve fordøjelsen og måske endda til en vis grad forarbejdning til kommercielle mejeriprodukter.

*Forskningens fokus.* Vores nuværende forskning arbejder på at kortlægge fordelingen mellem vesikler og fedtkugler i forskellige mælkeprodukter. Vi udvikler samtidig nye metoder til at måle mængden af begge typer strukturer. Et centralt element i arbejdet er at undersøge hvordan vesikler fra forskellige mejeripro-dukter optages og fungerer i levende celler. Denne viden kan blive afgørende for fremtidens udvikling af sundhedsfremmende mejeriprodukter.

## 9. Projektets delaktiviteter i hele projektperioden

Projektet bestod af to arbejdsplaner (WP1 og WP2), opdelt i hhv 4 og 3 milepæle (MP). Samtidigt indlejre-des aktiviteterne fra Modul 1 i Phd-projektet "Biological activities of dairy EVs", finansieret via et Arla and AU Framework og AUs PhD-skole.

Projektforløb:

### Tidsplan

Work package	2019	2020	2021
WP1	XXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXX	XXXXXX
WP2	XXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXX
PhD-project, Module 1	XXXXXXX	XXXX	XXXXXXX
Reporting	X X	X X	X XX

### WP1 – Paradigme for analyse af EV og mælkefedtkuglemembraner (MFGM) i mælkefraktioner

MP1. Proteinmarkører

MP2. Lipid forskelle

MP3. Integritet af isolerede mælke EV

MS4. Nukleotid indhold

## **WP2 – Profilering af EV og MFGM i fosfolipidholdige mælkefraktioner**

MP5. Indsamling af egnede mejerifraktioner

MP6. Opgørelse af EV og MFGM tilstedeværelse i indsamlede fraktioner

MP7. Evaluering af det innovative potentiale

## **10. Afvigelser**

Projektet forløb i henhold til tidsplanen.

## **11. Projektets resultater**

### **WP1 – Paradigme for analyse af EV og mælkefedtkuglemembraner (MFGM) i mælkefraktioner.**

For at kunne afgøre den biologiske oprindelse af membranstrukturer i mælkefraktioner vil vi gerne udvide antallet af vores eksperimentelle redskaber til sådanne undersøgelser. Vi søger at etablere kvalitative og kvantitative metoder til at kunne differentiere imellem mælke ekstracellulære vesikler (MEV) og MFGM.

**MP1. Proteinmarkører.** Der er beskrevet gode proteinmarkører for MEVs, og vi har etableret analyser for tilstedeværelse af CD81, CD9 og CD63 vha Western blotting. Der er imidlertid ikke beskrevet specifikke markører for MFGM. Ved brug af antistoffer har vi afprøvet om udvalgte proteiner kan bruges. I overvejende grad ser det ud til at butyrophilin, adipophilin (PLIN2) og vimentin er kraftigt overrepræsenterede i MFGM. De anvendte antistoffer imod adipophilin og vimentin viser dog lav følsomhed og specificitet. Vi har foretaget studier af om måling af enzymaktivitet knyttet til membraner i mælk, specielt xanthinoxidase, giver information om den biologiske oprindelse af membranstrukturer i mælkefraktioner. Aktiviteten af xanthinoxidase knytter sig tilsyneladende ikke kun til EV eller MFGM (der dog mest i MFGM), men den kan evt. bruges til at beskrive, hvorledes et givet produkt har været behandlet (Pernille Moldrup Sørensen, projekt og speciale). Indledende eksperimenter er også foretaget med andre mælkeenzymmer, der eventuelt hovedsageligt stammer fra MEV (Mark Niedziella Merrison, bachelorprojekt). Vedr. enzymer knyttet til fosfolipidpartikler se i øvrigt Hansen and Rasmussen, 2021. Hvis der kunne opnås finansiering, så vurderes det værdifuldt at videreføre studierne af enzymaktiviteterne af diverse membranbundne enzymer, da det er vigtigt at kunne afgøre om et proteins/enzyms fysiske tilstedeværelse afspejles i en bibeholdt aktivitet efter processering.

**MP2. Lipid forskelle.** Målene for denne milepæl er nået, og vi har foretaget kvalitative og kvantitative fosfolipid-analyser, samt målt triacylglycerol og kolesterol. Kvalitative analyser kan også foretages vha. tyndtlagskromatografi. Resultater kan bl.a. ses i publikationer af SF Hansen et al., 2020, J. Food Engineering 276 og MS Hansen et al 2022, Int Dairy J. 127.

**MP3. Integritet af isolerede mælke EV.** Size-exclusion chromatography og nanoparticle-tracking analysis (NTA) blev benyttet. Med henblik på at kunne gennemføre bioaktivitetsstudier af MEV har vi lavet målinger, som angiver, at MEV kan fryses ved -80°C uden at kompromittere deres integritet. Studier af, hvorvidt frysetø processen påvirker bioaktiviteten er foretaget. Fx frysning ved -20°C, -80°C og flydende kvælstof samt skånsom optøning (på is), stuetemp. og 37°C (Rikke Halse Østergaard, Bsc). Enzymaktivitets-målingerne med xanthinoxidase angiver at dette enzym er mere stabilt når det optræder sammen med MFGM i forhold MEV. Fx tåler enzymet i MEV'er ikke frysning ved -20°C, mens -80°C tolereres.

**MP4. Nukleotid indhold.** Efter specifik ekstraktion tjekkes tilstedeværelse af ikke-kodende RNA (fx miRNA) med en Bioanalyser. Resultater kan ses i publikationer af MC López de las Hazas et al., 2021, Eur J. Nutrition 236 og MS Hansen et al 2022, Int Dairy J. 127.

**WP2 – Profilering af EV and MFGM i fosfolipidholdige mælkefraktioner.** Der sigtes imod at klarlægge tilstedeværelse af EV i mælk og sammenligne afledte fraktioner og produkter.

**MP5 og MP6: Indsamling af egnede mejerifraktioner, og opgørelse af EV og MFGM tilstedeværelse i indsamlede fraktioner.** Der er gennemgået analyser af en EV-holdig fraktion fra mælk behandlet med hhv. pasteurisering, pasteurisering fulgt op af homogenisering, og pasteurisering fulgt op af cavitation. Derudover har Arla Foods Ingredients (AFI) stillet valleafledte fraktioner til rådighed, nemlig "MFGM-10" og "MCI-EV" fra før og efter spray-tørring. Integriteten af ekstracellulære vesikler efter diverse behandlinger er undersøgt ved at følge proteinmarkører, lipidsammensætning og bevarelse af de indeholdte små nukleotidstreng. Efter at have afsluttet de sidste analyser er et manuskript udarbejdet, fagfælledbedømt og udgivet: MS Hansen et al 2022, Int Dairy J. 127 (se nedenstående tabel 1). Der er ligeledes blev lavet analyser på AFI-prøverne, se Ascanius et al., 2021, Dairy 2.

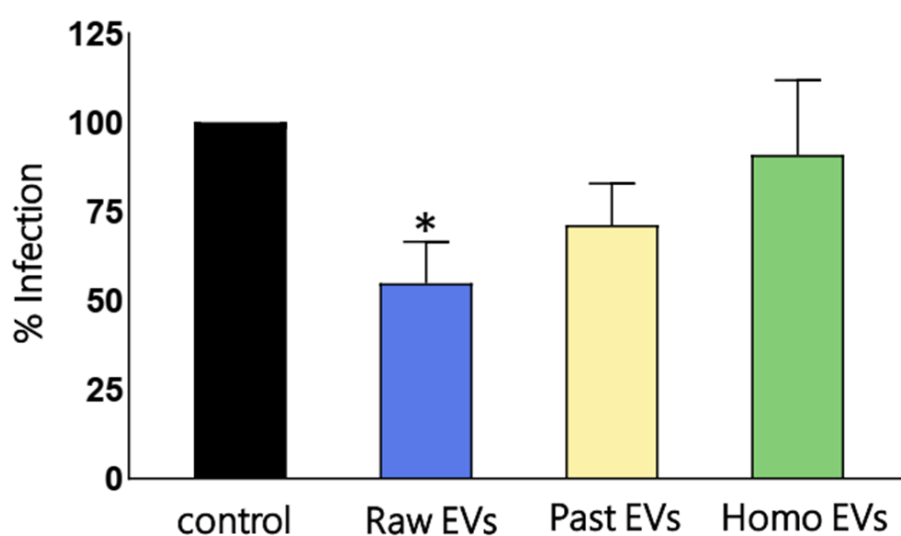
	Non-processed	Pasteurized	Pasteurized + cavitated	Pasteurized + homogenized
Size avg (nm)	154	155	177	233
PL relative to non-processed	1x	1.9x	2.0x	3.0x
TAG relative to non-processed	1x	6.3X	7.6x	83.8x
Protein relative to non-processed	1x	1.5x	1.8x	2.1x
Casein	(+)	+	+++	++++++
Beta-lactoglobulin	(+)	+++	+++	++++++
miRNA	+++	++	+++	++

**Tabel 1:** Sammenstilling af analyseresultater af isolerede MEV-holdige fraktioner fra ubehandlet mælk eller efter henholdsvis pasteurisering, pasteurisering + cavitation og pasteurisering + homogenisering. Se i øvrigt Hansen et al., 2022, Int. Dairy J. 127.

**MP7. Evaluering af det innovative potentiale.** Resultaterne opnået i dette projekt, sammen med den øvrige publicerede information, peger i høj grad på at mælkefraktioner indeholdende EV'er har en gunstig biologiske påvirkning. Derfor er der for tiden stor bevågenhed forbundet med dette i mejeribranchen som helhed. Den tilgængelige viden og erkendelser vedr. effekter under optag er dog stadig forholdsvist begrænset, hvilket kalder på iværksættelse af nye eksplorative studier på området.

**Modul 1 i Phd-projektet "Biological activities of dairy EVs".** Bioaktiviteten af MEV gennemføres ved analyse af effekter på celler i kultur. Ved brug af mikroskopi har vi kortlagt, hvorledes MEV optages i tarmceller (MS

Hansen et al., 2020, Biomedicines 8, 211). Vi undersøgt om MEV påvirker celler negativt, ved at lave viabilitetsmålinger (Ida Schnack Eg Gadegaard, Bsc. rapport). Cellerne tolererer MEV behandling. Vi har testet immunologiske effekter af MEV på makrofag-afledt cellelinje (RAW264.7), hvor respons i form af interleukinsecernerer monitoreres. Resultaterne viser at human og bovin MEV har en gunstig påvirkning efter et simuleret mikrobielt angreb (Susanne Rossen Ascanius, Mol biol projekt og fortsat i et Msc arbejde). Resultaterne findes i Ascanius et al., 2021, Dairy 2. Arbejdet er videreført i et system med humane makrofager THP-1 celler, hvor NLRP-3 responset evalueres (Ida Schnack Eg Gadegaard, projekt og speciale) og ligeledes har vi foretaget studier af, hvorvidt mælke EV'er hjælper tarmceller (Caco-2) under infektion (Maria S. Hansen, PhD-rapport). Endvidere har vi foretaget studier af MEVs effekter på Rotavirus infektivitet (Caroline Vangsøe, Bsc-, Mol Biol- og Msc-projekt, se figur 2 og Vangsøe et al., 2024) og på enteroendokrine tarmcellers sekretion af regulative forbindelser (GLP-1, Rikke Halse Østergaard Mol Biol projekt og speciale).



**Figur 2.** Effekt af industriel forarbejdning af mælk på den anti-rotavirale aktivitet af de isolerede EV'er. Isolerede MEV-holdige fraktioner stammer fra ubehandlet mælk (Raw), efter henholdsvis pasteurisering (Past) eller pasteurisering + homogenisering (Homo). Cellerne blev forbehandlet med EV'er (100 µg protein/mL) i 4 timer efterfulgt af rotavirusinfektion i 1 time. Data præsenteres som gennemsnit +SD (n ≥ 6), asterisks angiver statistisk signifikante forskelle (p < 0,05) i forhold til ubehandlet prøve (kontrol) (Fra poster af Dimitra Graikini, v. EFFoST møde, Dublin 7-8 november, 2022, resultater kvalificeret i Vangsøe et al., 2024).

## 12. Resultaternes betydning, herunder for mejeribrug

Nærværende projekt var rettet imod nye erkendelser vedr. denne væsentlige, men upåagtede, bioaktive fosfolipidfraktion i mælk. Nyttig ny viden om en kompleks mælkefraktion med stort innovativt potentiale er blevet indhentet. Alt i alt kan det hjælpe mejeriindustrien med at finde nye procesteknologiske parametre til fremstilling af nye mælkeprodukter med høj kvalitet, samt faciliterer tilførsel af værdifulde næringsstoffer for konsumenten. Vi er også kommet nærmere afgørelser om, hvilke biologiske funktioner, der kan knyttes

til MEV'er sammenlignet med andre fosfolipidstrukturer i mælk. Dertil spørgsmålet om, hvorvidt funktionen er bibeholdt efter processering. Relevansen er klar, idet MEV'er sandsynligvis allerede er indholdsstoffer i en lang række mælkeprodukter og fraktioner, eftersom de har udgangspunkt i skummetmælken.

Projektet forløb i henhold til tidsplanen med et tilsyneladende større udbytte end umiddelbart ventet.

#### *Væsentlige resultater i punktform*

- Vi har udvidet vores viden/erfaring vedr det system vi arbejder i.
- Metoder er nu til rådighed for analyse af MEV.
- Nået større afklaring vedr. markører for den biologiske oprindelse af membranstrukturer i mælkefraktioner.
- Gode resultater er opnået med studier af integriteten af ekstracellulære vesikler efter hhv. pasteurisering, homogenisering og cavitation. Gjort ved at følge proteinmarkører, lipidsammensætning og bevarelse af de indeholdte små nukleotidstrengene (publiceret).
- Kortlagt optag af MEV i tarmceller (publiceret).
- Beskrevet MEV-holdige fraktioner fra mejeriindustrielle vallefraktioner og ingredienser (til dels publiceret).
- Gennemført en del studier med henblik på, at evaluere biologiske effekter af disse nye fosfolipidholdige fraktioner i:
  - Makrofager afledt fra mus (RAW264.7). Humane MEV er reference (publiceret).
  - Effekter på komplekst tarmmodel-system (organoider) med samarbejdspartner i NL (endnu ikke afsluttet).
  - Undersøgt om bovine MEV kan viderebringe regulativt materiale til en passende cellulær vært eller gennem kosten til mus. Samarbejde med gruppe i Madrid (publiceret).
  - Makrofager af human oprindelse (THP-1).
  - Rotavirus infektivitet *in vitro* (publiceret).
  - Inkretin-sekretion fra L-celler i kultur.

#### ***Implementering af resultater i praksis og afledte projekter:***

Det var projektets præmis, at der skulle udveksles information med branchen. Vi har via MFFs projektmøder sikret, at vores erfaringer er blevet kommunikeret. Dertil kommer, at der har været en betragtelig publikationsaktivitet samt der er blevet uddannet en række kandidater, hvoraf de fleste har fundet ansættelse i mejeribrancherelaterede stillinger. Vi har desuden holdt møder med AFI, hvor vores erfaringer er blevet videregivet. Branchen kan således afgøre, om den vil videreudvikle på opnåede resultater og metoder. Som det antydes ovenfor, peger projektet i retning af opfølgende studier med bovine MEV'er i fokus. Potentialet for at øge produktionsvolumenen af en fosfolipidingrediens via værdiforædling af en sidestrømme blev undersøgt i GUDP-projektet DAIRY-SMART og AFH-projektet GutBioMod.

### **13. Formidling og vidensdeling vedr. projektet**

#### **Artikler i internationale tidsskrifter:**

Maria S Hansen, Ida SE Gadegaard, Eva C Arnsfang, Kristine Blans, Lene N Nejsum, Jan T Rasmussen. 2020. Specific and Non-Invasive Fluorescent Labelling of Extracellular Vesicles for Evaluation of Intracellular Processing by Intestinal Epithelial Cells. *Biomedicines* 8(7), 211.

Susanne R. Ascanius, Maria S. Hansen, Marie S. Ostenfeld, Jan T. Rasmussen (2021). Milk derived extracellular vesicles suppress inflammatory cytokine expression and nuclear factor- $\kappa$ B activation in lipopolysaccharide stimulated macrophages, *Dairy* 2 (2), 165-178.

María-Carmen López de las Hazas, Lorena del Pozo-Acebo, Maria S. Hansen, Judit Gil-Zamorano, Diana C. Mantilla-Escalante, Diego Gómez-Coronado, Francisco Marín, Almudena Garcia-Ruiz, Jan T. Rasmussen, Alberto Dávalos. (2021). Extracellular RNAs are unstable and rapidly degraded unless protected. Bovine-milk extracellular vesicles (EVs) confer protection to dietary miRNAs, although it remains unclear whether this importantly improves their chances of reaching host target cells to exert biological effects. *Eur J. Nutrition* 236.

Maria S Hansen, Sandra B Gregersen and Jan T Rasmussen. (2022) Bovine milk processing impacts characteristics of extracellular vesicle isolates obtained by size-exclusion chromatography. *Int. Dairy J.* 127, 105212.

Vangsøe, C., Graikini, D., Bojsen, A., Sánchez, L. and Rasmussen, J.T. (2024). Effects of milk extracellular vesicles from bovine, human, and caprine origin on rotavirus infectivity in cultured human intestinal cells. *International Dairy Journal* 154, 105937.

#### **Bidrag i fagbøger:**

Hansen M.S., Rasmussen J.T. (2021) Enzymes Associated with Milk Phospholipid Membrane Structures: Milk Fat Globule Membranes and Extracellular Vesicles. In: Kelly A.L., Larsen L.B. (eds) *Agents of Change*. Food Engineering Series. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8_6). Print ISBN 978-3-030-55481-1. Chap 6, pp 127-161.

#### **Populærvideenskabelige artikler:**

Det er ikke lige fedt – Forekomst og biologiske egenskaber af naturlige nano-vesikler i mælk. Maria S. Hansen og Jan T Rasmussen. Artikel i *Mælkeritidende* (4, p13, Forskning 4, 2021).

Skummetmælkens små hemmeligheder - Forekomst og bioaktivitet af en relativt nyopdaget form for fosfolipid-strukturer i mælk, kaldet ekstracellulære vesikler. Artikel i *Mælkeritidende* (1, p20-1, 2024).

#### **Studenteropgaver:**

Thesis, PhD progress report (Jan 2019). Maria Stenum Hansen. *Biological Activities of Dairy Milk Extracellular Vesicles*. (Eval Feb 2019).

Thesis, Master of Science Engineering (Jun 2019), René Klinge Iwang, The effect of fat globular membrane morphology on activity of phospholipase in relation to cheese yield and foam formation. (45 ECTS, Exam June 2019).

Thesis, Bachelor of Science (Jun 2019), Ida Schnack Eg Gadegaard, Assessment of biological effects of isolated bovine milk extracellular cells. (20 ECTS, Eval. Jul 2019).

Thesis, Molecular Biological Project (June 2019), Susanne Rossen Ascanius, Investigation of extracellular vesicles' biological effects on the intestinal immune system. (10 ECTS, Eval Jul 2019).

Thesis, Master of Science (Jun 2020), Susanne Rossen Ascanius, Investigation of biological effects of milk derived extracellular vesicles on macrophages. (60 ECTS, Exam June 2020).

Thesis, Molecular Biological Project (Jun 2020), Ida Schnack Eg Gadegaard, Immunological effect of extracellular vesicles in human macrophage-like cells. (10 ECTS, Eval Jul 2020).

Thesis, Molecular Biological Project (Jun 2020), Pernille Moldrup Sørensen, Evaluation of protein markers specific for extracellular vesicles and milk fat globule membranes. (10 ECTS, Eval Jul 2020).

Thesis, Bachelor of Science (Jun 2020), Caroline Vangsgøe, Bovine milk derived extracellular vesicles influence on rotavirus infection. (20 ECTS, Eval. Jul 2020).

Thesis, Bachelor of Science (Jun 2020), Rikke Halse Østergaard, Properties of bovine extracellular vesicles subjected to different treatments. (20 ECTS, Eval. Jul 2020).

Thesis, Master of Science (June 2021), Pernille Moldrup Sørensen, Preservation and storage stability of bovine milk derived phospholipid particles asses by monitoring xanthine oxidoreductase activity. (60 ECTS, Exam June 2021).

Thesis, Master of Science (June 2021), Ida Schnack Eg Gadegaard, Immunologic effects of isolated milk extracellular vesicles - Studies of cytokine secretion and inflammasome activation in human macrophage-like cells. (60 ECTS, Exam June 2021).

Thesis, Molecular Biological Project (Jun 2021), Rikke Halse Østergaard, Effects of bovine milk extracellular vesicles on glucagon-like peptide 1 secretion *in vitro*. (10 ECTS, Eval Jul 2021).

Thesis, Bachelor of Science (Jun 2021), Mark Niedziella Merrison, Gamma-glutamyl transferase in bovine milk extracellular vesicles and milk fat globule membranes. (20 ECTS, Eval. June 2021).

Thesis, PhD (June 2021), Maria Stenum Hansen, Characterization and bioactivities of bovine milk derived extracellular vesicles. (Defended Nov 2021).

Thesis, Molecular Biological Project (Aug 2021), Caroline Vangsgøe, Effects of bovine milk derived extracellular vesicles on rotavirus infection degree in cultured intestinal cells. (10 ECTS, Eval sept 2021).

Thesis, Master of Science (June 2022), Rikke Halse Østergaard, Effects of Milk Components on Glucagon-Like Peptide-1 and Glucagon-Like Peptide-2 Secretion *in vitro*. (60 ECTS, Exam June 2022).

#### **Indlæg ved faglige kongresser, symposier etc.:**

Oral presentation (3<sup>rd</sup> Oct. 2019), Susanne Rossen Ascanius, Maria Stenum Hansen, Jan Trige Rasmussen. Investigation of the biological effects of milk derived extracellular vesicles effect on cultured macrophages. 1<sup>st</sup> Annual symposium 2019, AU Hospital, Skejby.

Poster (Oct 2019), K. Blans, B. Petrat-Melin, X. Geng, L.B. Larsen, M.S. Ostefeld, L. Wiking, J.T. Rasmussen. The composition of various phospholipid containing dairy fraction/powders is indicative for the origin of the comprising membrane material. 11<sup>th</sup> NIZO Dairy Conference, Papendal, NL.

Oral presentation (Nov 2019), Kristine Blans, Maria S. Hansen<sup>1</sup>, Marie S. Ostefeld, and Jan T. Rasmussen. Isolation, characterization, and biological properties of milk extracellular vesicles. 16<sup>th</sup> International Symposium on Milk Genomics and Human Health – “Milk and health in a sustainability perspective”, Aarhus, 12-14 November 2019.

Poster (Nov 2019). Susanne Rossen Ascanius, Maria Stenum Hansen, Jan Trige Rasmussen. Investigation of the biological effects of milk derived extracellular vesicles effect on cultured macrophages. 16<sup>th</sup> International Symposium on Milk Genomics and Human Health – “Milk and health in a sustainability perspective”, Aarhus, 12-14 November 2019.

Oral presentation (28 Oct. 2021), Ida Schnack Eg Gadegaard, Maria Stenum Hansen, Jan Trige Rasmussen. Immunologic effects of isolated milk extracellular vesicles - Studies of cytokine secretion and inflammasome activation in human macrophage-like cells. 2<sup>nd</sup> Annual symposium 2021, Vejle Sygehus, 7100 Vejle.

Poster and short oral presentation (28 Oct. 2021), Rikke Halse Østergaard, Jan Trige Rasmussen. Effects of bovine milk extracellular vesicles on glucagon-like peptide 1 secretion in vitro. 2<sup>nd</sup> Annual symposium 2021, Vejle Sygehus, 7100 Vejle.

#### **14. Bidrag til kandidat- og forskeruddannelse**

Antal dimittendrapporter: 15 bacheloropgaver og specialer, samt 1 PhD afhandling.

Gæsteophold: Maria Stenum Hansen, Maastricht University, (supervisor: Tim Wolfs, Asc. Prof)

Gæsteophold på AU: María-Carmen López de las Hazas (Postdoc), Dimitra Graikini (Phd-studerende).

#### **15. Nye kontakter/projekter**

Se punkt 13.