



Exosomen und extrazelluläre Vesikel

Trennung, Aufreinigung und Charakterisierung mit der Asymmetrischen Fluss Feld-Fluss Fraktionierung gekoppelt mit der Mehrwinkel-Lichtstreuung

Dr. Gerhard Heinzmann

Postnova Analytics GmbH

Einleitung

Viele unterschiedliche Arten von pflanzlichen, tierischen und auch menschlichen Zellen schütten winzige Vesikel aus, deren Inhalt von anderen Zellen wieder aufgenommen und verwertet werden kann. Allgemein werden diese biologischen Partikel als extrazelluläre Vesikel bezeichnet. Exosomen sind eine Unterart der extrazellulären Vesikel; ihre Größe liegt im Bereich von 20 nm bis 100 nm. Daneben gibt es noch die bis zu 1 µm großen Mikrovesikel. Noch größer sind die apoptotischen Körperchen (*apoptotic bodies*), die im Rahmen des programmierten Zelltods durch Abschnürung ganzer Zellteile freigesetzt werden.

Mikrovesikel entstehen durch Ausstülpung der äußeren Zellmembran, Exosomen durch Einstülpung sogenannter Endosomen, die zum endosomalen Membransystem im Zellinnern gehören. Exosomen und Mikrovesikel transportieren im Rahmen des interzellulären Materialtransports molekulare Informationen von den Sender- zu den Empfängerzellen. Diese Transporteigenschaft macht Exosomen im Bereich der kontrollierten Wirkstoff-Freisetzung (Drug Delivery) zu einer hoch interessanten Substanzklasse.

Moleküle die von Exosomen transportiert werden sind z. B. Messenger-RNA, die den genetischen Code für ein neu zu bildendes Protein enthalten, wie auch Mikro-RNA, die die Übersetzung von Messenger-RNA reguliert, sowie Proteine mit vielfältigen Funktionen wie etwa die Adressierung der Zielzelle [1].

Trennung und Aufreinigung von Exosomen

Exosomen liegen meist in einem komplexen Gemisch mit anderen extrazellulären Vesikeln und auch größeren Bestandteilen, wie z. B. Zellfragmenten und Viren, vor. Eine wichtige Aufgabe ist die Abtrennung der vergleichsweise kleinen Exosomen von den größeren Probenbestandteilen, um eine möglichst reine Fraktion der Exosomen zu erhalten, die zum einen für weitere Untersuchungen z. B. mit Methoden der Proteomik, aber auch für pharmazeutische Anwendungen zur Verfügung steht.

Für die Trennung von Exosomen von störenden, größeren Partikeln hat sich die differenzielle Zentrifugation mit Fliehkräften bis zum einhunderttausendfachen der Erdbeschleunigung als Methode der Wahl etabliert. Zunehmend wird aber auch die asymmetrische Fluss Feld-Fluss Fraktionierung für die Trennung und Aufreinigung von Exosomen verwendet [2].

Prinzip der Feld-Fluss Fraktionierung

Die Feld-Fluss Fraktionierung (FFF) ist eine Technik, die, ähnlich wie die Gelpermeationschromatographie (GPC/SEC), die in einem geeigneten Lösungsmittel gelösten oder dispergierten Probenmoleküle und -teilchen in einem Trennkanaal auftrennt und danach mit einer geeigneten Technik detektiert [3]. Während bei der GPC/SEC die Trennung der Probenmoleküle aufgrund von Diffusion in die Poren des Trennsäulenmaterials erfolgt, wird bei der FFF ein quasi leerer Kanal als Trennmedium verwendet. Die Trennung findet durch ein Feld statt, das

in einem 90°-Winkel zum Elutionsstrom angelegt wird (Abbildung 1).

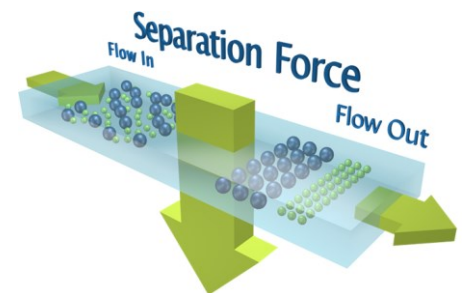


Abb. 1: Trennmechanismus der Feld-Fluss-Fraktionierung

Wird als Feld ein Querfluss verwendet, dann spricht man von der Fluss Feld-Fluss Fraktionierung. Die heute am meisten verbreitete Technik ist die asymmetrische Fluss Feld-Fluss Fraktionierung, auch kurz als AF4 bezeichnet. Hier wird nur auf einer Seite des Kanals ein Querfluss abgeleitet während die andere Seite statisch ist (Abbildung 2).

Mit der AF4 können sowohl Biopolymere und Proteine/Antikörper in wässrigen Lösungs- und Laufmitteln sowie Viren, Exosomen und Nanopartikel aller Art getrennt und charakterisiert werden. Die AF4 wird daher als universeller Separator bezeichnet.

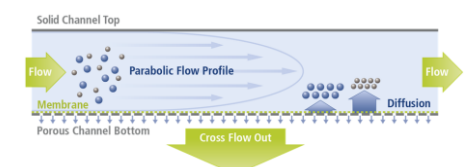


Abb. 2: Prinzip der asymmetrischen Fluss-Feld-Fluss-Fraktionierung (AF4)

Der Trennbereich der asymmetrischen Fluss Feld-Fluss Fraktionierung reicht von einer Größe von etwa 1 nm bis zu

einer Größe von etwa 1 µm. Damit liegt die Größe der Exosomen und extrazellulären Vesikel im Trennbereich dieser Technologie.

Detektion der Partikelgröße mit der Online-Mehrwinkel-Lichtstreuung

Mit einem Mehrwinkel-Lichtstreuendetektor (MALS = Multi-Angle Static Laser Light Scattering, Abbildung 3) können direkt nach der Trennung und Aufreinigung der Proben die Größen der Exosomen und extrazellulären Vesikel bestimmt werden [4].

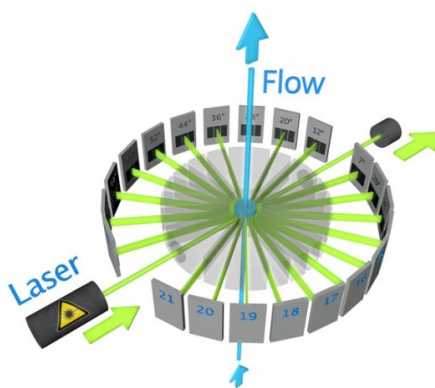


Abb. 3: Schematischer Aufbau eines Mehrwinkel-Lichtstreuendetektors

Ein Mehrwinkel-Lichtstreuendetektor misst das Streulicht einer Probe bei mehreren Winkeln; aus der Winkelabhängigkeit der Lichtstreuung kann nach einer Kalibration mit einem Partikel mit bekannter Größe direkt die Größe von unbekannt Partikeln bestimmt werden. Die Probenkonzentration und der Kontrastfaktor der Probe (so genannter dn/dc-Wert) müssen für die Größenbestimmung nicht bekannt sein.

Trennung einer Probe von Exosomen und extrazellulären Vesikeln von größeren Partikeln mit der asymmetrischen Fluss Feld-Fluss Fraktionierung

Abbildung 4 zeigt die Auftrennung einer Probe mit Exosomen und größeren Probenbestandteilen mit der Methode der asymmetrischen Fluss Feld-Fluss Fraktionierung. Die beiden Spezies sind gelb markiert. Im FFF-Trennmodus eluieren die kleinere Exosomen bei einer Elutionszeit von ca. 30 bis 35 min, vor den größeren Probenbestandteilen, die eine Elutionszeit von ca. 48 bis 55 min aufweisen.

Mit Hilfe der online gekoppelten, statischen Mehrwinkel-Lichtstreuung können direkt die Größen der eluierenden Partikel bestimmt werden (Abbildung 5).

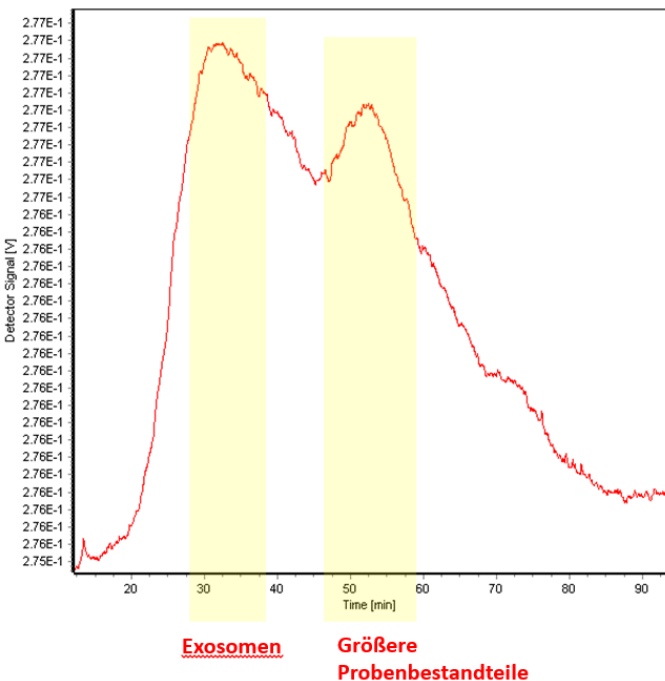


Abb. 4: Trennung von Exosomen und größeren Probenbestandteile mit der asymmetrischen Fluss Feld-Fluss Fraktionierung

Für den Peak bei einer Elutionszeit von ca. 30 bis 35 min finden sich Trägheitsradien im Bereich von etwa 25 nm was je nach Form der Partikel einem Durchmesser von ca. 50-60 nm entspricht, der zweite Peak bei einer Elutionszeit von 48 bis 55 min hingegen weist Trägheitsradien von 60-75 nm auf was einem Durchmesser von ca.120-150 nm entspricht. Der erste Peak entspricht daher der für Exosomen typischen Größe während der zweite Peak auf größere Probenbestandteile wie z. B. Viren oder Zellfragmente schließen lässt.

Anzumerken ist, dass bei der statischen und auch der dynamischen Lichtstreuung die Faustregel gilt, dass ein zehnfach größeres Teilchen ein etwa um den Faktor eine Million stärkeres Streulicht erzeugt. Im Fall der Abbildung 4 bedeutet das, dass im ersten Peak bei einer Elutionszeit von 30-35 min zahlenmäßig sehr viel mehr Partikel vorhanden sind als im zweiten Peak bei einer Elutionszeit von 48-55 min. Die Anzahl der vorhandenen Exosomen überwiegt also deutlich die Anzahl der größeren Zellfragmente und extrazellulären Vesikel.

Die mit der asymmetrischen Fluss Feld-Fluss Fraktionierung aufgetrennten Exosomen und größeren Probenbestand-

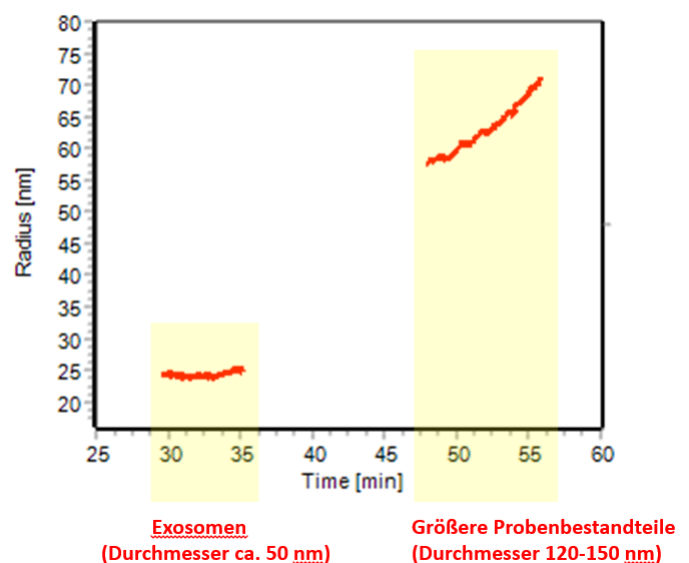


Abb. 5: Bestimmung der Größen von Exosomen und größeren Probenanteilen mit der online gekoppelten statischen Mehrwinkel-Lichtstreuung

teile können nun in einem Fraktionensammler aufgefangen werden. Die einzelnen Fraktionen stehen dann für weitere Untersuchungen, z. B. mit den Methoden der Proteomik, wie auch für pharmazeutische Anwendungen, in aufgereinigter Form zur Verfügung.

Zusammenfassung

Die asymmetrische Fluss Feld-Fluss Fraktionierung hat sich neben der differentiellen Zentrifugation als weitere, geeignete Technologie für die Trennung von Exosomen und extrazellulären Vesikeln von störenden, größeren Partikeln wie z. B. Zellfragmenten und Viren, etabliert. Nach der Trennung können die Größen der Exosomen und extrazellulären Vesikeln direkt mit der online gekoppelten, statischen Mehrwinkel-Lichtstreuung bestimmt werden. Danach können die von den störenden, größeren Partikeln abgetrennten Probenbestandteile in einem Fraktionensammler aufgefangen werden. Dann stehen sie für weitere Untersuchungen und Charakterisierungen, z. B. mit den Methoden der Proteomik, in aufgereinigter Form zu Verfügung.

Literatur

[1] Zeitschrift Trillium Diagnostik, „Extrazelluläre Vesikel - Die neuen Hoffnungsträger der Krebsdiagnostik“, Ausgabe TD 4/2015.

[2] Postnova Analytics, Application Note, “Measurement of Cancer Biomarker Enrichment in Exosomes: Separation Using Both Asymmetrical Flow and Centrifugal Field-Flow Fractionation”, University of Utah Salt Lake City/USA, 2018

[3] G. Heinzmann, „Grundlagen der Feld-Fluss Fraktionierung“, Analytik NEWS, 2015.

[4] G. Heinzmann, „Statische und Dynamische Lichtstreuung - Grundlagen und Anwendungen in der Polymer-, Protein- und Nanopartikelanalytik“, Analytik NEWS, 2016.