

Etablieren einer Methode zur Extraktion und Analyse von extrazellulären Vesikeln aus Muttermilch

Andrea Haid¹, Lukas Herzog², Christoph Mehofer³, Markus Wellenzohn³,
Christiane Gebhard², Harald Kühnel²

¹ Hochschule Campus Wien, Department Gesundheitswissenschaften, andrea.haid@hcw.ac.at

² Hochschule Campus Wien, Department Applied Life Sciences, harald.kuehnel@hcw.ac.at

³ Hochschule Campus Wien, Department Technik

Abstract. In dieser Studie wurden extrazelluläre Vesikel aus Kuhmilch (mEVs) durch eine Kombination mehrerer schonender Aufreinigungsschritte isoliert. Nach enzymatischer Kaseinentfernung mittels Chymosins folgten Filtration, Tangentialflussfiltration (TFF) und Größenausschlusschromatographie (SEC), wodurch eine effektive Abtrennung von Kaseinaggregaten und anderen Milchbestandteilen erreicht wurde. Die deutliche Abreicherung der Kaseinproteine konnte durch SDS-PAGE-Analysen nachgewiesen werden. Die Identität und Integrität der isolierten mEVs wurde anschließend durch SEC-Profile, digitale PCR-Analysen spezifischer microRNAs (let-7a, miR-21) sowie Atomkraftmikroskopie (AFM) bestätigt. Die Quantifizierung von RNA-, DNA- und Proteingehalten erfolgte mittels Fluoreszenzfärbungen und Qubit-Messungen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die kombinierte Anwendung dieser Verfahren eine reproduzierbare und schonende Anreicherung biologisch relevanter Milchvesikel ermöglicht.

Keywords: Milch-extrazelluläre Vesikel, Tangentialflussfiltration (TFF), Milch

Einleitung

Muttermilch enthält neben Nährstoffen eine Vielzahl bioaktiver Komponenten, die wesentlich zur Entwicklung von Säuglingen beitragen. In den letzten Jahren rückten insbesondere extrazelluläre Vesikel aus Milch (mEVs) in den Fokus der Forschung. Diese nanoskaligen Partikel transportieren Proteine, Lipide und Nukleinsäuren und spie-

len eine bedeutende Rolle bei der Regulation von Immunfunktionen, der Entwicklung des Darms sowie der allgemeinen Reifung des Säuglings (Mecocci et al., 2022).

Studien zeigen, dass Milch-EVs nicht nur die Immunabwehr stärken, sondern auch an der Steuerung von Wachstums- und Entwicklungsprozessen beteiligt sind und möglicherweise vor Stoffwechselerkrankungen schützen (Di et al., 2024a). Aufgrund ihrer Stabilität im Verdauungstrakt und ihrer Fähigkeit, genetische Informationen zu übertragen, gelten sie als wichtiger Bestandteil der Mutter-Kind-Kommunikation über die Ernährung.

Kasein ist eine Verunreinigung in diesem Prozess, die durch Säurefällung entfernt werden kann. Durch Absenken des pH-Werts auf etwa 4,6 fällt Kasein aus und kann anschließend durch Zentrifugation abgetrennt werden. Diese Methode ist einfach und effektiv, kann jedoch die Eigenschaften der EVs leicht beeinflussen.

Eine weitere Möglichkeit ist die enzymatische Behandlung mit Chymosin, das gezielt Kaseinmizellen spaltet und Kasein ausfallen lässt. Diese Methode gilt als besonders effektiv und schonend für die Vesikel (Weiskirchen et al., 2023).

Tangentialflussfiltration (TFF) ist eine Möglichkeit, den Prozess in einen größeren Maßstab zu bringen. Die Molke wird dann über TFF-Systeme nach einer klassischen Filtration (0,22 µm) über Poren mit 500 kDa Porengröße geleitet. Dabei werden größere Partikel und Proteine entfernt, während die EVs in der Retentat-Fraktion angereichert werden.

Weiters ist die Analytik von Milch-extrazellulären Vesikeln mit zahlreichen Herausforderungen verbunden, die sich aus der Komplexität der Milchmatrix und den Eigenschaften der Vesikel selbst ergeben. Die Heterogenität der Vesikelpopulation – etwa hinsichtlich Größe, biogenetischer Herkunft und molekularer Zusammensetzung – macht eine klare Zuordnung und Charakterisierung zusätzlich schwierig, da sich die Größen- und Dichtebereiche verschiedener EV-Typen stark überlappen (Di et al., 2024).

Methoden

Gewinnung der Milch-extrazellulären Vesikel:

- ▶ Entfettung der Milch: zwei Zentrifugationsschritte, 8000g/30 min und 12000g/60 min, es wird jeweils mit dem Überstand weitergearbeitet;
- ▶ Entfernung von Kasein:
 - ▶ enzymatische Behandlung mit Chymosin, pH-Wert wird auf 5,5 eingestellt, Zugabe von Chymosin und CaCl₂ und anschließende Inkubation bei 37°C für 60 min, nach Beendigung der Reaktion wird der pH-Wert wieder auf 7 eingestellt;
 - ▶ Fällung durch Ansäuern auf pH-Wert von 4,6 mit HCl;

- ▶ jeweils gefolgt von einer Zentrifugation 16 500 g/60 min;
- ▶ Entfernung von Partikeln: Filtration durch 0,22 µm-Sterilfilter;
- ▶ Aufkonzentrierung: Tangentialflussfiltration durch eine Membran mit 500 kD Porengröße;
- ▶ finale Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie (Sephacryl S500HR).

Zur Charakterisierung der isolierten Milch-EVs wurden Nukleinsäuren und Proteine mittels fluoreszenzbasierter Farbstoffe, die spezifisch an Zielmoleküle binden, durch Messung der Fluoreszenzintensität in einem Qubit-Fluorometer (Thermo Scientific) quantifiziert. Digitale PCR wurde verwendet, um miRNAs zu identifizieren und zu quantifizieren. Atomkraftmikroskopie (Morphologie und Größe) wurde zusätzlich zur noch spezifischeren Charakterisierung der mEVs eingesetzt.

Ergebnisse

Mit der HCl-Fällung konnte Kasein entfernt werden; mit dem Einsatz von Chymosin (Laabferment) konnte ein noch stärkerer Klärungseffekt erzielt werden (Abbildung 1A). Die Bestätigung durch eine SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese zeigt eine Abnahme der Kaseinbanden im Bereich von 25 bis 30 kDa während des Aufreinigungsprozesses (Abbildung 1B).

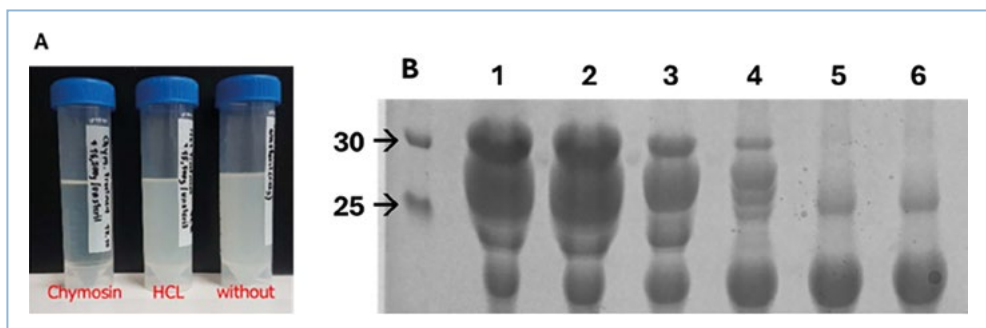


Abbildung 1: A) Resttrübung in verschiedenen Aufarbeitungsmethoden. Links enzymatisch mit Chymosin, in der Mitte mittels Fällung durch HCl und rechts ohne Fällung der Kaseinproteine. B) Verlauf der Kaseinklärung mittels SDS PAGE (links Molekulargewichtstandard-Banden bei 25 und 30 kDa). In der Spur 1 kann man die unbehandelte Milch sehen, Spur 2 zeigt die Milch nach erster Zentrifugation (8000 g), Spur 3 nach zweiter Zentrifugation (12000 g), Spur 4 nach Chymosinbehandlung, Spur 5 nach anschließender Zentrifugation (16500 g) und Spur 6 nach Filtration durch 0,22 µm Filter.

In der auf die Filtration und die Aufkonzentrierung mittels TFF folgenden SEC konnte erfolgreich ein mEV-Peak identifiziert werden. Dieser wurde durch digitale PCR identifiziert und befindet sich bei 0,4 Säulenvolumen im Chromatogramm (Abbildung 2A). Basierend auf der qPCR-Methode von Xue et al. (Xue et al., 2024), wurde innerhalb dieser Studie eine sequenzspezifische dPCR-Methode zur Detektion von mEV-assoziiierter

miRNA entwickelt. Um die Methode zu etablieren, wurden hsa-miR-21 und hsa-let-7a als Ziel-miRNAs gewählt. Die Fraktionen der SEC-Aufreinigung wurden getestet und es konnte eine Anreicherung der miRNAs in den mEV-Fraktionen detektiert werden (Abbildung 2B), auch spätere Fraktionen zeigen eine hohe Konzentration von nicht in mEV verpackter frei vorliegender miR21 an.

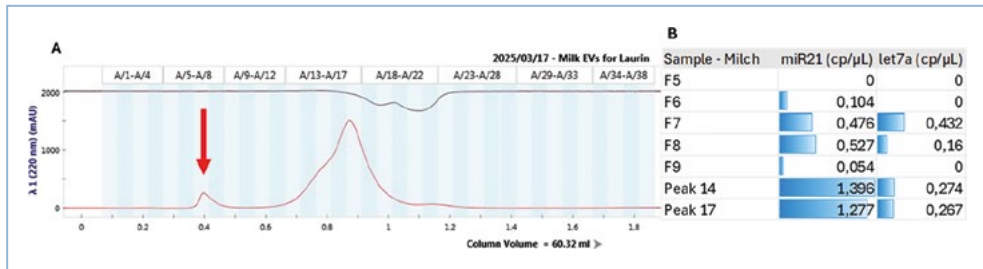


Abbildung 2: A) SEC-Chromatogramm von einer Molke-Probe, bei 0,4 Säulenvolumen ist ein mEV-Peak erkennbar und mit einem roten Pfeil markiert. B) Ergebnisse der digitalen PCR-Analyse: In dem mEV-Peak (F6–8) ist ein Anstieg der miR21- und let7a-Konzentrationen erkennbar; in den später eluierenden Fraktionen (Peak 14 und 17) findet man frei vorliegende miRNAs, deshalb auch hier ein starkes Signal vor allem von miR21.

Durch die anschließend durchgeführte fluorimetrische Quantifizierung mittels Qubit konnte die DNA-, RNA- und Proteinkonzentration von verschiedenen Milchprodukten ermittelt werden (Abbildung 3A). Die Größe und Morphologie der mEVs wurde mittels AFM bestimmt, es konnten Partikel im Bereich von 30 bis 150 nm identifiziert und vermessen werden (Abbildung 3B).

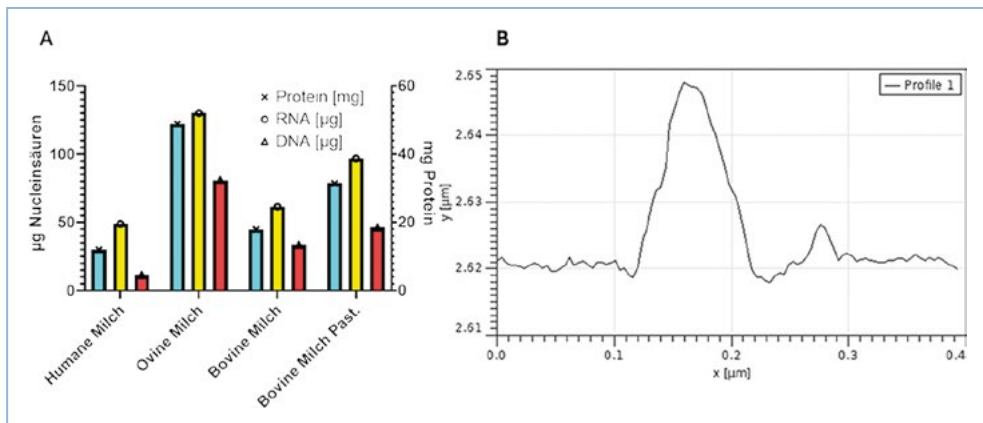


Abbildung 3: A) Fluorimetrische Messungen der Protein- und Nukleinsäuregehalte von Menschen, Schaf, Kuh und pasteurisierter Kuhmilch. B) AFM-Messung: Profil eines Partikels mit ca. 100 nm Durchmesser

Diskussion

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass das Präprozessieren von Milch für die Gewinnung extrazellulärer Vesikel bereits zuverlässig funktioniert und eine solide Grundlage für die weitere Aufreinigung bietet. Besonders die Anwendung von Tangentialflussfiltration (TFF) und Größenausschlusschromatographie (SEC) hat sich als vielversprechend erwiesen, um mEVs effizient und schonend anzureichern. Dennoch erreichen diese Methoden hinsichtlich Ausbeute und Reinheit derzeit noch nicht das Niveau der etablierten Ultrazentrifugation, die nach wie vor als Goldstandard gilt. Hier besteht weiterhin Optimierungsbedarf, insbesondere für großtechnische Anwendungen.

Die Fracht der mEVs konnte anhand von Fluoreszenzmessungen mittels Fluorometer quantifiziert werden und auch miRNAs, die hauptsächlich für die Effekte von mEVs verantwortlich sind, konnten mittels digitaler PCR quantifiziert werden.

Diese neu etablierte dPCR-Methode ist ein geeignetes Tool, um sequenzspezifisch miRNA in mEVs zu detektieren und zu quantifizieren. Durch die hohe Sensitivität der Methode lassen sich selbst geringe Konzentrationen von miRNAs detektieren. Diese Methode zeigt eine hohe Reproduzierbarkeit (Intra- und Intermediärpräzision) und höhere Spezifität im Vergleich zu kommerziell erhältlichen farbstoffbasierten dPCR-Assays. In Testansätzen zur Überprüfung der Linearität wurde gleichzeitig auch das Detektionslimit festgestellt, welches für beide miRNAs bei 1 copy/ μ l liegt.

In Kombination mit den AFM-Messungen, welche Partikel in dem entsprechenden Größenbereich nachweisen können, ließ sich die Isolierung von mEVs eindeutig belegen.

Wir danken der Humanmilchbank der Klinik Floridsdorf sowie der MA23, die diese Forschung im Rahmen des Projekts „Dünnschichttechnologien in interdisziplinären Anwendungsfeldern (DIA)“, Projektnummer 30-22, gefördert hat. Weiters danken wir für die Anschubfinanzierung der HCW.

Referenzen

- Di, S., Huang, Y., Qiao, W., Zhang, X., Wang, Y., Zhang, M., Fu, J., Zhao, J., & Chen, L. (2024). Advances in the isolation and characterization of milk-derived extracellular vesicles and their functions. *Frontiers in Nutrition*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1512939>
- Mecocci, S., Trabalza-Marinucci, M., & Cappelli, K. (2022). Extracellular vesicles from animal milk: Great potentialities and critical issues. *Animals*, *12*(23), 3231. <https://doi.org/10.3390/ani12233231>
- Weiskirchen, R., Schröder, S. K., Weiskirchen, S., Buhl, E. M., & Melnik, B. (2023). Isolation of bovine and human milk extracellular vesicles. *Biomedicines*, *11*(10), 2715. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102715>
- Xue, Y., Wang, K., Jiang, Y., Dai, Y., Liu, X., Pei, B., Li, H., Xu, H., & Zhao, G. (2024). An ultrasensitive and multiplexed miRNA one-step real time RT-qPCR detection system and its application in esophageal cancer serum. *Biosensors and Bioelectronics*, *247*, 115927. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115927>