Zusammenfassung

Hao Wang

Dr. med.

Characterization of neural precursor cell-derived exosome and its role in promoting neurite outgrowth

Fach/Einrichtung: Neurochirurgie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Alexander Younsi

Verletzungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) führen oft zu schwerwiegenden Folgen, ohne dass derzeit regenerativen Behandlungsansätze verfügbar sind. Die Transplantation von neuronalen Vorläuferzellen (NPCs) hat Potenzial gezeigt, die funktionelle Erholung nach traumatischen Hirn- oder Rückenmarksverletzungen (TBI und SCI) zu verbessern. Die vorteilhaften Effekte der NPCs werden teilweise ihren parakrinen Funktionen durch Exosomen zugeschrieben. Diese Studie konzentriert sich auf die Charakterisierung von aus NPCs isolierten Exosomen (NPC-Exos) und die Untersuchung ihrer Eigenschaften für potenzielle Anwendungen in der Behandlung von ZNS-Verletzungen.

NPCs wurden aus der subventrikulären Zone von E14 Wistar-Rattenembryonen isoliert und mittels Immunzytochemie und RT-qPCR charakterisiert. Nach der Expansion wurden NPC-Exos aus dem Kulturmedium mittels einer dreistufigen Differenzentrifugation und einer 0,22- μ m-Filtrationsmethode isoliert. Die Identifikation und Quantifizierung von NPC-Exos erfolgten mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), Western Blot mit mehreren exosomenspezifischen Markern und Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA). Zusätzlich wurde für die Proteomanalyse von NPC-Exos die Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) mit anschließender

bioinformatischer Ingenuity®-Pfadanalyse verwendet.

Die erfolgreiche Etablierung und Charakterisierung von primären Ratten-NPC-Kulturen wurde erreicht, was durch die Expression von Nestin und anderen neuronalen Vorläufermarkern ohne NeuN-, Tuj1- oder GFAP-Expression angezeigt wurde. TEM bestätigte die typische kelchförmige Morphologie der NPC-Exos, die weiterhin mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung der Marker CD63, CD81 und TSG101 bestätigt wurden. In der NTA zeigten NPC-Exos eine durchschnittliche Größe von 141 ± 7 nm. Die Proteomanalyse ergab eine signifikante Anreicherung der NPC-Exos mit Proteinen wie Syntaxin 1B, Netrin-1 und Integrin β -1, die u.a. an der Steuerung des Neuritenwachstums beteiligt sind.

Folglich zeigten Versuche an aus Rattenhirnen extrahierte primäre Neuronen, die mit verschiedenen Dosen von NPC-Exos behandelt wurden, dass eine hohe Exosomendosis zu einer signifikanten Zunahme der GAP-43-Immunintensität und damit zu einem verstärkten Neuritenwachstum *in vitro* führt. Zusätzlich konnte mittels induzierter PC12-Zellen, die als weiteres Neuritenwachstumsmodell dienen, eine signifikante Neuritenverlängerung nachgewiesen werden, wenn die Zellen mit steigenden Konzentrationen von NPC-Exos behandelt wurden.

Unsere Studie bestätigt somit die erfolgreiche Isolierung von Exosomen mit typischen Merkmalen aus primären NPC-Kulturen. Dass ihr Protein-Inhalt mit der Steuerung des Neuritenwachstums zusammenhängt und dieses in Zellkulturexperimenten mit neuronalen Zellen auch steigert, deutet auf das Potenzial von NPC-Exos als zellfreie Behandlungsoption für ZNS-Verletzungen wie TBI oder SCI hin und rechtfertigt weitere *in vivo* Studien.