



# UNIVERSITÄTS KLINIKUM HEIDELBERG

Neurochirurgische Klinik | Universitätsklinikum Heidelberg | Im Neuenheimer Feld 400 | 69120 Heidelberg

Deutsche Wirbelsäulenstiftung  
c/o Dr. med. Klaus Schnake  
Zentrum für Wirbelsäulen- und Skoliotherapie  
Malteser Waldkrankenhaus St. Marien  
Rathsberger Str. 57  
91054 Erlangen

**PD Dr. med.  
Alexander Younsi**

Funktionsoberarzt  
Neurochirurgische Klinik

## **Abschlussbericht für die erhaltene Forschungsförderung der Deutschen Wirbelsäulenstiftung 2021**

15.01.2024

Sehr geehrter Herr Schnake,  
sehr geehrte Damen und Herren der Deutschen Wirbelsäulenstiftung,

hiermit möchte ich Ihnen zu meinem u.g., durch Sie geförderten Versuchsvorhaben  
den Abschlussbericht zukommen lassen.

### 1. Antragssteller:

PD Dr. med. Alexander Younsi  
Neurochirurgische Klinik  
Universitätsklinikum Heidelberg  
INF 400  
69120 Heidelberg

### 2. Projektname:

Verbesserung der Neuroregeneration nach traumatischer Rückenmarksverletzung  
durch von neuronalen Stammzellen generierte Exosomen

### 3. Projekt-Code der Verwaltung des Universitätsklinikums Heidelberg:

D.10054054

### 4. Datum des Zuwendungsbescheids:

16.12.2021

### 5. Einleitung:

Traumatische Rückenmarksverletzungen führen bei betroffenen Patienten zu häufig lebenslang anhaltenden schweren Behinderungen [1]. Neben den großen körperlichen Leiden führt eine Rückenmarksverletzung mit konsekutiver Querschnittssymptomatik zu psychischen Folgeerkrankungen der Betroffenen und ferner zu erheblichen sozio-ökonomischen Belastungen, die sich auf die gesamte Gesellschaft auswirken. Zwar zielen verfügbare chirurgische Maßnahmen (z.B. Dekompression des Rückenmarks) auf die Abwendung sekundärer Schädigungen, die durch eine zusätzliche Kompression z.B. durch Hämatome oder Knochenfragmente verursacht werden können, ab [2]. Eine etablierte

Im Neuenheimer Feld 400  
69120 Heidelberg  
Tel. +49 6221 56-36305  
Fax +49 6221 56-6300  
alexander.younsi@  
med.uni-heidelberg.de  
www.klinikum.uni-heidelberg.de

medikamentöse oder sonstige Therapie, durch welche das akut geschädigte Rückenmark vor weiteren Folgeschäden „geschützt“ oder sogar eine Regeneration gezielt vorangetrieben werden können, existiert bis dato aber trotz hohem Forschungsaufwand nicht [3].

Im Fokus entsprechender präklinischer Forschungsvorhaben standen in den letzten Jahren v.a. zelluläre Therapien mit z.B. neuronalen Stammzellen (NPCs), für welche nach experimenteller SCI mehrfach eine Verbesserung der Neuroregeneration auf histologischer sowie auch funktioneller Ebene gezeigt werden konnte [4]. Allerdings blieben Überleben und Differenzierung von transplantierten NPCs meist reduziert und entsprechend war auch eine klinische Translation bislang wenig erfolgreich [5].

Eine neue, „zellfreie“ Therapiealternative könnte das „Sekretom“ der Stammzellen darstellen. Dieses ist definiert als die Menge der löslichen Proteine, freien Nukleinsäuren, Lipide aber auch Exosomen, die in den extrazellulären Raum sezerniert werden [6]. Durch Exosomen wird von den Stammzellen dabei der Transfer bioaktiver Materialien realisiert, außerdem findet durch sie ein „Cross-Talk“ mit anderen Zellen statt wodurch u.a. auch die molekulare Zusammensetzung des extrazellulären Milieus verändert werden kann [7]. Von NPCs sezernierte Exosomen sind noch weitestgehend unerforscht, es wird aber davon ausgegangen, dass sie miRNAs und Proteine tragen, welche für die Neuroregeneration, die Neuroplastizität und die Neuroprotektion äußerst relevant sind [8].

In Vorarbeiten wurde deshalb durch unsere Arbeitsgruppe zunächst die Generierung von primären NPCs aus der Subventrikulären Zone von Rattenembryos etabliert, zudem wurden Exosomen bereits aus dem Zellkulturüberstand von NPCs erfolgreich mittels Ultrazentrifugation isoliert, mittels Nanoparticle Tracking Analyse (NTA) sowie BCA-ELISA quantifiziert und mittels Western-Blot, Elektronenmikroskopie sowie Massenspektrometrie charakterisiert.

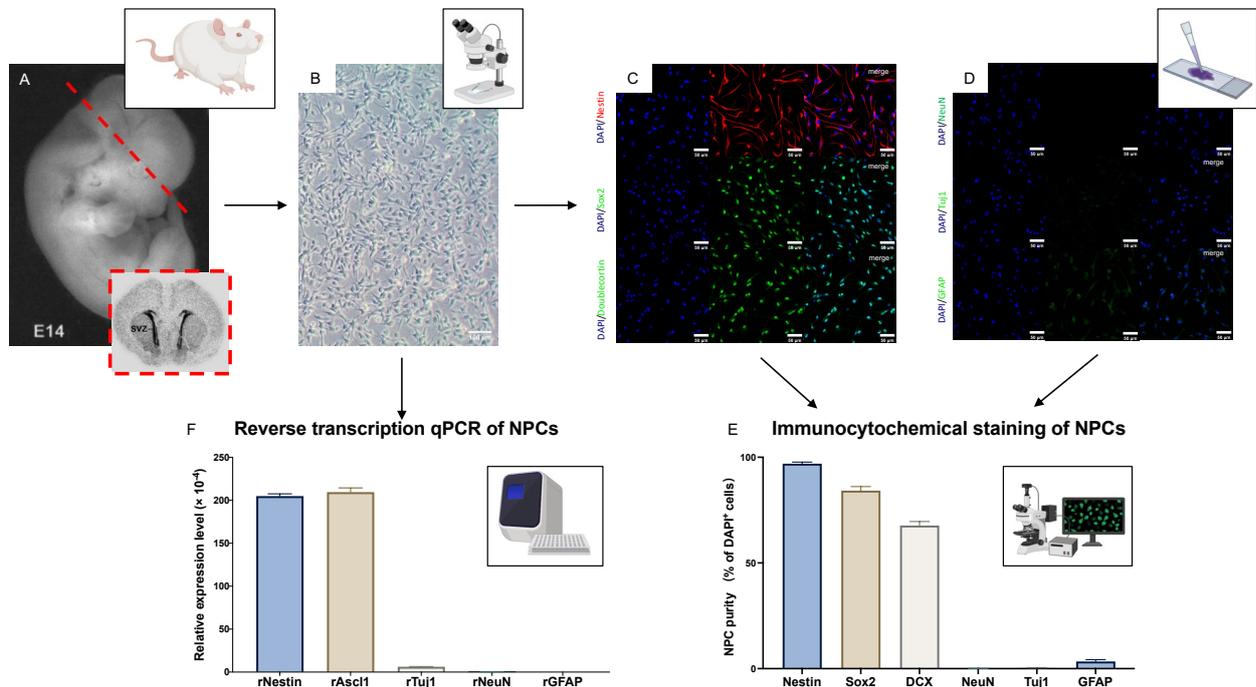
#### 6. Zielsetzung:

In diesem, durch Sie geförderten Versuchsvorhaben sollte nun der Hypothese nachgegangen werden, dass NPC-Exosomen als eine „zellfreie“ Therapie die Neuroregeneration auf histologischer sowie funktioneller Ebene verbessern sowie auch das posttraumatische Milieu nach einer traumatischen Rückenmarksverletzung im Tiermodell *in vivo* positiv beeinflussen könnten. Dies vor dem Hintergrund, eine Alternative zur Stammzelltransplantation als etabliertes, aber limitiertes Therapiekonzept zu entwickeln und diese und nach Anwendung im Tiermodell auf klinische Studien zu übertragen.

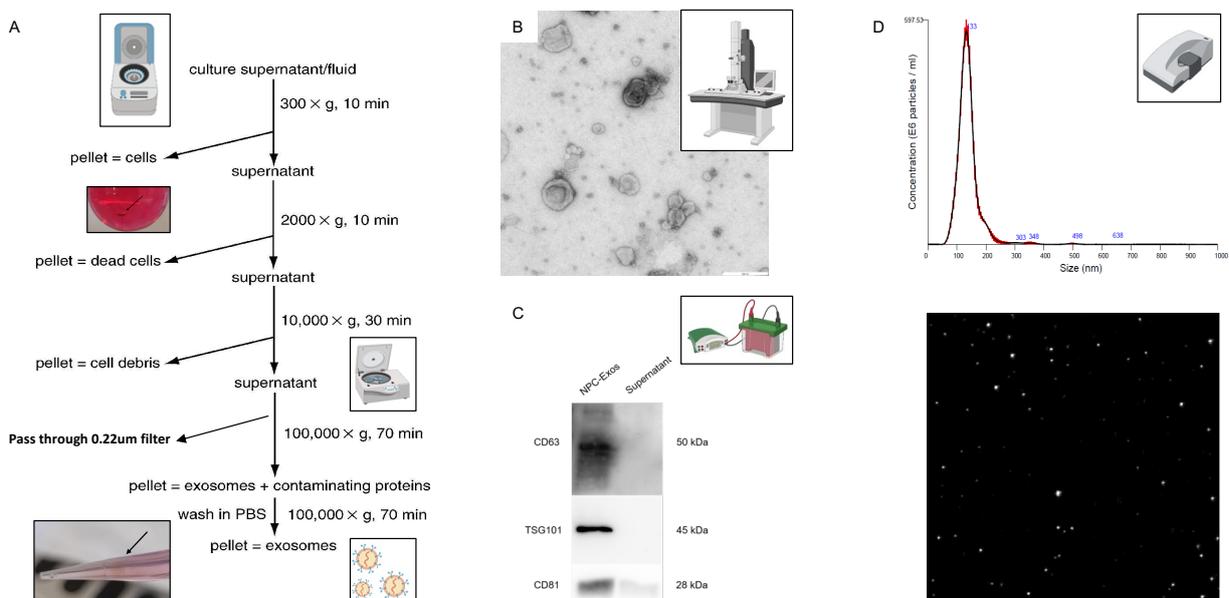
#### 7. Methoden und Ergebnisse:

Nach Erhalt der Förderung im Dezember 2021 wurden zunächst unsere bereits im Vorfeld begonnenen *in vitro* Experimente fortgeführt, um ein besseres Verständnis für potenzielle Mechanismen der späteren *in vivo* Therapie mit NPC-Exosomen zu entwickeln.

Kurz zusammengefasst konnten wir die Methodik der Exosomen-Isolierung durch Ultrazentrifugation weiter perfektionieren und so Exosomen von NPCs durch weitere Massenspektrometrie-Untersuchungen auf Proteinebene final charakterisieren (**Abb. 1 und 2**).

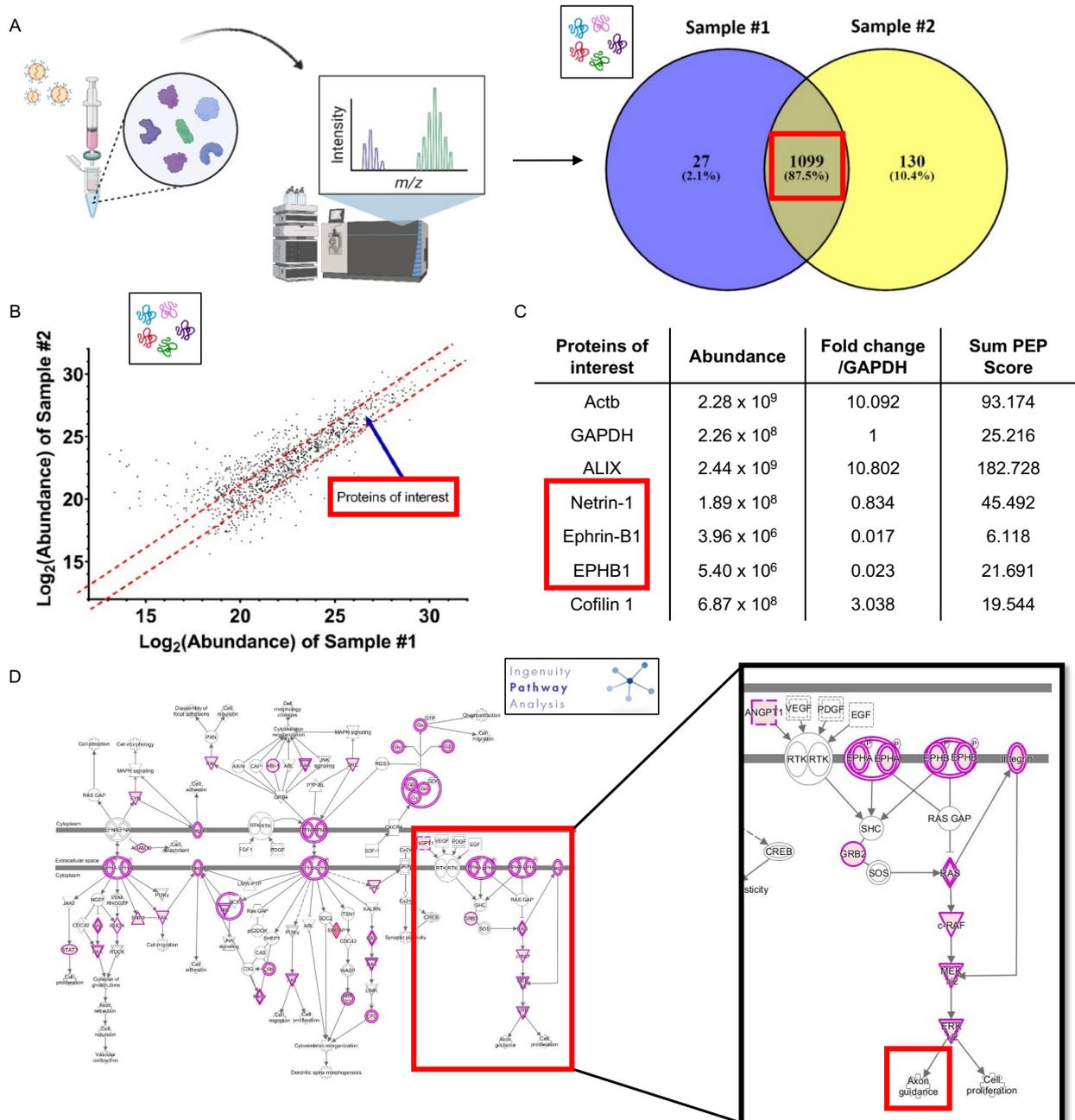


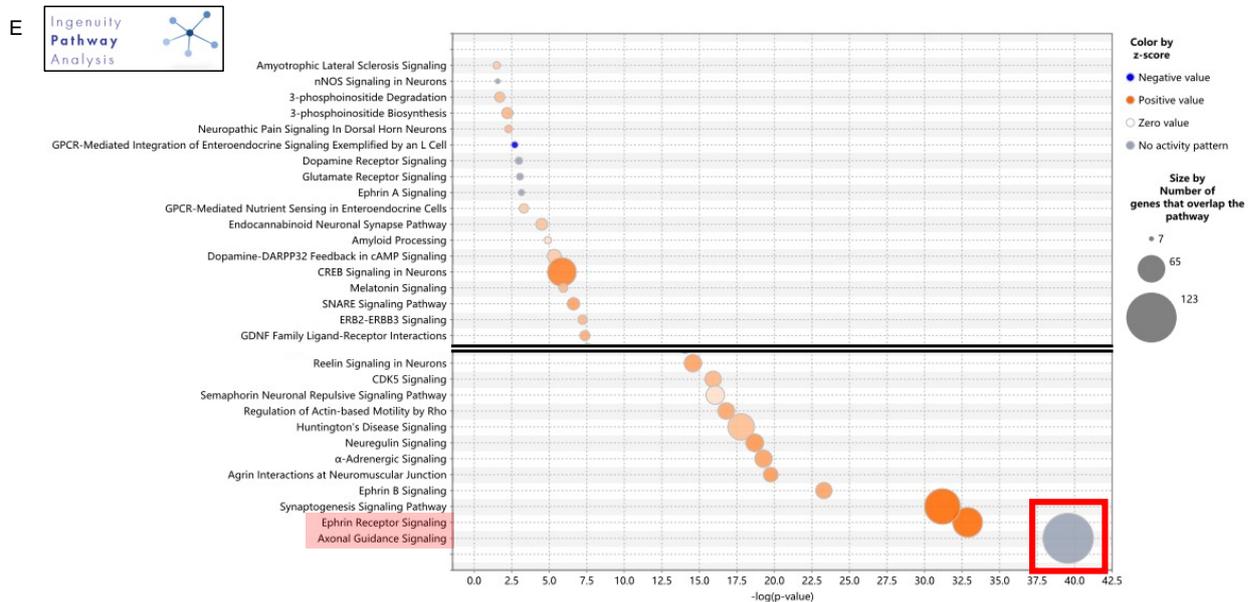
**Abb. 1:** (A) Gewinnung von neuronalen Stammzellen (NPCs) aus der subventrikulären Zone (schematisch) von 14-Tage-alten Ratten-Embryos. (B) Primärkultur der NPCs in Passage vier mit einer Konfluenz zwischen 80-90% unter dem Lichtmikroskop. (C+D) Charakterisierung der NPCs mittels Immunfluoreszenzfärbungen und Konfokalmikroskopie, dabei zeigt sich eine Expression der Stammzell-Marker Nestin (rot), Sox2 (grün) und Doublecortin (grün), jeweils kolokalisiert mit DAPI (blau), ohne Expression von Markern adulter Neurone (NeuN, Tuj1) oder Astrozyten (GFAP). (E) Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbungen und (F) zusätzlicher Nachweis der Marker-Expression auch auf RNA-Ebenen mittels RT-qPCR.



**Abb. 2:** (A) Ablauf der Isolierung von Exosomen aus dem NPC-Zellkultur-Überstand mit Darstellung der jeweiligen Zentrifugations-, Ultrazentrifugations- und Filtrationsschritte. (B) Nachweis einer für Exosomen typischen Vesikelform- und -größe mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), (C) der Expression der Exosomen-typischen Marker CD63, TSG101 und CD81 mittels Western Blot sowie (D) der Konzentration ( $10^{11}$  Partikel/ml) von Vesikeln in Exosomen-typischer Größe ( $147.5 \pm 67.5$  nm) mittels Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).

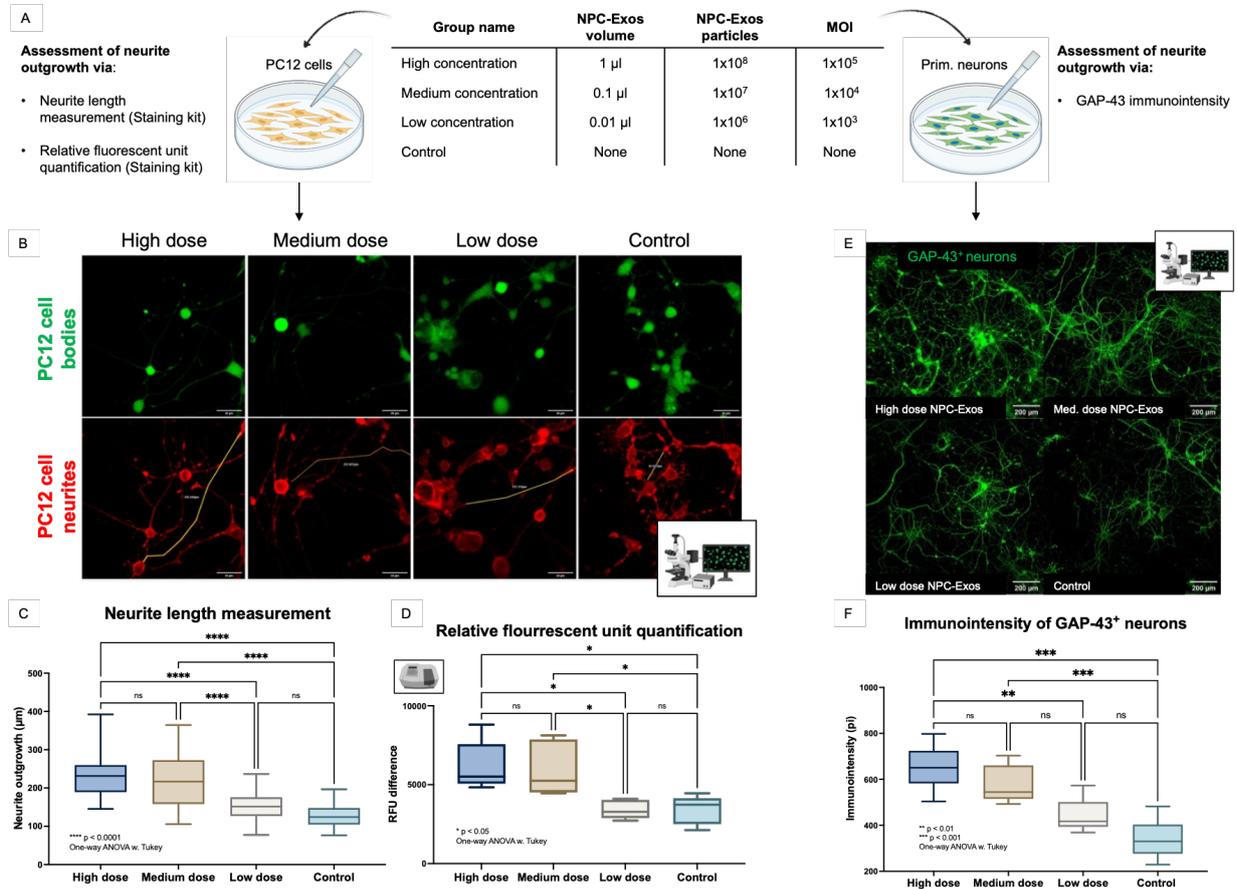
Dabei fanden sich weitere pro-neuroregenerative Signalmoleküle, welche biostatistisch umfassend ausgewertet und analysiert wurden. So konnte als eine der Hauptfunktionen der NPC-Exosomen auf Protein-Ebene nun die Förderung der axonalen Aussprossung/Elongation identifiziert werden (**Abb. 3**).





**Abb. 3:** (A) Schematischer Ablauf der Massenspektrometrie anhand von zwei Proben mit Venn-Diagramm, welches die sich überschneidenden Proteine der beiden NPC-Exosomen-Extraktionen zeigt. (B) Punktdiagramm, das die Verteilung der Häufigkeit der sich überschneidenden Proteine (nach  $\log_2$ -Transformation) demonstriert. (C) Tabellarische Auflistung der sieben häufigsten Proteine in den NPC-Exosomen. (D) und (E) Biostatistische Ergebnisse der Ingenuity® Pathway Analyse welche ein hohes Vorkommen von Proteinen, welche mit Signalwegen der axonalen Aussprossung assoziiert sind, zeigt.

Darauf aufbauend wurden nun *in vitro* Therapieversuche mit den NPC-Exosomen konzipiert, um deren Einfluss, bedingt durch ihre hohe Anreicherung von Proteinen wie Netrin-1 oder Ephrin-B1, auf die axonale Elongation nachzuweisen. Dazu wurde eine primäre Neuronen-Zellkultur aus dem Rückenmark von Ratten generiert. Zudem wurden kommerziell erwerbliche PC12 Zellen verwendet. Die NPC-Exosomen wurden in verschiedenen Konzentrationen dem Zellkulturmedium der jeweiligen neuronalen Zellen zugesetzt (alle 48 Stunden für bis zu sieben Tage) und die axonale Elongation über verschiedene Verfahren quantifiziert. So konnte durch die Applikation der NPC-Exosomen eine dosisabhängige Zunahme der axonalen Aussprossung bestätigt werden (**Abb. 4**).



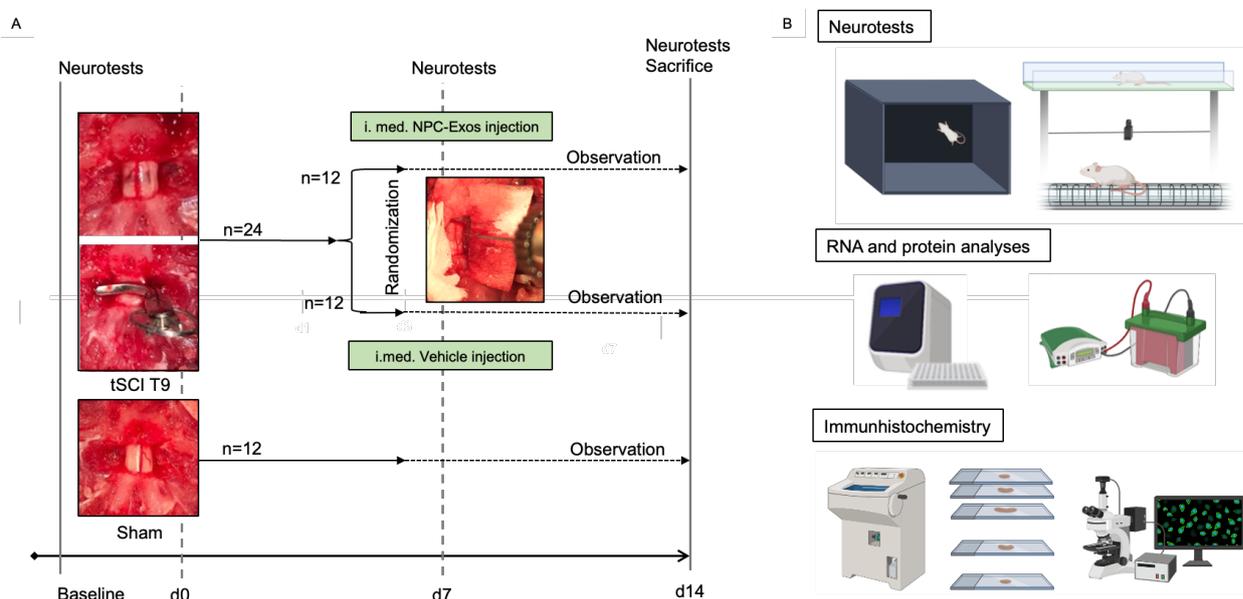
**Abb. 4:** (A) Aufbau des *in vitro* Therapieversuchs mit drei unterschiedlichen Konzentrationen von NPC-Exosomen, appliziert jeweils in das Zellkulturmedium von PC12 Zellen und primären Neuronen (alle 48 Stunden für sieben Tage). (B) Qualitativer und (C) quantitativer Nachweis einer in Abhängigkeit der NPC-Exosomen-Konzentration zunehmenden Axonen-Länge von PC12 Zellen sowie (D) Nachweis einer erhöhten Gesamtfluoreszenz von Axonen der PC12 Zellen durch die NPC-Exosomen-Therapie. (E) Qualitativer und (F) quantitativer Nachweis einer erhöhten Intensität der GAP-43-Färbung von Axonen in primären Neuronen ebenfalls in Abhängigkeit der NPC-Exosomen-Konzentration.

Als nächster Schritt des Versuchsvorhabens war nun der Beginn des *in vivo* Teils mit Applikation der NPC-Exosomen nach traumatischer Kompressions/Kontusions-Rückenmarksverletzung im Rattenmodell angedacht. Wie in unserem Antrag beschrieben, sollten die Fördermittel der Deutschen Wirbelsäulenstiftung maßgeblich in diesen Teil des Experiments fließen; entsprechend wurde für alle *in vitro* Experimente nur ein kleinerer Teil der Fördersumme, hauptsächlich für die immer wieder notwendige Isolierung der NPC-Exosomen, abgerufen. Allerdings war zunächst die Fortsetzung der Experimente nicht möglich, da ich mich aufgrund familiärer Umstände für eine längere Zeit im Jahr 2022 aus dem Arbeits- und Forschungsleben zurückziehen musste. Entsprechend erreichte Sie mein Zwischenbericht zum Ende des letzten Jahres auch verspätet, wofür ich mich erneut entschuldigen möchte. Dank der mir gewährten kostenneutralen Verlängerung der bewilligten Förderung bis zum 31.12.2023 konnte ich mit meiner Arbeitsgruppe im vergangenen Jahr nun aber den *in vivo* Teil des Versuchsvorhabens beginnen und zum größten Teil auch abschließen.

Als Traumamodell fungierte hierbei die Kompressions/Kontusions-Rückenmarksverletzung in Höhe BWK 9/10, diese wurde 24 weiblichen Wistar Ratten nach Laminektomie mit einem speziellen Clip (Verschlusskraft 28g) für 1 min zugefügt. In der akuten, posttraumatischen Phase wurden die Tiere intensiv gepflegt und observiert und erst nach sieben Tagen die „Therapie“, also in diesem Fall die stereotaktische Injektion der NPC-Exosomen in das verletzte Rückenmark durchgeführt. Ziel war es hierbei, das für die axonale Regeneration hostile Milieu der Akutphase zu umgehen und die NPC-Exosomen dann aber direkt

in das Rückenmarksgewebe, also an ihren potenziellen Wirkort, zu bringen, ohne die Risiken und Probleme einer systemischen Applikation in Kauf nehmen zu müssen.

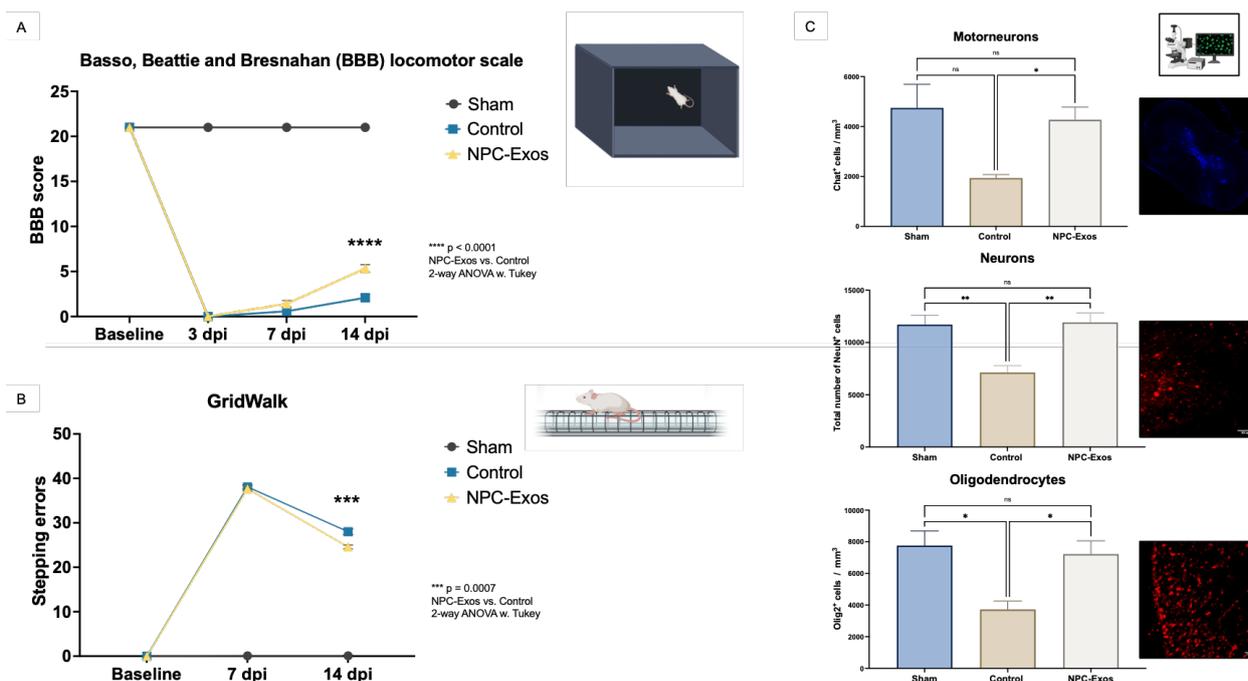
In Anbetracht der *in vitro* Vorversuche wurde mit einer Konzentration von  $1 \times 10^9$  NPC-Exosomen, gelöst in 10  $\mu$ l PBS, gearbeitet. Die stereotaktische intramedulläre Injektion erfolgte bei 12 Tieren bilateral jeweils 50  $\mu$ m rostral und kaudal der Läsion in Höhe BWK 9 in einer Tiefe von 1.5 mm (Injektionsgeschwindigkeit 0.5  $\mu$ l/min), also nicht in das Zentrum der Läsion mit Neuroinflammation, Nekrose und Astrogliose sondern in die perilesionale Region mit möglicherweise noch vermehrt intakten Neuronen. Bei den restlichen 12 Tieren wurde anstelle von NPC-Exosomen nur PBS als Kontrolle verwendet, die Randomisierung in die beiden Versuchsgruppen erfolgte intraoperativ per Loszug. Als weitere Versuchsgruppe und zum Vergleich mit nicht traumatisierten Tieren wurden 12 Ratten nur einer Sham-Operation ohne Rückenmarksverletzung (Laminektomie) und entsprechend zum Zeitpunkt der intramedullären Injektion nur einer erneuten Sham-Operation zugeführt. Zur Messung der funktionellen Erholung erfolgte zum Versuchsbeginn (vor Trauma/Sham-Operation), nach sieben Tagen (vor intramedullärer Injektion/Sham-Operation) sowie nach 14 Tagen eine neurobehaviorale Testung mittels der Basso, Beattie and Bresnahan (BBB)-Skala, dem Gridwalk Test und der CatWalk Ganganalyse. Der Versuch wurde dann 14 Tage nach Trauma/Sham-Operation bzw. sieben Tage nach intramedullärer Injektion/Sham-Operation durch die Euthanasie der Tiere beendet. Jeweils neun Tiere je Gruppe wurden direkt im Anschluss mit PBS und Paraformaldehyd perfundiert, dann wurden die Rückenmäcker entnommen und mit Succrose kryofixiert sowie bei  $-80^\circ$  konserviert. Das so präparierte Gewebe wurde im Verlauf mit einem Kryostaten axial ( $n=6$ ) sowie sagittal ( $n=3$ ) geschnitten, um Längs- sowie Querschnitte des Rückenmarks für die Immunhistochemie zu erhalten. Die restlichen drei Tiere je Gruppe wurden lediglich mit PBS perfundiert, dann wurden direkt die Rückenmäcker entnommen und diese sofort schockgefroren und konserviert. Im weiteren Verlauf soll das so präparierte Gewebe für RNA- und Proteinanalysen verwendet werden (**Abb. 5**).



**Abb. 5:** Schematische Darstellung des *in vivo* Versuchsaufbaus mit Clip-Kompressions/Kontusions-Rückenmarksverletzung in Höhe BWK 9/10 bei  $n=24$  sowie Sham-Operation (nur Laminektomie) bei  $n=12$  weiblichen Wistar Ratten mit nach sieben Tagen folgender intramedullärer Injektion von NPC-Exosomen oder Placebo (PBS) und Versuchsende nach 14 Tagen. (B) Schematische Darstellung der zur Baseline, an Tag 3, 7 und 14 nach Rückenmarksverletzung durchgeführten Neurotests (BBB-Skala, Gridwalk und CatWalk Ganganalyse) sowie der nach Versuchsende durchgeführten Gewebeaufbereitung (für RNA- und Protein Analysen sowie Immunhistochemie).

Zunächst wurden dann die Ergebnisse der BBB-Skala und des Gridwalk Tests ausgewertet. Außerdem wurde mit den immunohistochemischen Färbungen der axialen Rückenmarksschnitte und der Konfokalmikroskopie mit den entsprechenden Bildanalysen (semi-automatische Zell-Quantifizierung) begonnen. Erfreulicherweise zeigte sich bei Tieren, welche die intramedulläre Injektion von NPC-

Exosomen erhalten hatten, sieben Tage nach der „Therapie“ im Vergleich zu den Tieren der Kontroll-Gruppe eine signifikant verbesserte funktionelle Erholung gemessen am Punktwert auf der BBB-Skala und den Schrittfehlern im Gridwalk Test. Zudem konnte in den axialen Rückenmarksschnitten durch die „Therapie“ mit NPC-Exosomen nach 14 Tagen eine größere Zahl an Oligodendrozyten (Olig2<sup>+</sup> Zellen), Neuronen (NeuN<sup>+</sup> Zellen) und Motoneuronen (ChaT<sup>+</sup> Zellen) nachgewiesen werden (**Abb. 6**).



**Abb. 6:** (A) BBB-Punktwerte der Sham- Kontroll- und mit NPC-Exosomen behandelten Tiere zu allen Zeitpunkten mit Nachweis einer signifikanten Verbesserung 14 Tage nach Rückenmarksverletzung. (B) Ebenso Nachweis einer signifikanten Reduktion von Schrittfehlern 14 Tage nach Rückenmarksverletzung in den mit NPC-Exosomen behandelten Tieren. (C) Vorläufige Ergebnisse der Immunhistochemie (n=3/Gruppe) mit einem möglichen Hinweis auf eine durch NPC-Exosomen erhöhte Anzahl von Motoneuronen (ChaT<sup>+</sup> Zellen), Neuronen im Allgemeinen (NeuN<sup>+</sup> Zellen) und Oligodendrozyten (Olig2<sup>+</sup> Zellen) im Rückenmark 14 Tage nach Verletzung.

## 8. Diskussion:

Zusammenfassend konnte die dem Versuchsvorhaben vorangestellte Hypothese durch die dargelegten Ergebnisse bestätigt werden: NPC-Exosomen können bei periläsionaler, intramedullärer Injektion in der subakuten Phase nach traumatischer Rückenmarksverletzung im Tiermodell bereits im kurzfristigen Verlauf sieben Tage nach der „Therapie“ die funktionelle Erholung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen verbessern. Auch auf histologischer Ebene zeichnet sich eine verbesserte Neuroregeneration, bislang charakterisiert durch eine höhere Anzahl von Oligodendrozyten und Neuronen ab. Mechanistisch könnte hierfür eine verbesserte axonale Elongation um bzw. ggf. auch über die traumatische Läsion im Rückenmark hinweg die Ursache sein – dies legen die hohe Anreicherung der NPC-Exosomen mit für die axonale Elongation verantwortlichen Proteinen sowie deren *in vitro* nachweisbare Effekte auf die axonale Elongation verschiedener Neuronen nahe. Die noch ausstehenden Untersuchungen müssen nun zeigen, dass in der Tat auch *in vivo* durch die applizierten NPC-Exosomen eine axonale Elongation immunhistochemisch stattfindet und dass auf RNA- und Protein-Ebene Signalwege der axonale Elongation hochreguliert werden. Dazu gehört auch die CatWalk Ganganalyse, welche über die spezifische funktionelle Erholung der auf- und absteigenden Faserbahnen noch weitere Ergebnisse liefern kann. Da die NPC-Exosomen noch mit vielen weiteren Proteinen beladen sind wird aber genauso wichtig sein, wie sie sich auf das posttraumatische Milieu auswirken und ob sie dieses im Sinne einer reduzierten Astrogliose, Neuroinflammation und Narbenbildung verbessern.

## 9. Ausblick

Diese vorläufigen Daten wurden zusammen mit den Ergebnissen der *in vitro* Vorversuche Ende des letzten Jahres auf der DWG-Jahrestagung in Stuttgart vorgestellt und erhielten dort den 3. Vortragspreis. Seitdem gehen die Auswertungen mit Hochdruck weiter, so erfolgt aktuell die aufwendige Analyse der > 100 Parameter der CatWalk Ganganalyse. Außerdem werden weitere immunhistochemische Färbungen an den axialen und sagittalen Rückenmarksschnitten durchgeführt, um den Einfluss der NPC-Exosomen auf die neuronale Regeneration, die axonale Elongation, die Synapsenbildung sowie die Myelinisierung, aber auch die posttraumatische Neuroinflammation, Astrogliose und Narbenbildung zu evaluieren. Die Untersuchung der Rückenmäcker auf RNA- und Protein-Ebene ist noch ausstehend und wird in Abhängigkeit der immunhistochemischen Ergebnisse zeitnah spezifiziert und durchgeführt werden (verschiedene Targets sind geplant).

Die Mittel aus der bewilligten Förderung sind, wie Sie dem beiliegenden Mittelverwendungsnachweis entnehmen können, pünktlich zum Ablauf der Förderphase aufgebraucht gewesen. Die noch ausstehenden Untersuchungen werden deshalb wie bereits bei der Antragsstellung zugesichert mit Hausmitteln weiterfinanziert und fortgesetzt, sodass in diesem Jahr sowohl mit allen Ergebnissen als auch mit einer Publikation gerechnet werden kann. Entgegen der im Zwischenbericht angekündigten Strategie, die *in vitro* Ergebnisse separat zu publizieren, haben wir uns entschieden, diese mitsamt der *in vivo* Ergebnisse in einem umfassenden Manuskript zu beschreiben. In diesem, sowie in allen mit dem Versuchsvorhaben assoziierten Präsentationen wird die Deutsche Wirbelsäulenstiftung selbstverständlich als Förderer genannt, außerdem werden wir Ihnen das Manuskript umgehend zukommen lassen.

Im Rahmen meiner gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich nun erneut sehr herzlich bei Ihnen für Ihre Unterstützung bedanken! Insbesondere ist dadurch auch die medizinische Doktorarbeit von Herrn Hao Wang, welcher das Versuchsvorhaben maßgeblich mit durchgeführt hat, möglich gewesen, welche er bereits verfasst hat und nun bald verteidigen darf.

Viele herzliche Grüße aus Heidelberg!



Ihr Alexander Younsi

## 10. Literatur

1. Furlan JC, Fehlings MG (2009) The impact of age on mortality, impairment, and disability among adults with acute traumatic spinal cord injury. *J Neurotrauma* 26(10):1707–17
2. Fehlings MG, Vaccaro A, Wilson JR, et al (2012) Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury: results of the Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study (STASCIS). *PLoS One* 7(2):e32037
3. M N Hadley, B C Walters, P A Grabb, N M Oyesiku, G J Przybylski, D K Resnick TCR (2002) Pharmacological Therapy after Acute Cervical Spinal Cord Injury. *Neurosurgery* 50(suppl\_3):S63–S72
4. Youseffard M, Rahimi-Movaghar V, Nasirinezhad F, Baikpour M, Safari S, Saadat S, Moghadas Jafari A, Asady H, Razavi Tousi SMTT, Hosseini M (2016) Neural stem/progenitor cell transplantation for spinal cord injury treatment; A systematic review and meta-analysis. *Neuroscience* 322:377–397
5. Yamazaki K, Kawabori M, Seki T, Houkin K (2020) Clinical trials of stem cell treatment for spinal cord injury. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms21113994
6. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R (2017) Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms18091852
7. Iraci N, Gaude E, Leonardi T, et al (2017) Extracellular vesicles are independent metabolic units with asparaginase activity. *Nat Chem Biol* 13(9):951–955

8. Stevanato L, Thanabalasundaram L, Vysokov N, Sinden JD (2016) Investigation of content, stoichiometry and transfer of miRNA from human neural stem cell line derived exosomes. PLoS One 11(1):1–13

#### 11. Anlagen

- Mittelverwendungsnachweis Zeitraum 2021-2023 (SVN D.10054054.pdf)
- Einzelpostenliste (EPL D.10054054.pdf)