

Auswirkungen kontaminierter Medium-Zusätze auf die quantitative microRNA-Analyse oligodendroglialer extrazellulärer Vesikel

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

von

Martin Auber

geb. am 25.07.1987 in Berlin

Mainz, August 2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	V
Abstract	VII
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
1.1 Extrazelluläre Vesikel	1
1.1.1 Biogenese und Bestandteile extrazellulärer Vesikel	1
1.1.2 Aufnahme von extrazellulären Vesikeln in Donorzellen	5
1.1.3 Isolation von extrazellulären Vesikeln	7
1.1.4 Charakterisierung extrazellulärer Vesikel.....	8
1.1.5 Isolierung von extrazellulären Vesikeln aus Zellkulturen	9
1.2 microRNA.....	11
1.2.1 Biogenese und Funktion von miRNAs	11
1.2.2 (mi)RNA in Extrazellulären Vesikeln	13
1.3 Oligodendrozyten und Neurone.....	15
1.3.1 Oligodendroglialer trophischer Support für Neurone	15
1.3.2 Oligodendroglialer Axon-Support über extrazelluläre Vesikel.....	16
1.3.3 Hypothese: Phänotypische Anpassungen des Axons auf den trophischen Support durch Vesikel assoziierte miRNAs	18
1.4 Zielsetzung.....	19

2	Material und Methode	21
2.1	Geräte	21
2.2	Materialien, Chemikalien, Puffer, Medien und kommerzielle Kits	22
2.2.1	Antikörper	27
2.2.2	Software	28
2.3	Zellkultur	28
2.3.1	Isolierung und Herstellung primärer Zellkulturen	28
2.3.1.1	Antikörper basierte Isolierung primärer Oligodendrozyten.....	28
2.3.1.2	Isolierung primärer kortikaler Neurone aus murinen Embryonen	29
2.3.2	Boyden Chamber Co-Kultursystem.....	29
2.3.3	Zelltransfektion mit Lipofectamin.....	30
2.3.4	Stimulation primärer Oligodendrozyten durch D/L-Serin und Glutamat.....	30
2.4	Isolation, Charakterisierung und Behandlung von extrazellulären Vesikeln und Medium-Kontrollen.....	31
2.5	RNA Analysen.....	34
2.5.1	RNA-Isolation	34
2.5.2	Reverse Transkription quantitative PCR	34
2.5.2.1	Probenübergreifende Kalibrierung der RT-qPCR durch Spike-in miRNA.....	35
2.5.3	MiRNA-Sequenzierung-2 von primären Oligodendrozyten und dazugehörigen extrazelluläre Vesikeln mit und ohne Supplement	36
2.6	Proteinbiochemie	38
2.6.1	Lysierung von Zellen und subzelluläre Fraktionierung.....	38
2.6.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	38
2.6.3	Westernblot	39
2.7	Viabilitätsanalyse mittels MTT-Test.....	39
2.8	Statistik	40

3	Ergebnisse	41
3.1	RNA-Seq und RT-qPCR Validierung primärer Oligodendrozyten und den dazugehörigen extrazellulären Vesikeln	41
3.2	Keine Bestätigung eines Transfers von miR-122-5p über oligodendrogliale extrazelluläre Vesikel zu neuronalen Zielzellen.....	42
3.3	Quantitative miRNA-Vergleiche zwischen Oligodendrozyten und extrazellulären Vesikeln mittels RT-qPCR	46
3.4	miRNA-Kontamination im Zellkulturmedium.....	49
3.4.1	Kontaminationsindikatoren – Supplemente zeigen Partikel- und miRNA-Kontamination.....	49
3.4.2	Katalase ist eine Quelle der miRNA-Kontamination in chemisch definierten Supplementen.....	54
3.4.3	mRNA-Sequenzierung neuronaler Zielzellen nach Behandlung mit extrazellulären Vesikeln.....	58
3.5	Neue Sequenzierung von oligodendroglialen extrazellulären Vesikeln unter Berücksichtigung der miRNA-Kontamination in Supplementen	61
3.5.1	Qualitätskontrollen von extrazellulären Vesikeln durch Nanopartikel Tracking Analyse und Westernblot.....	62
3.5.2	Reproduzierbare RNA-Profile deuten auf intakte RNA für (mi)RNA-Sequenzierung-2	66
3.5.3	Phred Score von (mi)RNA-Sequenzierung-2 weist auf eine hohe Qualität der Sequenzierung hin	69
3.5.4	Qualitätskontrolle für (mi)RNA-Sequenzierung-2: Mapping Längverteilung	69
3.5.5	Hauptkomponentenanalyse von miRNA-Sequenzierung-2 – klare Trennung extrazellulärer Vesikel-Proben und Gruppierung der Oligodendrozyten	73
3.5.6	Bestätigung partiell geschützter miRNA im Medium nach RNase-Verdau	77
3.5.7	Abzug Medium-basierter miRNA-Kontamination von vesikulären miRNA-Proben. 78	
3.5.8	MiRNA-kontaminiertes Supplement beeinflusst differentielle miRNA-Expression zwischen extrazellulären Vesikeln und Donorzellen	81

3.5.9	Glutamat- und Serin-Stimulation beeinflussen das miRNA-Profil von primären Oligodendrozyten und extrazellulären Vesikeln	83
4	Diskussion	85
4.1	Widerlegung der Hypothese: Phänotypische Anpassungen des Axons auf den trophischen Support durch Vesikel assoziierte miR-122-5p und miR-451a	86
4.2	Medium beeinflusst geNorm-Resultate stärker als genetischer Hintergrund	87
4.3	Bestandteile von „chemisch definierten“ Supplementen verfälschen Resultate von extrazellulären Vesikeln	88
4.4	Einordnung von miRNA-Seq-1 und mRNA-Seq nach Aufdeckung der miRNA-Kontamination in Supplementen	92
4.5	„Chemisch definierte“ Supplemente weisen eine durch Katalase verursachte miRNA-Kontamination auf	93
4.6	miRNA-Sequenzierung-2: Neuentwickelte miRNA Analyse von extrazellulären Vesikeln durch Mediumsabweich	95
4.7	Analysen über mögliche Sortiermechanismen stellen erhebliche Tragweite der miRNA-Kontamination dar	96
4.8	Stimulierte Oligodendrozyten zeigen veränderte miRNA-Profile in extrazellulären Vesikel	98
5	Fazit - Ausblick	100
6	Literaturverzeichnis.....	103
7	Anhang	i
A.	Zusatzdaten	i
B.	Publikationen, Vorträge und Auszeichnungen.....	xv

Zusammenfassung

Im zentralen Nervensystem werden Neurone von oligodendroglialen Myelinscheiden umschlossen, welche maßgeblich für das Aufrechterhalten neuronaler Integrität und das Bereitstellen von energiereichen Metaboliten sind. *In vitro* Studien zeigen darüber hinaus eine an neuronale Aktivität gekoppelte gliale Unterstützung über oligodendrogliale extrazelluläre Vesikel (EV), welche eine erhöhte neuronale Stressresistenz vermitteln. EVs bestehen aus einer schützenden Lipid-Doppelmembran und können ihre aus Proteinen und Nukleinsäuren bestehende Fracht innerhalb eines Organismus zwischen Zellen transportieren. Auch microRNAs (miRNAs), die Teil der posttranskriptionellen Regulation sind, können mittels EVs transferiert werden. Um zellspezifische EV-Analysen durchführen zu können, muss überwiegend auf Zellkultur-Modelle zurückgegriffen werden, wofür seit Dekaden Wachstumsmedien mit Serumszusätzen (z.B. fetales Rinderserum, FBS) verwendet werden. Seren beinhalten Proteine, Vesikel und RNAs, wodurch die Erforschung von EVs und deren Inhalt erschwert wird. Als Alternative fand die Verwendung von Vesikel-depletierten Seren oder serum-freien, chemisch definierten Supplementen, die als RNA-, Vesikel- und Partikel-frei gelten, Einzug in Zellkultur-Methoden für Analysen von EVs.

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst festgestellt werden, dass die Validierung eines vorhandenen miRNA-Datensatzes von Oligodendrozyten und entsprechenden EVs ohne Medium-Kontrollen mittels RT-qPCR (quantitativer Echtzeit-PCR) keine relevanten Signifikanzen hervorbrachte. Basierend auf diesen Resultaten sollten oligodendrogliale EV-miRNAs unter vollumfänglicher Integration von serum-freien Medium-Kontrollen erneut auf ihre biologische Relevanz untersucht werden. Hierbei ergaben sich fünf Erkenntnisse, welche bei Nichtberücksichtigung zu Verfälschungen von EV-Ergebnissen führen können und auf Bestandteile der Medium-Kontrolle zurückzuführen sind (1-5): (1) Bei Nanopartikel Tracking Analysen der Medium-Kontrollen nach differentieller Ultrazentrifugation (dUZ) wurden Partikel im Größenbereich von kleinen EVs detektiert. Durch Anwendung von EV-Isolationsmethoden, (2) Größenausschluss-Chromatographie und (3) dUZ wurden miRNAs aus der Medium-Kontrolle aufgereinigt und mittels RT-qPCR und NGS (Sequenzierung der nächsten Generation) nachgewiesen. (4) Zudem war ein Viertel der miRNA-Kontamination aus der Medium-Kontrolle nach RNase-Behandlung (anerkannte Methode zur Analyse von RNAs innerhalb von EVs) weiterhin detektierbar. (5) Des Weiteren konnten Proteine, welche zuvor als EV-Inhalt beschrieben wurden, im Pellet der Medium-Kontrolle nach dUZ detektiert werden. Die beschriebenen Erkenntnisse können EV-Ergebnisse auf verschiedenen Ebenen verfälschen, was eine entsprechende Anpassung der MISEV-Vorgaben (*engl.* minimal information for studies of extracellular vesicles) nach sich ziehen müsste.

Detaillierte Untersuchungen, zur Feststellung des Ursprungs der miRNA-Verunreinigung, deckten miRNA-Kontaminationen bei verschiedenen industriell hergestellten serum-freien Supplementen (B27 und NS21) auf. Mittels individueller Inhaltsstoff-Analysen konnten kommerziell erworbene Katalasen als miRNA-kontaminierte Komponente identifiziert werden. Der Nachweis

abundanter miRNAs aus den jeweiligen Ursprungsgeweben der Katalasen, könnte möglicherweise auch andere Forschungsgebiete (z.B. extrazelluläre RNA) beeinflussen.

Des Weiteren gelang in der vorliegenden Arbeit die Entwicklung einer *in silico* durchgeführten Medium-Kontroll-Korrektur, wodurch der Einfluss der miRNA-Kontamination eingedämmt werden konnte. Hierfür wurden 97 % der kontaminierenden miRNA-Reads der Medium-Kontrolle (was zehn miRNAs ausmacht) aus der Analyse ausgeschlossen. Durch einen parallel durchgeführten Ansatz, bei dem EVs ohne (miRNA-kontaminierte) Supplemente isoliert wurden, konnten die *in silico* Ergebnisse bestätigt werden. Die umfangreiche Beschreibung der miRNA-Kontaminationen in der Medium-Kontrolle waren dementsprechend essentiell für belastbare Analysen oligodendroglialer EV-miRNAs. Zusätzlich kristallisierte sich unter anderem miR-92b-3p als EV-angereichert heraus, die eine mögliche biologische Relevanz haben könnte und bereits als neuroprotektiv beschrieben wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnten somit nicht nur miRNA-Kontaminationen in sogenannten „chemisch definierten“ Supplementen beschrieben werden, sondern auch Lösungsvorschläge aufgezeigt werden, wie Analysen von biologisch relevanten miRNAs stringent durchgeführt werden können.

Abstract

In the central nervous system, neurons are wrapped by oligodendroglial myelin sheaths, which are essential for the maintenance of neuronal integrity and provide energy-rich metabolites. In addition, *in vitro* studies also showed a glial support via oligodendroglial extracellular vesicles (EV), which is triggered by neuronal activity and results in an increased neuronal stress resistance. EVs are surrounded by a protective lipid double membrane and transport their protein- and nucleic acids-containing cargo between cells within an organism. MicroRNAs (miRNAs), as a part of post-transcriptional regulation, can also be transferred by EVs. In the past, cell type specific EVs were studied mainly in cell culture models using media supplemented with sera (e.g. fetal bovine serum, FBS). Sera contain proteins, vesicles and RNAs, making research on EVs and their cargo more difficult. As an alternative, the use of serum-free, chemically defined supplements (considered RNA-, vesicle- and particle-free), has found its way into cell culture methods for the analysis of EVs.

In the present work, oligodendroglial EV-miRNAs were investigated for their biological relevance under full implementation of serum-free medium controls. Five findings have been observed, which could interfere with EV results and which also can be attributed to components of the medium control (1-5): (1) In nanoparticle tracking analysis of medium control after differential ultracentrifugation (dUC), particles in the size range of small EVs were detected. By applying two different EV isolation methods, (2) size exclusion chromatography and (3) dUC, miRNAs were purified from medium control and detected by real-time quantitative PCR and next-generation sequencing. (4) Furthermore, a quarter of the medium control miRNA contamination was still detectable after RNase treatment (common method for analysing RNAs within EVs). (5) Also proteins previously described as EV-cargo could be detected in the medium control pellet after dUC. Based on the described findings, EV-results could be misinterpreted on various levels, which should lead to a corresponding adaptation of the MISEV-guidelines (minimal information for studies of extracellular vesicles).

Detailed investigations to determine the origin of miRNA-contaminations revealed miRNAs in various industrially produced serum-free supplements (B27 and NS21). Individual analysis of ingredients identified commercially acquired catalases as miRNA-contaminated components. Detection of abundant miRNAs from respective origins of catalases could also influence other research areas like extracellular RNA.

Furthermore, we developed an *in silico* performed medium control correction to reduce the influence of miRNA-contaminations on EV-miRNA results. For this purpose, 97 % of the contaminating miRNA-reads in medium control (representing ten miRNAs) were excluded from the analysis. Parallel approaches, in which EVs were isolated without (miRNA-contaminated) supplements, confirmed the *in silico* results. The comprehensive description of miRNA contaminations in medium control were essential for a reliable analysis of oligodendroglial EV-miRNAs. Additionally,

miR-92b-3p turned out to be enriched in EV-pellets, which might have a possible biological relevance, as miR-92b-3p has already been described as neuroprotective.

In the present work, not only miRNA-contaminations in so-called "chemically defined" supplements were found, also solutions for stringent and rigorous analysis of biologically relevant miRNAs could be proposed.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Klassifizierung und Ursprünge extrazellulärer Vesikel.	1
Abbildung 1-2: Biogenese von Mikrovesikeln und Exosomen.	4
Abbildung 1-3: Syntheseweg vom frühen Endosom zu Exosomen.	5
Abbildung 1-4: microRNA – Kanonische Biogenese und Funktion.	12
Abbildung 1-5: Sekretion oligodendroglialer extrazellulärer Vesikel und ihre Funktion in Glia-Neuron-Einheiten.	17
Abbildung 2-1: Illustration für die Definition und Kalibrierung des Schwellenwerts via spike-in cel-miR-39-3p in RT-qPCR.	36
Abbildung 3-1: Ergebnisse der miRNA-Sequenzierung-1 und Validierung mittels RT-qPCR von primären Oligodendrozyten und dazugehörigen extrazellulären Vesikeln.	42
Abbildung 3-2: Auswirkung einer miR-122-5p-Mimik Transfektion auf neuronale Glut1 und Pkm1 Expression.	44
Abbildung 3-3: Unveränderte neuronale miRNA- und Zielprotein-Konzentration nach Co-Kultur mit Oligodendrozyten.	45
Abbildung 3-4: MiR-122-Transfektion von Oligodendrozyten hat keinen Einfluss auf neuronale miR-122-5p Konzentration nach Co-Kultur.	46
Abbildung 3-5: GeNorm-Berechnung zur Festlegung stabiler Referenz-miRNAs in extrazellulären Vesikeln und primären Oligodendrozyten.	48
Abbildung 3-6: Relative miRNA-Expression in extrazellulären Vesikeln primärer Oligodendrozyten von Wildtyp-, PLP ^{-/-} - und CNP ^{-/-} -Mäusen.	49
Abbildung 3-7: Nanopartikel Tracking Analyse von Medium-Kontrollen über eine Zeitspanne von ca. einem Jahr.	51
Abbildung 3-8: Durch RT-qPCR Analysen identifizierte miRNA-Kontamination in chemisch definierten Supplementen für Zellkultur-Medien.	53
Abbildung 3-9: MiRNA-Kontamination aus NS21 nach RNase A-Verdau, Depletion durch Ultrazentrifugation und Größenausschluss-Chromatographie.	53
Abbildung 3-10: Analysen des Supplements NS21 identifizieren Katalase als Quelle der miRNA-Kontamination.	57

Abbildung 3-11: Stark reduzierte mRNAs in Neuronen nach Behandlung mit oligodendroglialen extrazellulären Vesikeln.	58
Abbildung 3-12: <i>In silico</i> Analyse von miRNAs aus oligodendroglialen extrazellulären Vesikeln und ihren potenziellen Ziel mRNAs in Neuronen.	60
Abbildung 3-13: Detektion weiterer kontaminierender miRNAs in Supplementen und Katalase.	61
Abbildung 3-14: Nanopartikel Tracking Analyse der generierten extrazellulären Vesikel-Proben für miRNA-Sequenzierung-2.	63
Abbildung 3-15: Westernblot zur Charakterisierung von extrazellulären Vesikeln und Oligodendrozyten.	66
Abbildung 3-16: Bioanalyser-Profile der RNA-Proben von (mi)RNA-Sequenzierung-2.	69
Abbildung 3-17: Phred Scores von (mi)RNA-Sequenzierung-2.	69
Abbildung 3-18: Mapping Längenverteilung der (mi)RNA-Sequenzierung-2.	73
Abbildung 3-19: Prozentuale Mapping Längenverteilung der (mi)RNA-Sequenzierung-2.	73
Abbildung 3-20: miRNA Hauptkomponentenanalyse der extrazellulären Vesikel und dazugehöriger Oligodendrozyten aus miRNA-Sequenzierung-2.	74
Abbildung 3-21: Hauptkomponentenanalyse der verschiedenen Gruppen von extrazellulären Vesikel aus miRNA-Sequenzierung-2.	75
Abbildung 3-22: Hauptkomponenten Analyse der Oligodendrozyten und dazugehörigen extrazellulären Vesikeln inklusive Medium-Kontrolle aus miRNA-Sequenzierung-2.	76
Abbildung 3-23: Ein Viertel der miRNAs des Mediums sind vor einem Abbau durch RNase geschützt.	77
Abbildung 3-24: Entwicklung eines Korrektur-Abzugs der mediumsbasierten miRNA-Kontamination aus den Proben der extrazellulären Vesikel von miRNA-Sequenzierung-2.	80
Abbildung 3-25: Differentielle miRNA-Expression zwischen extrazellulären Vesikeln und Oligodendrozyten – Vergleich +NS21 und ØNS21.	82
Abbildung 3-26: Glutamat und Serin Stimulation beeinflussen miRNA-Profile von Oligodendrozyten und extrazellulären Vesikeln.	84
Abbildung 4-1: Zusammenfassende Ergebnisse, die durch Mediumskomponenten bedingt sind und mit Resultaten von extrazellulären Vesikeln interferieren würden.	91

Abbildung 7-1: Westernblot von miR-122-5p-Mimik transfizierten primären Neuronen.xiv

Abbildung 7-2:: Westernblot von Neuronen nach Co-Kulturen mit Oligodendrozyten.....xiv

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Proteinbestandteile der ESCRT (<i>engl.</i> endosomal sorting complexes required for transport) Maschinerie.....	3
Tabelle 2-1: Liste verwendeter Zentrifugen und Rotoren.....	21
Tabelle 2-2: Geräteliste.....	21
Tabelle 2-3: Materialien.....	22
Tabelle 2-4: Chemikalien und Kommerzielle Kits	23
Tabelle 2-5: Sonden für miRNA- und mRNA-Detektion in qPCR.	24
Tabelle 2-6: Puffer und Lösungen.....	25
Tabelle 2-7: Medien und Medium-Komponenten.....	25
Tabelle 2-8: Zusammensetzung der Supplementen NS21, sm-NS19 und sm-NS16.....	26
Tabelle 2-9: Komponenten für individuelle miRNA-Analysen.	27
Tabelle 2-10: Primäre Antikörper.	27
Tabelle 2-11: Sekundär Antikörper.	28
Tabelle 2-12: Computer Softwares.	28
Tabelle 2-13: Zellzahl und Volumenangaben zu den Isolationen von oligodendroglialen extrazellulären Vesikeln	31
Tabelle 2-14: Zyklus-Programm für die Synthese von cDNA aus mRNA-Template.	35
Tabelle 2-15: Probenliste für die miRNA-Sequenzierung-2 (miRNA-Seq-2).	37
Tabelle 3-1: Readcounts der miR-1246 in miRNA-Sequenzierung-1.....	50
Tabelle 4-1: Proben-Zusammenfassung von miRNA-Sequenzierung-2.....	95
Tabelle 7-1: Mengenangaben der verwendeten Proben für die miRNA-Sequenzierung-2.	i
Tabelle 7-2: Top150 miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 von primären Oligodendrozyten mit NS21 (pOLs+NS21) während der Isolations-Periode von extrazellulären Vesikel.	ii
Tabelle 7-3: Top150 miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 von primären Oligodendrozyten ohne NS21 (pOLsØNS21) während der Isolations-Periode von extrazellulären Vesikel.....	iii

Tabelle 7-4: Top150 miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 von primären Oligodendrozyten nach Stimulation mit Glutamat und D/L-Serin und ohne NS21 (s-pOLsØNS21) während der Isolations-Periode von extrazellulären Vesikel.v

Tabelle 7-5: Top150 miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 von oligodendroglialen extrazellulären Vesikeln mit NS21 (EVs+NS21) während der Isolations-Periode.vi

Tabelle 7-6: Top150 miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 von oligodendroglialen extrazellulären Vesikeln ohne NS21 (EVsØNS21) während der Isolations-Periode.vii

Tabelle 7-7: Top150 miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 von oligodendroglialen extrazellulären Vesikeln ohne NS21 und mit Glutamat und D/L-Serin Stimulation während der Isolations-Phase (SEVsØNS21).viii

Tabelle 7-8: Top150 miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 der Medium-Kontrolle (MKON).....ix

Tabelle 7-9: Top miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 der RNase-behandelten Medium-Kontrolle (MR).x

Tabelle 7-10: Top150 miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 von RNase-behandelten oligodendroglialen extrazellulären Vesikeln mit NS21 (EVs+RNase+NB21) während der Isolations-Periode.xi

Tabelle 7-11: Top150 miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 von RNase-behandelten oligodendroglialen extrazellulären Vesikeln ohne NS21 (EVs+RNaseØNB21) während der Isolations-Periode.....xii

Abkürzungsverzeichniss

AGO1 – 4	Argonautenprotein 1 – 4
ALIX	(<i>engl.</i>) ALG-2-interacting protein X
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BM	Basalmedium
BSA	(<i>engl.</i>) bovine serum albumin
CC3	Caspase-3
cDNA	komplementäre DNA (<i>engl.</i> complementary DNA)
Cmotifs	vermehrt in Zellen vorkommendes RNA-Motiv
CNP	(<i>engl.</i>) 2,'3' cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase
CNTF	(<i>engl.</i>) ciliary neurotrophic factor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cq	(<i>engl.</i>) cycle of quantification
dest.	destilliert
DGCR8	(<i>engl.</i>) DiGeorge syndrome critical region gene 8
DGE	differentielle Genexpression
DIV	(<i>engl.</i>) days <i>in vitro</i>
DM	Differenzierungsmedium
DMEM	(<i>engl.</i>) Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
dUZ	differentielle Ultrazentrifugation, differentielle Ultrazentrifugation
ECL	(<i>engl.</i>) enhanced chemiluminescence
EGF	(<i>engl.</i>) Epidermal Growth Factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum, <i>Siehe</i>
ESCRT	(<i>engl.</i>) endosomal sorting complex required for transport
EV	extrazellulärer Vesikel
EVs+NS21	extrazelluläre Vesikel mit NS21
EVs+RNase+NS21	RNase behandelte EVs mit NS21
EVs+RNaseØNS21	RNase behandelte EVs ohne NS21
EVsØNS21	extrazelluläre Vesikel ohne NS21
EXOmotifs	vermehrt in EVs vorkommendes RNA-Motiv
EXP-5	Exportin-5
EZM	extrazelluläre Matrix
FBS	Fötales Rinderserum (<i>engl.</i> fetal bovine serum)
FC	(<i>engl.</i>) fold change
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GLUT1	Glukose-Transportern

Golgi	Golgi-Apparat
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	(<i>engl.</i>) Hank's Balanced Salt Solution
hnRNPA2B1	(<i>engl.</i>) heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>engl.</i> horseradish peroxidase)
HRS	(<i>engl.</i>) hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
HS	Pferdeserum (<i>engl.</i> horse serum)
HSC70	(<i>engl.</i>) heat-shock-cognate-70
HSP90	(<i>engl.</i>) heat-shock-cognate-90
ILV	itralumaler Vesikel
KAT	Katalase, Katalase
KON	Kontrolle
MAG	Myelin assoziiertes Glykoprotein
MCT1	Monocarboxylat-Transporter
MIQE	(<i>engl.</i>) minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments
miRNA	microRNA, microRNA
miRNA-Seq-1	miRNA-Sequenzierung-1
miRNA-Seq-2	miRNA-Sequenzierung-2
MISEV	(<i>engl.</i>) minimal information for studies of extracellular vesicles, Minimale Information für Studien über extrazelluläre Vesikel (<i>engl.</i> minimal information for studies of extracellular vesicles)
MKON	Medium-Kontrolle
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MR	Medium-RNase-Verdau
mRNA	(<i>engl.</i>) messenger RNA
mRNA-Seq	mRNA-Sequenzierung von Neuronen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromide
MV	Mikrovesikel
MVB	multivesikulären Körpern (<i>engl.</i> multivesicular body)
MVE	multivesikuläre Endosom
NB21	NeuroBrew-21
NF	Normalisierungsfaktor
NG2	Neural/Glial Antigen 2
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NS21	Neuronal Supplement 21
nSMase2	Neural sphingomyelinase 2
nt	Nukleotide
NTA	Nanopartikel-Tracking-Analysen
PBS	(<i>engl.</i>) phosphate buffered saline

PC	Hauptkomponente (<i>engl.</i> principal component)
PC1	Hauptkomponente 1
PC2	Hauptkomponente 2
PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>engl.</i> principal component analysis)
pCNs	primäre Neurone aus Kortizes (<i>engl.</i> primary cortical neurons)
PDGF	(<i>engl.</i>) platelet derived growth factor
<i>pgk1</i>	(<i>engl.</i>) phosphoglycerate kinase 1
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PKM2	Pyruvat Kinase 2
PLL	Poly-L-Lysine
PLP	Proteolipid-Protein
PM	Proliferationsmedium
pOL-EV-miRNAs	pOL EV assoziierte miRNAs
pOL-EVs	pOL generierten EVs
pOLs	primäre Oligodendrozyten
pOLs+NS21	primäre Oligodendrozyten mit NS21
pOLsØNS21	primäre Oligodendrozyten ohne NS21
pre-miRNA	Vorläufer miRNA (<i>engl.</i> precursor-miRNA)
Pre-RISC	(<i>engl.</i>) Pre-RNA induced silencing complex
pri-miRNA	primäre miRNA
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAB	(<i>engl.</i>) RAS-related protein
RAB-Proteine	(<i>engl.</i>) RAS-related proteins
RAN	(<i>engl.</i>) RAS-related Nuclear protein
RCF	Relative Zentrifugalbeschleunigung
RHO	Ras homolog
RIN	(<i>engl.</i>) RNA integrity number
RISC	(<i>engl.</i>) RNA induced silencing complex
<i>RN18S</i>	18S ribosomale RNA
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	RHO-assoziierte Proteinkinasen
RPM	(<i>engl.</i>) reads per million
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	reverse Transkription quantitative Polymerase-Kettenreaktion
SD	Stichprobenstandardabweichung (<i>engl.</i> standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate polyac-rylamide gel electrophoresis)

SEC	Größenausschluss-Chromatographie (<i>engl.</i> size exclusion chromatography)
SEM	Standardfehler (<i>engl.</i> standard error of the mean)
SEVsØNS21	Glutamat und D/L-Serin stimulierte EVs ohne NS21
siRNA	(<i>engl.</i>) small interfering RNA
<i>slc2a1</i>	(<i>engl.</i>) solute carrier family 2
sm-NS16	(<i>engl.</i>) self-made NS16
sm-NS19	(<i>engl.</i>) self-made NS19
sm-NS21	(<i>engl.</i>) self-made NS21
SNARE	(<i>engl.</i>) soluble N ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
snoRNA	kleine nukleoläre Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> small nucleolar ribonucleic acid)
snRNA	kleine nukleäre Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> small nuclear ribonucleic acid)
SOD	Superoxid-Dismutase, Superoxid-Dismutase
s-pOLsØNS21	Glutamat und D/L-Serin stimulierte pOLs ohne NS21
STAM	(<i>engl.</i>) signal transducing adaptor molecule
T3	Triiodthyronin
TBS	(<i>engl.</i>) Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRBP	(<i>engl.</i>) TAR RNA binding protein
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TSG101	(<i>engl.</i>) tumor susceptibility gene 101
UTR	(<i>engl.</i>) untranslated region
UZ	Ultrazentrifugation
VPS	(<i>engl.</i>) vacuolar protein sorting-associated protein
vtRNA	(<i>engl.</i>) vault RNA
WB	Westernblot
WT	Wildtyp
YBX1	Y-box Protein 1

1 Einleitung

1.1 Extrazelluläre Vesikel

Die Erforschung extrazellulärer Vesikel (EV, plural EVs) ist ein Musterbeispiel dafür, wie eine als etabliert geltende Theorie teilweise widerlegt und um neue Sichtweisen erweitert werden konnte, wodurch ein neues, attraktives Forschungsfeld entstehen konnte. Bis 1983, als erstmals zwei unterschiedliche Arbeitsgruppen die Freisetzung von Vesikeln beschreiben konnten (Harding et al. 1983; Pan und Johnstone 1983), wurden EVs ausschließlich als zellulärer Abfall abgetan (Nagarajah 2016). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass die Biogenese und der Inhalt von EVs komplex sind und sie einen wichtigen Teil der interzellulären Kommunikation darstellen (van Niel et al. 2018).

1.1.1 Biogenese und Bestandteile extrazellulärer Vesikel

Der Überbegriff extrazelluläre Vesikel umfasst die folgenden drei, sich in ihrer Biogenese unterscheidenden Vesikel-Typen: Exosomen, Mikrovesikel (MV, *plural* MVs) und apoptotische Körper (Abbildung 1-1). Apoptotische Körper entstehen während des programmierten Zelltods (Apoptose) (Elmore 2007) und können zwischen 100 nm und über 1 µm groß werden (Karpman et al. 2017; van Niel et al. 2018).

MVs liegen in der Größenordnung von 150 – 1 000 nm und werden durch direktes Abknospen von der Zellmembran gebildet. Exosomen gehören mit einer Größe von 40 – 150 nm zu den kleinen EVs und werden (anders als die MVs) im späten Endosom generiert und über Fusion von multivesikulären Körpern (*engl.* multivesicular body, MVB) mit der Zellmembran in das extrazelluläre Milieu entlassen (van Niel et al. 2018; Jeppesen et al. 2019). Über EVs können Proteine und Nukleinsäuren, geschützt von einer Lipid-Doppelmembran, innerhalb eines Organismus transportiert werden. Dadurch können EVs einen Teil der interzellulären Kommunikation einnehmen (van Niel et al. 2018).

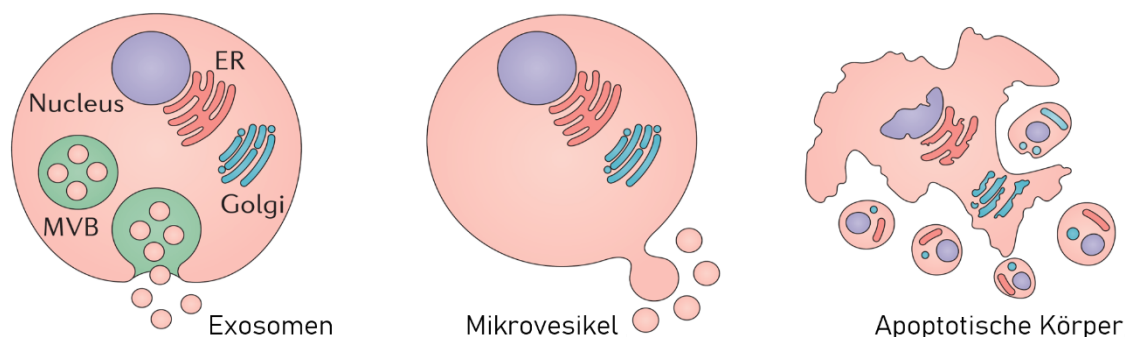


Abbildung 1-1: Klassifizierung und Ursprünge extrazellulärer Vesikel. Exosomen (40 – 150 nm) entstehen im späten Endosom in multivesikulären Körpern (*engl.* multivesicular body, MVB) und werden über die Fusion von MVBs mit der Zellmembran in das extrazelluläre Milieu abgegeben. **Mikrovesikel (150 – 1 000 nm)** werden durch direktes Abknospen von der Zellmembran generiert und **Apoptotische Körper (100 nm bis > 1µm)** entstehen aufgrund von

Zelltod-Prozessen. Endoplasmatisches Retikulum (ER), Nukleus (*engl.* nucleus), Golgi-Apparat (Golgi). (modifiziert nach Karpman et al. 2017; van Niel et al. 2018).

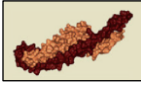
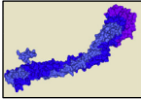

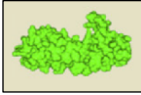
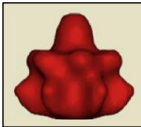
Für die Biogenese der MVs verändert sich die Zusammensetzung der Lipide und Proteine an der Plasmamembran. Zunächst gruppieren sich Lipide, Tetraspanine und weitere Proteine, unter anderem über den sogenannten ESCRT-I (*engl.* endosomal sorting complex required for transport)-Komplex, zu einer Mikrodomäne für die MV-Bildung und -Beladung mit verschiedenen bioaktiven Molekülen. Anschließend wird durch einen Anstieg des Ca^{2+} -Levels eine Enzymmaschinerie, bestehend aus Aminophospholipidtranslokasen (Flippasen und Floppasen), Scramblasen und Calpain, zur Neuordnung der Plasmamembran angeregt (Pap et al. 2009; Beer et al. 2018).

Durch die Translokation von Phosphatidylserin von der inneren Membranschicht an die Zelloberfläche entsteht eine Asymmetrie der Plasmamembran nach außen. Des Weiteren wird aufgrund des intrazellulären Ca^{2+} -Anstiegs ein Prozess eingeleitet, durch den sich Spingomyelinasen an der Plasmamembran anlagern und dort Ceramide in die Membran einbauen, was ebenfalls eine Ausstülpung der Membran fördert (Fabio Bianco et al.). Nach der Neuordnung des Aktinzytoskeletts werden MVs abgeschnürt (Abbildung 1-2 oben) (zusammengefasst in van Niel et al. 2018).

In Tumorzellen konnte während der MV-Biogenese und der Aktin-Regulation ein Zusammenspiel zwischen GTPasen der RHO(Ras homolog)-Familie und RHO-assoziierten Proteinkinasen (ROCK) beobachtet werden (Li et al. 2012). Aber auch Bestandteile, die in der Exosomen-Biogenese beschrieben werden, wie ALIX (*engl.* ALG-2-interacting protein X), TSG101 (*engl.* tumor susceptibility gene 101) und RAB-Proteine (*engl.* RAS-related proteins), können in die Biogenese von MVs integriert sein (van Niel et al. 2018; Colombo et al. 2014).

Anders als bei MVs findet die Exosomen-Generierung nicht an der äußeren Plasmamembran, sondern im späten Endosom statt, wobei über 20 verschiedene Proteine allein für die Bildung der ESCRT-Komplexe notwendig sind (Tabelle 1-1 - auch für Abkürzungserläuterungen) (Hanson und Cashikar 2012; Henne et al. 2011). Dabei werden zunächst ubiquitinierte membranassoziierte Proteine über ESCRT-0 (bestehend aus HRS und STAM) zu Mikrodomänen gruppiert. Über eine Bindung zwischen TSG101 und HRS interagieren ESCRT-0 und ESCRT-I. Durch eine Interaktion zwischen VPS28 (ESCRT-I) und VPS26 (ESCRT-II) wird der Komplex um ESCRT-II erweitert.

Tabelle 1-1: Proteinbestandteile der ESCRT (*engl.* endosomal sorting complexes required for transport) Maschinerie. (modifiziert nach Henne et al. 2011; Hanson und Cashikar 2012).

Komplex	Struktur	Proteinname – Human (<i>engl.</i>)
Hefe	Human*	
ESCRT-0		
Vsp27 Hse1	HRS STAM1/2	 hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate signal transducing adaptor molecule 1/2
ESCRT-I		
Vsp23 Vsp28 Vsp37 Mvb12	TSG101 VSP28 VSP37A,B,C,D MVB12A,B	 tumor susceptibility gene 101 vacuolar protein sorting-associated protein 28 vacuolar protein sorting-associated protein 37A,B,C multivesicular body sorting factor 12A,B
ESCRT-II		
Vsp36 Vsp22 Vsp25	VSP36 VSP22 VSP25	 vacuolar protein sorting-associated protein 36 vacuolar protein sorting-associated protein 22 vacuolar protein sorting-associated protein 25
ESCRT-III		
Vsp20 Snf7 Vsp24 Vsp2	VSP20 SNF7-1,-2,-3 VSP24 VSP2A,B	 vacuolar protein sorting-associated protein 20 sucrose nonfermentor 7-1,-2,-3 vacuolar protein sorting-associated protein 24 vacuolar protein sorting-associated protein 2A,B
VPS4 Komplex		
Vsp4 Vsp60 Vta1	VSP4 CHMP5 VTA1	 vacuolar protein sorting-associated protein 4 charged multivesicular body protein 5 vacuolar protein sorting-associated protein

*bei verschiedenen möglichen Synonymen wurde, wenn möglich, das Äquivalent zur Hefe verwendet. Weitere Synonyme siehe Hanson und Cashikar 2012.

Anschließend bindet ESCRT-III über VSP20 an VSP25 von ESCRT-II. Daraufhin wird an ESCRT-III die Polymerisierung von Snf7 ausgelöst, was zu einer Ausstülpung der Membran als intraluminales Vesikel (ILV) in das multivesikuläre Endosom (MVE) führt (Abbildung 1-2, unten). Zusätzlich werden, unter anderem über ALIX, Cargo-Komponenten in ILVs sortiert. Über den VSP4-Komplex werden die ESCRT Komponenten abgebaut und ins Zytoplasma recycelt (zusammengefasst in Hanson und Cashikar 2012; Henne et al. 2011; Katzmann et al. 2002).

Allgemein zusammengefasst sind die überwiegenden Aufgaben von ESCRT-0,-I und -II das Sortieren der Cargo-Komponenten. Dem gegenüber stehen ESCRT-III und der VSP4-Komplex, die vorwiegend die Plasmamembran umgestalten (Migliano und Teis 2018). Jedoch ist in dendritischen Zellen auch HRS, als Teil von ESCRT-0, für die Sekretion und Abknospung von ILVs notwendig (Tamai et al. 2010; van Niel et al. 2018). Des Weiteren scheint der Syndecan-Syntenin-ALIX Signalweg ausschließlich in die Exosomen Sekretion integriert zu sein (Baietti et al. 2012).

Parallel zu dem beschriebenen ESCRT-abhängigen Syntheseweg existiert ein ESCRT-unabhängiger Weg, bei dem vermehrt Ceramide über Sphingomyelinasen hergestellt und in die Membran des späten Endosoms eingebaut werden, wodurch eine negative Membrankrümmung in den MVB entsteht (Trajkovic et al. 2008; Goñi und Alonso 2009). Zusätzlich können Ceramide zu Sphingosin-1-phosphate umgewandelt werden, die wiederum G_i-Protein-gekoppelte Sphingosin-1-phosphat-Rezeptoren aktivieren, welche scheinbar eine wichtige Rolle für das Sortieren des Cargos in die ILVs einnehmen (Kajimoto et al. 2013).

Des Weiteren können über ALIX Tetraspanine für das endosomale Sortieren rekrutiert werden (Larios et al. 2020). Mit ihren vier Transmembrandomänen (besonders CD63) können Tetraspanine wiederum in das endosomale Sortieren und das Cargo-Sortieren sowie in die Exosomen-Sekretion involviert sein. Zusätzlich konnten CD81, CD82 und CD9 für das Beladen von Exosomen identifiziert werden (Buschow et al. 2009; Chairoungdua et al. 2010; Andreu und Yáñez-Mó 2014; van Niel et al. 2018). Auch weitere membraninterkalierende Proteine wie Integrine scheinen in die Cargo-Rekrutierung über Tetraspanine integriert zu sein (Andreu und Yáñez-Mó 2014).

Die kegelförmige Struktur von CD81 begünstigt außerdem die Abknospung des ILVs nach innen, bei vermehrter Anlagerung von Tetraspaninen in die Membran des MVEs (Zimmerman et al. 2016). Somit sind Tetraspanine an der Beladung und an der Bildung von ILVs beteiligt. Außerdem können Membranproteine über Syntenin zur Mikrodomäne gruppiert werden. Dieser Cargo-Cluster kann daraufhin über ALIX an ESCRT-III gebunden und ebenfalls Teil der ILV-Bildung werden (Abbildung 1-2, unten) (zusammengefasst in van Niel et al. 2018).

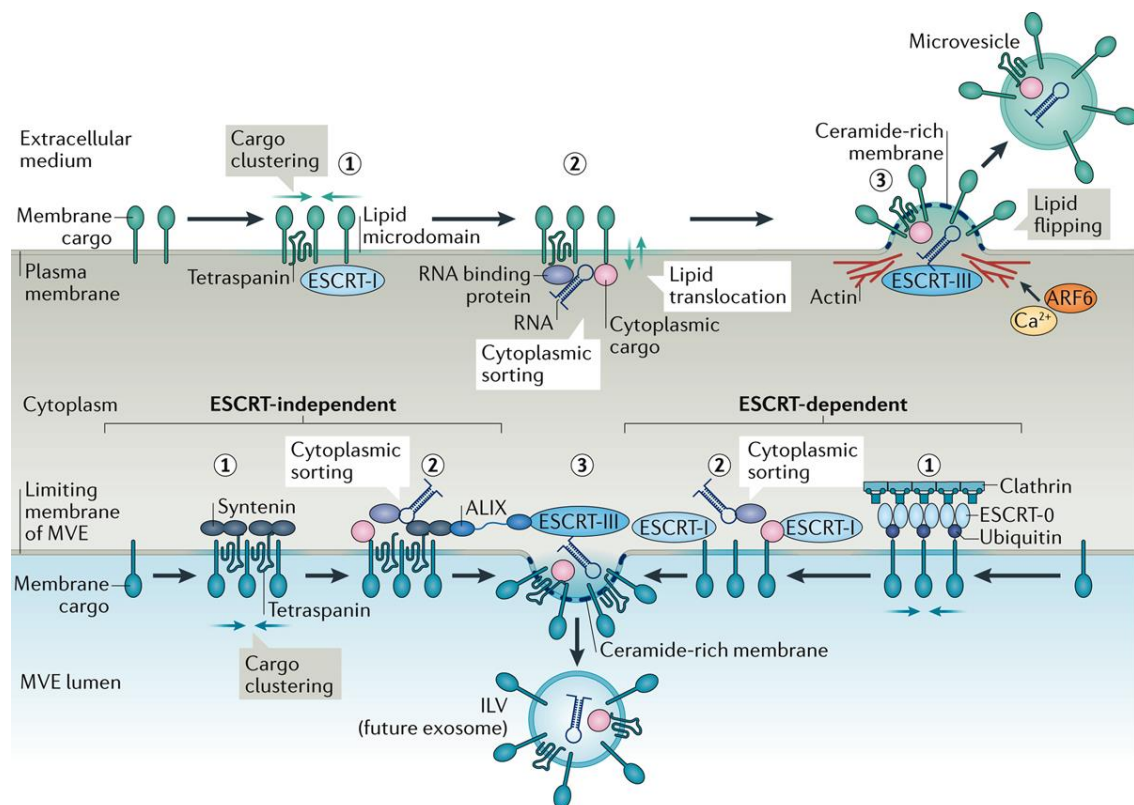


Abbildung 1-2: Biogenese von Mikrovesikeln und Exosomen. Mikrovesikel (oben): Bildung der Mikrodomäne über ESCRT-I (1); sortieren des zytoplasmatischen Cargos und Ca^{2+} -induzierte Lipidtranslokation (2); Neuordnung des Aktinzytoskeletts und Abknospen des Mikrovesikels an der Plasmamembran (3). **Exosomen (unten):** Bildung des membranassoziierten Cargo-Clusters über Syntenin (ESCRT-unabhängig) oder ESCRT-0 (1); Sortieren des zytosolischen Cargos (2) und Abknospen des intraluminalen Vesikels (ILV) über ALG-2 interacting protein X (ALIX) und ESCRT-III (ESCRT-unabhängig) oder durch die Anlagerung von ESCRT-I, -II (nicht abgebildet) und -III (3). (modifiziert nach van Niel et al. 2018).

Das MVE (auch MVB genannt) kann sich in der Zelle zum späten MVB (Abbildung 1-3) entwickeln. Der späte MVB kann entweder über das Lysosom abgebaut werden oder über verschiedene kleine GTPasen, die RAS-related proteins (RAB) mit der Plasmamembran fusionieren, wobei Ca^{2+} -abhängige SNARE-Komplexe (*engl.* soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) involviert sind. Auf diesem Weg oder über den direkten Fusionsweg des MVBs über RAB-Proteine mit der Plasmamembran, können die ILVs als Exosomen in das extrazelluläre Milieu entlassen werden (Abbildung 1-3) (Kowal et al. 2014; Colombo et al. 2014; van Niel et al. 2018). Somit können verschiedene bioaktive Moleküle mittels EVs als Bestandteil der Zell-Zell-Kommunikation übermittelt werden.

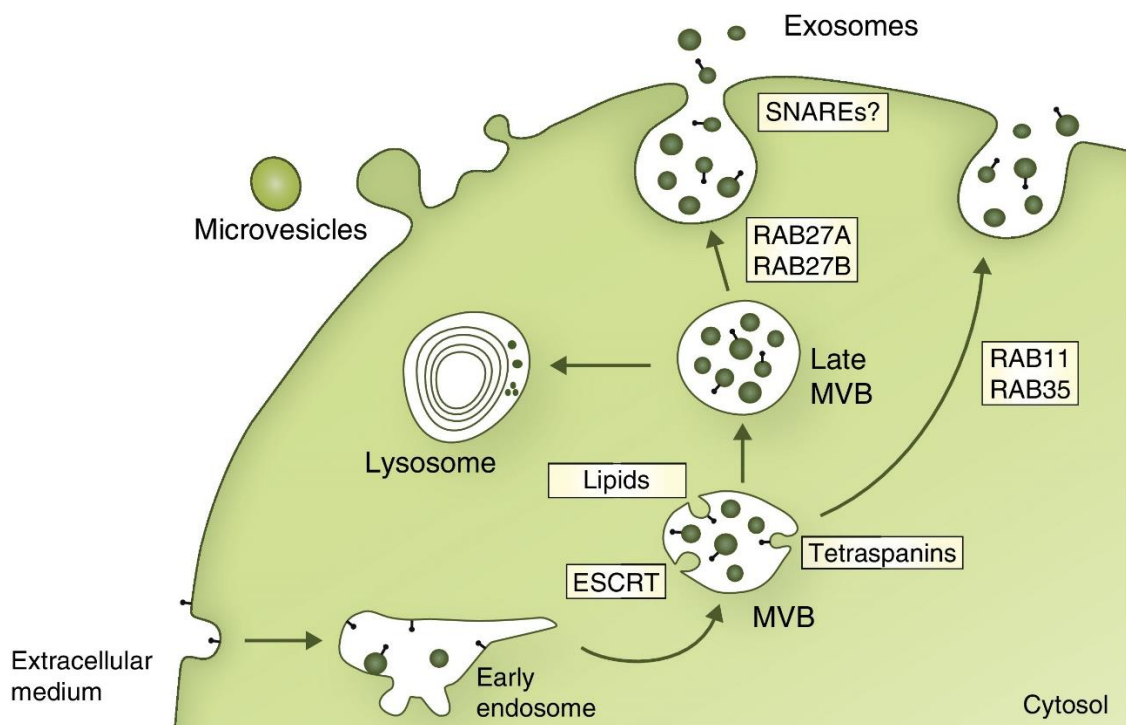


Abbildung 1-3: Syntheseweg vom frühen Endosom zu Exosomen. Über den ESCRT-abhängigen und/oder –unabhängigen Weg (siehe Abbildung 1-2) wird das multivesikuläre Endosomen (*engl.* multivesicular body, MVB) gebildet und entweder über das Lysosom abgebaut oder über RAS-related proteins (RAB) und SNARE-Komplexe (*engl.* soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) mit der Plasmamembran fusioniert und die Exosomen werden ins extrazelluläre Milieu entlassen (Kowal et al. 2014).

1.1.2 Aufnahme von extrazellulären Vesikeln in Donorzellen

Nach der Freisetzung von EVs können diese inklusive ihrer bioaktiven Fracht von Donorzellen aufgenommen werden. Studien an MVs von Tumorzellen konnten EGF-Rezeptoren (*engl.* Epidermal Growth Factor) in Verbindung mit der Erkennung und Aufnahme von Vesikeln stellen (Al-Nedawi et al. 2008). Hierbei kann die Aufnahmekapazität von dem pH-Wert und der Temperatur beeinflusst werden, was genauso wie EV-Dosis und Dauer für die EV-Aufnahme bei Experimenten-Planungen berücksichtigt werden sollte (Russell et al. 2019). Mulcahy et al. 2014 fassen mehrere Beweise für die zelluläre Integration von EVs zusammen: So konnte murines Protein in humanen Zellen nachgewiesen werden, wenn die Zellen zuvor mit Maus-EVs behandelt wurden

(Valadi et al. 2007). Des Weiteren gelang die Detektion von Reporterproteinen in Empfängerzellen, nachdem die entsprechende mRNA über MVs bereitgestellt wurde (Skog et al. 2008; Ratajczak et al. 2006). Eine weitere Studie zeigt einen Zielgen Knock-down in Donorzellen durch EV-übermittelte siRNA (*engl.* small interfering RNA) (Alvarez-Erviti et al. 2011). Des Weiteren konnte Biolumineszenz in Luziferase-exprimierenden Zielzellen detektiert werden, wenn Luziferin EV-vermittelt bereitgestellt wurde (Montecalvo et al. 2012). Außerdem konnte die Aufnahme von EVs in Zielzellen durch mit Lipid-Membran-Farbstoffen gefärbten EVs, direkt nachgewiesen werden (zusammengefasst in Mulcahy et al. 2014). Auch durch Fusion von grün fluoreszierenden Proteinen (GFP) mit EV-Proteinen (meist Tetraspanine), die ebenfalls in EV-behandelten Zielzellen detektierbar waren, gelang ein weiterer direkter Nachweis für die Aufnahme von EVs (Koumangoye et al. 2011).

Die zugrundeliegenden zellbiologischen Mechanismen für die EV-Aufnahme sind noch nicht vollends erforscht, jedoch können Tetraspanine, Integrine, Lipide, Lektine, Heparansulfat-Proteoglykane und extrazelluläre Matrix (EZM)-Komponenten eine wichtige Rolle in der Zielzellerkennung einnehmen (van Niel et al. 2018). Demnach interagieren EV-Integrine mit interzellulären Adhäsionsmolekülen der Zielzellen. Des Weiteren können EV-Integrine auch EZMs binden, die dann als eine Art „Reißverschluss“ zwischen EV-Integrinen und Integrinen der Plasmamembran fungieren (Morelli et al. 2004; Sung et al. 2015; Purushothaman et al. 2016; van Niel et al. 2018). Auch über Tetraspanine können EVs an Integrine der Plasmamembran andocken und in die Zielzelle aufgenommen werden (Rana et al. 2012). Eine weitere Interaktion kann über Heparansulfat-Proteoglykane und Lektine aufgebaut werden, wobei die Proteine sowohl auf EVs als auch auf der Plasmamembran vorkommen können (Melo et al. 2015; van Niel et al. 2018).

Außerdem macht die Zusammensetzung der EV-Lipide eine Verbindung mit Lipidbindeproteinen möglich (zusammengefasst in van Niel et al. 2018). Auch die Ausbildung von Lipid Rafts (zu Deutsch „Lipidflöße“) an der Plasmamembran ermöglichen Interaktionen z.B. mit Cholesterol oder Annexin II auf den EVs (Mulcahy et al. 2014). Lipid Rafts-bedingte Kopplungen lösen die Aufnahme über Endozytose aus. Diese Art der Aufnahme trifft ebenfalls auf Clathrin- und Caveolin-vermittelte Anlagerungen zu (Mulcahy et al. 2014; van Niel et al. 2018). Außerdem können EVs über Phagozytose und Makropinozytose aufgenommen werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass der EV-Cargo über Membranfusion direkt in das Zytoplasma aufgenommen werden kann (Mulcahy et al. 2014). Dies ist gerade für die Aufnahme von EV-miRNAs und –mRNAs eine viel diskutierte Variante (Valadi et al. 2007; van Niel et al. 2018).

Erfolgt die Vesikel-Integration jedoch in Gänze, dann gelangen die Vesikel meistens über das Endosom in den MVB. Hier wird der Vesikel-Inhalt entweder über intrazelluläre Membranfusion ins Zytoplasma abgegeben oder die Inhaltsstoffe werden über Lysosomen für den trophischen Support aufbereitet (Mulcahy et al. 2014; van Niel et al. 2018). Des Weiteren können die Vesikel an der Plasmamembran auch wieder re-sekretiert werden (van Niel et al. 2018).

1.1.3 Isolation von extrazellulären Vesikeln

Für die Isolierung von EVs werden verschiedene Protokolle und Methoden herangezogen, was die Vergleichbarkeit der Studien erschwert. van Deun et al. 2017 haben diese Heterogenität in der Experimenten-Durchführung über einen Zeitraum von vier Jahren gesammelt und ausgewertet. Demnach war mit 45 % die am häufigsten verwendete Methode zur Isolierung von EVs die differentielle Ultrazentrifugation (dUZ). Hierbei werden durch aufsteigende Zentrifugalkräfte und Entfernen von Überständen und Pellets verschiedene Bestandteile aus Bio-Fluiden aufgereinigt.

Die apoptotischen Körper pelletieren zu einem großen Teil mit Zellen bei ca. 200 – 1 500 x g (10 min). Im anschließenden Zentrifugationsschritt bei 10 000 – 20 000 x g (30 - 40 min) sedimentieren Partikel im Größenbereich zwischen 100 und 800 nm, die im Allgemeinen als MV bezeichnet werden. Kleine Vesikel mit einer Größe unter 100 nm pelletieren ab ca. 100 000 x g und wurden in der Literatur, basierend auf der Größe, als Exosomen bezeichnet (van der Pol et al. 2012; Crescitelli et al. 2013). Jedoch sind die Größenübergänge der Vesikel fließend und auch Proteinaggregate können in einem Partikel-überschneidenden Größenbereich auftreten, so dass die Größe nicht als alleinstehendes Kriterium für die Vesikel-Charakterisierung herangezogen werden kann (Kowal et al. 2016).

Des Weiteren können Vesikel über ihre Dichte mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation aufgereinigt werden, jedoch ist diese Methode mit einer Zentrifugationsdauer über 14 h zeitintensiv (Kowal et al. 2016; Théry et al. 2006).

Einen geringeren Zeitaufwand versprechen kommerzielle Aufreinigungsmethoden, bei denen Vesikel meistens über Präzipitation aus Bio-Fluiden isoliert werden. Hierbei entstehen Aggregate zwischen den Vesikeln aber auch mit Proteinen, was nachfolgende Analysen erschwert (van der Pol et al. 2014).

Mittels Größenausschlusschromatographie (*engl.* size exclusion chromatography) können Partikel ausschließlich über ihre Größe aufgereinigt werden. Jedoch existiert auch hier das Problem, dass Proteine und Proteinaggregate in überschneidenden Fraktionen zu den Vesikeln eluiert werden (Böing et al. 2014; Lobb et al. 2015; Welton et al. 2015; Brahmer et al. 2019).

Über Aufreinigungsmethoden, bei denen magnetische Kügelchen (*engl.* Beads) über Immunoaffinität spezielle EV-Oberflächenmarker binden, können ebenfalls EVs isoliert werden. Aufgrund des gewählten EV-Markers kann bei dieser Methode jedoch auch ein Bias hin zu einer spezifischen EV-Population entstehen (Kowal et al. 2016; Nakai et al. 2016; Brahmer et al. 2019).

Durch die Kombination verschiedener Isolationsverfahren inkl. der Gradienten Ultrazentrifugation (UZ) kann die Reinheit der EV-Populationen erhöht werden (Jeppesen et al. 2019). Da jedoch mit steigender Komplexität der Aufreinigung ein verstärkter Materialverlust einhergeht, muss zwischen Reinheit der Vesikel-Probe und Materialausbeute bedacht abgewogen werden. Demnach

richtet sich die Wahl der Isolationsmethodik vor allem nach den anschließenden Analyseverfahren. Umfangreiche Zusammenfassungen über Standards zur Probengewinnung, Isolations- und Analyse-Methoden von EVs, geben die Ausmaße der unterschiedlichen Techniken wieder (Théry et al. 2018; Witwer et al. 2013).

1.1.4 Charakterisierung extrazellulärer Vesikel

Die im vorigen Abschnitt beschriebenen Entwicklungen verschiedener EV-Isolationsmethoden sind auch darin begründet, dass keine eindeutigen EV-Marker vorhanden sind, die den Ursprung der Vesikel klar identifizieren können. So existierten aktuell noch keine Marker zur klaren Trennung von MVs und Exosomen (Kowal et al. 2016; van Niel et al. 2018). Dadurch konnten auch die Proben neuer Isolationsmethoden schwer auf Reinheit und Vesikel-Ursprung überprüft werden.

Jedoch können über elektronenmikroskopische Untersuchungen eindeutig Partikelgröße und -struktur analysiert werden. So gelang durch die Kombination verschiedener Isolationsmethoden die Einteilung von Partikeln in kleine (40 – 150 nm) und große EVs (>150 nm) sowie in nicht-vesikuläre Partikel (Jeppesen et al. 2019). Die Elektronenmikroskopie ist jedoch eine zeitintensive und kostspielige Methode für die Charakterisierung von EV-Proben, die zusätzlich ein hohes Maß an Expertise benötigt.

Dem gegenüber stehen Analysen zur Nanopartikelverfolgung (Nanopartikel-Tracking-Analysen, NTA) die über die brownische Molekularbewegung mit geringem Zeitaufwand Größen- und Mengenprofile von EV-Proben erstellen können (Dragovic et al. 2011). Vom NTA nicht erfasst ist allerdings der Aufbau des einzelnen Partikels und somit auch die Zusammensetzung der kompletten Probe, wodurch co-isolierte Partikel (z.B. Protein-Aggregate) unentdeckt bleiben. Außerdem kann mittels NTA je Messung nur ein Profildbereich und nicht das komplette Größenspektrum der Probenzusammensetzung analysiert werden (van der Pol et al. 2014; Jamaly et al. 2018).

Auch wenn der zelluläre Ursprung (endosomal vs. Abknospen von der Plasmamembran) eines Partikels schwer nachzuvollziehen ist, weisen unter anderem Tetraspanine wie CD9, CD63 und CD81 sowie weitere Vesikel-Marker wie TSG101, Syntenin und ALIX auf EVs hin. Westernblot (WB)-Analysen können somit unkompliziert Aufschluss über die Probenzusammensetzungen geben (Kowal et al. 2016; Jeppesen et al. 2019; van Niel et al. 2018). Nach umfangreichen Isolations- und Charakterisierungs-Studien konnten vermehrt Exosomen- (CD63) und MV-Marker (Annexin A1) identifiziert werden, wodurch die ersten Grundlagen für differenziertere EV-Analysen gelegt wurden (Kowal et al. 2016; Jeppesen et al. 2019).

Zusätzlich lassen weitere Marker-Proteine Rückschluss auf den Ursprung von bestimmten Zell-Typen zu. So konnten die Oligodendrozyten-Proteine Proteolipid-Protein (PLP) und 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP) in EVs von Oligodendrozyten nachgewiesen werden (Krämer-Albers et al. 2007). Auch aus Blut gewonnene EVs können über spezielle Protein-Cluster

ihren Donorzellen zugeordnet werden (Brahmer et al. 2019). Durch weiterentwickelte Proteom-Analysen können aussagekräftige Datensätze zur EV-Proteinzusammensetzung schneller und mit weniger Material generiert und analysiert werden, wodurch möglicherweise weitere Marker-Proteine identifiziert werden können. Umfangreiche Datenbanken über EV-assoziierte Proteine, RNAs und Lipide stehen hier für Analysen mit großen Datensätze zur Verfügung (EVpedia, Kim et al. 2013; Vesiclepedia, Pathan et al. 2019).

Die bereits etablierte Durchflusszytometrie zur Bestimmung von Zelltypen auf die Analyse von EVs zu transferieren, ist aufgrund der geringen Größe der EVs nicht trivial, wird jedoch trotzdem vorangetrieben (Nolan und Duggan 2018). Aktuell können EVs nach Immunoaffinitätskopplung an fluoreszierende Beads in Durchflusszytometern (Koliha et al. 2016; Brahmer et al. 2019) oder nach Fluoreszenz-Färbung mittels bildgebender Durchflusszytometrien (Görgens et al. 2019) dargestellt werden, wodurch die Heterogenität von EVs gezeigt und EV-Subklassen analysiert werden können. Welsh et al. 2020 haben hierzu ein Rahmenwerk über notwendige Mindestinformationen hinsichtlich EV-Studien mit Durchflusszytometrie verfasst. Wichtige Aspekte sind in diesem Zusammenhang Probenfärbung, EV-Detektion und -Messung sowie Versuchsanordnung (Welsh et al. 2020). Durch die Darstellung von EV-Subklassen könnte diese Methode möglicherweise für die Erkennung von pathologischen Veränderungen herangezogen werden.

Zusätzlich zum Proteom können EVs auch auf die Lipidzusammensetzung untersucht werden, wobei Änderungen in der Komposition ebenfalls Aufschluss über pathologische Vorgänge geben können (Llorente et al. 2013). Des Weiteren kann ein Teil des EV-Cargos aus verschiedenen RNA-Klassen bestehen, die durch weiterführende Analysen untersucht werden können (Kim et al. 2017).

Dieses Kapitel stellte die umfangreichen Herausforderungen, die mit der Charakterisierung von EVs einhergehen, dar. 2014 wurden in einem Positionspapier die minimalen Informationen für Studien über extrazelluläre Vesikel (*engl.* minimal information for studies of extracellular vesicles, MISEV2014) ausgearbeitet, um unter anderem die Isolation und Nomenklatur von EVs hervorzuheben und von anderen extrazellulären Partikeln abzugrenzen (Lötvall et al. 2014). Aufgrund des Wissenszuwachs innerhalb des EV-Forschungsfelds werden die MISEV-Richtlinien kontinuierlich angepasst (MISEV2018, Théry et al. 2018).

Nach dem folgenden Kapitel über EV-Isolationen aus Zellkulturen wird zunächst die Klasse der microRNAs (miRNA) per se ausführlich dargestellt, um anschließend auf miRNAs als Cargo von EVs eingehen zu können.

1.1.5 Isolierung von extrazellulären Vesikeln aus Zellkulturen

Extrazelluläre Vesikel, die innerhalb eines Organs produziert und aufgenommen werden, zu isolieren, erweist sich an vitalen Organismen als sehr kompliziert bis nicht umsetzbar. Um trotzdem die Biologie der jeweiligen EVs zu studieren, können Zelltypen des gewünschten Organs isoliert,

kultiviert und deren EVs aufgereinigt werden. Für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen wird seit Dekaden fetales Rinderserum (*engl.* fetal bovine serum, FBS) verwendet, dessen Bestandteile zum einen variieren und zum anderen häufig Überschneidungen mit EV-assoziierten Molekülen aufweisen (Gstraunthaler und Lindl 2013; Shelke et al. 2014).

Seit über 45 Jahren ist die Präsenz von vesikulären Strukturen im Größenbereich von ca. 55 nm in FBS bekannt (Benz und Moses 1974). In späteren Studien konnten zusätzlich klassische EV-Markerproteine wie TSG101, CD63 und CD81 in FBS-EV-Proben (isoliert durch dUZ) detektiert werden (Shelke et al. 2014). Außerdem entsprach das RNA-Profil von FBS-EVs typischen EV-RNA-Profilen. Da auch durch Proteinase- mit anschließender RNase-Behandlung keine Profiländerung der RNA aus FBS-EV-Pellets auszumachen war, konnte der RNase-Schutz auf vesikuläre Strukturen zurückgeführt werden (Shelke et al. 2014). Somit stellt die Kultivierung von Zellen in Serum-supplementiertem Medium für die EV-Forschung ein großes Problem dar, da innerhalb des Serums Proteine, miRNAs und Vesikel vorhanden sind, die mit den gängigen EV-Isolationsmethoden co-isoliert werden würden (Shelke et al. 2014).

Aufgrund dessen wurden verschiedene Depletionsverfahren entwickelt, mit dem Ziel die interferierenden Moleküle aus Seren zu entfernen (Théry et al. 2006). Jedoch können durch unterschiedliche Effizienzen der Depletionsverfahren nachfolgende Analysen beeinflusst werden. Außerdem kann die Depletion Auswirkungen auf das Verhalten und den Phänotyp der kultivierten Zellen haben (Eitan et al. 2015; Kornilov et al. 2018; Driedonks et al. 2019; Lehrich et al. 2018). So zeigen Zellen einer Hautkrebszelllinie in Medium mit EV-depletiertem FBS ein stark reduziertes Migrationsverhalten im Vergleich zu Zellen, die in Medium mit unbehandeltem FBS kultiviert wurden (Shelke et al. 2014).

Desweiteren konnten Wei et al. 2016 zeigen, dass gängige EV-Depletionsverfahren nicht ausreichend sind, um miRNAs vollständig aus FBS zu entfernen. Aufgrund der unterschiedlichen Depletionsverfahren und in Anbetracht der nicht 100 %igen Effizienz (zumindest bezogen auf miRNAs) wird vermehrt die Verwendung von Serum-freien und chemisch definierten Supplementen postuliert (Tosar et al. 2017). Jedoch wird gleichzeitig diskutiert, dass durchaus auch in chemisch definierten Supplementen Bestandteile vorhanden sind, die möglicherweise RNAs einschließen könnten (Tosar et al. 2017). Des Weiteren sind einige Bestandteile (z.B. Transferrin, Albumin, Proteine Katalase [KAT] oder Superoxid-Dismutase [SOD]) der chemisch definierten Supplemente tierischen Ursprungs, wodurch Qualitätsunterschiede auftreten könnten (Chen et al. 2008; Tosar et al. 2017). Aufgrund der miRNA-Kontaminationen im FBS und der möglichen Qualitätsunterschiede bei chemisch definierten Supplementen muss bei der Analyse von EV-miRNAs das Zellkulturmedium detailliert auf kontaminierende miRNAs untersucht werden.

1.2 microRNA

MicroRNAs (miRNAs) sind zwischen 18 und 22 Nukleotide (nt) lange, nicht-kodierende RNAs, die die Aktivität von ca. 30 % der proteinkodierenden Gene kontrollieren (Filipowicz et al. 2008). Mit der Entdeckung der miRNAs in den neunziger Jahren wurde ein starker posttranskriptioneller Regulationsmechanismus aufgedeckt (Varani 2015; Wickens und Takayama 1994). Die Translationsregulierung durch miRNAs über die Interaktion mit dem untranslatierten Bereich am 3'-Ende (*engl.* untranslated region, 3'UTR) einer mRNA verdeutlicht an dieser Stelle auch die Wichtigkeit der 3'UTR und könnte eine Erklärung für ihre bedeutende Länge geben (Filipowicz et al. 2008).

1.2.1 Biogenese und Funktion von miRNAs

Beim kanonischen Syntheseweg wird das miRNA-Gen von der RNA Polymerase II oder III abgelesen und die primäre miRNA (pri-miRNA) transkribiert. Anschließend faltet sich die pri-miRNA zu einer Haarnadel-Struktur (*engl.* hairpin) mit unvollkommener Basenpaarung. Der Mikroprozessor, bestehend aus dem Protein DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8) und der RNase-III-Typ Endonuklease Drosha, schneidet die pri-miRNA so am unteren Stamm (*engl.* stem), dass die Vorläufer miRNA (*engl.* precursor, pre-miRNA) mit einem 2 nt-Überhang am 3'-Ende entsteht. Die pre-miRNA wird unter Verbrauch von Guanosintriphosphat (GTP) über RAN (*engl.* **R**A-s-related **N**uclear protein) und Exportin-5 (EXP-5) ins Zytoplasma transportiert (Abbildung 1-4 A).

Hier wird der Loop der pre-miRNA von der RNase III-Typ Endonuklease Dicer abgeschnitten, wobei Dicer in einem Komplex mit dem TAR RNA-binding Protein (TRBP) vorliegt. Im weiteren Verlauf wird die doppelsträngige miRNA über den heat-shock-cognate-70/heat-shock-Protein-90-Komplex (HSC70-HSP90) unter Adenosintriphosphat (ATP)-Verbrauch auf die Argonautenproteine 1 – 4 (AGO1 – 4) geladen. Dabei bilden HSC70-HSP90, AGO1 – 4 und die doppelsträngige miRNA den Pre-RNA-induced silencing complex (Pre-RISC). Der ‚passenger‘-Strang (blau in Abbildung 1-4 A) wird daraufhin degradiert und der ‚guide‘-Strang (rot in Abbildung 1-4 A) über AGO1 – 4 in den reifen RNA-induced silencing complex (RISC) integriert.

Mittels der sogenannten seed-Region (Nukleotide 2 bis 8) der reifen miRNA findet der RISC die korrekte 3'UTR, um die mRNA entweder zu degradieren, zu deadenylieren oder die Translation zu inhibieren (Abbildung 1-4 B; zusammengefasst in Filipowicz et al. 2008; Ha und Kim 2014; Winter et al. 2009). Schätzungen zufolge werden >60 % der mRNAs über miRNAs reguliert (Friedman et al. 2009).

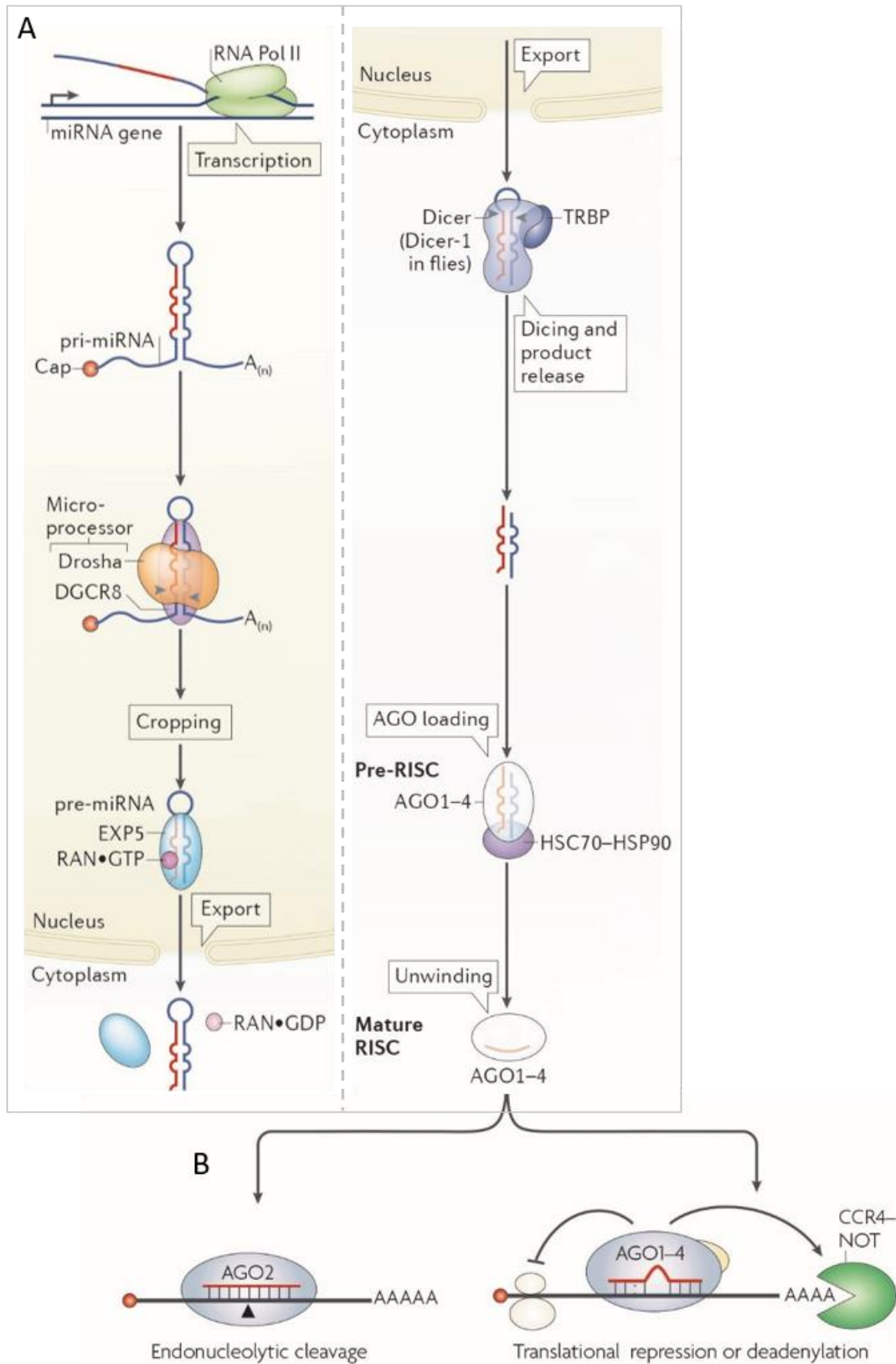


Abbildung 1-4: microRNA – Kanonische Biogenese und Funktion. Im Zellkern wird die pri-miRNA synthetisiert und zur pre-miRNA prozessiert, bevor sie unter Guanosintriphosphat (GTP)-Verbrauch in das Zytoplasma exportiert wird und dort als einsträngige mature miRNA in

den RNA induced silencing complex (RISC) integriert wird (**A**) und die mRNA-Translation herunterreguliert (**B**). Detaillierte Beschreibung und Abkürzungen siehe Text. (modifiziert nach Ha und Kim 2014; Filipowicz et al. 2008).

1.2.2 (mi)RNA in Extrazellulären Vesikeln

RNAs gehören zu den bioaktiven Molekülen, welche häufig als Bestandteile des EV-Cargos beschrieben werden. Da EV-miRNAs überwiegend in geringer Konzentration vorkommen, ging deren Identifizierung und Charakterisierung mit dem technischen Fortschritt zur Detektion schwach konzentrierter RNAs einher (Kim et al. 2017). Dadurch erfolgte die Beschreibung von tumorangereicherten mRNAs und miRNAs sowohl in karzinogenen MV-Donorzellen, als auch in den entsprechenden MVs (Skog et al. 2008). In einer weiteren Studie konnten ebenfalls miRNAs und mRNAs in EVs nachgewiesen werden (Valadi et al. 2007). Außerdem gelang hier die Detektion von ^3H -Uracil markierter RNA in EV-Zielzellen (Valadi et al. 2007). Zusätzlich beschreiben Valadi et al. 2007 *ex vivo* eine Translations-Fähigkeit von mRNA, die aus EVs isolierte wurde. Darüber hinaus konnte ein RNase-protektiver Effekt, der durch Vesikel-Membranen vermittelt wird, gezeigt werden (Skog et al. 2008; Valadi et al. 2007). Mittels Trypsin-Behandlung wurde außerdem bewiesen, dass sich RNAs innerhalb von EVs befinden und nicht mit makromolekularen Strukturen assoziiert vorliegen (Valadi et al. 2007). Das Spektrum der RNA-Klassen in EVs kann umfangreich sein und unter anderem Y-RNAs, vtRNAs (*engl.* vault RNA) und tRNAs (Transfer-RNA) beinhalten (Nolte-t Hoen et al. 2012). Nach stöchiometrischen Analysen über die Verteilung von miRNAs in EVs wird vermutet, dass nicht in allen EV-Subklassen miRNAs vorliegen (Chevillet et al. 2014).

Da zum einen Protein-assoziierte RNAs mit EVs co-isoliert werden können und zum anderen die Isolierungen und Analysen von EV-RNAs divers sein können, sind exakte Standardisierungen für EV-RNA-Studien unerlässlich (Hill et al. 2013; Lötvall et al. 2014; Théry et al. 2018). Aufgrund dessen wurden in einer umfangreichen Zusammenfassung Standards zur EV-Aufreinigung, EV-RNA-Isolation, Sequenzierungs-Library-Präparation und Sequenzdaten-Analyse formuliert (Hill et al. 2013). Um zusätzlich eine höhere Reproduzierbarkeit in EV-(RNA-)Studien zu erhalten, wurde mit EV-TRACK eine Online-Plattform für detaillierte Isolations- und Charakterisierungsangaben von EV-(RNA-)Studien etabliert (van Deun et al. 2017).

Durch die Entdeckung von miRNAs in EVs kann der Wirkungsgrad des EV-Cargos in der Zell-Zell-Kommunikation auch auf die Ebene der posttranskriptionellen Regulation in Zielzellen erweitert werden. EV-miRNA-Profile bieten zudem ein hohes Potenzial als pathologische Biomarker, da möglicherweise miRNAs gezielt in EVs sortiert werden und so Rückschlüsse auf den Status von Donorzellen gezogen werden könnten (Kim et al. 2017; Zhang et al. 2015). Der genaue Ablauf denkbarer Sortiermechanismen ist weitestgehend unklar, jedoch konnten bereits mögliche zellbiologische Sortierprozesse beschrieben werden (Kim et al. 2017; Zhang et al. 2015):

1) Der Neural sphingomyelinase 2 (nSMase2)-abhängige miRNA-Sortiermechanismus in EVs wurde von Kosaka et al. 2013 in Tumorzellen beschrieben. Mittels knock-down von nSMase2

konnte von bestimmten miRNAs eine verringerte Konzentration in den EV-Fractionen festgestellt werden. Die entsprechende intrazelluläre miRNA-Konzentration in den Donorzellen blieb jedoch unverändert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass nSMase2 bei der EV-Sekretion involviert ist, jedoch scheint dieser Syntheseweg zelltypspezifisch zu sein (Kosaka et al. 2010; Shamseddine et al. 2015; Phuyal et al. 2014), sodass möglicherweise auch der miRNA-Sortiermechanismus nur in bestimmten Tumorzellen besteht.

2) Villarroya-Beltri et al. 2013 konnten über bioinformatische RNA-Analysen Sequenzen bestimmen, die entweder vermehrt in EV-miRNAs vorkommen (EXOmotifs) oder in den Zell-miRNAs anzufinden sind (CLmotifs). Änderungen der RNA-Motive (EXOmotif zu CLmotif und CLmotif zu EXOmotif) reicherten die miRNAs in dem jeweils neuen Zielbereich an. Zusätzlich konnte das SUMOylierte Protein heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1 (hnRNPA2B1) in den EVs nachgewiesen werden und als miRNA-sortierendes Protein in Verbindung mit dem EXOmotif gebracht werden. Jedoch wurden miRNAs, die zur Motivberechnung herangezogen und als EV-angereichert bestimmt wurden (miR-451a, miR-122-5p und miR-1246), in einer nachträglich erschienenen Studie als Verunreinigung in dem verwendeten EV-depletiertem FBS beschrieben (Wei et al. 2016; Tosar et al. 2017).

3) Eine Nukleotid-Addition am 3'-Ende von miRNAs konnte mit Anreicherungen der miRNAs in Zellen oder EVs korreliert werden. So wurden poly-Uracil Isoformen vermehrt in EVs detektiert und poly-Adenin miRNAs erhöht in den Donorzellen nachgewiesen (Koppers-Lalic et al. 2014). Jedoch wurden auch hier die EV-Proben unter Verwendung EV-depletierten FBS generiert. Des Weiteren wurden in dieser Studie miRNAs zur Berechnung der EV-assoziierten miRNAs herangezogen, die als Kontaminanten im FBS beschrieben wurden (Wei et al. 2016; Tosar et al. 2017). Zusätzlich erscheinen miRNAs als EV-unterrepräsentiert, die keine homologe miRNA im Rind haben (Tosar et al. 2017), wodurch die Beobachtung möglicherweise durch das verwendete FBS beeinflusst wurde.

4) Da RISC-Bestandteile in EV-Proben detektiert wurden, in denen ebenfalls miRNAs nachgewiesen werden konnten, wird auch ein durch RISC-Bestandteile vermittelter miRNA-Sortiermechanismus diskutiert (zusammengefasst in Zhang et al. 2015). van Deun et al. 2014 zeigten jedoch, dass die Korrelation zwischen EV-Markern und dem RISC-Bestandteil AGO2 nur bei der UZ-Isolierung zutreffend ist. Werden EVs über eine Sukrose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt, kommen EV-Markerproteine in Fraktionen getrennt von AGO2 und Dicer vor. Auch Jeppesen et al. 2019 zeigten keine Evidenzen, dass Exosomen oder kleine EVs Bestandteile der miRNA-Biogenese-Maschinerie beinhalten.

5) Shurtleff et al. 2016 beschreiben in ihrer Studie, dass in HEK293T-Zellen das Y-box Protein 1 (YBX1) unter anderem die miRNAs miR-223-3p und miR-144-3p in Exosomen sortiert und sie deswegen in Exosomen angereichert vorkommen. Auch in dieser Studie wurde EV-depletiertes FBS verwendet, wodurch miRNAs zum einen als EV-angereichert (Shurtleff et al. 2016) und zum anderen als FBS-kontaminierend (Wei et al. 2016; Tosar et al. 2017) beschrieben wurden. Des

Weiteren konnten die Resultate, dass YBX1 in EVs detektierbar ist und dass miR-144 und miR-223 in EVs angereichert sind, in einer weiteren Studie mit humanen Krebszelllinien nicht bestätigt werden (Jeppesen et al. 2019).

6) In einer kürzlich erschienen Studie wird postuliert, dass das RNA-bindende Protein Lupus LA miR-122-5p in Exosomen sortiert (Temoche-Diaz et al. 2019). Die Veröffentlichung erwähnt die Problematik der von FBS stammenden kontaminierenden miRNAs, greift jedoch trotzdem auf EV-depletiertes FBS zurück. Somit wurde miR-122-5p zum einen in EV-depletiertem FBS (Wei et al. 2016) und zum anderen als in Exosomen sortierte miRNA (Temoche-Diaz et al. 2019) beschrieben. Des Weiteren wird in der Studie auf das EV-Isolationsprotokoll von Jeppesen et al. 2019 Bezug genommen, mit dem wesentlichen Unterschied, dass die EV-Isolation einmal mit EV-depletiertem FBS (Temoche-Diaz et al. 2019) und das andere Mal FBS-frei (Jeppesen et al. 2019) durchgeführt wurde.

Auch wenn die zellbiologischen Prozesse für die Sortierung der miRNAs in EVs unklar sind, so haben miRNAs als Teil des EV-Cargos eine zellbiologische Relevanz und können die Translation in Zielzellen beeinflussen (Valadi et al. 2007; Kim et al. 2017). Im Folgenden soll dargestellt werden, inwieweit dieses Prinzip auf die Interaktion zwischen Oligodendrozyten und Neurone übertragen und integriert werden kann, wozu zunächst die Glia/Neuron-Einheit beschrieben wird.

1.3 Oligodendrozyten und Neurone

Bereits unter makroskopischer Betrachtung weist das Gehirn zwei Hauptstrukturen auf – die weiße und die graue Substanz. Dieser strukturelle Unterschied basiert auf der zellulären Zusammensetzung der verschiedenen Bereiche. Die graue Substanz besteht überwiegend aus dem Soma der Neurone, wohingegen sich die Axone der Neurone auch durch die weiße Substanz ziehen. Jedoch ist die weißlich glänzende Färbung dieser Substanz nicht auf die Neurone zurückzuführen, sondern auf einen weiteren Zelltyp im Gehirn – die Oligodendrozyten.

1.3.1 Oligodendroglialer trophischer Support für Neurone

Oligodendrozyten ummanteln die Axone der Neurone mit mehreren Membranschleifen (Myelinschicht), wodurch die Axone isoliert werden, was unter anderem essentiell für die saltatorische Erregungsweiterleitung ist. Die dichtgepackte Myelinschicht ist aufgrund ihrer Zusammensetzung mit 70 – 80 % Lipiden (Trockengewicht) ausschlaggebend für die weiße Färbung der namensgebenden Substanz (Simons und Nave 2015). Jedoch kommt den Oligodendrozyten nicht nur die Funktion der Axonisolierung sowie eine Art neuronalen Stützgewebes zu, sondern zusätzlich geht von ihnen ein axonaler Support aus. Hinweise für solch einen Support zeigten Studien an Mäusen, denen die Myelinproteine PLP oder CNP fehlen, deren Myelinschichten allerdings morphologisch unverändert erschienen (Griffiths et al. 1998; Lappe-Siefke et al. 2003). Diese knock-out

Mäuse weisen jedoch neuronale Degeneration und Schwellungen auf. Demnach haben die genetischen Veränderungen der Oligodendrozyten einen starken Einfluss auf die neuronale Ver-sehrtheit.

Weiterführende Untersuchungen konnten einen metabolischen Support beschreiben, wonach Oligodendrozyten die Produkte der Glykolyse – Pyruvat und Laktat – elektrisch aktiven Neuronen zur Verfügung stellen (Fünfschilling et al. 2012; Saab et al. 2016). Die elektrische Aktivität der Neurone bedingt eine Glutamat-abhängige Stimulierung von NMDA (*N*-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren und damit einen Ca^{2+} -Einstrom in Oligodendrozyten. Dieser Prozess löst die Integration von Glukose-Transportern (GLUT1) in die Oligodendrozyten-Membran aus, um den erhöhten Glukosebedarf für die Glykolyse decken zu können. Parallel scheint es, dass über Monocarboxylat-Transporter (MCT1) Pyruvat und Laktat aus den Oligodendrozyten in das Axon transportiert und dort zur ATP-Herstellung verwendet werden (Saab et al. 2016). So konnte gezeigt werden, dass Oligodendrozyten trotz verminderter mitochondrialer Aktivität aufgrund aerober Glykolyse überlebensfähig sind und wahrscheinlich elektrisch aktiven Neuronen Laktat bereitstellen (Fünfschilling et al. 2012). Zusätzlich mündet ein Verlust oligodendroglialer MCT1 in neuronalen Schwellungen bei unveränderten Oligodendrozyten (Lee et al. 2012).

Unter Betrachtung der Längenverhältnisse von Axonen und die damit aufkommende Distanz zum neuronalen Zellkörper erscheint eine lokale Unterstützung seitens der Oligodendrozyten notwendig. So können Axone des kortikospinalen Trakts bei 1 μ m Breite bis zu 1 m lang werden. Im Vergleich wäre ein U-Bahntunnel für einen 4 m breiten U-Bahnwaggon ungefähr 4 000 km lang. Der schnelle Transport im Axon weist eine Geschwindigkeit von ca. 5 μ m/s auf (für Mitochondrien), der langsame Transport ca. 2 mm pro Tag (für Proteine). Um in der Metapher zubleiben, würde der Wagon für den schnellen Transport ca. 70 km/h fahren und bei dem langsamen Transport ca. 0,5 km/h (Nave 2010).

Dieser Vergleich hebt eindrucksvoll den zeitintensiven axonalen Transport von Molekülen und Proteinen hervor. Zusätzlich wird hier verdeutlicht, dass spontane Reaktionen auf veränderte Umstände über den beschriebenen Transport schwer vorstellbar sind. Möglicherweise existiert parallel zum metabolischen Support der Oligodendrozyten ein weiterer unterstützender Mechanismus, der die Axone zusätzlich mit Molekülen und Proteinen versorgt.

1.3.2 Oligodendroglialer Axon-Support über extrazelluläre Vesikel

Erste Studien zeigten, dass ein oligodendroglialer Axon-Support, zusätzlich zu dem oben beschriebenen metabolischen Support, durch EVs vermittelt sein könnte. Für eine der ersten Charakterisierungen von oligodendroglialen EVs wurden Vesikel mittels dUZ aus Zellkulturüberstand isoliert. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten isolierte Vesikel zwischen 30 – 80 nm (Krämer-Albers et al. 2007). Im WB konnten die Vesikelmarker ALIX, HSC/HSP70 und TSG101 sowie die Glia-Proteine PLP, CNP, MAG (Myelin assoziiertes Glykoprotein) und MOG (Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein) dargestellt werden (Krämer-Albers et al. 2007; Frühbeis et al.

2013). Auch im UZ-Dichtegradienten korrelieren EV-Marker (ALIX und HSC/HSP70) mit dem Oligodendrozyten-Protein PLP (Frühbeis et al. 2013). Weitere EM-Bilder konnten außerdem PLP assoziierte ILVs in MVBs von primären Oligodendrozyten zeigen (Krämer-Albers et al. 2007).

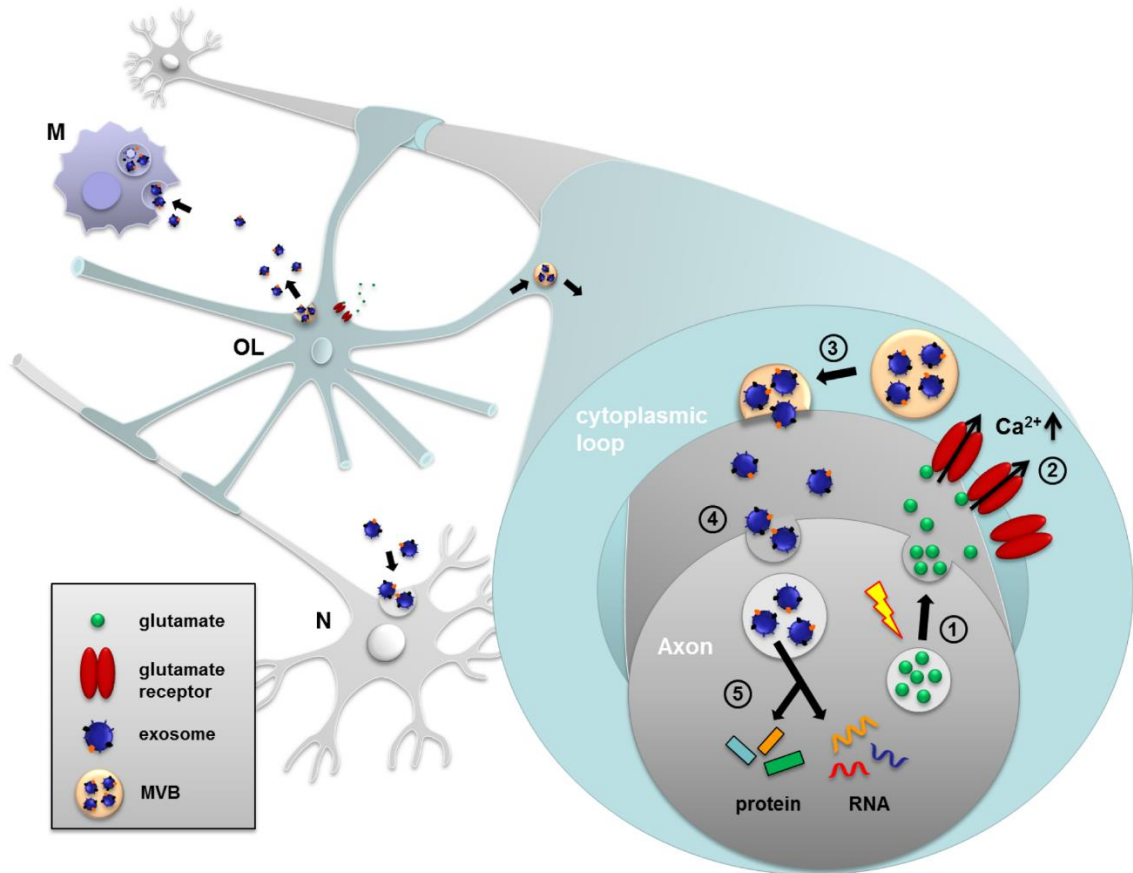


Abbildung 1-5: Sekretion oligodendroglialer extrazellulärer Vesikel und ihre Funktion in Glia-Neuron-Einheiten. Glutamat, das als Reaktion auf neuronale elektrische Aktivität sezerniert wird (1), stimuliert oligodendrogliale Glutamatrezeptoren, wodurch ein Ca^{2+} -Einstrom ausgelöst wird (2) welcher die Freisetzung von Exosomen aus Oligodendrozyten (OL) bedingt (3). Neurone internalisieren Exosomen (4) mit anschließender Protein- und RNA-Freisetzung (5). Oligodendrogliale Exosomenaufnahme durch Mikroglia (M). Multivesikulärer Körper (MVB), Zytoplasmatische Schleife (*engl.* cytoplasmatic loop), Glutamat (*engl.* glutamate), Rezeptor (*engl.* receptor), Exosom (*engl.* exosome) (Frühbeis et al. 2013).

Wie in 1.1.1 (S. 1) beschrieben ist unter anderem ein Ca^{2+} -Einstrom in Zellen initial für die EV-Freisetzung. Elektrisch aktive Neurone lösen solch einen Ca^{2+} -Einstrom bei Oligodendrozyten aus (1.3, S. 15). Frühbeis et al. 2013 zeigten, dass das bei elektrisch aktiven Neuronen freigesetzte Glutamat den Ca^{2+} -Einstrom über Glutamatrezeptoren in Oligodendrozyten verstärkt und zur Freisetzung von EVs führt (Abbildung 1-5). Außerdem weisen Neurone nach der Aufnahme von oligodendroglialen EVs *in vitro* eine bessere Stressresistenz auf (Frühbeis et al. 2013; Fröhlich et al. 2014). Als mögliche EV-Bestandteile, die eine Resistenz gegen oxidativen Stress positiv beeinflussen könnten, wurden die Proteine Katalase (KAT) und Superoxid-Dismutase (SOD) zum Abbau von Sauerstoff-Radikalen mit oligodendroglialen EVs in Verbindung gebracht (Fröhlich et al. 2014). Erste Ergebnisse aus einer vorpublizierten Studie weisen auf einen redu-

zierten EV-vermittelten Support hin, wenn die EVs von PLP- oder CNP-knock-out Oligodendrozyten stammen (Frühbeis et al. 2019). Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass primäre Oligodendrozyten (pOLs, *Singular* pOL) von PLP- und CNP-knock-out Tieren weniger EVs freisetzen. Jedoch konnte das wildtypische Niveau des EV-Supports für Neurone auch dann nicht erreicht werden, wenn die Konzentration der knock-out EVs angepasst wurde. Somit könnte bei den knock-out Modellen sowohl eine quantitative Reduzierung der EVs als auch eine qualitative Veränderung existieren (Frühbeis et al. 2019).

Im Cargo der pOL generierten EVs (pOL-EVs) sind unter anderem auch miRNAs zu detektieren (Fröhlich et al. 2014), deren Funktionen in der vorliegenden Arbeit untersucht werden soll. Im folgenden Kapitel wird eine Hypothese diskutiert, wie pOL-EV assoziierte miRNAs (pOL-EV-miRNAs) in der Oligodendrozyten-Neuron-Einheit agieren könnten.

1.3.3 Hypothese: Phänotypische Anpassungen des Axons auf den trophischen Support durch Vesikel assoziierte miRNAs

Wie bereits beschrieben (1.2.2, S. 13) können EV-miRNAs Zielzellen phänotypisch über posttranskriptionelle mRNA-Regulation verändern. Auf dieser Grundlage basiert eine Studie, bei der EVs aus Brustkrebszellen Nischenzellen als Zielzellen beeinflussen. Die EV-assozierte miR-122-5p soll demnach in den Zielzellen das Glykolyse-Enzym Pyruvat Kinase 2 (PKM2) und den Glukosetransporter GLUT1 herunterregulieren, sodass diese Zellen weniger Glukose verbrauchen (Fong et al. 2015). Diese Glukose stünde dann wiederum dem Metabolismus der Tumorzellen zur Verfügung.

Da *PKM2* und miR-122-5p jeweils komplementäre Basen über die 3'UTR bzw. seed-Region haben, stellt die *PKM2* mRNA ein direktes Target der miR-122-5p dar. Diese Interaktion wurde durch ein Luciferase-basiertes Screening identifiziert (Boutz et al. 2011). Phosphoryliertes PKM2 kann außerdem im Nukleus als transkriptioneller Co-Aktivator unter anderem die Transkription von *GLUT1* induzieren (Prakasam et al. 2018; Yang et al. 2012). Zusammengefasst werden durch eine hohe Konzentration an miR-122-5p die Glykolyse-Enzyme PKM2 (direkt) und GLUT1 (indirekt) reduziert (Fong et al. 2015).

Wenn das Axon über den trophischen Support mit oligodendroglialem Laktat und Pyruvat versorgt wird, dann müsste gleichzeitig der axonale Bedarf an PKM2 und GLUT1 sinken. Da aus einer unveröffentlichten miRNA-Sequenzierung von pOLs und den dazugehörigen EVs (miRNA-Seq-1) miR-122-5p als stark erhöht mit pOL-EVs in Verbindung gebracht werden konnte (durchgeführt von Dr. D. Fröhlich), wurde eine Hypothese aufgestellt, die die Studie von (Fong et al. 2015) in den trophischen Support integriert.

Demnach könnten, parallel zur trophischen Versorgung, miRNAs über EVs von den Oligodendrozyten zu den Axonen transferiert werden und dort speziell über miR-122-5p die nichtbenötigten

Proteine PKM2 (Glykolyse) und GLUT1 (Glukosetransporter) reduzieren. MiR-451a, deren Assoziation mit oligodendroglialen EVs ebenfalls aus der miRNA-Seq-1 entnommen werden konnte, kann zusätzlich die GLUT1 Transkription über das Inhibieren des Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K)/Akt Signalwegs reduzieren (Guo et al. 2016). Zusammengenommen könnten die pOL-EV-assoziierten miR-451a und miR-122-5p Neurone, durch Herunterregulierung von PKM2 und GLUT1, auf den tropischen Support durch Oligodendrozyten vorbereiten.

1.4 Zielsetzung

MiRNAs, die mit EVs assoziiert sind, haben das Potenzial Zielzellen nachhaltig phänotypisch zu beeinflussen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den miRNA-Cargo von oligodendroglialen EVs zu identifizieren und deren Funktion in neuronalen Zielzellen zu studieren. Nach aktuellem Stand der Technik muss zur Isolierung von primären oligodendroglialen EVs auf Zellkultur-Methoden zurückgegriffen werden. Aufgrund der beschriebenen miRNA-Verunreinigungen in FBS werden für die Kultivierung der primären oligodendroglialen und neuronalen Zellen ausschließlich chemisch definierte Medienzusätze verwendet. Jedoch ist selbst in Zellkultursystemen, unter Verwendung von chemisch definierten Supplementen, die Analyse von EV-miRNAs nicht trivial.

Einige Bestandteile der Supplemente werden aus tierischem Gewebe gewonnen, wodurch auch in Medium-Zusätzen Verunreinigungen auftreten können. Mögliche miRNA-Kontaminationen würden in einer solchen EV-Probe auf Grund der hohen Homologien zwischen den Arten größtenteils unerkant bleiben. Um trotzdem glaubwürdige EV-miRNA-Analysen durchführen zu können, sollen stringente Medium-Kontrollen parallel zu den Versuchen durchgeführt werden. Auf diese Weise wird nicht nur das Medium inklusive aller Zusätze erstmals umfassend auf miRNAs analysiert, sondern auch die Auswirkungen typischer Behandlungen von EV-Proben (z.B. RNase-Behandlung und dUZ) auf Medium-Komponenten experimentell untersucht und beschrieben. Diese stringenten Kontrollen legen essentielle Grundlagen für die Erforschung der EV-assoziierten miRNAs in Zellkulturen.

Der unveröffentlichte Datensatz der miRNA-Seq-1 soll zudem intensiver bioinformatisch untersucht werden und mögliche funktionelle miRNAs sollen mittels reverse Transkription quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) validiert werden. Da in miRNA-Seq-1 keine Medium-Kontrollen in die Sequenzierung involviert wurden, können je nach dem, wie die qPCR-Resultate ausfallen, weitere Sequenzierungen durchgeführt werden. Parallel sollen durch den Vergleich mit dem miRNA-Profil der Donor-pOLs Rückschlüsse auf mögliche miRNA-Sortierungsmechanismen in EVs gezogen werden.

Darauffolgend sollen pOL-EVs oder potenzielle miRNAs in Form von miRNA-mimiks verwendet werden, um kultivierte Neurone zu behandeln und anschließend Veränderungen der Zielgene auf mRNA- und Protein-Ebene zu untersuchen. Auf diese Weise soll unter anderem die unter 1.3.3 (S. 18) formulierte Hypothese, dass EV assoziierte miR-451a und miR-122-5p in Neuronen PKM2 und GLUT1 reduzieren, überprüft werden.

Für weiterführende Untersuchungen der neuronalen posttranskriptionellen mRNA-Regulation durch EV-vermittelte miRNAs soll ein weiterer unveröffentlichter Datensatz einer mRNA-Sequenzierung von Neuronen (mRNA-Seq) bioinformatisch untersucht werden. Für die Probengenerierung wurden Zellkulturen von primären Neuronen aus dem Kortex der Maus (*engl.* primary cortical neurons, pCNs) angefertigt und mit oder ohne pOL-EVs behandelt (durchgeführt von Dr. D. Fröhlich). Durch *in situ* Analysen sollen reduzierte neuronale mRNAs nach EV-Behandlung als direkte Targets mit den seed-Regionen von pOL-EV-miRNAs in Verbindung gebracht werden.

Nach dem Studium der miRNA-Profile von wildtypischen pOLs und EVs sollen diese Profile mit denen der PLP- und CNP-knock-out Mäusen verglichen werden. Mögliche Änderungen sollen in Bezug auf die Neurodegeneration dieser Tiere betrachtet werden. Um mittels RT-qPCR Vergleiche zwischen EV- und pOL-miRNAs ziehen zu können, müssen zunächst Referenz-miRNAs etabliert werden, die für beide Probentypen valide sind. Dasselbe gilt für die Vergleiche der EV-miRNAs von pOLs mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund (PLP^{-/-} und CNP^{-/-}), da keine allgemeingültigen Referenz-miRNAs für EVs existieren. Für die Analyse potenzieller Referenz-miRNAs werden die qPCR Ergebnisse mit dem Programm QBase⁺ (Vandesompele et al. 2002; Hellemans et al. 2007) analysiert

Durch das stringente Integrieren der Medium-Kontrollen können mögliche Verunreinigungen jeglicher Art (Partikel, Proteine und/oder miRNAs) identifiziert, deren Auswirkung auf EV-Resultate berücksichtigt und in die Analyseverfahren mitaufgenommen bzw. herausgerechnet werden, wodurch anschließend biologisch relevante pOL-EV-miRNAs charakterisiert werden können.

2 Material und Methode

2.1 Geräte

Tabelle 2-1: Liste verwendeter Zentrifugen und Rotoren. Alphabetisch nach Hersteller sortiert.

Typ	Name	Hersteller
Ultrazentrifuge (Tisch-) Ultrazentrifuge Rotor (Ultrazentrifuge) Rotor (Ultrazentrifuge) Rotor (Ultrazentrifuge) Rotor (Ultrazentrifuge)	Optima™ L-90K Ultracentrifuge Optima™ Ultracentrifuge Max-E SW40-Ti SW28 TLA-55 TLS-55	Beckman Coulter (München)
Zentrifuge	Z383K	Hermle (Wehingen)
Zentrifuge Zentrifuge Zentrifuge	Megafuge® 1.0R Tabletop Biofuge® fresco Biofuge® 17RS	Heraeus (Hanau)

Tabelle 2-2: Geräteliste. Alphabetisch nach Hersteller sortiert.

Name	Hersteller
2100 Bioanalyzer	Agilent (Santa Clara, CA, USA)
StepOne™ Real-Time PCR system 48-well StepOne™ Real-Time PCR system 96-well	Applied Biosciences (Waltham, Massachusetts, USA)
T3 Thermocycler	Biometra (Göttingen)
Mini-PROTEAN® TetraVertical Electrophoresis Cell Mini-PROTEAN® TetraVertical Electrophoresis Cell Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell System Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell System	Bio-Rad (München)
Gefriertrocknungsanlage ALPHA 2-4 LD	Christ (Osterode am Harz)
Epson Perfection 1660	Epson (Suwa, Nagano, Japan)
Hyperkassette	GE Healthcare (München)
Water bath Z 383 K	Hermle (Wehingen)
Heating thermomixer HTMR-133	HLC (Bovenden)
HiSeq 2000 Sequencing System	Illumina (San Diego, CA, USA)
C200 Incubator	Labotect (Göttingen)
Leica DM-IL (Inverses Mikroskop)	Leica (Wetzlar)
NanoSight, LM10	Malvern Instruments (Malvern, Großbritannien)
gentleMACS Dissociator MACS MultiStand MACSmix Tube Rotator MidiMACS Separator	Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach)
Optimax Typ TR X-Ray Film Processor	MS Laborgeräte (Wiesloch)
Single channel electronic pipette E4 XLS	Rainin (Columbus, OH, USA)
CO2 incubator MCO-20AIC	Sanyo (Moriguchi, Präfektur Osaka, Japan)
pH meter Lab 850 Laborflaschen	Schott (Mainz)
Tecan Infinite M200 Pro	Tecan Life Sciences (Männedorf)
SteriIGARD III Advance Class II Bio-logical Safety Cabinet	The Baker Company (Sanford, USA)
Nanodrop™ 3300 Photospectrometer Nanodrop™ 1000 Photospectrometer	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Haemocytometer	VWR (Radnor, PA, USA)

2.2 Materialien, Chemikalien, Puffer, Medien und kommerzielle Kits

Tabelle 2-3: Materialien Alphabetisch nach Hersteller sortiert.

Name	Katalognummer	Hersteller oder Vertrieb
6-well Multischalen Einsatz	353102	BD Falcon, Heidelberg
6-well Multischalen (Kompatibel für Einsatz)	353502	
Polyallomer Microfuge Eppendorf Tube 1,5 ml	357448	Beranek (Weinheim)
Polyallomerröhrchen für Ultrazentrifugation 14 ml	331374	
Polyallomerröhrchen für Ultrazentrifugation 38,5 ml	5052	
Polyallomerröhrchen für Ultrazentrifugation 2,2 ml	347357	
Spritzen 1 ml	H999.1	Carl Roth (Karlsruhe)
PVDF Membran	T830.1	
KIMTECH® Science Präzisionstücher	AA64.1	
Amersham Hyperfilm ECL	28906837	GE Healthcare (München)
Pipetten:	---	Greiner (Frickenhäuser)
- 5 ml	606180	
- 10 ml	607180	
- 25 ml	760180	
- 50 ml	768180	
Reaktionsgefäße (15 ml)	188271	
Reaktionsgefäße (50 ml)	227261	
Transferpipetten 3,5 ml	86.1171	
12-well Multischalen	665180	
Amicon Ultra-15, PLHK Ultracel-PL Membran, 100 kDa	UFC910024	
Millipore Express PLUS Membran, Polyethersulfon, hydrophil, 0,22 µm, 13 mm	CX07.1	Millipore (Billerica, MA, USA)
PVDF-Membran, Immobilon-P, 0.45 µm Porengrößen	IPVH00010	
Zellkulturschalen 6 cm	10111351	Nunc, ThermoFisher Scientific (s.u.)
24-well Multischalen	734-0992	Nunc, VWR (s.u.)
Pipettenspitzen :	---	Sarstedt (Nümbrecht)
- 0,1 – 10 µl	70/1130.210	
- 0,5 – 20 µl	70/1116.210	
- 2 – 20 µl	70/760.213	
- 2 – 200 µl	70/760.211	
- 100 – 1250 µl	70/1186.210	
Zellschaber	---	Sarstedt (Nümbrecht)
- 16 cm	83/1832	
- 25 cm	83/1830	
- 39 cm	83/1831	
Sterilfilter (Spritzenaussatz)	16532	Sartorius (Göttingen)
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL	4346907	Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)
MicroAmp™ Fast Optical 48-Well Reaction Plate, 0.1 mL	4375816	
MicroAmp® Optical Adhesive Film	4311971	
MicroAmp® 48-Well Optical Adhesive Film	4375323	
Sterilfilter (für Schottglas)	595-4520	
6-well Multischalen	596-4520	
	10119831	

Pasteurpipetten (Glas mit Baumwolle)	612-1799	VWR (Radnor, PA, USA)
Pasteurpipetten (Glas ohne Baumwolle)	612-1719	
Spritzen 10 ml	613-3931	
Nunc™ zellkulturbehandelte Kolben mit Vent/Close-Verschlusskappen	734-2046	
Objektträger	630-1985	
Parafilm M	291-1213	
Whatman-Papier	514-8013	
Zellkulturschalen 15 cm	34-0013	
Zellsieb (<i>engl.</i> Cell strainer) 40 µm pore size	734-0002	
Zellsieb (<i>engl.</i> Cell strainer) 70 µm pore size	734-0003	
Zellkultureinsätze (<i>engl.</i> Inserts) für 6-Well-Plates	734-0040P	
6-Well-Companion Platte für Membraneinsätze	734-0065	
Reaktionsgefäße 1,5 ml, Safe-Lock PCR-clean	211-2164	
Einwegspritzen, 50 ml	613-2053	

Tabelle 2-4: Chemikalien und Kommerzielle Kits Alphabetisch nach Hersteller sortiert.

Name	Katalognummer	Hersteller
Agilent DNA 1000 Kit	5067-1504	Agilent (Santa Clara, CA, USA)
Bioanalyzer High Sensitivity DNA Analysis	5067-4626	
SensiFAST Probe Hi-ROX Kit	Bio-82005	Bioline (London, UK)
Precision Plus Protein Standards Dual Color	161-0374	Bio-Rad (München)
1,4-Dithiothreitol (DTT)	6908.2	Carl Roth (Karlsruhe)
Chloroform	3313.1	
10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)	9592.2	
2-Propanol p.a.	6752.5	
Acrylamid Mix 30% (Rotiphorese® Gel 30)	3029.1	
30 % hydrogen peroxide	8070.2	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	4720.1	
EDTA	8040.2	
Ethanol 100 %	9065.4	
Milchpulver	T145.2	
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	2367.1	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	CN30.3	
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	4855.1	
Tween 20	9127.2	
Albumin Fraktion V, proteasefrei	T844.2	
Sepharose® CL-2B	17014001	
B27	17504044	Gibco™ (Tochterfirma von Life Technologies - Carlsbad, CA, USA)
TruSeq SR Cluster Kit v3-cBot-HS	GD-401-3001	Illumina (San Diego, CA, USA)
RNase A	12091-039	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
2.5 % Trypsin	5090-046	
TaqMan® Gene Expression Master Mix	4369016	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	4366596	
0.22 µm PES-filter membranes	CX07.1	Merck Millipore
Neural Tissue Dissociation Kit - Papain	130-092-628	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
anti-AN2 Beads	130-097-170	
anti-O4 Beads	130-094-543	
NeuroBrew-21 (NB21)	130-093-566	
Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11-245 kDa)	P7712L	New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)
6x loading dye	B70245	
NEBNext Multiplex Small RNA Prep Set for Illumina	E7560S	
RNasin® Plus RNase Inhibitor	N2611	Promega (Fitchburg, WI, USA)

RNase-free DNase Set	79254	Qiagen (Venlo, Niederlande)
QIAzol Lysis Reagent	79306	
Negative Control siRNA	1022076	
miScript miRNA Mimic (5 nmol) – miR-122-5p	142528059	
miRNeasy Mini Kit	217004	
miRNeasy Micro Kit	217084	
MinElute PCR Purification Kit	28006	
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail	4693116001	Roche (Basel, Schweiz)
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	4897030001	
RNaseZAP™, Cleaning agent for removing RNase	R2020	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
10 x phosphate buffered saline (PBS)	P5493-1L	
H ₂ O ultrapure	W4502	
Glutamate	G-5889	
D/L-Serin	S4375	
Ponceau S Lösung	P7170	
Triton X-100	T8787	
Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent	13778100	Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)
Opti-Mem®	31985062	
1x HBSS, no calcium, no magnesium	14170088	
10x HBSS, no calcium, no magnesium	14170138	
2,5 % Trypsin	15090-046	
Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep) (10,000 U/mL)	15140-122	
RNase™ AWAY	7002PK	
TaqMan Fast Advanced Master Mix	4444557	
TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit	A28007	

Tabelle 2-5: Sonden für miRNA- und mRNA-Detektion in qPCR. qPCR-Sonden von Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA) für miRNAs (Katalognummer A25576 und 4427975) und mRNAs (Katalognummer: 4331182).

Name	Assay-ID
miR-122-5p	477855_mir
miR-30d-5p	478606_mir
miR-451a	mmu482766_mir
miR-148b-3p	477824_mir
miR-181-5p	478583_mir
miR-144-3p	477913_mir
miR-19b-3p	mmu478264_mir
miR-24-3p	mmu481011_mir
miR-186-5p	mmu480966_mir
miR-486a-5p	mmu481183_mir
let-7g-5p	478580_mir
Cel-miR-39	478293_mir
miR-122-5p	000445
miR-30d-5p	000420
snoRNA-202	001232
<i>Glut1 (Slc2a)</i>	Mm00441480_m1
<i>Pkm</i>	Mm00834102_gH
<i>Pgk1</i>	Mm00435617_m1
<i>RN18S</i>	Mm03928990_g1

Tabelle 2-6: Puffer und Lösungen.

Name	Zusammensetzung
1x SDS Elektrophorese Puffer	200 ml/l 5x SDS Elektrophorese Puffer verdünnt mit dH ₂ O
25x Roche® Complete protease inhibitor cocktail	Eine Tablette Roche® Complete protease inhibitor cocktail in 2 ml ddH ₂ O lösen
4x Proben-Puffer	200 mM Tris-HCL (pH=6.8); 8% SDS; 0.4% bromphenol blue; 40% glycerol; Optional: 400 mM DTT für reduzierende Bedingungen
5x SDS Elektrophorese Puffer	125 mM Tris; 1.25 M Glycine; 0.5% SDS; pH 8.3
Blockierlösung (BSA)	BSA 3 % w/v BSA in TBST
Blockierlösung (Milch)	PBST; 4% Milchpulver (#T145.2, Roth)
ECL (<i>engl.</i> enhanced chemiluminescence) Lösung	Solution A: 50 mg Luminol (#A4685, Sigma Aldrich) in 200 ml 0.1 M Tris-HCl (pH 8.6) lösen; Lagerung bei 4 °C Solution B: 11 mg para-hydroxy coumaric acid (C9008, Sigma Aldrich) in 10 ml DMSO (#4720.1, Roth) lösen; Lagerung bei RT Präparation vor dem Entwickeln (pro Membrane): Mix 1 ml Solution A mit 100 µl Solution B und 0.3 µl 30 % H ₂ O ₂ (#8070.2, Roth); Inkubieren der Membran für 2 min
Lysepuffer	50 mM Tris/HCl (pH 7,2); 150 mM NaCl; 1 % Triton X-100; Roche® Complete Protease Inhibitor Cocktail wurde vor der Verwendung hinzugefügt (1:25)
PBS	150 mM NaCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.7 mM NaH ₂ PO ₄ , pH=7.2
PBST	PBS; 0,1 % Tween 20
TBST	0.1% (v/v) Tween 20 in TBS
Poly-L-Lysine (PLL)	0.1 g/l Poly-L-Lysine Hydrobromid; Polymerisationsgrad: 70,000-150,000 (#P1274-1G, Sigma-Aldrich)
Sammel- und Trenngel für SDS-PAGE	Acrylamidgele wurden nach Sambrook und Russell 2001 hergestellt
Sammelgelpuffer	1 M Tris (pH 6,8); Lagerung bei 4 °C
TBS (<i>engl.</i> Tris-buffered saline)	150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH=7.2
Transferpuffer (WB*)	24 mM Tris (#4855.5); 192 mM Glycine (#3790.3, Roth); 20 % EtOH (#9065.4, Roth; verdünnt mit dH ₂ O)
Trenngelpuffer	1.5 M Tris (pH 8,8); Lagerung bei 4 °C

*Westernblot

Tabelle 2-7: Medien und Medium-Komponenten.

Medium	Zusammensetzung
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 1 % HS	13.4 g/l DMEM (#52100-039 Invitrogen); 2 g/l NaHCO ₃ ; 10 ml/l 100x Pen-Strep (#15140-122, Life Technologies); 10 ml/l horse serum (#1517705, Gibco)
Ampicillin stock	75 mg/ml Ampicillin (#HP62.1, Roth); in ddH ₂ O, sterilisiert durch Filtration
CNTF stock (10 µg/ml)	5 µg CNTF (#450-13, Peprotech) verdünnt in 500 µl D-PBS (#14287-080, Gibco) mit 0.2 % BSA (#A4919-1G, Sigma Aldrich); aliquotiert und Lagerung bei -80 °C
Differenzierungsmedium (DM)	Grundmedium; 4.2 µg/ml Forskolin (#F6886, Sigma); 10 ng/ml CNTF (#450-13, Peprotech); 40 ng/ml T3
DNase (0,05 %)	50 mg DNase I (#10104159001, Roche) in 10 ml 10 x HBSS und 90 ml H ₂ O dest. (pH 6,8 einstellen mit 2 N NaOH)
FGF Stock (10 µg/ml)	(#167100-18B-A Tebu-bio) 0,5 µg/ml, angesetzt nach Herstellerangaben
Forskolin stock (4,2 mg/ml)	10 mg Forskolin (#F6886, Sigma) in 2,4 ml DMSO (#4720.1, Roth) lösen, aliquotieren und bei -20 °C lagern
Grundmedium	NeuroMACS (#130-093-570, Miltenyi Biotec); 20 ml/l NB21 (#130-093-566, Miltenyi Biotec); 10 ml/l Pen-Strep (#15140-122, Life Technologies); 2 mM L-Glutamine (#25030-024, Life Technologies)
Grundmedium mit PDGF und FGF	Grundmedium; 10 ng/ml PDGF (#167100-13A-B, Tebu-bio) und 5 ng/ml FGF (#167100-18B-A Tebu-bio)
HBSS	5,33 mM KCl; 0,441 mM KH ₂ PO ₄ ; 4,17 mM NaHCO ₃ ; 137,93 mM NaCl; 0,338 mM Na ₂ HPO ₄ ; 5,56 mM D-glucose; 0,0266 mM Phenol Rot

HBSS ⁺	HBSS + 0,15 % MgSO ₄
MTT Reagenz	5 mg/ml Thiazol Blue Tetrazolium Bromide (#M2128, Sigma Aldrich) in PBS lösen; Sterile filtrieren mit einem 0,22 µm Filter; dunkel bei 4°C lagern
Natriumselenit (30 mM)	0.05187 g Natriumselenit (#S5261, Sigma Aldrich) in 10 ml H ₂ O dest. lösen; Aliquots bei -20 °C lagern
Neurobasal Ausplattier-Medium	Neurobasal (#1309101 Gibco); 20 ml/l B27 (#17504044 Invitrogen); 0.5 mM L-glutamine (#25030-024, Life Technologies); 10 ml/l 100x Pen-Strep (#15140-122, Life Technologies); 12.5 µM Glutamate
Neurobasal Versorgungsmedium	Neurobasal (#1309101 Gibco); 20 ml/l B27 (#17504044 Invitrogen); 0.5 mM L-Glutamine (#25030-024, Life Technologies); 10 ml/l 100x Pen-Strep (#15140-122, Life Technologies)
NT-3 stock (1 µg/ml)	10 µg NT-3 (#450-03, Peprotech) in 100 µl dH ₂ O lösen und anschließend in 9.9 ml D-PBS (#14287-080, Gibco) mit 0.2 % BSA verdünnen; aliquotieren und bei -80°C lagern
PDGF Stock (10 µg/ml)	2 µg lyophilisiertes PDGF (#167100-13A-B, Tebu-bio) in 20 µl ddH ₂ O lösen, 180 µl D-PBS (#14287-080, Gibco) mit 0.2 % BSA hinzufügen; aliquotieren und bei -80 °C lagern
Proliferationsmedium (PM)	Grundmedium; 4.2 µg/ml Forskolin (#F6886, Sigma); 10 ng/ml CNTF (#450-13, Peprotech); 10 ng/ml PDGF (#167100-13A-B, Tebu-bio), 1 ng/ml NT-3 (#450-03, Peprotech)
T3 (500 µM Stock)	0,0034 g T3 (#T6397, Sigma Aldrich) in 10 ml EtOH p.a. (#9065.4, Roth) lösen; Dunkel lagern bei -20 °C
Trypsin (1 %)	100 ml Trypsin (#15090-046, Invitrogen) mit 15 ml 10 x HBSS (#14170138, Thermo Fischer Scientific) und 135 ml H ₂ O mit 125 mg DNase I (#10104159001, Roche) lösen; pH 7.8; aliquotieren und bei -20 °C lagern

* Abkürzungen: CNTF (*engl.* Ciliary neurotrophic factor); PDGF (*engl.* platelet derived growth factor); NT-3 (*engl.* Neurotrophin-3); T3 (Triiodthyronin); HS (Pferdeserum, *engl.* horse serum); HBSS (*engl.* Hank's Balanced Salt Solution)

Tabelle 2-8: Zusammensetzung der Supplementen NS21, sm-NS19 und sm-NS16. Basierend auf Chen et al. 2008.

	Katalog-nummer	Quelle	NS konz. (µg/ml)	Medium konz. (µg/ml)
Superoxid-Dismutase (SOD)	S5395	Bovine Erythrozyten	125	2.5
Katalase (KAT)	C40	Bovine Leber	125	2.5
Bovine Serum Albumin (BSA)	*	Bovines Blut	125 000	2500
Insulin	I9278	Humanes Insulin, rekombinant, exprimiert in <i>S. cerevisiae</i>	200	4
Holo-Transferrin	2914-HT	Humanes Plasma	250	5
Glutathione (reduziert)	G6013	Hefe	50	1
T3 (triiodol-I-thyronine)	T6397	Synthetisch organisch	0,10	0.002
L-Carnitine	C0283	Synthetisch	100	2
Ethanolamine	E0135	Synthetisch organisch	50	1
D(+)-galactose	G0750	Boviner Milchzucker	750	15
Putrescine	P5780	Synthetisch	805	16.1
Sodium Selenite	S1382	Synthetisch	0,72	0.01435
Ethanolische Bestandteile				
Corticosterone	C2505	Synthetisch organisch	1	0.02
Linoleic acid	L1012	Pflanze: Distelöl	50	1
Linolenic acid	L2376	Pflanze: Leinöl	50	1
Lipoic acid (thioctic acid)	T1395	Synthetisch	2,35	0.047
Progesterone	P0130	Synthetisch organisch	0,32	0.0063
Retinol acetate	R7882	Synthetisch	5	0.1

Retinol, all trans (vit. A)	95144	Synthetisch	5	0.1
D,L-alpha-Tocopherol (vit. E)	T3251	Synthetisch	50	1
D,L-alpha-Tocopherol acetate	T3001	Pflanze: u. a. Soja- bohne, Erdnüsse, Rapsöl	50	1

Namen der Komponenten sind überwiegend in englischer Sprache angegeben, da Original-Produkte vom Hersteller ebenfalls in Englisch angegeben werden.

Alle Komponenten sind von Sigma außer holo-Transferrin (R&D biotech) und BSA (siehe unten).

Alle Komponenten für sm-NS21 (*engl.* self-made NS21) und sm-NS19 wurden in Neurobasal gelöst.

*Original BSA aus NS21 (Neuronal Supplement 21, Chen et al. 2008) wurde großzügig von Miltenyi zur Verfügung gestellt.

Mit grauer Box markierte Komponenten wurden für sm-NS19 (*engl.* self-made NS19) gepoolt

Mit schwarzer Box markierte Komponenten wurden für sm-NS16 (*engl.* self-made NS16) gepoolt

Protein Komponenten sind mit roter Box markiert

Tabelle 2-9: Komponenten für individuelle miRNA-Analysen.

Komponenten	Quelle	Cat.-Nr. (*) und Firma	Input für RNA-Isolation	Menge in 500 µl NS21
Katalase	Rinder-Leber-1	C40, Sigma	62,5 µg	62,5 µg
Katalase	Rinder-Leber-2	6025.1, Roth	62,5 µg	62,5 µg
Katalase	Erythrozyten	C3556, Sigma	62,5 µg	62,5 µg
Katalase	<i>Aspergillus niger</i>	C3515, Sigma	62,5 µg	62,5 µg
Bovine Serum Albumin			71 mg	62,5 mg
Superoxid-Dismutase			62,5 µg	62,5 µg
Holo-Transferrin	Siehe Tabelle 2-8, S. 26		2,6 mg	0,125 mg
Insulin			0,1 mg	0,1 mg

(*) Katalog-Nummer

2.2.1 Antikörper

Tabelle 2-10: Primäre Antikörper.

Antigen	Klone	Katalog- nummer	Spezies	Verdün- nung	Hersteller
Actin	polyklonal	A2066	Kaninchen	1:200	Sigma
Alix	49/AIP1	611621	Maus	1:250	BD
Calnexin	polyklonal	SPA-865	Kaninchen	1:1000	Enzo
Calreticulin	polyklonal	SPA-600	Kaninchen	1:4000	Stressgene
CC3	polyklonal	9661S	Kaninchen	1:1000	Cell Signalling
CD81	B-11	sc-166029	Maus	1:1000	Santa Cruz
Flotillin-1	polyklonal	F1180	Kaninchen	1:1000	Sigma
GAPDH	polyklonal	A300-641A	Kaninchen	1:2000	Biomol
GLUT1	monoklonal	laborgefertigte	Kaninchen	1:10000	AG-Nave
Katalase	monoklonal	sc-271803	Maus	1:1000	Santa Cruz
PKM2	polyklonal	#3198	Kaninchen	1:1000 (*)	Cell Signalling
PLP	aa3	laborgefertigte	Ratte	1:10	Hybridoma AG-Nave
SOD	monoklonal	sc-101523	Maus	1:1000	Santa Cruz
Syntenin	polyklonal	ab19903	Kaninchen	1:2000	Abcam
TSG101	4A10	GTX70255	Maus	1:1000	GeneTex
Tubulin	TUJ1 1-15-56	BLD-845502	Kaninchen	1:2000	BioLegend (Biozol)

* in 3 % w/v BSA in TBST

Tabelle 2-11: Sekundär Antikörper. Hergestellt von Dianova. Verwendung in einer 1:10 000 Verdünnung.

Ziel-Spezies	Wirt-Spezies	Konjugation	Katalognummer
Maus	Ziege	HRP	#115-035-003
Kaninchen	Ziege	HRP	#111-035-003
Ratte	Ziege	HRP	#112-035-003

2.2.2 Software

Tabelle 2-12: Computer Softwares.

Name	Hersteller / Entwickler
QBase+	Biogazelle
Microsoft Office 2013	Microsoft
StepOne Software 2.2.2	Applied Biosystems
ImageJ	Open source, National Institutes of Health
Graphpad PRISM	Graphpad Software
CorelDRAW X7	Corel Corporation
FastQC Software	v 0.10.1, Babraham Bioinformatics, UK
Alignment Software bowtie	Langmead et al. 2009
Nanosight 2.3 Software	Malvern

2.3 Zellkultur

2.3.1 Isolierung und Herstellung primärer Zellkulturen

In der vorliegenden Arbeit wurden primäre murine Zellkulturen zum einen von Oligodendrozyten und zum anderen von Neuronen erstellt. In den folgenden beiden Kapiteln sind die unterschiedlichen Protokolle für die Herstellung der entsprechenden *in vitro* Zellkulturen beschrieben. Die Inkubatoren für die Zellkulturen wurden auf 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 8 % CO₂ eingestellt.

2.3.1.1 Antikörper basierte Isolierung primärer Oligodendrozyten

Die Isolierung primärer Oligodendrozyten aus postnatalen Mäusen (P 6-9) orientiert sich an den Protokollen aus Fröhlich et al. 2014 und Miebach 2019. Zunächst wurden die Tiere dekapitiert, das Gehirn isoliert und anschließend mittels des Neural-Tissue-Dissociation-Kits mit Papain (Miltenyi Biotech) eine Einzelzellsuspension hergestellt. Nachfolgend wurde die Zellsuspension entweder mit NG2 (Neural/Glial Antigen 2)-Antikörper- (Anti-AN2 MicroBeads, Miltenyi Biotech) oder O4-Antikörper-gekoppelten magnetischen Kügelchen (*engl.* Beads; Anti-O4 MicroBeads, Miltenyi Biotech) nach Herstellerangaben inkubiert, um je nach dem NG2- oder O4-positive Gliazellen aufzureinigen. Über einen Magneten (QuadroMACS Separator, Miltenyi Biotech) wurden die jeweiligen Zellen zunächst aus der Zellsuspension isoliert. Anschließend wurden die Zellen am

Magneten mit DMEM + 1 % HS gewaschen und im entsprechenden Medium, das für das Ausplattieren der jeweiligen Zellen verwendet wird, eluiert (nach Herstellerangaben und Miebach 2019).

In 6 cm PLL-beschichteten Petrischalen wurden O4-positive pOLs in DMEM + 1 % HS ausplattiert. Nachdem die Zellen adhärirt waren (ca. 1 – 2 h), wurde auf MACS Grundmedium mit PDGF und FGF gewechselt (Tabelle 2-7; S. 25). An DIV1 (Tage *in vitro*, *engl.* days *in vitro*) wurde das Medium (abhängig von der Menge an Zelldebris/-detritus im Überstand) entweder pelletiert (300 x g / RT / 10 min) und anschließend wieder auf die Zellen gegeben oder es wurde (bei geringem Zelldebris) keine Behandlung vollzogen. Während des Zentrifugen-Schritts wurden die Zellen zweimal mit 37 °C warmen DMEM gewaschen. Je nach Integrität der Zellen war die EV-Isolationsperiode entweder von DIV2 bis DIV4 oder von DIV3 bis DIV5 in frischem MACS Grundmedium. Wurden EVs von DIV3 bis DIV5 gesammelt, erfolgte an DIV2 ein halber Medium-Wechsel.

NG2-positive Zellen wurden in PM (Tabelle 2-7) auf PLL-beschichteten 6 cm Petrischale ausplattiert. An DIV2 wurde das Medium auf DM (Tabelle 2-7) gewechselt und die EV-Isolations-Periode erstreckte sich von DIV4 – 6 in frischem DM mit oder ohne NS21. Die verwendeten Zellzahlen sind der Tabelle 2-13 (S. 31) und Tabelle 7-1 (S. i, Anhang) zu entnehmen.

2.3.1.2 Isolierung primärer kortikaler Neurone aus murinen Embryonen

Für die Herstellung von primären neuronalen Zellkulturen aus Kortizes (pCNs, *engl.* primary cortical neurons) wurden zunächst E15 Embryonen aus dem Uterus von trächtigen Mäusen präpariert. Danach wurden die Gehirne und anschließend die Kortizes isoliert, in dem sie vom Hirnstamm und den olfaktorischen Bulbi getrennt wurden. Anschließend wurden die Meningen entfernt. Nach einem Trypsin-Verdau (1 % in HBSS / 37 °C / 4 min) wurden die Kortizes zweimal mit HBSS⁺ gewaschen und anschließend in 0,05 % DNase (in HBSS) mechanisch mittels Pasteurpipette mit kleiner werdender Öffnung, zu einer Einzelzellsuspension dissoziiert. Nach erneuten zweimaligen Waschschritten mit HBSS⁺ wurden die Zellen pelletiert (130 x g / 10 min / 4 °C), in Ausplattier-Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. In PLL-beschichteten 6-well Platen wurden $0,7 \times 10^6$ pCNs ausplattiert. Für die Aufrechterhaltung der neuronalen Kulturen wurde das Versorgungsmedium alle 4 bis 5 Tage gewechselt.

2.3.2 Boyden Chamber Co-Kultursystem

Das Boyden Chamber System ermöglicht eine kontaktlose Co-Kultivierung von zwei unterschiedlichen Zelltypen. Über eine Filtermembran (Porengröße 1 µm) kann ein Austausch von Partikeln und Molekülen zwischen den Zelltypen erfolgen.

Für Co-Kultur-Versuche wurden $0,7$ bis 1×10^6 pCNs auf PLL-beschichtete 6-well Zellkulturplatten ausplattiert. Zwei Tage später wurden $0,9$ bis $1,25 \times 10^6$ O4-positive pOLs in den entsprechenden Einsätzen ausplattiert. An DIV5 (pCNs) und DIV3 (pOLs) wurden die Zellen für 48 h in

Neurobasal Versorgungsmedium zusammengeführt. Wurden pOLs zuvor transfiziert, so geschah dies an DIV3 bevor die Zellen zusammengeführt wurden.

Bei NG2-positiven pOLs wurden $0,4 \times 10^6$ Zellen pro Einsatz ausplattiert. An DIV4 (NG2-positive pOLs und pCNs) wurden die Zellen ebenfalls in Neurobasal Versorgungsmedium zusammengeführt und blieben für weitere 72 h im Co-Kultursystem.

Je nach weiterer Analyse wurden pCNs in Lysepuffer (Westerblot) oder Qiazol (RNA) aufgenommen. Wurden sowohl RNA- als auch Westernblot-Analysen durchgeführt, dann wurden die pCNs zunächst in 200 μ l Lysispuffer abgeschabt und anschließend 100 μ l in Qiazol zur RNA-Isolierung überführt und 100 μ l für die Protein-Analyse verwendet.

2.3.3 Zelltransfektion mit Lipofectamin

Um die Wirkung von miR-122-5p auf pCNs zu untersuchen, wurden pCNs mit einer miR-122-5p-Mimik transfiziert. Hierfür wurde das Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent nach Protokollangaben mit folgenden Änderungen verwendet: Im 6-Well-System wurden 2 μ l Lipofectamin verwendet. Die Konzentration der miR-122-5p-Mimik beliefen sich auf 80 pmol, 160 pmol und 240 pmol. Durchgeführt wurde die Transfektion der pCNs an DIV5 und nach 24 h, 48 h oder 72 h wurde je ein Ansatz für Protein- und RNA-Analysen verwendet. Als Kontrolle wurde für jeden Ansatz eine kontroll-misch-RNA (5'-AATTCTCCGAACGTGTCACGT-3', Qiagen) verwendet.

Desweiteren wurden pOLs mit 160 pmol miR-122-5p-Mimik transfiziert, um die Konzentration von miR-122-5p in pOL-EVs möglicherweise zu erhöhen. Anschließend wurden transfizierte pOLs mit pCNs im Co-Kultursystem vereint und für weitere 48 h kultiviert. Auf pCN-Ebene wurde abschließend die Auswirkung der Mimik-Transfektion untersucht. Weitere Informationen siehe 2.3.2 (S. 29).

2.3.4 Stimulation primärer Oligodendrozyten durch D/L-Serin und Glutamat

Wie unter 1.3.2 (S. 16) beschrieben, könnte oligodendrogliale EV-Freisetzung von elektrisch aktiven Neuronen abhängen (Frühbeis et al. 2013). Um diesen Vorgang *in vitro* nachzuahmen, wurde bei NG2-sortierten pOLs an DIV6 ein Medium-Wechsel durchgeführt und parallel 100 μ M Glutamat und 200 μ M D/L-Serin hinzugefügt. Nach 4 h wurde erneut mit 100 μ M Glutamat und 200 μ M D/L-Serin stimuliert. Nach insgesamt 5 h wurden die EVs isoliert und die Zellen sowie die EVs für weitere Behandlungen aufbereitet.

2.4 Isolation, Charakterisierung und Behandlung von extrazellulären Vesikeln und Medium-Kontrollen

In dem folgenden Kapitel werden zunächst unterschiedliche EV-Isolationsverfahren und Methoden für die EV-Charakterisierung, die in dieser Arbeit verwendet wurden, dargelegt. Außerdem werden eine Methodik zur Depletion von FBS und verschiedene RNase-Behandlungen an EVs und Medium-Kontrollen beschrieben.

2.4.1 Isolation von extrazellulären Vesikeln und Partikeln durch differentielle Ultrazentrifugation

Extrazelluläre Vesikel von *in vitro* pOLs wurden ausschließlich mittels differentieller Ultrazentrifugation (dUZ) isoliert. Die entsprechende Charakterisierung der EVs ist Kapitel 1.3.2 (S. 16) zu entnehmen.

Bei der Isolation von EVs oder entsprechenden Medium-(Kontroll-)Proben wurde durchgehend auf Eis bzw. 4 °C gearbeitet. Um tote Zellen aus dem Zellkulturüberstand zu entfernen wurde dieser bei 130 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Mittels Pipette wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein weiteres Mal zentrifugiert (10 000 x g / 4 °C / 30 min) wodurch Zelldebris und größere Vesikel (Apoptosekörper und Mikrovesikel) pelletiert werden. Anschließend wurde durch Dekantieren der 10 000 x g Überstand in UZ-Gefäße überführt. Durch einen ca. 100 000 x g UZ-Schritt (4 °C / 2 h – SW40 Ti: 29 000 rpm, RCF [avg] 106 201, RCF [max] 149 577, *k*-factor 261,3; SW28: 28 000 rpm, RCF [avg] 103 745, RCF [max] 141 371, *k*-factor 245,5) wurden kleine EVs pelletiert. Für NTA-Analysen wurden 2,2 ml 10 000 x g Überstand in einem parallelen UZ-Schritt (47 000 rpm bei 4 °C; Beckman TLS-55 Rotor, RCF [avg] 146 837, RCF [max] 189 267, *k*-Faktor 68,2) pelletiert.

Der Tabelle 2-13 sind die verwendeten Mengen der EV-Isolationen zu entnehmen. Für dUZ von Basalmedium oder supplementiertem Basalmedium (mit NS21, sm-NS21 oder sm-NS19) wurden 25 ml verwendet. Die Volumina der Medium-Kontrollen der miRNA-Sequenzierung-2 mit und ohne RNase-Behandlung sind der Tabelle 7-1 (Zusatzdaten, S. i) zu entnehmen.

Tabelle 2-13: Zellzahl und Volumenangaben zu den Isolationen von oligodendroglialen extrazellulären Vesikeln

Genetischer Hintergrund	Zellzahl [x 10 ⁶]	Medium [ml]	Ergebnis-Verweis	Isolations-Beads* (Zellen)	< 200 nt cut-off**
WT	5 – 15	12 – 30	Abbildung 3-1, S. 42	O4	+
WT	5 – 20	12 – 45	Abbildung 3-5, S. 48 Abbildung 3-6, S. 49	O4	+
PLP ^{-/-}	9 – 14	20 – 30			
CNC ^{-/-}	7 – 11	15 – 25			
WT	RNA-Sequenzierung-2: Angaben Tabelle 7-1 (S. i)		Kapitel 3.5, S. 61	NG2	∅

WT: Wildtyp | PLP: Myelinproteine Proteolipid-Protein | CNC: 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase
*Beads (engl): Magnetische Kügelchen | **cut-off (Grenzwert) während der RNA-Isolierung

Je nachdem welche anschließende Analyse durchgeführt werden sollte, wurden die Pellets entweder in PBS (für NTA oder RNase-Verdau), in Probenpuffer (für WB) oder in QIAzol (für RNA Analysen) resuspendiert und bei 4 °C (direkte weitere Behandlung), -20 °C (Lagerung für WB) oder -80 °C (Lagerung für RNA-Extraktion) aufbewahrt.

2.4.2 Isolation von extrazellulären Vesikeln und Partikeln durch Größenausschluss-Chromatographie

Über die Größenausschluss-Chromatographie (*engl.* size exclusion chromatography, SEC) können Partikel größenbasierend voneinander getrennt werden. Die benötigten Sepharose-Säulen wurden nach Böing et al. 2014 hergestellt. Für die Herstellung von einer Säule wurde in den Zylinder einer 10 ml Spritze ein 0,22 µm-Filter gelegt. Anschließend wurden 15 ml Sepharose CL-2B (in 20 % Ethanol) mit 5 ml partikelfreiem PBS gemischt und der Spritzenzylinder langsam befüllt, bis ein Säulenvolumen von 10 ml erreicht wurde. Nachfolgend wurde die Säule mit 10 ml PBS gewaschen, bevor sie mit 2 ml NS21 beladen wurde. Zur Elution wurde kontinuierlich PBS nachgefüllt. In den ersten Fraktionen des Eluats sind die großen Partikel vorhanden. Absteigend mit den Fraktionen sinkt auch die Partikelgröße. Basierend auf Brahmer et al. 2019 wurden folgende Fraktionen gepoolt: 1 – 4 (große Partikel), 5 – 6 (kleine Vesikel) und 7 – 14 (Proteine). Anschließend wurden die gepoolten Fraktionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei einem Vakuum von 1,03 mbar gefriergetrocknet. Aufgrund der unterschiedlichen Probengröße wurden die Proben in den folgenden Mengen QIAzol resuspendiert: Fraktionenpool 1 – 4 in 1400 µl; Fraktionenpool 5 – 6 in 700 µl und Fraktionenpool 7 – 14 in 2800 µl. Bis zur RNA-Isolation wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.4.3 Depletion von Partikeln aus Supplement durch 20 h Ultrazentrifugation

Ähnlich zu den EV-Depletions-Protokollen für Seren (Théry et al. 2006; Shelke et al. 2014), wurden 0,2 ml NS21-Supplement für 20 h mit 47 000 rpm bei 4 °C (Beckman TLA-55 Rotor, RCF [avg] 98 963, RCF [max] 130 000, k-Faktor 90.4) zentrifugiert. Anschließend wurden Überstand und Pellet jeweils in QIAzol (Qiagen, nach Hersteller-Angaben) aufgenommen und bei -80 °C bis zu der RNA-Isolation gelagert.

2.4.4 Nanopartikel-Tracking-Analyse

Mittels Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) kann ein Mengen- sowie Größenprofil von gelösten Partikeln einer Probe erstellt werden. Hierfür wurde das Instrument Nanosight LM10 (Kamera Model Hamamatsu C11440-50B/A11893-02) mit 532 nm Laser und der Nanosight 2.3 Software verwendet. Die Temperatur der Probe wurde während der Messung konstant bei 23 °C gehalten. Des Weiteren wurde eine Dosierungspumpe verwendet und über die Skript-Steuerung (*engl.* script control) "Repeatstart, Syringeload 500, Delay 5, Syringestop, Delay 15, Capture 30 and

Repeat 4' gesteuert. Weitere Einstellungen waren: Kamerasteuerung Standard, Kameralevel 15 – 16, Detektionsschwelle (*engl. threshold*) 7 und erwartete minimale Partikelgröße (*engl. minimum expected particle size*) auto. Mit diesen Einstellungen wurden fünf Videos à 30 s aufgenommen und als Grundlage für die Berechnung der Durchschnittlichen Partikelkonzentration und –größe verwendet. Die dUZ-Pellets wurden in Partikel-freiem PBS für die Messung resuspendiert. Um die Analysen im NTA-Messbereich durchzuführen, wurden die Proben konzentriert und anschließend mit dem entsprechenden Faktor verrechnet.

2.4.5 RNase- und Triton-X100-Behandlung von extrazellulären Vesikeln und Mediumsproben

Um ausschließlich RNA innerhalb von EVs zu untersuchen, können EV-Proben mit RNase behandelt werden, da die RNase nicht in intakte EVs eindringen kann. Somit wird die RNA außerhalb der EVs degradiert und die RNA innerhalb der EVs bleibt unversehrt. Durch eine zuvor durchgeführte Detergenzien-Behandlung (z.B. Triton-X 100) kann der RNase-Schutz der Lipid-Doppelmembran aufgehoben werden. Ist die RNA jedoch auch nach Detergenzien- und anschließender RNase-Behandlung zu detektieren, basiert der RNase-Schutz möglicherweise auf Proteinkomplexen. RNase-Behandlungen an dem NS21-Supplement wurden zum einen ohne Detergenzien-Behandlung (100 ml NS21 + 20 µg/ml RNase A [Invitrogen], 30 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln) und zum anderen mit Detergenzien-Behandlung (100 ml NS21 + 1 % (V/V) Triton-X 100 [Sigma-Aldrich]; anschließende Zugabe von 20 µg/ml RNase A [Invitrogen], 30 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln) durchgeführt. Der RNase-Verdau wurde durch die Zugabe von 1,25 µl/ml RNasin Plus RNase Inhibitor (Promega) gestoppt und die Proben mit QIAzol (Qiagen, nach Hersteller-Angaben) versetzt.

Für RNase-Behandlungen der Medium-Kontrollen im Zuge der miRNA-Sequenzierung-2 (miRNA-Seq-2) wurden zunächst 66 ml (zwei UZ-Röhrchen à 33 ml) NS21-supplementiertes Basalmedium im Zuge der dUZ 100 000 x g pelletiert. Anschließend wurden die UZ-Pellets in 100 µl PBS resuspendiert, die jeweiligen Replikate vereint und mit 20 µg/ml RNase A (Invitrogen) behandelt (30 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln). Mit 1,25 µl/ml RNasin Plus RNase Inhibitor (Promega) wurden die Behandlungen gestoppt und die Proben anschließend mit QIAzol (Qiagen, nach Hersteller-Angaben) vermengt. RNase-Behandlungen der pOL-EVs wurden in 20 ml des 10 000 x g Überstands durchgeführt. Auch hier erfolgte die Behandlung mit 20 µg/ml RNase A (Invitrogen) (30 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln) und wurde durch das Hinzufügen von 1,25 µl/ml RNasin Plus RNase Inhibitor (Promega) gestoppt. Nach anschließender UZ wurden die Pellets in 700 µl QIAzol (Qiagen) resuspendiert.

Die Proben wurden nach der Zugabe von QIAzol (Qiagen) entweder bei -80 °C gelagert oder direkt für die RNA-Isolierung vorbereitet.

2.5 RNA Analysen

2.5.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolierung für die Analyse von miRNAs wurde mittels miRNeasy micro Kit (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Bei der Isolierung von pOL- und EV-RNA wurde (wenn nicht anders vermerkt) ein <200 nt „cut-off“ (Grenzwert) und ein „on-column DNase treatment“ (DNase-Verdau auf der Säule) nach Kitangaben durchgeführt. Die RNA-Isolierung aus Medium-Proben erfolgte ohne cut-off und ohne DNase-Verdau.

Für zelluläre RNA-Proben wurden die Zellen zunächst einmal mit eiskaltem PBS gewaschen, bevor sie in QIAzol (1500 µl pro 6 cm Schale) mittels Zellschaber abgelöst wurden. 100 000 x g Pellets wurden in 700 µl QIAzol resuspendiert. Wurden mehrere UZ-Röhrchen pro Replikat verwendet, dann wurden die 700 µl QIAzol aufgeteilt und für die anschließende RNA-Extraktion wieder vereint. 500 µl Supplement (B27 und NS21) wurden entsprechend der Hersteller-Angaben direkt in QIAzol gelöst.

RNA-Isolierung von pCNs (nach Co-Kultur oder Transfektion) erfolgte mittels miRNeasy mini Kit (Qiagen) nach Hersteller-Angaben inkl. on-column DNase treatment und ohne <200 nt cut-off.

2.5.2 Reverse Transkription quantitative PCR

Für die Reverse Transkription von pOL- oder EV-Proben wurden 5 ng RNA verwendet und für miRNA-Analysen von pCNs wurden <10 ng RNA für die Reverse Transkription eingesetzt. Da die RNA-Mengen der Supplemente und der Supplement-Komponenten unterhalb der Messgrenze der verfügbaren NanoDrop Geräten (ND1000 und ND3300, Thermo Scientific) lag, konnte keine RNA-Konzentration bestimmt werden. Hier wurde mit 3,7 µl das maximale Volumen zur Synthese der komplementären DNA (*engl.* complementary DNA, cDNA) eingesetzt.

Vor der reversen Transkription von pOL-, EV-, Medium- und Medium-Komponenten-RNA wurde (wenn nicht anders vermerkt) die synthetisch hergestellte cel-miR-39-3p (UCACCGGGUGUAA-AUCAGCUUG, 0.994 amol) als spike-in hinzugegeben und später für die Probenübergreifende (*engl.* inter-sample) Kalibrierung der RT-qPCR verwendet.

Die cDNA Synthese für miRNAs (außer pCN-miRNA nach Co-Kultur mit transfizierten pOLs) wurde mit dem TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die RT-qPCR wurde der TaqMan Fast Advanced Master Mix sowie die verschiedenen TaqMan Advanced miRNA Assays zur Detektion der jeweiligen miRNAs (Tabelle 2-5, S. 24) nach Herstellerangaben verwendet. Als Thermozykler diente das StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Für die miRNA-Detektion aus pCNs nach Co-Kultur mit transfizierten pOLs wurde das TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) nach Herstellerangaben verwendet. Für

die RT-qPCR wurde das SensiFAST Probe Hi-ROX Kit (Bioline) mit den TagMan miRNA Assays zur Detektion von miR-122-5p, miR-30d-5p und snoRNA-202 (Tabelle 2-5, S. 24) nach Herstellerangaben verwendet.

Die cDNA-Synthese der mRNA von pCNs wurde mit dem Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) nach Herstellerangaben mit kleinen Abänderungen durchgeführt. Zunächst wurde 1 µg RNA mit 2 µl random hexamer primers mit H₂O (dest. RNase-frei) in einem totalen Volumen von 13 µl für 10 min auf 65 °C inkubiert und anschließend direkt auf Eis gestellt. Nach Kit-Angaben wurde daraufhin der RT-Master-Mix (inklusive 5U Transcriptor Reverse Transcriptase) hinzugegeben und mit folgendem Zyklus-Programm die cDNA erstellt:

Tabelle 2-14: Zyklus-Programm für die Synthese von cDNA aus mRNA-Template.

Prozess	Temperatur	Dauer
Anlagerung	25 °C	10 min
Reverse Transkription (RT)	55 °C	30 min
Deaktivierung der RT-Enzyme	85 °C	5 min
Lagerung	4 °C	Endlos

Für die anschließende RT-qPCR wurden cDNA, Taqman[®] Gene Expression Assays (Tabelle 2-5, S. 24) und Taqman[®] Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) nach Hersteller-Angaben für ein Reaktionsvolumen von 10 µl verwendet. Als Thermozykler wurde das StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) verwendet.

2.5.2.1 Probenübergreifende Kalibrierung der RT-qPCR durch Spike-in miRNA

Um in der Studie technische Unterschiede aufgrund individuell durchgeführter cDNA-Synthesen und qPCR-Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten auszugleichen, wurde anhand einer Spike-in miRNA (cel-miR-39-3p) eine Probenübergreifende (*engl.* inter-sample) Kalibrierung durchgeführt. Wie bereits erwähnt wurde jeder Probe (wenn nicht anders notiert) vor der cDNA-Synthese die gleiche Menge Spike-in cel-miR-39 beigefügt (Kapitel 2.5.2).

Nach durchgeführter qPCR wurde zunächst der probenindividuelle Cq-Wert (*engl.* cycle of quantification) für cel-mir-39 bestimmt (mittels Autofunktion in StepOne Software 2.2.2). Anschließend wurde ein Cq-Durchschnittswert (23,628 +/- 0,168 [SEM]; Input 48 Samples) für cel-miR-39 berechnet.

In einem nächsten Schritt wurde an dem berechneten Cq-Durchschnittswert (schwarzgepunktete, vertikale Linie in Abbildung 2-1) der Proben-Schwellenwert (*engl.* *threshold*) jeder individuellen spike-in cel-miR-39 kalibriert (horizontal, gepunktete Linie in Abbildung 2-1 [pink für N1 und grün für N2]). Anschließend wurde der kalibrierte Threshold auf die weiteren Ziel-miRNAs einer Probe übertragen. Somit konnte über den kalibrierten Threshold der Cq-Wert für die Ziel-miRNA der entsprechenden Probe ermittelt werden (vertikale Linien – pink [N1] und grün [N2]). In dem Beispiel aus Abbildung 2-1 ist die Anwendung der Threshold-Kalibrierung für zwei unabhängige Replikate der Katalase aus Rinder-Leber-2 dargestellt. Die Amplifikationskurven stellen den

Mittelwert von zwei qPCR-Replikaten dar. Durch die Threshold-Kalibrierung nähern sich die C_q-Werte der miR-30d-5p von zwei unabhängigen Replikaten an. Der C_q Grenzwert (*engl. cut-off*) wurde auf 35 gesetzt.

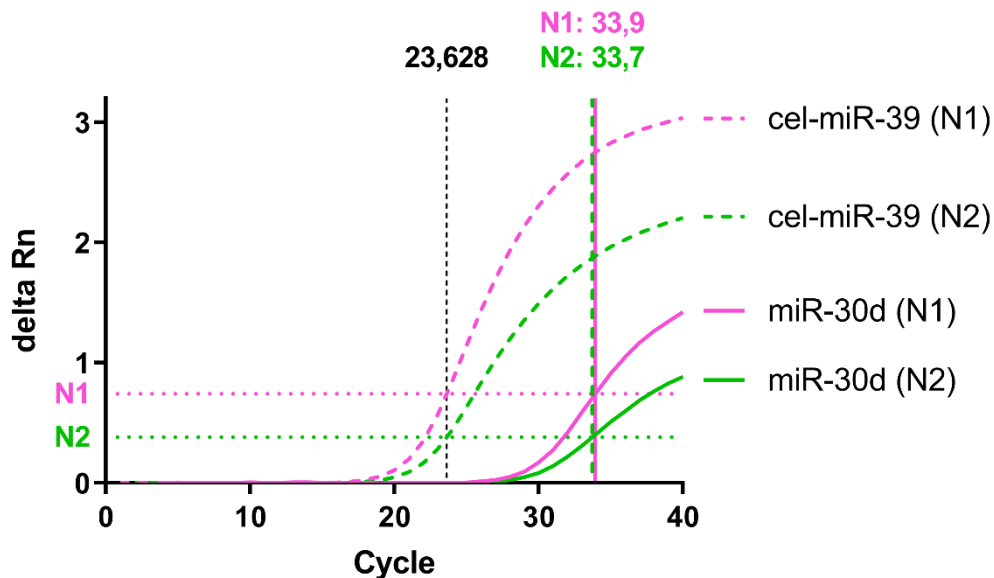


Abbildung 2-1: Illustration für die Definition und Kalibrierung des Schwellenwerts via spike-in cel-miR-39-3p in RT-qPCR. Amplifikationskurven (Mittelwert technischer Replikate) von miR-30d-5p und cel-miR-39 von zwei unabhängigen Replikaten (N1 und N2). Schwellenwert (*engl. threshold*) für cel-miR-39 (horizontal gepunktete Linie: pink [N1]; grün [N2]) wurde am *cycle of quantification* (C_q)-Durchschnittswert (23,628 +/- 0,168 [SEM]; Input 48 Samples; schwarz gepunktete, vertikale Linie) ausgerichtet. Dieser Threshold wurde anschließend auf die Target-miRNAs eines Replikats übertragen und zur C_q-Bestimmung verwendet. Die verwendete Threshold-Kalibrierung ermöglicht Korrekturen technischer Abweichungen, die aufgrund individuell durchgeführter cDNA-Synthesen und qPCR-Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten auftreten können.

2.5.3 MiRNA-Sequenzierung-2 von primären Oligodendrozyten und dazugehörigen extrazelluläre Vesikeln mit und ohne Supplement

Für eine weiterführende miRNA-Sequenzierung-2 (miRNA-Seq-2) wurden pOL-EVs in An- und Abwesenheit von NS21 aufgereinigt. Die pOLs wurden mittels NG2-Beads isoliert (2.3.1.1, S. 28). Des Weiteren wurden auch pOL-EVs nach Glutamat und D/L-Serin Stimulation in das Probenpektrum aufgenommen (2.3.4, S. 30). Tabelle 2-15 gibt einen Überblick, welche Proben parallel behandelt wurden. Genaue Mengen- und Konzentrationsangaben sowie Sequenzierungsdaten sind der Tabelle 7-1 (A Zusatzdaten, S. i) zu entnehmen.

Tabelle 2-15: Probenliste für die miRNA-Sequenzierung-2 (miRNA-Seq-2). Der Tabelle sind parallele erhobene Probenbehandlungen zu entnehmen.

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7
EVs+NS21⁽¹⁾		E2+	E3+	E4+	E5+	E6+	
EVsØNS21⁽²⁾		E2Ø	E3Ø	E4Ø	E5Ø	E6Ø	
pOLs+NS21⁽³⁾		C2+	C3+	C4+	C5+	C6+	
pOLsØNS21⁽⁴⁾		C2Ø	C3Ø	C4Ø	C5Ø	C6Ø	
SEVsØNS21⁽⁵⁾	SE1			SE4	SE5*	SE6	SE7
s-pOLsØNS21⁽⁶⁾	SC1			SC4	SC5*	SC6	SC7
EVs+RNase+NS21⁽⁷⁾	E1++						E7++
EVs+RNaseØNS21⁽⁸⁾	E1+Ø						E7+Ø

*Nachträglich aussortiert, da auf SE5 weniger als 500.000 miRNAs Reads kamen.

⁽¹⁾ Extrazelluläre Vesikel (EVs) mit NS21 | ⁽²⁾ EVs ohne NS21 | ⁽³⁾ primäre Oligodendrozyten (pOLs) mit NS21 |

⁽⁴⁾ pOLs ohne NS21 | ⁽⁵⁾ Glutamat und D/L-Serin stimulierte EVs ohne NS21 und ⁽⁶⁾ dazugehörige pOLs |

⁽⁷⁾ RNase behandelte EVs mit NS21 und ⁽⁸⁾ ohne NS21

Die Sequenzierung wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael W. Pfaffl, Lehrstuhl für Tierphysiologie & Immunologie an der Technischen Universität München, durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde die extrahierte RNA mittels NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina (New England Biolabs, USA) in cDNA Libraries nach Hersteller-Angaben umgeschrieben, mit der Ausnahme, dass Aufgrund der geringen RNA-Ausgangskonzentration in den EV-Proben Adaptoren und Primer 1:2 verdünnt wurden. Nach der PCR Prä-Amplifikation wurden sämtliche Libraries mit Hilfe des MinElute PCR Purification Kits (Qiagen, Deutschland) erneut aufgereinigt und zur Konzentrationsbestimmung per Mikrokapillar-Elektrophorese auf einen DNA 1000 Chip (2100 Bioanalyzer, Agilent, Deutschland) aufgetragen. Um unerwünschte Signale durch Adaptor-Dimere oder längere RNA Spezies (z.B. mRNA oder rRNA) zu vermeiden, wurde eine Längenselektion mit den amplifizierten cDNA-Konstrukten durchgeführt. Dazu wurden normalisierte Konzentrationen der Libraries vereint, auf ein 4 % Agarosegel aufgetragen und die Bande entsprechend einer Länge von 135 bis 160 Basenpaaren (Länge der 5'- und 3'-Adaptoren + ~22nt) ausgeschnitten. Nach einer weiteren Aufreinigung mittels MinElute PCR Purification Kit, wurde die korrekte Längen-Selektion mittels DNA High Sensitivity Kit (2100 Bioanalyzer, Agilent, Deutschland) validiert. Die finalen Sequenzier-Libraries wurden auf einem HiSeq2000 (Illumina, USA) nach vorangegangener Brücken-Amplifikation auf einem cBot (TruSeq SR Cluster Kit v3, Illumina, USA) in 50 Zyklen mit Single-Read Verfahren sequenziert.

Um die allgemeine Qualität der Sequenzierdaten abschätzen zu können, wurden 3'-Adaptor-Sequenzen mittels Btrim (Kong 2011) entfernt. Längenverteilung der sequenzierten RNA Transkripte sowie die Richtigkeit der Basenabfolge, abgebildet durch den Phred Score, wurden durch die FastQC Software (v 0.10.1, Babraham Bioinformatics, UK) bestimmt. Um eine Verzerrung der Daten durch falsch-positive Zuweisung degradiertes RNA zu vermeiden, wurden sämtliche Reads < 16 nt aus dem Datensatz gefiltert. Des Weiteren wurden vor dem finalen Read-Mapping für miRNAs sequentiell alle Transkripte, die keinen oder maximal eine Base Unterschied zu Sequenzen von rRNAs, tRNAs, snRNAs und snoRNAs aufweisen (Rfam Datenbank, Burge et al. 2013), entfernt. Für die Bestimmung der miRNA-Profile wurden die gefilterten Reads mit der aktuellsten Version der miRBase Datenbank (v22, Langmead et al. 2009) abgeglichen. Sämtliche Read-Mapping Schritte wurden mit der Alignment Software bowtie (Langmead et al. 2009) durchgeführt,

wobei maximal eine Basen-Nichtübereinstimmung toleriert und nur das Alignment mit der höchsten Übereinstimmung gezählt wurde. Detaillierte und weiterführende Angaben über verwendete Protokolle können der Veröffentlichung Buschmann et al. 2018 entnommen werden.

Um die Ergebnisse des Medium-RNase-Verdaues (MR) in Relation zu den unverdauten Proben (MKON) setzen zu können, wurden die Sequenzierungsergebnisse von MR mit der mittleren Library-Größe von MKON normalisiert. Demnach ergibt sich der entsprechende Normalisierungsfaktor (NF) von 13,67 folgendermaßen:

$$NF = \frac{\sum MKON_{Mittelwerte_Reads}}{\sum MR_{Mittelwerte_Reads}}$$

Die Normalisierung von MR erfolgte durch die Multiplikation der Reads von MR mit NF. Darauf folgend wurden die normalisierten Reads von MR in Relation zu MKON gesetzt.

2.6 Proteinbiochemie

2.6.1 Lysierung von Zellen und subzelluläre Fraktionierung

Um die Proteinzusammensetzung der pOLs zu analysieren, wurden die Zellen zunächst lysiert. Das komplette Vorgehen wurde auf Eis durchgeführt. Zu Beginn wurden die pOLs zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber in Lysepuffer (Tabelle 2-6; S. 25; 250 µl / 6 cm Schale) abgeschabt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei kontinuierlicher Rotation auf 4 °C inkubiert. Die Zellkerne wurden pelletiert (1000 x g / 10 min / 4 °C), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Zellkern-Pellet verworfen. Gelagert wurde das Zelllysate bei -20 °C.

2.6.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*engl.* sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) können Proteine größenbasierend aufgetrennt und anschließend visualisiert werden. Die Herstellung von 12 %en SDS-Gelen ist an den Angaben aus „Molecular Cloning – A Laboratory Manual“, Tabellen A8-9 und A8-10 im Kapitel A8.43 (Sambrook und Russell 2001) orientiert. Gegossen wurden die Gele in den Casting Stands des Mini PROTEAN® 3 Systems (Bio-Rad).

Protein-Proben wurden in 4-fach Proben-Puffer mit DTT resuspendiert, für 10 min bei 70 °C erwärmt und dann in die Taschen geladen. Als Marker wurden 7 µl Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11–245 kDa, von New England Biolabs) verwendet. Die Elektrophorese lief bei 140 – 160 V bis zur gewünschten Auftrennung der Proteine. Anschließend wurden die Proteine mittels Westernblot (2.6.3) auf eine Polyvinylidenfluorid Membran übertragen.

2.6.3 Westernblot

Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine mittels Westernblot (WB) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran übertragen, die zuvor für 2 min in Ethanol aktiviert wurde. Für den Transfer wurde das Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell System (Bio-Rad) nach Herstellerangaben verwendet. Je nach Versuchsdurchführung wurde der Proteintransfer für 3 h mit 200 mA oder Übernacht (<15 h) bei 40 – 50 mA durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran einmal unter leichtem schütteln mit Wasser (dest.) gespült.

Anschließend wurden bei Raumtemperatur (RT) die Protein-Epitope auf der Membran mit 4 % Milch in PBS-T (oder 3 % BSA in TBS-T [PKM2]) für 30 min blockiert. Die Membran wurde mit den jeweiligen erst Antikörper entweder übernacht bei 4 °C oder für 2 – 3 h bei RT inkubiert und anschließend dreimal mit PBS-T (oder TBS-T) für >8 min gewaschen. Wurde die Membran zunächst mit einem erst Antikörper in 3 % BSA (in TBS-T) behandelt, dann wurde sie anschließend mit 4 % Milch (in PBS-T) blockiert, bevor weitere Behandlung mit erst Antikörpern in 4 % Milch (in PBS-T) durchgeführt wurden.

Meerrettichperoxidase (*engl.* horseradish peroxidase; HRP)-gekoppelte sekundär Antikörper wurden ebenfalls in 4 % Milch (in PBS-T) angesetzt und zum 30 minütigen Inkubieren der Membran verwendet. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Membran mit PBS-T (>8 min) wurde sie 2 min in einer erweiterten Chemilumineszenz (*engl.* enhanced chemiluminescence; ECL) Lösung inkubiert.

Das der Proteinmenge entsprechende Licht wurde unter Verwendung von Hyperfilm ECL (GE healthcare) mittels OptiMax X-Ray film Prozessors detektiert. Nachfolgend konnte mit einem weiteren erst Antikörper die Detektion eines anderen Protein-Epitops vollzogen werden oder die PVDF-Membran bei -20 °C gelagert werden. Entwickelte Filme wurden eingescannt und die Westernblot Signale mittels der Image J Software für Quantifizierungen aufgearbeitet.

2.7 Viabilitätsanalyse mittels MTT-Test

Für die Viabilitätsbestimmung von pOLs während der EV-Isolierungsphasen in Kombination mit sm-NS19 oder NS21 (NB21 von Miltenyi) wurde die zelluläre metabolische Aktivität ermittelt. Hierfür befanden sich die Zellen bis DIV4 in NS21 ergänztem Medium. Von DIV4 bis 6 wurde das Kulturmedium gewechselt und das neue Medium zuvor entweder mit NS21 oder mit sm-NS19 versetzt.

An DIV6 wurde dem Kulturmedium 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromide (MTT) (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma) in einer Konzentration von 0,5 mg/ml beigegeben und die Zellen wurden für 1,5 h bei 37 °C und 8 % CO₂ sowie 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde das Medium verworfen und die gebildeten Formazankristalle wurden in

200 µl Isopropanol, unter leichtem Schütteln in Dunkelheit, gelöst. Die Absorption bei 562 nm wurde mit einem Plattenlesegerät (Tecan Infinite 2000) ermittelt.

2.8 Statistik

Die Ergebnisse der MTT-Tests wurden mit dem Computerprogramm GraphPad Prism ausgewertet. Die Differenz zwischen den Mittelwerten ungepaarter Stichproben wurde mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Signifikanz ($\alpha = 0,05$) durchgeführt ($p = 0,0176$). Die Daten der Kontroll-Gruppe wurden auf 100 % normalisiert.

Für die Darstellung von Messergebnissen in einem Diagramm wurde ebenfalls das Programm GraphPad Prism verwendet. Die Fehlerbalken innerhalb der jeweiligen Diagramme geben entweder die Stichprobenstandardabweichung (*engl.* standard deviation, SD) oder den Standardfehler (*engl.* standard error of the mean, SEM) wieder.

3 Ergebnisse

Wie unter 1.3 (S. 15) beschrieben, bilden Oligodendrozyten und Neurone eine Glia-Neuron-Einheit, bei der die Oligodendrozyten das Neuron unter anderem mit Metaboliten wie Pyruvat versorgen (Saab et al. 2016). Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass Oligodendrozyten EVs herstellen und diese von Neuronen aufgenommen werden können (Frühbeis et al. 2013; Fröhlich et al. 2014). Außerdem konnte *in vitro* ein positiver Effekt von pOL-EVs auf die Vitalität von Neuronen nachgewiesen werden (Frühbeis et al. 2013; Fröhlich et al. 2014). Aufgrund dieser Erkenntnisse ist ein, parallel zum Metaboliten-Support laufender, EV-vermittelter Glia-Support für Neurone wahrscheinlich. Da bereits bei anderen Zelltypen der Transport und die Aufnahme von miRNAs durch EVs beschrieben wurde (Fong et al. 2015), war ein Ziel der vorliegenden Arbeit ein eventuelles miRNA-Profil oligodendroglialer EVs zu beschreiben und deren mögliche phänotypische Auswirkung auf Zielneurone zu untersuchen. Durch die unter 2.4.1 (S. 31) beschriebene Aufreinigungsmethode wurden EVs von pOLs (pOL-EVs) isoliert, die bereits in vorangegangenen Arbeiten beschrieben wurden (Krämer-Albers et al. 2007; Frühbeis et al. 2013; Fröhlich et al. 2014). Die miRNA-Zusammensetzung von pOLs sowie deren EVs, wurde durch RNA-Seq und RT-qPCR analysiert. Die hieraus gewonnenen Ergebnisse sowie weiterführende Resultate werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3.1 RNA-Seq und RT-qPCR Validierung primärer Oligodendrozyten und den dazugehörigen extrazellulären Vesikeln

Um einen umfassenden Überblick des miRNA-Profiles der pOLs und den dazugehörigen EVs zu erhalten, wurde eine RNA-Sequenzierung (miRNA-Seq-1) erhoben (durchgeführt von Dr. D. Fröhlich in Kooperation mit dem Institut für Molekulare Biologie). Die hierfür verwendeten pOLs wurden aus Maus-Embryonen gewonnen (Trotter und Schachner 1989; Krämer et al. 1997; Fröhlich et al. 2014). Um eine Serum-Kontamination bei der EV-Isolation auszuschließen, wurde das chemisch definierte Supplement B27 verwendet. Die bioinformatische Analyse (Abbildung 3-1 A) zeigt zwei stark in der EV-Probe angereicherte miRNAs (miR-122-5p und miR-451a) sowie miRNAs (miR-30d-5p und let-7g), die gleichermaßen in Zellen und EVs vertreten sind. Weiterführende Ergebnisse der kompletten Sequenzierung und Hintergründe über die NGS-Durchführung sind der Veröffentlichung Auber et al. 2019 zu entnehmen. Des Weiteren wurden die NGS-Daten im Gene Expression Omnibus (GEO) des NCBI unter der Zugangsnummer GSE134096 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE134096>) hinterlegt.

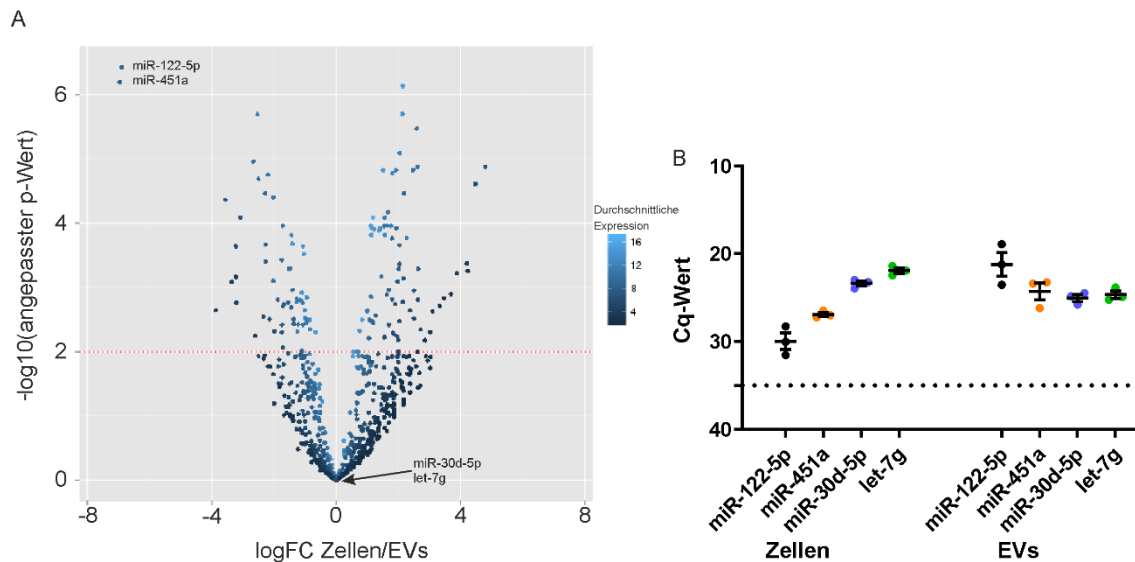


Abbildung 3-1: Ergebnisse der miRNA-Sequenzierung-1 und Validierung mittels RT-qPCR von primären Oligodendrozyten und dazugehörigen extrazellulären Vesikeln. (A) Volcano Plot von miRNAs aus primären Oligodendrozyten und deren extrazellulären Vesikeln (EVs). MiR-122-5p und miR-451a sind stark in EVs angereichert (oben links), während miR-30d-5p und let-7g gleichermaßen in Zellen und EVs vorkommen ($n = 3$). Rot gepunktete Linie: Signifikanzniveau von 1 % Falscherkennungsrate (angepasster p-Wert = 0,01). logFC: \log_2 (*engl.*) Fold Change. **(B)** RT-qPCR Validierung von miR-122-5p, miR-451a, miR-30d-5p und let-7g durch unabhängige biologische Replikate der Zellen und EVs ($n = 3$). Gestrichelte Linie: Cut-off Cq 35 definiert als Hintergrund-qPCR Signal; Fehlerbalken: SEM.

Für die Validierung der miRNA-Seq-1 durch RT-qPCR, wurden die pOLs mittels O4-Beads (siehe 2.3.1.1, S. 28) isoliert. Auch hier (Abbildung 3-1 B) zeigen miR-122-5p sowie miR-451a höhere Cq-Werte in den EV-Proben im Vergleich zu den Zellen (miR-122-5p: Cq EVs 21.2/ Zellen 29.9; miR-451a: Cq EVs 24.3/Zellen 26.9). Die Cq-Werte von miR-30d-5p (EVs 25.0/Zellen 23.4) und let-7g (EVs 24.7/Zellen 21.9) sind dagegen ähnlich zwischen den EVs und den pOLs oder weisen eine Anreicherung in den pOLs auf. Zusammengefasst bestätigen die RT-qPCR-Ergebnisse die Resultate der miRNA-Seq-1.

3.2 Keine Bestätigung eines Transfers von miR-122-5p über oligodendrogliale extrazelluläre Vesikel zu neuronalen Zielzellen

Myelinisierte Neurone haben eine verringerte Glykolyse und erhalten das Glykolyse-Produkt Pyruvat von Oligodendrozyten (Saab et al. 2016). Da, wie unter 1.3.3 (S. 18) beschrieben, Glut1 indirekt durch miR-451a und Pkm2 als direktes Ziel von miR-122-5p reduziert werden kann, wurde im Folgenden ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Pyruvat-Support und dem vesikulären miRNA-Transport untersucht.

Hierfür wurde zunächst die Auswirkung einer miR-122-5p-Transfektion auf das mRNA- und Protein-Level von Pkm2 und Glut1 in pCNs analysiert. Abbildung 3-2 A zeigt eine erfolgreiche Anreicherung von miR-122-5p in pCNs nach Lipofectamin-basierter Transfektion. Mit einer 150-fachen

Anreicherung konnte bei einem Einsatz von 240 pmol miR-122-5p-Mimik, nach 48 h die höchste Menge an miR-122-5p (normalisiert auf let-7g und Kontrollgruppe) in pCNs detektiert werden. Jedoch auch bei einem Einsatz von 80 pmol sowie 160 pmol konnte nach 24 h, 48 h und 72 h eine Anreicherung der miR-122-5p im Vergleich zu den Kontroll-Proben festgestellt werden. Ausschließlich bei einer Transfektionsmenge von 240 pmol und einer Versuchsdauer von 72 h konnte keine Anreicherung von miR-122-5p festgestellt werden (Foldchange: 0,176).

Auf mRNA-Ebene (Abbildung 3-2 B) konnte jedoch keine Reduktion der Ziel-mRNAs *glut1* (*slc2a1*) und *pkm* (qPCR-Sonde unterscheidet keine *pkm*-Splice-Varianten) nachgewiesen werden. Im Gegenteil zeigten die durchgeführten Anreicherungen der miR-122-5p ein ca. zweimal höheres mRNA-Level von *pkm* und *glut1* (normalisiert auf das Geometrische Mittel aus *pgk1* und *RN18S*) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Auch auf Proteinebene ist keine eindeutige Reduktion von GLUT1 und PKM2 festzustellen. Je nach Wahl des Referenzproteins sind starke Schwankungen der Ergebnisse innerhalb einer Probe festzustellen. Nach 24 h Versuchsdauer und 80 pmol miR-122-5p-Mimik Einsatz ist bei PKM2, wenn auf GAPDH normalisiert wurde, eine Reduktion festzustellen. Werden jedoch ACTIN und TUBULIN zur Normalisierung herangezogen, ist PKM2 in den behandelten Neuronen angereicht im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 3-2 C). Eine ähnliche Tendenz konnte unter gleichen Versuchsbedingungen auch für GLUT1 festgestellt werden. Bei 160 pmol Mimik-Einsatz und 24 h Versuchsdauer konnte bei PKM2 und GLUT1 eine Reduktion unter Verwendung der Referenzproteine GAPDH und ACTIN detektiert werden, bei TUBULIN ist jedoch eine höhere PKM2- und eine gleichbleibende GLUT1-Konzentration zu beobachten.

Zusammengefasst konnte diese Inkonsistenz der referenzproteinabhängigen PKM2- oder GLUT1-Konzentration bei den folgenden Versuchsansätzen festgestellt werden: 80 pmol, 160 pmol, (PKM2, 24 h) - 80 pmol, 160 pmol, 240 pmol (GLUT1, 24 h) - 160 pmol, 240 pmol (PKM2, 48 h) - 160 pmol, 240 pmol (GLUT1, 48 h) - 80 pmol, 160 pmol, 240 pmol (GLUT1, 72 h). Einzig bei dem Ansatz mit 80 pmol Mimik und 48 h Versuchsdauer wurde unabhängig der Referenzproteine und wiedererwarten der Theorie eine Erhöhung von GLUT1 detektiert.

Der Versuchsansatz über 72 h zeigte für alle drei Mimik-Konzentrationen und für alle Referenzproteine eine Reduzierung von PKM2 (Abbildung 3-2 C), jedoch konnte nur für die Ansätze 80 pmol und 160 pmol eine Erhöhung der miR-122-5p festgestellt werden (A). Auch für 240 pmol / 24 h und für 80 pmol / 48 h konnte eine Reduzierung von PKM2 unabhängig der Referenzproteine festgestellt werden. Allgemein kann kein Zusammenhang zwischen der eingesetzten Menge an miR-122-5p-Mimik, der detektierten Menge miR-122-5p in den pCNs, und dem *pkm*- und *glut1*-mRNA-Level sowie dem jeweiligem Protein-Level in den pCNs festgestellt werden.

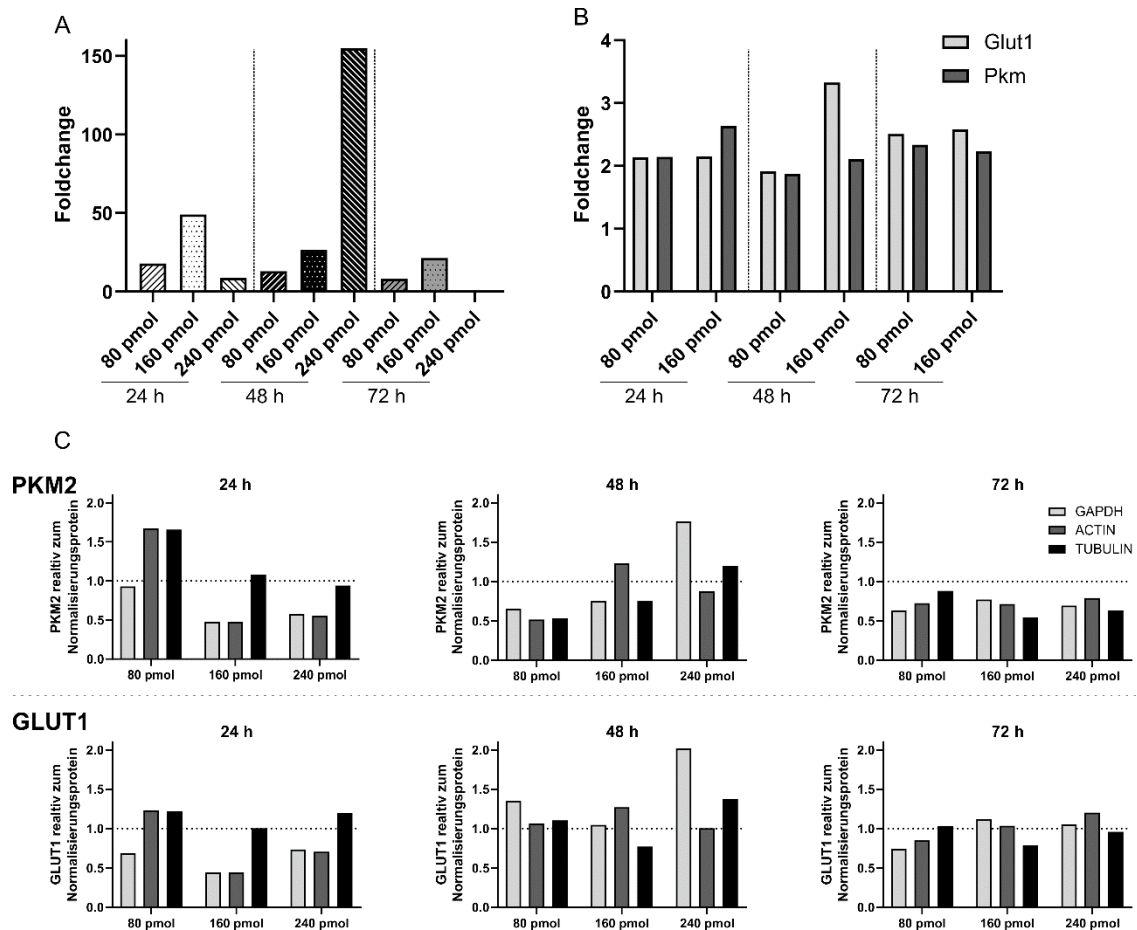


Abbildung 3-2: Auswirkung einer miR-122-5p-Mimik Transfektion auf neuronale Glut1 und Pkm1 Expression. (A) RT-qPCR von miR-122-5p in miR-122-5p-Mimik transfizierten primären kortikalen Neuronen (pCNs). Normalisiert auf let-7g und pCN-Kontrolle (kontroll-misch-RNA) ($n = 1$). (B) RT-qPCR von mRNA *glut1* (*slc2a1*) und *pkm*. Normalisiert auf das Geometrische Mittel (*pgk1* und *RN18S*) und pCN-Kontrolle (kontroll-misch-RNA) ($n = 1$). (C) Westernblot von PKM2 und GLUT1 in miR-122-5p-Mimik transfizierten pCNs. Darstellung relativ zur pCN-Kontrolle (kontroll-misch-RNA) und verschiedenen Normalisierungsproteinen. Westernblot-Filme siehe Zusatzdaten, S. xiv, Abbildung 7-1. ($n = 1$).

Parallel zu den Transfektionen wurde in Co-Kulturen (siehe 2.3.2, S. 29) ein möglicher EV-assoziiertes Transport von miR-122-5p und miR-451a zu pCNs untersucht. Hierfür wurde in pCNs nach Co-Kultur zum einen das miRNA-Level von miR-122-5p und miR-451a und zum anderen die Proteinmenge von PKM2 und GLUT1 gemessen. Da in diesem Versuch kein Vergleich zwischen zellulärer und EV-miRNAs gezogen wurde, sollte die endogene miR-30d-5p als Referenz herangezogen werden und es erfolgte keine Normalisierung auf cel-miR-39 (spike-in). Die gemessenen Fluoreszenz-Kurven für miR-451a und miR-122-5p entsprechen keiner PCR-Amplifikation (Abbildung 3-3 A und B), weswegen die Cq-Werte auf 40 gesetzt wurden (Abbildung 3-3 C). Für die genannten miRNAs konnte keine Amplifikation in RNA-Proben von pCNs detektiert werden, dementsprechend kann auch keine konkrete Aussage über einen Transport der miRNAs getroffen werden, jedoch ist ein Transport nach den beschriebenen Ergebnissen unwahrscheinlich.

In einem parallelen Ansatz wurden die Proteine PKM2 und GLUT1 in pCNs, nach Co-Kultivierung, untersucht. Auch hier sind unabhängig des Normalisierungsproteins sowohl Anreicherung als auch Reduktion von PKM2 und GLUT1 festzustellen (Abbildung 3-3 D). Dies spricht erneut dafür, dass pOLs im Co-Kultursystem keinen Einfluss über EV-miRNAs (oder anderer Moleküle) auf die Expression von PKM2 und GLUT1 in pCNs nehmen.

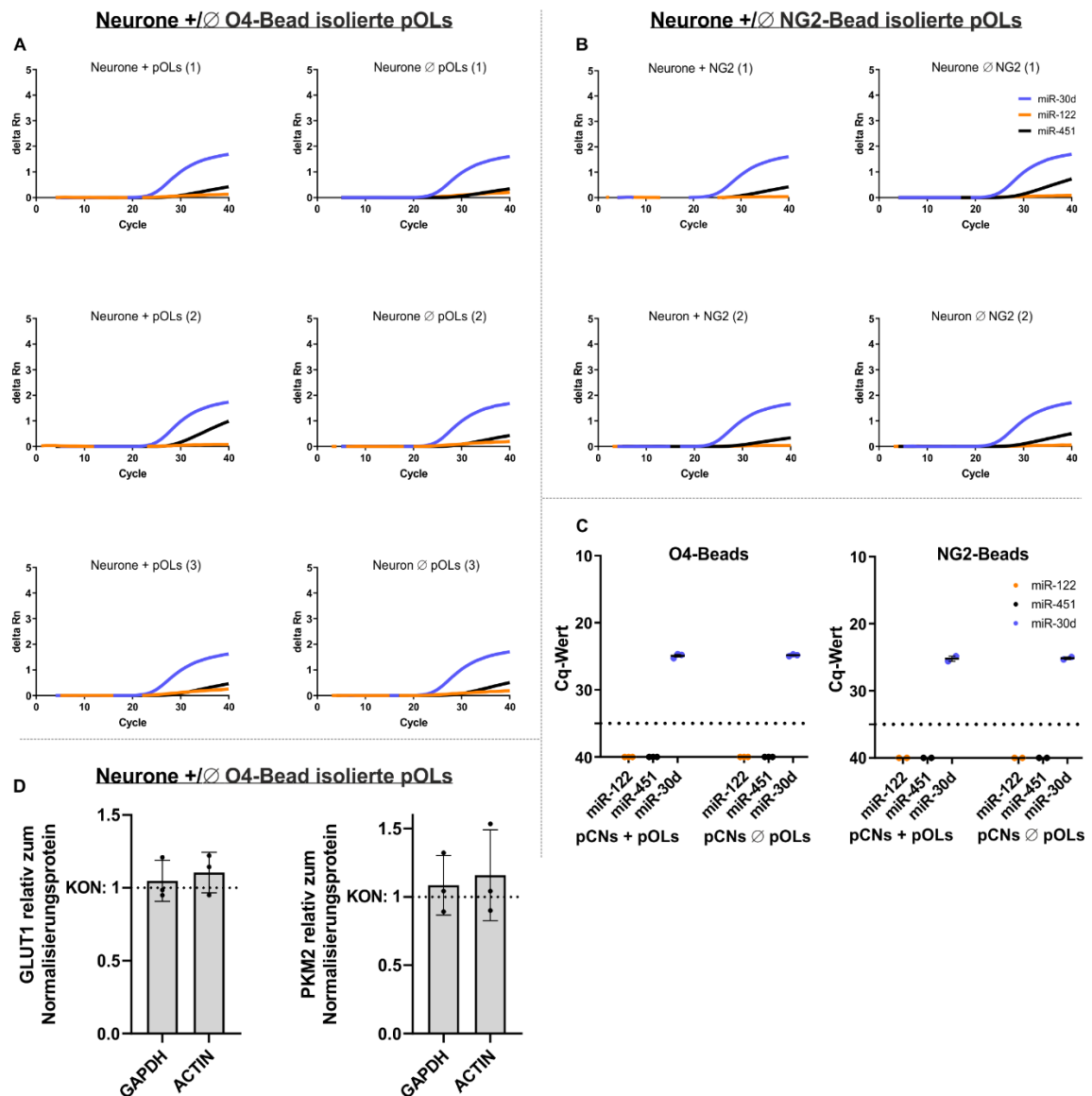


Abbildung 3-3: Unveränderte neuronale miRNA- und Zielprotein-Konzentration nach Co-Kultur mit Oligodendrozyten. (A + B) RT-qPCR von miR-30d, miR-122-5p und miR-451a in primären kortikalen Neuronen (pCNs) mit und ohne Co-Kultivierung primärer Oligodendrozyten (pOLs); pOL-Isolierung durch O4-Beads (A) oder NG2-Beads (B). (C) Zusammenfassung der Cq-Werte aus A und B. Da die Fluoreszenzkurven für miR-122-5p und miR-451a keine eindeutige Amplifikation widerspiegeln, wurden die Cq-Werte für diese Targets auf 40 gesetzt (keine Threshold-Normalisierung durch cel-miR-39 spike-in). Fehlerbalken: SEM. (D) Quantifizierung der Proteine GLUT1 und PKM2 mittels Westernblot von pCNs nach Co-Kultur mit pOLs. Normalisiert auf GAPDH oder ACTIN und auf Kontrolle (KON: 1; ohne pOLs). Westernblot-Filme siehe Zusatzdaten, S. xiv, Abbildung 7-2. Fehlerbalken: SD. (n = 3).

In einem weiteren Versuch wurden pOLs mit miR-122-5p-Mimik transfiziert, bevor sie mit Neuronen Co-Kultiviert wurden. Auf diese Weise sollte ein möglicher EV-assoziiertes miR-122-5p

Transport verstärkt werden. Anschließend wurde das miR-122-5p-Level in pCNs mittels RT-qPCR bestimmt. Nach Transfektion der pOLs mit miR-122-5p-Mimik und anschließender Co-Kultur mit pCNs konnte ebenfalls keine neuronale miR-122-5p detektiert werden (Abbildung 3-4 A, vergl. Abbildung 3-3 C). MiR-30d-5p und snoRNA-202 sollten als Referenzen verwendet werden und zeigen ähnliche Cq-Werte zwischen Mimik- (miR-30d: 32,1; snoRNA-202: 27,9 [Cq]) und Kontroll-Gruppen (miR-30d: 31,9; snoRNA-202: 27,7 [Cq]).

Auf Proteinebene der pCNs ist ebenfalls kein Unterschied zwischen Co-Kultivierung mit miR-122-tansfizierten pOLs und der Kontrollgruppe ersichtlich (Abbildung 3-4 B). Erneut konnte beides, Anreicherung sowie Reduzierung von GLUT1 und PKM2, in beiden Gruppen festgestellt werden.

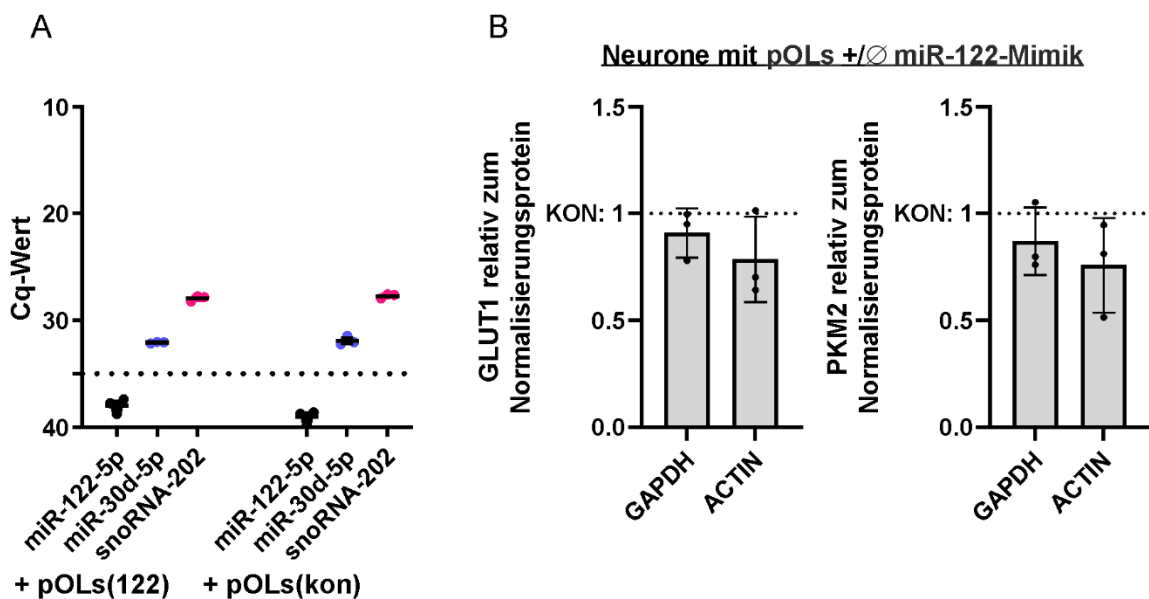


Abbildung 3-4: MiR-122-Transfektion von Oligodendrozyten hat keinen Einfluss auf neuronale miR-122-5p Konzentration nach Co-Kultur. (A) qPCR primärer kortikaler Neurone nach Co-Kultur mit miR-122-5p-Mimik oder kontroll-misch-RNA (kon) transfizierter primärer Oligodendrozyten. Referenzen (miR-30d-5p und snoRNA-202) sind gleichbleibend. (n = 3; Fehlerbalken: SEM). (B) Quantifizierung von GLUT1 und PKM2 mittels Westernblot von pCNs nach Co-Kultur mit miR-122-5p-Mimik oder kontroll-misch-RNA (KON) transfizierten pOLs. Normalisiert auf Kontrolle und auf GAPDH oder ACTIN. Westernblot-Filme siehe Zusatzdaten, S. xiv, Abbildung 7-2. n = 3. Fehlerbalken: SD.

3.3 Quantitative miRNA-Vergleiche zwischen Oligodendrozyten und extrazellulären Vesikeln mittels RT-qPCR

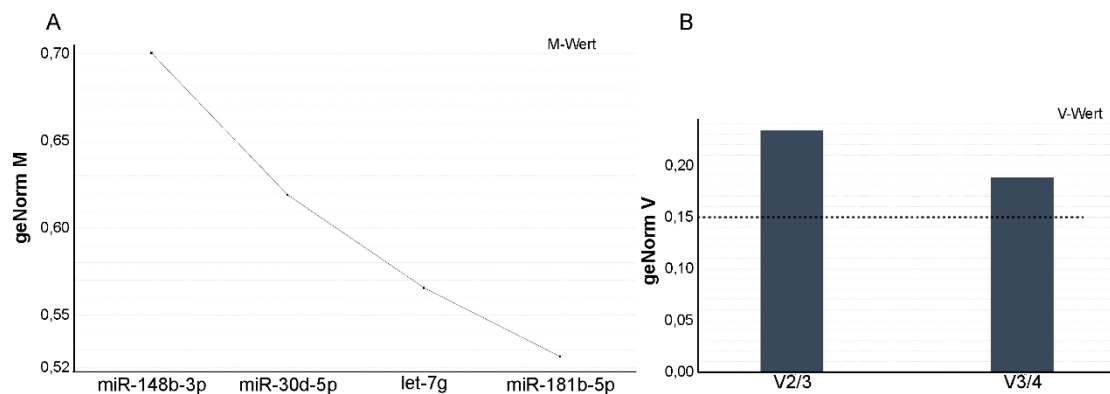
Neben der Fragestellung, ob miR-122-5p EV-vermittelt von Oligodendrozyten zu Neuronen transportiert wird und dort funktionell aktiv ist, sollte ein Weg gefunden werden, die Ergebnisse der miRNA-Seq-1 mittels RT-qPCR zu validieren. Hierfür sollten quantitative Vergleiche von miRNAs zwischen EVs und pOLs, sowie zwischen EVs von verschiedenen genetischen Hintergründen (PLP^{-/-} und CNP^{-/-}) durchgeführt werden. Da für RT-qPCRs von EV-miRNAs keine etablierten Referenz-miRNAs bekannt sind, ist die experimentelle Durchführung nicht trivial. Zunächst wurde

untersucht, ob nicht regulierte miRNAs zwischen Zellen und EVs aus miRNA-Seq-1, auch mittels RT-qPCR gleichverteilt sind und als mögliche Referenz-miRNAs benutzt werden könnten.

Hierfür wurden die qPCR-Ergebnisse mit dem Programm qBase⁺ (Biogazelle) analysiert. QBase⁺ ist ein auf geNorm (Vandesompele et al. 2002) und qbase (Hellemans et al. 2007) basierender, speziell entwickelter Algorithmus zur Identifizierung von Referenzgenen. Durch ein Referenzgen-Ranking und der schrittweisen Eliminierung des jeweils instabilsten Gens, gelingt eine Evaluierung inklusive Selektion möglicher Referenz-miRNAs. Der errechnete M-Wert spiegelt die Stabilität der Referenz-Gene wider und sollte kleiner 0,5 sein. Für die Mindestanzahl der Referenz-Gene wird die Änderung des geometrischen Mittels in Abhängigkeit zur Referenz-Gen-Anzahl ermittelt und als V-Wert angegeben. Ist der V-Wert kleiner als 0,15, dann gilt die Anzahl der verwendeten Referenz-Gene als ausreichend.

In der durchgeführten Analyse wurden RT-qPCR-Ergebnisse von 4 EV-RNA-Proben (<200 nt) und 4 pOL-RNA-Proben (<200 nt) miteinander verglichen. Da jedoch die M-Werte aller getesteten miRNAs oberhalb des Grenzwerts von 0,5 liegen, erfüllt keine dieser miRNAs die Kriterien um als stabile Referenz-miRNA verwendet zu werden (Abbildung 3-5 A). Auch die V-Werte liegen oberhalb des Grenzwerts von 0,15 (Abbildung 3-5 B). In einer RT-qPCR, bei der die Probenzusammensetzung aus wildtypischen pOL- und EV-miRNAs besteht, sind die gewählten miRNA-Kandidaten somit nicht als Referenz-miRNAs geeignet.

Wildtypische EV- und pOL-Proben



EV-Proben: WT, CNP-ko und PLP-ko

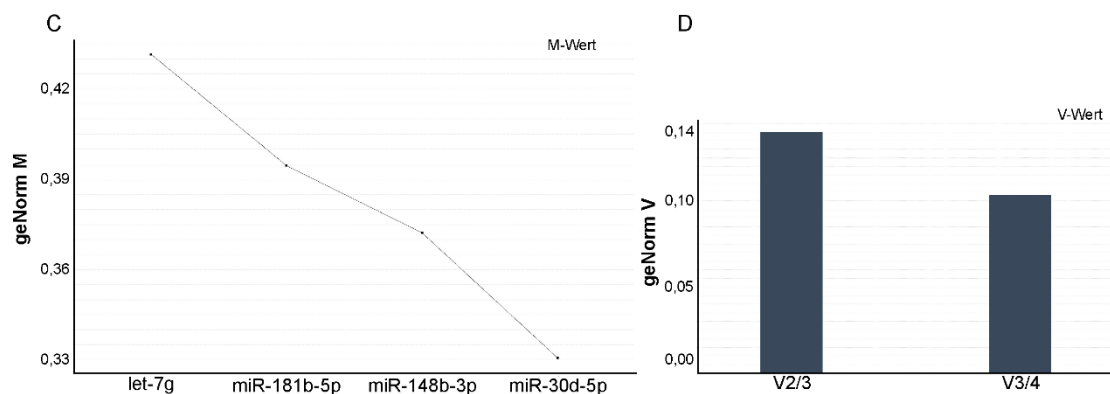


Abbildung 3-5: GeNorm-Berechnung zur Festlegung stabiler Referenz-miRNAs in extrazellulären Vesikeln und primären Oligodendrozyten. A + B: Probenzusammensetzung der geNorm Berechnung: RNA (<200 nt) viermal aus extrazelluläre Vesikel (EV) und RNA (<200 nt) viermal aus primären Oligodendrozyten (pOL) von wildtypischen (WT) Mäusen. (A) M-Wert, Schwellenwert 0,5; (B) V-Wert, Schwellenwert 0,15. **C + D:** Probenzusammensetzung der geNorm Berechnung: je viermal EV-RNA (<200 nt) pro genetischem Hintergrund (Wildtyp, $CNP^{-/-}$ und $PLP^{-/-}$). (C) M-Wert. (D) V-Werte.

Wie bereits beschrieben zeigen $PLP^{-/-}$ und $CNP^{-/-}$ einen verminderten neuronalen Support (1.3.1, S. 15). Des Weiteren stellen pOLs der knock-out Mäuse *in vitro* weniger EVs her, die außerdem einen reduzierten Support für gestresste pCNs aufweisen (Frühbeis et al. 2013; Frühbeis et al. 2019). Ob sich diese unterschiedlichen Eigenschaften der EVs auch im miRNA-Profil widerspiegeln, soll im Folgenden untersucht werden.

Zunächst mussten probenspezifische Referenz-miRNAs identifiziert werden. Hierfür wurden je vier EV-RNA-Proben (<200 nt) von pOLs aus Wildtyp-, $PLP^{-/-}$ - und $CNP^{-/-}$ -Mäusen in die Analyse integriert. Abbildung 3-5 C zeigt, dass die M-Werte aller miRNA-Targets unterhalb des Grenzwerts von 0,5 liegen. Am stabilsten sind miR-30d-5p mit einem M-Wert von ca. 0,33 und miR-148b-3p, mit einem M-Wert von ca. 0,373. Die V-Werte aus Abbildung 3-5 D liegen ebenfalls unterhalb des Grenzwertes von 0,15, sodass hier zwei Referenz-miRNAs ausreichend sind (V-Wert: 0,14) und keine Notwendigkeit besteht eine dritte oder vierte miRNA hinzuzunehmen.

Somit wurden die MISEV-Guidelines (*engl.* minimal information for studies of extracellular vesicles) erfüllt, da mehr als ein Referenzgen verwendet wird und die Stabilität sowie die Zusammensetzung durch einen der empfohlenen Algorithmen überprüft wurde (Théry et al. 2018). Des Weiteren wird in diesem Punkt auch die MIQE-Guideline (*engl.* minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments) erfüllt, da zunächst adäquate Referenz-miRNAs experimentell bestimmt wurden und mehr als eine Referenz-miRNA zur Normalisierung herangezogen wurde (Bustin et al. 2009).

Für die differentielle Analyse der EV-miRNAs verschiedener Genotypen wurden vier EV-RNA-Proben des jeweiligen genetischen Hintergrunds verwendet: 4 x wildtypisch, 4 x $PLP^{-/-}$ und 4 x $CNP^{-/-}$. Die Normalisierung erfolgte nach den Resultaten der qBase⁺-Analyse auf das geometrische Mittel von miR-30d-5p und miR-148b-3p. Aus Abbildung 3-6 wird ersichtlich, dass das Resultat keine Konsistenz aufweist. Überwiegend zeigen die miRNAs bei allen drei genetischen Hintergründen sowohl Anreicherungen als auch Reduktionen der Target-miRNAs. Einzig miR-451a ist im $PLP^{-/-}$ -Hintergrund bei allen Replikaten herunterreguliert (<1) (C). MiR-122-5p zeigt bei $PLP^{-/-}$ ein fast identisches Bild zur miR-451a, jedoch liegt ein Replikat knapp über 1 (B). Somit weisen drei Replikate eine reduzierte relative Menge und ein Replikat eine erhöhte relative Menge zu den Referenzgenen auf. Jedoch ist dieser Unterschied gering und wurde wahrscheinlich durch Messfehler oder Unterschiede in der PCR-Effizienz hervorgerufen.

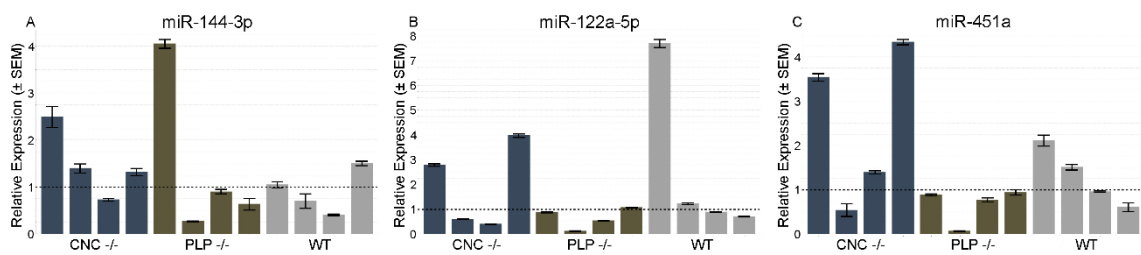


Abbildung 3-6: Relative miRNA-Expression in extrazellulären Vesikeln primärer Oligodendrozyten von Wildtyp-, PLP^{-/-}- und CNP^{-/-}-Mäusen. Basierend auf den geNorm-Resultaten aus Abbildung 3-5 wurde die RT-qPCR von miR-122-5p, miR-144-3p und miR-451a aus extrazellulären Vesikeln von primären Oligodendrozyten (pOLs) gegen das Geometrische Mittel aus miR-30d-5p und miR-148b-3p normalisiert (RNA < 200 nt). pOLs stammen von verschiedenen genetischen Hintergründen (Wildtyp, PLP^{-/-} und CNP^{-/-}). Individuelle Darstellung biologischer Replikate: n = 4. Fehlerbalken = SEM von technischen Replikaten (Duplikate pro qPCR-Lauf).

Da durch die erhobenen Ergebnisse keine eindeutigen Unterschiede der miRNA-Profile zwischen den genetischen Hintergründen auszumachen waren, wurden keine weiterführenden Wildtyp-/knock-out-Vergleiche durchgeführt. Außerdem konnte die gleichmäßige Verteilung potenzieller Referenz-miRNAs aus miRNA-Seq-1 nicht mittels RT-qPCR bestätigt werden, wodurch auch keine weiteren Untersuchungen über quantitative miRNA-Verteilungsmuster zwischen pOLs und EVs weiterverfolgt werden konnten.

3.4 miRNA-Kontamination im Zellkulturmedium

Um RNA-, Protein- und Vesikel-Kontamination von Seren in Zellkultur zu umgehen (siehe 1.1.5, S. 9), wird in der EV-Forschung häufig auf chemisch definierte Supplemente oder auf EV-depletiertes Serum zurückgegriffen. Jedoch ist EV-depletiertes Serum nicht miRNA-frei und somit ungeeignet für EV-miRNA Untersuchungen (Wei et al. 2016). Trotz dieser Vorkehrungen erscheinen weiterhin Studien, in denen gewebs- oder spezie fremde miRNAs beschrieben werden. In den folgenden Kapiteln wurden zunächst die Zellkultur-Medien mit den entsprechenden Supplementen NS21 und B27 auf mögliche kontaminierende Partikel, Proteine und miRNAs hin untersucht. Anschließend wurden die gewonnenen Ergebnisse in weitere Analyse-Verfahren aufgenommen, um daraufhin Untersuchungen an oligodendroglialen EV-miRNAs durchführen zu können.

3.4.1 Kontaminationsindikatoren – Supplemente zeigen Partikel- und miRNA-Kontamination

Wie zuvor beschrieben, konnten miRNA-Kontaminationen in depletiertem FBS nachgewiesen werden. Ein entscheidender Indikator war die Detektion der miR-1246, die nicht in Nagetieren, jedoch in Rindern und Primaten synthetisiert wird (Wei et al. 2016; Zhang et al. 2011). Somit kann miR-1246, nach dem Beispiel von (Wei et al. 2016), in Zellkulturen mit Mauszellen als Kontaminationsindikator für miRNAs aus Fremdspezies herangezogen werden. Aus Tabelle 3-1 wird ersichtlich, dass miR-1246 auch in miRNA-Seq-1 vorhanden ist und ein erhöhtes Vorkommen in den EV-Fractionen zeigt. Da miR-1246 laut aktueller Literatur nicht von murinen pOLs stammen

kann, liegt hier wahrscheinlich eine Verunreinigung der EV-Proben durch fremde miRNA vor. Ursprünge der möglichen Verunreinigung können in den Medium-Bestandteilen (Basalmedium und B27) liegen, oder durch Verunreinigung des Operators hervorgerufen worden sein. Im Folgenden soll zunächst durch zusätzliche Methoden und Kontrollen, das Medium auf weitere Kontaminanten überprüft werden, um die mögliche Quelle der Verunreinigung ausfindig zu machen.

Tabelle 3-1: Readcounts der miR-1246 in miRNA-Sequenzierung-1.

Proben	RPM Level
Zellen A	0.45
Zellen B	0.09
Zellen C	0.07
EV A	3.70
EV B	1.78
EV C	6.62

RPM: Reads per Million
EV: Extrazelluläre Vesikel

In Abbildung 3-7 (A und B) sind NTA-Resultate der Medium-Kontrollen von Vollmedium (Basalmedium + NS21, MKON) über einen Zeitraum eines Jahres gesammelt dargestellt. Innerhalb der ersten neun Monate (Mai 2016 bis Januar 2017) rangiert die Partikelkonzentration unterhalb von 260×10^6 Partikel/ml (B). Im April 2017 erreicht die Partikelkonzentration des Mediums jedoch Werte über 800×10^6 Partikel/ml (B). Aus Abbildung 3-7 A geht außerdem hervor, dass das Maximum der Partikelgröße zwischen 100 und 150 nm liegt (April 2017), womit es den Bereich einnimmt, in dem auch die untersuchten kleinen EVs der pOLs liegen.

Innerhalb des Zeitraums von Mai 2016 bis April 2017 kam es zur Verwendung einer neuen LOT-Nummer des NS21 (von Miltenyi als NB21 erworben). Aus den in Abbildung 3-7 C gegenübergestellten Ergebnissen der verschiedenen LOT-Nummern geht die Heterogenität des gleichen Produkts mit unterschiedlichen LOT-Nummern hervor. Das im April 2017 verwendete NB21 weist ca. die doppelte Menge an Partikeln auf, im Vergleich zu dem im Mai 2016 verwendeten Produkt. Des Weiteren ist das Supplement NS21 ausschlaggebend für die Partikelverunreinigung, da im reinen Basalmedium (BM) und im PBS keine Partikel zu detektieren sind.

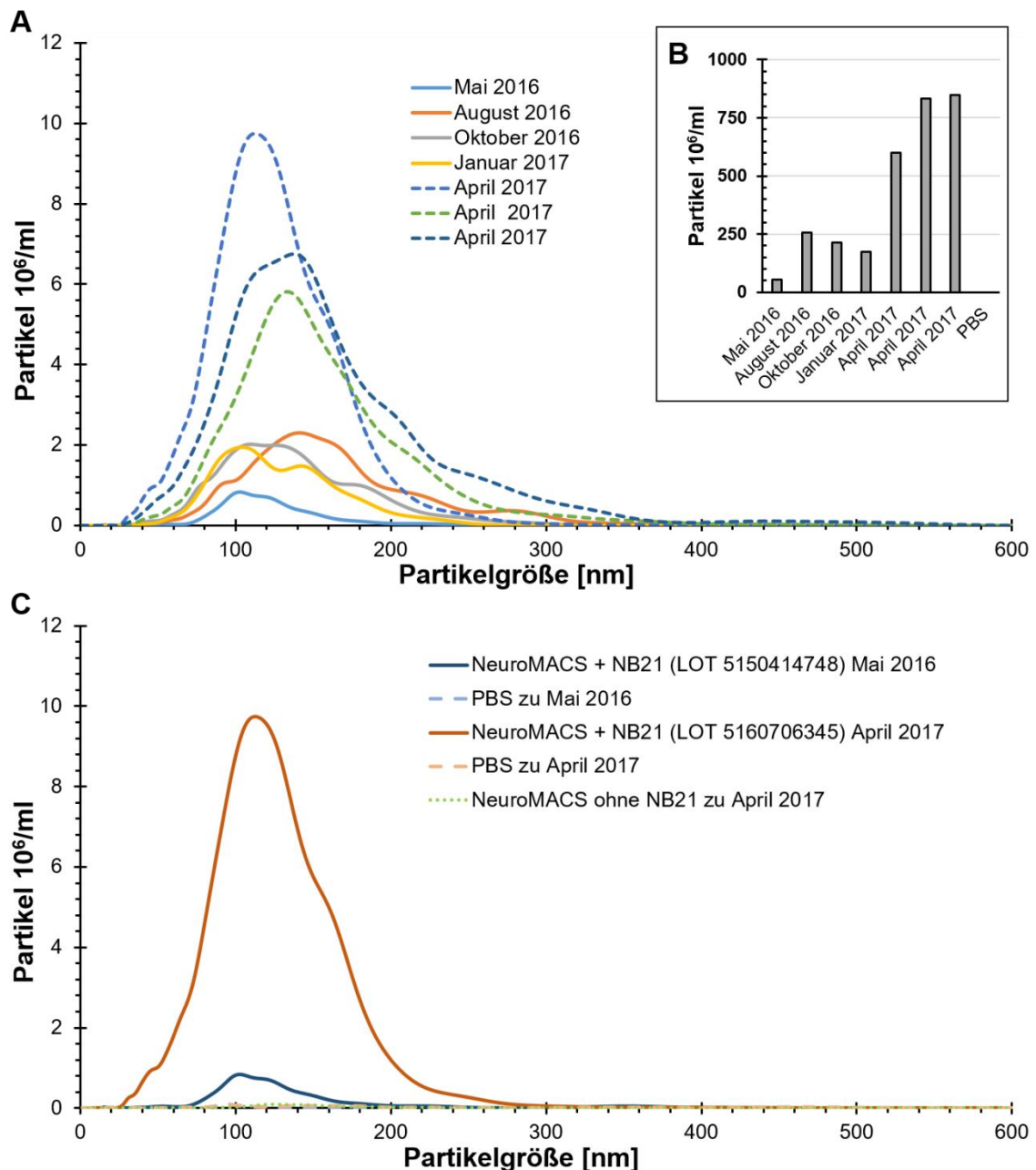


Abbildung 3-7: Nanopartikel Tracking Analyse von Medium-Kontrollen über eine Zeitspanne von ca. einem Jahr. Unterschiedliche Partikelgrößen (A) und –konzentrationen (B) im Pellet nach differentieller Ultrazentrifugation (dUZ) der Vollmedium-Kontrollen (Basalmedium (BM) + NS21 [von Miltenyi als NB21 erworben]). (C) Direkter Vergleich der dUZ-Pellets von BM (NeuroMACS) und zwei Vollmedium-Kontrollen, deren NB21 aus unterschiedlichen Chargen mit verschiedenen LOT-Nummern stammen.

Der in Abbildung 3-7 auf Partikelebene dargestellte Unterschied zwischen BM und Vollmedium (BM + NS21, MKON), soll im Folgenden auch auf miRNAs untersucht werden. Hierzu wurden UZ-Pellets nach differentieller Zentrifugation (siehe 2.4.1, S. 31) des Vollmediums und des reinen BMs (je 25 ml Ausgangsvolumen) auf miRNAs mittels RT-qPCR untersucht. Aus dem Ergebnis (Abbildung 3-8 A) geht hervor, dass alle getesteten miRNAs aus dem UZ-Pellet des reinen BMs oberhalb des Cq-Schwellenwerts liegen. Im UZ-Pellet des Vollmediums konnten dagegen die

getesteten miRNAs detektiert werden (miR-122-5p: 18,7 [Cq] 1,00 [SEM] – miR-451a: 23,4 [Cq] 1,03 [SEM] – miR-30d-5p: 28,2 [Cq] 0,77 [SEM] – let-7g: 28,2 [Cq] 1,29 [SEM]).

Da bei der Untersuchung von Medium-Kontrollen die RNA-Konzentration nicht bestimmt werden konnte, wurden wie unter 2.5.2 (S. 34) beschrieben, immer 3,7 μ l RNA und 0,994 amol spike-in für die cDNA-Synthese verwendet. Aufgrund der variierenden Konzentration des RNA-Inputs und der konstanten Menge an Spike-in-RNA zur (threshold-)Normalisierung, kann aus dem Ergebnis die qualitative Aussage getroffen werden, dass die miRNA-Kontamination mit der Zugabe des NS21 zusammenhängen muss. Ein quantitativer Vergleich ist hier ebenso wie bei allen weiteren RT-qPCR-Resultaten, bei denen keine RNA-Konzentration gemessen werden konnte, nicht zulässig.

In Abbildung 3-8 B wurde die RNA direkt aus NS21 isoliert und auch hier konnten alle getesteten miRNAs nachgewiesen werden. Zudem wurde ein weiteres, in der Zusammensetzung ähnliches Supplement, B27 (Gibco®), auf die gleichen miRNA-Targets überprüft. Da sowohl in B27 als auch in NS21 alle überprüften miRNAs detektiert werden konnten, scheint die miRNA-Kontamination keine Hersteller interne Ursache zu haben. Eher ist davon auszugehen, dass bei der Herstellung dieser Art von Medium-Supplementen die miRNA-Verunreinigung, möglicherweise durch Produkt-Komponenten, hervorgerufen wird.

Das in Abbildung 3-8 A analysierte UZ-Pellet (BM + NS21) ist vergleichbar mit dem UZ-Pellet einer EV-Isolation. Somit würden die hier detektierten miRNAs in einer gleich aufgereinigten EV-Probe mit den EV-miRNAs interferieren und eine Unterscheidung zwischen den miRNAs aus dem Supplement und den EV-miRNAs wäre nicht möglich. Im Folgenden soll zum einen überprüft werden, wie sich die miRNA-Kontamination auf weiterer Methoden aus der EV-Forschung auswirkt. Zum anderen wird versucht die miRNA-Verunreinigung zu eliminieren, um ein miRNA-freies Medium für die Analysen von EV-miRNAs zu erhalten.

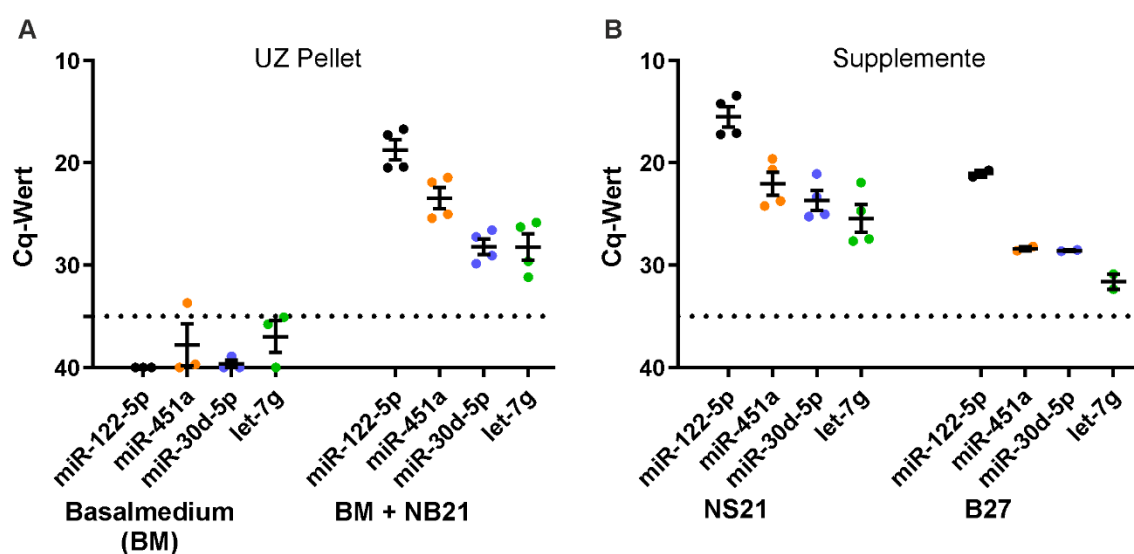


Abbildung 3-8: Durch RT-qPCR Analysen identifizierte miRNA-Kontamination in chemisch definierten Supplementen für Zellkultur-Medien. (A) RT-qPCR Analysen der Pellets nach differentieller Ultrazentrifugation (UZ) von 25 ml unkontaminiertem Basalmedium ($n = 3$) und 25 ml NS21 supplementiertem Medium ($n = 4$, Verwendung von zwei verschiedenen LOTS, jeweils 2 n). (B) RT-qPCR von miRNAs. Die RNA wurde direkt aus den Supplementen NS21 ($n = 4$, Verwendung von zwei verschiedenen LOTS, jeweils 2 n) und B27 ($n = 2$, identische LOT-Nummer) isoliert. Supplement-Input von 500 μ l entspricht der verwendeten Supplement-Menge aus A. Gestrichelte Linie, Background-Schwellenwert wurde auf Cq 35 definiert. Fehlerbalken: SEM.

Um ausschließlich miRNAs zu untersuchen, die sich innerhalb von EVs befinden, können RNase-Behandlungen als eine anerkannte Methode durchgeführt werden. Hierbei kann die RNase nicht in Vesikel eindringen und degradiert so ausschließlich außenliegende miRNAs. Um zu überprüfen inwieweit die kontaminierenden miRNAs aus NS21 nach RNase-Behandlung weiterhin zu detektieren sind und möglicherweise Ergebnisse verfälschen könnten, wurden RNase-Behandlungen mit und ohne Detergenzien durchgeführt. Abbildung 3-9 A zeigt das Ergebnis des NS21-RNase-Verdau. Die unbehandelten NS21-Proben bestätigen das miRNA-Profil von Abbildung 3-8 B, wobei die höheren Cq-Werte an dem geringeren Ausgangsvolumen des NS21 liegen könnte (100 μ l statt 500 μ l in Abbildung 3-8 B).

Nach dem RNase-Verdau sind miR-451a, miR-30d-5p und let-7g nicht nachweisbar. Dieses Ergebnis demonstriert zunächst, dass der RNase-Verdau per se funktioniert hat. Im Vergleich zu der unbehandelten Probe ist der Cq-Wert der miR-122-5p von 18,1 (SEM $\pm 0,67$) auf 26,6 (SEM $\pm 0,34$) angestiegen. Wie bereits erwähnt können keine genauen quantitativen Aussagen aus den Ergebnissen gezogen werden. Der Anstieg des Cq-Wertes der miR-122-5p ist mit ca. 6,5 jedoch so stark, dass er auf einen Verdau durch die RNase zurückzuführen ist. Da die miR-122-5p aber weiterhin einen Cq-Wert von 26,6 aufweist, wurde sie scheinbar partiell vor dem RNase-Verdau geschützt. Auch eine Behandlung mit dem Detergens Triton X-100 zeigte nur leichte Effekte auf den Cq-Wert von miR-122-5p (29,4; SEM $\pm 1,16$). Dieses Ergebnis deutet auf einen Degradationsschutz hin, der nicht auf einer Lipidschicht beruht, sondern möglicherweise durch makromolekulare Komplexe hervorgerufen wird. Da mittels RNase-Verdau von EV-Proben häufig eine Assoziation zwischen miRNAs und EVs bewiesen wird, stellt die Detektion der miR-122-5p in NS21 nach RNase-Verdau ein weiteres Ergebnis dar, welches mit EV-Resultaten interferieren würde.

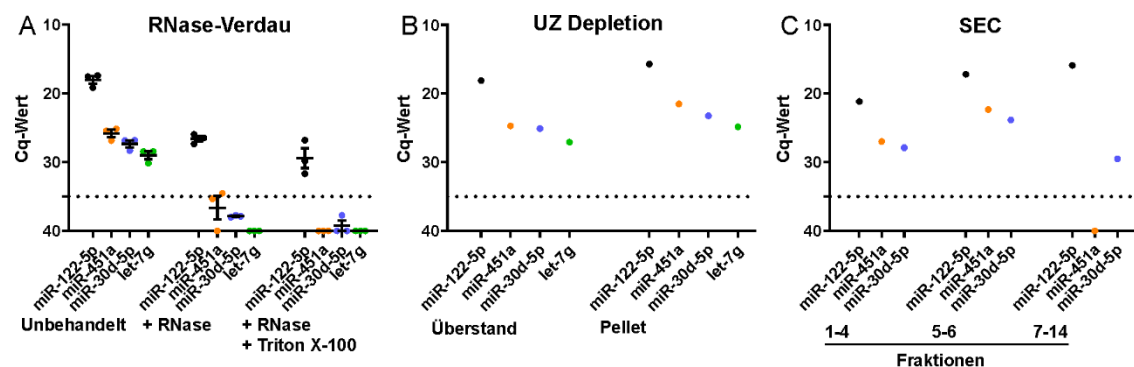


Abbildung 3-9: MiRNA-Kontamination aus NS21 nach RNase A-Verdau, Depletion durch Ultrazentrifugation und Größenausschluss-Chromatographie. (A) RT-qPCR von 100 μ l unkontaminiertem NS21; RT-qPCR von 100 μ l RNase A verdautem NS21 mit und ohne Triton X-100 Behandlung zeigen partiellen Schutz der miR-122-5p. ($n = 3$, Fehlerbalken: SEM) (B) RT-qPCR

von miRNAs aus Überstand und Pellet nach Depletion von 0,2 ml NS21 durch Ultrazentrifugation (n = 1; 20 h; UZ). (C) RT-qPCR von miRNAs aus den verschiedenen Fraktionen nach Größenausschluss-Chromatographie (SEC) von 2 ml NS21: große Vesikel (1-4), kleine Vesikel (5-6) und Proteine (7-14) (n = 1). Gestrichelte Linie: Background-Schwellenwert wurde auf Cq 35 definiert.

Eine gängige Methode, um Kontaminanten aus Serum zu entfernen, ist die Depletion durch Ultrazentrifugation über einen längeren Zeitraum (Théry et al. 2006). Um die Verteilung der miRNA-Kontamination aus NS21 nach längerer Depletion zu untersuchen und möglicherweise ein miRNA-freies (Supplementen-)Überstand zu generieren, wurde eine UZ-Depletion auf NS21 angewandt (Abbildung 3-9 B). Nach einem 20 stündigen UZ-Lauf konnten sowohl im Überstand als auch im Pellet des NS21 alle getesteten miRNAs nachgewiesen werden. Somit ist diese Methode nicht geeignet, um NS21 miRNA-frei zu bekommen.

Wie unter 2.4.2 (S. 32) beschrieben ist die Größenausschluss-Chromatographie (SEC) eine Methode, um Partikel ihrer Größe entsprechend aufzutrennen. Sollte die miRNA-Kontamination aus NS21 nicht in den Fraktionen der kleinen EVs (5 - 6) eluieren, könnte die SEC eine mögliche Alternative zur dUZ stellen, um kleine EVs für RNA-Analysen zu isolieren. In Abbildung 3-9 C wurde untersucht in welchen Fraktionen der SEC die kontaminierenden miRNAs zu detektieren sind. In dem Fraktionen-Pool der großen Partikel (1 – 4) sind die getesteten miRNAs genauso deutlich nachzuweisen, wie in dem Pool der kleineren Vesikel (5 – 6). Auch in dem Pool der Proteine und Makromoleküle (7 – 14), konnten miR-122-5p und miR-30d-5p detektiert werden, jedoch nicht miR-451a. Da bereits nach SEC von NS21 in den Fraktionen der kleinen EVs miRNAs festzustellen sind, entfällt auch diese Methode als Alternative, um EV-miRNAs aus Zellkultur-Überständen mit NS21 aufzureinigen und zu analysieren. Des Weiteren stellt auch dieses Resultat, dass nach SEC von NS21 miRNAs in den Fraktionen der kleinen EVs zu detektieren sind, ein weiteres Ergebnis dar, welches EV-Ergebnisse überlagern und verfälschen würde.

Somit ist festzuhalten, dass mittels zeitintensiver UZ-Depletion kein miRNA-freies Supplement generiert werden kann. Des Weiteren konnte nach SEC in den Fraktionen der kleinen EVs sowie nach RNase-Behandlung miRNA detektiert werden. Diese Ergebnisse würden mit EV-Resultaten interferieren und könnten zu fehlinterpretierten EV-Ergebnissen führen.

3.4.2 Katalase ist eine Quelle der miRNA-Kontamination in chemisch definierten Supplementen

Nachdem gezeigt wurde, dass das Supplement NS21 miRNA kontaminiert ist und diese Kontamination auch nicht durch UZ-Depletion, RNase-Verdau oder SEC entfernt oder umgangen werden konnte, soll im Folgenden der Ursprung der Kontamination aufgedeckt werden. Anschließend soll ein miRNA-freies Supplement für eine mögliche pOL-Kultivierung hergestellt werden.

MiR-122-5p und miR-451a stechen beide in dem miRNA-Seq-1 als stark EV-regulierte miRNAs heraus (Abbildung 3-1 A). Zusätzlich haben beide miRNAs die niedrigsten Cq-Werten des NS21 (Abbildung 3-8 B) und miR-122-5p ist außerdem die einzige getestete miRNA, die nach

RNase-Verdau detektiert werden konnte (Abbildung 3-9 A). Anhand dieser starken Präsenz der beiden miRNAs wurde versucht die Bestandteile, die als miRNA-Kontaminanten infrage kommen könnten, einzugrenzen. MiR-122-5p ist abundant in der Leber vertreten und miR-451a wird mit Erythrozyten in Verbindung gebracht. Wie aus der Tabelle 2-8 (S. 26) zu entnehmen ist, sind die einzigen Bestandteile des NS21 aus den genannten Geweben Katalase (Leber) und SOD (Erythrozyten). Zur intensiveren Analyse dieser Bestandteile wurde ein Supplement, sm-NS19, ohne Katalase (KAT) und ohne SOD entwickelt.

In einem ersten Schritt sollte überprüft werden, wie sich KAT und SOD während der differentiellen Zentrifugation verhalten. Hierzu wurde Basalmedium jeweils mit NS21, sm-NS19 und sm-NS21 (sm-NS19 +KAT +SOD) versetzt und anschließend differentiell zentrifugiert. Im Westernblot der jeweiligen UZ-Pellets ist sowohl KAT als auch SOD zu detektieren (NS21 und sm-NS21; Abbildung 3-10 A). Bei sm-NS19 supplementiertem Medium können wie erwartet weder SOD noch KAT in dem UZ-Pellet identifiziert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Medium-Komponenten KAT und SOD mit EVs aus Zellkulturüberstand co-isoliert werden würden und so fälschlicherweise mit EVs assoziiert werden könnten.

Anschließend wurden auf die gleiche Weise UZ-Pellets von mit sm-NS19 und sm-NS21 versetztem Basalmedium generiert und auf miRNAs überprüft. In Abbildung 3-10 B zeigt sich ausschließlich bei sm-NS21 supplementiertem Medium die Detektion von miR-122-5p (Cq: 26,2) und miR-30d-5p (Cq: 34,9). Somit korreliert die miRNA-Kontamination mit der Zugabe der Bestandteile SOD und KAT. Durch das Entfernen von KAT und SOD konnte ein Supplement (sm-NS19) generiert werden, dass keine miRNA-Kontamination der getesteten miRNAs im UZ-Pellet zeigt. Sollte die Verwendung von sm-NS19 keine Auswirkung auf die Viabilität der pOLs haben, könnten extravasikuläre miRNAs aus Zellkultur-Überständen mit solch einem Supplement untersucht werden. Abbildung 3-10 C zeigt jedoch eine um $13 \pm 2\%$ (SEM, 0.017) verringerte metabolische Aktivität von in sm-NS19 kultivierten pOLs im Vergleich zu pOLs denen NS21 zur Verfügung stand. SOD und KAT bauen reaktive Sauerstoffspezies (*engl.* reactive oxygen species, ROS) ab und sind Teil des ROS-Signalwegs (Ighodaro und Akinloye 2018). Möglicherweise liegt im Medium, dass mit sm-NS19 supplementiert wurde, ein höherer zellschädigender oxidativer Stress vor.

In einem nächsten Schritt wurden die Bestandteile von NS21 individuell analysiert. Die eingesetzte Menge entsprach mindestens der Menge von 500 μ l NS21 (Tabelle 2-8, S. 26; Tabelle 2-9, S. 27). Abbildung 3-10 D zeigt zum einen alle Proteine (Insulin, BSA, Holo-Transferin und SOD) außer KAT und zum anderen einen Pool (sm-NS16, Tabelle 2-8) aller weiteren Bestandteile von NS21. Die hier untersuchten Inhaltsstoffe sind frei von den getesteten miRNAs.

Die Untersuchungen der Katalasen, die aus Säugetieren gewonnen wurden, zeigen eine heterogene miRNA-Kontamination (Abbildung 3-10 E). Bei den Katalasen aus Rinderleber ist miR-122-5p die am stärksten vertretende miRNA und wie bereits erwähnt kommt miR-122-5p abundant in der Leber vor. Die Katalasen wurden von unterschiedlichen Herstellern erworben (Rinder-Leber (1) von Sigma[®] und Rinder-Leber (2) von Roth[®]) und bei beiden ist eine

miRNA-Kontamination festzustellen, was für eine globale Ursache der miRNA-Kontamination bei diesen Katalasen spricht. Trotzdem unterscheiden sich beide Katalasen in ihrem miRNA-Profil, da bei der Rinder-Leber (1) ausschließlich die miR-122-5p (27,6 / 0,40 - [Cq] / [SEM]), bei der Rinder-Leber (2) jedoch alle getesteten miRNAs (miR-122-5p: 21,7 / 0,47; miR-451a: 27,8 / 0,46; miR-30d-5p: 33,3 / 0,51; let-7g: 33,2 / 0,63 – [Cq] / [SEM]) nachgewiesen werden konnten. Die Katalase aus Erythrozyten zeigt keinen Cq-Wert für miR-122-5p oder miR-30d-5p, jedoch mit 22,4 (SEM: 0,10) den höchsten Cq-Wert für die mit Blut assoziierte miR-451a. Des Weiteren ist let-7g hier nachweisbar (34,1 / 0,27 – [Cq] / [SEM]).

Somit tragen die analysierten Katalasen eine Art „Fingerabdruck“ des Herkunftsorgans in ihrem miRNA-Profil. Bei Leber-Katalasen ist miR-122-5p stark vertreten, während bei der erythrozytären Katalase miR-451a als abundante miRNA nachgewiesen werden konnte. In beiden Fällen sind jene miRNAs abundant, die prominent in den jeweiligen Ursprungsorganen vorkommen. Wurde Katalase jedoch aus dem Pilz *Aspergillus niger* extrahiert, konnte keine der getesteten miRNAs nachgewiesen werden.

Abbildung 3-10 F zeigt erneut EV-miRNA von pOLs, die mittels RT-qPCR analysiert wurde. Diesmal stand jedoch der Einfluss des NS21 im Vordergrund, weshalb die EV-Sammelperiode mit (EVs+NS21) und ohne NS21 (EVsØNS21) durchgeführt wurde. MiR-122-5p konnte ausschließlich in Proben mit NS21 nachgewiesen werden. Fehlte NS21 während der EV-Isolationsphase, konnte keine miR-122-5p in EV-Proben detektiert werden. Zusätzlich stieg auch der Cq-Wert der miR-451a auf die Höhe des Schwellenwerts bei EVsØNS21. MiR-30d-5p (+NS21: 28,8 / 0,52; ØNS21: 29,0 / 0,63 - [Cq] / [SEM]) und let-7g (+NS21: 27,0 / 0,39; ØNS21: 27,3 / 0,44 - [Cq] / [SEM]) zeigen unabhängig der NS21-Zugabe ähnliche Cq-Werte. Dies unterstreicht, dass eine triviale Subtraktion der Cq-Werte einer Medium-Kontrolle von EV-Proben mit NS21 nicht legitim wäre.

Aus den Ergebnissen der Abbildung 3-10 geht eindrucksvoll hervor, dass die miRNA-Kontamination durch Katalase in NS21 eingetragen wird und die Depletion von Katalase eine verringerte metabolische Aktivität von pOLs bedingt. Außerdem pelletieren SOD und KAT nach UZ, weswegen diese Proteine in einem EV-Pellet fälschlicherweise als EV-Proteine interpretiert werden könnten. Abschließend konnte der weitreichende Einfluss des NS21 auf das EV-miRNA-Profil anhand der miR-122-5p und miR-30d-5p dargelegt werden.

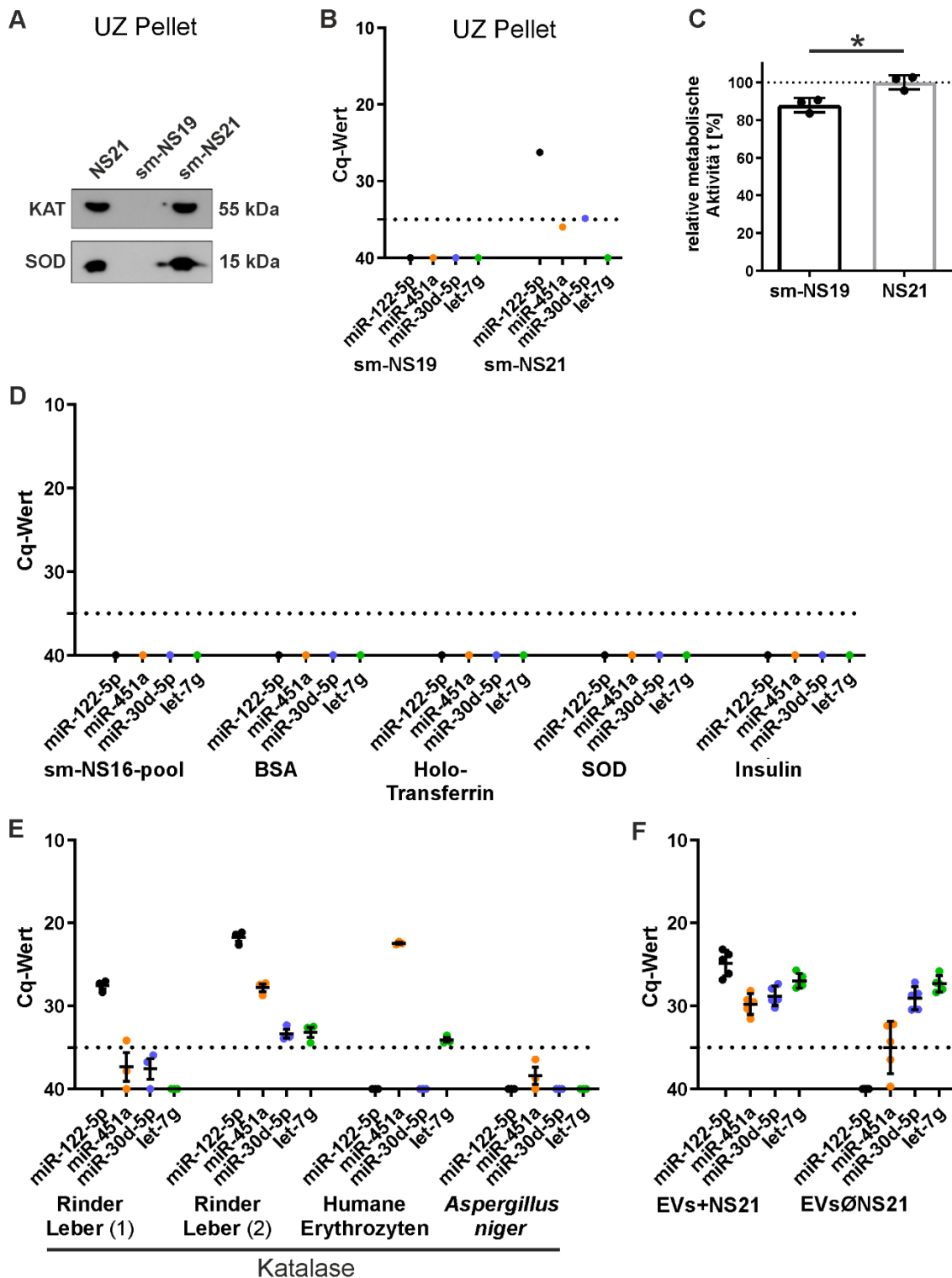


Abbildung 3-10: Analysen des Supplements NS21 identifizieren Katalase als Quelle der miRNA-Kontamination. (A) Westernblot Analyse von Pellets nach differentieller Ultrazentrifugation (dUZ) von Basalmmedium, welches entweder mit kommerziellem NS21, sm-NS19 (ohne Superoxidase Dismutase [SOD] und Katalase [KAT]), oder sm-NS21 (mit SOD und KAT) versetzt wurde. SOD und KAT konnten im Pellet detektiert werden. (n = 1). (B) RT-qPCR von miRNAs aus UZ-Pellets nach dUZ von Medium, das entweder mit sm-NS19 oder sm-NS21 versetzt wurde. Sm-NS21 ist positive für miR-122-5p und miR-30d-5p, wodurch ein Zusammenhang zwischen SOD und/oder KAT mit der miRNA-Kontamination aufkommt. (n = 1). (C) MTT-Assay zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von primären Oligodendrozyten die in sm-NS19 und NS21 kul-

tiviert wurden. Das Fehlen von SOD und KAT resultiert in einer signifikant reduzierten metabolischen Aktivität der Zellen ($n = 3$, SEM, $*p = 0.017$, two-way ANOVA). (D) RT-qPCR von miRNAs aus den Proteinen Bovine Serum Albumin (BSA), Holo-Transferrin, SOD und Insulin sowie aus dem sm-NS16-pool (Details: Tabelle 2-8, S. 26 und Tabelle 2-9, S. 27). Keine der getesteten miRNAs konnte detektiert werden. ($n = 1$). (E) RT-qPCR Analyse von kommerziell erworbenen KATs (Details: Tabelle 2-9, S. 27). Tierische KATs unterschiedlichen Gewebes variieren im Grad der miRNA-Kontamination. Die aus dem Pilze *Aspergillus niger* gewonnene KAT ist frei von den getesteten miRNAs ($n = 3$). (F) RT-qPCR Analyse von miRNAs aus extrazellulären Vesikeln die mit (EVs+NS21) oder ohne NS21 (EVsØNS21) isoliert wurden. MiR-122-5p und -451a konnten ausschließlich in den Proben EVs+NS21 detektiert werden – miR-30d-5p und let-7g dagegen auch in EVsØNS21. ($n = 5$, identische RNA-Proben wie in miRNA-Sequenzierung-2). Fehlerbalken: SEM.

3.4.3 mRNA-Sequenzierung neuronaler Zielzellen nach Behandlung mit extrazellulären Vesikeln

Parallel zu den Untersuchungen, welche die miRNA-Kontamination der Supplemente NS21 und B27 beweisen konnten, wurden Zielgenanalysen von pOL-EV-behandelten pCNs durchgeführt. Hierfür wurde eine RNA-Seq von pCNs analysiert, die mit oder ohne pOL-EVs behandelt wurden (durchgeführt von Dr. D. Fröhlich). Abbildung 3-11 zeigt, die auf diesem Datensatz (im Folgenden als „mRNA-Seq“ bezeichnet) basierenden Top-10 herunterregulierten mRNAs in pCNs nach EV-Behandlung verglichen mit unbehandelten pCNs.

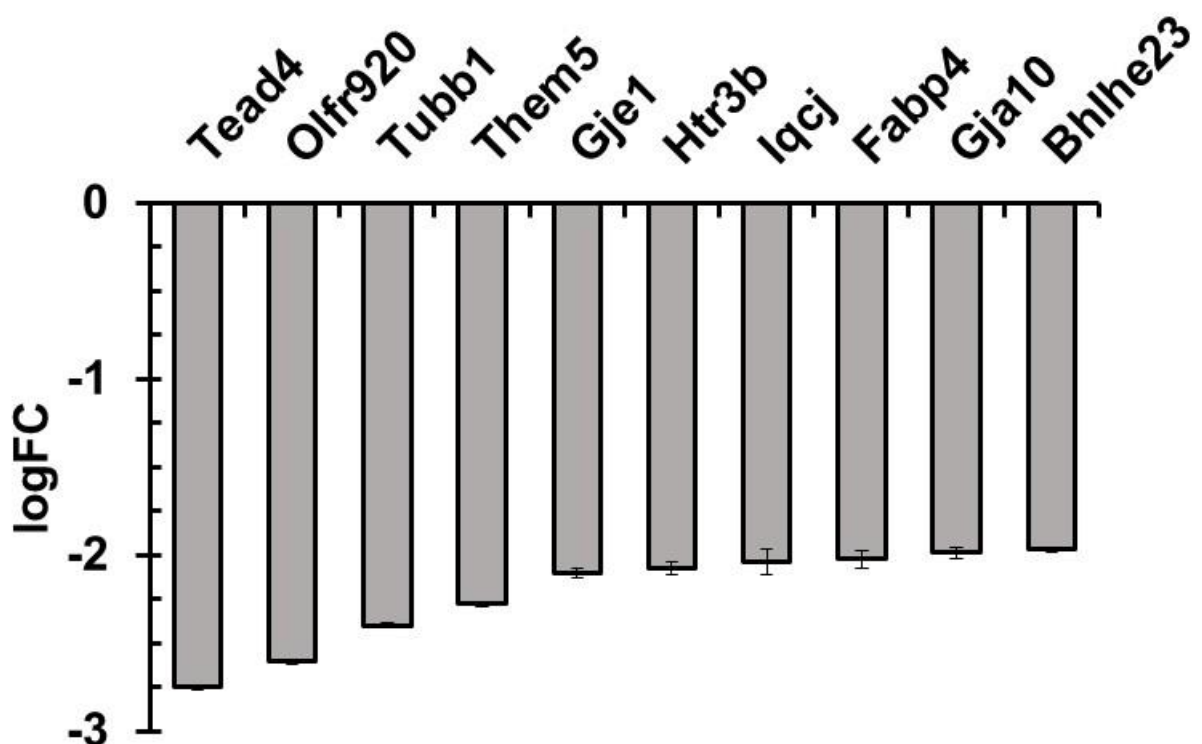


Abbildung 3-11: Stark reduzierte mRNAs in Neuronen nach Behandlung mit oligodendroglialen extrazellulären Vesikeln. Top10 herunterregulierter mRNA primärer kortikaler Neurone (pCNs) nach Behandlung mit extrazellulären Vesikeln (EVs) verglichen mit unbehandelten pCNs. mRNA-Sequenzierung: $n = 3$.

In einer weiterführenden *in silico* Analyse wurden die Seed-Regionen der EV-miRNAs aus miRNA-Seq-1 gegen die 3'UTRs von neun der TOP herunterregulierten mRNAs der pCNs auf Bindestellen untersucht (Gja10 wurde ausgeschlossen, da zum Zeitpunkt der Analyse keine miRNA als mögliches Target gelistet war). Abbildung 3-12 illustriert die 3'UTRs der reduzierten mRNAs (aus Abbildung 3-11) und die dazugehörigen Seed-Regionen der EV-miRNAs aus miRNA-Seq-1.

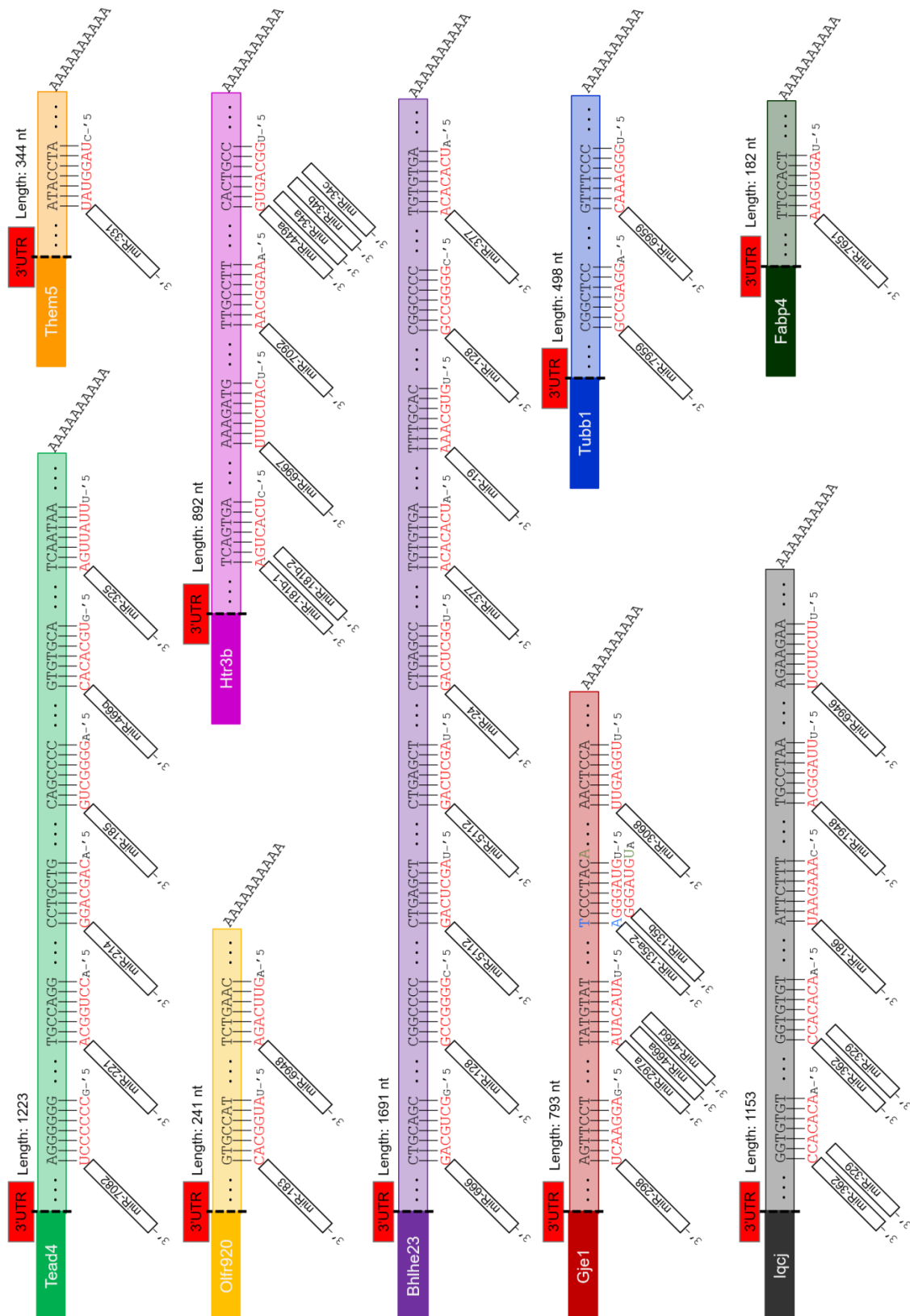


Abbildung 3-12: *In silico* Analyse von miRNAs aus oligodendroglialen extrazellulären Vesikeln und ihren potenziellen Ziel mRNAs in Neuronen. Top neun reduzierte neuronale mRNAs nach Behandlung mit extrazellulären Vesikeln von primären Oligodendrozyten (pOL-EVs) (basierend auf mRNA-Seq; siehe Abbildung 3-11). Zusätzlich sind die 3'UTRs der möglichen Zielgene dargestellt, inkl. möglicher Bindestellen zu den Seed-Regionen der miRNAs, die in pOL-EVs detektiert werden konnten (basierend auf miRNA-Seq-1).

Da die oben bereits beschriebene miRNA-Kontamination der Supplemente (Abbildung 3-8) auch die in Abbildung 3-12 dargestellten miRNAs beeinflussen könnte, wurden die Supplemente B27 (Verwendung in miRNA-Seq-1) und NS21 mittels RT-qPCR auf vier weitere miRNAs (miR-19b-3p, miR-24-3p, miR-186-5p und miR-486a-5p) aus der Abbildung 3-12 getestet. Alle der getesteten miRNAs konnten auch in NS21 und B27 (Abbildung 3-13) detektiert werden. Zusätzlich konnten die getesteten miRNAs auch in der Katalase Rinder-Leber (1) (von Sigma[®], C40, 0,005 g) festgestellt werden und kommen folglich sowohl in den Supplementen als auch in der Katalase vor. Da somit die Herkunft der miRNA nicht eindeutig den EVs oder dem Medium zugeordnet werden kann, kann auch kein Zusammenhang zwischen möglichen EV-miRNAs und den herunterregulierten pCN-mRNAs hergestellt werden. Der Ansatz, mittels direkter Zielgenanalyse die miRNA-Kontamination der Supplemente zu umgehen, kann somit nicht weiterverfolgt werden, da die Herkunft der miRNAs nicht eindeutig den EVs oder den Supplementen zugeordnet werden konnte.

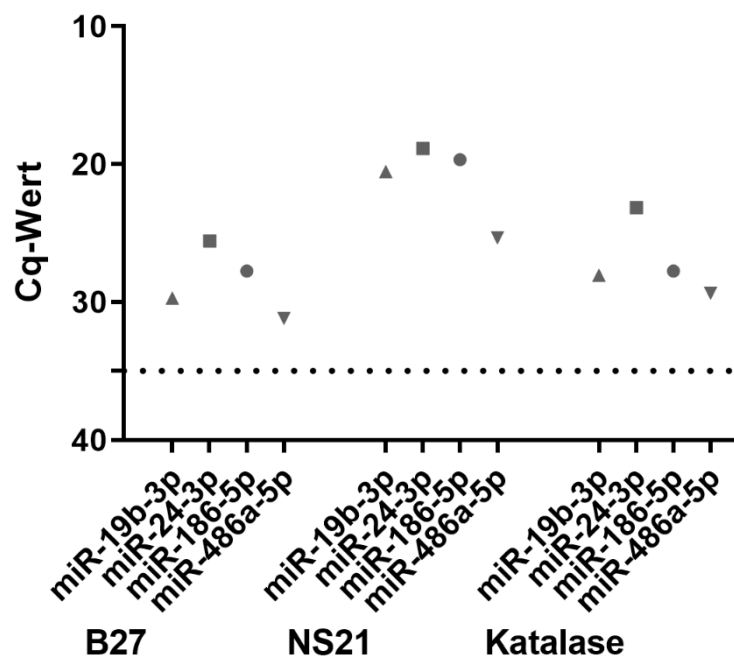


Abbildung 3-13: Detektion weiterer kontaminierender miRNAs in Supplementen und Katalase. RT-qPCR Analyse von miRNAs aus kommerziell erworbenen Supplementen (B27 und NS21) und kommerziell erworbener Katalase (Bovine Leber-1). MiRNAs sind in extrazellulären Vesikel-Proben (miRNA-Sequenzierung-1) vertreten und könnten möglicherweise neuronale mRNA binden (mRNA-Sequenzierung, Abbildung 3-12) und deren Translation hemmen. n = 1.

3.5 Neue Sequenzierung von oligodendroglialen extrazellulären Vesikeln unter Berücksichtigung der miRNA-Kontamination in Supplementen

Nachdem die miRNA-Kontamination in beiden getesteten Supplementen detektiert werden konnte, wurden pOL-EVs mit (EVs+NS21) und ohne (EVsØNS21) Zugabe von NS21 isoliert, um

eine neue RNA-Sequenzierung von pOLs und EVs (miRNA-Seq-2), zu generieren (siehe 2.4.1, S. 31 und 2.5.3, S. 36). Da elektrisch aktive Neurone, die Freisetzung von oligodendroglialen EVs beeinflussen (1.3.2, S. 16), wurden außerdem pOL-EVs unter stimulierenden *in vitro* Bedingungen generiert. Hierfür wurden pOLs 5 h mit Glutamat und D/L-Serin stimuliert und anschließend die EVs (SEVs) isoliert. Zusätzlich wurde RNA aus Medium-Kontrollen (MKON) in den Sequenzierungsansatz mit aufgenommen.

Im Folgenden werden zunächst Qualitätskontrollen der EVs dargestellt und anschließend die Qualität der EV-, pOL- und MKON-(mi)RNAs beschrieben. Durch die umfangreiche Integration von MKON in miRNA-Seq-2 konnte die miRNA-Kontamination des NS21 tiefgreifend beschrieben und anschließend *in silico* Methoden für die Analyse von EV-miRNAs entwickelt werden.

3.5.1 Qualitätskontrollen von extrazellulären Vesikeln durch Nanopartikel Tracking Analyse und Westernblot

Zur Charakterisierung der für die Sequenzierung eingesetzten EV-Proben wurden NTA und Westernblot Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse der NTA (Abbildung 3-14) zeigen erneut die stärksten Partikelanreicherungen in den NS21 versetzten Proben (EV+NS21 und MKON+NS21). Jedoch ist bei allen EV-Proben (sowohl supplementierten Proben [EV+NS21] als auch supplement-freien Proben [EVØNS21 und SEVØNS21]) die Partikelkonzentration höher, als in den entsprechenden Medium-Kontrollen (MKON+NS21, MKONØNS21 und MKON stimuliert ØNS21). Demnach können kultivierte pOLs Partikel produzieren, welche über dUZ aufgereinigt werden können und im Größenbereich von Exosomen und kleinen EVs liegen.

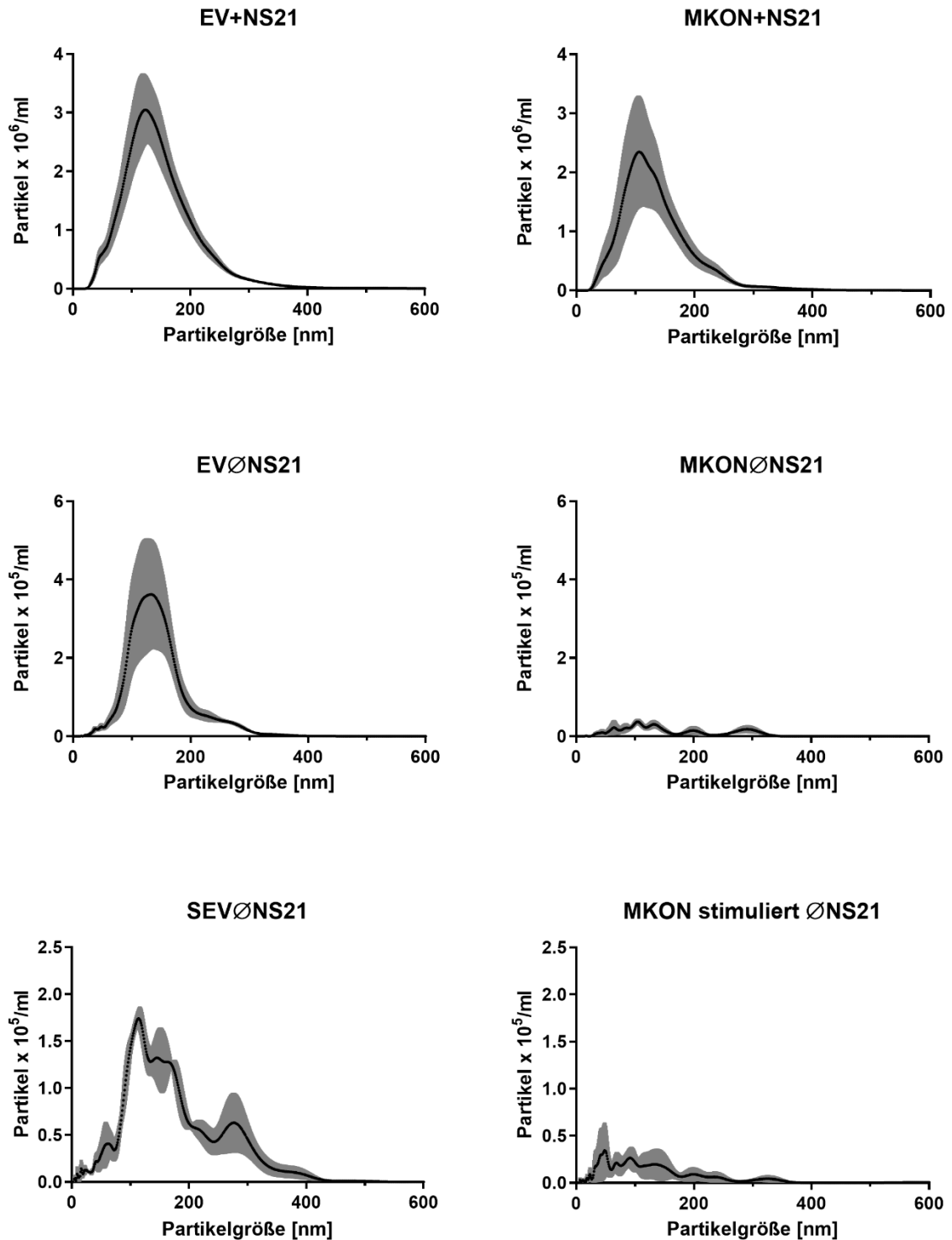


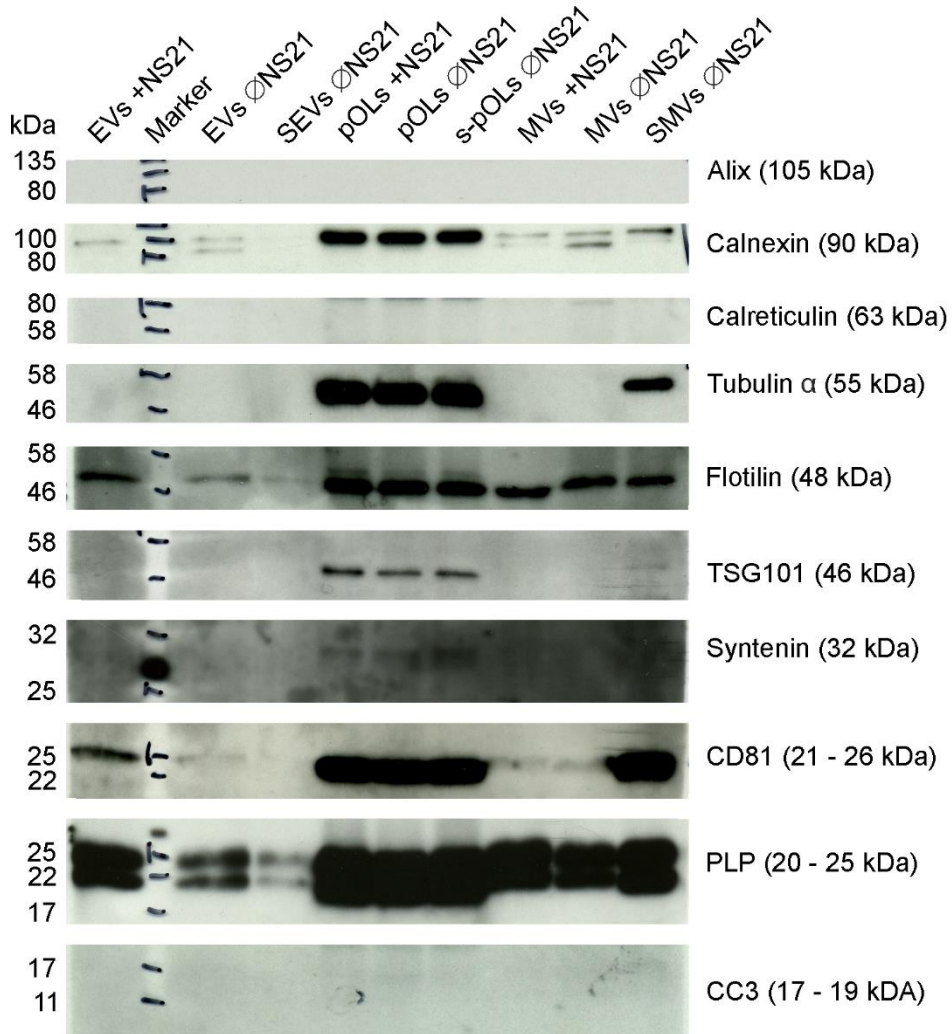
Abbildung 3-14: Nanopartikel Tracking Analyse der generierten extrazellulären Vesikel-Proben für miRNA-Sequenzierung-2. Ergebnisse der Nanopartikel Tracking Analyse (NTA) von extrazellulären Vesikel (EVs), die aus NS21-versetztem Medium isoliert wurden (**EV+NS21**) inkl. der entsprechender Medium-Kontrollen (**MKON+NS21**); von EVs, die ohne NS21 isoliert wurden (**EVØNS21**) inkl. entsprechender Medium-Kontrollen (**MKONØNS21**) und von EVs, die unter Glutamat und D/L-Serin stimulierenden Bedingungen ohne NS21 isoliert wurden (**SEVØNS21**) inkl. der entsprechender Medium-Kontrollen (**MKON stimuliert ØNS21**). EV-Proben zeigen in allen Bedingungen mehr Partikel als die entsprechenden Medium-Kontrollen. Standardfehler: graue Fläche. (n = 5; außer SEV: n = 4)

Nach NTA-basierter Größenanalyse der Vesikel wurden UZ-Pellets (kleine EVs, entsprechend der NTA-Resultate), 10.000 x g Pellets (größere Vesikel, überwiegend MVs) und die entsprechenden Donorzellen biochemisch analysiert. Aus dem resultierenden Westernblot (Abbildung 3-15) geht hervor, dass die Proteinmarker CD81, Flotillin und PLP in EVs mit und ohne NS21 detektiert werden konnten. Bei stimulierten EVs (SEVsØNS21) konnten die Marker Flotillin und PLP detektiert werden, jedoch nicht CD81. Dies ist vermutlich auf die im Stimulations-Experiment reduzierte EV-Sammelperiode von 5 h und der daraus resultierenden geringeren Materialmenge zurückzuführen. Die Signale von PLP und Flotillin sinken ausgehend von EVs+NS21 (am intensivsten) über EVsØNS21 bis SEVsØNS21. Übertragen auf CD81 könnte es durchaus sein, dass CD81 der SEVs unterhalb des Detektionsminimums liegt. Da der TSG101-Antikörper ein schwaches Detektionsvermögen aufweist, war möglicherweise das verwendete Material hier bei allen EV-Proben zu gering, um TSG101 zu detektieren. Ebenso scheint durch die gegebenen Bedingungen keine ausreichende Materialmenge generiert zu werden, um Syntenin in EV-Proben identifizieren zu können.

Um die EV-Proben auf intrazelluläre Verunreinigungen zu überprüfen, wurden die Proben auf Proteine aus dem Endoplasmatischem Retikulum, Calnexin und Calreticulin, und Tubulin als Bestandteil des Zytoskeletts kontrolliert. Von den drei verwendeten Markern, können Calreticulin und Tubulin in keiner EV-Probe (ausgeschlossen MVs) detektiert werden und einzig Calnexin ist in EVs+ØNS21 vorhanden. Außerdem ist in keiner Probe eine erhöhte Apoptose festzustellen, da der Apoptose-Marker CC3 (Caspase-3,) in allen Proben negativ ist. Da jedoch für CC3, Calreticulin und Alix keine Positivkontrollen vorhanden sind, ist nur eine eingeschränkte Aussage möglich.

Zusammengefasst konnte mittels NTA die Isolation kleiner Partikel festgestellt werden und durch biochemische Analysen konnten Proteinmarker von EVs detektiert werden, wodurch die Isolation kleiner EVs belegt werden konnte. Im Folgenden wird daraufhin die Qualität der EV-RNA (und auch pOL-RNA) untersucht.

A



B

	kDa	EVs			pOLs			MVs			Inkubation: 1. Antikörper
		+NS21	ØNS21	Stimuliert	+NS21	ØNS21	Stimuliert	+NS21	ØNS21	Stimuliert	
CD81	21 – 26	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	3 h – RT
TSG101	46	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Green	ÜN – 4 °C
Calnexin	90	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	ÜN – 4 °C
Syntenin	32	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	3 h – RT
Flotillin	48	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	ÜN – 4 °C
PLP	20 & 25	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	ÜN – 4 °C
CC3	17 – 19	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	3,5 – RT
Calreticulin	63	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	4 h – RT
Alix	105	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	ÜN – 4 °C
Tubulin α	55	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Green	ÜN – 4 °C

Abbildung 3-15: Westernblot zur Charakterisierung von extrazellulären Vesikeln und Oligodendrozyten. (A) Westernblot von extrazellulären Vesikeln (EVs, 100 000 x g Pellets) und primären Oligodendrozyten (pOLs) sowie den entsprechenden 10 000 x g Pellets (größere Vesikel, definiert als Mikrovesikeln, MVs) (B) Zusammenfassung von A: Protein detektiert (grün); Protein nicht-detektiert (rot). Weitere Angaben zur Inkubationsreihenfolge (von CD81 bis Tubulin) des erst Antikörpers; sowie Angaben zur Temperatur und Länge der Inkubation (RT: Raumtemperatur; ÜN: Übernacht).

3.5.2 Reproduzierbare RNA-Profile deuten auf intakte RNA für (mi)RNA-Sequenzierung-2

Für die Qualitäts-Bestimmung von RNA-Proben können RNA-Profile, die mittels Bioanalyser erstellt wurden, herangezogen werden. Die Versehrtheit zellulärer RNA-Proben wird durch den sogenannten RIN-Wert (*engl.* RNA integrity number) angegeben, der sich aus dem Verhältnis von 28S und 18S ribosomaler RNA zusammensetzt und zwischen eins (degradierte RNA) und zehn (intakte RNA) liegt. Da für EV-RNA der RIN-Wert nicht aussagekräftig ist und auch sonst kein vergleichbareres „Werkzeug“ zur Bestimmung der Integrität verfügbar ist, wird die Qualität der RNA aus miRNA-Seq-2 anhand der individuellen RNA-Profile bestimmt. Vergleichbare RNA-Profile verschiedener Replikate können demnach auf eine geringe RNA-Degradierung hinweisen.

In Abbildung 3-16 sind die RNA-Profile der Proben dargestellt, die für die nachfolgende Sequenzierung verwendet wurden. Da im Zuge der Sequenzierung ausschließlich kleine RNAs (ca. 21 – 23 nt +/-10) analysiert werden, wurde an dieser Stelle kein Cut-off in die RNA-Isolierung integriert. Dadurch kann das komplette RNA-Profil für die Bewertung der RNA-Qualität herangezogen werden.

Die RNA-Proben der pOLs (pOLs+NS21 [A‘], pOLsØNS21 [B‘] und s-pOLsØNS21 [C‘]) haben durchgängig ein ähnliches Profil mit den typischen ribosomalen Peaks bei knapp über 40 s (18S Untereinheit) und bei ca. 48 s (28S Untereinheit). Diese Ergebnisse weisen sowohl darauf hin, dass die pOL-RNAs innerhalb der Zellen durch die unterschiedlichen Behandlungen nicht degradiert sind, als auch, dass die RNAs während der Isolierung überwiegend stabil geblieben sind. Für die RNA von EVs ist ein vergleichbarer Degradierungsindikator (Verhältnis der ribosomalen Untereinheiten) nicht bekannt. Innerhalb der Versuchsdurchführungen sind jedoch gleiche Profile nachzuweisen, was für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und für stabile Versuchsbedingungen spricht. Die Unterschiede zwischen den Profilen A‘, B‘ und C‘ sollen durch die Auswertung der miRNA-Seq-2 auch auf miRNA-Ebene ausgearbeitet werden.

Für die Untersuchung eines RNase-Einflusses auf EV-RNA (Profile in D) wurden EVs sowohl mit NS21 (EVs+RNase+NS21, D‘) als auch ohne NS21 (EVs+RNaseØNS21, D‘‘) RNase-behandelt. Aus beiden Profilen geht ein Peak in einem vergleichbaren niedermolekularen Bereich hervor. Ein Vergleich zwischen den EV-Proben mit RNase-Verdau (D‘ und D‘‘) zu den vergleichbaren EV-Proben ohne RNase-Verdau (A‘ [EVs+NS21] und B‘ [EVsØNS21]) deutet auf einen Abbau der höhermolekularen Strukturen durch den RNase-Verdau hin. Jedoch ist zu bedenken, dass für die Untersuchung zu dem RNase-Einfluss (Profile in D) mit zwei Replikaten eine unzureichende

Anzahl an Replikaten zur Verfügung stehen. Alle hierzu getroffenen Aussagen beinhalten eine Unsicherheit und können ausschließlich eine spekulative Richtung vorgeben. Auch die Erkenntnisse aus dem direkten Vergleich der Profile aus D' (EVs+RNase+NS21) und D'' (EVs+RNaseØNS21) sind auf Grund von zwei Replikaten und den geringen Profiländerungen nicht unbedenklich.

Die Profile der Mediumskontroll-Proben (E', MKON [Basalmedium + NS21] und E'', MR [MKON+RNase]) weisen außer des Marker-Peaks keine weiteren Profiländerungen auf. Da der Marker-Peak jedoch auf Höhe der miRNA läuft, könnte dieser mögliche miRNAs überdecken. Wie oben bereits gezeigt (3.4, S. 49), konnten miRNAs sowohl direkt in MKON als auch nach RNase-Verdau detektiert werden. Aufgrund dieser vorangegangenen Resultate wurden MKON und MR weiterhin mittels NGS untersucht, auch wenn keine RNA im Bioanalyser-Profil nachgewiesen werden konnte.

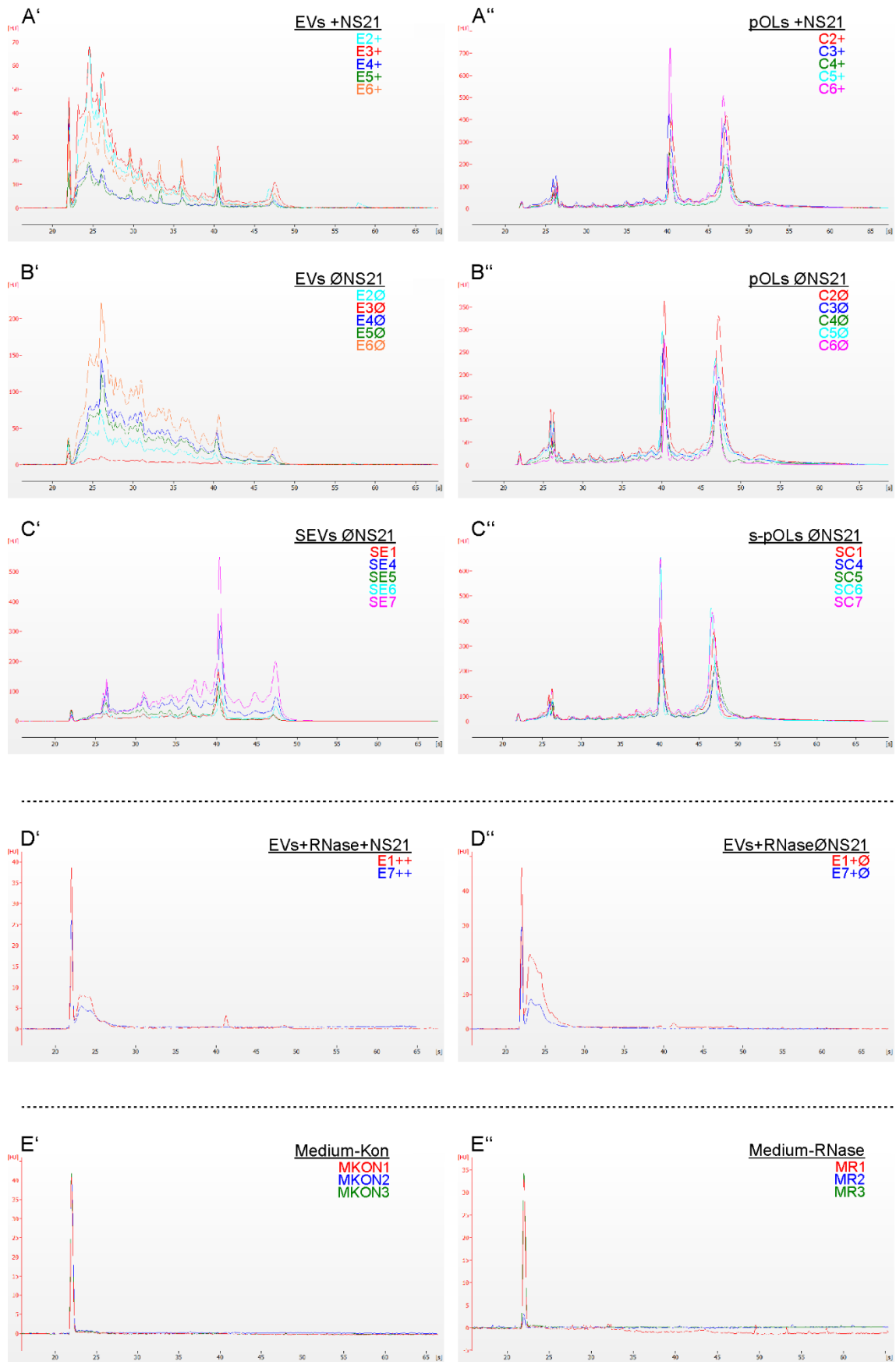


Abbildung 3-16: Bioanalyser-Profile der RNA-Proben von (mi)RNA-Sequenzierung-2. (A) RNA-Profile primärer Oligodendrozyten (pOLs) kultiviert in Medium mit NS21 während der Vesikel-Isolationsperiode (**A'**, **pOLs+NS21**) und RNA-Profile der assoziierten extrazellulären Vesikel (EVs) (**A'**, **EVs+NS21**). (B) pOL-RNA-Profile \emptyset NS21 (**B'**, **pOLs \emptyset NS21**) und EV-RNA-Profile \emptyset NS21 (**B'**, **EVs \emptyset NS21**) während der EV-Isolationsperiode. (C) RNA-Profil von Glutamat und D/L-Serin stimulierten pOLs (**C'**, **s-pOLs \emptyset NS21**) und die dazugehörige EV-RNA ohne NS21 (**C'**, **SEVs \emptyset NS21**). (D) RNA-Profile von RNase-verdauten EVs mit NS21 (**D'**, **EVs+RNase+NB21**) und ohne NS21 (**D'**, **EVs+RNase \emptyset NB21**). (E) Medium-Kontrollen mit NS21 ohne RNase-Verdau (**E'**, **MKON**) und mit RNase-Verdau (**E'**, **MR**).

3.5.3 Phred Score von (mi)RNA-Sequenzierung-2 weist auf eine hohe Qualität der Sequenzierung hin

Die Qualität einer Sequenzierung kann durch den sogenannten Phred Score wiedergegeben werden. Der Wert des Phred Scores gibt die Wahrscheinlichkeit an, ob eine Nukleinbase im Sequenzierungsprozess richtig bestimmt wurde. Je höher der Phred Score ist, desto wahrscheinlicher ist die korrekte Angabe der Nukleinbase. Ein Phred Score von 30 bedeutet eine Fehlerrate von 1 zu 1000 und wird als Standard akzeptiert. Die Phred Scores der miRNA-Seq-2 (Abbildung 3-17) liegen bei allen Proben über 35, was einer sehr guten Qualität entspricht. Die ermittelten Sequenzen sind demnach belastbar.

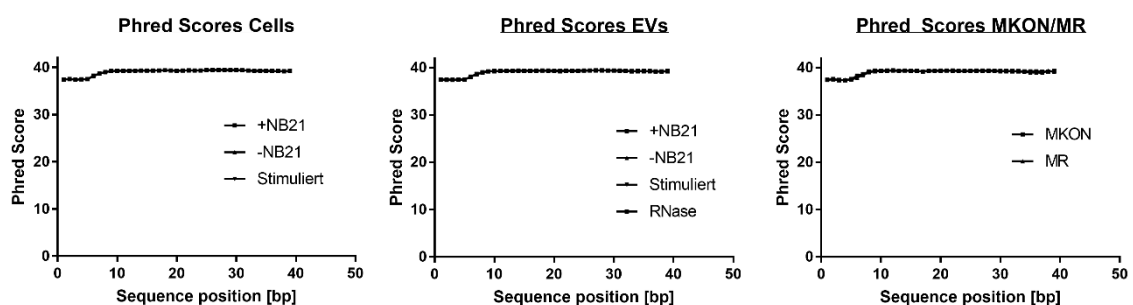


Abbildung 3-17: Phred Scores von (mi)RNA-Sequenzierung-2. Der Phred Score liegt in allen Proben über 35 und spiegelt damit eine sehr gute Qualität wider. Da eine Überlagerung der einzelnen Kurven vorliegt, sind die Kurven der entsprechenden Proben nicht getrennt voneinander wahrzunehmen. Replikate entsprechen der RNA aus Abbildung 3-16.

3.5.4 Qualitätskontrolle für (mi)RNA-Sequenzierung-2: Mapping Längenverteilung

Mittels Mapping Längenverteilung können die Längenprofile der sequenzierten RNA-Proben dargestellt werden. Da RNA-Fragmente unterhalb von 15 bp zu einem großen Teil durch Degradation entstehen und keiner RNA-Klasse zugeordnet werden können, wurde ein Cut-off von 15 bp verwendet. Größere RNA-Fragmente, die keiner RNA-Klasse zugeordnet werden konnten und möglicherweise als Abbauprodukte von mRNAs oder lncRNAs (long non-coding RNA) entstanden sind, werden als nicht-zugeordnet (*engl.* unmapped) bezeichnet. Zusätzlich wurden in die folgende Analyse weitere RNA-Klassen mit aufgenommen. In den Mapping Längenverteilungen kann über die Anzahl der Reads pro Sequenz Position (*engl.* Sequence position) das Profil der

RNA nach Sequenzierung wiedergegeben werden. Die zusätzliche RNA-Bestimmung erweitert die Analyse um die Verteilung der jeweiligen RNA-Klassen, wodurch ein umfangreiches Verteilungsprofil der RNA-Proben entsteht.

Die Längenverteilung (Abbildung 3-18) gibt zunächst ein erstes Bild über die Read-Tiefe der einzelnen Gruppen. Demnach haben die zellulären Proben (D, F und H) sowie die Medium-Kontrolle (MKON, A) über 1×10^6 Reads. Die EV-Proben (C, E und G) liegen mit ca. 5×10^5 Reads unterhalb der zellulären Proben. Nach RNase-Verdau des Mediums (MR, B) zeigt sich auch hier eine Reduktion auf $1,25 \times 10^5$ Reads. Bei dem RNase-Verdau der EVs ist die Read-Zahl im Vergleich zu den nicht-verdauten Proben (C und E) ebenfalls gesunken. Demnach weist EV+RNase+NS21 (I) weniger als 1×10^5 Reads auf und EV+RNaseØNS21 (J) kommt auf ca. 2×10^5 Reads.

Wie bereits erwähnt, kann der Mapping Längenverteilung auch die Read-Verteilung der jeweiligen RNA-Typen entnommen werden. Gemeinsam mit der prozentualen Mapping Längenverteilung aus Abbildung 3-19 kann so eine differenzierte RNA-Zusammensetzung abgebildet werden. Hier ist bei MKON (A) der Großteil (über 60 %) der Reads der Gruppe der miRNAs zu zuweisen. Durch den RNase-Verdau (B, MR) schrumpft der miRNA-Anteil auf unter 30 % und der Anteil der unmapped Fragmente steigt von ca. 20 % (MKON) auf ca. 30 % (MR).

Bei den Mapping Längenverteilungen der pOLs besteht, ähnlich wie bei den RNA-Bioanalyser-Profilen (Abbildung 3-16), zwischen den Gruppen eine hohe Übereinstimmung der Profile (Abbildung 3-18 D, F und E). Die Verhältnisse der RNA-Typen sind in den pOL-RNA-Proben ähnlich zusammengesetzt. Demnach kann auch hier daraus abgeleitet werden, dass die unterschiedlichen Behandlungen der pOLs höchstens eine geringe Auswirkung auf die RNA-Proben hatte. Bei den pOLsØNS21 ist der unmapped Anteil um ca. 10 % höher im Vergleich zu den anderen pOL-Proben (pOLs+NS21 und s-pOLsØNS21).

Zwischen den EV-Proben mit NS21 (C) und ohne NS21 (E) weist das Profil übereinstimmende Merkmale auf. Beide Profile weisen über das komplette Spektrum hinweg eine hohe Heterogenität auf. Des Weiteren zeigen beide Proben einen ungefähren miRNA-Anteil von 10 %, sodass an dieser Stelle kein offensichtlicher Einfluss der detektierten Medium-miRNA aus MKON in EVs+NS21 festzustellen ist. Außerdem sind über die komplette Sequenz ribosomale RNAs (rRNA) detektierbar. Mit knapp unter 50 % rRNA ist der Anteil an rRNA in den EV-Proben am höchsten (Abbildung 3-19). Das Profil der EV-RNA-Proben, die nach Stimulation generiert wurden (G), ähnelt eher den zellulären Proben (D, F und H), als den unstimulierten EV-Proben (C und E). Die prozentuale Verteilung der RNA-Gruppen entspricht wiederum den EV-Proben +/ØNS21 (Abbildung 3-19).

Wurde vor der RNA-Isolierung ein RNase-Verdau an den EV-Probe durchgeführt, dann zeigen die EV-RNA-Proben unabhängig vom NS21 ein erhöhtes Vorkommen an unmapped RNA, die über 40 % der Reads ausmacht. Wurde die EV-Probe jedoch in Anwesenheit von NS21 isoliert,

dann ist der Anteil der miRNA ca. doppelt so hoch (I) im Vergleich zu den Proben, bei den die EVs ohne NS21 (J) isoliert wurden (auch Abbildung 3-19).

Mittels der Mapping Längenverteilungen wurde das globale Profil der RNA-Proben inklusive RNA-Klassen dargestellt. Im Folgenden wird das Augenmerk auf die Analyse der miRNAs gelegt. Hierzu wird die unterschiedliche miRNA-Zusammensetzung innerhalb der Proben zunächst global über die Hauptkomponentenanalyse ermittelt.

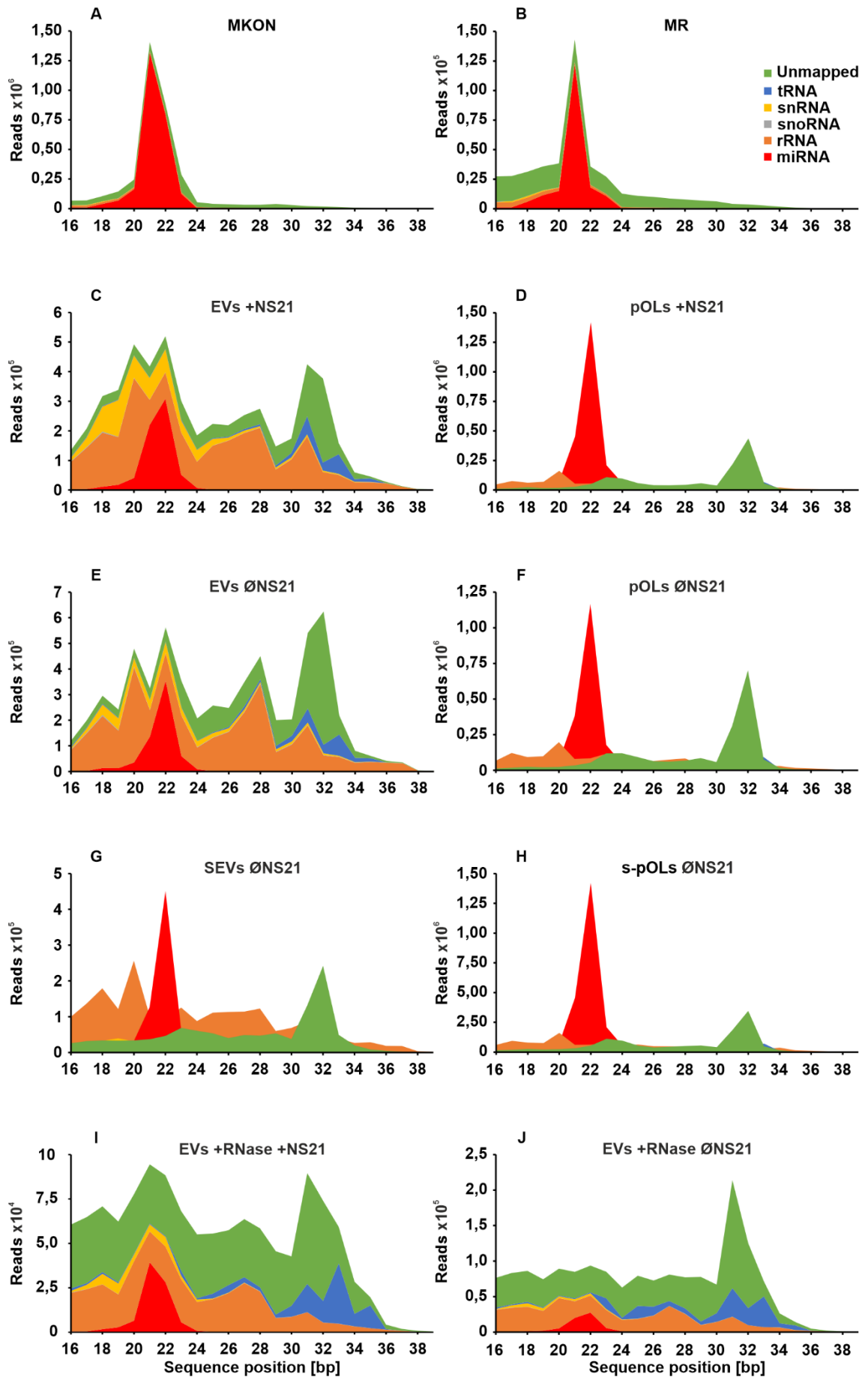


Abbildung 3-18: Mapping Längenverteilung der (mi)RNA-Sequenzierung-2. In der Mapping Längenverteilung ist die Zusammensetzung der RNA-Probe und die Verteilung der verschiedenen RNA-Typen dargestellt. (A) RNA aus differentiellen Ultrazentrifugations(dUZ)-Pellets der Medium-Kontrolle (Basalmedium + NS21, **MKON**, n = 3). (B) RNA aus dUZ-Pellets von MKON mit RNase-Verdau (**MR**, n = 3). RNA der primären Oligodendrozyten (pOLs) mit NS21 (**pOLs+NS21**, **D**), ohne NS21 (**pOLsØNS21**, **F**) und nach D/L-Serin und Glutamat Stimulation (**s-pOLsØNS21**, **E**) zeigen ähnliche Profile. RNA-Profile der dazugehörigen extrazellulären Vesikel (EVs) mit NS21 (**EVs+NS21**, **C**), ohne NS21 (**EVsØNS21**, **E**) und nach Stimulation (**SEVsØNS21**, **G**) sind heterogen. EVs nach RNase-Behandlung mit NS21 (**EVs+RNase+NS21**, **I**, n = 2) und ohne NS21 (**EVs+RNaseØNS21**, **J**, n = 2) zeigen hohen unmapped Anteil. Legendenbeschreibung: länger als 15 nt und passt zu keiner der gelisteten RNA-Klassen, nicht-zugeordnet (*engl.* **unmapped**); Transfer-RNA (**tRNA**); kleine nukleäre Ribonukleinsäure (*engl.* small nuclear ribonucleic acid, **snRNA**); kleine nukleoläre Ribonukleinsäure (*engl.* small nucleolar ribonucleic acid, **snoRNA**); ribosomale Ribonukleinsäure (**rRNA**) und microRNA (**miRNA**). n = 5 (außer A,B,I und J)

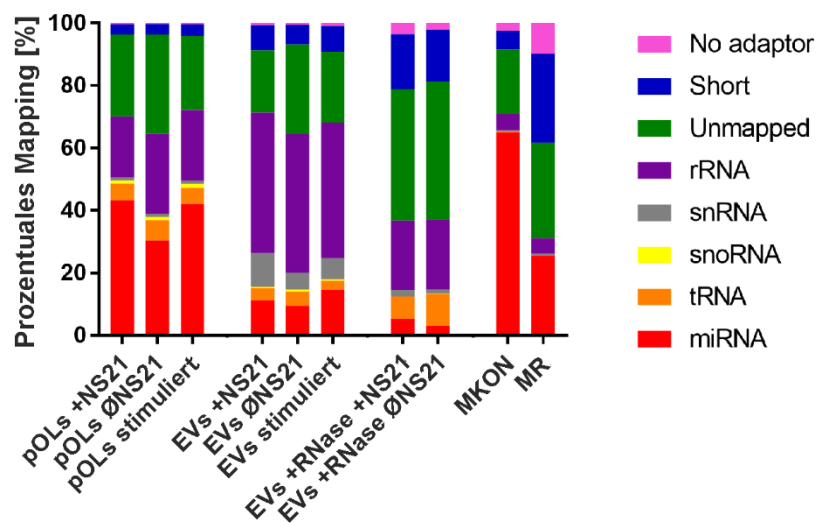


Abbildung 3-19: Prozentuale Mapping Längenverteilung der (mi)RNA-Sequenzierung-2. Die Ergebnisse der RNA-Zusammensetzung aus Abbildung 3-18 sind hier prozentual dargestellt. Legendenbeschreibung: weniger als 15 nt (**short**; z.B. Adapter-Dimere oder Degradationsprodukte); keine Adapter-Sequenz (**No adaptor**), weitere Angaben siehe Abbildung 3-18.

3.5.5 Hauptkomponentenanalyse von miRNA-Sequenzierung-2 – klare Trennung extrazellulärer Vesikel-Proben und Gruppierung der Oligodendrozyten

Bei der Hauptkomponentenanalyse (*engl.* principal component analysis, PCA) wird ein umfangreicher Datensatz auf die beiden Hauptkomponenten (*engl.* principal component, PC) reduziert, bei denen die Daten den größten Unterschied aufweisen. Die Hauptkomponente 1 (PC1) spiegelt hierbei den stärksten Unterschied wider und die PC2 dementsprechend den zweitstärksten Unterschied. In Abbildung 3-20 ist das PCA-Ergebnis der pOL- und dazugehörigen EV-Gruppen aus miRNA-Seq-2 zu sehen. Die EV-Proben (EV+NS21, EVØNS21 und SEVØNS21) gruppieren bezogen auf die x-Achse (PC1: 29,17 %) in dem Bereich zwischen 0,1 und 0,25. Somit ist bezogen

auf die aussagekräftige PC1 kein Unterschied innerhalb der EV-Proben festzustellen, jedoch unterscheiden sich die jeweiligen EV-Gruppen bezogen auf die PC2 (8,25 %) eindeutig. Außerdem zeigen die EV-Gruppen einen deutlichen Unterschied zu den entsprechenden pOL-Gruppen (pOLs+NS21, pOLsØNS21 und s-pOLsØNS21) bezogen auf PC1. Die pOLs gruppieren jedoch in Bezug auf PC1 und PC2 im selben Bereich, was wiederum für einen geringfügigen Einfluss auf die zelluläre miRNA durch die Verwendung unterschiedlicher Medien während der EV-Isolationsperiode spricht (Vergleich: Abbildung 3-16, Abbildung 3-18 und Abbildung 3-19).

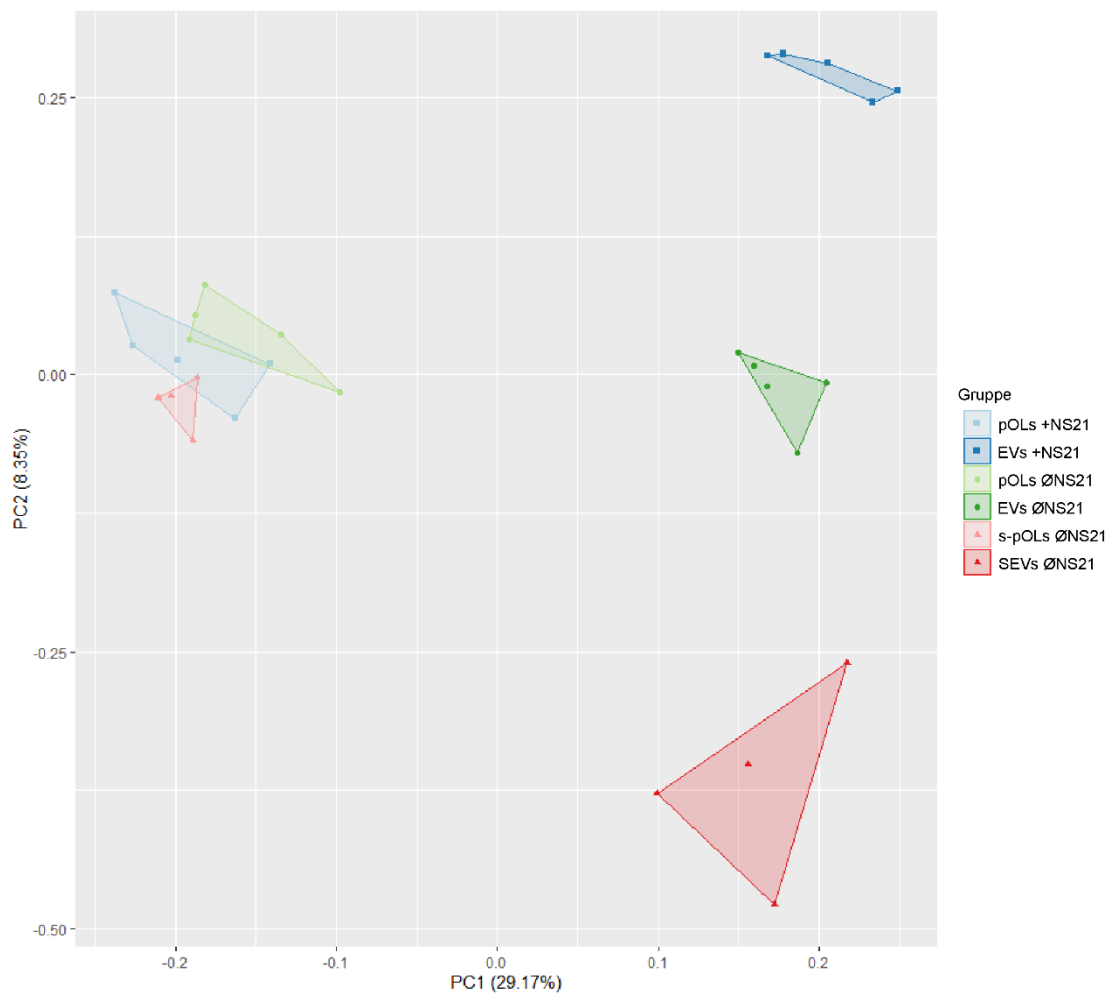


Abbildung 3-20: miRNA Hauptkomponentenanalyse der extrazellulären Vesikel und dazugehöriger Oligodendrozyten aus miRNA-Sequenzierung-2. Die Gruppen der extrazellulären Vesikel (EVs) mit NS21 (**EVs+NS21**), ohne NS21 (**EVsØNS21**) und nach Stimulation mit D/L-Serin und Glutamat (**SEVsØNS21**) liegen getrennt voneinander und getrennt zu den dazugehörigen primären Oligodendrozyten (pOLs) mit NS21 (**pOLs+NS21**), ohne NS21 (**pOLsØNS21**) und nach Stimulation mit D/L-Serin und Glutamat (**s-pOLsØNS21**). pOLs zeigen Überschneidungen unabhängig vom Supplement NS21 und/oder der Stimulation. (n = 5; außer bei SEVs und s-pOLs, hier n = 4).

Aus der PCA, die die gezielte Analyse der EV-Gruppen beinhaltet (Abbildung 3-21), geht (ähnlich wie in Abbildung 3-20 für PC-2) eine differentielle Gruppierung der einzelnen EV-Gruppen hervor. Hier liegen die EVs+NS21 getrennt von den EVsØNS21 und den SEVsØNS21. Der stärkste Unterschied (bezogen auf PC1) besteht zwischen den EVs+NS21 und den SEVsØNS21, jedoch ist

außerdem eine Trennung zwischen den stimulierten und den nicht-stimulierten EV-Proben festzustellen. Demnach hat sowohl die Supplementierung des Mediums als auch die Stimulierung mit D/L-Serin und Glutamat während der Isolationsperiode einen Einfluss auf das miRNA-Profil der EV-Proben.

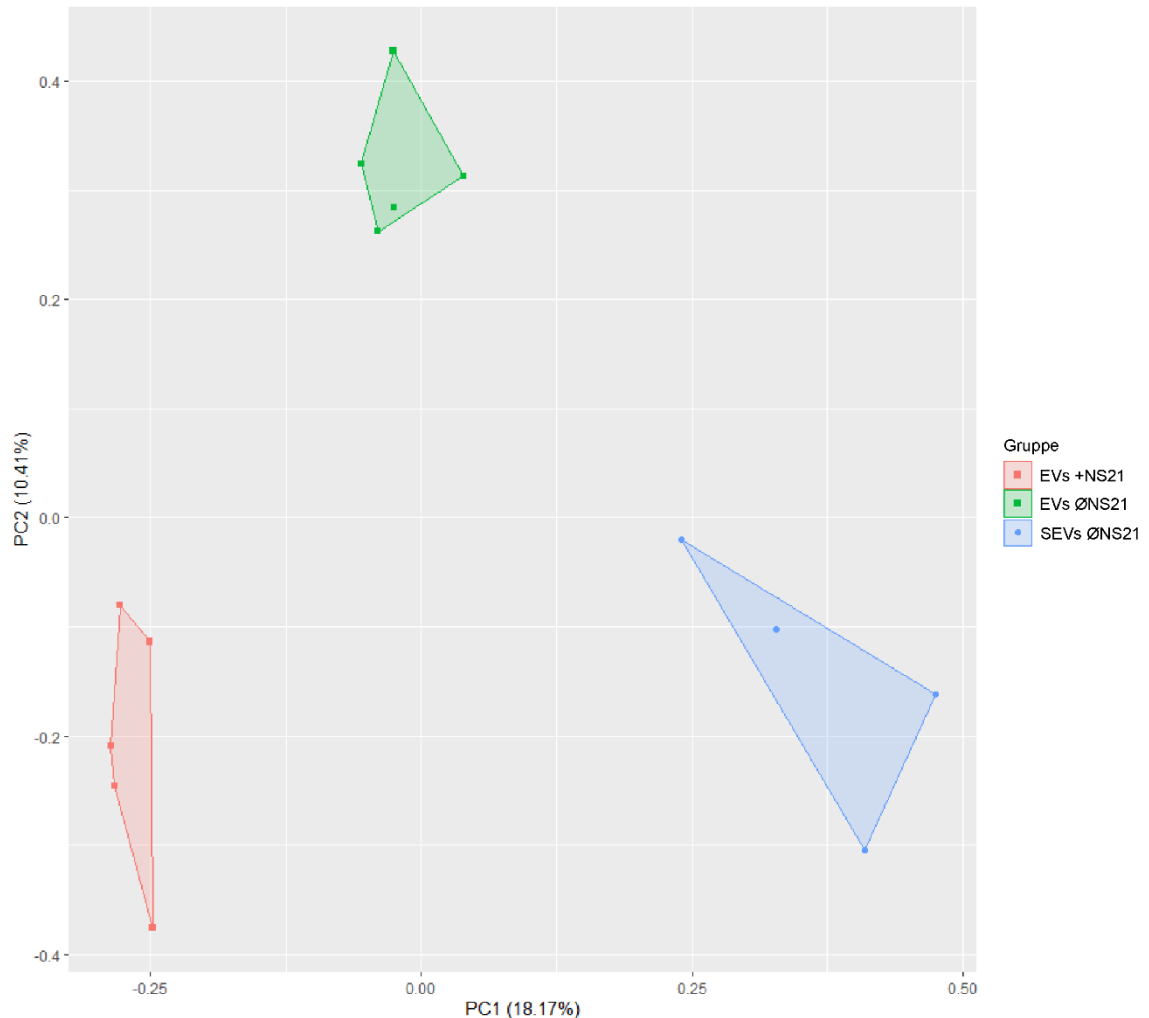


Abbildung 3-21: Hauptkomponentenanalyse der verschiedenen Gruppen von extrazellulären Vesikel aus miRNA-Sequenzierung-2. Die Gruppen der extrazellulären Vesikel (EVs) mit NS21 (**EVs+NS21**), ohne NS21 (**EVsØNS21**) und nach Stimulation mit D/L-Serin und Glutamat (**SEVsØNS21**) bilden separate Cluster. (n = 5; außer SEV, n = 4).

In einer weiteren PCA wurde ein Vergleich zwischen den drei EV- und den dazugehörigen pOL-Proben (+NS21, ØNS21 und stimuliert) sowie der MKON berechnet (Abbildung 3-22). Erwartungsgemäß ähnelt die Verteilung der biologischen Proben (EVs und pOLs) der Verteilung aus Abbildung 3-20. Der Unterschied zwischen den pOLs und den EVs liegt bezogen auf die PC1 bei ca. 0,2. Somit ist der Unterschied unter den biologischen Proben nicht so stark, wie zwischen den EVs und den MKON-Proben (PC1: 34,71 %, Differenz ca. 0,35). Auch die Proben aus EVs+NS21 gruppieren näher zu den restlichen EV-Proben als zu MKON, obwohl in beiden Ansätzen NS21 vorhanden ist.

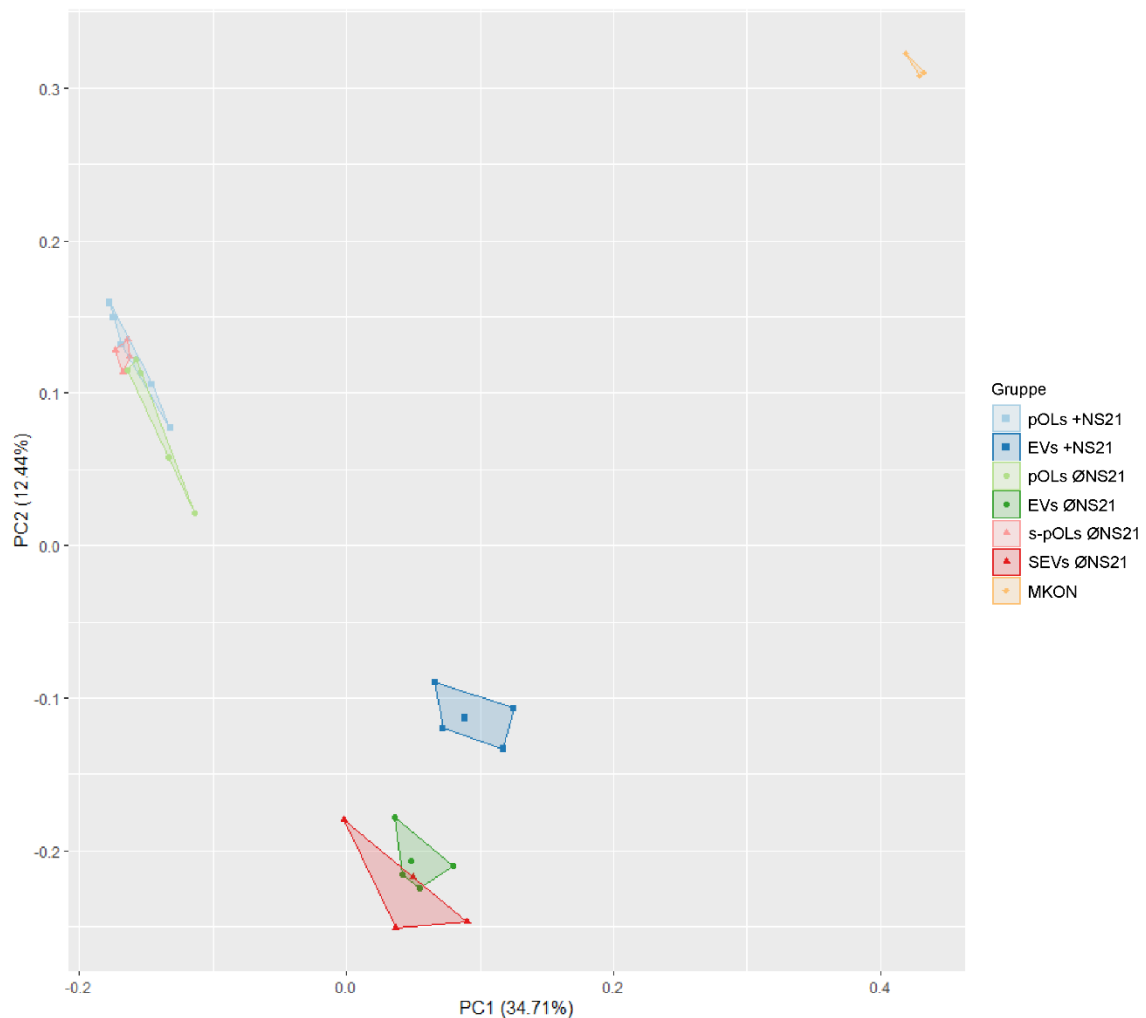


Abbildung 3-22: Hauptkomponenten Analyse der Oligodendrozyten und dazugehörigen extrazellulären Vesikeln inklusive Medium-Kontrolle aus miRNA-Sequenzierung-2. Zusätzlich zu den Gruppen der extrazellulären Vesikel (EVs) mit NS21 (**EVs+NS21**), ohne NS21 (**EVsØNS21**) und nach Stimulation mit D/L-Serin und Glutamat (**SEVsØNS21**) und den dazugehörigen primären Oligodendrozyten (pOLs) mit NS21 (**pOLs+NS21**), ohne NS21 (**pOLsØNS21**) und nach Stimulation mit D/L-Serin und Glutamat (**s-pOLsØNS21**) aus Abbildung 3-20, wurde die Medium-Kontrolle (**MKON**) hinzugezogen, die sich stark von den biologischen Gruppen separiert. (n = 5; außer bei SEVs und s-pOLs, hier n = 4).

Die Ergebnisse der PCAs zeigen unabhängig der Medien-Zusammensetzung (+NS21 oder ØNS21) keine Unterschiede der miRNA-Profile auf pOL-Ebene. Bei den miRNA-Profilen der EVs können jedoch distinkte Gruppierungen der jeweiligen Proben in Abhängigkeit zu den Medien-Zusammensetzungen festgestellt werden. Um die miRNA-Kontamination und somit den Einfluss des Mediums von den endogenen EV-miRNAs trennen zu können, soll im weiteren Verlauf der Arbeit die miRNA-Kontamination intensiver analysiert und darauf aufbauend eine Korrektur entwickelt werden.

3.5.6 Bestätigung partiell geschützter miRNA im Medium nach RNase-Verdau

Durch die Mapping Längenverteilung (3.5.4, S. 69) wurden bereits die ersten Ergebnisse beschrieben, nach denen auch in miRNA-Seq-2 eine miRNA-Kontamination in der MKON ausgemacht werden konnte. Des Weiteren zeigen die Resultate der Mapping Längenverteilung ebenfalls die Detektion von miRNAs im Medium nach RNase-Behandlung. Im Folgenden wird (ähnlich wie unter 3.4.1, S. 49) explizite darauf eingegangen, welche miRNAs in MKON gegen eine RNase-Behandlung geschützt sind und welche degradiert werden können.

Der Abbildung 3-23 sind miRNAs aus MKON und deren Verhalten nach RNase-Verdau (MR) zu entnehmen. Hierzu wurden die Reads der Seq-Ergebnisse von MR in Relation zu MKON gesetzt (Normalisierungsfaktor 13,67). Demnach wurden die miRNAs aus MR mit Werten >1 als geschützt, mit Werten zwischen 1 und 0,7 als partiell degradiert (bzw. partiell geschützt) und miRNAs mit Werten $<0,7$ als ungeschützt eingestuft.

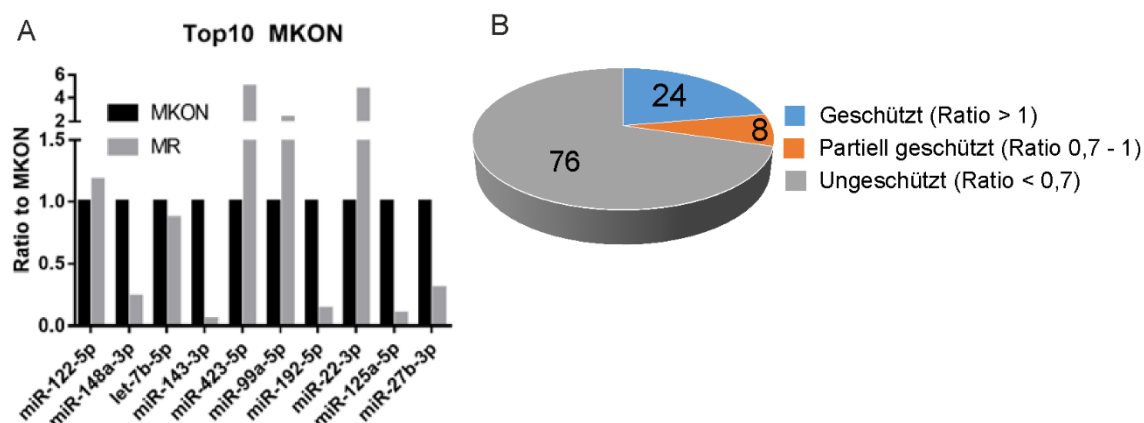


Abbildung 3-23: Ein Viertel der miRNAs des Mediums sind vor einem Abbau durch RNase geschützt. (A) Top 10 miRNAs aus Medium-Kontrolle (MKON) und entsprechende miRNAs nach RNase-Verdau (MR). Normalisiert auf die Summe der Reads (Normalisierungsfaktor: 13,67). MKON wurde auf eins gesetzt und MR steht in Relation zu MKON. **(B)** Verteilung aller miRNAs nach RNase-Verdau (cut-off: 50 Reads in MKON). (n = 3).

Anhand der zehn am stärksten exprimierten miRNAs in MKON (Top10 MKON) wird der heterogene Effekt des RNase-Verdaus auf die miRNA-Population deutlich (Abbildung 3-23 A). Vier der Top10 miRNAs aus MKON sind RNase-geschützt (miR-122-5p, -423-5p, -99a-5p und -22-3p), eine miRNA (let-7b-5p) wird partiell degradiert und fünf miRNAs werden abgebaut (miR-148a-3p, -143-5p, -192-5p, -125a-5p und -27b-3p). Aus der Abbildung 3-23 B wird deutlich, dass ca. dreiviertel der miRNAs eine MR/MKON-Ratio <1 haben und somit degradiert werden. Ein Viertel der miRNAs sind jedoch gegen einen RNase-Abbau geschützt. Somit konnten die Erkenntnisse, dass Medium Supplemente miRNA-kontaminiert sind und dass diese miRNAs zum Teil RNase-resistent sind, aus Absatz 3.4.1 (S. 49) bestätigt werden.

3.5.7 Abzug Medium-basierter miRNA-Kontamination von vesikulären miRNA-Proben

Eine Strategie, um einen durch Medium-Kontamination verfälschten Sequenzierungsdatensatz hinsichtlich physiologisch relevanter EV-miRNAs auswerten zu können, könnte ein Background-Abzug darstellen. Hierbei werden die Reads der kontaminierenden miRNAs aus MKON von denen der vesikulären Proben EVs+NS21 subtrahiert. Dieses Vorgehen erweist sich jedoch aus verschiedenen Gründen als nicht trivial.

Zunächst können Read-Zahlen (oder Reads) einer Probe ausschließlich im Verhältnis zu den totalen Read-Zahlen derselben Probe betrachtet werden, nicht aber in das direkte Verhältnis zu Read-Zahlen anderer Proben gesetzt werden. Eine Überlegung, um Reads verschiedener Proben direkt miteinander vergleichen zu können, wäre eine Normalisierung der Reads über geeignete miRNAs. Da Medium-Bestandteile aus verschiedenen Tieren gewonnen werden, könnten hierfür auch speziesfremde miRNAs verwendet werden. Jedoch weisen gerade miRNAs eine hohe Homologie zwischen verschiedenen Organismen auf, wodurch speziesfremde miRNAs schwer zu detektieren sind und somit auch keine Option für eine Normalisierungsstrategie stellen. Zusätzlich besteht eine hohe Heterogenität zwischen den (mi)RNA-Proben aus der MKON und EVs+NS21, wodurch ebenfalls keine miRNAs zur Normalisierung herangezogen werden können. Der im Folgenden beschriebene Background-Abzug wurde unter den Aspekten entwickelt, dass der Hauptteil der Kontamination – bei größtmöglichem Erhalt der Information des EV-miRNA-Profiles – eliminiert werden soll.

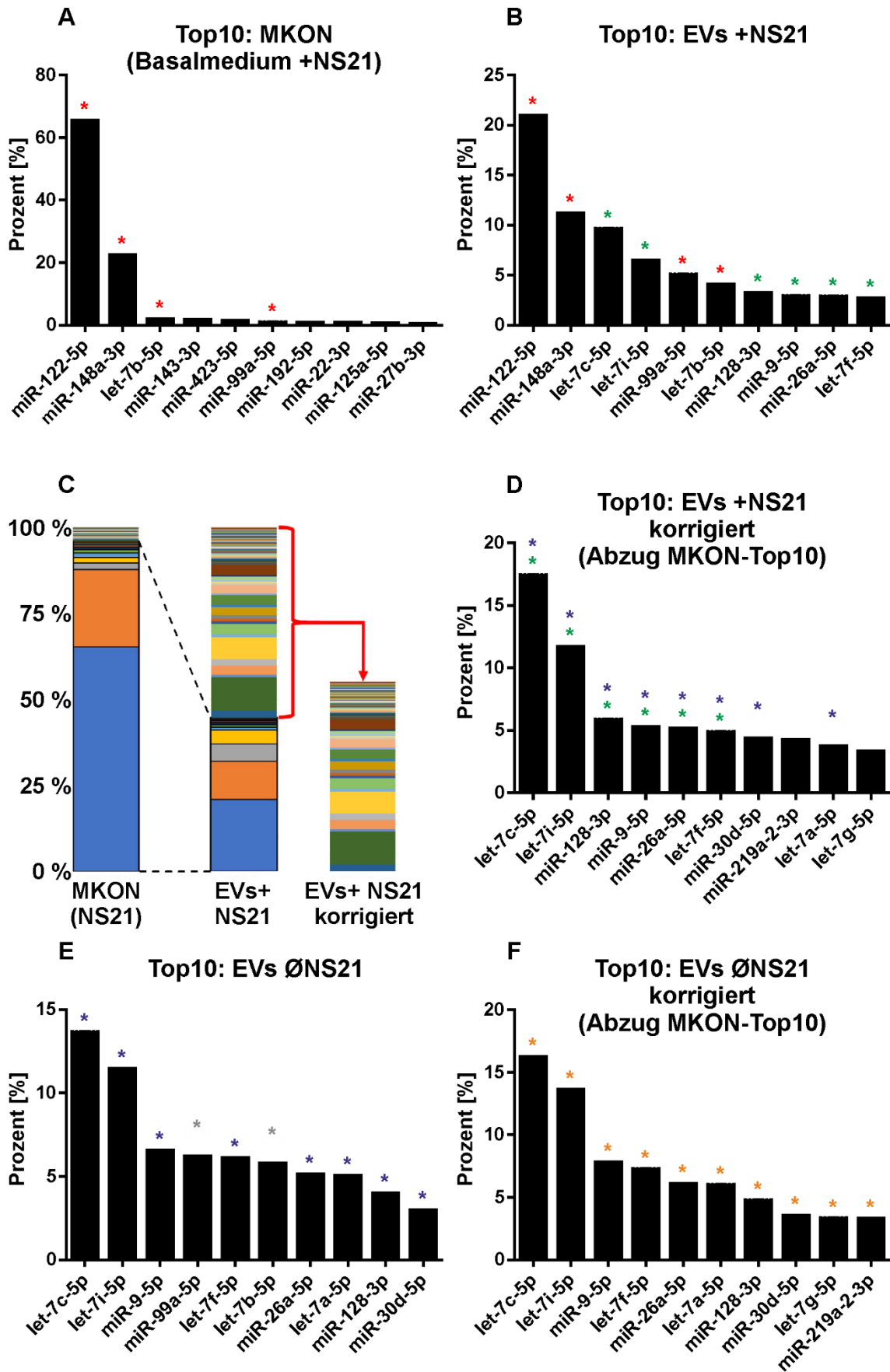


Abbildung 3-24: Entwicklung eines Korrektur-Abzugs der mediumsbasierten miRNA-Kontamination aus den Proben der extrazellulären Vesikel von miRNA-Sequenzierung-2. (A) Top10 miRNAs der Medium-Kontrolle (MKON). (B) Top10 miRNAs aus extrazellulären Vesikel (EVs) mit NS21 (EVs+NS21). (**roter Stern**, gleiche miRNAs in A und B). (C) Strategie für den Top10-Abzug. Die Top10 miRNAs aus A (97 % der Reads) werden aus der Analyse von EVs+NS21 (B) ausgeschlossen (entspricht ca. 45 % der Reads). Die restlichen Reads werden als EVs+NS21 korrigiert analysiert, deren Top10 miRNAs in **D** dargestellt sind (**grüner Stern**, gleiche miRNAs in B und D). (E) Top10 miRNAs von EVsØNS21 (**blauer Stern**, gleiche miRNAs in D und E; **hellgrauer Stern**, miRNAs kommen auch in A & B (da roter Stern) vor. Top10-Abzug wurde auch an EVsØNS21 durchgeführt wodurch unabhängig der Proben dasselbe Analyseverfahren vollzogen wurde, Top10 miRNAs sind in **F** dargestellt (**oranger Stern**, gleiche miRNAs in D). (EVs, n = 5. MKON, n = 3).

Abbildung 3-24 zeigt die Entwicklung für einen Korrektur-Abzug der mediumsbasierten miRNA-Kontamination aus den Proben der extrazellulären Vesikel von miRNA-Sequenzierung-2. Unter Betrachtung der zehn am höchsten exprimierten miRNAs aus MKON (Abbildung 3-23 A) wird deutlich, dass miR-122-5p mit über 65 % und miR-148a-3p mit ca. 20 % den Hauptanteil der Reads in MKON einnehmen (Tabelle 7-8, S. ix, Zusatzdaten).

In Abbildung 3-24 B sind die Top zehn miRNAs aus EVs+NS21 dargestellt. Die markierten miRNAs (**roter Stern**) sind sowohl in EVs+NS21 als auch unter den Top10 miRNAs aus MKON (Abbildung 3-24 A) vertreten. In EVs+NS21 dominieren, genauso wie in MKON (Abbildung 3-24 A), die miRNAs miR-122-5p und miR-148-3p. Die geringeren Werte der prominenten miRNAs miR-122-5p (ca. 21 %) und miR-148a-3p (ca. 12 %) in EVs+NS21 können zum einen an der heterogeneren RNA-Probe liegen (A, MKON: ca. 180 miRNAs; B, EVs+NS21: ca. 329 miRNAs - cut-off: Mittelwert > 10 Reads) und/oder daran, dass miRNAs aus dem Medium aufgenommen wurden. Die Gesamtheit der Top10 miRNAs der MKON entsprechen ca. 97 % der totalen Reads der MKON – in der Probe EV+NS21 nehmen die gleichen miRNAs ca. 45 % der Reads ein (Abbildung 3-24 C; Zusatzdaten, Tabelle 7-5, S. vi; Tabelle 7-8, S. ix). Um an dieser Stelle die miRNA-Kontaminanten bestmöglich auszuklammern, wurden die Top10 miRNAs der MKON aus EVs+NS21 vor der Durchführung von weiteren Analysen ausgeschlossen. Abbildung 3-24 D zeigt die zehn am höchsten exprimierten miRNAs nach Durchführung des MKON-Top10-Abzugs von EVs+NS21 (EVs+NS21 korrigiert).

Parallel zu den Proben für EVs+NS21 wurde RNA aus EVsØNS21 isoliert und sequenziert – die zehn meist exprimierten miRNAs hierzu sind in Abbildung 3-24 E dargestellt. Acht der Top10 miRNAs dieser Probe (**blauer Stern**) finden sich auch in dem miRNA-Profil von ‚EVs+NS21 korrigiert‘ (Abbildung 3-24 D).

Um Proben-unabhängig dasselbe Analyseverfahren anzuwenden und um mögliche kontaminierenden miRNA-Überreste ausschließen zu können, wurde in einem weiteren Schritt ebenfalls der MKON-Top10-Abzug auf EVsØNS21 angewandt. Somit sind die Top10 kontaminierenden miRNAs aus MKON von der kompletten Analyse über EV-miRNAs (EVsØNS21: ca. 330 miRNAs; EVs+NS21: ca. 329 miRNAs - cut-off: Mittelwert > 10 Reads) ausgenommen, wodurch jedoch auch mögliche EV-assoziierte miRNAs ausgeschlossen werden könnten. Unter den Top10

miRNAs in ‚EVsØNS21 korrigiert‘ (Abbildung 3-24 F) finden sich dieselben miRNAs (oranger Stern), wie in ‚EV+NS21 korrigiert‘ (Abbildung 3-24 D).

Durch die Integration der MKON in die miRNA-Seq-2 konnte die weitreichende miRNA-Kontamination im Medium dargestellt und ein möglicher korrigierender Background-Abzug ausgearbeitet werden. Im Folgenden werden weitere Analyseverfahren von Sequenzdaten, die durch die Medium-Kontamination verzerrt werden könnten, eingehender untersucht und dargestellt.

3.5.8 MiRNA-kontaminiertes Supplement beeinflusst differentielle miRNA-Expression zwischen extrazellulären Vesikeln und Donorzellen

Die differentielle Genexpression (DGE) ist ein Analyseverfahren, durch das unter anderem miRNAs identifiziert werden können, die möglicherweise in EVs sortiert wurden. Hierbei wird die Expression der EV-miRNAs mit der der Zellen verglichen und auf Unterschiede analysiert. EV-angereicherte miRNAs könnten einem potenziellen Sortierungsmechanismus unterliegen.

In der folgenden Analyse wurde solch eine DGE auf die Gruppen pOLs+NS21 und EVs+NS21 durchgeführt und mit einer DGE aus den Gruppen pOLsØNS21 und EVsØNS21 verglichen. Durch diesen Vergleich spezifischer miRNAs in beiden Gruppen können mögliche Auswirkungen der miRNA-Kontamination exemplarisch dargestellt werden.

Abbildung 3-25 zeigt die Top fünf (Top5) regulierten miRNAs der DGE zwischen EVs und pOLs. In A sind die Top5 regulierten miRNAs der Proben mit NS21 (schwarz) und den entsprechenden Veränderungen der gleichen miRNAs aus den Proben ohne NS21 (grau) dargestellt. MiR-122-5p zeigt mit einem Log2 FC von ca. 9,3 die stärkste DGE hin zu EVs+NS21 – in EVsØNS21 ist miR-122-5p mit einem Log2 FC von 1,5 auffällig geringer. Im Vergleich dazu ist miR-192-5p als zweitstärkste regulierte EV-miRNA aus +NS21 mit einem Log2 FC von 4,3 erheblich schwächer in EVs angereichert als miR-122-5p. Des Weiteren ist in EVsØNS21 die miR-192-5p stärker in pOLs zu detektieren. Die weiteren drei hochregulierten miRNAs in EVs+NS21 weisen mit einem Log2 FC zwischen 3,3 und 4,1 einen ähnlichen Log2 FC zu miR-192-5p auf.

In Abbildung 3-23 B sind die Top5 regulierten miRNAs aus ØNS21 (grau) mit den Veränderungen der jeweilig gleichen miRNAs aus EVs+NS21 (schwarz) dargestellt. Bei den in EVs angereicherten miRNAs sind die Log2 FC Werte mit 2,8 (miR-203-3p) bis 2,0 (miR-505-5p) niedriger als in Abbildung 3-23 A (angereichert in EVs+NS21) mit Log2 FC Werten bis zu 9,3. Außerdem ist die Differenz der Log2 FC Werte zwischen den Top5 EV-miRNAs bei ØNS21 mit 0,8 geringer als bei +NS21 mit einer Differenz von ca. 6. Des Weiteren beläuft sich der Unterschied der in EVs-angereicherten miRNAs zwischen ØNS21 (grau) zu den gleichen miRNAs aus EVs+NS21 (schwarz) bei vier der fünf miRNAs (miR-203-3p, -342-5p, -7033-5p und -505-5p) auf unter 0,5.

Auffallend ist miR-200a-3p als einzige miRNA, die nach beiden Isolationsbedingungen (+ und ØNS21) unter den Top5 in EVs-angereicherten miRNAs vertreten ist. Zusätzlich ist bei

miR-200a-3p der Unterschied zwischen +NS21 und ØNS21 mit einer Differenz von über zwei höher als bei den restlichen miRNAs (Abbildung 3-25 B, angereichert in EVs).

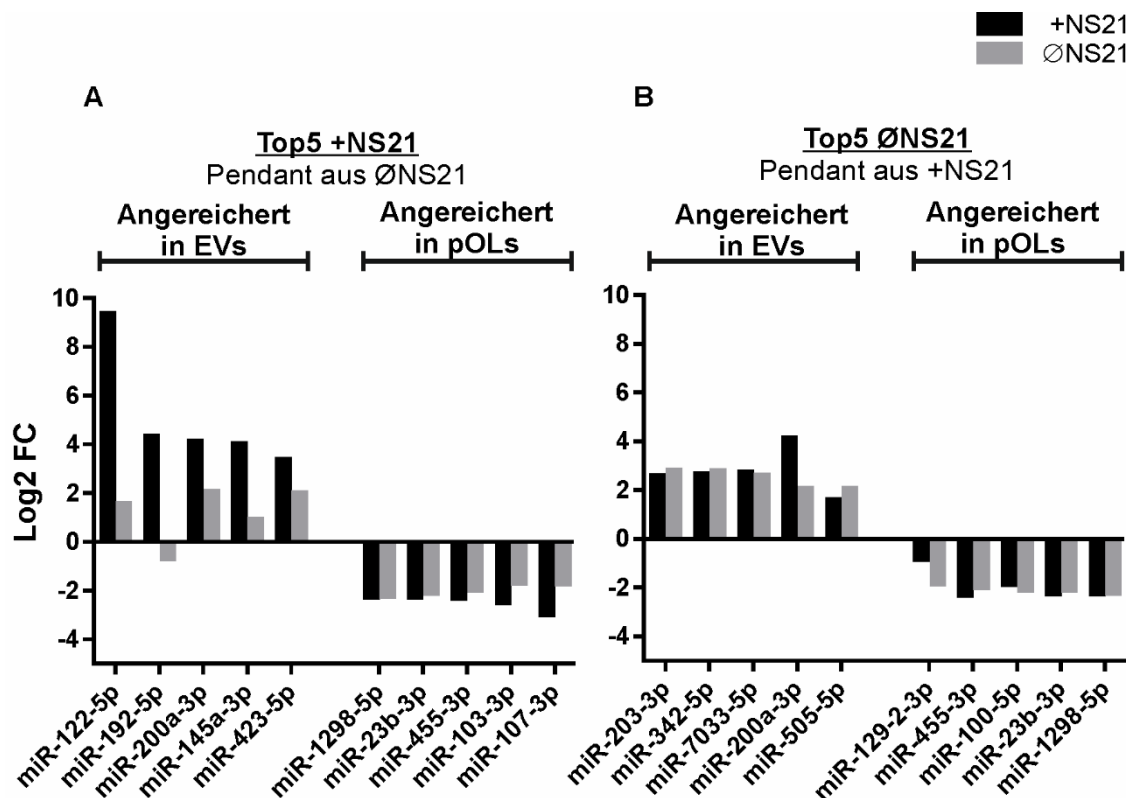


Abbildung 3-25: Differentielle miRNA-Expression zwischen extrazellulären Vesikeln und Oligodendrozyten – Vergleich +NS21 und ØNS21. Vergleich von miRNA-Expression zwischen primären Oligodendrozyten (pOLs) und extrazellulären Vesikeln (EVs) mittels differentieller Genexpression (DGE). (A) Top fünf hochregulierte miRNAs in pOLs und EVs +NS21 (inkl. entsprechender miRNAs aus ØNS21). (B) Top fünf hochregulierte miRNAs in pOLs und EVs ØNS21 (inkl. entsprechender miRNAs aus +NS21). Log2 fold change: Log2 FC. (n = 5).

Die hohen Unterschiede der Log2 FC Werte von in EVs-angereicherten miRNAs zwischen den EV-Isolationsbedingungen in Abbildung 3-25 A („angereichert in EVs“) weisen erneut (wie unter 3.5.7, S. 78) auf eine miRNA-Kontamination hin. Da die Unterschiede der in EVs-angereicherten miRNAs in Abbildung 3-25 B zwischen den Gruppen +/ØNS21 geringer ist, könnten dieses Ergebnisse darauf hinweisen, dass der Einfluss durch die NS21-miRNA-Kontamination auf diese miRNAs ebenfalls gering ist. Bei in pOLs-angereicherten miRNAs sind drei der fünf miRNAs zwischen A und B identisch (miR-1298-5p, -23b-3p und -455-3p). Dies deutet, ebenso wie die kleineren Log2 FC Werte (unter 3), auf einen geringeren Effekt der NS21-miRNA-Kontamination auf die pOLs hin.

Durch direkte Gegenüberstellungen von DGE-Analysen gleicher miRNAs nach unterschiedlichen EV-Isolationsbedingungen, konnte der weitreichende Einfluss des Supplements NB21 auf DGE-Analyseverfahren dargestellt werden.

3.5.9 Glutamat- und Serin-Stimulation beeinflussen das miRNA-Profil von primären Oligodendrozyten und extrazellulären Vesikeln

Der durch elektrisch aktive Neurone ausgelöste Ca^{2+} -Einstrom in Oligodendrozyten (1.3.2, S. 16) kann *in vitro* durch Glutamat- und D-Serin-Stimulation imitiert werden. Um die Auswirkung der Stimulation auf die DGE zwischen Oligodendrozyten und EVs zu untersuchen, wurden in der folgenden Analyse DGEs von stimulierten (s-pOLsØNS21 und SEVØNS21) mit nicht-stimulierten Proben (pOLsØNS21 und EVsØNS21) verglichen. Da für die hier untersuchten Sequenzierungsdaten ausschließlich Proben ohne NS21 nebeneinandergestellt wurden, wurde kein MKON-Top10 Abzug durchgeführt.

Für das Venn-Diagramm der Abbildung 3-26 wurde zunächst eine DGE-Analyse zwischen s-pOLsØNS21 und den dazugehörigen SEVsØNS21 sowie eine weitere DGE-Analyse zwischen den pOLsØNS21 und EVsØNS21 durchgeführt. Anschließend wurden die regulierten miRNAs den entsprechenden Gruppen des Venn-Diagramms zugeordnet. Diesem Diagramm ist zu entnehmen, dass bei den stimulierten Proben 19 miRNAs (angereichert in s-pOLsØNS21) und 18 miRNAs (angereichert SEVsØNS21) nicht in den jeweiligen Proben ohne Stimulation vorkommen. Demgegenüber können fünf miRNAs (angereichert in EVsØNS21; Østimuliert) bzw. neun miRNAs (angereichert in pOLsØNS21; Østimuliert) ausschließlich in den nicht-stimulierten Proben als hochreguliert detektiert werden.

21 miRNAs sind sowohl unter stimulierenden (SEVs) als auch unter nicht-stimulierenden (EVsØNS21; Østimuliert) Bedingungen in EVs als hochreguliert festzustellen. Dem gegenüber stehen 16 miRNAs, die nach Stimulation (s-pOLsØNS21) und auch ohne Stimulation (pOLsØNS21; Østimuliert) in pOLs als angereichert zu detektieren sind.

MiR-92b-3p findet sich sowohl hochreguliert in pOLsØNS21Østimuliert (Log2 FC -1,15), als auch in SEVsØNS21 (Log2 FC 1,07). Dadurch ist miR-92b-3p die einzige miRNA innerhalb dieses Vergleichs, die sowohl in EVs (SEV) als auch in pOLs (ØStimulation) hochreguliert vorkommt. Somit werden möglicherweise durch die Stimulation verstärkt EVs freigesetzt, die mit der miR-92b-3p assoziiert sind. Zusätzlich könnten EVs mit weiteren miRNAs auf diese Weise freigesetzt werden, die jedoch nicht mit der angewandten DGE-Methode erkannt werden würden. Dies wäre der Fall, wenn miRNAs weiterhin zellulär vorkommen aber durch den EV-Release ein Gleichgewicht zwischen EVs und pOLs entstehen würde. Die neun in pOLsØNS21ØStimulation vorkommenden und angereicherten miRNAs könnten potenziell davon betroffen sein.

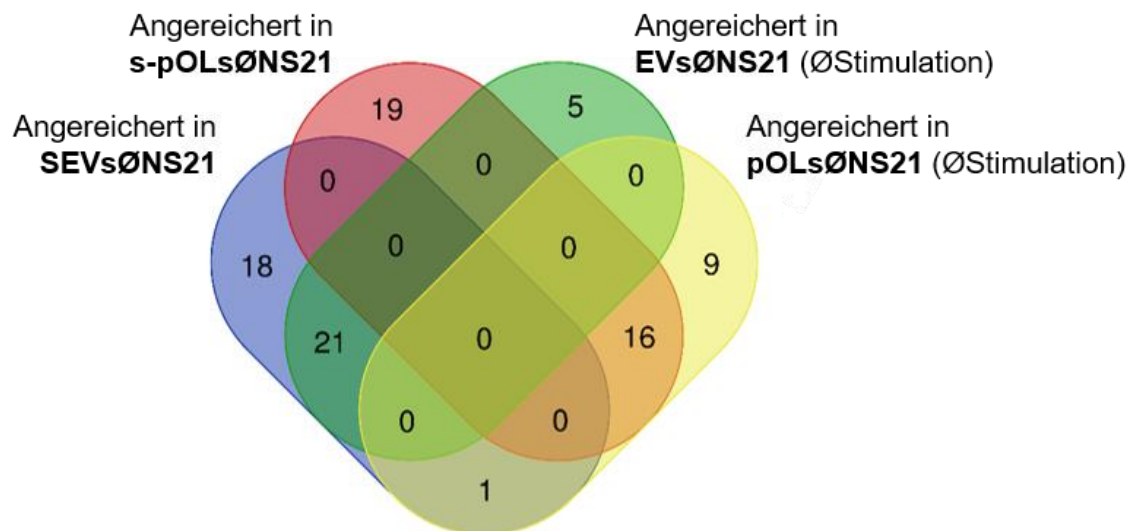


Abbildung 3-26: Glutamat und Serin Stimulation beeinflussen miRNA-Profile von Oligodendrozyten und extrazellulären Vesikeln. Grundlage des Venn-Diagramms sind differentiell exprimierte miRNAs von primären Oligodendrozyten ohne NS21 (pOLsØNS21) und extrazelluläre Vesikel ohne NS21 (EVsØNS21) sowie differentiell exprimierte miRNAs von D/L-Serin und Glutamat stimulierten pOLs ohne NS21 (s-pOLsØNS21) und stimulierten EVs ohne NS21 (SEVsØNS21). MiR-92b-3p ist sowohl in SEVsØNS21 als auch in pOLsØNS21 hochreguliert. (Proben ohne Stimulation: n = 5; stimulierte Proben n = 4).

4 Diskussion

Ein Großteil der aktuellen EV-Forschung ist auf *in vitro* Zellkulturstudien angewiesen, auch wenn *in vivo* Methoden kontinuierlich vorangetrieben werden. Demnach scheint sowohl der Transfer von Cre-(Rekombinase-)RNA als auch der von miRNAs (indirekter Nachweis über Detektion von möglicherweise EV-assoziierten miRNAs in Zielzellen) *in vivo* wahrscheinlich (Ridder et al. 2014). Da für die Unterscheidung zwischen (z.B. Cre-) RNA- oder Protein-Transfer weiterhin EVs aus Biofluiden isoliert werden müssen, bleiben die Unsicherheiten der EV-Aufreinigung inklusive der Co-Isolierungen weiterer Makromoleküle bestehen (Brahmer et al. 2019; Böing et al. 2014; Welton et al. 2015). Zusätzlich sind Untersuchungen von EVs spezieller Organe nur dann möglich, wenn die Vesikel über Körperflüssigkeiten transportiert werden und aus diesen Flüssigkeiten isoliert werden könnten. Für Analysen von EVs, die innerhalb eines differenziert abgeschnittenen Organs (z.B. Gehirn) hergestellt und aufgenommen werden, existieren gegenwärtig keine Isolations-Methoden. Aufgrund dessen muss für Analysen oligodendroglialer EV-miRNAs aktuell auf *in vitro* insolierte EVs zurückgegriffen werden. Seit Dekaden wird für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen FBS verwendet, dessen Bestandteile unter anderem Vesikel, Proteine und (mi)RNAs sein können (Gstraunthaler und Lindl 2013; Shelke et al. 2014; Wei et al. 2016). Somit werden die Analyse-Möglichkeiten der EV-Forschung, aufgrund benötigter Seren in Zellkultur, erschwert und stark reduziert. Um weiterhin auf Zellkultur-basierte Untersuchungen zurückgreifen zu können, wurden verschiedene Zellkultur-Methoden kontinuierlich weiterentwickelt. Eine dieser Entwicklungen, die in vielen Kultursystemen Anwendung findet, war der Austausch von Serum durch speziell angefertigte, sogenannte „chemisch definierte“ Supplemente. Diese wurden lange Zeit als unbedenklich für Analysen von EV-miRNAs eingestuft und in zahlreichen Studien verwendet.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch auch in sogenannten „chemisch definierten“ Supplementen (NS21 und B27) miRNA-Kontaminationen detektiert werden. Zusätzlich gelang die Ermittlung von KAT als miRNA-verunreinigte Komponente der Supplemente. Diese erstmalig beschriebene Entdeckung verkompliziert Untersuchungen von EV-assoziierten miRNAs aus Zellkultur. Des Weiteren können biologisch Relevante Analysen aufgrund der miRNA-Kontamination zusätzlich erschwert werden. Diese Umstände werden im folgenden Kapitel an dem Beispiel „Transport von pOL-EV-assoziiierter miR-122-5p und miR-451a zu Neuronen“ explizit erörtert.

Trotz der weitreichenden Komplexität der miRNA-Kontamination in definierten Supplementen konnten Lösungsansätze zur Analyse von EV-miRNAs etabliert werden. Durch quantitative Beschreibungen der miRNA-Kontamination des NS21 gelang eine Korrektur-Entwicklung, um trotz der Kontamination EV-miRNAs zu analysieren. Darauf aufbauend konnte unter anderem dargelegt werden, wie DGE-Analysen, die zur Untersuchung von Sortiermechanismen von EV-miRNAs herangezogen werden, durch die miRNA-Kontamination beeinflusst werden und zu Fehlinterpretationen führen können. Des Weiteren konnten erste Analysen über miRNA-Profiländerungen in pOLs und EVs nach Serin/Glutamat-Stimulation aufgestellt werden.

4.1 Widerlegung der Hypothese: Phänotypische Anpassungen des Axons auf den trophischen Support durch Vesikel assoziierte miR-122-5p und miR-451a

Wie bereits erwähnt konnte bei Brustkrebszellen ein EV vermittelter Transport von miR-122-5p und miR-451a zu prämetastatischen Nischenzellen beschrieben werden. In Donorzellen konnte daraufhin eine Reduktion von PKM2 und GLUT1 festgestellt werden (Fong et al. 2015; Boutz et al. 2011). Aus der miRNA-Seq-1 ging ebenfalls eine Anreicherung von miR-122-5p und miR-451a in oligodendrogialen EVs hervor, aufgrund dessen folgender Fragestellung nachgegangen wurde: *Inwieweit werden phänotypische axonale Anpassungen auf den trophischen Support durch EV-assoziierte miR-122-5p und miR-451a beeinflusst* (1.3.3, S. 18)? Da Oligodendrozyten im Zuge des trophischen Supports die Produkte der Glykolyse – Pyruvat und Laktat – elektrisch aktiven Neuronen zur Verfügung stellen (Fünfschilling et al. 2012; Saab et al. 2016), wäre ein geringerer Bedarf an axonalem PKM2 und GLUT1 vorstellbar.

Die Hypothese „Phänotypische Anpassungen des Axons auf den trophischen Support durch Vesikel assoziierte miRNAs“ (1.3.3, S. 18) wurde unter Verwendung von Ergebnissen (Abbildung 3-1, S. 42) aufgestellt, die höchstwahrscheinlich durch miRNA-kontaminiertes Supplement beeinflusst wurden (Abbildung 3-24, S. 80 und Abbildung 3-8, S. 53). Außerdem konnte die bereits bekannte Reduktion von PKM2 und GLUT1 in prämetastatischen Nischen durch von Brustkrebszellen abgesonderte miR-122-5p (Fong et al. 2015; Boutz et al. 2011) nicht auf pCNs übertragen werden (Abbildung 3-2 B & C, S. 44), obwohl eine miR-122-5p-Mimik-Transfektion zu einer Erhöhung von miR-122-5p in pCNs führte (Abbildung 3-2).

Zusätzlich konnten keine Anstiege der miR-122-5p oder miR-451a in pCNs nach Co-Kultivierung mit pOLs festgestellt werden, sodass auch hier ein EV-basierter miR-122-5p oder -451a Transport nicht intensiver analysiert werden konnte (Abbildung 3-3, S. 45). Auch eine Veränderung des GLUT1- oder des PKM2-Niveaus in pCNs konnte in Co-Kulturen nicht beobachtet werden (Abbildung 3-4, S. 46). Zugleich war über miR-122-5p-Mimik transfizierte pOLs sowohl die Konzentration von miR-122-5p in pCNs nach Co-Kultur nicht erhöht als auch das PKM2- und GLUT1-Niveau in pCNs nicht eindeutig reduziert (Abbildung 3-4, S. 46).

Aufgrund weitreichender Untersuchungen konnte eine miRNA-Verunreinigung in dem Supplement NS21 festgestellt werden, deren Hauptanteil mit ca. 65 % miR-122-5p ausmacht (Abbildung 3-8, S. 53; Abbildung 3-19 A, S. 73; Abbildung 3-20, S. 74 und Abbildung 3-24, S. 80). Außerdem konnten miR-122-5p und miR-451a mittels RT-qPCR nicht detektiert werden, sobald die EV-Proben ohne Supplement generiert wurden (Abbildung 3-10 F, S. 57). Diese Resultate legen nahe, dass miR-122-5p und miR-451a nicht als stark exprimierte miRNAs in oligodendrogialen EVs oder im Gehirn vorkommen. Da miR-122-5p und miR-451a außerdem in Blut (miR-451a) und

Leber (miR-122-5p) beschrieben wurden und primär nicht dem Gehirn zugeordnet werden, fügen sich diese Erkenntnisse in die aktuelle Literatur (Chang et al. 2004; Pritchard et al. 2012).

Zusammenfassend konnte die Erkenntnis gewonnen werden, dass kommerziell erworbene Medium-Zusätze miRNA-Verunreinigungen beinhalten, wodurch Aussagen über biologisch relevante Zusammenhänge erschwert werden.

4.2 Medium beeinflusst geNorm-Resultate stärker als genetischer Hintergrund

Eine weitere biologische Fragestellung, die im Zuge der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollte, umfasst die Beschreibung des EV-miRNA-Profiles von Oligodendrozyten genetisch veränderter Mäuse. Wie bereits erwähnt zeigen $PLP^{-/-}$ und $CNP^{-/-}$ -Modelle neuronale Degeneration bei unversehrter Myelinschicht. Außerdem sind die Proteine PLP und CNP Bestandteile oligodendroglialer EVs und entsprechende Knock-out-Modelle zeigen reduzierten neuronalen Support und reduzierte EV-Sekretion (Krämer-Albers et al. 2007; Frühbeis et al. 2013; Frühbeis et al. 2019). Parallel zu den miRNA-Analysen der wildtypischen pOL-EVs wurden die Ergebnisse mit den miRNA-Profilen der Knock-out-Modelle verglichen. Mögliche Änderungen sollten in Bezug auf die Neurodegeneration der Tiere betrachtet werden. Für die erwähnten Untersuchungen mussten zunächst stabile miRNA-Referenzen ermittelt werden, auf deren Grundlage RT-qPCR-Vergleiche durchgeführt werden konnten. Vorausgehend ist auch hier festzuhalten, dass die Resultate mit miRNA-kontaminiertem NS21 erhoben wurden.

Die geNorm Ergebnisse der RT-qPCR von wildtypischen pOL- und EV-RNA-Proben (Abbildung 3-5, S. 48) können durch die miRNA-Kontamination des NS21 erklärt werden. Aufgrund der miRNA-Kontamination werden die miRNA-Profile der EV-Proben nicht ausschließlich von den pOLs geprägt, sondern ebenfalls durch die miRNAs des NS21 beeinflusst. Der unterschiedliche Einfluss des Supplements auf die RNA-Profile der pOL- und EV-RNA könnte eine Begründung für die hohen geNorm M- ($>0,5$) und V-Werte ($>0,15$) liefern (Abbildung 3-5 A & B). Demnach dürfte keine der überprüften miRNAs für eine Normalisierung in einer RT-qPCR mit pOL- und EV-Proben eingesetzt werden (Vandesompele et al. 2002; Hellemans et al. 2007).

Wenn jedoch ausschließlich EV-Proben für die geNorm-Analyse hinzugezogen wurden, dann liegen die geNorm M ($<0,5$) und V ($<0,15$) Werte für alle getesteten miRNAs unterhalb der kritischen Schwellenwerte, was die Ähnlichkeit der getesteten miRNAs über alle Proben wiedergibt (Abbildung 3-5 C & D). Diese Übereinstimmung der EV-miRNA-Proben verschiedener Genotypen basiert möglicherweise auf den miRNAs, die aufgrund der miRNA-Kontamination des NB21 in die Proben gelangten. Zusätzlich können die getesteten miRNAs (let-7g, miR-181b-5p, miR-148b-3p und miR-30d-5p) in der MKON der miRNA-Seq-2 festgestellt werden (Zusatzdaten; Tabelle 7-8, S. ix). Die schwankenden relativen Expressionen der oligodendroglialen EV-miRNAs (miR-122-5p, miR-144-3p und miR-451a) über vier Replikate von wildtypischen, $PLP^{-/-}$ und

CNP^{-/-}-Mäusen (Abbildung 3-6, S. 49) weisen weiter daraufhin, dass an dieser Stelle nicht alle Versuchsparameter vollends kontrolliert wurden.

Zusammenfassend deuten die Beobachtungen darauf hin, dass das miRNA-kontaminierte Medium geNorm-Resultate stark beeinflusst und mögliche Veränderungen im miRNA-Profil, die durch genetisch veränderte Hintergründe hervorgerufen werden könnten, überdeckt werden. Somit müssten die aktuellen MISEV-Vorgaben für EV-miRNA-Analysen, die sich mit miRNAs aus Zellkultur-isolierten EVs befassen, erweitert werden (Théry et al. 2018). Demnach ist die Verwendung von sogenannten „chemisch definierten“ Supplementen nicht ausreichend für EV-miRNA-Analysen, da diese Medium-Zusätze EV-miRNA-Profile beeinflussen können. Dadurch können anschließende RT-qPCR-Analysen mittels Algorithmus zur Identifizierung stabiler Referenz-miRNAs (z.B. geNorm, Vandesompele et al. 2002 oder Normfinder, Andersen et al. 2004) beeinflusst werden. Aufgrund dessen besteht die Möglichkeit, dass miRNA-Profile aus EV-Proben entscheidend von dem verwendeten Medium verändert werden könnten, wodurch die MISEV- als auch die MIQE-Vorgaben (Théry et al. 2018; Bustin et al. 2009) dahingehend erweitert werden müssten, dass in unkonditioniertem Medium keine miRNAs detektiert werden dürften.

4.3 Bestandteile von „chemisch definierten“ Supplementen verfälschen Resultate von extrazellulären Vesikeln

Durch die Verwendung sogenannter „chemisch definierter“ Supplemente B27 oder NS21 sollte bei den EV-Analysen in der vorliegenden Arbeit die Sicherheit gegeben werden, mit miRNA- und Partikel-freiem Zellkulturmedium zu arbeiten. Somit sollten Kontaminationen mit Vesikeln, Proteinen und RNAs, wie sie für FBS-supplementierte Medien beschrieben sind, umgangen werden (Benz und Moses 1974; Shelke et al. 2014; Wei et al. 2016; Tosar et al. 2017). Der Gebrauch von „chemisch definierten“ Supplementen würde ebenfalls implizieren, dass RNA-Proben aus dem Zellkulturüberstand keinen Einfluss durch fremde miRNAs erhalten würden. Erkenntnisse verschiedener Untersuchungen aus der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass Bestandteile von „chemisch definierten“ Supplementen detaillierte Analysen von extrazellulären Vesikeln maßgeblich beeinflussen können (Abbildung 4-1).

Die ersten Indizien, dass trotz serumfreien Bedingungen eine miRNA-Kontamination im Zellkulturmedium vorhanden war, stützen sich auf die Detektion nicht-muriner miR-1246 aus miRNA-Seq-1 (Tabelle 3-1, S. 50). Da miR-1246 (nach aktueller Literatur) nicht aus den murinen pOLs stammen kann (Wei et al. 2016; Zhang et al. 2011), muss diese miRNA von außen in die Probe gelangt sein. Durch weiterführende Analysen konnte die miRNA-Verunreinigung der Supplemente bestätigt werden, sodass die miR-1246 an dieser Stelle aller Voraussicht nach auch durch das verwendete B27 in die Proben gelangte.

Gezielte qPCR-Analysen bestätigten, dass die Supplemente die miRNA-Kontamination in das Medium tragen und ausschließlich in supplementierten Medien miRNAs im dUZ-Pellet detektiert

werden konnten (Abbildung 3-8, S. 53). Die beschriebene miRNA-Kontamination würde mit dem Identifizieren endogener EV-miRNAs interferieren, da in einem UZ-Pellet aufgrund der hohen Homologie der miRNAs nicht zwischen miRNA-Kontamination und EV-miRNAs unterschieden werden könnte (Abbildung 4-1 A). Erste Versuche, die miRNA-Kontamination mittels UZ (20 h, 100 000 x g) aus dem NS21 zu depletieren, gelangen nicht, da sowohl im Pellet als auch im Überstand miRNAs detektiert werden konnten (Abbildung 3-9 B, S. 53). Jüngste Studien zeigen bezogen auf FBS, dass diese Form der miRNA-Depletion nicht vollständig ist und dass das verwendete Depletions-Protokoll einen hohen Einfluss auf die Depletions-Effizienz hat (Wei et al. 2016; Driedonks et al. 2019). Daher ist es nicht überraschend, dass die UZ-Depletion von NS21 ebenfalls nicht geeignet ist, um miRNA-Kontaminanten aus Supplementen zu entfernen.

Da miR-122-5p sowohl in EV-depletiertem FBS als auch in NS21 stark vertreten ist (Abbildung 3-24 A, S. 80; Wei et al. 2016), könnte miR-122-5p möglicherweise eine Art Kontamination-Indikator einnehmen. Zusätzlich existieren weitere Übereinstimmungen zwischen miRNAs (miR-486, -122, -150, -320, -451a, -92a und -423), die in EV-depletiertem FBS vorkommen (Wei et al., 2016), als EV-angereicht beschrieben wurden (Tosar et al. 2017) und in NS21 detektiert werden konnten (Zusatzdaten; Tabelle 7-8, S. ix). Aufgrund dieser Parallelen der miRNA-Kontamination zwischen FBS und NS21, müssten die von (Tosar et al. 2017) aufgestellten Bedenken über Untersuchungen, die sich mit EV-assoziierten miRNAs beschäftigen und mit EV-depletiertem FBS durchgeführt wurden, auf Studien, die unter Verwendung von „chemisch definierten“ Supplementen aufgestellt wurden, ausgedehnt werden.

Eine weitere EV-Isolationsmethode ist die SEC, bei der die Bestandteile einer Lösung größenbasiert voneinander getrennt werden. Somit könnten mittels SEC möglicherweise kleine Vesikel (Fraktionen 5 und 6 nach Böing et al. 2014; Brahmer et al. 2019) von miRNA-tragenden Proteinen getrennt werden. Da jedoch in den Fraktionen der kleinen Vesikel (5 und 6) alle getesteten miRNAs nachgewiesen werden konnten, kann die miRNA-Kontamination aus NS21 mittels SEC nicht umgangen werden. Des Weiteren stellt die Detektion der miRNAs in den gepoolten Fraktionen 5 und 6 erneut ein Resultat dar, dass mit EV-Ergebnissen interferieren würde (Abbildung 4-1 B; Abbildung 3-9, S. 53). Außerdem konnten sowohl in den Fraktionen der großen Vesikel (1 – 4), als auch in denen der Proteine (7 – 14) miRNAs detektiert werden, was eine Interaktion der miRNAs mit unterschiedlich großen Bestandteilen des NS21 möglich erscheinen lässt und durch unterschiedlich große Proteinkomplexe ausgelöst werden könnte. Durch weiterführende Untersuchungen ungepoolter Fraktionen könnten den ersten Ergebnissen differenziertere Aussagen über die Verteilung der miRNAs folgen.

Zusätzlich zu den miRNA-Kontaminationen in Proben nach typischen EV-Isolationsprotokollen konnten Partikel in Medium-Kontrollen nach UZ detektiert werden. Die NTA-Ergebnisse aus einem Zeitraum von ca. einem Jahr bestätigen die Detektion von Partikeln in Medium-Kontrollen (Abbildung 3-7, S. 51). Eine genauere Betrachtung der Resultate, bei denen die Lot-Nummern

eindeutig den NTA-Messungen zugeordnet werden konnten (Abbildung 3-7 C), stellt die Variabilität der industriell gefertigten Supplemente in Bezug auf Partikel deutlich heraus. Zum einen könnten diese unterschiedlichen Ergebnisse der Qualitätskontrollen fatale Auswirkungen auf die Zellviabilität innerhalb fragiler Zellkultursysteme haben und zum anderen die Ergebnisse von sensiblen Messmethoden verzerren. Demnach sollten stets Qualitätskontrollen in die Versuchsdurchführung integriert werden, jedoch nicht nur bei den Supplementen, sondern auch bei allen weiteren verwendeten Produkten. Die NTA Messungen (Abbildung 3-7 C) demonstrieren außerdem, dass die Partikel durch das NS21 eingebracht werden, da sowohl in dem Basalmedium NeuroMACS als auch in dem verwendete PBS keine Partikel nachgewiesen werden konnten. Die Detektion von Partikeln in serumfreien „chemisch definierten“ Supplementen stellt erneut eine Parallele zu FBS dar (Benz und Moses 1974; Shelke et al. 2014). Des Weiteren sind auch die hier festgestellten Erkenntnisse Resultate, die EV-Ergebnisse beeinflussen würden (Abbildung 4-1 A).

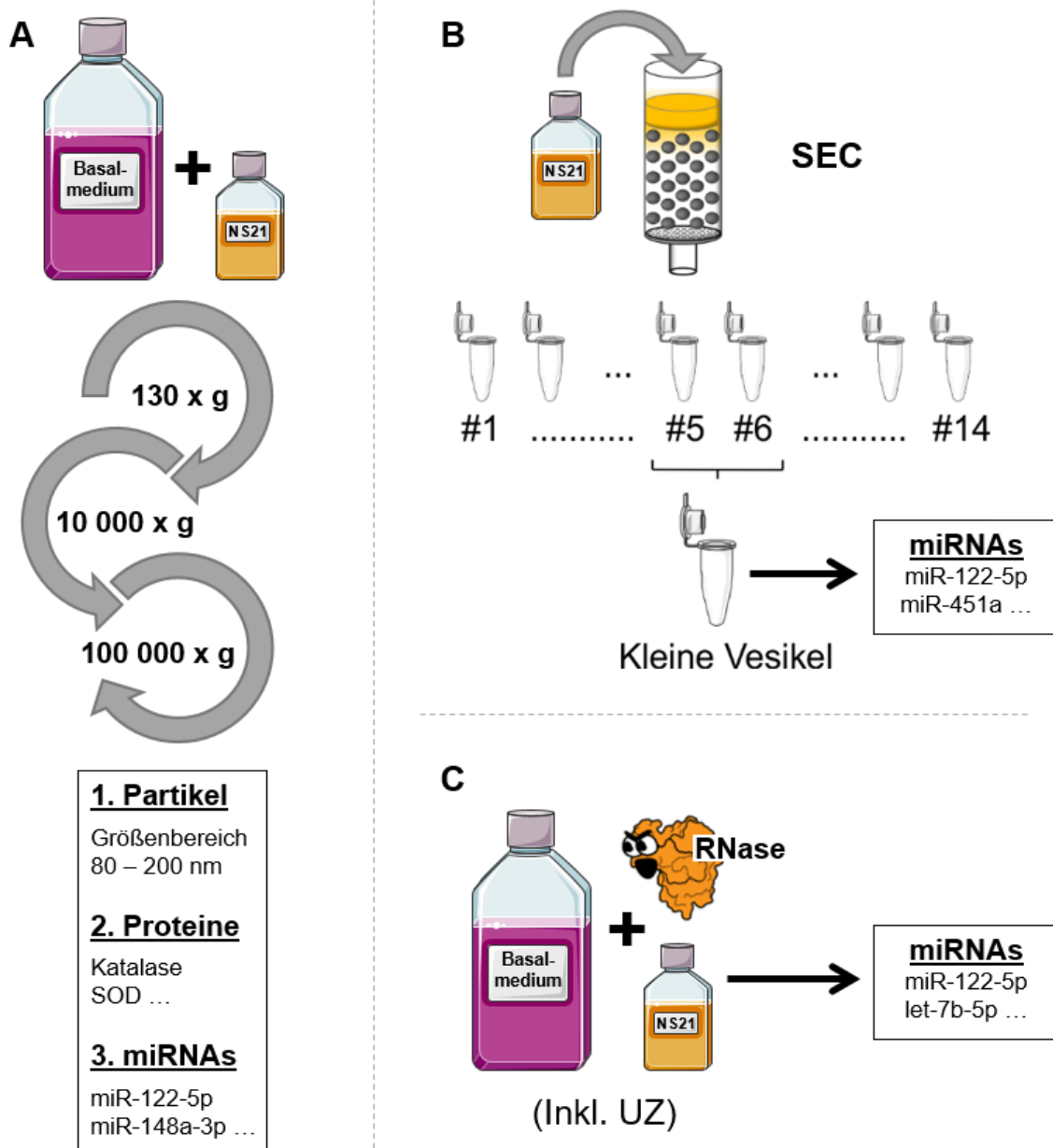


Abbildung 4-1: Zusammenfassende Ergebnisse, die durch Mediumkomponenten bedingt sind und mit Resultaten von extrazellulären Vesikeln interferieren würden. (A) Pellet nach differentieller Ultrazentrifugation (dUZ) von NS21 supplementiertem Basalmedium enthält Partikel, Proteine und miRNAs. (B) Nach Größenausschluss-Chromatographie (SEC) von NS21 können in den Fraktionen der kleinen Vesikel miRNAs detektiert werden. (C) Nach RNase-Behandlung von NS21-supplementiertem Basalmedium sind ca. ¼ der miRNAs vor Degradation geschützt und bleiben detektierbar.

Weitere klassische EV-Behandlungen, bei denen unter Verwendung von Detergenzien und RNase die Assoziation zwischen EVs und RNAs festgestellt werden kann, wurden ebenfalls auf NS21 angewandt. So konnte nach RNase-Verdau weiterhin miR-122-5p detektiert werden (Abbildung 3-9 A, S. 53), was erneut ein Resultat darstellt, welches EV-Ergebnisse verfälschen könnte (Abbildung 4-1 C). Vertiefende Analysen bezüglich der Tragweite des RNase-Schutzes zeigten, dass ca. ein Viertel der miRNAs aus der Medium-Kontrolle vor einem RNase-Verdau

geschützt ist (Abbildung 3-23, S. 77). Jedoch konnte miR-122-5p nach einer zuvor durchgeführten Detergenzien-Behandlung und anschließendem RNase-Verdau weiterhin detektiert werden, was einen Protein-basierten RNase-Schutz möglich erscheinen lässt und durch einen Proteinase-Verdau bestätigt werden müsste.

Erste Anzeichen, dass ein Zusammenhang zwischen miRNA-Kontamination und Proteinen bestehen könnte, können nach der Detektion von Proteinen im UZ-Pellet geschlossen werden. Sowohl SOD als auch KAT konnten in UZ-Pellets nachgewiesen werden (Abbildung 3-10, S. 57), womit ein weiteres Ergebnis dargestellt werden konnte, dass mit EV-Resultaten interferieren und zu falschen Annahmen führen könnte (Abbildung 4-1 A; Abbildung 3-10 A). Aufgrund dieser Resultate müssen auch die in 1.3.2 (S. 16) beschriebenen Erkenntnisse, dass KAT und SOD pOL-EV-assoziiert sind und oxidativ gestresste neuronale Zielzellen positiv beeinflussen können (Fröhlich et al. 2014), überprüft werden.

Zusammenfassend gelang die Identifizierung von fünf Resultaten, die durch NS21 ausgelöst werden und EV-Ergebnisse verfälschen würden. Demnach konnten (1) miRNAs (2. auch nach RNase-Behandlung), (3) Proteine und (4) Partikel in NS21 nach verschiedenen EV-Isolationsprotokollen (auch SEC, 5) detektiert werden (zusammengefasst in Abbildung 4-1).

Die Auswirkungen und Chancen, die die Feststellung der miRNA-kontaminierten Katalase mit sich ziehen, werden im Kapitel 4.5 diskutiert. Die daraus resultierenden weiteren Möglichkeiten, für ein Umgehen der miRNA-Kontamination, werden daraufhin in dem Kapitel 4.6 dargelegt. Zunächst werden jedoch *in silico* Verfahren zur neuronalen Zielgen-Identifizierung nach EV-Behandlung diskutiert, wodurch erneut die Tragweite der miRNA-Kontamination veranschaulicht wird.

4.4 Einordnung von miRNA-Seq-1 und mRNA-Seq nach Aufdeckung der miRNA-Kontamination in Supplementen

Um mögliche Zielgene von EV-miRNAs in Neuronen zu identifizieren, wurden pCNs mit pOL-EVs behandelt. Anschließend wurde das mRNA-Transkriptom der behandelten pCNs mit unbehandelten pCNs verglichen und *in silico* Analysen durchgeführt (Abbildung 3-12, S. 60). Da im Zuge der vorliegenden Arbeit eine miRNA-Kontamination im Supplement B27 entdeckt wurde, ist ein Rückschluss auf EV-assoziierte miRNAs kompliziert. Die Erkenntnisse über die miRNA-Kontamination wurden überwiegend am Supplement NS21 untersucht. Jedoch wurde NS21 basierend auf B27 entwickelt (Chen et al. 2008), wodurch ähnliche Ergebnisse für B27 zu erwarten sind. Da sowohl miRNAs aus dem Supplement als auch EV-assoziierte miRNAs im UZ-Pellet nachweisbar sind, kann aufgrund der hohen Homologie der miRNAs im Nachhinein kein Rückschluss auf den Ursprung (EV oder B27) einer miRNA gezogen werden. Somit könnten mögliche Ziel-Gene in der mRNA-Seq entweder von EV-miRNAs oder durch B27-miRNAs reguliert worden sein.

Außerdem besteht die Möglichkeit, dass pOLs während der EV-Isolations-Periode miRNAs aus dem B27-versetzten Medium aufgenommen und so das miRNA-Profil des Mediums beeinflusst

haben könnten. Somit würden sich die UZ-Pellets für die Behandlung der pCNs zusätzlich darin unterscheiden, dass das B27-miRNA-Profil einmal von pOLs verändert und einmal unverändert gewesen wäre. Demnach hätte auch ein solcher EV-unabhängiger Effekt auf den Zustand der pCNs wirken können, wodurch das Transkriptom hätte verändert werden können. Die in pCNs herunterregulierten mRNAs (Abbildung 3-11, S. 58) können demnach durch angereicherte B27-miRNAs oder durch EV-miRNAs reduziert worden sein (Abbildung 3-12, S. 60).

Da vier getestete miRNAs aus den *in silico* Analysen auch in den Supplementen nachweisbar waren (Abbildung 3-13, S. 61), kann an dieser Stelle kein Zusammenhang zwischen EV-basierten miRNAs und herunterregulierten Zielgenen gezogen werden. Zusätzlich kann im Nachhinein ebenfalls nicht der Grad der miRNA-Kontamination des verwendeten B27 festgestellt werden, da dieser abhängig von Charge variieren könnte.

Aufgrund der erhobenen Ergebnisse konnte erneut verdeutlicht werden, dass mit miRNA-kontaminiertem Supplement keine biologisch relevanten Aussagen (in Bezug auf miRNA Funktionsweisen) untersucht werden können. Weiterführende Analysen konnten Katalase als Träger der miRNA-Kontamination aufdecken, wodurch neue Strategien für die Untersuchung von EV-miRNAs aus Zellkulturen aufgestellt werden konnten.

4.5 „Chemisch definierte“ Supplemente weisen eine durch Katalase verursachte miRNA-Kontamination auf

Wie bereits erwähnt konnten miRNAs in beiden kommerziell erworbenen Supplementen (NS21 (NB21), Miltenyi und B27, Gibco) detektiert werden, wodurch eine individuelle Ursache in der Produktionskette eines Herstellers unwahrscheinlich ist. Eher kann davon ausgegangen werden, dass die miRNA-Kontamination auf eine Komponente aus beiden Produkten zurückzuführen ist. Aufgrund dieses vermuteten globalen Problems wurde systematisch versucht die verunreinigte Komponente zu identifizieren. Hierfür wurden zunächst Komponenten zur Analyse herangezogen, die in Verbindung mit den in NS21 stabil detektierten miR-451a und miR-122-5p stehen könnten (Abbildung 3-8, S. 53 und Abbildung 3-9, S. 53).

Aufgrund der Anreicherung von miR-122-5p in Leber und miR-451a im Blut (Chang et al. 2004; Pritchard et al. 2012), wurden die Proteine KAT und SOD zunächst näher untersucht, da diese Komponenten aus der Leber (KAT) und den Erythrozyten (SOD) gewonnen wurden (Tabelle 2-8, S. 26). In dem UZ-Pellet des selbst hergestellten KAT- und SOD-negativen sm-NS19 konnten keine miRNAs detektiert werden. Nach der Zugabe von KAT und SOD im sm-NS21 wurde miR-122-5p eindeutig nachgewiesen (Abbildung 3-10 B, S. 57). Somit existiert ein Zusammenhang zwischen dem Hinzufügen von SOD und/oder KAT und der Detektion der miR-122-5p in dem UZ-Pellet von supplementiertem Medium.

Schließlich konnte eindeutig gezeigt werden, dass KAT und nicht SOD die miRNA-Kontamination hervorruft, da alle NS21-Komponenten, außer KAT, frei von den untersuchten miRNAs sind (Abbildung 3-10, S. 57). Auf der anderen Seite konnten in allen KATs, die aus tierischem Material gewonnen wurden, miRNA-Kontaminationen festgestellt werden. Zusätzlich weisen die miRNA-Profile der verschiedenen KATs mit einer Art „Fingerabdruck“ auf deren Ursprünge hin. So ist in den aus Leber gewonnenen KATs miR-122-5p angereichert und in der aus Erythrozyten isolierten KAT miR-451a abundant. Außerdem konnte die miRNA-Kontamination bei verschiedenen Herstellern der gleichen KAT (Rinder Leber 1 und 2) detektiert werden, was gegen eine miRNA-Kontaminations-Problematik eines individuellen Herstellers spricht. Einzig die Katalase aus dem Pilz *Aspergillus niger* ist frei von den getesteten miRNAs und könnte somit für eine mögliche Herstellung eines miRNA-freien NS21 herangezogen werden, vorausgesetzt, dass hier auch keine weiteren miRNAs detektiert werden würden. Auch rekombinant in *Escherichia coli* produzierte Katalase (Furuta und Hayashi 1990) könnte für die Herstellung von miRNA-freien Supplementen verwendet werden, solange keine miRNA-Kontamination detektiert werden würde.

Da die RNA-bindenden Eigenschaften von KAT bereits beschrieben sind (Clerch et al. 1996), ist die Bindung von miRNAs an KAT mit biologischer Relevanz denkbar. Ob die miRNA-Kontamination ein Nebenprodukt ist, das beim Isolations-Prozess der KAT mit aufgereinigt wird, oder ob eine biologisch relevante Interaktion zwischen KAT und miRNA vorliegt, müsste mit weiteren Untersuchungen überprüft werden. Hierzu könnten Immunpräzipitationen von Katalasen mit anschließender miRNA-Analyse durchgeführt werden. Würde eine Interaktion zwischen KAT und miRNA bestehen, bliebe weiterhin die Frage offen, ob diese Interaktion die Enzymaktivität der KAT beeinflusst oder ob eine Art Transportmechanismus für die miRNA zugrunde liegt. Da jedoch bei KAT und SOD, die beide aus Erythrozyten isoliert wurden, ausschließlich bei KAT miRNAs detektiert werden konnten (Abbildung 3-10, S. 57), scheinen biologische Hintergründe für eine Interaktion zwischen KAT und miRNA möglich.

Um unter (wahrscheinlich) miRNA-freien Bedingungen arbeiten zu können, wurden pOLs in sm-NS19 supplementiertem Medium kultiviert. Jedoch zeigte sich eine signifikant verringerte metabolische Aktivität im Vergleich zu pOLs, die NS21 supplementiertes Medium zur Verfügung hatten (Abbildung 3-10 C, S. 57). Somit stellen diese Kulturbedingungen keine Lösung für die Kultivierung von pOLs in miRNA-freiem Medium dar. SOD und KAT neutralisieren Sauerstoffradikale, wodurch kultivierte Zellen vor oxidativem Stress geschützt werden (Ighodaro und Akinloye 2018). Durch den Wegfall dieses Schutzes ist eine reduzierte metabolische Aktivität denkbar.

Da sowohl die Verwendung von KAT-freiem sm-NS19 oder UZ-depletieretem NS21 als auch die EV-Isolation mittels SEC keine Alternativen für Analysen von pOL-EV-miRNAs darstellen, mussten weiterführende Strategien für die Untersuchung von pOL-EV-miRNAs entwickelt werden. Hierfür bietet sich die Sequenzierung von parallel gewonnenen RNA-Proben an, bei denen die EV-Isolationsperiode mit und ohne NS21 supplementiertem Medium durchgeführt wurde. Außerdem

ist ein Medium-Abgleich essentiell, um weiterführende EV-miRNA-Analysen durchführen zu können.

4.6 miRNA-Sequenzierung-2: Neuentwickelte miRNA Analyse von extrazellulären Vesikeln durch Mediumsabgleich

Die Grundlage für die vorliegende Arbeit basierte auf der miRNA-Seq-1, deren Resultate, nach dem Beweis der miRNA-Kontamination in B27, nicht weiter zur Bewertung von EV-assoziierten miRNAs herangezogen werden können. Um weiterhin pOL-EV-assoziierte miRNAs analysieren zu können, wurde für eine neue RNA-Sequenzierung (miRNA-Seq-2) ein umfangreiches Probenspektrum aufgestellt (Tabelle 4-1 und Tabelle 2-15, S. 37). Mit dieser umfangreichen Probenzahl inklusive weitreichender Kontrollen, wurden Fragestellungen zu EV-assoziierten miRNAs von verschiedenen Seiten adressiert.

Tabelle 4-1: Proben-Zusammenfassung von miRNA-Sequenzierung-2

Oligodendrozyten	Extrazelluläre Vesikel	Medium-Kontrollen
pOLs+NS21	EVs+NS21	MKON (+NS21)
pOLsØNS21	EVsØNS21	MR (MKON+RNase)
s-pOLsØNS21	SEVsØNS21	

pOLs: primäre Oligodendrozyten; s-pOLs: Stimulierte-pOLs; EVs: Extrazelluläre Vesikel; SEV: Stimulierte EVs; MKON: Medium-Kontrolle;

Auf pOL-Ebene konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden, die auf die verschiedenen Medium-Zusammensetzungen während der EV-Isolationsperiode (mit und ohne NS21) zurückzuführen wären. Es traten keine Veränderungen der Marker im Westernblot-Proteinprofil auf und der Apoptosemarker CC3 war unabhängig vom NS21 nicht zu detektieren (Abbildung 3-15, S. 66). Gleichermäßen sind die miRNA-Profile einzustufen, da die pOL-Proben sowohl in den PCAs gruppieren (Abbildung 3-20, S. 74 und Abbildung 3-22, S. 76) als auch in den Mapping Längensverteilungen eine ähnliche Verteilung der RNA-Klassen zeigen (Abbildung 3-18, S. 73 und Abbildung 3-19, S. 73). Zusätzlich weisen die Bioanalyser-Untersuchungen der pOLs (Abbildung 3-16, S. 69) ähnliche Profile auf und zeigen keine Anzeichen von RNA-Degradierung.

Die Bioanalyser-Profile der EV-RNAs zeigen dagegen Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen auf, jedoch sind die Profile innerhalb einer Gruppe reproduzierbar, was als Indiz für eine stabile Probengenerierung gewertet werden kann (Abbildung 3-16). Durch die Mapping Längensverteilungsprofile intensiviert sich der beobachtete Unterschied zwischen den EV-Proben (Abbildung 3-18 C, E & G, S. 73) und die PCAs zeigen auf miRNA-Ebene eine klare Trennung der drei EV-Proben (Abbildung 3-20, S. 74 und Abbildung 3-21, S. 75). Zwar sind auch die MKON-Proben von den EV+NS21-Proben in der PCA separiert (Abbildung 3-22, S. 76), jedoch zeigen die Top10 miRNAs beider Gruppen vier übereinstimmende miRNAs (miR-122-5p, miR-148a-3p, let-7b-5p und miR-99-5p; Abbildung 3-24, S. 80).

Die Top10 miRNAs der MKON decken ca. 97 % der Reads der MKON ab – in EVs+NS21 umfassen diese zehn miRNAs noch immer ca. 45 % der Reads (Abbildung 3-24 C). Dem gegenüber

stehen 319 miRNAs (cut-off: EVs+NS21-Mittelwert > 10 Reads), die die restlichen ca. 55 % der Reads ausmachen. Durch den beschriebenen Top10-Abzug werden demnach ca. 45 % wahrscheinlich kontaminierende miRNA-Reads abgezogen. Auf der anderen Seite besteht die Möglichkeit, dass nicht alle Reads, die durch den Top10-Abzug ausgeschlossen werden, aus dem Medium stammen. Zusätzlich werden nicht alle kontaminierenden miRNAs aus dem Medium durch die angewandte Top10-Abzugsmethode erfasst, da die restlichen 3 % aus MKON noch 170 verschiedene miRNAs (cut-off: MKON-Mittelwert > 10 Reads) umfassen. Da jedoch die Definition für den Abzug darin bestand, einen Mittelweg zwischen kontaminierender miRNA-Subtraktion und der Darstellung möglicher EV-assoziiertes miRNAs zu finden, wurde keine stringenter Korrektur gewählt.

Durch die Anwendung des Top10-Abzuges (EVs+NS21+korrigiert) konnte eine Annäherung des miRNA-Profiles von EVs+NS21 an das von EVsØNS21 demonstriert werden (Abbildung 3-24 D und E [auch F], S. 80), jedoch bergen beide Versuchsansätze (EVs+NS21+korrigiert und EVsØNS21) ihre Schwächen. Demnach ist auch nach der Korrektur der Grad der miRNA-Kontamination im miRNA-Profil von EV+NS21+korrigiert weiterhin unklar. Auf der anderen Seite wurden die pOLsØNS21 einem Stressfaktor durch die Depletion des Supplements ausgesetzt, dessen Einfluss auf das EV-miRNA-Profil nicht bekannt ist und in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden müsste. Da keine etablierte Methode zur EV-miRNA-Analyse vorhanden ist, wurde in dieser Arbeit versucht das Problem durch verschiedene Herangehensweisen zu lösen, mit dem Bewusstsein, dass beide Strategien (EVs+NS21+korrigiert und EVsØNS21) die erwähnten Schwächen aufweisen. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass nach striktem Top10-Abzug in beiden Konditionen (EVs+NS21+korrigiert und EVsØNS21+korrigiert) die gleichen miRNAs unter den zehn abundantesten miRNAs auftreten. Das entwickelte Korrekturverfahren ermöglicht somit, durch verschiedene Versuchsdurchführungen übereinstimmende Ergebnisse zu erzeugen.

4.7 Analysen über mögliche Sortiermechanismen stellen erhebliche Tragweite der miRNA-Kontamination dar

Um miRNAs zu identifizieren, die möglicherweise über einen Sortiermechanismus innerhalb der Donorzelle in EVs sortiert werden und so vermutlich angereichert in EV-Proben vorkommen, wurden EV- und pOL-Proben mittels DGE analysiert. Durch diese Untersuchung wurde erneut die Tragweite offengelegt, wie Ergebnisse falsch interpretiert werden können, wenn keine Medium-Kontrollen in die Analysen integriert werden. So stellt sich die miR-122-5p mit einem ungefähren Log₂ FC von 9 in EVs+NS21 als in EVs stark hochreguliert dar (Abbildung 3-25, S. 82). In den pOL+NS21-Proben nimmt die miR-122-5p jedoch nur ca. 0,038 % der Reads ein (Tabelle 7-2, S. ii, Zusatzdaten). Bei dieser auftretenden Diskrepanz kann keine Schlussfolgerung gezogen werden, welche die enorme Anreicherung in den EV-Proben bei der gleichzeitig geringen Readzahl in den Donorzellen erklären könnte. Anders ausgedrückt: Wenn miR-122-5p innerhalb der pOLs in EVs (oder ILVs) sortiert werden würde, müsste sie auch in den pOL-Proben stark

detektiert werden. Da das nicht der Fall ist, verstärkt auch diese Beobachtung die bereits dargelegten Ergebnisse zur miRNA-Kontamination im Supplement. Darüber hinaus wird an diesem Beispiel deutlich, dass falsche Schlüsse aus DGE-Analysen gezogen werden können, wenn keine Medium-Kontrollen in die Untersuchungen involviert werden und die DGE-Ergebnisse getrennt von den „absoluten“ pOL- und EV-miRNA-Expressionen betrachtet werden.

Zusätzlich stehen die Werte des Log₂ FCs bei den Top5 miRNAs der EVs+NS21 mit >3 ebenfalls in einer Diskrepanz zu den Top5 miRNAs der EVsØNS21 (log₂ FC <2,8). Das könnte an dem erwähnten Stressfaktor liegen, der durch die NS21-Depletion verursacht wurde. Jedoch sind die fünf miRNAs aus den Top5 EVs+NS21-hochreguliert auch in MKON zu detektieren und weisen in MKON eine höhere Readzahl auf als in EVs+NS21 (Zusatzdaten; Tabelle 7-5, S. vi und Tabelle 7-8, S. ix). Aufgrund der bereits beschriebenen Heterogenität der unterschiedlichen Probenarten kann hier keine eindeutige quantitative Aussage getroffen werden, jedoch deuten die höheren Readzahlen im Medium auf ein starkes Vorkommen der fünf miRNAs in MKON hin. Dadurch liegt die Erklärung näher, dass diese miRNAs durch die miRNA-Kontamination des Supplements in den EV-Proben angereicht sind, als dass diese miRNAs durch den Stressfaktor aufgrund der NS21-Depletion nicht in EVsØNS21 hochreguliert vorkommen. Ebenfalls spricht dafür erneut die geringere Auswirkung des NS21 auf die jeweiligen miRNA-Profile der pOLs, da hier unter den Top5 hochregulierten miRNAs in pOLs drei identisch sind zwischen +NS21 und ØNS21.

Die Relevanz dieser Ergebnisse zeigen Vergleiche mit bereits veröffentlichten Studien: Eine aktuelle Studie, die einen miRNA-Sortiermechanismus auf Basis von miRNA-Sequenzierungsdaten beschreibt ist Shurtleff et al. 2016 (siehe 1.2.2, S. 13). Auch hier wurde die miRNA von Interesse, miR-233-3p, aufgrund einer 72-fachen Anreicherung in EVs (gegenüber Zellen) für weitere Untersuchungen ausgewählt. Bei Betrachtung der Read-Zahlen, der durchgeführten RNA-Sequenzierung, liegen die Reads der zellulären Fraktion bei null. Diese Datenlage ähnelt der zuvor beschriebenen Situation aus der vorliegenden Arbeit. Shurtleff et al. 2016 diskutieren nicht, wie miRNAs in EVs sortiert werden können, ohne in Donorzellen vorzukommen. Weitere miRNAs aus der Studie (miR-451a, miR-144-3p und miR-150-5p) zeigen ähnliche Diskrepanzen zwischen EV- und Zell-Proben. Darauf folgende Studien legen eine miRNA-Kontamination, unter anderem von miR-451a, miR-144-3p, miR-150-5p und miR-223-3p, in EV-depletiertem FBS dar (Tosar et al. 2017; Wei et al. 2016). Auch in der Studie von Shurtleff et al. 2016 wurde solch ein EV-depletierendes FBS verwendet, sodass auch hier die miRNA-Anreicherungen in den EV-Proben ihre Ursache in der miRNA-Kontamination des FBS haben könnten. Zusätzlich konnten, in einer weiteren Studie mit umfangreicher EV-Isolationsmethodik und unter FBS-freien EV-Isolationsbedingungen, miR-223 und miR-144 nicht in EVs detektiert werden (Jeppesen et al. 2019).

4.8 Stimulierte Oligodendrozyten zeigen veränderte miRNA-Profile in extrazellulären Vesikel

Elektrisch aktive Neurone lösen einen Ca^{2+} -Einstrom in Oligodendrozyten aus (Einleitung: 1.3.2, S. 16), der *in vitro* durch Glutamat- und D-Serin-Stimulation imitiert werden kann. In dem Vergleich der DGE der Proben s-pOLs (ØNS21), SEVs (ØNS21), pOLsØNS21 (ØStimulation) und EVsØNS21 (ØStimulation) sind 37 miRNAs (16 pOLs; 21 EVs) nicht von der Stimulation beeinflusst und weitere 37 miRNAs (19 s-pOLs; 18 SEVs) kommen möglicherweise durch die Stimulation in den pOLs oder den EVs angereichert vor (Abbildung 3-26, S. 84). Die NTA- und WB-Resultate weisen bereits auf eine erhöhte Materialmenge in den EVsØNS21ØStimulation-Proben hin, sodass auch die unterschiedlichen EV-Isolationsperioden (SEVs/s-pOLsØNS21: 5 h; EVs/pOLsØNS21: 48 h) Auswirkungen auf die miRNA-Profile haben könnten. Da in den nicht-stimulierten Proben weniger miRNAs reguliert detektiert werden (26 EVs; 26 pOLs), als in den stimulierten Proben (40 SEVs; 35 s-pOLs), könnte die Stimulation per se einen Regulationseffekt haben.

Die herausstechende miR-92b-3p ist zum einen in den pOLsØNS21 (ØStimulation) und in den SEVsØNS21 hoch reguliert. Möglicherweise ist die miR-92b-3p Teil einer EV-Subpopulation, deren Freisetzung durch Stimulation ausgelöst wird. Demnach könnte in den pOLs eine Art Speicher an EVs vorhanden sein, die unter anderem miR-92b-3p beinhalten. Ohne Stimulus würde dieser Speicher der EV-Subpopulation in pOLs verweilen, sodass mehr miR-92b-3p innerhalb der Oligodendrozyten zu detektieren wäre. Durch den Stimulus würde diese EV-Subpopulation freigegeben werden, wodurch die miR-92b-3p Konzentration in der EV-Fraktion steigen und innerhalb der Zellen sinken würde. Diese Beobachtung kann in das aktuelle Konzept der oligodendroglialen EV-Sekretion, die durch elektrisch aktive Neurone ausgelöst wird, integriert werden (Frühbeis et al. 2013; Fröhlich et al. 2014). Da pOL-EVs außerdem einen positiven Effekt auf Neurone haben und elektrisch aktive Neurone zusätzlich einen oligodendroglialen Support genießen, könnte die beschriebene mögliche EV-Subpopulation ein fehlendes „Puzzleteil“ sein, das beide Theorien miteinander verbinden könnte. Eine aktuelle Studie konnte bereits zeigen, dass miR-92b-3p zum einen über astrozytäre EVs zu Neuronen übermittelt werden und zum anderen, dass miR-92b-3p neuroprotektiv wirken können (Xu et al. 2019). Obwohl der neuroprotektive Effekt auch mittels Transfektion von miR-92b-3p-Mimik festgestellt werden konnte, gelang die Entschlüsselung der genauen Signalkaskade innerhalb von Neuronen jedoch noch nicht (Xu et al. 2019). Mögliche Ursachen, die hierzu in Xu et al. 2019 diskutiert werden, könnten unter anderem in der Förderung der Zellproliferation durch die von miR-92b-3p verursachte Inhibierung von Smad7 (*engl.* mothers against decapentaplegic homolog 7) liegen (Zhuang et al. 2016). Außerdem wird eine durch miR-92b-3p ausgelöste Herunterregulierung von PTEN (*engl.* phosphatase and tensin homolog) diskutiert, wodurch eine Aktivierung der PI3K/AKT Signalkaskade hervorgerufen werden könnte (Worby und Dixon 2014; Song et al. 2016; Xu et al. 2017; Li et al. 2013). Des Weiteren kann die Überlegung, dass miR-92b-3p möglicherweise pOL-EV-assoziiert ist, durch die Seq-Daten der

MKON untermauert werden, da miR-92b-3p in der MKON nur ca. 0,002 % der Reads (59 Reads), in SEVsØNS21 jedoch ca. 0,216 % der Reads (1846 Reads), einnimmt. Dennoch muss auch hier berücksichtigt werden, dass die Prozentangaben von zwei verschiedenen Proben-Gruppen nicht direkt miteinander verglichen werden dürfen. Da in SEVsØNS21 jedoch eine höhere Anzahl an unterschiedlichen miRNAs als in MKON detektiert werden konnte, kann den Reads in SEVsØNS21 eine stärkere „Gewichtung“ im Vergleich zu den Reads der MKON zukommen. Demnach ist nicht nur der prozentuale Anteil der Reads von miR-92b-3p in SEVsØNS21 höher, zusätzlich ist ihre „Gewichtung“ stärker aufgrund der höheren Anzahl an miRNAs. Die auftretende Diskrepanz zwischen MKON und SEVs kann also als Indiz gewertet werden, dass miR-92b-3p geringfügig im Medium, sehr wohl aber in der Probe von pOL-EVs nach Stimulation, vorkommt.

Möglicherweise könnten noch weitere EV-assoziierte miRNAs über den Mechanismus „auf Abruf“ freigesetzt werden, deren Erfassung jedoch mit der angewandten Analyse nicht erfolgreich ist. Dieser Fall würde z.B. dann eintreten, wenn die miRNAs auch unabhängig der EV-Subpopulation in Zellen vertreten sind und die EV-Freisetzung ein Gleichgewicht zwischen pOLs und EVs schaffen würde. Dieses Szenario könnte für die 9 miRNAs der Gruppe pOLsØNS21 (ØStimulation) zutreffen. Wenn beispielsweise in einer Zelle eine miRNA zu 50 % mit ILVs assoziiert ist und zu 50 % unabhängig von ILVs in der Zelle vorliegt, dann würden nach einem ILV(EV)-Release in beiden Fraktionen (EVs und Zellen) die gleiche Menge miRNA zu detektieren sein und mit der angewandten Methode wäre keine Regulierung nachweisbar.

5 Fazit - Ausblick

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, ein eventuelles miRNA-Profil oligodendroglialer EVs zu beschreiben und deren mögliche phänotypische Auswirkung auf Zielneurone zu untersuchen. In die Analysen über EVs und deren miRNAs wurden umfangreiche Medium-Kontrollen miteinbezogen, wodurch fünf verschiedene Erkenntnisse aufgedeckt werden konnten, die auf Mediumszusätze zurückzuführen sind und mit EV-Resultaten interferieren würden: So konnten in dUZ-Pellets von supplementiertem Medium Partikel nachgewiesen werden, die in dem Größenbereich von kleinen EVs lagen (1). In vergleichbaren dUZ-Pellets wurden außerdem miRNAs (2) und Proteine (3, KAT und SOD) detektiert. Des Weiteren ließen sich miRNAs nach SEC von NS21 in den Fraktionen der kleinen EVs nachweisen (4). Außerdem ist ca. ein Viertel der miRNAs aus dUZ-Pellets von supplementiertem Medium nach RNase-Behandlung detektierbar (5). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch 20-stündige UZ-Depletion, wie bei FBS (Wei et al. 2016), keine vollständige Eliminierung der miRNA-Kontamination aus NS21 gelang.

Die vorliegende Arbeit demonstriert, dass selbst industriell gefertigte Produkte mit eindeutigen Inhaltsangaben keine Garantie für die Reinheit eines Produkts darstellen. Des Weiteren stellen die Ergebnisse der Arbeit die Bedeutung heraus, dass industriell gefertigte Produkte (wie NS21), die innerhalb von Experimenten Verwendung finden, auch weitreichenden Kontrollen der zu analysierenden Stoffe (z.B. Test auf miRNAs) unterzogen werden müssen. Auf diese Weise konnte in den kommerziell erworbenen und als „chemisch definiert“ beworbenen Produkten, NS21 (als NB21, Miltenyi Biotec) und B27 (Gibco™), genetische Information in Form von miRNAs nachgewiesen werden, die jedoch nicht unter den jeweiligen Inhaltsstoffen gelistet sind. Da NS21 und B27 sowie verschiedene Katalase-Produkte für die Verwendung in sensiblen Zellkulturen entwickelt wurden und an diesen Kulturen häufig Analysen mit hochsensitiven Methoden durchgeführt werden, kann die Kontamination mit miRNAs weitreichende Folgen für Forschungen mit Zellkultur-Techniken haben.

Die erhobenen Ergebnisse ziehen zwingend die Integration von Medium-Kontrollen, unabhängig der Medium-Zusammensetzung, in EV-Studien mit sich. Des Weiteren müssen die Kontrollen in allen Analyseverfahren durchgeführt werden, da mögliche Kontaminationen durch die steigende Sensitivität der Nachweismethoden an unterschiedlichen Punkten der Analysereihe entdeckt werden können. So konnte in der vorliegenden Arbeit die miRNA-Kontamination nicht durch die Analyseverfahren Bioanalyzer oder Nanodrop identifiziert werden, sondern erst mittels RT-qPCR oder NGS. Die weitreichende NGS-Untersuchung deckte die Tragweite der miRNA-Kontamination in NS21 auf, wonach ca. 180 verschiedene miRNAs (cut-off: Mittelwert > 10 Reads) detektiert wurden und ein Großteil der Verunreinigung auf zwei miRNAs (miR-122-5p, ca. 65 % und miR-148a-3p, 21 %) kamen.

Durch die vollumfängliche Integration der Medium-Kontrolle (MKON) in die vollständige miRNA-Seq-2 Analyse konnte ein erster Schritt zur Etablierung eines Korrektur-Verfahrens für

einen bioinformatik-basierten Abzug der kontaminierenden miRNAs getätigt werden. Da die Korrektur die Kontamination jedoch nicht vollends eliminieren kann, wurde versucht die Problematik auch durch ein Weglassen des NS21 während der EV-Isolation zu umgehen. Beide Herangehensweisen (Korrektur durch Top10-Abzug und Depletion des NS21) zeigen übereinstimmende Resultate, wodurch deren Aussagen gegenseitig bekräftigt werden.

Weitreichende Auswirkungen hat die Entdeckung der miRNA-Kontamination in Katalase (und dementsprechend auch in chemisch definierten Supplementen mit Katalase) insbesondere für das EV-Forschungsfeld, jedoch können auch andere Gebiete, die auf Zellkulturen angewiesen sind, davon betroffen sein. 1989 wurde erstmals ein chemisch definiertes Medium mit der Katalase C40 für die Kultivierung neuronaler Zellen entwickelt (Brewer und Cotman 1989). In der vorliegenden Arbeit konnten miRNA-Kontaminationen in C40 nachgewiesen werden, sodass diese miRNA-Kontamination in neuronalen Zellkulturen über 30 Jahre unentdeckt blieb. Die Anzahl der Resultate, die aufgrund der hier aufgedeckten miRNA-Kontamination überprüft werden müssten, kann nur erahnt werden.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit zur Detektion von miRNAs in Katalase-Produkten, entstehen neue Fragestellungen im Zusammenhang zwischen miRNA und Katalase, wodurch die hier gewonnenen Erkenntnisse auch das Forschungsgebiet über extrazelluläre RNA beeinflussen könnten. Zunächst müsste jedoch geklärt werden, ob die Korrelation von miRNA und Katalase auf einer biologischen Funktion basiert oder ob die miRNA bei der Aufreinigung der Katalase aus Leber oder Erythrozyten co-isoliert wird. Hierzu könnte Katalase zunächst mittels Immunpräzipitation aus verschiedenen Flüssigkeiten (z.B. Blut) oder Geweben (Organ- oder Zelllysate) aufgereinigt und anschließend auf miRNAs überprüft werden. Zusätzlich könnten bildgebende Methoden Aufschluss über die Struktur der Katalase inklusive miRNA bringen und eine mögliche Interaktion dieser Moleküle identifizieren. Sollte die Interaktion zwischen miRNA und Katalase bestätigt werden, bleibt weiterhin die Frage offen, ob die miRNA die Katalase-Aktivität beeinflusst oder ob die Katalase neben der bekannten Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser auch eine Funktion als miRNA-Transport hat. Sollte die gezielte miRNA-Bindung von Katalase bestätigt werden, würde der Katalase als miRNA-Bindeprotein in verschiedenen Forschungsfeldern erhöhte Aufmerksamkeit zukommen.

Um an Information über EV-assoziierte miRNAs zu gelangen, müssen bereits bekannte Analyseverfahren verbessert und neue Methoden entwickelt werden. Hier könnten EV-Subpopulationen über antikörpermarkierte Beads isoliert und anschließend die miRNA analysiert werden. Somit wäre die EV-Isolierung zielgerichteter, wodurch der Einfluss der Kontaminationen abnehmen könnte. Mittels sogenannter Image-Stream Technologie können bereits einzel-EV-Analysen durchgeführt werden – Weiterentwicklungen auf diesem Gebiet könnten in Zukunft möglicherweise ebenfalls für das Sortieren von EV-Subpopulationen herangezogen werden.

Ein ähnlicher Effekt würde durch das Analyseverfahren ExoView® der Firma NanoView erlangt werden. Bei diesem Verfahren können EVs über Antikörper, die auf einem Chip aufgetragen wurden, aufgereinigt werden. Anschließend können weitere Proteinfärbungen an den EVs durchgeführt werden und zusätzlich kann die RNA der EVs isoliert werden. So könnten z.B. pOL-EVs über CD63-Antikörper auf einem Chip isoliert und in einem weiteren Schritt eine PLP-Färbung der EVs durchgeführt werden. Anschließende miRNA-Isolierungen und -Untersuchungen wären somit von CD63- und PLP-positiven EVs. Auch hier sollte eine durch Katalase ausgelöste miRNA-Kontamination des Mediums geringe Auswirkungen haben, solange keine Aggregatsbildung zwischen EVs, Katalase, CD63 und miRNAs eingetreten ist. Auch Kombinationen von EV-Isolationsverfahren (z.B. SEC, Ultrafiltration, Gradienten UZ), ähnlich wie es bei Jeppesen et al. 2019 und Brahmer et al. 2019 vorgenommen wurde, könnten definiertere EV-Proben erzeugen und die Auswirkungen von kontaminierenden Proteinen oder miRNAs minimieren. Wobei auch hier umfangreiche Medium-Kontrollen essentiell wären.

Eine andere Herangehensweise wäre die Entwicklung miRNA-freier Supplemente, was einen großen Fortschritt für die miRNA-Analysen in Zellkultur-Modellen bedeuten würde. Für solche Supplemente müssten miRNA-freie Katalasen verwendet werden. Hierfür wäre die Katalase aus dem Pilz *Aspergillus niger* vielversprechend, jedoch könnte die Katalase auch rekombinant aus Bakterien oder Hefen gewonnen werden.

Durch die vorliegende Arbeit konnten zwei wichtige Punkte herausgearbeitet werden, die zu den bereits bestehenden Standards für das Arbeiten mit EVs aus Zellkulturen mit aufgenommen werden sollten:

1. Die Verwendung von sogenannten „chemisch definierten“ Supplementen in Zellkultur ist ungenügend für Analysen von EV assoziierten miRNAs. Damit geht einher, dass Serumfreie Bedingungen nicht weiter als Standard für EV-miRNA-Untersuchungen ausreichend sind, solange „chemisch definierte“ Supplemente Verwendung finden.
2. Unkonditionierte Kontrollen müssen ausnahmslos und vollumfänglich in die Analyseverfahren integriert werden.

Des Weiteren müssen Aussagen von Studien, die unter der Verwendung von NS21 oder ähnlichen Medium-Zusätzen erhoben wurden, überprüft werden. Überwiegend wären hiervon Resultate bzgl. miRNAs betroffen, aber auch Erkenntnisse über mögliche EV-assoziierte Proteine müssten erneut kontrolliert werden. Hierfür müssen jedoch nicht möglicherweise fehlende Kontrollen stupide nachgeholt werden – im Gegenteil können durch die erwähnten modernen Methoden bereits erhobene Ergebnisse überprüft und neue Erkenntnisse gezogen werden.

6 Literaturverzeichnis

Al-Nedawi, Khalid; Meehan, Brian; Micallef, Johann; Lhotak, Vladimir; May, Linda; Guha, Abhijit; Rak, Janusz (2008): Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. In: *Nature cell biology* 10 (5), S. 619–624. DOI: 10.1038/ncb1725.

Alvarez-Erviti, Lydia; Seow, Yiqi; Yin, Haifang; Betts, Corinne; Lakhali, Samira; Wood, Matthew J. A. (2011): Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. In: *Nature biotechnology* 29 (4), S. 341–345. DOI: 10.1038/nbt.1807.

Andersen, Claus Lindbjerg; Jensen, Jens Ledet; Ørntoft, Torben Falck (2004): Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. In: *Cancer research* 64 (15), S. 5245–5250. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.

Andreu, Zoraida; Yáñez-Mó, María (2014): Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 442. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00442.

Auber, Martin; Fröhlich, Dominik; Drechsel, Oliver; Karaulanov, Emil; Krämer-Albers, Eva-Maria (2019): Serum-free media supplements carry miRNAs that co-purify with extracellular vesicles. In: *Journal of extracellular vesicles* 8 (1), S. 1656042. DOI: 10.1080/20013078.2019.1656042.

Baietti, Maria Francesca; Zhang, Zhe; Mortier, Eva; Melchior, Aurélie; Degeest, Gisèle; Geeraerts, Annelies et al. (2012): Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. In: *Nature cell biology* 14 (7), S. 677–685. DOI: 10.1038/ncb2502.

Beer, Katharina B.; Rivas-Castillo, Jennifer; Kuhn, Kenneth; Fazeli, Gholamreza; Karmann, Birgit; Nance, Jeremy F. et al. (2018): Extracellular vesicle budding is inhibited by redundant regulators of TAT-5 flippase localization and phospholipid asymmetry. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (6), E1127-E1136. DOI: 10.1073/pnas.1714085115.

Benz, Edmund W.; Moses, Harold L. (1974): Small, virus-like particles detected in bovine sera by electron microscopy. In: *Journal of the National Cancer Institute* 52 (6), S. 1931–1934. DOI: 10.1093/jnci/52.6.1931.

Böing, Anita N.; van der Pol, Edwin; Grootemaat, Anita E.; Coumans, Frank A. W.; Sturk, Auguste; Nieuwland, Rienk (2014): Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. In: *Journal of extracellular vesicles* 3. DOI: 10.3402/jev.v3.23430.

Boutz, Daniel R.; Collins, Patrick J.; Suresh, Uthra; Lu, Mingzhu; Ramírez, Cristina M.; Fernández-Hernando, Carlos et al. (2011): Two-tiered approach identifies a network of cancer and liver disease-related genes regulated by miR-122. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (20), S. 18066–18078. DOI: 10.1074/jbc.M110.196451.

- Brahmer, Alexandra; Neuberger, Elmo; Esch-Heisser, Leona; Haller, Nils; Jorgensen, Malene Moeller; Baek, Rikke et al. (2019): Platelets, endothelial cells and leukocytes contribute to the exercise-triggered release of extracellular vesicles into the circulation. In: *Journal of extracellular vesicles* 8 (1), S. 1615820. DOI: 10.1080/20013078.2019.1615820.
- Brewer, Gregory J.; Cotman, Carl W. (1989): Survival and growth of hippocampal neurons in defined medium at low density: advantages of a sandwich culture technique or low oxygen. In: *Brain research* 494 (1), S. 65–74. DOI: 10.1016/0006-8993(89)90144-3.
- Burge, Sarah W.; Daub, Jennifer; Eberhardt, Ruth; Tate, John; Barquist, Lars; Nawrocki, Eric P. et al. (2013): Rfam 11.0: 10 years of RNA families. In: *Nucleic acids research* 41 (Database issue), D226-32. DOI: 10.1093/nar/gks1005.
- Buschmann, Dominik; Kirchner, Benedikt; Hermann, Stefanie; Märte, Melanie; Wurmser, Christine; Brandes, Florian et al. (2018): Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing. In: *Journal of extracellular vesicles* 7 (1), S. 1481321. DOI: 10.1080/20013078.2018.1481321.
- Buschow, Sonja I.; Nolte-'t Hoen, Esther N. M.; van Niel, Guillaume; Pols, Maaïke S.; Broeke, Toine ten; Lauwen, Marjolein et al. (2009): MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 10 (10), S. 1528–1542. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x.
- Bustin, Stephen A.; Benes, Vladimir; Garson, Jeremy A.; Hellems, Jan; Huggett, Jim; Kubista, Mikael et al. (2009): The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. In: *Clinical chemistry* 55 (4), S. 611–622. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.
- Chairoungdua, Arthit; Smith, Danielle L.; Pochard, Pierre; Hull, Michael; Caplan, Michael J. (2010): Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. In: *The Journal of cell biology* 190 (6), S. 1079–1091. DOI: 10.1083/jcb.201002049.
- Chang, Jinhong; Nicolas, Emmanuelle; Marks, Debora; Sander, Chris; Lerro, Anthony; Buendia, Marie Annick et al. (2004): miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. In: *RNA biology* 1 (2), S. 106–113. DOI: 10.4161/rna.1.2.1066.
- Chen, Yucui; Stevens, Beth; Chang, Jufang; Milbrandt, Jeffrey; Barres, Ben A.; Hell, Johannes W. (2008): NS21: re-defined and modified supplement B27 for neuronal cultures. In: *Journal of neuroscience methods* 171 (2), S. 239–247. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2008.03.013.

- Chevillet, John R.; Kang, Qing; Ruf, Ingrid K.; Briggs, Hilary A.; Vojtech, Lucia N.; Hughes, Sean M. et al. (2014): Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (41), S. 14888–14893. DOI: 10.1073/pnas.1408301111.
- Clerch, Linda B.; Wright, Angelique; Massaro, Donald (1996): Dinucleotide-binding site of bovine liver catalase mimics a catalase mRNA-binding protein domain. In: *The American journal of physiology* 270 (5 Pt 1), L790-4. DOI: 10.1152/ajplung.1996.270.5.L790.
- Colombo, Marina; Raposo, Graça; Théry, Clotilde (2014): Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. In: *Annual review of cell and developmental biology* 30, S. 255–289. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
- Crescitelli, Rossella; Lässer, Cecilia; Szabó, Tamas G.; Kittel, Agnes; Eldh, Maria; Dianzani, Irma et al. (2013): Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. In: *Journal of extracellular vesicles* 2. DOI: 10.3402/jev.v2i0.20677.
- Dragovic, Rebecca A.; Gardiner, Christopher; Brooks, Alexandra S.; Tannetta, Dionne S.; Ferguson, David J. P.; Hole, Patrick et al. (2011): Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. In: *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 7 (6), S. 780–788. DOI: 10.1016/j.nano.2011.04.003.
- Driedonks, Tom A. P.; Nijen Twilhaar, Maarten K.; Nolte-'t Hoen, Esther N. M. (2019): Technical approaches to reduce interference of Fetal calf serum derived RNA in the analysis of extracellular vesicle RNA from cultured cells. In: *Journal of extracellular vesicles* 8 (1), S. 1552059. DOI: 10.1080/20013078.2018.1552059.
- Eitan, Erez; Zhang, Shi; Witwer, Kenneth W.; Mattson, Mark P. (2015): Extracellular vesicle-depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth. In: *Journal of extracellular vesicles* 4, S. 26373. DOI: 10.3402/jev.v4.26373.
- Elmore, Susan (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. In: *Toxicologic pathology* 35 (4), S. 495–516. DOI: 10.1080/01926230701320337.
- Fabio Bianco; Cristiana Perrotta; Luisa Novellino; Maura Francolini; Loredana Riganti; Elisabetta Menna et al.: Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells.
- Filipowicz, Witold; Bhattacharyya, Suvendra N.; Sonenberg, Nahum (2008): Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? In: *Nature reviews. Genetics* 9 (2), S. 102–114. DOI: 10.1038/nrg2290.

- Fong, Miranda Y.; Zhou, Weiyang; Liu, Liang; Alontaga, Aileen Y.; Chandra, Manasa; Ashby, Jonathan et al. (2015): Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. In: *Nature cell biology* 17 (2), S. 183–194. DOI: 10.1038/ncb3094.
- Friedman, Robin C.; Farh, Kyle Kai-How; Burge, Christopher B.; Bartel, David P. (2009): Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. In: *Genome research* 19 (1), S. 92–105. DOI: 10.1101/gr.082701.108.
- Fröhlich, Dominik; Kuo, Wen Ping; Frühbeis, Carsten; Sun, Jyh-Jang; Zehendner, Christoph M.; Luhmann, Heiko J. et al. (2014): Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons: impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 369 (1652). DOI: 10.1098/rstb.2013.0510.
- Frühbeis, Carsten; Fröhlich, Dominik; Kuo, Wen Ping; Amphornrat, Jesa; Thilemann, Sebastian; Saab, Aiman S. et al. (2013): Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. In: *PLoS biology* 11 (7), e1001604. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001604.
- Frühbeis, Carsten; Kuo-Elsner, Wen Ping; Barth, Kerstin; Peris, Leticia; Tenzer, Stefan; Möbius, Wiebke et al. (2019): Oligodendrocyte-derived exosomes promote axonal transport and axonal long-term maintenance (41).
- Fünfschilling, Ursula; Supplie, Lotti M.; Mahad, Don; Boretius, Susann; Saab, Aiman S.; Edgar, Julia et al. (2012): Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. In: *Nature* 485 (7399), S. 517–521. DOI: 10.1038/nature11007.
- Furuta, Shuichi; Hayashi, Hiroaki (1990): Purification and properties of recombinant rat catalase produced in *Escherichia coli*. In: *Journal of biochemistry* 107 (5), S. 708–713. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123113.
- Goñi, Félix M.; Alonso, Alicia (2009): Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure. In: *Biochimica et biophysica acta* 1788 (1), S. 169–177. DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.09.002.
- Görgens, André; Bremer, Michel; Ferrer-Tur, Rita; Murke, Florian; Tertel, Tobias; Horn, Peter A. et al. (2019): Optimisation of imaging flow cytometry for the analysis of single extracellular vesicles by using fluorescence-tagged vesicles as biological reference material. In: *Journal of extracellular vesicles* 8 (1), S. 1587567. DOI: 10.1080/20013078.2019.1587567.
- Griffiths, Ian.; Klugmann, Matthias; Anderson, Thomas; Yool, Donald; Thomson, Christine; Schwab, Markus H. et al. (1998): Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major

- proteolipid of myelin. In: *Science (New York, N.Y.)* 280 (5369), S. 1610–1613. DOI: 10.1126/science.280.5369.1610.
- Gstraunthaler, Gerhard; Lindl, Toni (2013): Zell- und Gewebekultur. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Guo, Hongbao; Nan, Yang; Zhen, Yingwei; Zhang, Yahui; Guo, Liyun; Yu, Kai et al. (2016): miRNA-451 inhibits glioma cell proliferation and invasion by downregulating glucose transporter 1. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37 (10), S. 13751–13761. DOI: 10.1007/s13277-016-5219-3.
- Ha, Minju; Kim, V. Narry (2014): Regulation of microRNA biogenesis. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 15 (8), S. 509–524. DOI: 10.1038/nrm3838.
- Hanson, Phyllis I.; Cashikar, Anil (2012): Multivesicular body morphogenesis. In: *Annual review of cell and developmental biology* 28, S. 337–362. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154152.
- Harding, Clifford; Heuser, John; Stahl, Philip (1983): Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. In: *The Journal of cell biology* 97 (2), S. 329–339. DOI: 10.1083/jcb.97.2.329.
- Hellemans, Jan; Mortier, Geert; Paepe, Anne de; Speleman, Frank; Vandesompele, Jo (2007): qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. In: *Genome biology* 8 (2), R19. DOI: 10.1186/gb-2007-8-2-r19.
- Henne, William M.; Buchkovich, Nicholas J.; Emr, Scott D. (2011): The ESCRT pathway. In: *Developmental cell* 21 (1), S. 77–91. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.05.015.
- Hill, Andrew F.; Pegtel, D. Michiel; Lambertz, Ulrike; Leonardi, Tommaso; O'Driscoll, Lorraine; Pluchino, Stefano et al. (2013): ISEV position paper: extracellular vesicle RNA analysis and bioinformatics. In: *Journal of extracellular vesicles* 2. DOI: 10.3402/jev.v2i0.22859.
- Ighodaro, O. M.; Akinloye, O. A. (2018): First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. In: *Alexandria Journal of Medicine* 54 (4), S. 287–293. DOI: 10.1016/j.ajme.2017.09.001.
- Jamaly, Simin; Ramberg, Cathrine; Olsen, Randi; Latysheva, Nadezhda; Webster, Paul; Sovershaev, Timofey et al. (2018): Impact of preanalytical conditions on plasma concentration and size distribution of extracellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 17216. DOI: 10.1038/s41598-018-35401-8.

- Jeppesen, Dennis K.; Fenix, Aidan M.; Franklin, Jeffrey L.; Higginbotham, James N.; Zhang, Qin; Zimmerman, Lisa J. et al. (2019): Reassessment of Exosome Composition. In: *Cell* 177 (2), 428-445.e18. DOI: 10.1016/j.cell.2019.02.029.
- Kajimoto, Taketoshi; Okada, Taro; Miya, Satoshi; Zhang, Lifang; Nakamura, Shun-ichi (2013): Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. In: *Nature communications* 4, S. 2712. DOI: 10.1038/ncomms3712.
- Karpman, Diana; Ståhl, Anne-Lie; Arvidsson, Ida (2017): Extracellular vesicles in renal disease. In: *Nature reviews. Nephrology* 13 (9), S. 545–562. DOI: 10.1038/nrneph.2017.98.
- Katzmann, David J.; Odorizzi, Greg; Emr, Scott D. (2002): Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 3 (12), S. 893–905. DOI: 10.1038/nrm973.
- Kim, Dae-Kyum; Kang, Byeongsoo; Kim, Oh Youn; Choi, Dong-Sic; Lee, Jaewook; Kim, Sae Rom et al. (2013): EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. In: *Journal of extracellular vesicles* 2. DOI: 10.3402/jev.v2i0.20384.
- Kim, Kyoung Mi; Abdelmohsen, Kotb; Mustapic, Maja; Kapogiannis, Dimitrios; Gorospe, Myriam (2017): RNA in extracellular vesicles. In: *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 8 (4). DOI: 10.1002/wrna.1413.
- Koliha, Nina; Wiencek, Yvonne; Heider, Ute; Jüngst, Christian; Kladt, Nikolay; Krauthäuser, Susanne et al. (2016): A novel multiplex bead-based platform highlights the diversity of extracellular vesicles. In: *Journal of extracellular vesicles* 5, S. 29975. DOI: 10.3402/jev.v5.29975.
- Kong, Yong (2011): Btrim: a fast, lightweight adapter and quality trimming program for next-generation sequencing technologies. In: *Genomics* 98 (2), S. 152–153. DOI: 10.1016/j.ygeno.2011.05.009.
- Koppers-Lalic, Danijela; Hackenberg, Michael; Bijnsdorp, Irene V.; van Eijndhoven, Monique A. J.; Sadek, Payman; Sie, Daud et al. (2014): Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. In: *Cell reports* 8 (6), S. 1649–1658. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.08.027.
- Kornilov, Roman; Puhka, Maija; Mannerström, Bettina; Hiidenmaa, Hanna; Peltoniemi, Hilikka; Siljander, Pia et al. (2018): Efficient ultrafiltration-based protocol to deplete extracellular vesicles from fetal bovine serum. In: *Journal of extracellular vesicles* 7 (1), S. 1422674. DOI: 10.1080/20013078.2017.1422674.
- Kosaka, Nobuyoshi; Iguchi, Haruhisa; Hagiwara, Keitaro; Yoshioka, Yusuke; Takeshita, Fumitaka; Ochiya, Takahiro (2013): Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal

- transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (15), S. 10849–10859. DOI: 10.1074/jbc.M112.446831.
- Kosaka, Nobuyoshi; Iguchi, Haruhisa; Yoshioka, Yusuke; Takeshita, Fumitaka; Matsuki, Yasushi; Ochiya, Takahiro (2010): Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (23), S. 17442–17452. DOI: 10.1074/jbc.M110.107821.
- Koumangoye, Rainelli B.; Sakwe, Amos M.; Goodwin, J. Shawn; Patel, Tina; Ochieng, Josiah (2011): Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading. In: *PLoS one* 6 (9), e24234. DOI: 10.1371/journal.pone.0024234.
- Kowal, Joanna; Arras, Guillaume; Colombo, Marina; Jouve, Mabel; Morath, Jakob Paul; Prindal-Bengtson, Bjarke et al. (2016): Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (8), E968-77. DOI: 10.1073/pnas.1521230113.
- Kowal, Joanna; Tkach, Mercedes; Théry, Clotilde (2014): Biogenesis and secretion of exosomes. In: *Current opinion in cell biology* 29, S. 116–125. DOI: 10.1016/j.ccb.2014.05.004.
- Krämer, Eva-Maria; Koch, Thomas; Niehaus, Antje; Trotter, Jacqueline (1997): Oligodendrocytes direct glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins to the myelin sheath in glycosphingolipid-rich complexes. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (14), S. 8937–8945. DOI: 10.1074/jbc.272.14.8937.
- Krämer-Albers, Eva-Maria; Bretz, Niko; Tenzer, Stefan; Winterstein, Christine; Möbius, Wiebke; Berger, Hendrik et al. (2007): Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? In: *Proteomics. Clinical applications* 1 (11), S. 1446–1461. DOI: 10.1002/prca.200700522.
- Langmead, Ben; Trapnell, Cole; Pop, Mihai; Salzberg, Steven L. (2009): Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. In: *Genome biology* 10 (3), R25. DOI: 10.1186/gb-2009-10-3-r25.
- Lappe-Siefke, Corinna; Goebbels, Sandra; Gravel, Michel; Nicksch, Eva; Lee, John; Braun, Peter E. et al. (2003): Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. In: *Nature genetics* 33 (3), S. 366–374. DOI: 10.1038/ng1095.
- Larios, Jorge; Mercier, Vincent; Roux, Aurélien; Gruenberg, Jean (2020): ALIX- and ESCRT-III-dependent sorting of tetraspanins to exosomes. In: *The Journal of cell biology* 219 (3). DOI: 10.1083/jcb.201904113.

- Lee, Youngjin; Morrison, Brett M.; Li, Yun; Lengacher, Sylvain; Farah, Mohamed H.; Hoffman, Paul N. et al. (2012): Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. In: *Nature* 487 (7408), S. 443–448. DOI: 10.1038/nature11314.
- Lehrich, Brandon M.; Liang, Yaxuan; Khosravi, Pooya; Federoff, Howard J.; Fiandaca, Massimo S. (2018): Fetal Bovine Serum-Derived Extracellular Vesicles Persist within Vesicle-Depleted Culture Media. In: *International journal of molecular sciences* 19 (11). DOI: 10.3390/ijms19113538.
- Li, B.; Antonyak, M. A.; Zhang, J.; Cerione, R. A. (2012): RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells. In: *Oncogene* 31 (45), S. 4740–4749. DOI: 10.1038/onc.2011.636.
- Li, Yan; Li, Li; Guan, Yan; Liu, Xiuju; Meng, Qingyong; Guo, Qisen (2013): MiR-92b regulates the cell growth, cisplatin chemosensitivity of A549 non small cell lung cancer cell line and target PTEN. In: *Biochemical and biophysical research communications* 440 (4), S. 604–610. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.09.111.
- Llorente, Alicia; Skotland, Tore; Sylvänne, Tuulia; Kauhanen, Dimple; Róg, Tomasz; Orłowski, Adam et al. (2013): Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. In: *Biochimica et biophysica acta* 1831 (7), S. 1302–1309. DOI: 10.1016/j.bbailip.2013.04.011.
- Lobb, Richard J.; Becker, Melanie; Wen, Shu Wen; Wong, Christina S. F.; Wiegmans, Adrian P.; Leimgruber, Antoine; Möller, Andreas (2015): Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. In: *Journal of extracellular vesicles* 4, S. 27031. DOI: 10.3402/jev.v4.27031.
- Lötvall, Jan; Hill, Andrew F.; Hochberg, Fred; Buzás, Edit I.; Di Vizio, Dolores; Gardiner, Christopher et al. (2014): Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. In: *Journal of extracellular vesicles* 3, S. 26913. DOI: 10.3402/jev.v3.26913.
- Melo, Sonia A.; Luecke, Linda B.; Kahlert, Christoph; Fernandez, Agustin F.; Gammon, Seth T.; Kaye, Judith et al. (2015): Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. In: *Nature* 523 (7559), S. 177–182. DOI: 10.1038/nature14581.
- Miebach, Kerstin (2019): Genetic models to study extracellular vesicle transfer in the brain. Dissertation, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz.
- Migliano, Simona M.; Teis, David (2018): ESCRT and Membrane Protein Ubiquitination. In: *Progress in molecular and subcellular biology* 57, S. 107–135. DOI: 10.1007/978-3-319-96704-2_4.
- Montecalvo, Angela; Larregina, Adriana T.; Shufesky, William J.; Stolz, Donna Beer; Sullivan, Mara L. G.; Karlsson, Jenny M. et al. (2012): Mechanism of transfer of functional microRNAs

- between mouse dendritic cells via exosomes. In: *Blood* 119 (3), S. 756–766. DOI: 10.1182/blood-2011-02-338004.
- Morelli, Adrian E.; Larregina, Adriana T.; Shufesky, William J.; Sullivan, Mara L. G.; Stolz, Donna Beer; Papworth, Glenn D. et al. (2004): Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. In: *Blood* 104 (10), S. 3257–3266. DOI: 10.1182/blood-2004-03-0824.
- Mulcahy, Laura Ann; Pink, Ryan Charles; Carter, David Raul Francisco (2014): Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. In: *Journal of extracellular vesicles* 3. DOI: 10.3402/jev.v3.24641.
- Nagarajah, Sivappriyan (2016): Exosome Secretion - More Than Simple Waste Disposal? Implications for Physiology, Diagnostics and Therapeutics. In: *Journal of circulating biomarkers* 5, S. 7. DOI: 10.5772/62975.
- Nakai, Wataru; Yoshida, Takeshi; Diez, Diego; Miyatake, Yuji; Nishibu, Takahiro; Imawaka, Naoko et al. (2016): A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles. In: *Scientific reports* 6, S. 33935. DOI: 10.1038/srep33935.
- Nave, Klaus-Armin (2010): Myelination and support of axonal integrity by glia. In: *Nature* 468 (7321), S. 244–252. DOI: 10.1038/nature09614.
- Nolan, John P.; Duggan, Erika (2018): Analysis of Individual Extracellular Vesicles by Flow Cytometry. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1678, S. 79–92. DOI: 10.1007/978-1-4939-7346-0_5.
- Nolte-'t Hoen, Esther N. M.; Buermans, Henk P. J.; Waasdorp, Maaïke; Stoorvogel, Willem; Wauben, Marca H. M.; Hoen, Peter A. C. 't (2012): Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. In: *Nucleic acids research* 40 (18), S. 9272–9285. DOI: 10.1093/nar/gks658.
- Pan, Bin-Tao; Johnstone, Rose M. (1983): Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. In: *Cell* 33 (3), S. 967–978. DOI: 10.1016/0092-8674(83)90040-5.
- Pap, E.; Pállinger, E.; Pásztói, M.; Falus, A. (2009): Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. In: *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 58 (1), S. 1–8. DOI: 10.1007/s00011-008-8210-7.

- Pathan, Mohashin; Fonseka, Pamali; Chitti, Sai V.; Kang, Taeyoung; Sanwlani, Rahul; van Deun, Jan et al. (2019): Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. In: *Nucleic acids research* 47 (D1), D516-D519. DOI: 10.1093/nar/gky1029.
- Phuyal, Santosh; Hessvik, Nina P.; Skotland, Tore; Sandvig, Kirsten; Llorente, Alicia (2014): Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins. In: *The FEBS journal* 281 (9), S. 2214–2227. DOI: 10.1111/febs.12775.
- Prakasam, Gopinath; Iqbal, Mohammad Askandar; Bamezai, Rameshwar N. K.; Mazurek, Sybille (2018): Posttranslational Modifications of Pyruvate Kinase M2: Tweaks that Benefit Cancer. In: *Frontiers in oncology* 8, S. 22. DOI: 10.3389/fonc.2018.00022.
- Pritchard, Colin C.; Kroh, Evan; Wood, Brent; Arroyo, Jason D.; Dougherty, Katy J.; Miyaji, Melanie M. et al. (2012): Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. In: *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 5 (3), S. 492–497. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0370.
- Purushothaman, Anurag; Bandari, Shyam Kumar; Liu, Jian; Mobley, James A.; Brown, Elizabeth E.; Sanderson, Ralph D. (2016): Fibronectin on the Surface of Myeloma Cell-derived Exosomes Mediates Exosome-Cell Interactions. In: *The Journal of biological chemistry* 291 (4), S. 1652–1663. DOI: 10.1074/jbc.M115.686295.
- Rana, Sanyukta; Yue, Shijing; Stadel, Daniela; Zöller, Margot (2012): Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 44 (9), S. 1574–1584. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.06.018.
- Ratajczak, J.; Miekus, K.; Kucia, M.; Zhang, J.; Reca, R.; Dvorak, P.; Ratajczak, M. Z. (2006): Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. In: *Leukemia* 20 (5), S. 847–856. DOI: 10.1038/sj.leu.2404132.
- Ridder, Kirsten; Keller, Sascha; Dams, Maria; Rupp, Anne-Kathleen; Schlaudraff, Jessica; Del Turco, Domenico et al. (2014): Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation. In: *PLoS biology* 12 (6), e1001874. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001874.
- Russell, Ashley E.; Sneider, Alexandra; Witwer, Kenneth W.; Bergese, Paolo; Bhattacharyya, Suwendra N.; Cocks, Alexander et al. (2019): Biological membranes in EV biogenesis, stability, uptake, and cargo transfer: an ISEV position paper arising from the ISEV membranes and EVs workshop. In: *Journal of extracellular vesicles* 8 (1), S. 1684862. DOI: 10.1080/20013078.2019.1684862.

- Saab, Aiman S.; Tzvetavona, Iva D.; Trevisiol, Andrea; Baltan, Selva; Dibaj, Payam; Kusch, Kathrin et al. (2016): Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. In: *Neuron* 91 (1), S. 119–132. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.05.016.
- Sambrook, Joseph; Russell, David William (2001): Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shamseddine, Achraf A.; Airola, Michael V.; Hannun, Yusuf A. (2015): Roles and regulation of neutral sphingomyelinase-2 in cellular and pathological processes. In: *Advances in biological regulation* 57, S. 24–41. DOI: 10.1016/j.jbior.2014.10.002.
- Shelke, Ganesh Vilas; Lässer, Cecilia; Ghossein, Yong Song; Lötvall, Jan (2014): Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. In: *Journal of extracellular vesicles* 3. DOI: 10.3402/jev.v3.24783.
- Shurtleff, Matthew J.; Temoche-Diaz, Morayma M.; Karfilis, Kate V.; Ri, Sayaka; Schekman, Randy (2016): Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. In: *eLife* 5. DOI: 10.7554/eLife.19276.
- Simons, Mikael; Nave, Klaus-Armin (2015): Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 8 (1), a020479. DOI: 10.1101/cshperspect.a020479.
- Skog, Johan; Würdinger, Tom; van Rijn, Sjoerd; Meijer, Dimphna H.; Gainche, Laura; Sena-Estevés, Miguel et al. (2008): Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. In: *Nature cell biology* 10 (12), S. 1470–1476. DOI: 10.1038/ncb1800.
- Song, Hang; Zhang, Yao; Liu, Na; Wan, Chao; Zhang, Dongdong; Zhao, Sheng et al. (2016): miR-92b regulates glioma cells proliferation, migration, invasion, and apoptosis via PTEN/Akt signaling pathway. In: *Journal of physiology and biochemistry* 72 (2), S. 201–211. DOI: 10.1007/s13105-016-0470-z.
- Sung, Bong Hwan; Ketova, Tatiana; Hoshino, Daisuke; Zijlstra, Andries; Weaver, Alissa M. (2015): Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion. In: *Nature communications* 6, S. 7164. DOI: 10.1038/ncomms8164.
- Tamai, Keiichi; Tanaka, Nobuyuki; Nakano, Takashi; Kakazu, Eiji; Kondo, Yasuteru; Inoue, Jun et al. (2010): Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. In: *Biochemical and biophysical research communications* 399 (3), S. 384–390. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.07.083.

- Temoche-Diaz, Morayma M.; Shurtleff, Matthew J.; Nottingham, Ryan M.; Yao, Jun; Fadadu, Raj P.; Lambowitz, Alan M.; Schekman, Randy (2019): Distinct mechanisms of microRNA sorting into cancer cell-derived extracellular vesicle subtypes. In: *eLife* 8. DOI: 10.7554/eLife.47544.
- Théry, Clotilde; Amigorena, Sebastian; Raposo, Graça; Clayton, Aled (2006): Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. In: *Current protocols in cell biology* Chapter 3, Unit 3.22. DOI: 10.1002/0471143030.cb0322s30.
- Théry, Clotilde; Witwer, Kenneth W.; Aikawa, Elena; Alcaraz, Maria Jose; Anderson, Johnathon D.; Andriantsitohaina, Ramarosan et al. (2018): Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. In: *Journal of extracellular vesicles* 7 (1), S. 1535750. DOI: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- Tosar, Juan Pablo; Cayota, Alfonso; Eitan, Erez; Halushka, Marc K.; Witwer, Kenneth W. (2017): Ribonucleic artefacts: are some extracellular RNA discoveries driven by cell culture medium components? In: *Journal of extracellular vesicles* 6 (1), S. 1272832. DOI: 10.1080/20013078.2016.1272832.
- Trajkovic, Katarina; Hsu, Chieh; Chiantia, Salvatore; Rajendran, Lawrence; Wenzel, Dirk; Wieland, Felix et al. (2008): Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. In: *Science (New York, N.Y.)* 319 (5867), S. 1244–1247. DOI: 10.1126/science.1153124.
- Trotter, Jacqueline; Schachner, Melitta (1989): Cells positive for the O4 surface antigen isolated by cell sorting are able to differentiate into astrocytes or oligodendrocytes. In: *Developmental Brain Research* 46 (1), S. 115–122. DOI: 10.1016/0165-3806(89)90148-X.
- Valadi, Hadi; Ekström, Karin; Bossios, Apostolos; Sjöstrand, Margareta; Lee, James J.; Lötvall, Jan O. (2007): Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. In: *Nature cell biology* 9 (6), S. 654–659. DOI: 10.1038/ncb1596.
- van der Pol, E.; Coumans, F. A. W.; Grootemaat, A. E.; Gardiner, C.; Sargent, I. L.; Harrison, P. et al. (2014): Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 12 (7), S. 1182–1192. DOI: 10.1111/jth.12602.
- van der Pol, Edwin; Böing, Anita N.; Harrison, Paul; Sturk, Auguste; Nieuwland, Rienk (2012): Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. In: *Pharmacological reviews* 64 (3), S. 676–705. DOI: 10.1124/pr.112.005983.

- van Deun, Jan; Mestdagh, Pieter; Agostinis, Patrizia; Akay, Özden; Anand, Sushma; Anckaert, Jasper et al. (2017): EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. In: *Nature methods* 14 (3), S. 228–232. DOI: 10.1038/nmeth.4185.
- van Deun, Jan; Mestdagh, Pieter; Sormunen, Raija; Cocquyt, Veronique; Vermaelen, Karim; Vandesompele, Jo et al. (2014): The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. In: *Journal of extracellular vesicles* 3. DOI: 10.3402/jev.v3.24858.
- van Niel, Guillaume; D'Angelo, Gisela; Raposo, Graça (2018): Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 19 (4), S. 213–228. DOI: 10.1038/nrm.2017.125.
- Vandesompele, Jo; Preter, Katleen de; Pattyn, Filip; Poppe, Bruce; van Roy, Nadine; Paepe, Anne de; Speleman, Frank (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. In: *Genome biology* 3 (7), RESEARCH0034. DOI: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
- Varani, Gabriele (2015): Twenty years of RNA: the discovery of microRNAs. In: *RNA (New York, N.Y.)* 21 (4), S. 751–752. DOI: 10.1261/rna.050237.115.
- Villarroya-Beltri, Carolina; Gutiérrez-Vázquez, Cristina; Sánchez-Cabo, Fátima; Pérez-Hernández, Daniel; Vázquez, Jesús; Martín-Cofreces, Noa et al. (2013): Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. In: *Nature communications* 4, S. 2980. DOI: 10.1038/ncomms3980.
- Wei, Zhiyun; Batagov, Arsen O.; Carter, David R. F.; Krichevsky, Anna M. (2016): Fetal Bovine Serum RNA Interferes with the Cell Culture derived Extracellular RNA. In: *Scientific reports* 6, S. 31175. DOI: 10.1038/srep31175.
- Welsh, Joshua A.; van der Pol, Edwin; Arkesteijn, Ger J. A.; Bremer, Michel; Brisson, Alain; Coumans, Frank et al. (2020): MIFlowCyt-EV: a framework for standardized reporting of extracellular vesicle flow cytometry experiments. In: *Journal of extracellular vesicles* 9 (1), S. 1713526. DOI: 10.1080/20013078.2020.1713526.
- Welton, Joanne Louise; Webber, Jason Paul; Botos, Laur-Alexandru; Jones, Michael; Clayton, Aled (2015): Ready-made chromatography columns for extracellular vesicle isolation from plasma. In: *Journal of extracellular vesicles* 4, S. 27269. DOI: 10.3402/jev.v4.27269.
- Wickens, M.; Takayama, K. (1994): RNA. Deviants—or emissaries. In: *Nature* 367 (6458), S. 17–18. DOI: 10.1038/367017a0.

- Winter, Julia; Jung, Stephanie; Keller, Sarina; Gregory, Richard I.; Diederichs, Sven (2009): Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. In: *Nature cell biology* 11 (3), S. 228–234. DOI: 10.1038/ncb0309-228.
- Witwer, Kenneth W.; Buzás, Edit I.; Bemis, Lynne T.; Bora, Adriana; Lässer, Cecilia; Lötval, Jan et al. (2013): Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. In: *Journal of extracellular vesicles* 2. DOI: 10.3402/jev.v2i0.20360.
- Worby, Carolyn A.; Dixon, Jack E. (2014): PTEN. In: *Annual review of biochemistry* 83, S. 641–669. DOI: 10.1146/annurev-biochem-082411-113907.
- Xu, Lili; Cao, Hui; Xie, Yi; Zhang, Yao; Du, Mingyang; Xu, Xiaohui et al. (2019): Exosome-shuttled miR-92b-3p from ischemic preconditioned astrocytes protects neurons against oxygen and glucose deprivation. In: *Brain research* 1717, S. 66–73. DOI: 10.1016/j.brainres.2019.04.009.
- Xu, Tao; Wang, Hongxiang; Jiang, Mei; Yan, Yong; Li, Weiqing; Xu, Hanchong et al. (2017): The E3 ubiquitin ligase CHIP/miR-92b/PTEN regulatory network contributes to tumorigenesis of glioblastoma. In: *American Journal of Cancer Research* 7 (2), S. 289–300.
- Yang, Weiwei; Zheng, Yanhua; Xia, Yan; Ji, Haitao; Chen, Xiaomin; Guo, Fang et al. (2012): ERK1/2-dependent phosphorylation and nuclear translocation of PKM2 promotes the Warburg effect. In: *Nature cell biology* 14 (12), S. 1295–1304. DOI: 10.1038/ncb2629.
- Zhang, Jian; Li, Sha; Li, Lu; Li, Meng; Guo, Chongye; Yao, Jun; Mi, Shuangli (2015): Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. In: *Genomics, proteomics & bioinformatics* 13 (1), S. 17–24. DOI: 10.1016/j.gpb.2015.02.001.
- Zhang, Yu; Liao, Jun-Ming; Zeng, Shelya X.; Lu, Hua (2011): p53 downregulates Down syndrome-associated DYRK1A through miR-1246. In: *EMBO reports* 12 (8), S. 811–817. DOI: 10.1038/embor.2011.98.
- Zhuang, L. K.; Yang, Y. T.; Ma, X.; Han, B.; Wang, Z. S.; Zhao, Q. Y. et al. (2016): MicroRNA-92b promotes hepatocellular carcinoma progression by targeting Smad7 and is mediated by long non-coding RNA XIST. In: *Cell death & disease* 7, e2203. DOI: 10.1038/cddis.2016.100.
- Zimmerman, Brandon; Kelly, Brendan; McMillan, Brian J.; Seegar, Tom C. M.; Dror, Ron O.; Kruse, Andrew C.; Blacklow, Stephen C. (2016): Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. In: *Cell* 167 (4), 1041-1051.e11. DOI: 10.1016/j.cell.2016.09.056.

7 Anhang

A. Zusatzdaten

Tabelle 7-1: Mengenangaben der verwendeten Proben für die miRNA-Sequenzierung-2. Probenabkürzungen siehe Tabelle 2-15 (S. 37); Basalmedium + NB21: (MKON); MKON + RNase (MR).

Probe	Zellen		Medium [ml]	Partikel (NTA) x10 ⁶ /ml	Partikel (NTA) (Medium) x10 ⁶ /ml	RIN	ng/ul (BA)
	Schalen	Zellen [10 ⁶]					
C2+	10	(0,85 - 0,9)*	---	---	---	8,7	67,76
C2Ø	11	(0,85 - 0,9)*	---	---	---	8,1	64,29
C3+	11	0,85	---	---	---	8,4	72,03
C3Ø	12	0,85	---	---	---	8	47,76
C4+	13	0,79	---	---	---	8,8	38,60
C4Ø	14	0,79	---	---	---	8,1	27,39
C5+	12	0,8	---	---	---	8,4	39,11
C5Ø	14	0,8	---	---	---	8,2	43,91
C6+	11	0,79	---	---	---	8,7	49,76
C6Ø	12	0,79	---	---	---	8,3	21,43
SC1a	11	0,83	---	---	---	8,5	61,39
SC4	9	0,79	---	---	---	8,6	41,56
SC5	10	0,80	---	---	---	8,8	40,80
SC6	9	0,79	---	---	---	8,6	43,68
SC7	9	0,81	---	---	---	8,5	57,27
E2+	---	---	37,8	* 302,2	* 114,0	NA	2,03
E2Ø	---	---	35,8	* 60,6	* 3,6	NA	2,78
E3+	---	---	41,8	* 275,7	* 114,0	NA	2,27
E3Ø	---	---	45,8	* 66,6	* 3,6	NA	0,46
E4+	---	---	49,8	628,6	503,8	NA	0,60
E4Ø	---	---	53,8	9,8	5,7	NA	5,13
E5+	---	---	45,8	299,5	172,7	NA	0,56
E5Ø	---	---	53,8	22,2	0,4	NA	4,17
E6+	---	---	41,8	332	252,5	NA	1,35
E6Ø	---	---	45,8	27,4	7,4	NA	8,18
SE1a	---	---	41,8	23,3	7,4	NA	2,02
SE4	---	---	33,8	**	**	NA	5,89
SE5	---	---	37,8	17,8	1	NA	2,81
SE6	---	---	33,8	44,5	6,6	NA	1,93
SE7	---	---	33,8	30,0	0,2	NA	8,41
MKON 1	---	---	51	---	154,9	NA	0,01
MKON 2	---	---	51	---		NA	0,04
MKON 3	---	---	51	---		NA	0,02
MR 1	---	---	66	---	188,0	NA	0,03
MR 2	---	---	66	---		NA	0,00
MR 3	---	---	66	---		NA	0,02
E1++	---	---	20	---	---	NA	0,31
E1+Ø	---	---	20	---	---	NA	0,74
E7++	---	---	39,6	384,5	157,9	NA	0,11
E7+Ø	---	---	39,6	21,7	1,5	NA	0,15

*EV-Probe bestand aus 2 unabhängigen EV-Isolationen. NTA-Resultate sind nur von einer Isolation und Zellzahlen sind von beiden Isolationseignissen angegeben.

**Komplikationen bei NTA-Messung

Probe	RNA total [ng] (BA)	RNA Input Li- brary Prep [ng]	cDNA Input Size Selection [ng]	Library Size	miRNA Reads (Precursor 1MM)
C2+	745,36	100,00	4	5537084	2528519
C2Ø	707,19	100,00	4	5927620	2161601
C3+	792,33	100,00	4	5970057	2843893
C3Ø	525,36	100,00	4	6676314	2274834
C4+	424,60	100,00	4	5728254	2399166
C4Ø	301,29	100,00	4	6164435	1594675
C5+	430,21	100,00	4	4063030	1639781
C5Ø	483,01	100,00	4	5717988	1563769
C6+	547,36	100,00	4	4949803	1921002
C6Ø	235,73	100,00	4	6665652	1903654
SC1a	675,29	100,00	4	5832712	2619088
SC4	457,16	100,00	4	5275998	2274530
SC5*	448,80	100,00	4	5309923	1838337
SC6	480,48	100,00	4	5887355	2413840
SC7	629,97	100,00	4	4887157	2303246
E2+	22,31	8,00	6	5182542	523022
E2Ø	30,53	8,00	6	5412442	506452
E3+	24,96	8,00	6	6098871	677888
E3Ø	5,09	2,78	6	6819651	637206
E4+	6,55	3,57	6	5209383	698659
E4Ø	56,40	8,00	6	7348671	717749
E5+	6,12	3,34	6	6014596	728226
E5Ø	45,82	8,00	6	6730736	581833
E6+	14,83	8,00	6	6972440	685802
E6Ø	89,95	8,00	6	6733664	678479
SE1a	22,19	8,00	6	5487911	877166
SE4	64,79	8,00	6	4092965	533440
SE5*	30,90	8,00	4,38	3381358	178036
SE6	21,27	8,00	6	6130772	1144910
SE7	92,48	8,00	6	5555710	858549
M-Kon 1	0,15	0,08	6	4357982	2679467
M-Kon 2	0,39	0,21	6	3963630	2556603
M-Kon 3	0,20	0,11	5,5	3334539	2348951
MR 1	0,31	0,17	3,66	979414	314654
MR 2	0,04	0,02	2,28	456174	110532
MR 3	0,18	0,10	3,3	751987	131947
E1++	3,41	1,86	4,86	2023701	141418
E1+Ø	8,14	4,44	6	3294687	112357
E7++	1,24	0,68	4,62	1175900	30100
E7+Ø	1,64	0,89	2,58	835934	14840

*Nachträglich aussortiert, da auf SE5 weniger als 500.000 miRNAs reads kamen.

Tabelle 7-2: Top150 miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 von primären Oligodendrozyten mit NS21 (pOLs+NS21) während der Isolations-Periode von extrazellulären Vesikel. n=5.

Posi- tion	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent	Posi- tion	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent
1	mmu-let-7i-5p	358474	15,816	76	mmu-miR-106b-3p	1892	0,083
2	mmu-miR-9-5p	214807	9,478	77	mmu-miR-382-5p	1803	0,080
3	mmu-let-7f-5p	214315	9,456	78	mmu-miR-409-3p	1611	0,071
4	mmu-let-7c-5p	160700	7,090	79	mmu-miR-344-3p	1608	0,071
5	mmu-miR-99a-5p	158417	6,990	80	mmu-miR-342-3p	1591	0,070
6	mmu-miR-26a-5p	137786	6,079	81	mmu-miR-16-5p	1509	0,067
7	mmu-miR-219a-2-3p	105516	4,656	82	mmu-miR-218-5p	1502	0,066
8	mmu-let-7g-5p	90573	3,996	83	mmu-miR-20a-5p	1499	0,066
9	mmu-let-7a-5p	73872	3,259	84	mmu-miR-140-3p	1494	0,066
10	mmu-miR-30d-5p	57270	2,527	85	mmu-miR-423-5p	1476	0,065
11	mmu-let-7b-5p	46325	2,044	86	mmu-miR-411-5p	1422	0,063
12	mmu-miR-128-3p	37726	1,665	87	mmu-miR-488-3p	1368	0,060
13	mmu-let-7d-5p	34958	1,542	88	mmu-miR-186-5p	1311	0,058

14	mmu-miR-148a-3p	33904	1,496	89	mmu-miR-872-5p	1280	0,056
15	mmu-miR-27b-3p	31477	1,389	90	mmu-miR-29a-3p	1261	0,056
16	mmu-miR-181b-5p	28205	1,244	91	mmu-miR-434-3p	1259	0,056
17	mmu-miR-151-3p	23599	1,041	92	mmu-miR-181a-1-3p	1249	0,055
18	mmu-miR-21a-5p	22888	1,010	93	mmu-miR-381-3p	1227	0,054
19	mmu-miR-125b-5p	20454	0,902	94	mmu-miR-330-3p	1217	0,054
20	mmu-miR-181a-5p	19128	0,844	95	mmu-miR-330-5p	1173	0,052
21	mmu-miR-100-5p	17830	0,787	96	mmu-miR-433-3p	1092	0,048
22	mmu-miR-338-5p	17344	0,765	97	mmu-miR-146a-5p	1088	0,048
23	mmu-miR-24-3p	15857	0,700	98	mmu-miR-27a-3p	1074	0,047
24	mmu-miR-99b-5p	15248	0,673	99	mmu-miR-1983	1034	0,046
25	mmu-miR-30c-5p	14168	0,625	100	mmu-miR-351-5p	988	0,044
26	mmu-miR-9-3p	12511	0,552	101	mmu-miR-296-3p	973	0,043
27	mmu-miR-98-5p	11620	0,513	102	mmu-miR-6540-5p	946	0,042
28	mmu-miR-30a-5p	10885	0,480	103	mmu-miR-1843b-5p	917	0,040
29	mmu-miR-92a-3p	10680	0,471	104	mmu-miR-17-5p	905	0,040
30	mmu-miR-191-5p	9267	0,409	105	mmu-miR-345-3p	861	0,038
31	mmu-miR-127-3p	9057	0,400	106	mmu-miR-501-3p	859	0,038
32	mmu-miR-328-3p	8752	0,386	107	mmu-miR-99b-3p	849	0,037
33	mmu-miR-125a-5p	8175	0,361	108	mmu-miR-383-5p	845	0,037
34	mmu-miR-541-5p	6526	0,288	109	mmu-miR-337-5p	831	0,037
35	mmu-miR-298-5p	6298	0,278	110	mmu-miR-122-5p	823	0,036
36	mmu-miR-26b-5p	6235	0,275	111	mmu-miR-126a-3p	722	0,032
37	mmu-miR-103-3p	6026	0,266	112	mmu-let-7a-1-3p (*)	721	0,032
38	mmu-miR-423-3p	5304	0,234	113	mmu-miR-325-5p	704	0,031
39	mmu-miR-744-5p	5180	0,229	114	mmu-miR-344f-3p	701	0,031
40	mmu-miR-25-3p	4795	0,212	115	mmu-miR-374b-5p	682	0,030
41	mmu-miR-379-5p	4786	0,211	116	mmu-miR-322-3p	672	0,030
42	mmu-let-7e-5p	4642	0,205	117	mmu-miR-192-5p	665	0,029
43	mmu-miR-181d-5p	4415	0,195	118	mmu-miR-378a-3p	663	0,029
44	mmu-miR-361-3p	4082	0,180	119	mmu-miR-346-5p	620	0,027
45	mmu-miR-434-5p	4009	0,177	120	mmu-miR-671-3p	608	0,027
46	mmu-miR-30a-3p	3968	0,175	121	mmu-miR-138-1-3p	600	0,026
47	mmu-miR-1198-5p	3782	0,167	122	mmu-miR-543-3p	572	0,025
48	mmu-miR-1839-5p	3626	0,160	123	mmu-miR-140-5p	564	0,025
49	mmu-miR-30e-3p	3581	0,158	124	mmu-miR-101b-3p	546	0,024
50	mmu-miR-129-5p	3432	0,151	125	mmu-miR-669c-5p	517	0,023
51	mmu-let-7d-3p	3371	0,149	126	mmu-let-7b-3p	509	0,022
52	mmu-miR-340-5p	3351	0,148	127	mmu-miR-134-5p	508	0,022
53	mmu-miR-1981-5p	3293	0,145	128	mmu-miR-369-5p	502	0,022
54	mmu-miR-148b-3p	3220	0,142	129	mmu-miR-199a-3p (**)	499	0,022
55	mmu-miR-23b-3p	3171	0,140	130	mmu-miR-1843a-5p	468	0,021
56	mmu-miR-340-3p	3136	0,138	131	mmu-miR-486a-5p (***)	462	0,020
57	mmu-miR-204-5p	3033	0,134	132	mmu-miR-1249-3p	459	0,020
58	mmu-miR-532-5p	2968	0,131	133	mmu-miR-30b-5p	454	0,020
59	mmu-miR-143-3p	2924	0,129	134	mmu-miR-34c-5p	442	0,019
60	mmu-miR-149-5p	2763	0,122	135	mmu-miR-212-5p	440	0,019
61	mmu-miR-146b-5p	2695	0,119	136	mmu-miR-760-3p	428	0,019
62	mmu-miR-1298-5p	2663	0,117	137	mmu-miR-7688-5p	414	0,018
63	mmu-miR-185-5p	2655	0,117	138	mmu-miR-425-5p	400	0,018
64	mmu-miR-320-3p	2555	0,113	139	mmu-miR-101a-3p	391	0,017
65	mmu-miR-484	2536	0,112	140	mmu-miR-27b-5p	383	0,017
66	mmu-miR-674-3p	2527	0,111	141	mmu-miR-421-3p	380	0,017
67	mmu-miR-370-3p	2372	0,105	142	mmu-miR-30c-2-3p	362	0,016
68	mmu-miR-125b-1-3p	2337	0,103	143	mmu-miR-672-5p	362	0,016
69	mmu-miR-7a-5p	2187	0,097	144	mmu-miR-296-5p	354	0,016
70	mmu-miR-138-5p	2182	0,096	145	mmu-miR-187-3p	342	0,015
71	mmu-miR-92b-3p	2155	0,095	146	mmu-miR-194-5p	339	0,015
72	mmu-miR-30e-5p	2066	0,091	147	mmu-miR-1843b-3p	325	0,014
73	mmu-miR-22-3p	2008	0,089	148	mmu-miR-301a-5p	321	0,014
74	mmu-miR-598-3p	1959	0,086	149	mmu-miR-770-3p	321	0,014
75	mmu-miR-93-5p	1893	0,084	150	mmu-miR-384-5p	317	0,014

* mmu-let-7c-2-3p | ** mmu-miR-199b-3p | *** mmu-miR-486b-5p

Tabelle 7-3: Top150 miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 von primären Oligodendrozyten ohne NS21 (pOLsØNS21) während der Isolations-Periode von extrazellulären Vesikel. n=5.

Position	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent	Position	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent
1	mmu-let-7i-5p	287955	15,158	76	mmu-miR-7a-5p	1562	0,082
2	mmu-miR-9-5p	178507	9,397	77	mmu-miR-22-3p	1497	0,079

3	mmu-let-7f-5p	169369	8,916	78	mmu-miR-140-3p	1440	0,076
4	mmu-miR-99a-5p	140264	7,383	79	mmu-miR-342-3p	1356	0,071
5	mmu-let-7c-5p	134925	7,102	80	mmu-miR-344-3p	1315	0,069
6	mmu-miR-26a-5p	123239	6,487	81	mmu-miR-409-3p	1253	0,066
7	mmu-miR-219a-2-3p	95493	5,027	82	mmu-miR-434-3p	1214	0,064
8	mmu-let-7g-5p	74019	3,896	83	mmu-miR-488-3p	1189	0,063
9	mmu-let-7a-5p	56070	2,952	84	mmu-miR-423-5p	1158	0,061
10	mmu-miR-30d-5p	51792	2,726	85	mmu-miR-20a-5p	1152	0,061
11	mmu-let-7b-5p	37997	2,000	86	mmu-miR-330-3p	1146	0,060
12	mmu-miR-128-3p	32871	1,730	87	mmu-miR-218-5p	1144	0,060
13	mmu-miR-148a-3p	32474	1,709	88	mmu-miR-381-3p	1138	0,060
14	mmu-let-7d-5p	25832	1,360	89	mmu-miR-29a-3p	1120	0,059
15	mmu-miR-27b-3p	24661	1,298	90	mmu-miR-16-5p	1110	0,058
16	mmu-miR-181b-5p	22678	1,194	91	mmu-miR-351-5p	1093	0,058
17	mmu-miR-151-3p	22027	1,159	92	mmu-miR-411-5p	1092	0,057
18	mmu-miR-125b-5p	17677	0,931	93	mmu-miR-330-5p	1086	0,057
19	mmu-miR-181a-5p	17448	0,918	94	mmu-miR-186-5p	1001	0,053
20	mmu-miR-99b-5p	14065	0,740	95	mmu-miR-181a-1-3p	999	0,053
21	mmu-miR-21a-5p	13945	0,734	96	mmu-miR-872-5p	924	0,049
22	mmu-miR-24-3p	13057	0,687	97	mmu-miR-433-3p	921	0,049
23	mmu-miR-100-5p	12490	0,657	98	mmu-miR-1843b-5p	911	0,048
24	mmu-miR-338-5p	12126	0,638	99	mmu-miR-27a-3p	878	0,046
25	mmu-miR-30c-5p	12111	0,638	100	mmu-miR-383-5p	860	0,045
26	mmu-miR-92a-3p	10876	0,573	101	mmu-miR-1983	840	0,044
27	mmu-miR-30a-5p	9478	0,499	102	mmu-miR-99b-3p	816	0,043
28	mmu-miR-98-5p	9220	0,485	103	mmu-miR-296-3p	814	0,043
29	mmu-miR-328-3p	8831	0,465	104	mmu-miR-146a-5p	764	0,040
30	mmu-miR-9-3p	8375	0,441	105	mmu-miR-6540-5p	749	0,039
31	mmu-miR-127-3p	7915	0,417	106	mmu-miR-17-5p	735	0,039
32	mmu-miR-191-5p	7600	0,400	107	mmu-miR-122-5p	734	0,039
33	mmu-miR-125a-5p	7242	0,381	108	mmu-miR-346-5p	713	0,038
34	mmu-miR-541-5p	5771	0,304	109	mmu-miR-501-3p	709	0,037
35	mmu-miR-744-5p	4860	0,256	110	mmu-miR-126a-3p	708	0,037
36	mmu-miR-423-3p	4849	0,255	111	mmu-miR-378a-3p	700	0,037
37	mmu-miR-298-5p	4838	0,255	112	mmu-miR-138-1-3p	679	0,036
38	mmu-miR-25-3p	4719	0,248	113	mmu-miR-337-5p	679	0,036
39	mmu-let-7e-5p	4527	0,238	114	mmu-miR-344f-3p	639	0,034
40	mmu-miR-26b-5p	4474	0,235	115	mmu-miR-345-3p	629	0,033
41	mmu-miR-103-3p	4442	0,234	116	mmu-miR-322-3p	628	0,033
42	mmu-miR-30a-3p	4104	0,216	117	mmu-let-7b-3p	585	0,031
43	mmu-miR-181d-5p	3900	0,205	118	mmu-miR-671-3p	583	0,031
44	mmu-miR-204-5p	3749	0,197	119	mmu-miR-192-5p	572	0,030
45	mmu-miR-379-5p	3614	0,190	120	mmu-miR-374b-5p	547	0,029
46	mmu-miR-434-5p	3585	0,189	121	mmu-miR-325-5p	546	0,029
47	mmu-let-7d-3p	3562	0,188	122	mmu-let-7a-1-3p ^(*)	521	0,027
48	mmu-miR-23b-3p	3554	0,187	123	mmu-miR-669c-5p	508	0,027
49	mmu-miR-1198-5p	3520	0,185	124	mmu-miR-1249-3p	508	0,027
50	mmu-miR-1981-5p	3306	0,174	125	mmu-miR-486a-5p ^(**)	481	0,025
51	mmu-miR-361-3p	3204	0,169	126	mmu-miR-543-3p	479	0,025
52	mmu-miR-143-3p	3131	0,165	127	mmu-miR-1843a-5p	445	0,023
53	mmu-miR-30e-3p	3107	0,164	128	mmu-miR-30b-5p	432	0,023
54	mmu-miR-149-5p	3101	0,163	129	mmu-miR-760-3p	431	0,023
55	mmu-miR-129-5p	2908	0,153	130	mmu-miR-212-5p	429	0,023
56	mmu-miR-1839-5p	2902	0,153	131	mmu-miR-134-5p	400	0,021
57	mmu-miR-148b-3p	2630	0,138	132	mmu-miR-199a-3p ^(***)	396	0,021
58	mmu-miR-340-3p	2588	0,136	133	mmu-miR-140-5p	396	0,021
59	mmu-miR-1298-5p	2543	0,134	134	mmu-miR-369-5p	395	0,021
60	mmu-miR-674-3p	2516	0,132	135	mmu-miR-7688-5p	370	0,019
61	mmu-miR-532-5p	2478	0,130	136	mmu-miR-101b-3p	366	0,019
62	mmu-miR-320-3p	2419	0,127	137	mmu-miR-34c-5p	366	0,019
63	mmu-miR-484	2293	0,121	138	mmu-miR-425-5p	359	0,019
64	mmu-miR-340-5p	2201	0,116	139	mmu-miR-770-3p	352	0,019
65	mmu-miR-92b-3p	2118	0,111	140	mmu-miR-30c-2-3p	333	0,018
66	mmu-miR-370-3p	2116	0,111	141	mmu-miR-1964-3p	331	0,017
67	mmu-miR-125b-1-3p	2061	0,109	142	mmu-miR-132-3p	324	0,017
68	mmu-miR-185-5p	1909	0,100	143	mmu-miR-187-3p	322	0,017
69	mmu-miR-146b-5p	1884	0,099	144	mmu-miR-672-5p	321	0,017
70	mmu-miR-106b-3p	1883	0,099	145	mmu-miR-101a-3p	321	0,017
71	mmu-miR-138-5p	1811	0,095	146	mmu-miR-700-3p	316	0,017
72	mmu-miR-598-3p	1797	0,095	147	mmu-miR-23a-3p	314	0,017
73	mmu-miR-382-5p	1682	0,089	148	mmu-miR-1843b-3p	302	0,016
74	mmu-miR-30e-5p	1673	0,088	149	mmu-miR-455-5p	300	0,016
75	mmu-miR-93-5p	1623	0,085	150	mmu-miR-27b-5p	299	0,016

* mmu-let-7c-2-3p | ** mmu-miR-486b-5p | *** mmu-miR-199b-3p

Tabelle 7-4: Top150 miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 von primären Oligodendrozyten nach Stimulation mit Glutamat und D/L-Serin und ohne NS21 (s-pOLsØNS21) während der Isolations-Periode von extrazellulären Vesikel. n=4.

Position	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent	Position	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent
1	mmu-let-7i-5p	377378	15,707	76	mmu-miR-1298-5p	1860	0,077
2	mmu-let-7f-5p	230968	9,613	77	mmu-miR-106b-3p	1778	0,074
3	mmu-miR-9-5p	230124	9,578	78	mmu-miR-423-5p	1771	0,074
4	mmu-let-7c-5p	174698	7,271	79	mmu-miR-93-5p	1672	0,070
5	mmu-miR-99a-5p	165615	6,893	80	mmu-miR-411-5p	1654	0,069
6	mmu-miR-26a-5p	149793	6,234	81	mmu-miR-434-3p	1590	0,066
7	mmu-miR-219a-2-3p	104008	4,329	82	mmu-miR-16-5p	1553	0,065
8	mmu-let-7g-5p	95434	3,972	83	mmu-miR-342-3p	1504	0,063
9	mmu-let-7a-5p	85135	3,543	84	mmu-miR-344-3p	1476	0,061
10	mmu-miR-30d-5p	54805	2,281	85	mmu-miR-218-5p	1467	0,061
11	mmu-let-7b-5p	49971	2,080	86	mmu-miR-29a-3p	1455	0,061
12	mmu-miR-128-3p	40486	1,685	87	mmu-miR-872-5p	1370	0,057
13	mmu-let-7d-5p	39190	1,631	88	mmu-miR-140-3p	1363	0,057
14	mmu-miR-148a-3p	32786	1,365	89	mmu-miR-433-3p	1316	0,055
15	mmu-miR-27b-3p	31099	1,294	90	mmu-miR-488-3p	1287	0,054
16	mmu-miR-21a-5p	28542	1,188	91	mmu-miR-330-3p	1273	0,053
17	mmu-miR-181a-5p	26776	1,114	92	mmu-miR-186-5p	1259	0,052
18	mmu-miR-125b-5p	24537	1,021	93	mmu-miR-20a-5p	1173	0,049
19	mmu-miR-151-3p	23511	0,979	94	mmu-miR-27a-3p	1161	0,048
20	mmu-miR-100-5p	21049	0,876	95	mmu-miR-330-5p	1117	0,046
21	mmu-miR-338-5p	19188	0,799	96	mmu-miR-146a-5p	1071	0,045
22	mmu-miR-181a-3p	18293	0,761	97	mmu-miR-381-3p	1070	0,045
23	mmu-miR-99b-5p	17516	0,729	98	mmu-miR-181a-1-3p	1069	0,045
24	mmu-miR-24-3p	15276	0,636	99	mmu-miR-1983	1016	0,042
25	mmu-miR-30c-5p	14790	0,616	100	mmu-miR-337-5p	965	0,040
26	mmu-miR-98-5p	12907	0,537	101	mmu-miR-351-5p	956	0,040
27	mmu-miR-9-3p	12231	0,509	102	mmu-miR-6540-5p	935	0,039
28	mmu-miR-328-3p	11362	0,473	103	mmu-miR-1843b-5p	931	0,039
29	mmu-miR-92a-3p	10829	0,451	104	mmu-miR-296-3p	893	0,037
30	mmu-miR-191-5p	10539	0,439	105	mmu-miR-122-5p	877	0,037
31	mmu-miR-125a-5p	10144	0,422	106	mmu-miR-383-5p	873	0,036
32	mmu-miR-30a-5p	9947	0,414	107	mmu-miR-501-3p	863	0,036
33	mmu-miR-127-3p	9238	0,384	108	mmu-miR-99b-3p	861	0,036
34	mmu-miR-541-5p	7521	0,313	109	mmu-miR-17-5p	786	0,033
35	mmu-miR-26b-5p	6341	0,264	110	mmu-miR-378a-3p	785	0,033
36	mmu-miR-298-5p	6105	0,254	111	mmu-miR-345-3p	757	0,032
37	mmu-miR-423-3p	5951	0,248	112	mmu-miR-335-3p	723	0,030
38	mmu-miR-103-3p	5944	0,247	113	mmu-miR-346-5p	716	0,030
39	mmu-miR-744-5p	5477	0,228	114	mmu-let-7a-1-3p (*)	716	0,030
40	mmu-miR-379-5p	5279	0,220	115	mmu-miR-1249-3p	715	0,030
41	mmu-let-7e-5p	5145	0,214	116	mmu-miR-671-3p	714	0,030
42	mmu-miR-25-3p	5061	0,211	117	mmu-miR-543-3p	710	0,030
43	mmu-miR-129-5p	4650	0,194	118	mmu-miR-374b-5p	665	0,028
44	mmu-miR-30a-3p	4209	0,175	119	mmu-miR-322-3p	660	0,027
45	mmu-miR-181d-5p	3997	0,166	120	mmu-miR-126a-3p	636	0,026
46	mmu-miR-434-5p	3973	0,165	121	mmu-miR-325-5p	631	0,026
47	mmu-miR-1198-5p	3881	0,162	122	mmu-miR-192-5p	631	0,026
48	mmu-let-7d-3p	3837	0,160	123	mmu-miR-27b-5p	623	0,026
49	mmu-miR-361-3p	3778	0,157	124	mmu-miR-212-5p	607	0,025
50	mmu-miR-143-3p	3711	0,154	125	mmu-miR-134-5p	595	0,025
51	mmu-miR-30e-3p	3435	0,143	126	mmu-miR-770-3p	565	0,024
52	mmu-miR-1839-5p	3396	0,141	127	mmu-miR-140-5p	564	0,023
53	mmu-miR-340-5p	3253	0,135	128	mmu-miR-344f-3p	560	0,023
54	mmu-miR-204-5p	3101	0,129	129	mmu-miR-101b-3p	545	0,023
55	mmu-miR-532-5p	3096	0,129	130	mmu-miR-369-5p	537	0,022
56	mmu-miR-23b-3p	3063	0,127	131	mmu-miR-669c-5p	521	0,022
57	mmu-miR-1981-5p	3047	0,127	132	mmu-miR-486a-5p (**)	520	0,022
58	mmu-miR-340-3p	3033	0,126	133	mmu-miR-199a-3p (***)	519	0,022
59	mmu-miR-92b-3p	2974	0,124	134	mmu-let-7b-3p	499	0,021
60	mmu-miR-146b-5p	2965	0,123	135	mmu-miR-760-3p	477	0,020
61	mmu-miR-484	2924	0,122	136	mmu-miR-1843a-5p	476	0,020
62	mmu-miR-149-5p	2855	0,119	137	mmu-miR-34c-5p	476	0,020
63	mmu-miR-320-3p	2849	0,119	138	mmu-miR-30b-5p	459	0,019
64	mmu-miR-674-3p	2830	0,118	139	mmu-miR-138-1-3p	425	0,018
65	mmu-miR-148b-3p	2759	0,115	140	mmu-miR-101a-3p	411	0,017
66	mmu-miR-185-5p	2738	0,114	141	mmu-miR-30c-2-3p	409	0,017
67	mmu-miR-125b-1-3p	2478	0,103	142	mmu-miR-187-3p	398	0,017
68	mmu-miR-7a-5p	2468	0,103	143	mmu-miR-672-5p	396	0,016

69	mmu-miR-370-3p	2359	0,098	144	mmu-miR-421-3p	394	0,016
70	mmu-miR-22-3p	2282	0,095	145	mmu-miR-1843b-3p	390	0,016
71	mmu-miR-598-3p	2049	0,085	146	mmu-miR-222-3p	383	0,016
72	mmu-miR-382-5p	2038	0,085	147	mmu-miR-151-5p	380	0,016
73	mmu-miR-409-3p	2002	0,083	148	mmu-miR-425-5p	379	0,016
74	mmu-miR-30e-5p	1975	0,082	149	mmu-miR-132-3p	376	0,016
75	mmu-miR-138-5p	1880	0,078	150	mmu-miR-296-5p	372	0,015

* mmu-let-7c-2-3p | ** mmu-miR-486b-5p | *** mmu-miR-199b-3p

Tabelle 7-5: Top150 miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 von oligodendroglialen extrazellulären Vesikeln mit NS21 (EVs+NS21) während der Isolations-Periode. Top10 miRNA aus Medium-Kontrolle: rote Schrift. n=5.

Position	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent	Position	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent
1	mmu-miR-122-5p ⁽¹⁾	138847	20,951	76	mmu-miR-1839-5p	413	0,062
2	mmu-miR-148a-3p	74022	11,169	77	mmu-miR-106b-3p	388	0,058
3	mmu-let-7c-5p	63679	9,609	78	mmu-miR-433-3p	385	0,058
4	mmu-let-7i-5p	42690	6,442	79	mmu-miR-351-5p	375	0,057
5	mmu-miR-99a-5p	33358	5,033	80	mmu-miR-199a-3p ^(**)	367	0,055
6	mmu-let-7b-5p	27004	4,075	81	mmu-miR-129-5p	362	0,055
7	mmu-miR-128-3p	21338	3,220	82	mmu-miR-186-5p	360	0,054
8	mmu-miR-9-5p	19289	2,911	83	mmu-miR-146b-5p	352	0,053
9	mmu-miR-26a-5p	18843	2,843	84	mmu-miR-126a-3p	348	0,053
10	mmu-let-7f-5p	17762	2,680	85	mmu-miR-344-3p	335	0,051
11	mmu-miR-30d-5p	15901	2,399	86	mmu-miR-125b-1-3p	327	0,049
12	mmu-miR-219a-2-3p	15384	2,321	87	mmu-miR-434-3p	314	0,047
13	mmu-let-7a-5p	13532	2,042	88	mmu-miR-99b-3p	310	0,047
14	mmu-let-7g-5p	12053	1,819	89	mmu-miR-140-3p	301	0,045
15	mmu-miR-181b-5p	6757	1,020	90	mmu-miR-342-3p	301	0,045
16	mmu-miR-92a-3p	6249	0,943	91	mmu-miR-138-1-3p	279	0,042
17	mmu-miR-143-3p	5458	0,824	92	mmu-miR-218-5p	276	0,042
18	mmu-miR-24-3p	5134	0,775	93	mmu-miR-672-5p	273	0,041
19	mmu-miR-181a-5p	5023	0,758	94	mmu-miR-103-3p	273	0,041
20	mmu-miR-151-3p	4730	0,714	95	mmu-miR-501-3p	265	0,040
21	mmu-let-7d-5p	4678	0,706	96	mmu-miR-872-5p	262	0,040
22	mmu-miR-27b-3p	4591	0,693	97	mmu-miR-10a-5p	257	0,039
23	mmu-miR-125b-5p	4200	0,634	98	mmu-miR-381-3p	254	0,038
24	mmu-miR-423-5p ⁽¹⁾	3899	0,588	99	mmu-miR-93-5p	240	0,036
25	mmu-miR-99b-5p	3802	0,574	100	mmu-miR-92b-3p	239	0,036
26	mmu-miR-125a-5p	3592	0,542	101	mmu-miR-185-5p	237	0,036
27	mmu-miR-30a-5p	3412	0,515	102	mmu-miR-145a-3p ⁽¹⁾	237	0,036
28	mmu-miR-328-3p	3380	0,510	103	mmu-miR-342-5p	234	0,035
29	mmu-miR-423-3p	3337	0,504	104	mmu-miR-22-5p	231	0,035
30	mmu-miR-192-5p ⁽¹⁾	3264	0,492	105	mmu-miR-383-5p	231	0,035
31	mmu-miR-9-3p	3246	0,490	106	mmu-miR-1843b-5p	228	0,034
32	mmu-miR-320-3p	3033	0,458	107	mmu-miR-146a-5p	228	0,034
33	mmu-miR-22-3p	3024	0,456	108	mmu-miR-488-3p	225	0,034
34	mmu-miR-30c-5p	2816	0,425	109	mmu-miR-345-3p	220	0,033
35	mmu-miR-338-5p	2625	0,396	110	mmu-miR-101a-3p	219	0,033
36	mmu-miR-25-3p	2392	0,361	111	mmu-miR-16-5p	211	0,032
37	mmu-miR-21a-5p	2384	0,360	112	mmu-miR-183-5p	209	0,031
38	mmu-let-7d-3p	2158	0,326	113	mmu-miR-340-3p	202	0,031
39	mmu-miR-744-5p	2011	0,304	114	mmu-miR-6540-5p	201	0,030
40	mmu-miR-191-5p	1715	0,259	115	mmu-miR-485-5p	199	0,030
41	mmu-miR-541-5p	1651	0,249	116	mmu-miR-330-3p	198	0,030
42	mmu-miR-1198-5p	1621	0,245	117	mmu-miR-770-3p	197	0,030
43	mmu-miR-298-5p	1551	0,234	118	mmu-miR-20a-5p	196	0,030
44	mmu-miR-98-5p	1389	0,210	119	mmu-miR-411-5p	193	0,029
45	mmu-miR-181d-5p	1330	0,201	120	mmu-miR-690	193	0,029
46	mmu-miR-100-5p	1258	0,190	121	mmu-let-7a-1-3p ^(***)	190	0,029
47	mmu-miR-674-3p	1183	0,178	122	mmu-miR-139-5p	183	0,028
48	mmu-miR-29a-3p	1103	0,166	123	mmu-miR-152-3p	181	0,027
49	mmu-miR-127-3p	1073	0,162	124	mmu-miR-344f-3p	177	0,027
50	mmu-miR-30a-3p	984	0,148	125	mmu-miR-7a-5p	176	0,027
51	mmu-let-7e-5p	981	0,148	126	mmu-miR-1983	174	0,026
52	mmu-miR-382-5p	909	0,137	127	mmu-miR-23b-3p	171	0,026
53	mmu-miR-148b-3p	785	0,118	128	mmu-miR-671-3p	166	0,025
54	mmu-miR-434-5p	769	0,116	129	mmu-miR-378a-3p	163	0,025
55	mmu-miR-26b-5p	739	0,112	130	mmu-miR-337-5p	161	0,024
56	mmu-miR-27a-3p	731	0,110	131	mmu-miR-322-3p	159	0,024

57	mmu-miR-409-3p	730	0,110	132	mmu-miR-669c-5p	155	0,023
58	mmu-miR-532-5p	662	0,100	133	mmu-miR-503-3p	154	0,023
59	mmu-miR-30e-5p	616	0,093	134	mmu-miR-676-3p	154	0,023
60	mmu-miR-370-3p	613	0,092	135	mmu-miR-1298-5p	143	0,022
61	mmu-miR-484	606	0,091	136	mmu-miR-543-3p	141	0,021
62	mmu-miR-379-5p	605	0,091	137	mmu-miR-10b-5p	140	0,021
63	mmu-miR-1981-5p	597	0,090	138	mmu-let-7b-3p	135	0,020
64	mmu-miR-149-5p	595	0,090	139	mmu-miR-23a-3p	130	0,020
65	mmu-miR-138-5p	584	0,088	140	mmu-miR-3099-3p	125	0,019
66	mmu-miR-340-5p	562	0,085	141	mmu-miR-369-5p	119	0,018
67	mmu-miR-760-3p	533	0,080	142	mmu-miR-17-5p	115	0,017
68	mmu-miR-361-3p	523	0,079	143	mmu-miR-187-3p	113	0,017
69	mmu-miR-346-5p	511	0,077	144	mmu-miR-1249-3p	111	0,017
70	mmu-miR-194-5p	482	0,073	145	mmu-miR-3535	104	0,016
71	mmu-miR-486a-5p (*)	470	0,071	146	mmu-miR-182-5p	103	0,016
72	mmu-miR-30e-3p	448	0,068	147	mmu-miR-330-5p	102	0,015
73	mmu-miR-296-3p	444	0,067	148	mmu-miR-101b-3p	100	0,015
74	mmu-miR-598-3p	429	0,065	149	mmu-miR-132-3p	98	0,015
75	mmu-miR-204-5p	422	0,064	150	mmu-miR-1843a-5p	97	0,015

* mmu-miR-486b-5 | ** mmu-miR-199b-3p | *** mmu-let-7c-2-3p | ⁽¹⁾ miRNAs in DGE (3.5.8, S. 81)

Tabelle 7-6: Top150 miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 von oligodendroglialen extrazellulären Vesikeln ohne NS21 (EVsØNS21) während der Isolations-Periode. Top10 miRNA aus Medium-Kontrolle: rote Schrift. n=5.

Position	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent	Position	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent
1	mmu-let-7c-5p	85233	13,652	76	mmu-miR-340-3p	446	0,071
2	mmu-let-7i-5p	71477	11,448	77	mmu-miR-103-3p	436	0,070
3	mmu-miR-9-5p	40952	6,559	78	mmu-miR-22-3p	429	0,069
4	mmu-miR-99a-5p	38716	6,201	79	mmu-miR-1839-5p	421	0,067
5	mmu-let-7f-5p	38128	6,107	80	mmu-miR-296-3p	401	0,064
6	mmu-let-7b-5p	36055	5,775	81	mmu-miR-672-5p	395	0,063
7	mmu-miR-26a-5p	31985	5,123	82	mmu-miR-411-5p	366	0,059
8	mmu-let-7a-5p	31399	5,029	83	mmu-miR-129-5p	358	0,057
9	mmu-miR-128-3p	24939	3,994	84	mmu-miR-27a-3p	358	0,057
10	mmu-miR-30d-5p	18619	2,982	85	mmu-miR-99b-3p	352	0,056
11	mmu-let-7g-5p	17480	2,800	86	mmu-miR-125b-1-3p	350	0,056
12	mmu-miR-219a-2-3p	17279	2,767	87	mmu-miR-186-5p	349	0,056
13	mmu-let-7d-5p	11134	1,783	88	mmu-miR-344-3p	338	0,054
14	mmu-miR-148a-3p	11043	1,769	89	mmu-miR-383-5p	337	0,054
15	mmu-miR-181b-5p	8880	1,422	90	mmu-miR-138-1-3p	336	0,054
16	mmu-miR-181a-5p	7678	1,230	91	mmu-miR-342-5p	333	0,053
17	mmu-miR-99b-5p	6746	1,080	92	mmu-miR-669c-5p	330	0,053
18	mmu-miR-92a-3p	6209	0,994	93	mmu-miR-140-3p	316	0,051
19	mmu-miR-151-3p	5952	0,953	94	mmu-miR-92b-3p	304	0,049
20	mmu-miR-125b-5p	5084	0,814	95	mmu-miR-501-3p	303	0,048
21	mmu-miR-125a-5p	5011	0,803	96	mmu-miR-126a-3p	295	0,047
22	mmu-miR-24-3p	3993	0,640	97	mmu-miR-218-5p	293	0,047
23	mmu-miR-27b-3p	3935	0,630	98	mmu-miR-6540-5p	291	0,047
24	mmu-miR-30c-5p	3404	0,545	99	mmu-miR-381-3p	289	0,046
25	mmu-miR-328-3p	3239	0,519	100	mmu-miR-93-5p	283	0,045
26	mmu-miR-9-3p	3176	0,509	101	mmu-miR-146a-5p	268	0,043
27	mmu-miR-338-5p	3008	0,482	102	mmu-miR-16-5p	264	0,042
28	mmu-miR-423-3p	2776	0,445	103	mmu-miR-23b-3p	259	0,041
29	mmu-miR-320-3p	2749	0,440	104	mmu-miR-488-3p	258	0,041
30	mmu-let-7d-3p	2665	0,427	105	mmu-miR-345-3p	253	0,041
31	mmu-miR-744-5p	2661	0,426	106	mmu-miR-185-5p	251	0,040
32	mmu-miR-98-5p	2640	0,423	107	mmu-miR-872-5p	249	0,040
33	mmu-let-7e-5p	2612	0,418	108	mmu-miR-344f-3p	247	0,039
34	mmu-miR-21a-5p	2499	0,400	109	mmu-miR-342-3p	245	0,039
35	mmu-miR-541-5p	2224	0,356	110	mmu-miR-671-3p	240	0,038
36	mmu-miR-191-5p	2083	0,334	111	mmu-miR-330-5p	238	0,038
37	mmu-miR-30a-5p	2081	0,333	112	mmu-miR-1843b-5p	237	0,038
38	mmu-miR-25-3p	2069	0,331	113	mmu-miR-485-5p	235	0,038
39	mmu-miR-181d-5p	1805	0,289	114	mmu-miR-330-3p	232	0,037
40	mmu-miR-1198-5p	1780	0,285	115	mmu-miR-20a-5p	227	0,036
41	mmu-miR-674-3p	1780	0,285	116	mmu-miR-690	212	0,034
42	mmu-miR-298-5p	1706	0,273	117	mmu-miR-770-3p	207	0,033
43	mmu-miR-423-5p	1498	0,240	118	mmu-miR-676-3p	204	0,033
44	mmu-miR-127-3p	1402	0,225	119	mmu-miR-322-3p	196	0,031

45	mmu-miR-143-3p	1336	0,214	120	mmu-let-7a-1-3p (**)	195	0,031
46	mmu-miR-30a-3p	1073	0,172	121	mmu-miR-7a-5p	194	0,031
47	mmu-miR-434-5p	1012	0,162	122	mmu-miR-1983	191	0,031
48	mmu-miR-1981-5p	961	0,154	123	mmu-miR-3968	184	0,029
49	mmu-miR-100-5p	961	0,154	124	mmu-miR-1249-3p	183	0,029
50	mmu-miR-379-5p	957	0,153	125	mmu-miR-337-5p	179	0,029
51	mmu-miR-26b-5p	936	0,150	126	mmu-miR-1298-5p	176	0,028
52	mmu-miR-382-5p	874	0,140	127	mmu-miR-543-3p	170	0,027
53	mmu-miR-370-3p	841	0,135	128	mmu-miR-503-3p	167	0,027
54	mmu-miR-532-5p	765	0,123	129	mmu-miR-378a-3p	165	0,026
55	mmu-miR-122-5p	747	0,120	130	mmu-let-7b-3p	163	0,026
56	mmu-miR-484	695	0,111	131	mmu-miR-369-5p	156	0,025
57	mmu-miR-148b-3p	673	0,108	132	mmu-miR-17-5p	152	0,024
58	mmu-miR-149-5p	650	0,104	133	mmu-miR-3099-3p	152	0,024
59	mmu-miR-409-3p	647	0,104	134	mmu-miR-1964-3p	143	0,023
60	mmu-miR-30e-3p	609	0,097	135	mmu-miR-212-5p	137	0,022
61	mmu-miR-760-3p	589	0,094	136	mmu-miR-1843a-5p	136	0,022
62	mmu-miR-361-3p	581	0,093	137	mmu-miR-3535	135	0,022
63	mmu-miR-106b-3p	577	0,092	138	mmu-miR-183-5p	134	0,021
64	mmu-miR-340-5p	576	0,092	139	mmu-miR-130b-5p	131	0,021
65	mmu-miR-138-5p	562	0,090	140	mmu-miR-325-5p	127	0,020
66	mmu-miR-434-3p	546	0,087	141	mmu-miR-7688-5p	125	0,020
67	mmu-miR-29a-3p	542	0,087	142	mmu-miR-877-5p	124	0,020
68	mmu-miR-351-5p	528	0,085	143	mmu-miR-187-3p	122	0,019
69	mmu-miR-598-3p	518	0,083	144	mmu-miR-101b-3p	119	0,019
70	mmu-miR-146b-5p	495	0,079	145	mmu-miR-192-5p	117	0,019
71	mmu-miR-346-5p	492	0,079	146	mmu-miR-140-5p	113	0,018
72	mmu-miR-433-3p	487	0,078	147	mmu-miR-7033-5p	110	0,018
73	mmu-miR-486a-5p (*)	479	0,077	148	mmu-miR-203-3p	102	0,016
74	mmu-miR-30e-5p	457	0,073	149	mmu-miR-181a-1-3p	98	0,016
75	mmu-miR-204-5p	450	0,072	150	mmu-miR-374b-5p	90	0,014

* mmu-miR-486b-5p | ** mmu-let-7c-2-3p

Tabelle 7-7: Top150 miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 von oligodendroglialen extrazellulären Vesikeln ohne NS21 und mit Glutamat und D/L-Serin Stimulation während der Isolations-Phase (SEVsØNS21). n=4.

Position	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent	Position	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent
1	mmu-let-7i-5p	135489	15,874	76	mmu-miR-433-3p	499	0,058
2	mmu-let-7c-5p	123244	14,440	77	mmu-miR-671-3p	471	0,055
3	mmu-let-7f-5p	74843	8,769	78	mmu-miR-143-3p	469	0,055
4	mmu-miR-9-5p	61648	7,223	79	mmu-miR-598-3p	465	0,054
5	mmu-let-7a-5p	56117	6,575	80	mmu-miR-296-3p	447	0,052
6	mmu-let-7b-5p	44686	5,235	81	mmu-miR-486a-5p (*)	442	0,052
7	mmu-miR-26a-5p	44064	5,163	82	mmu-miR-27a-3p	439	0,051
8	mmu-miR-99a-5p	33589	3,935	83	mmu-miR-218-5p	429	0,050
9	mmu-miR-128-3p	25229	2,956	84	mmu-miR-1839-5p	429	0,050
10	mmu-miR-219a-2-3p	19818	2,322	85	mmu-miR-346-5p	416	0,049
11	mmu-let-7g-5p	19290	2,260	86	mmu-miR-342-5p	409	0,048
12	mmu-let-7d-5p	16910	1,981	87	mmu-miR-411-5p	405	0,047
13	mmu-miR-30d-5p	14367	1,683	88	mmu-miR-672-5p	393	0,046
14	mmu-miR-148a-3p	11222	1,315	89	mmu-miR-330-3p	388	0,045
15	mmu-miR-181b-5p	7608	0,891	90	mmu-miR-106b-3p	370	0,043
16	mmu-miR-151-3p	7479	0,876	91	mmu-miR-485-5p	358	0,042
17	mmu-miR-99b-5p	6970	0,817	92	mmu-miR-330-5p	344	0,040
18	mmu-miR-181a-5p	6152	0,721	93	mmu-miR-344-3p	340	0,040
19	mmu-miR-328-3p	6026	0,706	94	mmu-miR-29a-3p	336	0,039
20	mmu-miR-125a-5p	5827	0,683	95	mmu-miR-1249-3p	324	0,038
21	mmu-miR-125b-5p	5749	0,674	96	mmu-miR-16-5p	313	0,037
22	mmu-miR-98-5p	5525	0,647	97	mmu-miR-6540-5p	311	0,036
23	mmu-miR-338-5p	4875	0,571	98	mmu-miR-383-5p	306	0,036
24	mmu-miR-24-3p	4465	0,523	99	mmu-let-7b-3p	303	0,036
25	mmu-miR-21a-5p	4417	0,517	100	mmu-miR-1843b-5p	302	0,035
26	mmu-miR-27b-3p	4203	0,492	101	mmu-let-7a-1-3p (**)	301	0,035
27	mmu-let-7e-5p	4146	0,486	102	mmu-miR-434-3p	299	0,035
28	mmu-miR-744-5p	3819	0,447	103	mmu-miR-185-5p	286	0,034
29	mmu-let-7d-3p	3735	0,438	104	mmu-miR-186-5p	281	0,033
30	mmu-miR-92a-3p	3622	0,424	105	mmu-miR-501-3p	275	0,032
31	mmu-miR-9-3p	3577	0,419	106	mmu-miR-138-1-3p	266	0,031
32	mmu-miR-423-5p	3485	0,408	107	mmu-miR-337-5p	247	0,029

33	mmu-miR-423-3p	3366	0,394	108	mmu-miR-93-5p	243	0,028
34	mmu-miR-100-5p	3151	0,369	109	mmu-miR-543-3p	234	0,027
35	mmu-miR-541-5p	2961	0,347	110	mmu-miR-99b-3p	231	0,027
36	mmu-miR-30c-5p	2535	0,297	111	mmu-miR-770-3p	230	0,027
37	mmu-miR-320-3p	2475	0,290	112	mmu-miR-676-3p	224	0,026
38	mmu-miR-1198-5p	2212	0,259	113	mmu-miR-351-5p	222	0,026
39	mmu-miR-191-5p	2091	0,245	114	mmu-miR-381-3p	212	0,025
40	mmu-miR-92b-3p	1846	0,216	115	mmu-miR-690	208	0,024
41	mmu-miR-674-3p	1775	0,208	116	mmu-miR-345-3p	206	0,024
42	mmu-miR-30a-5p	1746	0,205	117	mmu-miR-23b-3p	205	0,024
43	mmu-miR-379-5p	1634	0,191	118	mmu-miR-212-5p	203	0,024
44	mmu-miR-25-3p	1518	0,178	119	mmu-miR-92b-5p	201	0,024
45	mmu-miR-127-3p	1431	0,168	120	mmu-miR-669c-5p	200	0,023
46	mmu-miR-26b-5p	1429	0,167	121	mmu-miR-1843b-3p	198	0,023
47	mmu-miR-298-5p	1402	0,164	122	mmu-miR-20a-5p	193	0,023
48	mmu-miR-129-5p	1258	0,147	123	mmu-miR-488-3p	188	0,022
49	mmu-miR-181d-5p	1240	0,145	124	mmu-miR-140-5p	188	0,022
50	mmu-miR-204-5p	1185	0,139	125	mmu-miR-369-5p	181	0,021
51	mmu-miR-340-5p	1157	0,136	126	mmu-miR-1983	181	0,021
52	mmu-miR-122-5p	1113	0,130	127	mmu-miR-3968	180	0,021
53	mmu-miR-1981-5p	1024	0,120	128	mmu-miR-140-3p	178	0,021
54	mmu-miR-125b-1-3p	984	0,115	129	mmu-miR-344f-3p	166	0,019
55	mmu-miR-409-3p	936	0,110	130	mmu-miR-1843a-5p	166	0,019
56	mmu-miR-30a-3p	934	0,109	131	mmu-miR-101b-3p	165	0,019
57	mmu-miR-149-5p	928	0,109	132	mmu-miR-7688-5p	148	0,017
58	mmu-miR-382-5p	803	0,094	133	mmu-miR-146a-5p	145	0,017
59	mmu-miR-148b-3p	799	0,094	134	mmu-miR-181a-1-3p	141	0,016
60	mmu-miR-370-3p	789	0,092	135	mmu-miR-1964-3p	139	0,016
61	mmu-miR-340-3p	774	0,091	136	mmu-miR-192-5p	138	0,016
62	mmu-miR-434-5p	768	0,090	137	mmu-miR-325-5p	136	0,016
63	mmu-miR-146b-5p	747	0,087	138	mmu-miR-187-3p	135	0,016
64	mmu-miR-484	732	0,086	139	mmu-miR-101a-3p	135	0,016
65	mmu-miR-30e-3p	722	0,085	140	mmu-miR-342-3p	134	0,016
66	mmu-miR-532-5p	718	0,084	141	mmu-miR-130b-5p	133	0,016
67	mmu-miR-361-3p	692	0,081	142	mmu-miR-17-5p	131	0,015
68	mmu-miR-22-3p	691	0,081	143	mmu-miR-877-5p	130	0,015
69	mmu-miR-7a-5p	636	0,075	144	mmu-miR-3099-3p	127	0,015
70	mmu-miR-760-3p	616	0,072	145	mmu-miR-126a-3p	127	0,015
71	mmu-miR-103-3p	601	0,070	146	mmu-miR-505-5p	123	0,014
72	mmu-miR-138-5p	597	0,070	147	mmu-miR-222-3p	118	0,014
73	mmu-miR-30e-5p	575	0,067	148	mmu-miR-378a-3p	113	0,013
74	mmu-miR-872-5p	547	0,064	149	mmu-miR-503-3p	111	0,013
75	mmu-miR-1298-5p	515	0,060	150	mmu-miR-134-5p	107	0,013

* mmu-miR-486b-5p | ** mmu-let-7c-2-3p

Tabelle 7-8: Top150 miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 der Medium-Kontrolle (MKON). Linie markiert Top10 miRNAs. n=3.

Position	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent	Position	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent
1	mmu-miR-122-5p ⁽¹⁾	1653292	65,390	76	mmu-miR-127-3p	99	0,004
2	mmu-miR-148a-3p	567951	22,463	77	mmu-miR-455-5p	99	0,004
3	mmu-let-7b-5p	47572	1,882	78	mmu-miR-339-5p	98	0,004
4	mmu-miR-143-3p	40920	1,618	79	mmu-miR-16-5p	95	0,004
5	mmu-miR-423-5p ⁽¹⁾	34214	1,353	80	mmu-miR-224-5p	95	0,004
6	mmu-miR-99a-5p	22237	0,880	81	mmu-miR-361-5p	94	0,004
7	mmu-miR-192-5p ⁽¹⁾	18539	0,733	82	mmu-miR-30c-5p	93	0,004
8	mmu-miR-22-3p	18401	0,728	83	mmu-miR-28a-5p	93	0,004
9	mmu-miR-125a-5p	14886	0,589	84	mmu-miR-378a-3p	90	0,004
10	mmu-miR-27b-3p	10876	0,430	85	mmu-miR-340-5p	87	0,003
11	mmu-miR-30a-5p	8569	0,339	86	mmu-miR-32-5p	83	0,003
12	mmu-miR-30d-5p	5634	0,223	87	mmu-let-7b-3p	80	0,003
13	mmu-miR-21a-5p	5513	0,218	88	mmu-miR-146b-5p	78	0,003
14	mmu-miR-24-3p	4853	0,192	89	mmu-miR-200b-3p	78	0,003
15	mmu-miR-26a-5p	4315	0,171	90	mmu-let-7a-1-3p ^(***)	75	0,003
16	mmu-miR-100-5p	3477	0,138	91	mmu-miR-140-5p	73	0,003
17	mmu-miR-194-5p	3474	0,137	92	mmu-miR-181b-5p	72	0,003
18	mmu-miR-125b-5p	3359	0,133	93	mmu-miR-222-3p	71	0,003
19	mmu-let-7i-5p	3261	0,129	94	mmu-miR-8117	69	0,003
20	mmu-miR-27a-3p	2973	0,118	95	mmu-miR-361-3p	68	0,003
21	mmu-miR-10a-5p	2792	0,110	96	mmu-let-7k	68	0,003

22	mmu-miR-128-3p	2695	0,107	97	mmu-miR-451a	67	0,003
23	mmu-miR-101a-3p	2632	0,104	98	mmu-miR-342-5p	66	0,003
24	mmu-miR-126a-3p	2585	0,102	99	mmu-miR-20a-5p	65	0,003
25	mmu-miR-29a-3p	2449	0,097	100	mmu-miR-382-5p	65	0,003
26	mmu-let-7a-5p	2407	0,095	101	mmu-let-7e-5p	64	0,003
27	mmu-miR-423-3p	2143	0,085	102	mmu-miR-19b-3p	63	0,002
28	mmu-miR-320-3p	2106	0,083	103	mmu-miR-365-1-5p	62	0,002
29	mmu-miR-92a-3p	1744	0,069	104	mmu-miR-92b-3p	59	0,002
30	mmu-miR-10b-5p	1704	0,067	105	mmu-miR-139-3p	52	0,002
31	mmu-miR-25-3p	1564	0,062	106	mmu-miR-9-5p	51	0,002
32	mmu-miR-151-3p	1463	0,058	107	mmu-miR-326-3p	51	0,002
33	mmu-let-7g-5p	1435	0,057	108	mmu-miR-365-3p	50	0,002
34	mmu-miR-145a-3p ⁽¹⁾	1418	0,056	109	mmu-miR-425-5p	47	0,002
35	mmu-let-7f-5p	1305	0,052	110	mmu-miR-195a-3p	44	0,002
36	mmu-miR-30e-5p	1253	0,050	111	mmu-miR-744-5p	43	0,002
37	mmu-miR-152-3p	1243	0,049	112	mmu-miR-19a-3p	42	0,002
38	mmu-miR-99b-5p	1231	0,049	113	mmu-miR-181a-2-3p	39	0,002
39	mmu-miR-148b-3p	1190	0,047	114	mmu-miR-411-5p	39	0,002
40	mmu-miR-199a-3p ^(*)	1138	0,045	115	mmu-miR-101c	39	0,002
41	mmu-let-7d-3p	916	0,036	116	mmu-miR-24-1-5p	39	0,002
42	mmu-let-7c-5p	914	0,036	117	mmu-miR-5119	39	0,002
43	mmu-miR-409-3p	858	0,034	118	mmu-miR-7a-5p	39	0,002
44	mmu-miR-203-3p	839	0,033	119	mmu-miR-218-5p	37	0,001
45	mmu-miR-26b-5p	800	0,032	120	mmu-miR-214-5p	33	0,001
46	mmu-miR-22-5p	797	0,032	121	mmu-miR-338-5p	32	0,001
47	mmu-miR-139-5p	706	0,028	122	mmu-miR-106b-3p	30	0,001
48	mmu-miR-142a-5p	585	0,023	123	mmu-miR-29c-3p	30	0,001
49	mmu-miR-486a-5p ^(**)	572	0,023	124	mmu-miR-200c-3p	30	0,001
50	mmu-miR-181a-5p	515	0,020	125	mmu-miR-15a-5p	29	0,001
51	mmu-miR-193b-5p	514	0,020	126	mmu-miR-206-3p	29	0,001
52	mmu-miR-30a-3p	441	0,017	127	mmu-miR-1306-3p	29	0,001
53	mmu-miR-186-5p	414	0,016	128	mmu-miR-204-5p	29	0,001
54	mmu-miR-214-3p	412	0,016	129	mmu-miR-155-5p	28	0,001
55	mmu-miR-543-3p	330	0,013	130	mmu-miR-345-3p	28	0,001
56	mmu-miR-532-5p	256	0,010	131	mmu-miR-148a-5p	27	0,001
57	mmu-miR-200a-3p ⁽¹⁾	249	0,010	132	mmu-miR-499-5p	26	0,001
58	mmu-miR-140-3p	238	0,009	133	mmu-miR-126a-5p	25	0,001
59	mmu-miR-379-5p	214	0,008	134	mmu-miR-760-3p	25	0,001
60	mmu-miR-191-5p	190	0,008	135	mmu-miR-24-2-5p	23	0,001
61	mmu-miR-185-5p	184	0,007	136	mmu-miR-150-5p	23	0,001
62	mmu-miR-328-3p	182	0,007	137	mmu-miR-28a-3p	22	0,001
63	mmu-miR-193a-5p	181	0,007	138	mmu-miR-193b-3p	22	0,001
64	mmu-miR-1a-3p	179	0,007	139	mmu-miR-29b-3p	22	0,001
65	mmu-miR-375-3p	179	0,007	140	mmu-miR-183-5p	21	0,001
66	mmu-miR-30e-3p	169	0,007	141	mmu-miR-93-5p	21	0,001
67	mmu-miR-103-3p	156	0,006	142	mmu-miR-484	19	0,001
68	mmu-miR-1839-5p	145	0,006	143	mmu-miR-485-5p	19	0,001
69	mmu-miR-199a-5p	135	0,005	144	mmu-miR-574-3p	17	0,001
70	mmu-miR-495-3p	131	0,005	145	mmu-miR-221-3p	17	0,001
71	mmu-miR-195a-5p	125	0,005	146	mmu-miR-149-5p	17	0,001
72	mmu-let-7d-5p	121	0,005	147	mmu-miR-1306-5p	17	0,001
73	mmu-miR-708-3p	116	0,005	148	mmu-miR-429-3p	17	0,001
74	mmu-miR-98-5p	102	0,004	149	mmu-miR-182-5p	16	0,001
75	mmu-miR-122-3p	100	0,004	150	mmu-miR-30b-5p	16	0,001

* mmu-miR-199b-3p | ** mmu-miR-486b-5p | *** mmu-let-7c-2-3p | ⁽¹⁾ miRNAs in DGE (3.5.8, S. 81)

Tabelle 7-9: Top miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 der RNase-behandelten Medium-Kontrolle (MR). Grenzwert: 10 Reads. n=3.

Position	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent	Position	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent
1	mmu-miR-122-5p	143542	77,294	31	mmu-miR-27a-3p	44	0,024
2	mmu-miR-423-5p	12533	6,749	32	mmu-miR-10b-5p	42	0,023
3	mmu-miR-148a-3p	9841	5,299	33	mmu-miR-193a-5p	37	0,020
4	mmu-miR-22-3p	6319	3,403	34	mmu-miR-194-5p	34	0,018
5	mmu-miR-99a-5p	3779	2,035	35	mmu-miR-199a-3p ^(*)	34	0,018
6	mmu-let-7b-5p	3036	1,635	36	mmu-miR-101a-3p	33	0,018
7	mmu-miR-320-3p	2110	1,136	37	mmu-let-7a-5p	32	0,017
8	mmu-miR-100-5p	432	0,232	38	mmu-miR-486a-5p ^(**)	32	0,017
9	mmu-miR-24-3p	393	0,211	39	mmu-miR-25-3p	30	0,016
10	mmu-miR-30a-5p	357	0,192	40	mmu-let-7d-3p	30	0,016

11	mmu-miR-125b-5p	248	0,134	41	mmu-miR-148b-3p	29	0,016
12	mmu-miR-27b-3p	244	0,131	42	mmu-miR-181a-5p	29	0,015
13	mmu-miR-192-5p	187	0,101	43	mmu-miR-186-5p	25	0,014
14	mmu-miR-30d-5p	175	0,094	44	mmu-miR-26a-5p	24	0,013
15	mmu-miR-143-3p	162	0,087	45	mmu-miR-127-3p	24	0,013
16	mmu-miR-423-3p	159	0,086	46	mmu-miR-92a-3p	23	0,012
17	mmu-miR-151-3p	139	0,075	47	mmu-miR-409-3p	22	0,012
18	mmu-miR-21a-5p	124	0,067	48	mmu-miR-412-5p	21	0,011
19	mmu-let-7i-5p	117	0,063	49	mmu-miR-30e-3p	20	0,011
20	mmu-miR-125a-5p	111	0,060	50	mmu-miR-342-5p	19	0,010
21	mmu-miR-193b-5p	109	0,059	51	mmu-miR-382-5p	19	0,010
22	mmu-miR-145a-3p	86	0,046	52	mmu-miR-5119	17	0,009
23	mmu-miR-128-3p	82	0,044	53	mmu-let-7c-5p	14	0,008
24	mmu-miR-22-5p	82	0,044	54	mmu-miR-760-3p	14	0,008
25	mmu-miR-10a-5p	75	0,040	55	mmu-miR-339-5p	14	0,007
26	mmu-miR-203-3p	75	0,040	56	mmu-miR-378a-3p	12	0,006
27	mmu-miR-99b-5p	65	0,035	57	mmu-miR-221-3p	11	0,006
28	mmu-miR-152-3p	61	0,033	58	mmu-miR-126a-3p	10	0,006
29	mmu-miR-29a-3p	59	0,032	59	mmu-miR-30a-3p	10	0,005
30	mmu-miR-30e-5p	45	0,024				

* mmu-miR-199b-3p | ** mmu-miR-486b-5p

Tabelle 7-10: Top150 miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 von RNase-behandelten oligodendroglialen extrazellulären Vesikeln mit NS21 (EVs+RNase+NB21) während der Isolations-Periode. n=2.

Position	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent	Position	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent
1	mmu-miR-122-5p	30885	36,014	76	mmu-miR-204-5p	45	0,052
2	mmu-let-7c-5p	7514	8,761	77	mmu-miR-7a-5p	42	0,049
3	mmu-let-7b-5p	6023	7,023	78	mmu-miR-501-3p	42	0,048
4	mmu-miR-99a-5p	5248	6,119	79	mmu-miR-346-5p	39	0,045
5	mmu-let-7i-5p	3782	4,409	80	mmu-miR-676-3p	38	0,044
6	mmu-miR-148a-3p	3504	4,086	81	mmu-miR-26b-5p	38	0,044
7	mmu-let-7a-5p	2090	2,436	82	mmu-miR-351-5p	37	0,043
8	mmu-miR-9-5p	1976	2,304	83	mmu-miR-532-5p	35	0,041
9	mmu-let-7f-5p	1951	2,274	84	mmu-miR-106b-3p	35	0,040
10	mmu-miR-423-5p	1577	1,839	85	mmu-miR-1839-5p	34	0,039
11	mmu-miR-128-3p	1435	1,673	86	mmu-miR-92b-3p	34	0,039
12	mmu-miR-26a-5p	1258	1,466	87	mmu-miR-149-5p	33	0,038
13	mmu-miR-30d-5p	1198	1,397	88	mmu-miR-378a-3p	32	0,037
14	mmu-miR-219a-2-3p	1132	1,320	89	mmu-miR-30e-5p	31	0,036
15	mmu-miR-320-3p	960	1,119	90	mmu-miR-690	30	0,035
16	mmu-miR-328-3p	932	1,087	91	mmu-miR-186-5p	30	0,034
17	mmu-miR-99b-5p	723	0,843	92	mmu-miR-146b-5p	30	0,034
18	mmu-miR-151-3p	715	0,834	93	mmu-miR-145a-3p	29	0,034
19	mmu-miR-125b-5p	532	0,620	94	mmu-miR-434-3p	29	0,033
20	mmu-miR-22-3p	506	0,590	95	mmu-miR-344-3p	29	0,033
21	mmu-miR-181b-5p	486	0,567	96	mmu-miR-5119	29	0,033
22	mmu-let-7d-5p	485	0,565	97	mmu-miR-671-3p	28	0,033
23	mmu-miR-143-3p	472	0,550	98	mmu-miR-29a-3p	27	0,031
24	mmu-miR-92a-3p	420	0,490	99	mmu-miR-340-5p	27	0,031
25	mmu-miR-423-3p	398	0,464	100	mmu-miR-138-1-3p	26	0,030
26	mmu-let-7g-5p	396	0,461	101	mmu-miR-126a-3p	26	0,030
27	mmu-miR-181a-5p	395	0,461	102	mmu-miR-1843b-5p	26	0,030
28	mmu-miR-125a-5p	395	0,460	103	mmu-miR-194-5p	26	0,030
29	mmu-miR-338-5p	344	0,401	104	mmu-miR-10b-5p	26	0,030
30	mmu-miR-9-3p	336	0,391	105	mmu-miR-218-5p	24	0,027
31	mmu-let-7d-3p	331	0,385	106	mmu-miR-193a-5p	24	0,027
32	mmu-miR-24-3p	311	0,363	107	mmu-miR-99b-3p	23	0,027
33	mmu-miR-541-5p	265	0,309	108	mmu-miR-193b-5p	23	0,027
34	mmu-miR-100-5p	250	0,292	109	mmu-miR-345-3p	23	0,026
35	mmu-miR-30a-5p	246	0,286	110	mmu-miR-383-5p	22	0,026
36	mmu-miR-760-3p	237	0,276	111	mmu-miR-103-3p	22	0,025
37	mmu-miR-27b-3p	234	0,273	112	mmu-miR-3099-3p	21	0,024
38	mmu-miR-21a-5p	225	0,262	113	mmu-miR-3470b	20	0,023
39	mmu-miR-744-5p	214	0,249	114	mmu-miR-199a-3p (**)	19	0,022
40	mmu-miR-1198-5p	181	0,210	115	mmu-miR-503-3p	19	0,022
41	mmu-let-7e-5p	174	0,203	116	mmu-miR-22-5p	18	0,021
42	mmu-miR-298-5p	156	0,182	117	mmu-miR-1964-3p	17	0,020
43	mmu-miR-25-3p	147	0,171	118	mmu-miR-3473b	17	0,020

44	mmu-miR-127-3p	136	0,158	119	mmu-miR-330-3p	17	0,019
45	mmu-miR-382-5p	128	0,149	120	mmu-miR-598-3p	17	0,019
46	mmu-miR-98-5p	118	0,138	121	mmu-miR-664-5p	17	0,019
47	mmu-miR-125b-1-3p	117	0,136	122	mmu-miR-1983	16	0,019
48	mmu-miR-181d-5p	112	0,131	123	mmu-miR-488-3p	16	0,019
49	mmu-miR-203-3p	100	0,116	124	mmu-miR-543-3p	16	0,018
50	mmu-miR-30c-5p	98	0,114	125	mmu-miR-411-5p	15	0,017
51	mmu-miR-484	89	0,103	126	mmu-miR-669c-5p	15	0,017
52	mmu-miR-30a-3p	80	0,093	127	mmu-miR-877-5p	15	0,017
53	mmu-miR-129-5p	79	0,092	128	mmu-let-7a-1-3p (***)	15	0,017
54	mmu-miR-486a-5p (*)	79	0,092	129	mmu-miR-23b-5p	14	0,016
55	mmu-miR-296-3p	77	0,089	130	mmu-miR-3968	14	0,016
56	mmu-miR-361-3p	75	0,087	131	mmu-miR-340-3p	14	0,016
57	mmu-miR-191-5p	74	0,086	132	mmu-miR-6540-5p	14	0,016
58	mmu-miR-433-3p	73	0,085	133	mmu-miR-486a-3p	13	0,015
59	mmu-miR-409-3p	72	0,084	134	mmu-miR-152-3p	13	0,015
60	mmu-miR-370-3p	71	0,083	135	mmu-miR-222-3p	13	0,015
61	mmu-miR-1981-5p	71	0,083	136	mmu-miR-140-3p	13	0,015
62	mmu-miR-192-5p	70	0,082	137	mmu-miR-212-5p	12	0,014
63	mmu-miR-379-5p	65	0,076	138	mmu-miR-872-5p	12	0,013
64	mmu-miR-674-3p	61	0,071	139	mmu-miR-125a-3p	12	0,013
65	mmu-miR-434-5p	59	0,068	140	mmu-miR-93-5p	12	0,013
66	mmu-miR-342-5p	55	0,064	141	mmu-let-7b-3p	12	0,013
67	mmu-miR-27a-3p	55	0,064	142	mmu-miR-351-3p	11	0,013
68	mmu-miR-485-5p	53	0,062	143	mmu-miR-1a-3p	11	0,013
69	mmu-miR-30e-3p	51	0,059	144	mmu-miR-92b-5p	11	0,012
70	mmu-miR-138-5p	49	0,057	145	mmu-miR-7688-5p	11	0,012
71	mmu-miR-770-3p	49	0,057	146	mmu-miR-342-3p	10	0,012
72	mmu-miR-10a-5p	49	0,057	147	mmu-miR-134-5p	10	0,012
73	mmu-miR-148b-3p	47	0,055	148	mmu-miR-381-3p	10	0,011
74	mmu-miR-672-5p	45	0,052	149	mmu-miR-486b-3p	10	0,011
75	mmu-miR-146a-5p	45	0,052	150	mmu-miR-5128	10	0,011

* mmu-miR-486b-5p | ** mmu-miR-199b-3p | *** mmu-let-7c-2-3p

Tabelle 7-11: Top150 miRNAs aus miRNA-Sequenzierung-2 von RNase-behandelten oligodendroglialen extrazellulären Vesikeln ohne NS21 (EVs+RNaseØNB21) während der Isolations-Periode. n=2.

Position	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent	Position	kanonische microRNA	Reads Durchschnitt	Prozent
1	mmu-let-7c-5p	9671	15,206	76	mmu-miR-486a-5p (**)	51	0,080
2	mmu-let-7b-5p	7957	12,511	77	mmu-miR-423-5p	50	0,078
3	mmu-let-7d-3p	7073	11,121	78	mmu-miR-5126	49	0,077
4	mmu-let-7d-5p	5098	8,016	79	mmu-miR-5129-5p	49	0,076
5	mmu-let-7g-5p	2486	3,909	80	mmu-miR-7669-3p	49	0,076
6	mmu-miR-10a-5p	2136	3,359	81	mmu-miR-92a-3p	49	0,076
7	mmu-let-7i-5p	1923	3,023	82	mmu-miR-5108	48	0,075
8	mmu-let-7f-5p	1832	2,881	83	mmu-miR-8101	44	0,068
9	mmu-miR-100-5p	1662	2,613	84	mmu-miR-8117	44	0,068
10	mmu-miR-125a-5p	1379	2,168	85	mmu-miR-7078-5p	43	0,067
11	mmu-miR-10b-5p	1345	2,114	86	mmu-miR-9-3p	43	0,067
12	mmu-miR-122-5p	1225	1,925	87	mmu-miR-484	42	0,065
13	mmu-miR-126a-3p	1148	1,805	88	mmu-miR-5119	39	0,061
14	mmu-miR-128-3p	1105	1,737	89	mmu-miR-8109	38	0,059
15	mmu-let-7e-5p	1054	1,656	90	mmu-miR-99a-5p	37	0,058
16	mmu-miR-143-3p	832	1,307	91	mmu-miR-142a-3p	36	0,056
17	mmu-miR-138-5p	781	1,228	92	mmu-miR-6377	35	0,054
18	mmu-miR-127-5p	779	1,225	93	mmu-miR-129-5p	33	0,052
19	mmu-miR-1258-3p	762	1,198	94	mmu-miR-12190-3p	32	0,050
20	mmu-miR-146a-5p	699	1,098	95	mmu-miR-5124a	31	0,049
21	mmu-miR-146b-5p	581	0,914	96	mmu-miR-134-5p	31	0,048
22	mmu-miR-148a-3p	554	0,870	97	mmu-miR-98-5p	30	0,047
23	mmu-miR-148b-3p	553	0,869	98	mmu-miR-9-5p	29	0,046
24	mmu-miR-181a-5p	440	0,691	99	mmu-let-7a-1-3p (***)	28	0,044
25	mmu-miR-183-5p	428	0,672	100	mmu-miR-151-5p	28	0,043
26	mmu-miR-151-3p	408	0,641	101	mmu-miR-126a-5p	27	0,042
27	mmu-miR-184-3p	332	0,521	102	mmu-miR-17-5p	27	0,042
28	mmu-miR-199a-5p	310	0,487	103	mmu-miR-103-3p	27	0,042
29	mmu-miR-1962	305	0,479	104	mmu-miR-142a-5p	26	0,041
30	mmu-miR-1a-3p	281	0,441	105	mmu-miR-149-5p	26	0,041
31	mmu-miR-1971	278	0,436	106	mmu-miR-140-3p	26	0,040

32	mmu-miR-20b-3p	263	0,414	107	mmu-miR-150-5p	25	0,039
33	mmu-miR-205-5p	259	0,406	108	mmu-miR-101a-3p	24	0,038
34	mmu-miR-22-3p	251	0,395	109	mmu-miR-146a-3p	24	0,038
35	mmu-miR-203-3p	237	0,373	110	mmu-miR-92b-5p	24	0,037
36	mmu-miR-200b-3p	234	0,367	111	mmu-miR-139-5p	23	0,035
37	mmu-miR-204-3p	232	0,364	112	mmu-miR-101b-3p	22	0,035
38	mmu-miR-21a-5p	228	0,358	113	mmu-miR-125b-5p	22	0,034
39	mmu-miR-222-3p	195	0,306	114	mmu-miR-1895	22	0,034
40	mmu-miR-1843a-5p	192	0,301	115	mmu-miR-191-5p	22	0,034
41	mmu-miR-219a-2-3p	188	0,296	116	mmu-miR-3068-5p	21	0,033
42	mmu-miR-206-3p	181	0,284	117	mmu-miR-127-3p	20	0,031
43	mmu-miR-223-3p	162	0,254	118	mmu-miR-32-3p	19	0,030
44	mmu-miR-222-5p	161	0,253	119	mmu-miR-181d-5p	19	0,029
45	mmu-miR-221-3p	159	0,249	120	mmu-miR-384-5p	18	0,028
46	mmu-miR-26a-5p	158	0,248	121	mmu-miR-16-5p	18	0,028
47	mmu-miR-26b-5p	130	0,204	122	mmu-miR-194-5p	18	0,028
48	mmu-miR-24-3p	122	0,192	123	mmu-miR-27b-3p	17	0,026
49	mmu-miR-3068-3p	122	0,191	124	mmu-miR-335-3p	17	0,026
50	mmu-miR-29a-3p	121	0,189	125	mmu-miR-379-5p	17	0,026
51	mmu-miR-3059-3p	117	0,183	126	mmu-miR-330-3p	16	0,025
52	mmu-miR-30c-5p	116	0,182	127	mmu-miR-182-5p	16	0,024
53	mmu-let-7a-5p	106	0,166	128	mmu-miR-25-3p	16	0,024
54	mmu-miR-27a-3p	103	0,162	129	mmu-miR-342-5p	16	0,024
55	mmu-miR-199a-3p (*)	102	0,160	130	mmu-miR-3967	16	0,024
56	mmu-miR-30a-5p	102	0,160	131	mmu-miR-185-5p	15	0,024
57	mmu-miR-30d-5p	102	0,160	132	mmu-miR-193b-3p	15	0,024
58	mmu-miR-3101-3p	92	0,144	133	mmu-miR-196a-5p	15	0,024
59	mmu-miR-409-3p	86	0,135	134	mmu-miR-30e-3p	15	0,024
60	mmu-miR-320-3p	78	0,123	135	mmu-miR-363-3p	15	0,024
61	mmu-miR-344f-5p	76	0,119	136	mmu-miR-5112	15	0,024
62	mmu-miR-338-5p	74	0,116	137	mmu-miR-224-5p	14	0,022
63	mmu-miR-328-3p	73	0,115	138	mmu-miR-541-5p	14	0,022
64	mmu-miR-466i-5p	73	0,115	139	mmu-miR-654-3p	14	0,022
65	mmu-miR-3968	71	0,111	140	mmu-miR-7225-5p	14	0,022
66	mmu-miR-361-3p	66	0,103	141	mmu-miR-152-3p	13	0,020
67	mmu-miR-3960	65	0,101	142	mmu-miR-574-5p	13	0,020
68	mmu-miR-5106	63	0,098	143	mmu-miR-340-3p	13	0,020
69	mmu-miR-451a	59	0,092	144	mmu-miR-6237	13	0,020
70	mmu-miR-485-5p	59	0,092	145	mmu-miR-423-3p	12	0,018
71	mmu-miR-6914-3p	59	0,092	146	mmu-miR-708-5p	12	0,018
72	mmu-miR-493-5p	57	0,090	147	mmu-miR-93-5p	12	0,018
73	mmu-miR-425-5p	56	0,088	148	mmu-miR-30b-5p	11	0,017
74	mmu-miR-5107-5p	56	0,088	149	mmu-miR-16-2-3p	11	0,017
75	mmu-miR-744-5p	52	0,081	150	mmu-miR-1843a-3p	11	0,017

* mmu-miR-199b-3p | ** mmu-miR-486b-5p | *** mmu-let-7c-2-3p

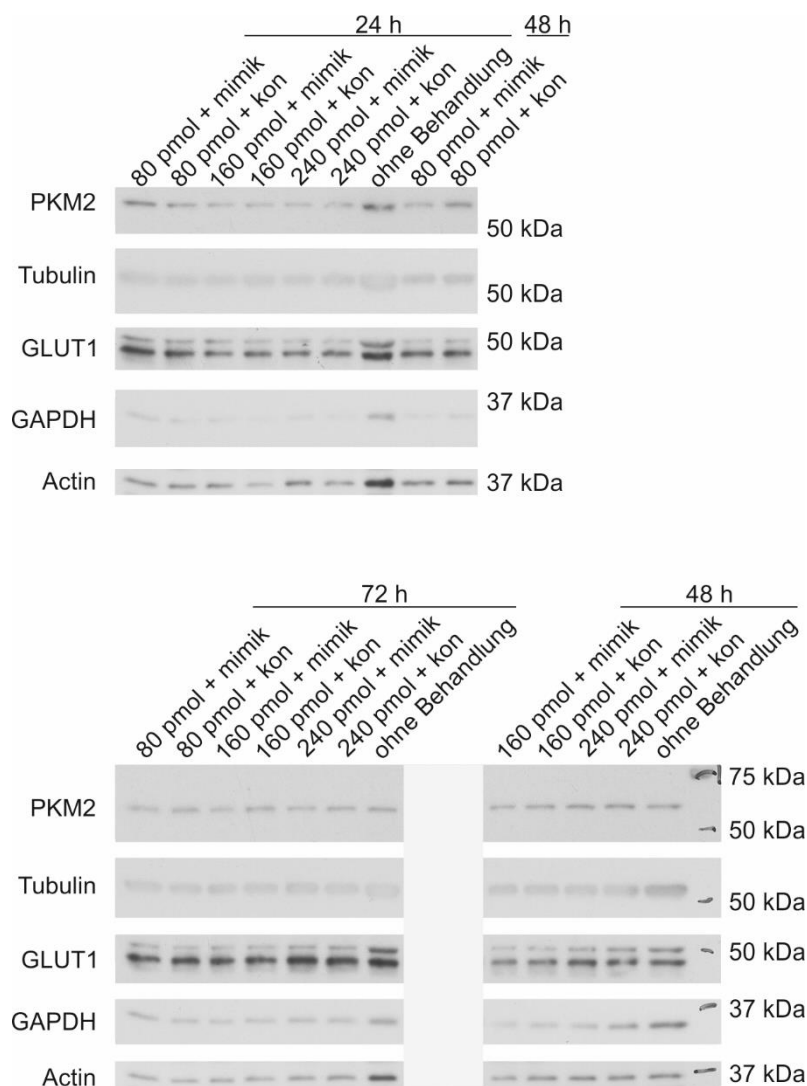


Abbildung 7-1: Westernblot von miR-122-5p-Mimik transfizierten primären Neuronen. Entwickelte und eingescannte Filme (Hyperfilme ECL, GE healthcare) zur Quantifizierung von Westernblot-Resultaten für miR-122-5p-Mimik (mimik) transfizierter primäre Neurone (pCNs) und pCN-Kontrollen (kontrollmisch-RNA).

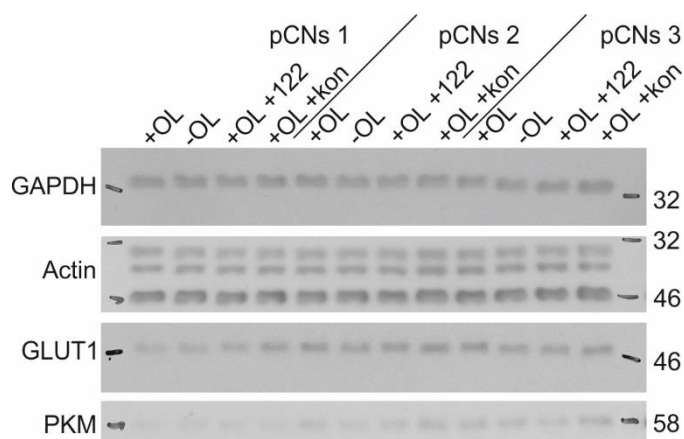


Abbildung 7-2: Westernblot von Neuronen nach Co-Kulturen mit Oligodendrozyten. Entwickelte und eingescannte Filme (Hyperfilme ECL, GE healthcare) zur Quantifizierung von Westernblot-Resultaten primärer Neurone nach Co-Kultur mit primären Oligodendrozyten (OL), ohne OL, mit OL die zuvor mit miR-122-5p-Mimik (OL +122) oder mit kontrollmisch-RNA (OL +kon) transfiziert wurden.

B. Publikationen, Vorträge und Auszeichnungen

Publikationen

Auber, M., Fröhlich, D., Drechsel, O., Karaulanov, E., & Krämer-Albers, E. M. (2019). Serum-free media supplements carry miRNAs that co-purify with extracellular vesicles. *Journal of extracellular vesicles*, 8(1), 1656042.

Poster

Auber, M., Drechsel, O., Fröhlich, D., Kou-Elsner P., Frühbeis C., & Krämer-Albers, E. M.: Analysis of small RNA in oligodendroglial exosomes. (rhine – main neuroscience network. 4th Biennial Meeting. Oberwesel 2016)

Auber, M., Hannah M., Drechsel, O., Fröhlich, D., Kou-Elsner P., Frühbeis C., & Krämer-Albers, E. M.: Analysis of small RNA in oligodendroglial exosomes. (Glial heterogeneity. SPP1757. Functional Specialisation of Neuroglia as Critical Determinants of Brain Activity. Jahrestagung. Berlin 2016)

Auber, M., Drechsel, O., Fröhlich, D., Frühbeis C., & Krämer-Albers, E. M.: Analysis of small RNA in oligodendroglial exosomes. (Focus Program Translational Neurosciences – Retreat. Mainz 2017)

Auber, M., Hannah M., Drechsel, O., & Krämer-Albers, E. M.: Serum-Free Media Supplements Carry miRNAs that Co-Purify with Extracellular Vesicles. (annual meeting international society for extracellular vesicles. Barcelona 2018)

Auber, M., Fröhlich, D., & Krämer-Albers, E. M.: Serum-Free Media Supplements Carry miRNAs that Co-Purify with Extracellular Vesicles. (9th Gene Quantification Event qPCR dPCR & NGS 2019. Freising 2019)

Wissenschaftliche Vorträge

Auber, M., Fröhlich, D., & Krämer-Albers, E. M.: Serum-Free Media Supplements Carry miRNAs that Co-Purify with Extracellular Vesicles. (9th Gene Quantification Event qPCR dPCR & NGS 2019. Freising 2019)

Auber, M.: Contaminat or not? – or how to deal with defined medium supplements carrying miRNAs in RNA-Seq of extracellular vesicles. (GSEV (*engl.* German Society for Extracellular Vesicles) & ASEV (*engl.* Austrian Society for Extracellular Vesicles) Joint Autumn Meeting Freising 2019)

Auszeichnungen

Posterpreis: Serum-Free Media Supplements Carry miRNAs that Co-Purify with Extracellular Vesicles. (annual meeting international society for extracellular vesicles. Barcelona 2018)

Fortbildung

EMBL Course: Extracellular Vesicles: from Biology to Biomedical Applications. (Heidelberg 2016)