

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie
der Medizinischen Fakultät Mannheim
Direktor: Prof. Dr. med. Harald Klüter

Etablierung einer Methode zur mRNA Detektion auf Einzelzellebene
mittels Durchflusszytometrie und Anwendung dieser zur Untersuchung
der Immunmodulation von mesenchymal stromalen Zellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Philipp Mattar

aus
Baden-Baden
2019

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Doktormutter: Frau Prof. Dr. rer. nat. Karen Bieback

Meinen Eltern.

Meinem Vater, der mich das Fragen lehrte.
Meiner Mutter, die mir das Antworten beibrachte.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	4
1.1 Simultaner Nachweis von Oberflächenmarkern, intrazellulärem Protein und mRNA mittels Durchflusszytometrie	4
1.1.1 Durchflusszytometrie	6
1.1.2 PrimeFlow RNA Assay	13
1.1.3 Polymerase Chain Reaction	19
1.1.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay	23
1.2 Mesenchymal stromale Zellen	27
1.2.1 Entdeckung und Historie	27
1.2.2 Gewinnung und Charakteristika	30
1.2.3 Klinische Anwendung von MSCs	32
1.2.4 Nebenwirkungen der Therapie mit MSCs	35
1.2.5 Immunmodulatorische Fähigkeiten	36
1.3 Zielsetzung	42
2 MATERIAL UND METHODEN	43
2.1 Material	43
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	43
2.1.2 Chemikalien	43
2.1.3 Käufliche Kits	44
2.1.4 Lösungen, Puffer und Medien	45
2.1.5 Geräte	47
2.1.6 Programme	48
2.2 Methoden	48
2.2.1 Zellen	48

2.2.2 Zellkultur	49
2.2.3 PrimeFlow RNA Assay	51
2.2.4 Polymerase Chain Reaction	54
2.2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay	56
2.2.6 Gesamtproteinassay.....	56
2.2.7 Auswertung und Statistik	56
3 ERGEBNISSE	59
3.1 Etablierung des PrimeFlow RNA Assays	60
3.1.1 Stimulation von Jurkat Zellen: PrimeFlow RNA Assay	60
3.1.2 Stimulation von PBMCs.....	64
3.2 Immunmodulatorische Fähigkeiten der MSCs	74
3.2.1 MSCs inhibieren die IFN- γ Produktion in PBMCs: PrimeFlow RNA Assay	75
3.2.2 MSCs inhibieren die IFN- γ mRNA Expression von stimulierten PBMCs: RT-qPCR.....	77
3.2.3 Im Konflikt stehende Ergebnisse zur Proteindetektion: ELISA	81
3.3 Einfluss der Glucosekonzentration auf die immunmodulatorischen Eigenschaften der MSCs	83
3.3.1 Diskrepante Ergebnisse für Effekte hoher Glucosespiegel auf die Immunmodulation durch MSCs: PrimeFlow RNA Assay	83
3.3.2 Hohe Glucosespiegel haben keinen eindeutigen Einfluss auf die Immunmodulation durch MSCs: Durchflusszytometrie	86
3.3.3 Hohe Glucosespiegel haben keinen eindeutigen Einfluss auf die Immunmodulation durch MSCs: RT-qPCR.....	88
3.3.4 Hohe Glucosespiegel haben keinen Einfluss auf die Immunmodulation durch MSCs: ELISA.....	93
3.4 Messung des Gesamtproteins in Überständen.....	94
4 DISKUSSION	97
4.1 Vor- und Nachteile des PrimeFlow RNA Assays	98
4.1.1 Betrachtung einzelner Zellpopulationen einer komplexen Gesamtheit..	98
4.1.2 Hoher Bedarf an Zellen, Kosten und Zeit	99
4.1.3 Begrenzte Erfahrungswerte und kalkulierte Versuchsplanung	100
4.2 Etablierung des PrimeFlow RNA Assays	101
4.2.1 Schlechte Bindung des CD3 Antikörpers.....	102
4.2.2 Geänderte Expression von Haushaltsgen RPL13A unter Stimulation .	103

4.3 Einfluss der Proteintransportinhibitoren	105
4.3.1 Zelluläre Toxizität von Monensin und Brefeldin A.....	105
4.3.2 Kumulative Verwendung der Proteintransportinhibitoren.....	106
4.3.3 Unterschiede in der mRNA Kinetik durch Proteintransportinhibitoren .	107
4.4 Diskrepanz zwischen RT-qPCR, PrimeFlow und ELISA Ergebnissen	108
4.4.1 Die Ebenen der Proteinproduktion.....	108
4.4.2 Mehr IFN- γ Protein bei weniger IFN- γ mRNA – geht das?	110
4.4.3 ELISA Ergebnisse – widersprüchlich aber homogen.....	112
4.4.4 IFN- γ Produktion durch mesenchymal stromale Zellen?	115
4.4.5 Unspezifische Bindung und methodische Präzision	115
4.5 Einfluss des Glucosespiegels auf mesenchymal stromale Zellen	116
4.5.1 Schwierigkeiten der Therapie mit mesenchymal stromalen Zellen	116
4.5.2 Großer Bedarf an neuen, gezielten Studien	117
4.6 IFN-γ als Parameter zur Immunmodulation	118
4.6.1 IFN- γ als Effektor für mesenchymal stromale Zellen	118
4.6.2 Unterschiedliche Anteile bestimmter Zellpopulationen	119
4.6.3 Aktivierung der mesenchymal stromalen Zellen durch IFN- γ	120
4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick	121
5 ZUSAMMENFASSUNG	124
6 LITERATURVERZEICHNIS	126
7 EIGENANTEIL AN DATENERHEBUNG UND –AUSWERTUNG UND EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	140
8 LEBENSLAUF	141
9 DANKSAGUNG	142

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
ADM	Adrenomedullin
ANOVA	Analysis of Variance
APC	Antigen präsentierende Zellen
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktoren
B2M	Beta-2-Mikroglobulin
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BP	Band Pass
bp	Basenpaare
Bref A	Brefeldin A
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CFU-F	Colony-Forming-Unit Fibroblast
CMV	Zytomegalie-Virus
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotid-Triphosphat
dsRNA	Double stranded RNA (doppelsträngige RNA)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Eph	Ephrin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FasL	Fas Ligand
FBS	Foetal Bovine Serum (Fötales Kälberserum)
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FMO	Fluorescence Minus One
FSC	Forward Scatter
Gal	Galectin
GARP	Glycoprotein A Repetitions Predominant
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GvHD	Graft versus Host Disease

HG	Hohe Glucose
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HO-1	Hämoxygenase 1
IBMIR	Instant Blood-mediated Inflammatory Reaction
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IDO	Indoleamin-2,3-Dioxygenase
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
ISCT	International Society for Cellular Therapy
LIF	Leukemia inhibiting Factor
LP	Long Pass
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MFI	Mean Fluorescence Intensity
miRNA	microRNA
MSCs	Mesenchymal stromale Zellen
• BM-MSCs	MSCs, gewonnen aus Knochenmark (bone marrow)
• LA-MSCs	MSCs, gewonnen aus Fettgewebe (lipoaspirate)
• UC-MSCs	MSCs, gewonnen aus Nabelschnurblut (umbilical cord)
MW	Mittelwert
NG	Normale Glucose
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zelle
NO	Nitric Oxide (Stickstoffmonoxid)
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF-AB	Platelet-derived Growth Factor AB
PD-L1	Programmed Death Ligand 1
PE	Phycoerythrin
PGE2	Prostaglandin E2

PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PTI	Proteintransportinhibitor
RNA	Ribonukleinsäure
RPL13A	Ribosomal Protein L13a
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-qPCR	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
SCF	Stem Cell Factor
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SDF-1	Stromal Derived Factor 1
Sema	Semaphorin
SSC	Sideward Scatter
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TSG-6	Tumor Necrosis Factor-stimulated Gene 6
UPR	Unfolded Protein Response
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1 EINLEITUNG

1.1 Simultaner Nachweis von Oberflächenmarkern, intrazellulärem Protein und mRNA mittels Durchflusszytometrie

In Folge der zunehmenden Komplexität von Zellkulturexperimenten durch Kokulturen aus mehr als zwei Zellpopulationen, 3D-Kulturen oder 3D-Miniorganen stellt sich die Herausforderung, hier biologische Prozesse zu untersuchen und den einzelnen Zellpopulationen zuordnen zu können. Mit Methoden wie RT-qPCR oder ELISA gelingt die relative Quantifizierung von RNA bzw. die Bestimmung der Konzentration eines Proteins der Gesamtheit einer Probe. Eine Aufschlüsselung nach etwaigen Subpopulationen, die unterschiedliche RNA- respektive Protein-Expressionsprofile zeigen, ist mit diesen Methoden jedoch nicht möglich.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Methode zu etablieren, die es mittels Mehrfarb-Durchflusszytometrie ermöglicht, in komplexen Zellgemischen Zellpopulationen über Oberflächenmarker zu identifizieren und gleichzeitig ihre biologische Funktion zu charakterisieren, z.B. über gebildete Proteine und mRNA. Bisherige Verfahren zur funktionellen Analyse, insbesondere intrazellulärer Prozesse, beschränkten sich auf Methoden wie Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR), Western-Blot oder Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), die jedoch das gesamte Zellgemisch, ohne Unterscheidung einzelner Zellpopulationen, untersuchen.

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, mittels fluoreszenz-markierten Antikörpern von Zellen exprimierte Oberflächenmarker oder Proteine zu markieren und anschließend gezielt nur die Zellen zu betrachten, die einen oder mehrere dieser Oberflächenmarker bzw. das Protein exprimierten. Eine Messung von spezifischen RNA bzw. DNA Segmenten ist mit der konventionellen Durchflusszytometrie nicht möglich, jedoch die unspezifische Messung von DNA und RNA (1, 2). Wollte man sowohl Informationen über die Gen- als auch die Proteinexpression einer bestimmten Subpopulation erhalten, so bestand ein Lösungsansatz darin, die Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker zu charakterisieren, sie dann mittels fluorescence-activated cell sorting (FACS) gezielt zu isolieren und anschließend eine RT-qPCR dieser bereinigten Population durchzuführen (3).

Beim FACS handelt es sich um eine Methode der Durchflusszytometrie, bei der die fluoreszenz-markierten Zellen ihrer Färbung nach in verschiedene Reagenzgefäße sortiert werden. Im Gegensatz zur klassischen Durchflusszytometrie, bei der die Zellen nach Durchlaufen des Geräts verworfen werden, können beim FACS mit den sortierten Zellen weitere Versuche (z.B. RT-qPCR) getätigt werden. Nachteil dieses Lösungsansatzes ist das umständliche Verfahren, sowie ein damit verknüpfter hoher Zeitaufwand (1).

Hier setzt die Methode des PrimeFlow RNA Assays an, welcher eine gleichzeitige Analyse von RNA, Protein und Oberflächenmarkern am Durchflusszytometer und damit die differenzierte Analyse von Subpopulationen einer Probe erlaubt (4). Die Untersuchungsmethode des PrimeFlow RNA Assays beruht auf einer Kombination aus einer Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und der branched DNA Technik (engl. branched = verzweigt). Es wird eine hohe Verstärkung (ca. 8000-fach) des Fluoreszenzsignals erzeugt, die es ermöglicht, auch geringe Mengen an gezielt fluoreszenz-markierter RNA in der Durchflusszytometrie sichtbar zu machen und bis zu drei RNA Targets gleichzeitig zu bestimmen. Porichis *et al.* adaptierten ein fluoreszenzmikroskopisches Verfahren (QuantiGene View RNA FISH Assay) dahin, dass es nun möglich war, das Fluoreszenzsignal der Zellen mittels eines Durchflusszytometers zu analysieren und gezielt die Expression bestimmter RNA Produkte in den Zellen zu untersuchen (4).

Im Vergleich zur Fluoreszenzmikroskopie hat dies einige entscheidende Vorteile: Während mit der Fluoreszenzmikroskopie durch manuelle Analyse nur einige hundert Zellen ausgewertet werden, erlaubt die Durchflusszytometrie einen Durchsatz von bis zu mehreren Millionen Zellen einer Probe. Durch Verwendung mehrerer Laser können in einem Durchflusszytometer, im Vergleich zur Fluoreszenzmikroskopie, auch deutlich mehr Fluoreszenzsignale gleichzeitig detektiert werden. Der PrimeFlow RNA Assay ermöglicht damit die gleichzeitige Analyse von RNA, intrazellulären Proteinen und Oberflächenmarkern von Zellen.

Im Unterschied zur PCR, bei der das zu analysierende Produkt vervielfältigt und gemessen wird, wird beim PrimeFlow RNA Assay nicht die RNA vervielfältigt. Es werden stattdessen, nach Bindung einer Sonde an die Zielsequenz, sog. „Preamplifier“ und „Amplifier“ angelagert, die über eine Verästelung eine Vervielfältigung der Bindungsstellen für fluoreszenz-markierte Antikörper erreichen. Diese binden dann

zielgerichtet das von der zu untersuchenden RNA Sequenz ausgehende Konstrukt. Somit wird das Fluoreszenzsignal verstärkt und damit detektierbar gemacht (Abbildung 8).

In der Ursprungsarbeit wurde der PrimeFlow RNA Assay für die zeitgleiche mRNA- und Protein-Detektion von Interferon gamma (IFN- γ) und Interleukin (IL)-2 in mit HIV und CMV infizierten T-Zellen genutzt (4). Primäres Ziel meiner Arbeit war, diese Methode in unserer Core Facility zu etablieren. Darauf aufbauend sollte, nach erfolgreicher Etablierung, die Methode für Fragestellungen unserer Arbeitsgruppe angewendet werden.

Der Fokus unserer Arbeitsgruppe liegt auf der Forschung an mesenchymal stromalen Zellen (MSCs), einer Population von Zellen mit immunmodulatorischen Eigenschaften. Deswegen wurde der PrimeFlow RNA Assay in einem Kokulturansatz aus MSCs und einer Subpopulation von Immunzellen des menschlichen Blutes, den peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), zu denen Lymphozyten (T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen) und Monozyten zählen, verwendet. Ich möchte dieses an T-Zellen etablierte Verfahren für unsere Untersuchungen über die immunmodulatorischen Effekte von MSCs auf PBMCs und deren Produktion von IFN- γ verwenden und die Vergleichbarkeit der Daten von PrimeFlow RNA Assay, RT-qPCR und ELISA näher beleuchten.

Die nachfolgenden Kapitel der Einleitung werden zunächst die verwendeten Methoden im Detail beschreiben. Anschließend wird der der Arbeit zugrundeliegende wissenschaftliche Kontext, d.h. die Untersuchung der immunmodulatorischen Eigenschaften der MSC, eingeführt.

1.1.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, bei dem mit einem sehr hohen Durchsatz einzelne Zellen an einem Lichtstrahl oder einer Spannung vorbeifließen. Diese Zellen erzeugen je nach Größe, Struktur, enthaltenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern oder Ähnlichem charakteristische Veränderungen des Lichtstrahls oder der Spannung und können so anhand ihrer Eigenschaften analysiert und sortiert werden.

Ihre erste Anwendung fand die Durchflusszytometrie in den 1940er Jahren durch Wallace H. Coulter. Er war der Namensgeber für das von ihm entdeckte „Coulter Principle“. Dieses besagt, dass Partikel in einer Lösung, welche durch eine Öffnung in einem unter Strom stehenden Material fließen, eine messbare Änderung der Leitfähigkeit (Impedanz) des Materials erzeugen. Diese Impedanzänderung ist proportional zur Größe des hindurchfließenden Partikels (5). Erzeugt wird die Impedanzänderung durch das Verdrängen von Elektrolyten durch die Partikel und der damit veränderten Leitfähigkeit. Bei der Analyse von Zellen, welche eine schlechte Leitfähigkeit haben, wird also ein verringerter Stromfluss gemessen, aus dem dann die Größe der Zellen berechnet werden kann. Dieses Verfahren vereinfachte die Anfertigung eines Blutbildes in der Labormedizin enorm. Dauerte es vor Anwendung der Zählmethode nach Coulter (engl. coulter counter) durch Anfärben und manuelle Auszählung noch über eine halbe Stunde, bis Ergebnisse vorlagen, konnte diese Zeit drastisch verkürzt werden. Anwendung findet die Methode bis heute in der Labormedizin, aber durch die mögliche Analyse vieler verschiedener Partikel, auch in der Überprüfung und Qualitätssicherung von Industrierohstoffen wie Glas und Keramik, Farben und Lacken, sowie in der Produktion von Nahrungsmitteln (6, 7).

Nach Entdeckung der impedanzbasierten Durchflusszytometrie durch Coulter wurde die Methode weiter erforscht und entwickelt. 1968 konnten Wolfgang Dittrich und Wolfgang Göhde mit der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie ein neuartiges Verfahren vorstellen (8). Konnte man mit der impedanzbasierten Durchflusszytometrie Größe und Anzahl der Zellen einer Probe bestimmen, so taten sich der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie neue Möglichkeiten auf. Es konnten damit neben der Größe und der Anzahl der Zellen nun auch Eigenschaften wie die Beschaffenheit im Innern der Zelle (Granularität) bestimmt werden. Das Verfahren erhielt den Namen Impulsfluorometrie. In den späten 60er Jahren konnte Marvin Van Dilla erstmals ein Zytophotometer bauen, welches im Gegensatz zu früheren Entwicklungen nicht mikroskopiebasiert war. Aufbauend auf den Entdeckungen von Crosland-Taylor, der es geschafft hatte, Zellen einer Lösung hintereinander aufgereiht durch eine Röhre fließen zu lassen (9), verwendete Van Dilla ein laserbasiertes Detektionssystem (10). Dieses Verfahren stellt den Grundstein der laserbasierten Durchflusszytometrie, wie wir sie heute kennen, dar.

Bei der laserbasierten Durchflusszytometrie erzeugen die fluoreszenzmarkierten Zellen beim Passieren eines Laserstrahls optische Signale in Form von

Wellenlängenänderungen und Streuung, welche mit Detektoren analysiert werden können. Voraussetzung für die Untersuchung einer Probe an einem Durchflusszytometer ist, dass die Zellen einzeln in einer Lösung vorliegen. Ist diese Voraussetzung erfüllt, so sorgt die Flusszelle (engl. flow cell), die neben den Lasern zur Detektion das Herzstück eines Durchflusszytometers darstellt, dafür, dass die Zellen von einer Hüllflüssigkeit umgeben werden und Zelle für Zelle einzeln in eine hochpräzise gefertigte Küvette aus Glas oder Quarz eintreten. Nach Durchtritt durch die Küvette werden die fluoreszenzmarkierten Zellen von unterschiedlichen Laserstrahlen angeregt und das emittierte Lichtsignal an speziell positionierten Detektoren gemessen (11). Feste Gewebstücke können nicht analysiert werden, da die Zellen hierbei nicht einzeln durch die Vorrichtung gelangen können, sondern im Verbund vorliegen.

Es kommen drei Anordnungen der Detektoren im Durchflusszytometer zum Einsatz: Detektoren, welche genau in der Richtung des vom Laserstrahl emittierten Lichts stehen, zeichnen den sogenannten „forward scatter“ (FSC) auf. Dieses Vorwärtsstreulicht entsteht durch die Brechung des Lichts im flachen Winkel an der Zelloberfläche und ist ein Maß für die Größe der Zelle.

Dem gegenübergestellt ist der „side scatter“ (SSC), das Seitwärtsstreulicht. Dieses entsteht durch die Brechung des Lichts im steilen Winkel im Innern und an der Oberfläche der Zelle. Die Stärke dieser Brechung hängt unter anderem von der Granularität, der Größe, der Beschaffenheit des Zellkerns, sowie der Anzahl der in der Zelle vorhandenen Vesikel ab (Abbildung 1). Detektoren für den side scatter stehen im rechten Winkel zum Strahl des einfallenden Lichts. Aus den kombinierten Parametern FSC und SSC lassen sich in der Durchflusszytometrie beispielsweise Leukozyten differenzieren und in Gruppen unterteilen (11) (Abbildung 2).

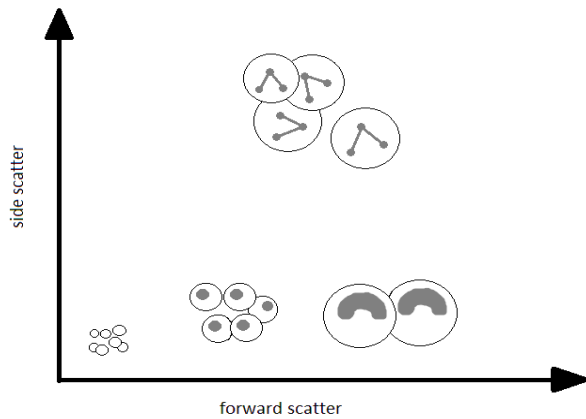
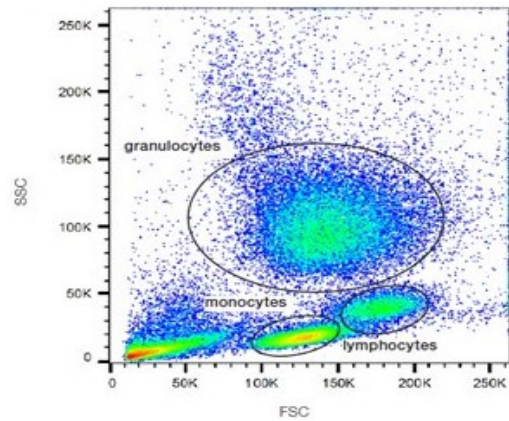


Abbildung 1: Forward und Side Scatter

Abbildung 2: Lymphozytenpopulationen¹

Durchflusszytometer sind nicht nur auf die Messung des gestreuten Lichts limitiert, man kann mit ihnen auch Fluoreszenz messen. Die Detektoren für die Fluoreszenz empfangen das Streulicht über eine Anordnung von Spiegeln und Filtern (Abbildung 3). Da die wenigsten Zellen bereits von sich aus fluoreszieren, verwendet man entweder Fluoreszenzfarbstoffe, die sich an Bestandteile der Zelle anlagern oder fluoreszenzmarkierte Antikörper.

Beispiele für Fluoreszenzfarbstoffe sind DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) und Propidiumiodid. DAPI ist ein Farbstoff, welcher an die DNA in einer Zelle bindet. Propidiumiodid interkaliert mit der DNA, d.h. es lagert sich zwischen den Basen der DNA ab. Damit lässt sich mit diesen Farbstoffen u.a. der Gesamt-DNA-Gehalt von Zellen messen und vergleichen. Propidiumiodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher die Eigenschaft besitzt, nur an DNA zu binden, wenn die Zellmembran der umgebenden Zelle zerstört ist. Bei gesunden Zellen mit intakter Zellmembran ist der Farbstoff nicht in der Lage, die Membran zu passieren und an die DNA zu binden. Er kann daher verwendet werden, um lebende von toten Zellen zu unterscheiden (11).

Neben Fluoreszenzfarbstoffen können auch Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, verwendet werden (11). Die Auswahl an verfügbaren Antikörpern ist hierbei sehr breit. Verfügbar sind Antikörper, welche gegen Oberflächenmoleküle der Zelle, z.B. Proteine mit CD-Klassifizierung (CD3, CD4, etc; CD = Cluster of differentiation) gerichtet sind, aber auch Antikörper, die an Strukturen oder Proteine im Inneren der Zelle binden. Als Beispiele wären hier IFN- γ oder ribosomale Proteine zu nennen.

¹ Quelle: <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-gates-regions.html>

Um eine Detektion intrazellulärer Proteine per Durchflusszytometrie zu ermöglichen, werden die verwendeten Zellen mit Proteintransportinhibitoren (PTI) behandelt, die zu einem Ausfall der Exkretion und so zu einer erhöhten Proteinkonzentration innerhalb der Zelle führen (11). Dies führt zu einer verbesserten Anfärbbarkeit und einem stärkeren Fluoreszenzsignal am Durchflusszytometer. Häufig verwendete Proteintransportinhibitoren sind Monensin und Brefeldin A (12), von denen beide in unseren Versuchen verwendet wurden.

Mit der Verwendung von mehreren verschiedenen Farbstoffen, Lasern mit verschiedenen Emissionsspektren und Filtern lassen sich gleichzeitig mehrere Zielmoleküle in einer Zelle analysieren. Durchflusszytometer der neueren Generationen können so ein Dutzend und mehr verschiedene fluoreszenzmarkierte Antikörper gleichzeitig erkennen (13-15). Hierbei ist darauf zu achten, dass sich die Emissionsspektren der einzelnen verwendeten Farbstoffe nicht überschneiden, sondern gut voneinander abgrenzbar sind, da sonst eine Differenzierung nicht möglich ist. Jedem Experiment am Durchflusszytometer muss daher eine Überprüfung der Kompatibilität der zu verwendenden Farbstoffe vorausgehen.

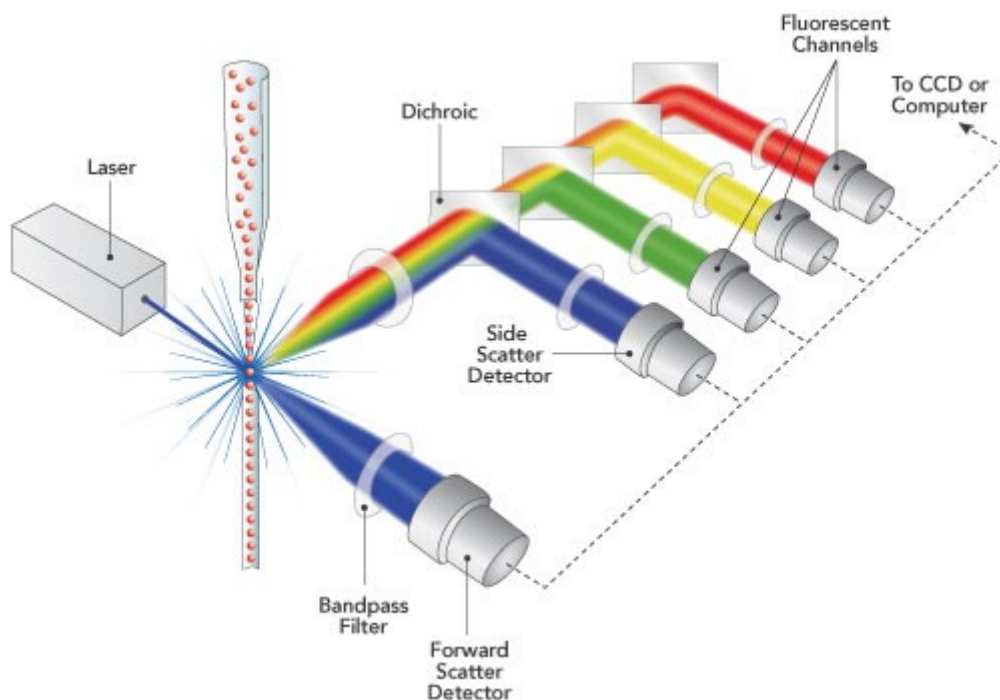


Abbildung 3: Aufbau eines Durchflusszytometers¹: Zu erkennen sind die Lichtquelle, deren Signal auf den Strom von einzelnen Zellen der Flusszelle trifft. Das gestreute Licht wird als FSC und über Anordnungen von dichroischen Spiegeln als SSC in den Detektoren gemessen. Durchflusszytometer besitzen häufig mehr als nur einen Laser, anders als in dieser Illustration dargestellt.

¹ Quelle: <http://sanguine.wpengine.com/wp-content/uploads/2013/07/flow-cytometry1.jpg>

Der Aufbau eines Durchflusszytometers setzt sich typischerweise aus folgenden Elementen zusammen (Abbildung 3):

Flusszelle (flow cell)

Diese sorgt dafür, dass die in Suspension vorliegenden Zellen von einer Hüllflüssigkeit umgeben werden, welche eine bessere Auftrennung der Zellen ermöglicht, und dann einzeln durch die Glasküvette am unteren Ende der Flusszelle wandern. Dieser Prozess der Aufreihung der Zellen wird als „hydrodynamic focussing“ bezeichnet.

Lichtquelle

Hierbei kommen meist mehrere Laser mit unterschiedlichen Emissionsspektren zum Einsatz. Das von uns genutzte Durchflusszytometer BD Canto II ist ausgestattet mit einem roten Laser (633 nm), einem blauen Laser (488 nm), sowie einem violetten Laser (403 nm).

Filter

Die Filter sorgen für eine Auftrennung des emittierten Lichtsignals auf die jeweiligen Detektoren. Sie besitzen die optische Eigenschaft, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu reflektieren und abzulenken, während sie Licht einer anderen Wellenlänge passieren lassen, ohne es abzulenken.

Detektoren

Sie dienen der Aufzeichnung des Fluoreszenzsignals. Da das Signal ein sehr schwaches ist, kommen hier sogenannte „Photomultiplier“ zum Einsatz. Dies dient dem Zweck, das Lichtsignal um ein Vielfaches zu verstärken und es so besser sichtbar zu machen. Hierbei löst ein ankommendes Photon, welches auf den Photomultiplier trifft, durch den photoelektrischen Effekt ein Elektron aus dessen Oberfläche. Dieses herausgeschleuderte Elektron wird daraufhin in einem elektrischen Feld beschleunigt und trifft auf eine weitere Elektrode (Dynode), aus der es nun mehrere Elektronen herauslöst. Die Anzahl der Elektronen nimmt von Dynode zu Dynode exponentiell zu. Am Ende des Photomultipliers erzeugen die Elektronen dann einen Spannungsabfall an einem elektrischen Widerstand, welcher das elektrische Signal darstellt.

Software zur Auswertung

Zur Auswertung der mit dem Durchflusszytometer erzeugten Daten bedarf es eines Computers mit geeigneter Software. Hierbei kommen je nach Labor und Benutzer unterschiedliche Programme zum Einsatz. Beispiele für bekannte Programme zur Analyse von Durchflusszytometrie-Daten sind FlowJo, Flow Explorer, FlowingSoftware oder Cell Quest. Die Daten der Durchflusszytometrie dieser Arbeit wurden mit dem Programm FlowJo V10 ausgewertet.

Technischen Fortschritte in der Durchflusszytometrie und der Biochemie ermöglichen es, eine immer größere Anzahl von Zielmolekülen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern simultan zu detektieren. Dies erhöht einerseits die Attraktivität und Effektivität der Durchflusszytometrie, schafft andererseits aber auch die Herausforderung einer anspruchsvollen Planung eines Experiments mit korrekten und verwertbaren Ergebnissen.

Ein erster Schritt bei der Planung eines Experiments mit mehreren zu markierenden Antigenen ist die Zuordnung der Antigene zu ihren am besten geeigneten Fluorochromen. Die unterschiedlichen Fluorochrome besitzen distinkte Exzitations- sowie Emissionsspektren und strahlen in verschiedenen Helligkeiten. So sollten beispielsweise schwach fluoreszierende Fluorochrome für Antigene mit einer hohen Expression reserviert werden, wohingegen besonders stark fluoreszierende Spezies für Antigene mit einer niedrigen Expression genutzt werden. Da hier die niedrige Expression ein schwächeres Signal hervorrufen würde, wird mit einem hellen Fluorochrom gearbeitet, um eine adäquate Detektion zu gewährleisten. Bei jeder Verwendung von mehr als einem Fluorochrom kann es passieren, dass die jeweiligen Emissionsspektren sich überlappen und es so zu einer Detektion von Fluoreszenzsignal im eigentlich nicht dafür vorgesehenen Kanal kommt. Dieses Phänomen wird als „Spillover“ (engl. spillover = Überschwappen) bezeichnet (Abbildung 4).

Im Durchflusszytometer kommen verschiedene Filter zum Einsatz, die nur für Licht bestimmter Wellenlängen durchlässig sind. So zum Beispiel long pass (LP) Filter und band pass (BP) Filter. Letztere werden im Beispielbild, erkennbar an den farbigen Säulen, für die Kanäle FITC (grün) und PE (gelb) verwendet. LP Filter lassen nur Licht ab einer bestimmten Wellenlänge (z.B. > 570 nm) passieren, BP Filter lassen ein spezifisches Spektrum (z.B. 320-650 nm) passieren. Das Signal von dem Fluorochrom

FITC ragt im Beispielbild in den Kanal für PE über, würde so ein falsch hohes Signal für PE liefern und es erschweren, die beiden Populationen zu trennen (16).

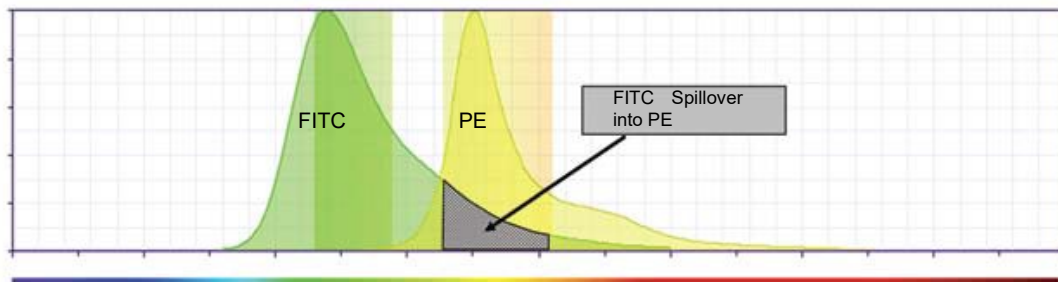


Abbildung 4: Überlagerung der Emissionsspektren von den Fluorochromen FITC und PE¹: Das Emissionsspektrum von FITC überlagert sich mit dem von PE. Um ein möglichst exaktes Ergebnis für den PE Kanal zu erhalten, muss der Anteil des Fluoreszenzsignals, welches durch FITC hervorgerufen wird, herausgerechnet werden.

Durch das Verfahren der Kompensation kann dieser Anteil des Spillovers herausgerechnet und so das Signal korrigiert werden. Hierfür werden zunächst alle im Experiment verwendeten Fluorochrome einzeln in sogenannten single-color Kontrollen gemessen. Dabei wird das Fluoreszenzsignal gleichzeitig in allen Detektoren aufgezeichnet. Somit lässt sich bestimmen, wieviel Fluoreszenzsignal eines Fluorochroms in den eigentlich nicht dafür bestimmten Kanälen detektiert wird. Über mathematische Berechnungen lässt sich für die Software zur Analyse bestimmen, inwieweit das gemessene Fluoreszenzsignal im jeweiligen Kanal korrigiert werden muss (17, 18). Das Verfahren der Kompensation führt zu besser zu differenzierenden Ergebnissen, allerdings sind die Möglichkeiten der Korrektur begrenzt. Ein zu hohes Maß an Spillover eines Fluorochroms in einen Kanal, welcher zur Detektion eines niedrig exprimierten Markers dient, führt zu einem Sensitivitätsverlust und verhindert eine Aufschlüsselung der einzelnen Populationen.

1.1.2 PrimeFlow RNA Assay

Der PrimeFlow RNA Assay ist eine spezielle Methode in der Durchflusszytometrie, die es ermöglicht, bis zu drei spezifische zelluläre RNA-Transkripte auf Einzelzellebene zu detektieren und zu analysieren. Er stellt eine Adaption der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) dar. Bei der FISH wird eine ca. 15-20 Basenpaare (bp) lange DNA- oder RNA-Sonde erstellt, die sich im weiteren Verlauf an das zu analysierende

¹ Quelle: https://www.bdbiosciences.com/documents/Compensation_Multicolor_TechBulletin.pdf

Gen, bzw. dessen Transkript, anlagern soll. Zunächst wird die Sonde chemisch modifiziert, sodass sie entweder direkt fluoreszenzmarkiert ist oder Bindungsstellen für fluoreszenzmarkierte Antikörper enthält. Diese markierte Sonde kann sich dann an DNA oder RNA in der Zielzelle anlagern und diese im Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen. Nachteile der FISH sind ein hoher Anteil an Hintergrundrauschen, sowie eine relativ niedrige Sensitivität. Dies ist bedingt durch unspezifisch bindende Sonden sowie eine schwache Verstärkung des Fluoreszenzsignals.

Der PrimeFlow RNA Assay hat gegenüber der FISH einige Vorteile. Die Methode kombiniert mehrere Techniken aus anderen Verfahren mit dem Endresultat, dass es mit dieser Technik möglich ist, auch geringe Konzentrationen von spezifischer mRNA für die Durchflusszytometrie, für die eine stärkere Fluoreszenz als für die Fluoreszenzmikroskopie nötig ist, sichtbar zu machen.

Dabei bedient sich die Methode der sogenannten branched DNA Technik. Unter branched DNA versteht man klassischerweise einen DNA Strang, dessen Enden nicht komplementär sind und die sich folglich nicht aneinanderlagern können. Die Enden liegen also frei vor und es kann sich im einfachsten Fall ein DNA-Einzelstrang, der genau aus den komplementären Basen zu den freiliegenden Enden besteht, an die DNA anlagern, wodurch eine Verzweigung entsteht (Abbildung 5). Genau so können aber auch durch gezielte Manipulation mehrere Verzweigungen (Abb. 6) und somit kompliziertere Konstrukte entstehen (19).

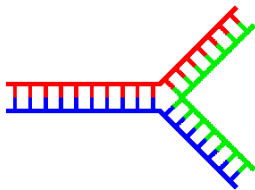


Abbildung 5: Einzelner DNA Branch¹

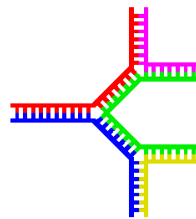


Abbildung 6: Multiple DNA Branches²

Diese Technik macht sich der Branched DNA Assay zunutze. Dieser Assay wird zur Detektion von bestimmten DNA Molekülen in einer Probe verwendet. Der Branched DNA Assay ist ein sog. „signal amplification assay“, im Gegensatz zu einem „target amplification assay“ wie der PCR. Beim Branched DNA Assay wird nicht das DNA-Molekül vervielfacht und so messbar gemacht, sondern das Fluoreszenzsignal des DNA Moleküls wird verstärkt. Über eine Kombination von verschiedenen DNA

¹ Quelle: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Branch-dna-single.svg>

² Quelle: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Branch-DNA-multiple.svg>

Molekülen wird ein Konstrukt erzeugt, welches es erlaubt, dass letzten Endes zahlreiche fluoreszenzmarkierte Sonden an das DNA Molekül binden können und es so zu einer sehr hohen Signalverstärkung kommt.

Das Prinzip des Branched DNA Assays ist in Abbildung 7 dargestellt. Ein Reaktionsgefäß wird mit der sog. „Capture Probe“ (gelb) so behandelt, dass diese am Boden haftet und ihr freies Ende zur Bindung freigibt. Daran bindet dann in einem weiteren Schritt der sog. „Capture Extender“ (rot), welcher mit seiner DNA Struktur eine spezifische Bindungsstelle für das zu analysierende DNA Molekül (blau) darstellt. Dieses DNA Molekül kann daraufhin an den Capture Extender binden und in einem weiteren Schritt einen sog. „Label Extender“ (grün) binden. An diesen Label Extender kann dann der Pre-Amplifier (schwarz) binden. Dieser fungiert, bildlich gesprochen, als Ast für die Amplifier (schwarz), welche an diesen binden und als Zweige an diesem Ast verstanden werden können. In einem weiteren Schritt binden dann fluoreszenzmarkierte Sonden an den Amplifier und geben das nun verstärkte Signal wieder. Die fluoreszenzmarkierten Sonden stellen in dieser Erklärung schlussendlich die Blätter dar. Man kann hier von einem Ast-Zweig-Blatt Prinzip sprechen.

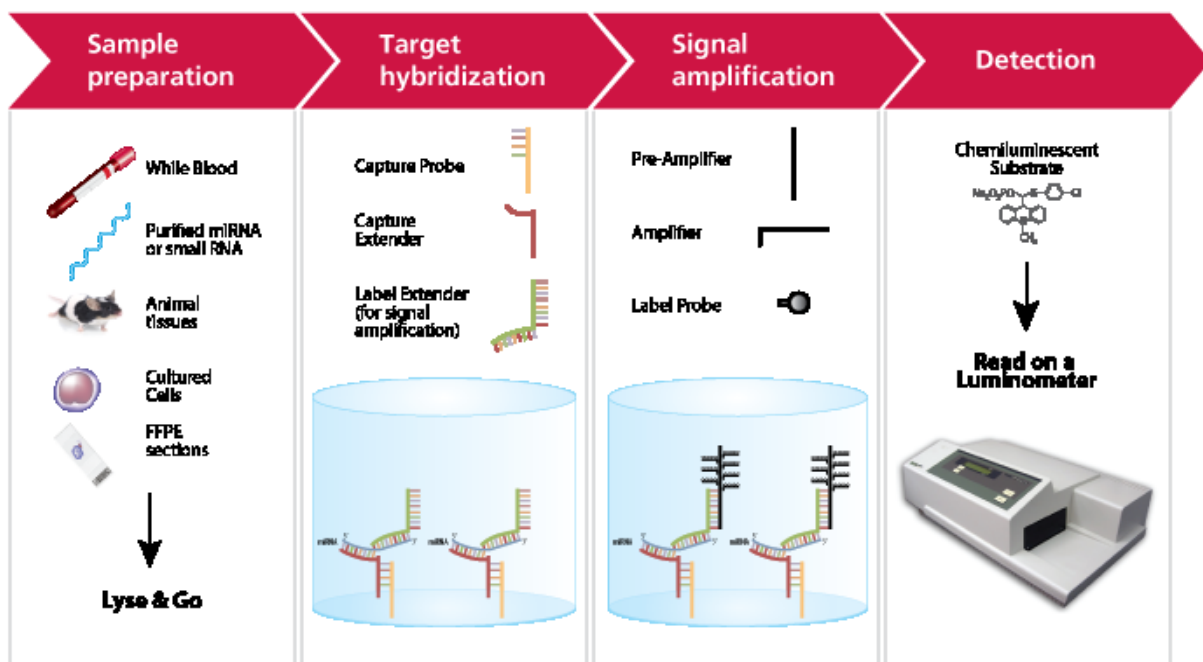


Abbildung 7: Branched DNA Assay Prinzip¹

Der PrimeFlow RNA Assay bedient sich einer ganz ähnlichen Methode (Abbildung 8). Das Prinzip der Signalverstärkung ist genau das Gleiche. Unter Verwendung von Pre-

¹ Quelle: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/epigenetics-noncoding-rna-research/mirna-analysis/quantigene-mirna-singleplex-assay/quantigene-mirna-singleplex-assay-how-it-works.html>

Amplifier und Amplifier kann laut Hersteller eine Signalverstärkung von bis zu 8000-fach erzielt werden (20). Mit dem Assay lassen sich mRNA sowie microRNA bestimmen. Die Messung von siRNA ist aktuell noch nicht möglich (21).

Zur Detektion eines RNA Transkripts wird ein Set aus 20 verschiedenen Oligonukleotidpaaren (in Abb. 7 Label Extenders genannt) genutzt, die an verschiedenen Stellen innerhalb des zu untersuchenden RNA Transkripts binden. An diese binden dann nach dem oben erwähnten Ast-Zweig-Blatt-Prinzip die Preamplifier, Amplifier und schlussendlich die fluoreszenz-markierten Sonden. An ein Oligonukleotidpaar können nach Anlagerung von Preamplifier und Amplifier bis zu 400 fluoreszenz-markierte Sonden binden. Falls alle 20 Oligonukleotidpaare binden, ergibt sich theoretisch also eine Verstärkung von $400 \times 20 = 8000$ -fach.

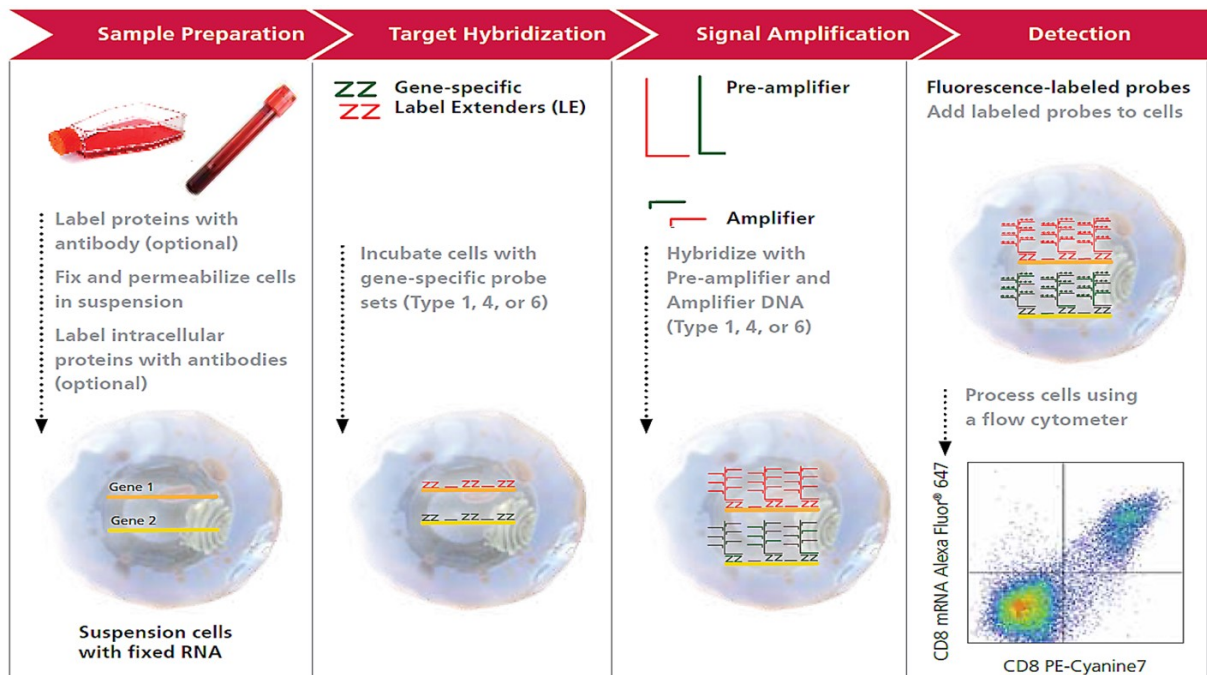


Abbildung 8: PrimeFlow RNA Assay Prinzip¹: Im ersten Schritt werden spezifische Oberflächenmoleküle mit Antikörpern markiert und Zellen fixiert und permeabilisiert, um eine Markierung von intrazellulärem Protein zu ermöglichen. Anschließend werden über genspezifische DNA Sonden die gewünschten Gene markiert. An diese Sonden kann im nächsten Schritt der Pre-Amplifier binden. Daran bindet der Amplifier. Im letzten Schritt binden an den Amplifier spezifisch fluoreszenz-markierte Sonden. Durch die Bindung von Pre-Amplifier und Amplifier wird die Zahl der Bindungsstellen für fluoreszenz-markierte Antikörper exponentiell bis zu 8000-fach erhöht.

Ein wichtiger Unterschied liegt in der Form der zu analysierenden Präparate. Sind mit einem Branched DNA Assay nur lysierte, also zerstörte, Zellen zu analysieren, so werden beim PrimeFlow RNA Assay permeabilisierte Zellen verwendet (4, 22). Die Zellen sind also intakt und die RNA wird intrazellulär detektiert, markiert und das Signal

¹ Quelle: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/primeflow-rna-assay.html>

wird verstärkt. Damit ist die Möglichkeit der Analyse an einem Durchflusszytometer gegeben. Es können mit der Methode gleichzeitig bis zu 3 RNA Sequenzen bestimmt werden. Es ist zudem möglich, dass zusätzlich zur fluoreszenzmarkierten RNA noch andere Merkmale der Zelle angefärbt und detektiert werden können. So können Oberflächenantigene der Zelle sowie intrazelluläre Proteine mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern zusätzlich zur RNA detektiert werden.

Dies wurde in unseren Experimenten dadurch realisiert, dass vor der Markierung der intrazellulären IFN- γ mRNA ein Farbstoff zur Identifizierung von toten Zellen (Fixable Viability Dye) verwendet wurde, sowie der T-Zell-Oberflächenmarker CD3 und intrazelluläres IFN- γ Protein mit einem fluoreszenz-markierten Antikörper markiert wurden und dann alle diese Parameter gleichzeitig am Durchflusszytometer bestimmen werden konnten.

Die Detektion intrazellulärer Proteine erfordert die Verwendung von permeabilisierten Zellen und Proteintransportinhibitoren (23). Proteintransportinhibitoren verhindern die Sekretion von Proteinen und führen so zu einer Akkumulation der Proteine im Innern der Zelle (Abbildung 9). Die Permeabilisierung der Zellmembran ermöglicht die Markierung der akkumulierten Proteine durch fluoreszenzmarkierte Antikörper.

Im PrimeFlow RNA Assay werden als Proteintransportinhibitoren Monensin und Brefeldin A in Kombination verwendet. Monensin ist ein Ionophor und wirkt an Lipidmembranen des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates als Ionenkanal und verhindert damit den Proteintransport (12). Bei Brefeldin A handelt es sich um ein Molekül, welches durch die Hemmung von ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARF) die Vesikelbildung im Golgi-Apparat unterbindet und damit die Proteinsekretion verhindert (12).

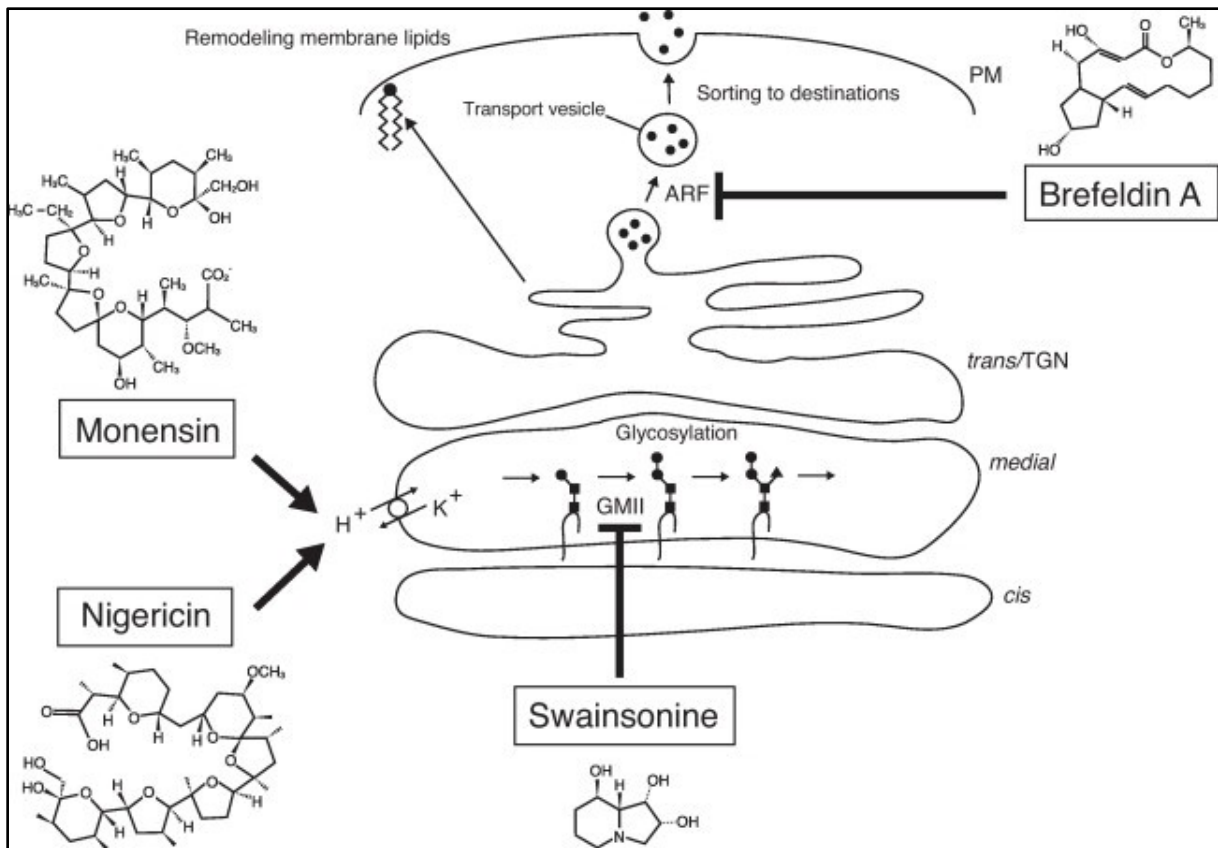


Abbildung 9: Wirkmechanismen von Proteintransportinhibitoren¹: Im PrimeFlow RNA Assay werden Monensin und Brefeldin A als Proteintransportinhibitoren verwendet.

¹ Quelle: Migita et al., Implications of the Golgi apparatus in prostate cancer, Int J Biochem Cell Biol. 2012 Nov;44(11):1872-6

Ein animierter Kurzfilm über das Prinzip des PrimeFlow RNA Assays lässt sich auf YouTube finden (24). Anwendung findet der PrimeFlow RNA Assay in einer noch beschränkten, jedoch immer größer werdenden Zahl von Publikationen, die sich unter anderem mit dem Nachweis kleinster Mengen RNA in einer Zellpopulation beschäftigen (25, 26). Zudem wird der Assay genutzt, um virale RNA in infizierten Zellen zu detektieren (27, 28) oder die Kinetik von RNA und Protein innerhalb der gleichen Zelle zu evaluieren (29). Aber auch andere Bereiche, wie die Zellreifebestimmung durch Messung der Telomerlänge (30) oder ein Ansatz zur präklinischen Bestimmung des Atheroskleroserisikos (31), werden unter Verwendung des PrimeFlow RNA Assays analysiert.

1.1.3 Polymerase Chain Reaction

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) ist eine molekularbiologische Methode, mit der ein oder mehrere DNA-Fragmente beliebig oft vervielfacht werden können. Damit kann, ausgehend von einer einzigen DNA-Kopie, eine hohe Anzahl Kopien hergestellt werden, wodurch eine sehr hohe Sensitivität erzielt werden kann. Die PCR wurde 1985 von Kary B. Mullis entwickelt (32). Die Anwendungen sind dabei so zahlreich wie verschieden: Von Ahnenforschung über exakte Analyse von Genen bis hin zur Diagnostik von Erbkrankheiten wird die PCR heute routinemäßig verwendet.

Das Grundprinzip der Methode ist die zyklische Temperaturänderung, bei der mehrere Zyklen des Aufheizens und des Abkühlens aufeinander folgen. Dies erlaubt das Schmelzen der DNA, die dann in Einzelstrangform vorliegt, gefolgt von der enzymatischen Vervielfältigung. Da die hierdurch produzierte DNA im folgenden Zyklus wieder geschmolzen werden kann, ergibt sich eine exponentielle Vervielfältigung (Abbildung 10).

Das Enzym, welches in der PCR zur Vervielfältigung der DNA dient, ist eine hitzestabile DNA-Polymerase, meist die Taq Polymerase, die ursprünglich aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, welches in heißen Quellen vorkommt, isoliert wurde. Die Taq Polymerase kopiert die DNA, indem sie Stück für Stück einzelne DNA-Fragmente, die Nukleotide, aneinanderfügt. Hierbei dient der DNA Einzelstrang als Muster für die Polymerase. Diese fertigt daraufhin einen komplementären Strang an, sodass am Schluss wieder eine Doppelstrang-DNA vorliegt. Den Startpunkt für die Polymerase stellen spezielle Oligonukleotide dar, die sogenannten DNA-Primer. Diese

DNA-Primer sind kurze (ca. 10-20 Basenpaare lange) Nukleotidketten, die sich sequenzspezifisch an die DNA anlagern und den Ansatzpunkt für die Polymerase schaffen. Mit der kalkulierten Auswahl der Primer kann also ein bestimmter Abschnitt der DNA zielgenau vervielfältigt werden.

Typischerweise besteht die PCR aus 20-40 Zyklen, welche jeweils aus 2-3, meist 3 definierten Temperaturschritten bestehen. Die Anzahl der Zyklen, die Temperaturen, sowie die Dauer der einzelnen Schritte hängen von verschiedenen Faktoren ab. Hierzu zählen unter anderem die verwendete DNA-Menge, die Schmelztemperatur der verwendeten Primer, sowie die Konzentration der DNA-Bausteine, der Deoxynukleotid-Triphosphate (dNTPs).

Polymerase chain reaction - PCR

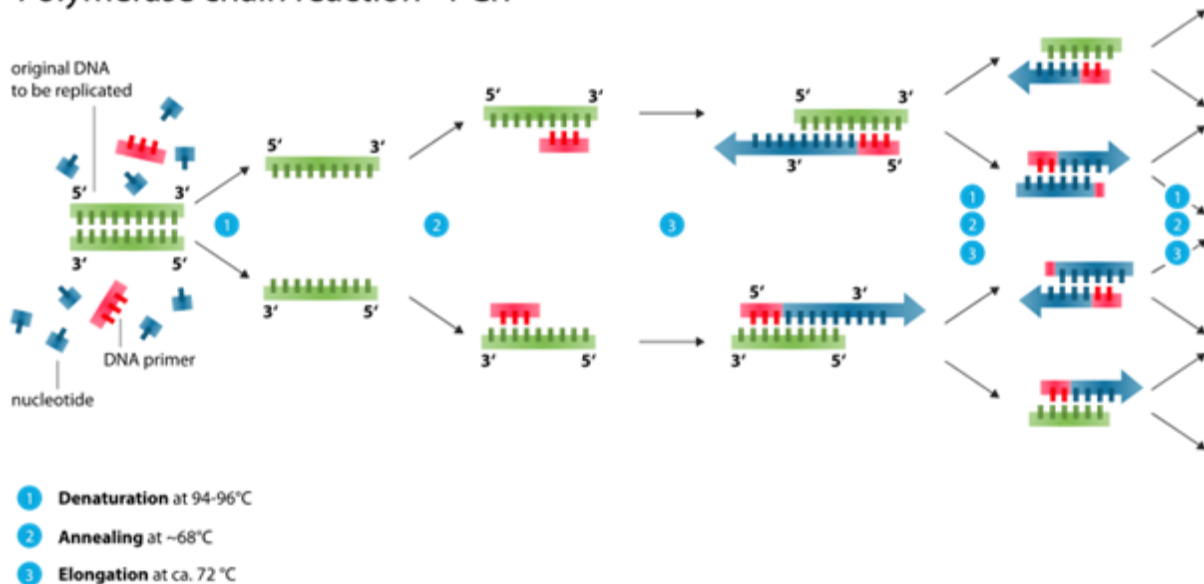


Abbildung 10: Ablauf einer PCR¹: Im ersten Schritt findet unter hoher Temperatur die Denaturierung der DNA-Stränge statt. Nach Abkühlung auf etwa 68°C lagern sich die Primer an die in Einzelsträngen vorliegende DNA an. Nun kommt es enzymatisch zu einer Bildung des komplementären Stranges, so dass wieder zwei DNA-Doppelstränge vorliegen. Diese drei Schritte werden wiederholt, so dass sich jedes Mal die DNA verdoppelt. Die Reaktion kommt zum Erliegen, wenn die Enzymaktivität sich erschöpft bzw. kein Substrat mehr vorhanden ist.

¹Quelle: https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction#/media/File:Polymerase_chain_reaction.svg

Ein klassischer Zyklus der PCR sieht wie folgt aus:

- **Initiation**

Dieser Schritt ist nur dann notwendig, falls der verwendete Assay eine sog. „hot-start PCR“ ist. Bei dieser Methode wird eine Temperatur von 94-96 °C bei Beginn erzeugt, welche die vorher inaktive Polymerase aktiviert. Dieser Schritt soll die unspezifische Vervielfältigung der DNA bei Raumtemperatur während des Versuchsaufbaus verhindern. Die Funktionsweise basiert auf am Enzym gebundenen Antikörpern oder Inhibitoren, welche erst nach einer Aktivierungstemperatur dissoziieren und das Enzym freigeben. Die Dauer dieses Schrittes ist je nach verwendetem Assay zwischen 1-9 Minuten lang.

- **Denaturation**

Bei der Denaturation sorgt eine Temperatur von 94-98 °C über 20-30 Sekunden für ein Schmelzen des DNA-Doppelstrangs. Durch die hohe Temperatur werden die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Strängen gelöst und die DNA liegt daraufhin in Einzelstrangform vor.

- **Anlagerung (Annealing)**

Die Temperatur wird im folgenden Schritt auf 50-65 °C gesenkt. Dies erlaubt das Anlagern der Primer an den DNA-Strang. Hierbei ist eine exakte Bestimmung der optimalen Temperatur wichtig. Ist die Temperatur zu niedrig, binden die Primer unspezifisch und das gewünschte DNA-Segment wird nicht zielgenau repliziert. Ist sie zu hoch, dann können die Primer sich nicht an die DNA anlagern. Typischerweise wird eine Temperatur gewählt, die etwa 3-5 °C unter der Schmelztemperatur der jeweiligen verwendeten Primer liegt. Für die Anlagerung der Primer werden 20-40 Sekunden veranschlagt.

- **Elongation**

Hierbei erzeugt die DNA-Polymerase durch das Aneinanderknüpfen von einzelnen Nukleotiden, den dNTPs, einen komplementären DNA-Strang. Die Temperatur hängt hierbei von der verwendeten Polymerase ab. Im Fall der Taq Polymerase liegt die verwendete Temperatur bei 72 °C. Die Länge dieses Schrittes wird von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Segments bestimmt. Es kann von einer Geschwindigkeit der Polymerase von ungefähr 1000 Basenpaaren pro Minute ausgegangen werden. Falls im Reaktionsgefäß ausreichend Reagenzien vorliegen, so wird mit jedem Zyklus die DNA verdoppelt.

Der Ablauf eines PCR Experimentes lässt sich zeitlich in drei Phasen einteilen (Abbildung 11). Die erste Phase besteht hierbei aus der exponentiellen Vervielfältigung der DNA. Da sich diese mit jedem Zyklus verdoppelt (unter der Annahme einer 100%igen Effizienz des Assays), kann die produzierte DNA Menge mit der Formel $\text{Effizienz}^{\text{Anzahl der Zyklen}}$ bestimmt werden. Bei 100%iger Effizienz wird diese gleich 2 gesetzt. Daran schließt sich eine Phase an, in der das verwendete Enzym graduell weniger Aktivität aufweist, sowie langsam die Reagenzien, welche zur Verlängerung der DNA benötigt werden, knapper werden. Die dritte Phase ist die Plateauphase. Das Enzym ist erschöpft und es sind keine Reagenzien mehr für die Elongation vorhanden. Die Reaktion kommt zum Stillstand.

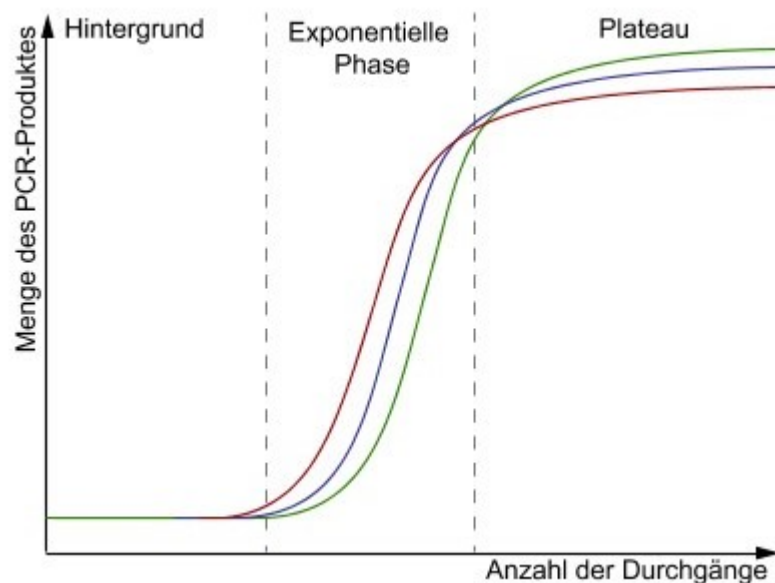


Abbildung 11: Phasen einer PCR¹

Um mittels der PCR RNA statt DNA zu vervielfältigen, muss diese RNA in einem ersten Schritt durch das Enzym Reverse Transkriptase, welches eine RNA-abhängige DNA-Polymerase darstellt, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Diese cDNA kann dann wie oben beschrieben durch die Real Time Quantitative PCR (RT-qPCR) amplifiziert und quantifiziert werden.

Die Quantifizierung findet mittels einer Messung der Fluoreszenz von spezifisch bindenden Sonden anhand einer internen Kontrolle statt. Diese interne Kontrolle stellt das Gen-Transkript eines Haushaltsgens (engl. housekeeping gene) dar. Das Haushaltsgen ist im Idealfall leicht zu detektieren und seine Expression unbeeinflusst von Zelltyp, Zellzyklus oder durch externe Reize (Stimulation, Medikamente, Krankheit). Das Signal des Haushaltsgens kann dazu verwendet werden, Variationen

¹ Quelle: http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr_praxis/praxis.vlu.html

in der Anfangsmenge der eingesetzten cDNA auszugleichen. So kann durch Vergleich der Fluoreszenzsignale des Haushaltsgens und des cDNA Targets eine relative Quantifizierung der Expression stattfinden.

Eine Zunahme der gefärbten Target-DNA korreliert so mit der Zunahme der Fluoreszenz im Reaktionsgefäß. Nach Ende der Elongation in jedem Zyklus der RT-qPCR findet solch eine Messung statt. Zur Erzeugung dieser Fluoreszenzsignale bestehen verschiedene Möglichkeiten von einfachen, interkalierenden Varianten (z. B. SYBR Green) über molekulare Beacons bis hin zu Hydrolysesonden. Bei diesen mit 8-9 Basenpaaren kurzen Hydrolysesonden befindet sich am 3'-Ende der Sonde ein sogenannter „Quencher“ und am 5'-Ende das Reporter-Fluorochrom. Im Ausgangszustand wird durch die kurze Distanz zwischen Quencher und Reporter das Fluoreszenzsignal des Reporters durch den Quencher ausgelöscht, da der Reporter seine Energie an den Quencher weitergibt und dieser in einer anderen Farbe als der Reporter fluoresziert. Dies wird als Förster-Resonanzenergietransfer bezeichnet. Nach Anlagerung der Sonde an die komplementäre DNA findet die Elongation statt. Durch die 5'-Nukleaseaktivität der DNA Polymerase wird der Reporter vom Quencher durch Hydrolysierung der Sonde getrennt und das nun entstehende Fluoreszenzsignal des Reporters kann gemessen werden.

1.1.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist eine Methode, welche durch die spezifische Bindung von Antikörpern und einen enzymbasierten Farbwechsel den quantitativen Nachweis eines Moleküls in einer Lösung ermöglicht. Die Ursprünge des ELISA liegen in den 1960er Jahren. Damals gab es als einzige Möglichkeit, ein Antigen nachzuweisen, nur einen Radioimmunassay. Hierbei wurden radioaktiv markierte Antikörper verwendet, die an das Zielmolekül binden sollten, welches daraufhin detektiert werden konnte. Rosalyn Sussman Yalow und Solomon Berson haben diese Technik erstmals 1960 beschrieben (33).

Radioimmunassays stellten wegen ihrer potenziellen Strahlenbelastung eine Gefahr für die Gesundheit dar, weswegen man nach Alternativen suchte. Die Lösung lag in einem Enzym, welches bei Reaktion mit einem bestimmten Substrat eine farbliche Änderung hervorrufen würde. Ein Beispiel für diese Reaktion ist das häufig verwendete Enzym Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase) mit dem Substrat

Tetramethylbenzidin. Damit mit dieser Methode auch ein Zielmolekül nachgewiesen werden konnte, musste das Enzym an einen Antikörper, welcher gegen das zu bestimmende Molekül gerichtet war, gebunden sein. Methoden, um diese Schritte möglich zu machen, wurden im Jahre 1966 entwickelt (34, 35). Kurze Zeit später, im Jahre 1971, publizierten zwei voneinander unabhängige Arbeitsgruppen dann zeitgleich Artikel, in welchen eine Methode beschrieben wurde, mit der ein enzymbasierter Immunassay möglich war (36, 37).

Der ELISA Assay basiert auf der Detektion eines Moleküls mittels Antikörpern in einer Flüssigkeit. Das Grundprinzip ist die Bindung von Komponenten an den Boden der ELISA Platte, gefolgt von verschiedenen Abfolgen von einer Behandlung mit Flüssigkeiten. Der erste Schritt besteht, je nach ELISA Typ, aus der Bindung von Antikörpern oder Zielmolekül an den Boden der ELISA Platte, wodurch diese dort immobilisiert und für die weitere Behandlung zugänglich sind. Darauf folgt die schrittweise Zugabe und Inkubation mit unterschiedlichen Reagenzien, welche schlussendlich mit der enzymatischen Farbumschlagsreaktion endet. Die Farbintensität kann dann in einem Photometer gemessen werden und so die Menge des sich in der Lösung befindlichen Moleküls bestimmt werden.

Bei der Methode des ELISAs kann zwischen dem direkten ELISA, dem Sandwich-ELISA und dem kompetitiven ELISA unterschieden werden (Abbildung 12). Beim direkten ELISA wird zunächst die Lösung, in welcher sich das Molekül befindet, das bestimmt werden soll, auf den Boden der Reaktionsplatte gegeben. Die Polystyroloberfläche der Platte sorgt dafür, dass es zu einer Adsorption der Moleküle am Boden der Platte kommt. Dann wird eine Lösung mit nichtreagiblem Protein (bspw. Albumin aus Rinderserum) hinzugefügt. Dieses Protein besetzt die Lücken zwischen dem zu bestimmenden Molekül auf dem Boden der Platte, um keine freie Fläche auf dem Plastikboden der Reaktionsplatte frei zu lassen. Dies wird als „blocking“ bezeichnet. Daraufhin kann eine Bindung von Antikörpern, welche gegen das zu bestimmende Molekül gerichtet sind, erfolgen. An diesen Antikörpern ist ein Enzym gebunden, welches die im nächsten Schritt folgende Farbumschlagsreaktion katalysiert. Nach Zugabe von Substrat wird dieses enzymatisch umgewandelt und es kann eine Farbänderung beobachtet werden.

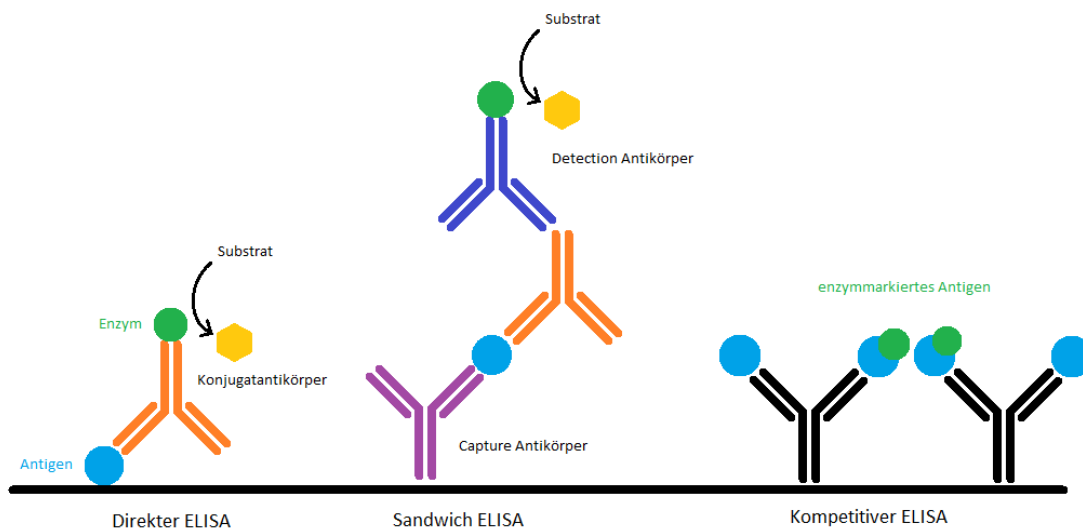


Abbildung 12: Übersicht ELISA Methoden: Funktionsprinzip eines direkten ELISAs, eines Sandwich ELISAs und eines kompetitiven ELISAs.

Die Konzentration der Antikörper und somit des gebundenen Enzyms geht mit einem umso stärkeren Farbumschlag einher, je höher die Konzentration von Zielmolekül in der Lösung ist. Die Farbintensität wird dann an einem Photometer gemessen, um mit den Konzentrationen in einer definierten Standardreihe verglichen zu werden und so die Konzentration des Zielmoleküls zu bestimmen. Zwischen den einzelnen Schritten ist jeweils mehrfaches Waschen der Platte vonnöten, damit ungebundene Reagenzien wie Antikörper, Molekül oder Substrat aus dem Reaktionsgefäß entfernt werden können. Ein großer Nachteil beim direkten ELISA liegt im ersten Schritt des Experimentes. Dadurch, dass der Boden der Reaktionsplatte unspezifisch bindet, können sich alle Moleküle, welche in der Probe enthalten sind, anlagern. Falls das Molekül, das von Interesse ist, nur in einer geringen Konzentration in der Probe vorliegt, so muss es mit den anderen Molekülen kompetitiv am Boden der Platte binden.

Dieses Problem umgeht man mit der Methode des Sandwich-ELISA, indem zunächst ein Antikörper, welcher gegen das Zielmolekül gerichtet ist, am Boden der Platte gebunden wird und so im nächsten Schritt nur das Molekül von Interesse binden kann. Beim Sandwich-ELISA folgt auf das Binden der Antikörper am Boden und dem anschließenden „blocking“ die Zugabe der Antigen-enthaltenden Probe, welche untersucht werden soll. Nun wird ein Antikörper hinzugegeben, welcher wiederum gegen das Antigen gerichtet ist. Diese ist nun zwischen zwei Antikörpern, wie in einem

Sandwich, gebunden. Im nächsten Schritt werden enzymmarkierte Antikörper hinzugegeben, welche an das Fc-Fragment der am Molekül gebundenen Antikörper binden. Nach der Zugabe von Substrat kann jetzt ein Farbumschlag beobachtet und dieser im Photometer quantifiziert werden. Wie beim direkten ELISA kann jetzt auch im Vergleich mit einer definierten Standardreihe mit vorgegebenen Konzentrationen die Menge des Moleküls in der Probe berechnet werden.

Die dritte Möglichkeit besteht in einem kompetitiven ELISA Ansatz. Zu Beginn wird wieder eine Platte mit gegen das Antigen gerichtetem, nicht markiertem Antikörper bedeckt. Nun werden zwei Lösungen hinzugefügt. Zum einen die Lösung, welche den Analyten enthält, zum anderen eine Lösung mit definierter Konzentration des Analyten, welcher zusätzlich markiert ist. Nun konkurrieren das in der Lösung in unbekannter Konzentration vorhandene Antigen sowie das markierte Antigen in bekannter Konzentration um die Bindungsstellen an den Antikörpern. Mit steigender Konzentration des Antigens in der Probe fällt die Menge an gebundenem markiertem Antigen an den Antikörpern. Folglich ist also das Fluoreszenzsignal umso schwächer, je höher die Konzentration des Antigens in der zu untersuchenden Probe ist. Diese Methode bietet sich an, falls nur ein einzelner spezifischer Antikörper für das Molekül zur Verfügung steht oder das Molekül nicht über ausreichend Bindungsstellen, so dass zwei Antikörper binden können, verfügt. In den Experimenten wurde ein Sandwich ELISA verwendet.

1.2 Mesenchymal stromale Zellen

1.2.1 Entdeckung und Historie

Das menschliche Knochenmark stellt einen Ort des steten Nachschubs für die Zellen des Blutsystems dar, die eine Lebenszeit zwischen einigen Tagen und Monaten aufweisen. Dies geschieht durch die hämatopoetischen Stammzellen. Neben diesen hämatopoetischen Stammzellen gibt es auch Zellen des Knochenmarks mit stammzellähnlichen Eigenschaften, die sich zu Gewebe differenzieren können, welches nicht der Hämatopoese zugehörig ist. Diese Zellen werden heutzutage als mesenchymal stromale Zellen (MSC) bezeichnet, da die Gewebe, in die sie sich zu differenzieren vermögen, dem Mesenchym entsprechen.

Vor etwa 150 Jahren war es erstmals Julius Cohnheim, der die Existenz nicht-hämatopoetischer Stammzellen vermutete, als er in seinen Experimenten wundheilungsfördernde Zellen beobachtete, die dem Knochenmark entsprangen (38). Weitere Hinweise auf die Existenz von Zellen des Knochenmarks mit stammzellähnlichen Eigenschaften ergaben sich, nachdem von Friedenstein *et al.* in den 60er und 70er Jahren aus Knochenmark Zellen isoliert wurden, die sich unter experimentellen Bedingungen zu Knorpel- und Knochengewebe, sowie zu Bindegewebe differenzieren konnten (39). Diese Arbeiten werden als der ursprüngliche Beweis der Existenz von MSCs angesehen.

Die Zellen zeichneten sich durch eine äußerst starke Adhärenz zu dem Plastik der Zellkulturbehälter aus. Diese Eigenschaft wurde dazu verwendet, die MSCs von anderen Zellen zu trennen und eine möglichst hohe Reinheit zu erreichen. Friedenstein konnte in *in vivo* Experimenten aus diesen Knochenmarkszellen Zellkolonien mit fibroblastoiden Eigenschaften, colony-forming unit-fibroblasts (CFU-F) genannt, erzeugen, sowie in *in vitro* Experimenten eine Differenzierung dieser CFU-Fs zu Bindegewebe und Knochen erreichen (40, 41). In darauf aufbauenden Arbeiten gelang es zu zeigen, dass aus den von Friedenstein entdeckten Zellen zudem Chondrozyten, Adipozyten und Myozyten hervorgehen konnten (42). Auch nach 20 bis 30 Teilungszyklen waren die Zellen immer noch in der Lage, sich in die verschiedenen Gewebe zu differenzieren.

Der Name mesenchymal stromale Zelle (engl. mesenchymal stromal cell) entstammt einem 2005 erstellten Vorschlag der internationalen Gesellschaft für Zelltherapie (ISCT), die bis dato mit vielen unterschiedlichen Namen (osteogenic stem cells, marrow stromal stem cells, skeletal stem cell und mesenchymal progenitor cells) bezeichneten Zellen unter einem gemeinsamen Namen zusammenzufassen. Weiterhin wurde durch die ISCT in dem Positionspapier darauf aufmerksam gemacht, dass die häufig verwendete Bezeichnung mesenchymale Stammzelle (mesenchymal stem cell) nicht grundlegend für alle Zellen, die durch die Plastik-Adhärenz isoliert wurden, verwendet werden sollte. Vielmehr sollte nur jene Subpopulation, die die Kriterien für Stammzellen erfüllt, auch als mesenchymale Stammzelle bezeichnet werden. Zu den Kriterien einer Stammzelle zählen die Fähigkeit der Selbsterneuerung, sowie die Fähigkeit, sich in verschiedene Zellen differenzieren zu können. Für beide Populationen galt allerdings weiterhin das Akronym MSC, was es umso wichtiger macht, klar aufzuzeigen, von welchen Zellen man genau spricht, um Verwirrung in der Wissenschaft und eventuell unrealistische Erwartungen von Laien an Therapien zu vermeiden (43).

Basierend auf den frühen Beobachtungen, dass MSCs starkes Proliferationsverhalten und Differenzierungskapazität aufweisen, hat man sie als ideale Kandidaten für Zellersatztherapien angesehen. Präklinische und klinische Daten zeigten jedoch, dass MSCs nur zu sehr geringen Anteilen nach einer Transplantation anwachsen. Ein Großteil der Zellen bleibt nach intravenöser Applikation in den Lungenkapillaren zurück. Erstaunlicherweise zeigten sich dennoch deutliche therapeutische Effekte. Auf der Suche nach dem Wirkmechanismus zeigte sich, dass MSC mehrere Eigenschaften auf sich vereinen (44, 45):

- Starkes immunmodulatorisches Potenzial
- Sekretion trophischer Faktoren (anti-apoptotisch, anti-fibrotisch, pro-angiogen)
- Stromafunktion (Bildung eines bindegewebigen Stützgerüsts)

In zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Versuchen konnten immunmodulatorische Fähigkeiten der MSCs nachgewiesen werden. Diese erstrecken sich von der Hemmung der Proliferation von T-Zellen (46), über Suppression der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen (47), bis hin zur therapeutischen Anwendung bei Autoimmunkrankheiten (48). MSCs sezernieren in ihrer Funktion als regulatorische und immunmodulatorische Zellen eine Reihe von trophischen Faktoren, welche

unterschiedliche Funktionen besitzen. MSCs können die Apoptose in Zellen verhindern, sowie die Fibrosierung von Gewebe hemmen (49). Zudem haben MSCs eine förderliche Rolle in der Bildung von neuen Blutgefäßen aus bereits bestehenden Blutgefäßen (Angiogenese) (50). Ihnen wird eine förderliche Rolle bei der Bildung des Stromas, des bindegewebigen Halteapparats eines jeden Organs, zugesagt. Bei systemischer Verabreichung der MSCs üben diese verschiedenste direkte, endo- und parakrine sowie immunologische Effekte in unterschiedlichsten Zielgeweben aus (Abbildung 13).

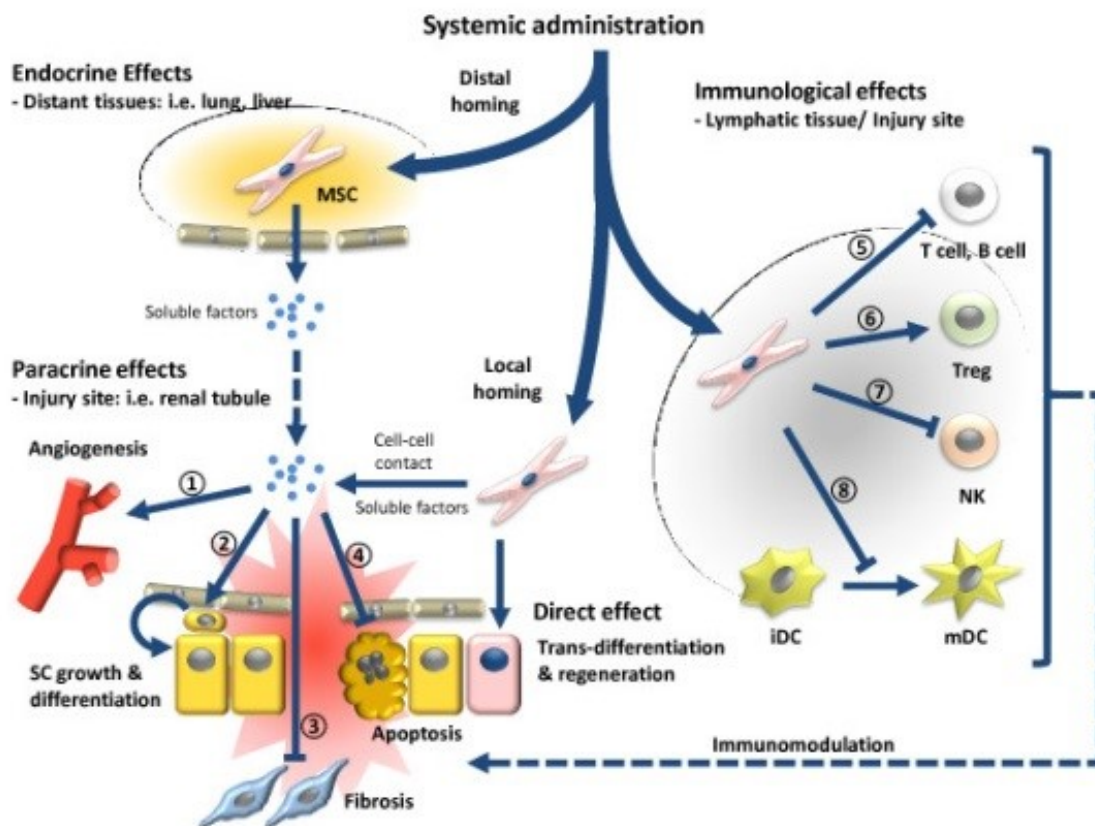


Abbildung 13: Effekte bei der Verabreichung von MSCs und involvierte Faktoren¹: **1)** Unterstützung der Angiogenese: vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP 1), basic fibroblast growth factor (bFGF) und Interleukin-6 (IL-6). **2)** Wachstum und Differenzierung von Stammzellen: stem cell factor (SCF), leukemia inhibiting factor (LIF), macrophage colony stimulating factor (M-CSF), stromal derived factor 1 (SDF 1), Angiopoietin 1 und Activin A. **3)** Hemmung der Fibrose: hepatocyte growth factor (HGF), bFGF und adrenomedullin (ADM). **4)** Hemmung der Apoptose: VEGF, HGF, IGF-1, transforming growth factor beta (TGF- β), bFGF, granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), Activin A und Thrombospondin. **5)** Suppression der T- und B-Zellen: human leukocyte antigen G5 (HLA G5), HGF, inducible nitric oxide synthase (iNOS), indoleamine 2,3 dioxxygenase (IDO), prostaglandin E2 (PGE 2), bFGF und TGF β . **6)** Induktion der Differenzierung und Vermehrung von regulatorischen T-Zellen (Tregs): TGF- β . **7)** Hemmung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen): IDO, PGE 2 und TGF- β . **8)** Hemmung der Reifung von Dendritischen Zellen (DC): PGE 2.

¹ Quelle: Figueroa et al., Mesenchymal Stem Cell treatment for autoimmune diseases: A critical review, Biol Res 45: 269-277, 2012

1.2.2 Gewinnung und Charakteristika

Mesenchymal stromale Zellen kommen in praktisch jedem vaskularisierten Gewebe vor und können aus diesem isoliert und gewonnen werden (51). Ursprünglich aus Knochenmark isoliert, werden MSCs heutzutage zudem aus Fettgewebe und perinatalem Gewebe wie Plazenta, Nabelschnur sowie Nabelschnurblut gewonnen (52). Daneben wurden MSCs aber auch erfolgreich aus Skelettmuskel, Synovialmembran, Zahnpulpa, Periodontium, Venen, Amnionflüssigkeit, Lungen- und Lebergewebe, sowie Gewebe der Haut isoliert (53). Die unterschiedliche Herkunft der jeweiligen MSCs wirft Fragen nach der Gleichheit bzw. Ähnlichkeit der Morphologie und Eigenschaften auf.

In Arbeiten unserer Forschungsgruppe konnten aus verschiedenen untersuchten Geweben (darunter Knochenmark, Lipoaspirat und Nabelschnurblut) jedes Mal Zellen gewonnen werden, die sich in weiteren Versuchen als MSCs identifizieren ließen (54). Gleichwohl zeigten sich Unterschiede in der Erfolgsrate der Gewinnung, der Proliferationsrate und der maximal möglichen Zellkulturdauer (55). Diese Ergebnisse decken sich mit denen anderer Forschungsgruppen (55-58).

Mit einem immer größer werdenden Interesse der Wissenschaft an der Forschung über MSCs entstand auch eine immer größere Menge an Literatur unterschiedlichster Quellen, die es sich zur Aufgabe gemacht hat, MSCs zu beschreiben und zu charakterisieren. Durch unterschiedliche Formen der Gewinnung und Expansion und durch uneinheitliche Definitionen können solche Mengen zu schwerer Vergleichbarkeit, Redundanzen, teilweise auch zu Widersprüchen führen. Im Zuge dessen hat die ISCT im Jahre 2006 ein Paper publiziert, welches die Position der ISCT bezüglich der minimalen Definitionskriterien für humane MSCs darstellt (59). Darin werden MSCs anhand folgender drei Kriterien definiert:

- Adhärenz zu Plastik
- Spezifische Expression von Oberflächenantigenen
 - CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD45⁻, CD34⁻, CD14⁻/CD11⁻, CD79α/CD19⁻, HLA Klasse II⁻
- Multipotentes Differenzierungspotenzial

Die Plastik-Adhärenz muss in Standardkulturbedingungen gewährleistet sein. Zudem muss die MSC Population positiv (≥95% pos.) für die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 sein, sowie negativ (≤2% pos.) für die Oberflächenmarker CD34, CD45,

CD14 oder CD11b, CD79 α oder CD19 und HLA Klasse II sein. Drittens muss in standardisierten *in vitro* Bedingungen eine Differenzierung zu Osteoblasten, Chondroblasten, sowie zu Adipozyten gelingen.

Das in unserer Arbeitsgruppe erarbeitete und angewandte Set von Oberflächenantigenen zur Definition von MSCs gleicht den Minimalkriterien der ISCT und ergänzt dieses um einige aus unserer Sicht wichtige zusätzliche Marker.

MSC-Panel:

- Positiv: CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, HLA-ABC
- Negativ: CD3, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD133, CD144, CD235a, HLA-DR
- Weder obligatorisch positiv/negativ: CD15, CD106

Die Bestimmung der spezifischen Oberflächenmarker dient der gezielten Identifikation von MSC Populationen. Über eine Kombination von mehreren positiven Oberflächenmarkern soll eine hohe Reinheit der betrachteten Population gewährleistet werden. Die Bestimmung von obligat negativen Oberflächenmarkern dient zusätzlich dem Vermeiden einer Kontamination mit anderen Zellpopulationen. Die in unserer Arbeitsgruppe zusätzlich verwendeten obligatorisch positiven Oberflächenmarker umfassen HLA-ABC, CD29, CD44 und CD146. Dabei handelt es sich um ein Klasse I Humanes Leukozytenantigen (HLA-ABC), Integrin β -1 (CD29), ein Zelladhäsionsmolekül, homing cell adhesion molecule (CD44), einen multifunktionalen Rezeptor für u.a. Hyaluronsäure, sowie melanoma cell adhesion molecule (CD146), dessen Expression mit der Differenzierungskapazität der MSCs korreliert (60).

Zu den obligatorisch negativen Oberflächenmarkern, die wir in Abweichung von dem von der ISCT vorgeschlagenen Set verwenden, gehören CD3, CD14, CD19, CD31, CD45, CD133, CD144 und CD235a. Bei CD31 handelt es sich um das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül PECAM-1, das auf Endothelzellen exprimiert wird und daher den Ausschluss dieser aus der analysierten Population zulässt. Zusätzlich CD133 oder Prominin-1, ein hämatopoetischer Stammzellmarker, dessen eigentliche Funktion bis dato nicht schlüssig geklärt ist. Bei CD144 wiederum handelt es sich um vascular-endothelial-cadherin (VE-cadherin), ein Glykoprotein, welches eine Rolle bei der Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten spielt.

Als weder obligatorisch positiv noch negativ färben wir CD15 und CD106 an. CD15, auch Lewis X oder SSEA-1 genannt, ist ein Granulozyten-Differenzierungsmarker, der auch auf pluripotenten Stammzellen sowie auf MSCs gefunden wird. Er dient auf MSCs als Pluripotenzmarker und kann zur Identifikation von MSCs aus unterschiedlichen Geweben genutzt werden. Bei CD106, auch vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) genannt, handelt es sich um einen Marker, dessen Expression positiv mit der immunmodulatorischen und angioproliferativen Potenz der MSCs korreliert (61, 62).

1.2.3 Klinische Anwendung von MSCs

Eigenschaften der MSCs, wie die Fähigkeit der Selbsterneuerung, die Möglichkeit der Differenzierung zu unterschiedlichen Geweben sowie die immunmodulatorischen Effekte, haben sie zu einem attraktiven Ziel klinischer Studien gemacht.

Die erste Studie mit MSCs fand 1995 statt (63). Über die Jahre war ein starker Anstieg in der Zahl klinischer Studien zu verzeichnen, welcher das stetig steigende Interesse an klinischer Anwendung von MSCs widerspiegelt (Abbildung 14). Während es 2012 laut der Datenbank klinischer Studien (www.clinicaltrials.gov) noch 281 Studien waren, fanden sich zu Beginn des Jahres 2019 schon 800 Studien, die bei der Suche nach „mesenchymal stem cells“ oder „mesenchymal stromal cells“ gelistet waren. Jedoch befindet sich der Großteil der Studien in Phase I und II. Jenseits von Phase II finden sich aktuell nur 6% der Studien (Abbildung 15).

Erste Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass der Großteil der vermeldeten Erfolge in den Studien auf den trophischen und immunmodulatorischen Effekten der MSCs zu fußen scheint. Es wird daher angenommen, dass die Produktion von Wachstumsfaktoren, Cytokinen (und Glykoproteinen) der entscheidende Faktor in der Wiederherstellung von beschädigtem Gewebe ist. Anders als initial vermutet, scheint die Differenzierungsfähigkeit in unterschiedliche Gewebe eher eine untergeordnete Rolle zu spielen (64, 65).

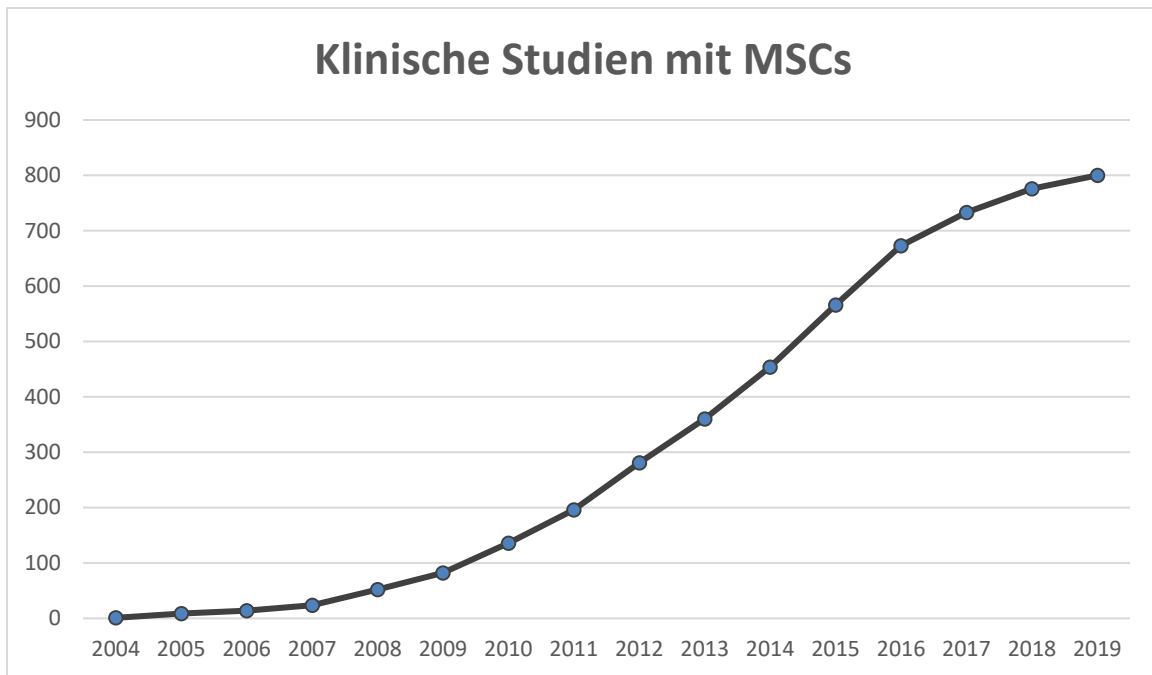


Abbildung 14: Anzahl klinischer Studien zu MSCs: Unter clinicaltrials.gov fanden sich 800 Studien, welche sich mit der therapeutischen Anwendung von MSCs befassen. Daten von clinicaltrials.gov; Zugriff am 03.03.19

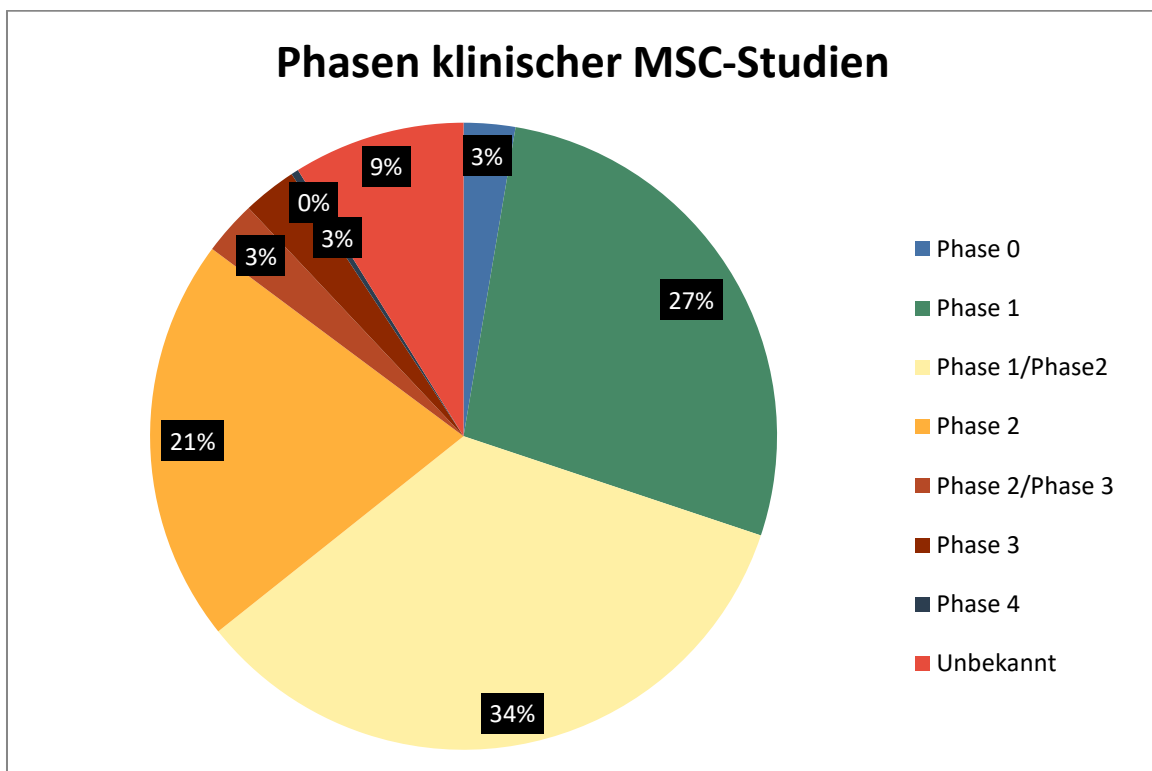


Abbildung 15: Phasen klinischer MSC Studien: Der Großteil (80%) der Studien zu MSCs befindet sich in den Phasen 1 & 2. Jenseits von Phase 2 befinden sich insgesamt gerade einmal 6% der Studien. Von 800 gelisteten Studien befanden sich drei in Phase 4. Daten von clinicaltrials.gov; Zugriff am 03.03.19.

Die klinische Anwendung von MSCs in Studien umfasst verschiedenste Krankheitsbilder, darunter Erkrankungen aus den Kreisen der Neurologie, Hepatologie, Nephrologie, Rheumatologie, Hämatologie, Pneumologie, sowie kardiovaskuläre Erkrankungen, chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), Bindegewebserkrankungen, Graft versus Host Disease (GvHD) und andere Autoimmunerkrankungen (Abbildung 16).

Bezüglich der therapeutischen Applikation der MSCs bestehen unterschiedliche Möglichkeiten: Bei gut zugänglichen lokalen Entzündungen oder Defekten, wie beispielsweise degenerativen Gelenkerkrankungen oder schlecht heilenden Knochendefekten, können die MSCs direkt in das geschädigte Gewebe eingebracht werden (66, 67). Eine systemische Applikation kann aufgrund der „Homing“-Fähigkeit der MSCs ebenso eingesetzt werden (68, 69). Diese erlaubt es den MSCs, mittels chemotaktisch wirkenden Faktoren wie Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1), Platelet-derived Growth Factor AB (PDGF-AB), Insulin-like Growth Factor (IGF-1) und Stromal Cell-derived Growth Factor-1 (SDF-1), die von den beschädigten Zellen sezerniert werden, zielgerichtet über das Gefäßsystem zum Ort des Geschehens zu gelangen. Besonders in der Therapie von Erkrankungen der inneren Organe sowie von Autoimmunerkrankungen macht man sich dies zunutze (53, 70). Dennoch haben viele Studien ergeben, dass die Applikation von MSCs *in vivo* geringes Überleben, kaum Einnistung und nur geringe Speicherung der Zellen aufweist (71, 72).

Für Fehlschläge in der Anwendung von MSCs in *in vitro* und *in vivo* Experimenten konnten verschiedene Faktoren verantwortlich gemacht werden. Zu diesen zählen unter anderem Hyperglykämie, Hypoxie und Entzündung (73). Besonders die Daten zu den Effekten von hohen Glucosespiegeln sind nicht eindeutig. Toxische Effekte mit erhöhter Seneszenz und Apoptoserate (74-76) stehen einer Resistenz gegenüber hohen Glucosespiegeln (77, 78), einer Proliferationssteigerung (77), oder einer Erhöhung bestimmter Differenzierungspfade (79, 80) entgegen. Um ein besseres Verständnis für den Einfluss hoher Glucosespiegel auf MSCs zu erhalten, führten auch wir vergleichende Versuche durch, in denen MSCs unterschiedlichen Glucosespiegeln ausgesetzt waren.

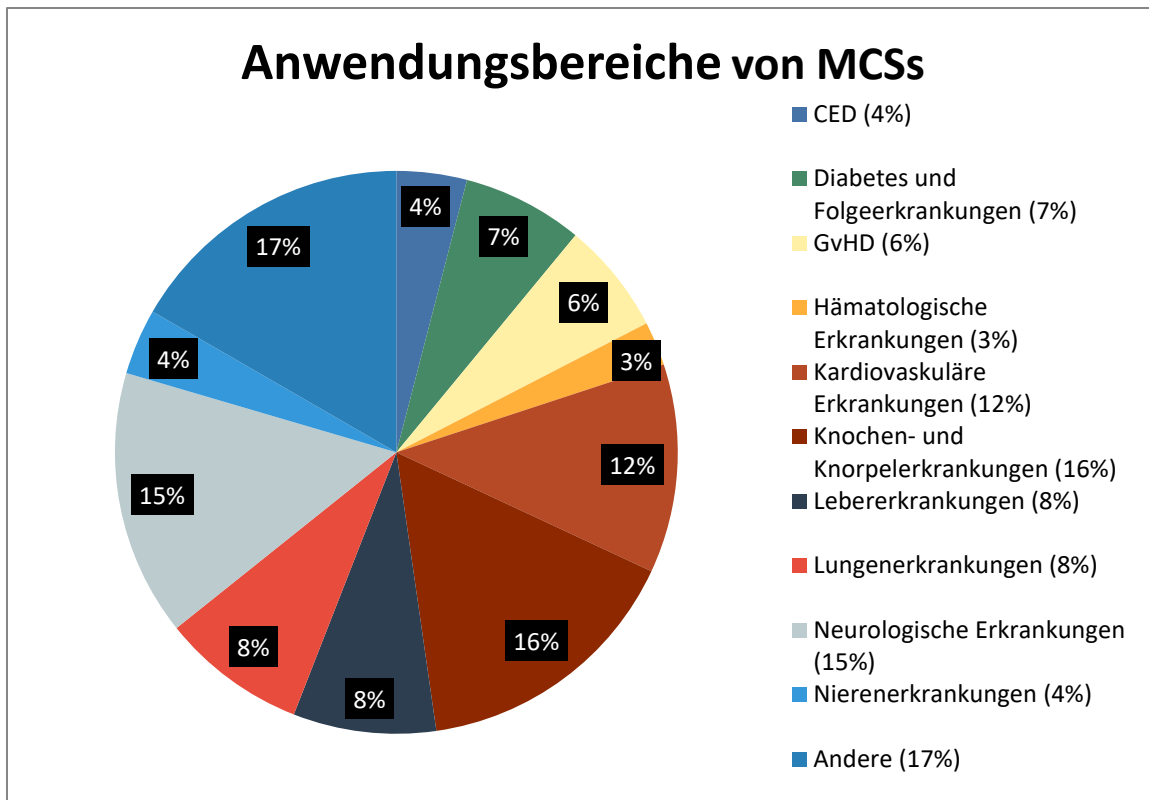


Abbildung 16: Anwendungsbereiche klinischer MSC Studien: Die klinischen Studien mit MSCs weisen eine hohe Vielfalt in ihrer Applikation auf. So werden heilungsfördernde Effekte der MSCs aktuell an fast allen Organen des menschlichen Körpers untersucht. Die aktuell größten Domänen sind die Forschung an der Verwendung von MSCs zur Therapie von Knochen- und Knorpelerkrankungen (Osteoarthritis, schlecht heilende Frakturen u.a.), Neurologischen Erkrankungen (Multiple Sklerose, Rückenmarksschädigungen u.a.) und kardiovaskulären Erkrankungen (Herzinfarkt, Herzinsuffizienz u.a.). Daten von clinicaltrials.gov; Zugriff am 03.03.19.

1.2.4 Nebenwirkungen der Therapie mit MSCs

Neben der therapeutischen Wirksamkeit ist der wichtigste Faktor bei klinischer Anwendung die Sicherheit. MSCs haben sich in bisherigen Phase I und II Studien als sehr nebenwirkungsarm und gut verträglich herausgestellt (70, 81, 82). Zu den theoretischen schweren Nebenwirkungen bei der allgemeinen Therapie mit Zellen zählen maligne Entartung der verabreichten Zellen, Organversagen, sowie Infektionen durch mögliche Hemmung des Immunsystems oder Kontamination des Kulturmediums (83).

Diese schweren Nebenwirkungen, falls aufgetreten, konnten jedoch in keiner Studie mit der Applikation von MSCs in direkten Zusammenhang gebracht werden, sodass aufgrund der bisherigen Datenlage die MSC-Anwendung als sicher eingestuft wird (64). Einzig transientes Fieber zeigte einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit der Applikation von MSCs (64). Berichte über die potenzielle Tumorigenität von

MSCs wurden zurückgezogen, nachdem herausgefunden wurde, dass die Ergebnisse durch eine Kontamination mit Zellen einer Tumorzelllinie entstanden waren (84, 85). Befürchtungen, dass es durch die Verabreichung von allogenen, nicht gematchten MSCs zu akuter Toxizität nach Infusion kommt, bestätigten sich nicht. Dies unterstreicht den „immunprivilegierten“ Status der MSCs, den man sich durch die geringe Expression von MHC Komplexen und ko-stimulatorischen Molekülen zur T-Zell-Aktivierung erklärt. Es gab Anzeichen dafür, dass MSCs kurz nach Applikation eine Immunantwort des Empfängers, eine *instant blood-mediated inflammatory reaction* (IBMIR), auslösen (86). Im Tierversuch ist eine erhöhte Inzidenz von thromboembolischen Ereignissen nach Applikation von MSCs beschrieben (87, 88). In unserer Arbeitsgruppe untersuchten wir, inwieweit MSCs prokoagulatorische Effekte auf Thrombozyten hatten und kamen zu dem Ergebnis, dass MSCs aus unterschiedlichen Geweben, darunter Knochenmark, Nabelschnurblut und Lipoaspirat, alle einen hemmenden Einfluss auf die Thrombozytenstimulation mittels Agonisten hatten und eine überschießende Thrombozytenaktivierung sogar verhindern konnten. Einzig MSCs aus Nabelschnurblut hatten teilweise eine stimulierende Wirkung, allerdings auf ruhende Thrombozyten, was die Fähigkeiten der MSCs bezogen auf die hämostatische Balance unterstreicht (89).

1.2.5 Immunmodulatorische Fähigkeiten

MSCs unterliegen einer Reihe von Besonderheiten bezüglich ihrer Charakteristika sowie ihrer immunmodulatorischen Fähigkeiten. So zeichnen Sie sich beispielsweise durch das Fehlen des MHC Klasse II Komplexes auf der Zelloberfläche aus. Des Weiteren werden die Moleküle des MHC Klasse I Komplexes sowie ko-stimulatorische Moleküle (CD40, CD80, CD 86 und CD154) in einer nur geringen Dichte exprimiert. Diese Eigenschaft wird als ein Grund dafür angesehen, warum MSCs als hypoimmunogen angesehen werden und es ihnen möglich ist, der Erkennung und Elimination durch das menschliche Immunsystem nach Verabreichung *in vivo* zumindest teilweise zu entgehen.

Neuere Studien haben gezeigt, dass es auch bei allogenen MSCs zu Reaktionen des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems unter Bildung von Antikörpern kommt (90). Jedoch geschieht diese Abwehrreaktion langsamer und in einem geringeren Ausmaß als bei anderen allogenen Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten

(91). MSCs können über eine Reihe von auf ihrer Zelloberfläche exprimierten Molekülen regulierend auf Zellen des Immunsystems wirken. Eine Hemmung der Proliferation von T-Zellen ist häufig beschrieben. Eine erhöhte Dichte des ko-inhibitorischen Moleküls Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) an der Zelloberfläche von MSCs wird als ein Faktor für die hemmenden Effekte auf T-Zellen angesehen. PD-L1 hemmte in *in vitro* Versuchen das Wachstum von T-Zellen sowie deren zytotoxisches Potenzial (92). Des Weiteren wird das Oberflächenmolekül HLA-G1 mit ähnlichen inhibitorischen Funktionen wie PD-L1 in Verbindung gebracht (93). MSCs können zudem über Expression des Fas Liganden (FasL) direkt die Apoptose in T-Zellen einleiten, sowie die Produktion von MCP-1 steigern, welches chemotaktisch zu einer weiteren Ansammlung von T-Zellen führt (94). Zwei weitere Oberflächenmoleküle, die kritisch für die immunmodulatorischen Fähigkeiten der MSCs zu sein scheinen, sind die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 (95).

MSCs besitzen die Eigenschaft, eine überschießende Immunantwort zu dämpfen, indem sie die Ausschüttung von proinflammatorisch wirkenden Faktoren senken und im Gegenzug die Sekretion antiinflammatorischer Substanzen steigern (96). Im Laufe der letzten Jahre wurden immer mehr von MSCs sezernierte Faktoren identifiziert, die eine Rolle für die immunmodulatorischen Effekte der MSCs spielen. Durch Sekretion dieser Faktoren können die MSCs hemmend auf stimulierte PBMCs und deren Sekretion proinflammatorischer Moleküle wirken. IFN- γ stellt ein solches proinflammatorisches Molekül dar, welches eine zentrale Rolle bei einer Entzündungsreaktion einnimmt und zahlreiche Funktionen und Effekte auf andere Zellen ausübt. IFN- γ wird hauptsächlich von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen als Reaktion auf mitogene oder antigene Stimulation produziert (97, 98), aber auch andere Zellen, wie B-Zellen, Natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) und Antigen-präsentierende Zellen (APCs) sind in der Lage, IFN- γ zu sezernieren (99-101). Zu den Aufgaben der Interferone zählen neben der antiviralen Funktion vor allem immunregulatorische Eigenschaften.

IFN- γ ist dazu imstande, die Expression von MHC Klasse I Molekülen zu steigern (102). Zusätzlich steigert es über Veränderung des Proteasoms, eine Peptidase, die Proteine zu Fragmenten abbaut, die Effektivität des MHC Klasse I Systems und die Vielfalt der Proteine, welche durch diesen Molekülkomplex präsentiert werden (103, 104). Es erhöht sich so die Anzahl der Epitope, welche den CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden und damit einhergehend der Grad der zellulären

Überwachung durch das Immunsystem (105). Mittels Bindung an den IFN- γ Rezeptorkomplex wird zusätzlich die Expression von MHC Klasse II Molekülen hochreguliert (106). Über das MHC Klasse II Molekül werden extrazelluläre Antigene durch APCs, wie dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen, gebunden und den CD4+ T-Helfer-Zellen dargeboten. Die CD4+ T-Helfer-Zellen können daraufhin zu TH1 Zellen differenzieren, die bei der Abwehr von intrazellulären Bakterien und Protozoen eine Rolle spielen. Diese Differenzierung ist abhängig von IFN- γ . Neben der Förderung der Differenzierung von T-Zellen zu TH1 Zellen steigert IFN- γ die spezifische zytotoxische Immunität auch über andere direkte und indirekte Mechanismen. Indirekt fördert es die spezifische zytotoxische Immunität über Wachstumshemmung von TH2 Zellen und Hochregulierung der Antigenprozessierung, Antigenpräsentation und der ko-stimulatorischen Moleküle von APCs (102).

IFN- γ nimmt auch direkten Einfluss auf die Differenzierung zum TH1 Phänotyp. Die Differenzierung des Phänotyps von naiven T-Zellen ist stark abhängig vom vorliegenden Zytokinmilieu zum Zeitpunkt der Antigenbindung an den T-Zell-Rezeptor. So sorgen IFN- γ und IL-12 für eine Differenzierung zum TH1 Typ, für die Differenzierung zum TH2 Typ ist IL-4 verantwortlich. Gleichermäßen stellt IFN- γ für das adaptive Immunsystem das Markerprotein von aktivierten TH1 Zellen dar, da es von aktivierten TH1 Zellen produziert wird. Wir entschieden uns in unseren Versuchen über die immunmodulatorischen Fähigkeiten von MSCs daher für die Analyse der Expression von IFN- γ durch PBMCs und wie diese in Anwesenheit der MSCs verändert wird.

De Nicola *et al.* konnten in ihren Studien durch Inhibition mittels Antikörper Transforming growth factor beta 1 (TGF β 1) sowie Hepatocyte growth factor (HGF) als zwei Moleküle identifizieren, die eine zentrale Position bei der Vermittlung der immunmodulatorischen Effekte der MSCs einnehmen (46). Prostaglandin E2 (PGE2) ist als weiterer wichtiger Faktor zu nennen, der von MSCs sezerniert wird und immunmodulatorisch wirkt (107). Erhöhte Konzentrationen von PGE2 konnten in T-Zellen einen Shift in der Polarisation vom proinflammatorischen TH1 Status zum antiinflammatorischen TH2 Status bewirken und bei dendritischen Zellen eine erhöhte Produktion von antiinflammatorisch wirkendem Interleukin 10 (IL-10) sowie eine erniedrigte Produktion von Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und IL-12 erzeugen (108). Weiterhin zeigte sich, dass Indoleamin-2,3-Dioxygenase (IDO) von MSCs in Abhängigkeit von IFN- γ einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation von

alloreaktiven T-Zellen hatte (109, 110). Neben IDO wurden auch hier höhere Konzentrationen von TGF β 1 und HGF, hervorgerufen durch IFN- γ , gemessen.

Die Art des Gewebes, aus dem MSCs isoliert werden, scheint einen Einfluss auf die immunmodulatorischen Fähigkeiten von MSCs zu haben. In einem Review unserer Arbeitsgruppe verglichen wir die vorliegende Literatur zum Vergleich der immunmodulatorischen Fähigkeiten von MSCs aus Knochenmark, Fettgewebe und Geburts-assoziiertem Gewebe (Nabelschnur, Nabelschnurblut, Plazenta) und kamen zu dem Ergebnis, dass MSCs aus anderen Quellen als Knochenmark oftmals stärkere immunmodulatorische Effekte besaßen (111). Dies war besonders für MSCs aus Lipoaspirat (LA-MSCs) der Fall, weswegen wir uns in unseren Versuchen für die Verwendung von LA-MSCs entschieden.

Es gibt eine Reihe von Daten, die nahelegen, dass MSCs ein sog. „Priming“ durch proinflammatorische Zytokine, wie beispielsweise IFN- γ , TNF- α , IL-1 α oder IL-1 β benötigen, bevor sie in einen Status übergehen, der sich durch immunsuppressive Effekte auszeichnet (112, 113). Das Verhältnis von pro-inflammatorischen Molekülen zu immunsuppressiven Faktoren ist daher in *in vitro* und in *in vivo* Ansätzen von Relevanz, da hierdurch die Funktion und die Einnistung der MSCs maßgeblich beeinflusst wird (90).

IFN- γ steigert die Produktion von Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) in MSCs (113). Stickstoffmonoxid (NO) ist ein flüchtiges, instabiles Gas, welches immunsuppressiv auf T-Zellen wirkt (113). Es liegt daher nahe, dass die Zielzellen primär in die Nähe von MSCs gelangen müssen, um eine Beeinflussung durch NO zu erfahren. Von MSCs sezernierte Chemokine (CXCL9, CXCL10), welche auf T-Zellen wirken, sorgen für einen chemotaktischen Reiz, der T-Zellen in die Umgebung der MSCs rekrutiert (113). Weitere Faktoren, die eine Rolle für immunmodulatorische Fähigkeiten der MSCs spielen, sind leukemia-inhibiting factor, galectin und insulin-like growth factor (114, 115). Najar *et al.* liefern mit ihrem Review eine ausführliche Übersicht über die aktuellen Erkenntnisse bezüglich der involvierten Faktoren, die im immunmodulatorischen Netzwerk der MSCs eine Rolle zu spielen scheinen (115). Zum Vergleich siehe Tabelle 1 und Abbildung 17.

Tabelle 1: Übersicht der wichtigsten Faktoren im immunregulatorischen Netzwerk der MSCs

Faktor	Kürzel	Wirkung auf
CD200	OX2	Produktion von TNF α ↓ und IL-10↑ in Makrophagen, IFN- γ ↓, IL-2↓, IL-4↑ und IL-10↑ in Lymphozyten, Alloreaktivität ↓, periphere Immuntoleranz gegenüber Autoantigenen↑
Eph receptor/Ephrin System ¹	Eph	Vaskulo- & Angiogenese, Ausschüttung immunregulatorischer Faktoren↑ T-Zellen: Migration, Aktivierung↑, Proliferation↑ MSCs: Rekrutierung, Migration, Differenzierung
Galectin	Gal	Zelladhäsion, Apoptose, Differenzierung, T-Zell-Inhibition, T-Zell-Proliferation, T _{Reg} -Aktivierung, IL-10 Produktion↑, Shift von TH1 zu TH2 T-Zell Antwort
Glycoprotein A repetitions predominant	GARP	Verfügbarkeit und Aktivierung von TGF- β 1↑, T-Zell-Funktion↓, Expansion von T _{Reg} -Zellen, periphere Immuntoleranz↑
Heme oxygenase-1	HO-1	T _{Reg} -Induktion, Expression von HGF↑, zytoprotektive Wirkung
Hepatocyte growth factor	HGF	T-Zell-Proliferation↓, IL-10↑ und IDO↑ in Dendritischen Zellen und Monozyten, Proliferation myeloider Suppressorzellen↑, Immunregulation über HGF/HO-1/IL-10 Pathway
Human leukocyte antigen G	HLA-G	T-Zellen: Proliferation↓, T _{Reg} -Induktion↑, TH2 Shift mit IL-10↑ und IFN- γ ↓ MSCs: Autokrine Verstärkung der Immunsuppression
Indolamin-2,3-dioxygenase	IDO	Abbau von Tryptophan in T-Zellen, daraufhin T-Zell-Inaktivierung, Produktion von immunsuppressivem Kynurenin↑, Lymphozytenproliferation↓
Insulin-like growth factor	IGF	Wird nicht von MSCs sezerniert; Zellzyklusregulation, Apoptose, Proteintranslation, Regulierung der Qualität und Amplitude einer Immunantwort, IL-10 Sekretion in T-Zellen↑, TH1-Immunantwort↓
Insulin-like growth factor-binding protein	IGFBP	Wird von MSCs exprimiert; PBMC-Proliferation↓, Wachstum maligner Zellen↓, mitogenes Potenzial von IGF↓
Interleukin 10	IL-10	Wird nicht von MSCs sezerniert; Shift von TH1 zu TH2, Antigenpräsentation durch Immunzellen↓, T _{Reg} -Induktion↑
Leukemia inhibiting factor	LIF	T-Zell Inhibition, Entwicklung von T _{Reg} -Zellen↑, HLA-G Produktion↑
Nitric oxide	NO	Elimination von Pathogenen↑, immunsuppressiv, Wundheilung↑, schädlich für MSCs, Datenlage uneinheitlich
Prostaglandin E2	PGE2	Lymphozytenaktivierung↓, Hemmung von $\gamma\delta$ -T-Zellen, IL-10 Produktion in Makrophagen↑, IDO↑
Semaphorin	Sema	Lymphozytenproliferation↓, T _{Reg} -Aktivität↑ und Sekretion von IL-10↑
Transforming growth factor beta 1	TGF β 1	Produktion von IL-17↑ und IL-10↑, Hemmung überschießender TH2- und TH17 Reaktivität
Tumor necrosis factor-stimulated gene 6	TSG-6	TH1 Differenzierung↓, Immuntoleranz↑, Migration von Neutrophilen↓, inflammatorische Aktivität von Proteasen↓

¹ erythropoietin-producing hepatocellular (Eph) receptor tyrosine kinase-B/Eph family receptor-interacting protein (ephrin)-B

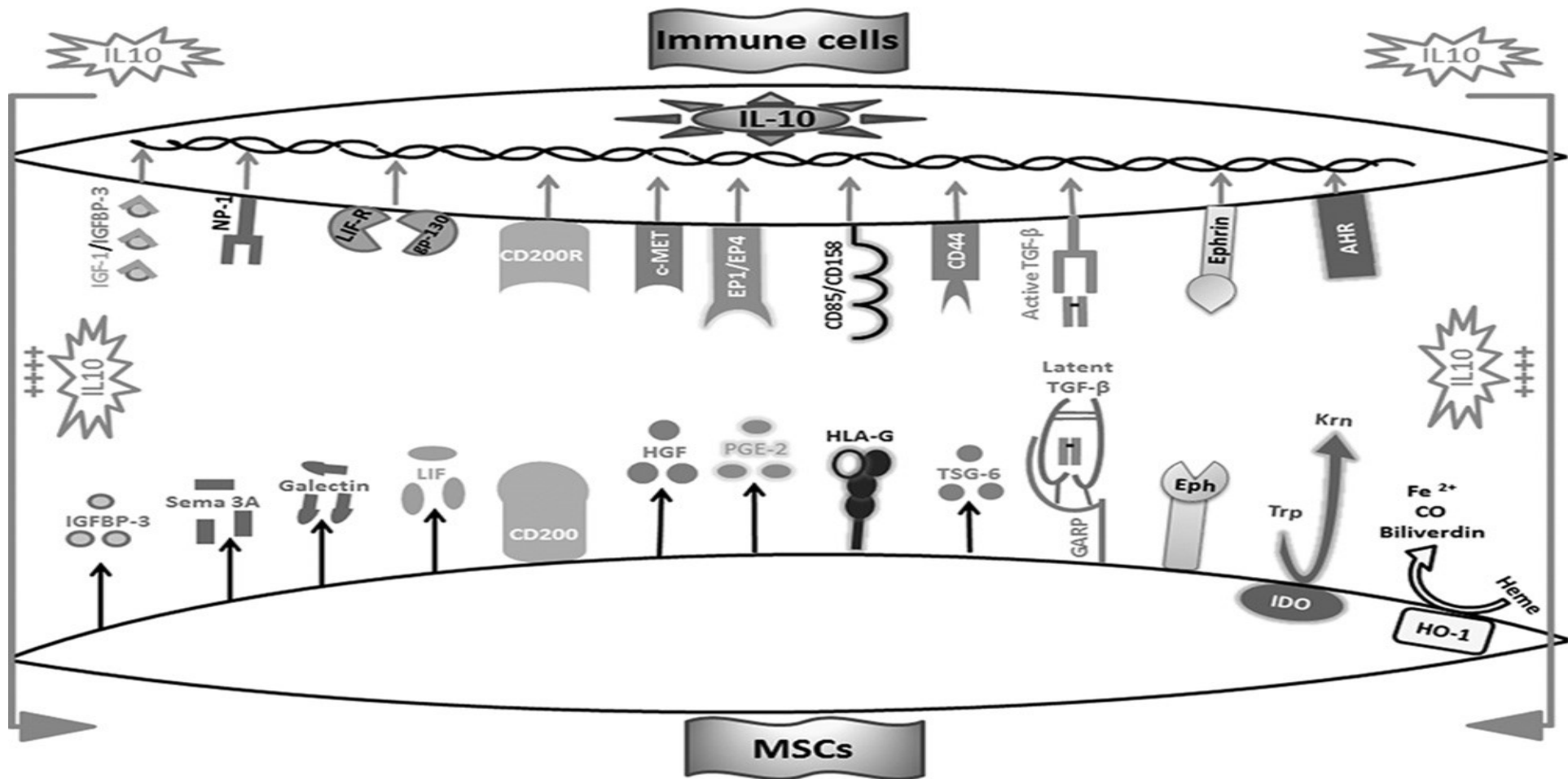


Abbildung 17: Das immunregulatorische Netzwerk der MSCs¹: Es sind eine Vielzahl von sezernierten Faktoren sowie rezeptorvermittelte Prozesse in die Immunregulation durch MSCs involviert. Eine zentrale Position nimmt das entzündungshemmende IL-10 ein, welches regulatorisch auf das angeborene sowie das erworbene Immunsystem wirkt. Ein Zusammenwirken dieser Faktoren im immunologischen Netzwerk sorgt für einen stabilen Status der Toleranz.

¹ Quelle: Najar *et al.* (2016), The Immunomodulatory Potential of Mesenchymal Stromal Cells: A Story of a Regulatory Network

1.3 Zielsetzung

Der PrimeFlow RNA Assay erlaubt die zeitgleiche Analyse der Expression von RNA, Protein und Oberflächenmarkern am Durchflusszytometer. Somit kann in der Analyse eine Zellpopulation anhand der Oberflächenmarker zielgenau untersucht und etwaige Subpopulationen identifiziert werden, die möglicherweise distinkte RNA und Protein Expressionsprofile aufweisen.

Ziel dieser Arbeit war es, den PrimeFlow RNA Assay:

1. in der FlowCore zu etablieren
2. auf Genauigkeit, Richtigkeit, Bedienbarkeit und weitere Parameter zu prüfen im Vergleich mit den etablierten Verfahren RT-qPCR und ELISA
3. auf das Forschungsthema anzuwenden, um IFN- γ mRNA und Protein simultan zu detektieren und die Expression in einem Kokulturansatz aus PBMCs und MSCs zu evaluieren.

Basierend auf der Arbeit von Porichis *et al.* (4) war es unser Ziel, den PrimeFlow RNA Assay im Labor und für die FlowCore zu etablieren. Um uns eng an das publizierte Protokoll zu halten, wählten wir eine für unser Labor relevante Fragestellung, nämlich die immunsuppressive Wirkung von mesenchymal stromalen Zellen auf peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Unsere Experimente sollten zeigen, wie die Expression von IFN- γ mRNA und Protein von unterschiedlich lange stimulierten PBMCs durch die Anwesenheit von MSCs verändert wird. Des Weiteren wurden Experimente durchgeführt, die die Auswirkungen von hohen Glucosespiegeln auf die immunmodulatorischen Effekte der MSCs untersuchen sollten und von denen wir uns ein besseres Verständnis über die Fähigkeiten von MSCs in Settings mit erhöhten Glucosespiegeln, wie beispielsweise Diabetes oder Sepsis, erhoffen. Diese Fragestellung ergab sich im Rahmen des Graduiertenkollegs 1874 DIAMICOM: Diabetische Mikrovaskuläre Komplikationen.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, die neue Methode mit den etablierten Methoden RT-qPCR und ELISA zu vergleichen, um zu sehen, in wie weit die Resultate verglichen werden können, und ob die Verwendung der Proteintransportinhibitoren Monensin und Brefeldin A einen Einfluss auf die Gen- und Proteinexpression haben.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Herkunft
Einmalhandschuhe	Hartmann	Heidenheim, DE
Falcon Tube 15 mL	Fisher Scientific	Schwerte, DE
Falcon Tube 50 mL	Fisher Scientific	Schwerte, DE
NUNC EasYFlask 25 cm ² – 175 cm ²	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Pipettenspitzen 5 µL – 1000 µL	Eppendorf	Hamburg, DE
Pipettenspitzen 5 µL – 1000 µL	Nerbe Plus	Winsen, DE
Precision Wipes	Kimberly-Clark	Irving, TX, USA
Pursept A Xpress	Schülke	Norderstedt, DE
Skalpelle	Braun	Tuttlingen, DE
Zellkulturplatte 6 Well	Corning	Corning, NY, USA
Zellkulturplatte 6 Well	Sigma	St. Louis, MO, USA
Zellkulturplatte 6 Well	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA

2.1.2 Chemikalien

Produkt	Kürzel	Hersteller	Herkunft
Ammoniumchlorid	NH ₄ Cl	Sigma	St. Louis, MO, USA
Aqua dest.		Merck Millipore	Darmstadt, DE
β-Mercaptoethanol 99%	β-ME	Sigma	St. Louis, MO, USA
Bovines Serumalbumin (Albumin Fraktion V)	BSA	AppliChem	Darmstadt, DE
CASY-TON		OMNI Life Science	Bremen, DE
Collagenase I		Serva	Heidelberg, DE
Dimethylsulfoxid	DMSO	WAK-Chemie	Steinbach, DE
Ethylendiamin- tetraessigsäure	EDTA	Roth	Karlsruhe, DE

Ethanol 70%	EtOH	Merck	Darmstadt, DE
Ethanol 100%	EtOH	Merck	Darmstadt, DE
FcR Blocking Reagent		Miltenyi	Bergisch-Gladbach, DE
Foetal Bovine Serum	FBS	Sigma	St. Louis, MO, USA
Ficoll		GE Healthcare	Uppsala, SWE
Flüssigstickstoff	N ₂	Air Liquide	Ludwigshafen, DE
Glucose (D-Glucose)	Glu	Sigma	St. Louis, MO, USA
Glutamin (L-Glutamin)	L-Glut	Sigma	St. Louis, MO, USA
Natriumazid	NaN ₃	Sigma	St. Louis, MO, USA
Natriumcarbonat	Na ₂ CO ₃	Sigma	St. Louis, MO, USA
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	Roth	Karlsruhe, DE
Penicillin/Streptomycin	P/S	Sigma	St. Louis, MO, USA
Trypsin (10X)		Lonza	Basel, CH
Tween-20		Serva	Heidelberg, DE

2.1.3 Käufliche Kits

- **PrimeFlow RNA Assay:**
 - PrimeFlow RNA Assay Kit
Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
 - PrimeFlow RNA Compensation Kit
Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
- **RT-qPCR:**
 - ISOLATE II RNA Mini Kit
Bioline, London, UK
 - SensiFast cDNA Synthesis Kit
Bioline, London, UK
- **ELISA:**
 - OptEIA Set for human interferon-gamma (IFN- γ)
Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ (USA)
 - TMB Substrate Reagent Kit
Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ (USA)
- **Gesamtprotein Assay:**
 - Pierce BCA Protein Assay Kit
Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)

2.1.4 Lösungen, Puffer und Medien

2.1.4.1 Lösungen, Puffer und Medien für die Zellkultur

Produkt	Menge	Zutaten	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)			Lonza
DMEM AB Hohe Glucose (DMEM AB HG) (4,5 g/L Glucose)	10% 2% 1% 3,5% in	Humanes AB Serum L-Glutamin (200mM) Penicillin/Streptomycin Glucoselösung (100g/L) DMEM	Sigma Sigma Lonza
DMEM AB Normal Glucose (DMEM AB) (1,0 g/L Glucose)	10% 2% 1% in	Humanes AB-Serum L-Glutamin Penicillin/Streptomycin DMEM	Sigma Sigma Lonza
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)			Gibco
Erylyse Puffer	15,5 mM 0,1 M 1 mM in	NH ₄ Cl NH ₄ HCO ₃ EDTA Aqua dest.	Sigma Roth Roth Merck
Kryokonservierungsmedium	10% in	DMSO FBS	WAK-Chemie Sigma
PBS-EDTA	2 mM in	EDTA PBS	Roth Gibco
RPMI 1640 Medium			Gibco
RPMI Kulturmedium (2,0 g/L Glucose)	10% 2% 1% in	FBS L-Glutamin Penicillin/ Streptomycin RPMI 1640	Sigma Sigma Sigma Gibco
Trypsin-Lösung	10% in	Trypsin PBS	Lonza Gibco

2.1.4.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Wirt	Isotyp	Klasse	Klon	Konz.	Hersteller
IFN-γ	Maus	IgG1k	monoklonal	4S.B3	1:20	ThermoFisher
CD3	Maus	IgG2a	monoklonal	UCHT1	1:20	ThermoFisher

2.1.4.2 Lösungen, Puffer und Medien für die Durchflusszytometrie

Produkt	Menge	Zutaten	Hersteller
Cell Stimulation Cocktail (500X) (plus protein transport inhibitors)			ThermoFisher
FACS Buffer (pH 7,4)	0,4% 0,02% in	BSA NaN ₃ PBS	AppliChem Sigma Gibco
Fixable Viability Dye eFluor 450			ThermoFisher
Fixable Viability Dye eFluor 780 (APC-Cy7)			ThermoFisher
Flow Cytometry Staining Buffer			ThermoFisher
IC Fixation Buffer			ThermoFisher

2.1.4.3 Lösungen, Puffer und Medien für die RT-qPCR

Produkt	Menge	Zutaten	Hersteller
LightCycler 480 Probes Master			Roche
Lysis Buffer	1% in	β-Mercaptoethanol Lysis Buffer RLY	Sigma Bioline

2.1.4.4 Lösungen, Puffer und Medien für den ELISA

Produkt	Menge	Zutaten	Hersteller
Coating Buffer	7,13 g/L 1,59 g/L in	NaHCO ₃ Na ₂ CO ₃ Aqua dest.	Sigma Sigma Merck
Assay Diluent	10 % in	FBS PBS	Sigma Gibco
Wash Buffer	0,05 % in	Tween-20 PBS	Serva Gibco
Substrate Solution	50% 50%	Substrate Reagent A (NaOH) Substrate Reagent B (TMB)	Becton- Dickinson Becton- Dickinson
Stop Solution	2 N	H ₂ SO ₄	Roth
Working Detector	0,4% 0,4% in	Detection Antibody SaV Horseradish Peroxidase Assay Diluent	Becton- Dickinson

2.1.4.5 Lösungen, Puffer und Medien für den Gesamtproteinassay

Produkt	Menge	Zutaten	Hersteller
BCA Working Reagent	98% 2%	BCA Reagent A BCA Reagent B	ThermoFisher

2.1.5 Geräte

- **Absaugpumpe**; Vacusafe Comfort, Integra Biosciences, Zizers, CH
- **Brutschrank**; CB 210, Binder, Tuttlingen, DE
- **Durchflusszytometer**; FACSCanto II, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
- **Eismaschine**; RNS-0385A, Manitowoc, Manitowoc, WI, USA
- **ELISA Microwell Plate Reader**; Infinite M200, Tecan, Männedorf, CH
- **ELISA Washer**; Wellwash 4 mk 2; Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
- **Feinwaage**; ABJ 22-4M, Kern & Sohn, Balingen-Frommern, DE
- **Magnetrührer**; MR Hei-Standard, Heidolph Instruments, Schwabach, DE
- **Mikroskop**; Axiovert 40 C, Zeiss Microscopy, Göttingen, DE
Axiovert 100, Zeiss Microscopy, Göttingen, DE
- **pH-Meter**; pH 211, Hanna Instruments, Vöhringen, DE
- **Pipetten**; 2, 10, 20, 100, 200, 1000 µL, Eppendorf, Hamburg, DE
- **Pipettierhilfe**; HandyStep, Brand, Wertheim, DE
- **RT-qPCR Cyclers/Reader**; LightCycler 480, Roche, Pleasanton, CA, USA
- **Schüttler**; Lab Dancer, IKA, Staufen, DE
- **Sterilwerkbank**; Hera Safe, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
- **Thermocycler**; DNA Engine Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- **Wasserbad**; Aqualine AL 12, Lauda, Lauda-Königshofen, DE
WNE 7, Memmert, Schwabach
- **Zellzähler**; CASY TT, OMNI Life Science, Bremen
- **Zentrifugen**; 5415 R, Eppendorf, Hamburg
MiniSpin, Eppendorf, Hamburg
Universal 320, Hettich, Tuttlingen
Rotina 420, Hettich, Tuttlingen

Alle Experimente wurden in Laboren der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt.

2.1.6 Programme

- **Excel**; Microsoft, Redmond, WA (USA)
- **FACSDiva**; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ (USA)
- **FlowJo V10**; FlowJo LLC, Ashland, OR (USA)
- **GraphPad Prism 7**; La Jolla, CA (USA)
- **LightCycler 480 Software 1.5**; Roche, Pleasanton, CA (USA)
- **Powerpoint**; Microsoft, Redmond, WA (USA)
- **SigmaPlot 11.0**; SYSTAT Software, Erkrath (DE)
- **GIMP**; GIMP Development Team

2.2 Methoden

2.2.1 Zellen

2.2.1.1 Jurkat Zellen

Die für die Experimente verwendeten Jurkat Zellen erhielten wir von Dr. M. Rojewski aus Ulm.

2.2.1.2 PBMCs

Zur Gewinnung der benötigten PBMCs wurden diese aus Buffy-Coat-Proben von Blut-Spendern (DRK Blutspendedienst Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie Mannheim) mittels eines Ficoll Gradienten isoliert (116).

2.2.1.3 MSCs

Die für die Experimente verwendeten MSCs wurden aus Lipoaspirat gewonnen. Die MSCs wurden vor Verwendung nach etabliertem Protokoll isoliert, charakterisiert und kryokonserviert gelagert (55). Für die Experimente wurden Aliquots aufgetaut und mindestens eine Passage vor Verwendung im Experiment kultiviert. Bei den Experimenten mit Kokulturen mit PBMCs wurden jeweils MSCs und PBMCs von verschiedenen, d.h. allogenen Spendern verwendet. In den Experimenten zu dem Einfluss von unterschiedlichen Glucosespiegeln auf die MSCs wurde der gleiche PBMC-Spender mit 3 verschiedenen allogenen MSC-Spendern verglichen (siehe 3.3).

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Stimulation von Jurkat Zellen

Da im mitgelieferten Protokoll des PrimeFlow RNA Assays die Methode an Jurkat Zellen durchgeführt wurde, wurden diese Zellen auch im ersten Versuch verwendet, um sich möglichst eng an die Vorgehensweise im Protokoll zu halten. Es wurden jeweils 3×10^6 Zellen pro Well verwendet. Die Stimulation der Zellen erfolgte für 12 Stunden mittels $0,05 \mu\text{g/mL}$ Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und $1 \mu\text{g/mL}$ Ionomycin in 2 mL RPMI 1640 10% FBS. Zur Proteintransportinhibition wurden $3 \mu\text{g/mL}$ Brefeldin A sowie $1,35 \mu\text{g/mL}$ Monensin verwendet, welche zeitgleich mit PMA und Ionomycin zu den Zellen gegeben wurden. Inkubiert wurden die Jurkat Zellen in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 .

2.2.2.2 Stimulationsreihen mit PBMCs

Die Versuche mit PBMCs erfolgten analog zu denen mit Jurkat Zellen. Es wurden parallele Ansätze initiiert (Tabelle 2). Für PrimeFlow und RT-qPCR Ansätze wurden zusätzlich die beiden Proteintransportinhibitoren $3 \mu\text{g/mL}$ Brefeldin A und $1,35 \mu\text{g/mL}$ Monensin zugegeben. Für ELISA und RT-qPCR Ansätze wurden keine Proteintransportinhibitoren verwendet, da mittels ELISA die Überstände der Zellen auf die Konzentration von sezerniertem IFN- γ Protein untersucht werden sollten. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen geerntet und auf die jeweiligen Versuche aufgeteilt (Tabelle 2). Dabei wurden jeweils $400 \mu\text{L}$ pro Well für RT-qPCR Versuche entnommen und in $350 \mu\text{L}$ Lysis Buffer lysiert. Anschließend wurde das Lysat umgehend bei -80°C gelagert. Die Überstände für den ELISA wurden nach Zentrifugation abgenommen und ebenfalls bei -80°C gelagert. Die Zellen für die Durchflusszytometrie wurden auf die entsprechenden Röhrchen verteilt und bis zu ihrer Verwendung in PBS gelagert.

Tabelle 2: Schema Stimmulationsreihe PBMCs: Für die Stimmulationsreihen wurden die PBMCs in 3 Gruppen aufgeteilt (unstimuliert, 3h stimuliert, 24h stimuliert). Dann wurde ein Ansatz mit Proteintransportinhibitoren angesetzt, aus welchem PrimeFlow und RT-qPCR Ergebnisse gewonnen wurden, sowie ein Ansatz ohne Proteintransportinhibitoren, mit welchem ELISA und RT-qPCR durchgeführt wurden. Abk.: PBMCs: peripheral blood mononuclear cells, PMA: Phorbol-myristate-acetate, PTI: Proteintransportinhibitor, Bref A: Brefeldin A

Stimmulationsreihe PBMCs			
Zellen	Stimulation	Transportinhibition	Versuche
PBMCs	Unstimuliert (-PMA/Ionomycin)	Mit PTI (+Bref A/Monensin)	PrimeFlow und RT-qPCR
		Ohne PTI (-Bref A/Monensin)	ELISA und RT-qPCR
	3 Stunden stimuliert (+PMA/Ionomycin)	Mit PTI (+Bref A/Monensin)	PrimeFlow und RT-qPCR
		Ohne PTI (-Bref A/Monensin)	ELISA und RT-qPCR
	24 Stunden stimuliert (+PMA/Ionomycin)	Mit PTI (+Bref A/Monensin)	PrimeFlow und RT-qPCR
		Ohne PTI (-Bref A/Monensin)	ELISA und RT-qPCR

2.2.2.3 PBMCs in Kokultur mit MSCs

Für die Versuche mit Kokulturen wurden LA-MSCs verwendet. Nach dem Auftauen wurden jeweils 6×10^5 Zellen in eine T175 Kulturflasche in DMEM-AB Medium ausgesät und kultiviert. Anschließend wurden je 3×10^5 Zellen pro Well in 6 Well Platten ausgesät. Die Passagennummer der MSCs variierte in den Versuchen zwischen 3 und 4. Am Folgetag wurden die Zellen gewaschen und anschließend 3×10^6 PBMCs in 2 mL RPMI Kulturmedium zu den MSCs gegeben und nach dem unter 2.2.2.2 genanntem Schema stimuliert (Tabelle 2).

2.2.2.4 MSCs unter normaler und hoher Glucose

Um die Auswirkungen eines hohen Glucosespiegels auf die immunmodulatorischen Fähigkeiten der MSCs zu untersuchen, wurden die MSCs ab der Isolation in DMEM AB Medium mit entweder 1,0 g/L (5,5 mM = normale Glucose, NG) oder 4,5 g/L (25 mM = hohe Glucose, HG) Glucose kultiviert. Anschließend waren die MSCs durch

das Hinzufügen der PBMCs für 24 Stunden in RPMI Kulturmedium mit 1,0 g/L bzw. 4,5 g/L Glucose gelagert. Es wurden 3 Konditionen verglichen: PBMCs ohne MSCs, PBMCs mit MSCs, die in NG Medium kultiviert wurden, sowie PBMCs mit MSCs, die in HG Medium kultiviert wurden.

2.2.3 PrimeFlow RNA Assay

Zusätzlich zum Nachweis von IFN- γ mRNA und mRNA des Haushaltsgens wurden extrazellulär CD3 und intrazelluläres IFN- γ Protein sowie mit Fixable Viability Dye zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen gefärbt. Die Zellen wurden zunächst mit Fixable Viability Dye gefärbt und danach mit dem Antikörper gegen CD3 behandelt. Daraufhin wurde der PrimeFlow RNA Assay nach Herstellerangaben unter Ergänzung der Färbung von IFN- γ Protein durchgeführt:

Tag 1 – Antikörpermarkierung, Fixation und Permeabilisation

Fixable Viability Dye

1. Die Zellen wie gewünscht in den Eppendorf-Tubes präparieren.
2. Zweimaliges Waschen mit 1 mL säurefreiem und serum- und proteinfreiem PBS und Zentrifugation mit 600xg für 5 Min.
3. In einer Konzentration von $1-10 \times 10^6$ /mL resuspendieren.
4. Hinzufügen von 0,5 μ L/mL Fixable Viability Dye und sofortiges Vortexen.
5. Inkubation für 30 Min bei 2-8°C, lichtgeschützt.
6. Zweimaliges Waschen mit Flow Cytometry Staining Buffer, jeweils Zentrifugation mit 600xg für 5 Min.

Markierung von CD3

1. Zellen in FACS Buffer Waschen und Zentrifugation mit 600xg für 5 Min.
2. Dekantieren und jeweils in 100 μ L FACS Buffer resuspendieren.
3. Hinzufügen von 10 μ L FcR Block.
4. Inkubation für 5 Min bei 2-8°C.
5. Hinzufügen von 5 μ L CD3 Antikörper (APC-markiert).
6. Inkubation für 20 Min bei 2-8°C.
7. Einmaliges Waschen mit 1 mL FACS Buffer.

PrimeFlow RNA Assay und intrazelluläre IFN- γ Protein Markierung

1. Präparation von Fixation Buffer 1 durch Mischen von Fixation Buffer 1A und Fixation Buffer 1B zu gleichen Teilen. (Hinweis: Diesen Puffer nicht stark schütteln. Es wird 1 mL dieses Puffers pro Probe benötigt. Dieser Puffer sollte frisch zubereitet werden und ungenutzter Puffer sollte verworfen werden).
2. Hinzufügen von 1 mL Fixation Buffer 1, danach die Eppendorf-Tubes mehrmals wenden, um zu mischen.
3. Inkubation für 30 Min bei 2-8°C.
4. Zentrifugation mit 800xg für 5 Min. Resuspendieren der Zellen in 100 μ L Restvolumen.
5. Präparation von 1X Permeabilization Buffer mit RNase Inhibitor durch Verdünnen von 10X Permeabilization Buffer mit RNase freiem Wasser und Hinzufügen von RNase Inhibitor in einer Konzentration von 1:1000. (Hinweis: Diesen Puffer nicht stark schütteln. Es werden 3 mL dieses Puffers pro Probe benötigt. Dieser Puffer sollte frisch zubereitet werden und ungenutzter Puffer sollte verworfen werden).
6. Hinzufügen von 1 mL 1X Permeabilization Buffer mit RNase Inhibitor, danach die Eppendorf-Tubes mehrmals wenden, um zu mischen.
7. Zentrifugation mit 800xg für 5 Min. Resuspendieren der Zellen in 100 μ L Restvolumen.
8. Hinzufügen von 1 mL 1X Permeabilization Buffer mit RNase Inhibitor, danach die Eppendorf-Tubes mehrmals wenden, um zu mischen.
9. Zentrifugation mit 800xg für 5 Min. Resuspendieren der Zellen in 100 μ L Restvolumen.
10. Hinzufügen von 5 μ L IFN- γ Protein Antikörper (PE-markiert).
11. Inkubation für 30 Min bei 2-8°C.
12. Hinzufügen von 1 mL 1X Permeabilization Buffer mit RNase Inhibitor, danach die Eppendorf-Tubes mehrmals wenden, um zu mischen.
13. Zentrifugation mit 800xg für 5 Min. Resuspendieren der Zellen in 100 μ L Restvolumen.
14. Präparation von 1X Fixation Buffer 2 durch Mischen von 125 μ L Fixation Buffer 2 (8X) mit 875 μ L Wash Buffer. Vorsichtig mischen durch mehrmaliges Wenden. (Hinweis: Diesen Puffer nicht stark schütteln. Es wird 1 mL dieses Puffers pro Probe benötigt. Dieser Puffer sollte frisch zubereitet werden und ungenutzter Puffer sollte verworfen werden).
15. Hinzufügen von 1 mL 1X Fixation Buffer 2, danach die Eppendorf-Tubes mehrmals wenden, um zu mischen.
16. Inkubation für 60 Min bei Raumtemperatur im Dunkeln.
17. Optional: Zellen können über Nacht in 1X Fixation Buffer 2 bei 2-8°C im Dunkeln gelagert werden, anstatt sie für 60 Min zu inkubieren.
18. Zentrifugation mit 800xg für 5 Min. Resuspendieren der Zellen in 100 μ L Restvolumen.
19. Hinzufügen von 1 mL Wash Buffer, danach die Eppendorf-Tubes mehrmals wenden, um zu mischen.
20. Zentrifugation mit 800xg für 5 Min. Resuspendieren der Zellen in 100 μ L Restvolumen.
21. Wiederholung des Waschvorgangs mit 1 mL Wash Buffer.
22. Optional: Zellen können über Nacht in Wash Buffer mit RNase Inhibitor bei 2-8°C im Dunkeln gelagert werden. Dafür muss im letzten Waschvorgang RNase Inhibitor in einer Konzentration von 1:1000 hinzugefügt werden.

Tag 1 – Hybridisierung der Target Probe

1. Target Probes sowie Positive Control Probes bei Raumtemperatur auftauen lassen.
2. Target Probe Diluent auf 40°C erwärmen.
3. Target Probes 1/20 in Target Probe Diluent verdünnen. Gründlich mischen durch Pipettieren.
4. 100 μ L verdünnte Target Probes (5 μ L Target Probes + 95 μ L Target Probe Diluent) zu den jeweiligen Proben hinzufügen und gut vortexen.
5. Inkubation für 2 h bei 40°C. Nach 1 h Proben zum Mischen mehrmals umdrehen.
6. Hinzufügen von 1 mL Wash Buffer, danach die Eppendorf-Tubes mehrmals wenden, um zu mischen.

7. Zentrifugation mit 800xg für 5 Min. Resuspendieren der Zellen in 100 µL Restvolumen.
8. Präparation von Wash Buffer mit RNase Inhibitor durch Hinzufügen von RNase Inhibitor in einer 1/1000 Verdünnung. (Hinweis: Es wird 1 mL dieses Puffers pro Probe benötigt. Dieser Puffer sollte frisch zubereitet werden und ungenutzter Puffer sollte verworfen werden).
9. Hinzufügen von 1 mL Wash Buffer mit RNase Inhibitor, danach die Eppendorf-Tubes mehrmals wenden, um zu mischen.
10. Zentrifugation mit 800xg für 5 Min. Resuspendieren der Zellen in 100 µL Restvolumen.
11. Lagerung der Proben über Nacht bei 2-8°C im Dunkeln. Dies ist der empfohlene Zeitpunkt, um das Protokoll zu pausieren.

Tag 2 – Signalamplifikation

1. Proben und Wash Buffer auf Raumtemperatur erwärmen.
2. PreAmp Mix, Amp Mix und Label Probe Diluent auf 40°C erwärmen.
3. Hinzufügen von 100 µL PreAmp Mix, kurzes Vortexen, um zu mischen.
4. Inkubation für 1,5 h bei 40°C.
5. Hinzufügen von 1 mL Wash Buffer, danach die Eppendorf-Tubes mehrmals wenden, um zu mischen.
6. Den Waschvorgang noch zweimal wiederholen. Dabei immer zwischen den Waschvorgängen Zentrifugation mit 800xg für 5 Min und resuspendieren der Zellen in 100 µL Restvolumen.
7. Hinzufügen von 100 µL Amp Mix, kurzes Vortexen, um zu mischen.
8. Inkubation für 1,5 h bei 40°C.
9. Während der Inkubation der Proben mit Amp Mix die Label Probes auf Eis im Dunkeln auftauen lassen.
10. Hinzufügen von 1 mL Wash Buffer, danach die Eppendorf-Tubes mehrmals wenden, um zu mischen.
11. Den Waschvorgang noch einmal wiederholen. Dabei immer zwischen den Waschvorgängen Zentrifugation mit 800xg für 5 Min und resuspendieren der Zellen in 100 µL Restvolumen.
12. Label Probes 1/100 in Label Probe Diluent verdünnen. (Hinweis: Es werden 100 µL verdünnte Label Probes pro Probe benötigt).
13. Hinzufügen von 100 µL verdünnten Label Probes zu den jeweiligen Proben, kurzes Vortexen, um zu mischen.
14. Inkubation für 1 h bei 40 °C.
15. Hinzufügen von 1 mL Wash Buffer, danach die Eppendorf-Tubes mehrmals wenden, um zu mischen.
16. Den Waschvorgang noch einmal wiederholen. Dabei immer zwischen den Waschvorgängen Zentrifugation mit 800xg für 5 Min und Resuspendieren der Zellen in 100 µL Restvolumen.
17. Hinzufügen von 1 mL Storage Buffer oder Flow Cytometry Staining Buffer, danach die Eppendorf-Tubes mehrmals wenden, um zu mischen.
18. Transfer der Proben in 12x75 mm Polystyren Rörchen und Analyse am Durchflusszytometer. (Hinweis: Proben können vor der Analyse bei 2-8°C im Dunkeln gelagert werden).

2.2.4 Polymerase Chain Reaction

Nach Aufnahme der PBMCs in Lysepuffer wurde zunächst die RNA nach Herstellerprotokoll isoliert. Dazu wurden die Zellen in Lysepuffer gegeben und RNA isoliert. Hierfür wurde das ISOLATE II RNA Mini Kit (Bioline, London, UK) verwendet. Anschließend wurde die Konzentration der RNA mittels NanoQuant Plate (Tecan, Männedorf, CH) am Plattenlesegerät Infinite M200 (Tecan, Männedorf, CH) bestimmt und die RNA in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde das SensiFast cDNA Synthesis Kit (Bioline, London, UK) nach Herstellerangabe verwendet. Dann wurde die RT-qPCR durchgeführt (Tabelle 3). Zur Fluoreszenz-Markierung der cDNA Transkripte verwendeten wir Universal Probe Library (UPL)-Sonden (Roche Diagnostics, Mannheim). In den Experimenten wurden die beiden Haushaltsgene Ribosomal Protein L13A (RPL13A) und β -2-Mikroglobulin (B2M) verwendet. Da in anfänglichen Experimenten mit dem PrimeFlow RNA Assay beobachten werden musste, dass sich die Expression von RPL13A infolge der Stimulation ändert, wurde für weitere Experimente das in beiden Methoden stabil exprimierte B2M (siehe 3.1.2.2) verwendet. Die in den Versuchen verwendeten Primer (Tabelle 4) hatten eine in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe belegte, ausreichend hohe Effizienz, sodass keine Primeroptimierung erfolgen musste (117).

Tabelle 3: Protokoll für die Synthese der cDNA und Durchführung der RT-qPCR

cDNA Synthese	Temperatur	Zeit
1. Primeranlagerung	25 °C	10 Min
2. Reverse Transkription	42 °C	15 Min
3. Inaktivierung	85 °C	5 Min
4. Kühlung	4 °C	
RT-qPCR		
1. Präinkubation	95 °C	10 Min
2. Denaturierung	95 °C	10 Sek
3. Hybridisierung	60 °C	30 Sek
4. DNA Synthese	72 °C	1 Min
5. Gehe zu Schritt 2, Wdh. 45x		
6. Kühlung	4 °C	

Zur relativen Quantifizierung der cDNA wurde am Roche Light Cycler 480 eine „Advanced Relative Quantification“ durchgeführt, bei der das normalisierte Verhältnis (norm. Ratio) von IFN- γ cDNA (Target) zu B2M (Referenz) mit der Formel

$$\text{Normalisiertes Verhältnis} = \left(\frac{\text{Konz. Target}}{\text{Konz. Referenz}} \right)_{\text{Probe}} : \left(\frac{\text{Konz. Target}}{\text{Konz. Referenz}} \right)_{\text{Kalibrator}}$$

bestimmt wurde. Als Kalibrator zur Normalisierung wurden Wells mit unstimulierten PBMCs verwendet.

Tabelle 4 Übersicht der verwendeten Primersequenzen

Name	UPL Sonde	Primer	Sequenz	Position	Intron	Amplicon länge
Homo sapiens interferon gamma (IFNG), mRNA	#21	IFNg_21-F	GGCATTTTGAAGAATTGGAAAG	286 – 307	92 nt	112
		IFNg_21-R	TTTGGATGCTCTGGTCATCTT	377 – 397		
Homo sapiens beta-2-microglobulin (B2M), mRNA	#42	B2M_42-F	TTCTGGCCTGGAGGCTATC	105 – 123	3807 nt	86
		B2M_42-R	TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC	168 – 190		
Homo sapiens ribosomal protein L13a (RPL13A), mRNA	#74	RPL13A_74-F	CTGGACCGTCTCAAGGTGTT	317 – 336	496 nt	124
		RPL13A_74-R	GCCCCAGATAGGCAAACTT	422 – 440		

2.2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Mit dem ELISA wurde die Konzentration von IFN- γ Protein in den Überständen der unterschiedlich lange stimulierten PBMCs bestimmt. Für den ELISA wurde das OptEIA Set for human interferon-gamma sowie das Substrate Reagent Set der Firma Becton Dickinson jeweils nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.6 Gesamtproteinassay

Mit dem Gesamtproteinassay kann unspezifisch der Gesamtproteingehalt einer Probe mittels Photometer anhand einer Standardreihe von Bovinem Serumalbumin (BSA) mit definierten Proteinkonzentrationen quantifiziert werden. Um sicherzustellen, dass die gemessenen Differenzen des IFN- γ Proteins aus den ELISA Versuchen nicht durch ungleiche Zellzahlen in den Versuchen entstanden, führten wir stichprobenartig Messungen des Gesamtproteins in den Überständen der Proben durch. In den Versuchen wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit der Firma ThermoFisher verwendet.

2.2.7 Auswertung und Statistik

2.2.7.1 Auswertung Durchflusszytometrie

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mittels der Software *FlowJo 10* (Version 10.0.0.8), *Microsoft Excel* sowie *Sigma Plot* (Version 11.0) für ausgewählte statistische Berechnungen. Nach Messung der Proben am Durchflusszytometer BD FACS Canto II wurden die gewonnenen Daten mittels der *FACS Diva Software* (Version 8) als „fcs“ Datei exportiert und anschließend mit dem Programm *FlowJo 10* ausgewertet. Als Gatingstrategie (Abbildung 18) wurde zunächst anhand des forward scatters und sideward scatters die Population zur Analyse isoliert, anschließend wurden mittels Gating auf den Lebend-Tot-Farbstoff (gefärbt mit APC-Cy7) alle toten Zellen von der Analyse ausgeschlossen. Ein ursprünglich geplantes Gating auf CD3⁺ Zellen wurde aufgrund von Schwierigkeiten mit dem CD3-Antikörper (PE-Cy7) nicht durchgeführt (Vgl. 4.2.1). Da es sich um ein Multicolor-Experiment mit insgesamt 5 Farbstoffen handelte, wurde das Gating für IFN- γ mRNA (APC), IFN- γ Protein (PE) und B2M (FITC) anhand der jeweiligen Fluorescence Minus One (FMO)

Kontrollen vorgenommen. Es wurden sodann die Mediane aller Fluoreszenzintensitäten (mean fluorescence intensity, MFI) definiert. Nach Abzug der Autofluoreszenz ergab sich der korrigierte MFI-Wert, welcher als Maß für die Antigenexpressionsstärke gilt. Nach Sichtung der Rohdaten wurden für jede Bedingung jeweils der arithmetische Mittelwert (MW) und die dazugehörige Standardabweichung (SD) berechnet. Zur Signifikanztestung wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen in *GraphPad Prism* übertragen und es wurden gepaarte t-Tests (2 Proben), beziehungsweise One Way ANOVA-Analysen (mehr als 2 Proben) (engl. analysis of variance), durchgeführt. Bei positivem Ergebnis der One Way ANOVA Analyse wurde als Post Hoc Test ein Tukey-Test durchgeführt. Falls keine Normalverteilung vorlag, wurden Rangsummentests durchgeführt. Statt eines t-Tests wurde ein Whitney-Mann-U-Test und statt einer One Way ANOVA-Analyse ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert <0.05 definiert. Korrelationen innerhalb der durchflusszytometrischen Experimente und zwischen den einzelnen Methoden wurden mittels Spearman-Korrelation ermittelt.

2.2.7.2 Auswertung RT-qPCR

Die Messung der Fluoreszenz in den Wells der RT-qPCR Platte erfolgte am *Roche Lightcycler 480*. Die Auswertung erfolgte mit der gleichnamigen Software. Es wurde jeweils das Verhältnis der IFN- γ cDNA im Vergleich zu den Haushaltsgenen B2M bzw. RPL13A bestimmt. Hierbei wurde die Fluoreszenz der IFN- γ cDNA einer Probe mit dem geometrischen Mittelwert der Fluoreszenz aller Reaktionsgefäße der gleichen Platte, in denen B2M amplifiziert wurde, verglichen. Dabei stammten die einzelnen Fluoreszenzwerte für B2M jeweils aus dem gleichen Experiment. Die gewonnenen Daten wurden in Excel übertragen und es wurden jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen der Experimente mit gleichen Bedingungen berechnet. Zur statistischen Signifikanztestung mittels gepaarten t-Tests und ANOVA Analysen wurde *GraphPad Prism* verwendet. Bei positivem Ergebnis der One Way ANOVA Analyse wurde als Post Hoc Test ein Tukey-Test durchgeführt. Falls keine Normalverteilung vorlag, wurden Rangsummentests durchgeführt. Statt eines gepaarten t-Tests wurde ein Whitney-Mann-U-Test und statt einer One Way ANOVA-Analyse ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

2.2.7.3 Auswertung ELISA

Die Erfassung der ELISA Daten erfolgte zunächst über das Auslesen der Fluoreszenz der Mikrotiterplatten am *TECAN Infinite M200*. Hierbei wurde die Extinktion der jeweiligen Wells bei 570 nm von der Absorption bei 450 nm abgezogen, um den Einfluss non-spezifischer Emissionen (z.B. das Plastik der Mikrotiterplatte) auf die Messung zu minimieren. Die gemessenen Daten wurden daraufhin in *Excel* exportiert und es wurde mittels *Sigma Plot* eine Standardkurve anhand einer vordefinierten Standardreihe berechnet. Anhand der Standardkurve wurde die Menge an IFN- γ in den jeweiligen Proben quantifiziert. Anschließend wurden jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen der Experimente mit gleichen Bedingungen erstellt und es wurden mit *GraphPad Prism* gepaarte t-Tests oder ANOVA-Analysen zur Signifikanztestung durchgeführt. Bei positivem Ergebnis der One Way ANOVA Analyse wurde als Post Hoc Test ein Tukey-Test durchgeführt. Falls keine Normalverteilung vorlag, wurden Rangsummentests durchgeführt. Statt eines t-Tests wurde ein Whitney-Mann-U-Test und statt einer One Way ANOVA Analyse ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

2.2.7.4 Darstellungen

Die graphischen Darstellungen wurden mittels *GraphPad Prism* (Version 7.02) und *GIMP* (Version 2.8) angefertigt.

3 ERGEBNISSE

Mit dieser Arbeit soll eine neuartige Methode zur durchflusszytometrischen Untersuchung von RNA, den PrimeFlow RNA Assay, evaluiert und etabliert werden. Dies erfolgt im Kontext einer wissenschaftlichen Fragestellung zur Charakterisierung der immunmodulatorischen Eigenschaften von MSCs (Vgl. 1.2).

In einem ersten Schritt wurde das Herstellerprotokoll anhand der Zell-Linie Jurkat etabliert. In einem nächsten Schritt wurde die IFN- γ mRNA und Protein Expression von unterschiedlich lange stimulierten PBMCs untersucht. Im Rahmen der wissenschaftlichen Fragestellung interessierte uns, inwiefern MSCs die Entzündungsreaktion von stimulierten PBMCs und damit die IFN- γ Produktion hemmend modulieren konnten. Dazu wurden Stimulationsreihen von PBMCs in Kokultur mit MSCs durchgeführt. Anschließend wurden die Spiegel von IFN- γ mRNA sowie IFN- γ Protein ausgewertet. Für die Versuche wurde einerseits der PrimeFlow RNA Assay angewandt, andererseits wurden RT-qPCR und ELISA durchgeführt, deren Ergebnisse mit denen des PrimeFlow RNA Assays verglichen wurden, um die Validität dieser neuen Methode zu prüfen.

Ein weiterer Aspekt von Interesse war für uns, den Einfluss von unterschiedlichen Glucosespiegeln auf die immunmodulatorischen Fähigkeiten von MSCs zu untersuchen, genauer, ob ein erhöhter Glucosespiegel während der Expansion und Kultur der MSCs vor Verwendung im Experiment zu verringerten immunmodulatorischen Fähigkeiten führt. Hierzu wurden MSCs in Medium mit physiologischem und mit erhöhtem Glucosespiegel kultiviert und anschließend wiederum Kokulturen mit PBMCs durchgeführt.

Durch die unterschiedlichen Voraussetzungen für PrimeFlow RNA Assay und ELISA bedingt (Vgl. 1.1.2 & 1.1.4), wurde bei jedem Experiment eine RT-qPCR von Zellen mit den Proteintransportinhibitoren Monensin und Brefeldin A, sowie eine RT-qPCR von Zellen ohne Proteintransportinhibitoren durchgeführt. Auf die Unterschiede der Expression von IFN- γ mRNA und Protein, die sich in diesen Experimenten gezeigt haben, möchte ich gerne genauer eingehen.

3.1 Etablierung des PrimeFlow RNA Assays

3.1.1 Stimulation von Jurkat Zellen: PrimeFlow RNA Assay

Zu Beginn der Etablierung des PrimeFlow RNA Assays führten wir ein Experiment durch, bei dem wir mit humanen immortalisierten T-Lymphozyten der Jurkat Tumorzelllinie arbeiteten und IFN- γ mRNA und Protein bestimmten, um dem Herstellerprotokoll zu folgen. In anfänglichen Untersuchungen verglichen wir mittels RT-qPCR unterschiedliche Haushaltsgene auf ihre Stabilität unter Stimulation (Daten nicht gezeigt) (118). RPL13A zeigte hierbei besonders homogene Ergebnisse, weswegen wir uns für die Verwendung dieses Haushaltsgens entschieden. Die Zellen wurden mit PMA und Ionomycin unter Zugabe der Proteintransportinhibitoren (PTI) Brefeldin A und Monensin stimuliert. Nach 12 Stunden Stimulation wurde das PrimeFlow Protokoll exakt nach Herstellerangaben durchgeführt (Vgl. 2.2.3). Verglichen wurde die Expression von IFN- γ mRNA und Protein von unstimulierten sowie von 12 Stunden stimulierten Zellen. Zusätzlich wurde der Oberflächenmarker CD3 für T-Zellen und das Haushaltsgen RPL13A als Kontrolle gefärbt. Zur Gatingstrategie siehe Kapitel 2.2.7.

In dem Experiment zeigte sich bei guter Viabilität (Abbildung 18 B) der unstimulierten Zellen ein sehr schwaches Signal des CD3 Antikörpers (Abbildung 18 C). Bei den unstimulierten Zellen war das Haushaltsgen RPL13A klar positiv (Abbildung 18 D). Das Signal für IFN- γ mRNA war in unstimulierten Zellen schwach nachweisbar, IFN- γ Protein im Vergleich deutlicher nachweisbar (Abbildung 18 E&F).

Bei den stimulierten Zellen zeigte sich, dass das Signal des CD3 Antikörpers abnahm; von 44% Positivität (unstimuliert) auf etwa 8% Positivität (stimuliert) (Abbildung 19 C). Es ist für T-Zellen eine verminderte Expression von CD3 und CD4 nach Stimulation mit PMA beschrieben (119-121), dennoch war das beobachtete Signal überraschend schwach (Vgl. 4.2.1). Im Vergleich mit unstimulierten Zellen war eine unerwartet stärkere Expression des Haushaltsgens RPL13A zu verzeichnen, bei der eine RPL13A schwach exprimierende Population auffiel, während die Expression der RPL13A stark positiven Zellen an Intensität (mittlere Fluoreszenzintensität) zunahm (Abbildung 20 A). Bei IFN- γ mRNA und Protein war nach 12 Stunden Stimulation ein schwacher, aber erkennbarer Anstieg des Fluoreszenzsignals für beide Parameter, im Vergleich zu unstimulierten PBMCs, zu verzeichnen (Abbildung 20 E&F). IFN- γ RNA nahm von 30% Positivität auf 57% zu, und es zeigte sich eine höhere mittlere Fluoreszenzintensität.

Die Positivität von IFN- γ Protein war in beiden Populationen fast maximal (98% unstimuliert, 97% stimuliert), allerdings nahm die mittlere Fluoreszenzintensität in stimulierten Zellen zu (MFI 1181 unstimuliert vs. MFI 1972 stimuliert, Vgl. Abbildung 18 E & Abbildung 19 E).

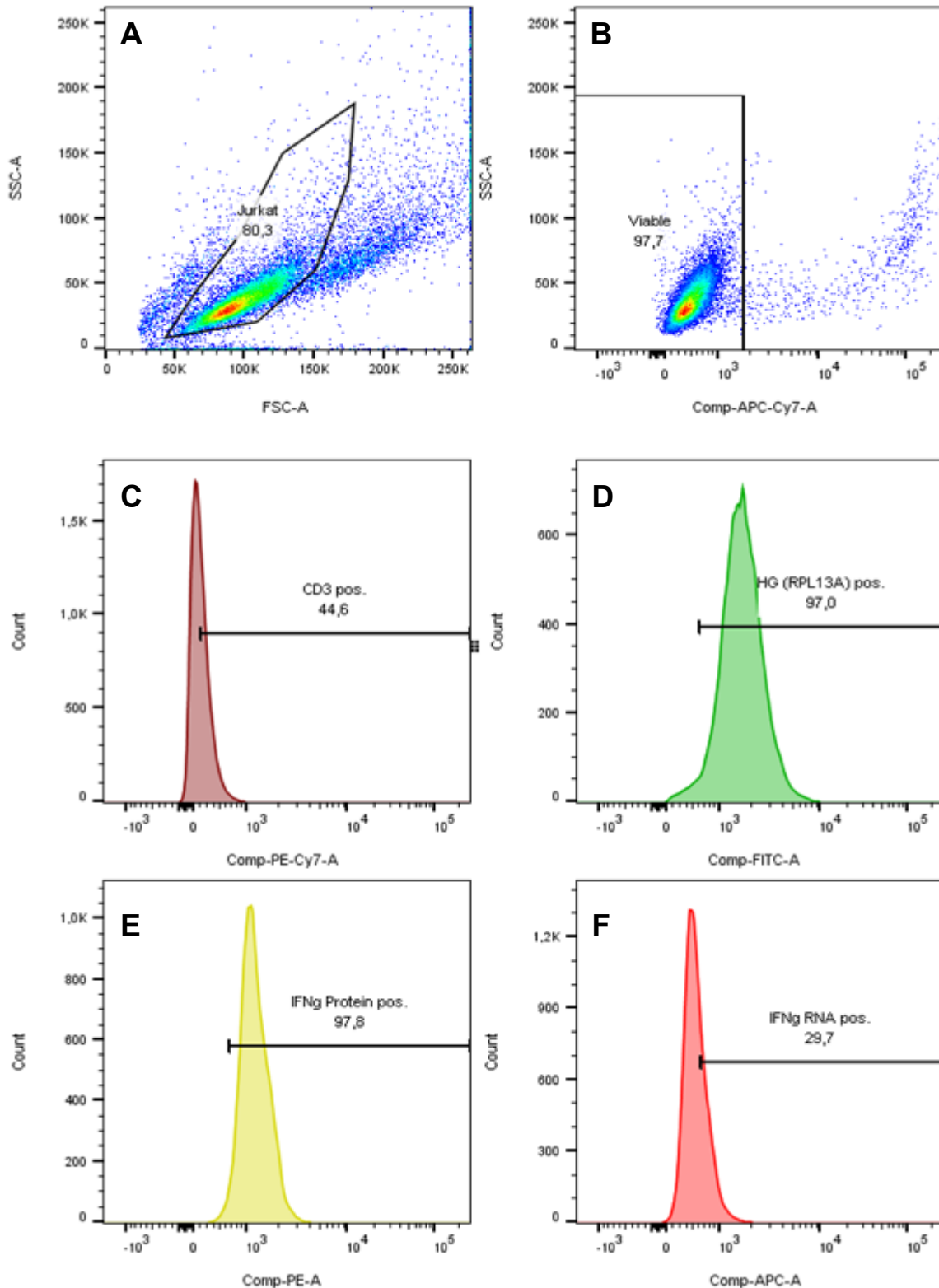


Abbildung 18 (PrimeFlow): Jurkat Zellen unstimuliert: Es zeigt sich ein schwaches Signal für CD3. Auch bei unstimulierten Zellen ist IFN- γ Protein nachzuweisen. Das Haushaltsgen RPL13A ist deutlich exprimiert, IFN- γ RNA hingegen ist wenig vorhanden. Zur Gatingstrategie siehe Kapitel 2.2.7.

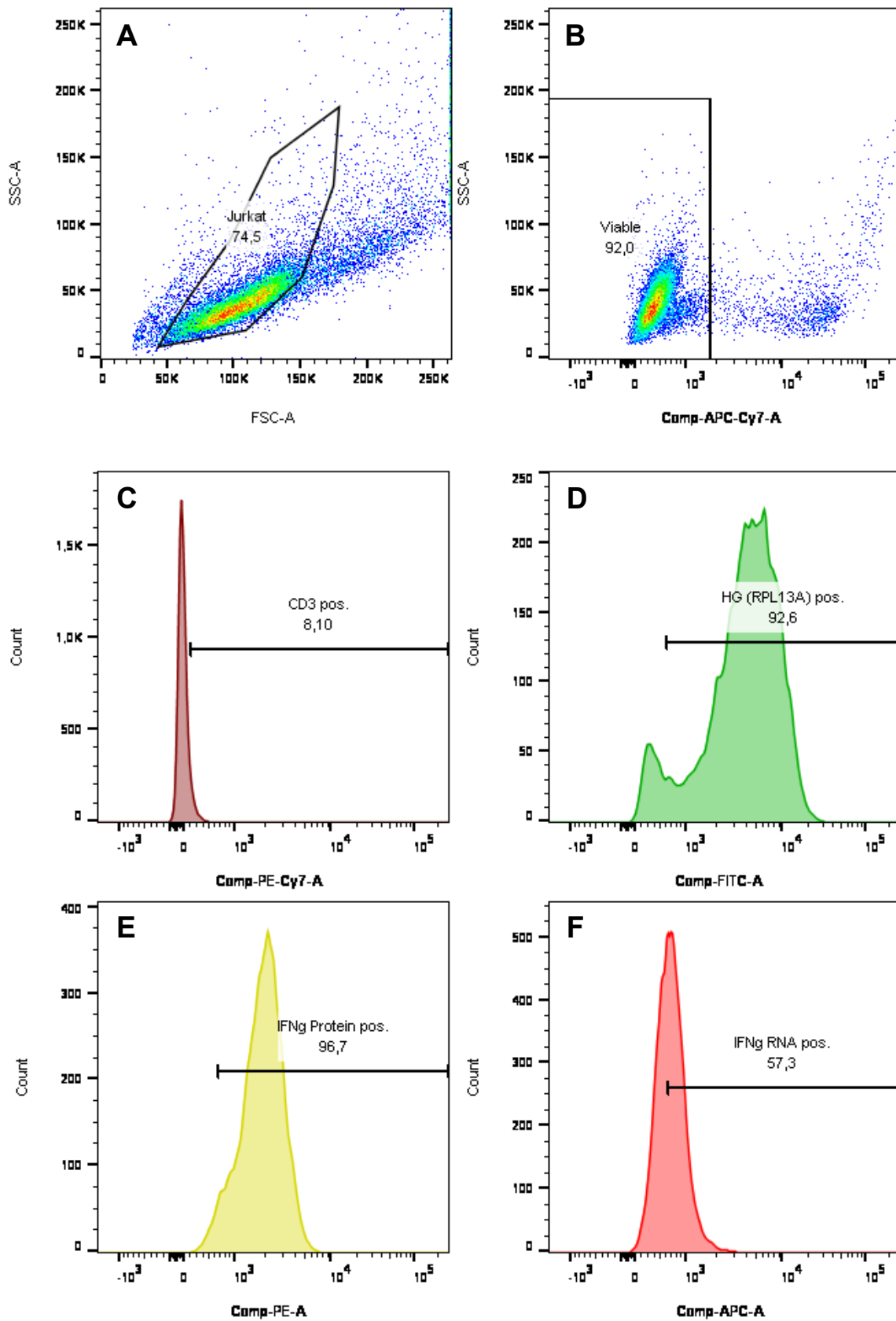


Abbildung 19 (PrimeFlow): Jurkat Zellen für 12 Stunden stimuliert: Hier zeigt sich ein noch schwächeres Signal für CD3. IFN- γ Protein ist nun stärker exprimiert. Ebenso IFN- γ RNA und das Haushaltsgen RPL13A.

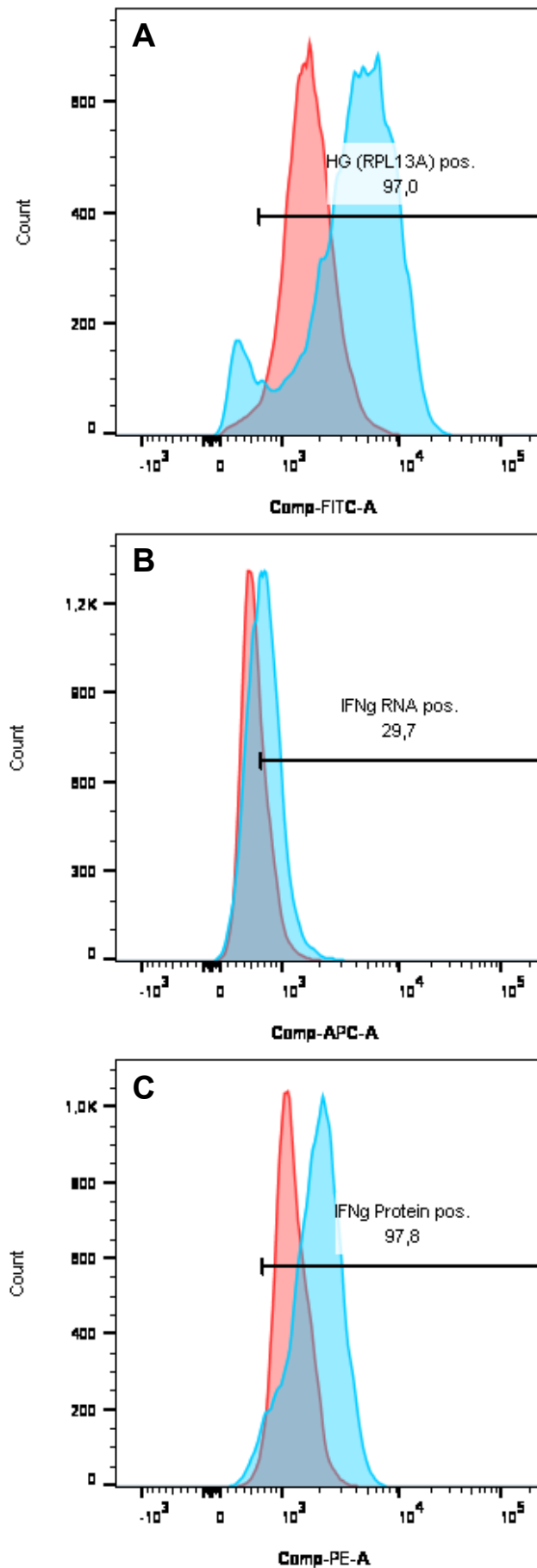


Abbildung 20 (PrimeFlow): Jurkat Zellen unstimuliert und stimuliert: Der Vergleich zeigt eine Veränderung der Expression nach 12 Stunden Stimulation für IFN- γ RNA (B), IFN- γ Protein (C), sowie für RPL13A (A). Dabei ist die stärkste Veränderung bei RPL13A zu verzeichnen. Hier scheint eine Subpopulation der PBMCs RPL13A stärker zu exprimieren (zwei blaue Peaks in Abb. 20 A).

Aus den obigen Ergebnissen folgt: Das Experiment zeigt, dass das Protokoll ohne Modifikation im Labor durchgeführt werden kann. Die Ergebnisse waren, bis auf die unerwartet veränderte Expression von RPL13A (gedacht als Referenzgen mit stabiler Expression), vergleichbar zu den laut Protokoll zu erwartenden Daten. Das schwache Signal für CD3 ist möglicherweise durch Herunterregulation nach Stimulation erklärt. Nach diesem Proof of Principle Experiment an der Jurkat-Zelllinie wurde der Versuch mit Primärzellen, d.h. PBMC, durchgeführt.

3.1.2 Stimulation von PBMCs

In Vorversuchen mittels RT-qPCR und ELISA wurden die PBMCs zunächst über unterschiedliche Zeiträume (1, 3, 6, 12, 24 Stunden) mittels PMA und Ionomycin stimuliert, um die Kinetik der IFN- γ mRNA und Protein Expression zu verfolgen. Hier interessierte uns die Frage, in welchem zeitlichen Abstand die IFN- γ Protein Produktion auf die mRNA Expression folgt. Als Kontrolle wurden unstimulierte Zellen analysiert.

Nach 3 Stunden Stimulation war das Signal für IFN- γ mRNA maximal (Abbildung 21). Die Expression von IFN- γ Protein nahm über die Zeit kontinuierlich zu und war nach 24 Stunden am höchsten (Abbildung 22). Aufgrund dieser Muster entschieden wir uns dafür, weiterführende Experimente zu diesen Zeitpunkten (3 und 24 Stunden) zu analysieren.

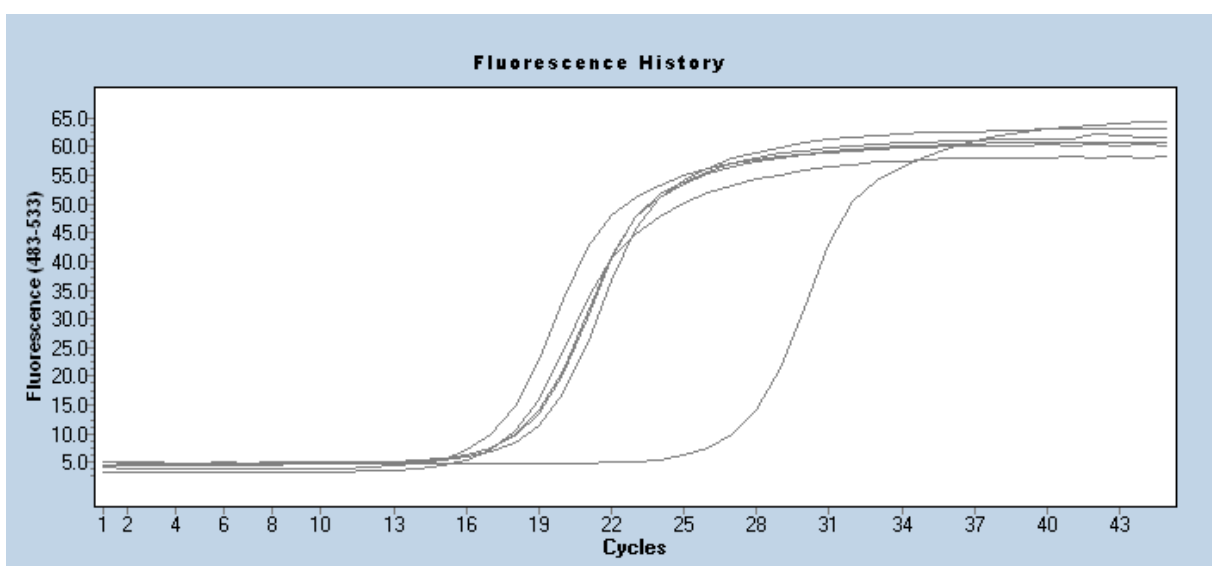


Abbildung 21 (PCR): Expression von IFN- γ in PBMCs nach Stimulation mit PMA/Ionomycin: Die Reihenfolge der Kurven der unterschiedlich lange stimulierten PBMCs lautet von links nach rechts: 3h, 6h, 12h, 24h, 1h, unstimuliert. Ein früherer Zyklus, nach dem die Kurve ansteigt geht hierbei mit einer stärkeren Expression der mRNA einher. Die IFN- γ RNA Expression ist somit nach 3h Stimulation maximal.

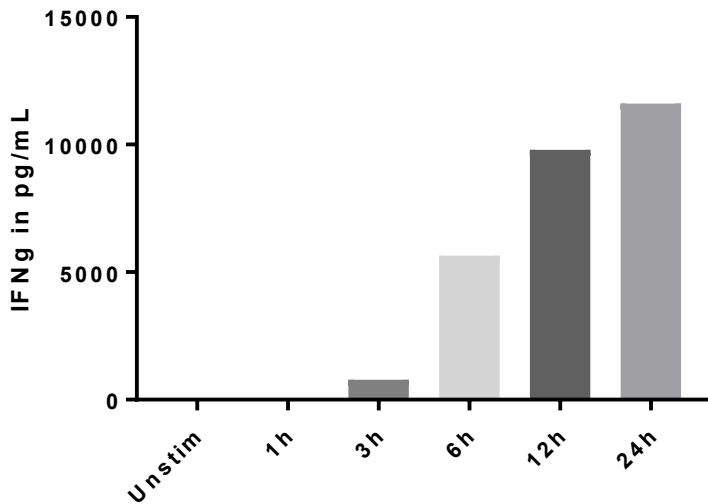


Abbildung 22 (ELISA): IFN- γ Proteinexpression in Überständen von PBMCs nach Stimulation mit PMA/Ionomycin: Es zeigt sich eine über die Zeit kontinuierlich zunehmende IFN- γ Produktion mit ihrem Maximum bei 24 Stunden. Eine Stimulation länger als 24h wurde nicht durchgeführt.

Es zeigte sich in anfänglichen Versuchen, wie auch bei den Versuchen mit Jurkat Zellen, eine verstärkte Expression von RPL13A nach Stimulation (Abbildung 23). Diese verstärkte Expression war mit dem PrimeFlow RNA Assay, nicht aber in der RT-qPCR nachzuweisen (Abbildung 25). Dieses Ergebnis legt ein methodisches Problem innerhalb des PrimeFlow RNA Assays nahe und unterstreicht die Notwendigkeit, neue Methoden gegen etablierte Vergleichsmethoden zu evaluieren. In der Tat bestätigte der Hersteller auf Rückfrage, dass andere Arbeitsgruppen über die gleiche Problematik berichteten. Als Konsequenz wurde für die nachfolgenden Versuche die Expression des Haushaltsgens B2M analysiert.

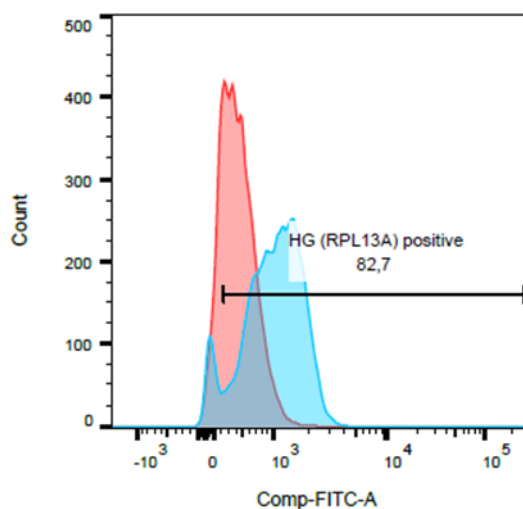


Abbildung 23 (PrimeFlow): RPL13A Fluoreszenzsignal (gefärbt mit FITC) vor (rot) und nach (blau) Stimulation von PBMCs

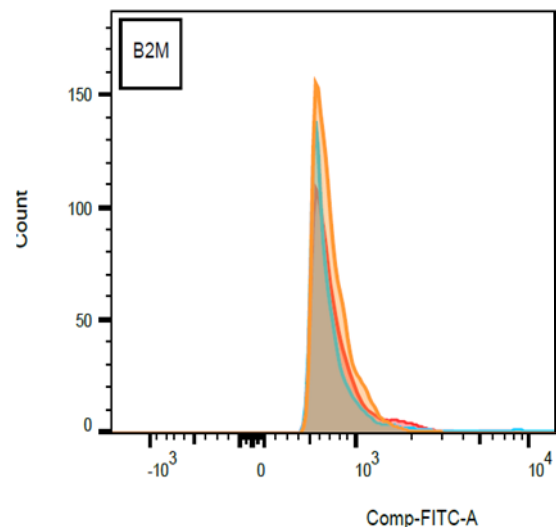


Abbildung 24 (PrimeFlow): B2M Fluoreszenzsignal (gefärbt mit FITC) unstimuliert (rot), 3h stimuliert (blau) und 24h stimuliert (orange)

Bei der Verwendung von B2M, auf Anraten des Herstellers, waren diese Differenzen in der Tat nach Stimulation nicht mehr zu beobachten (Abbildung 24), übereinstimmend mit den RT-qPCR Ergebnissen (Abbildung 26).

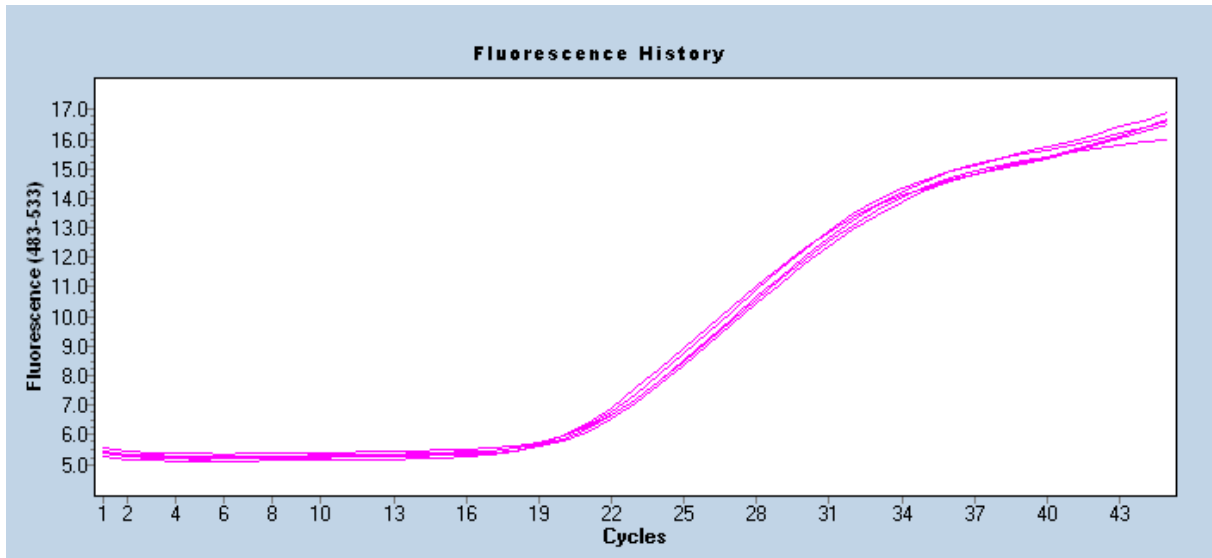


Abbildung 25 (PCR): Expression von RPL13A in PBMCs nach Stimulation mit PMA/Ionomycin: Es zeigt sich eine gleichmäßige Expression für unstimulierte und unterschiedlich lange (1h, 3h, 6h, 12h, 24h) stimulierte Zellen.

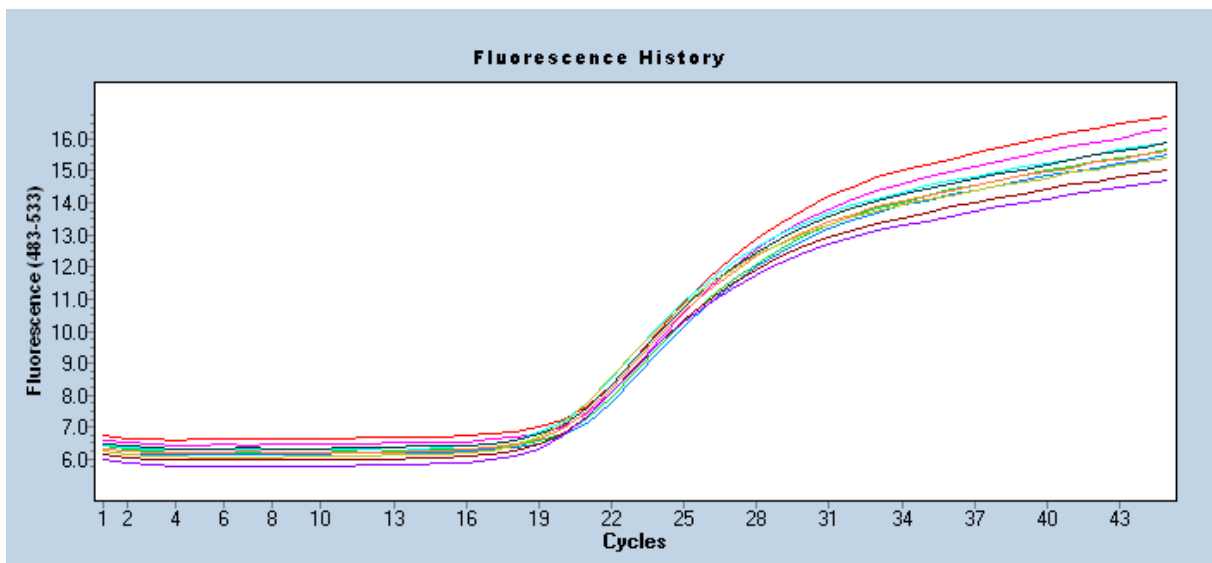


Abbildung 26 (PCR): Expression von B2M in PBMCs nach Stimulation mit PMA/Ionomycin: Es zeigt sich eine typische gleichmäßige Expression von B2M mRNA in unstimulierten sowie stimulierten (1h, 3h, 6h, 12h, 24h) PBMCs. B2M ist von der Stimulation unbeeinflusst und somit als Haushaltsgen geeignet.

Wie zuvor bei Jurkat-Zellen beobachtet, konnte auch eine Abnahme der CD3 Expression in PBMC nach Stimulation mit PMA/Ionomycin beobachtet werden (beachte unterschiedliche Skalierung) (Abbildung 27 &Abbildung 28). Zwar war das Fluoreszenzsignal deutlicher als bei Jurkat Zellen zu verzeichnen, jedoch immer noch schwach.

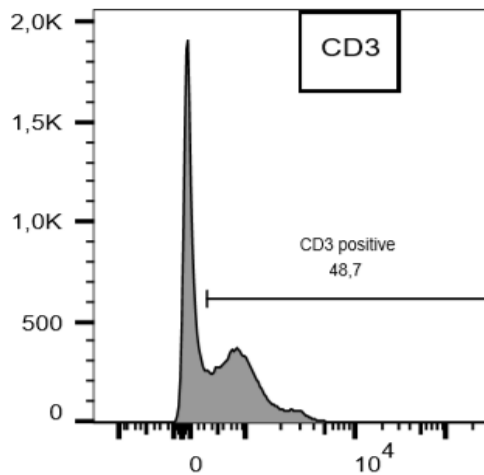


Abbildung 27 (PrimeFlow): Expression von CD3 in unstimulierten PBMCs

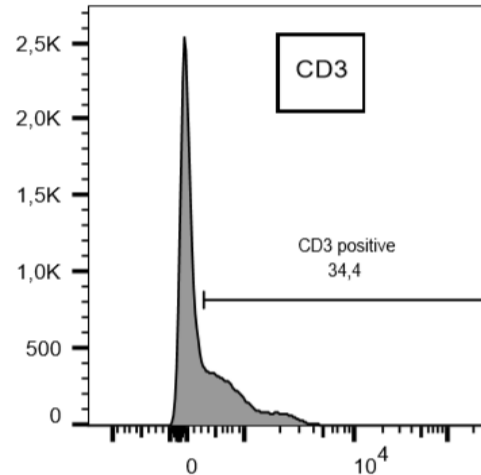


Abbildung 28 (PrimeFlow): Expression von CD3 in PBMCs nach 24h Stimulation

3.1.2.1 IFN- γ Expression in stimulierten PBMCs, bestimmt mittels PrimeFlow RNA Assay

Im folgenden Schritt ging es darum, die mRNA und Protein Expressionsdaten, die mit dem PrimeFlow RNA Assay generiert wurden, mit den Ergebnissen etablierter Methoden zu vergleichen: RT-qPCR (mRNA) und ELISA (Protein). Hierbei ergab sich ebenfalls die Frage, ob die Verwendung der benötigten Proteintransportinhibitoren im PrimeFlow RNA Assay (Vgl. 1.1.2) das Ergebnis beeinflusst.

Mittels PrimeFlow RNA Assay analysierten wir die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für IFN- γ RNA und Protein der unterschiedlich lange stimulierten Zellen (Abbildung 29). Dies geschah in sieben unabhängigen Experimenten, um eine Einschätzung der Variabilität der Antwort zu erhalten. Das MFI-Signal für IFN- γ mRNA sowie für IFN- γ Protein war bei unstimulierten Zellen stets gering. Das IFN- γ mRNA MFI-Signal stieg nach 3 Stunden um etwa das 20-fache (20,94) an, um nach 24 Stunden wieder auf etwa dem Doppelten (1,94) des Ausgangsniveaus der Werte von unstimulierten Zellen zu liegen. Für das IFN- γ Protein MFI-Signal ist ein stetiger Anstieg über die Zeit zu verzeichnen: eine ca. 12-fache (11,56) Steigerung nach 3 Stunden und eine ca. 25-fache (25,60) Steigerung nach 24 Stunden Stimulation (Tabelle 5 & Abbildung 29 & Abbildung 30).

Für den PrimeFlow RNA Assay fand sich eine starke Korrelation ($r=0,76$) für IFN- γ mRNA und Protein nach 3 Stunden. Auch fand sich eine starke Korrelation ($r=0,71$)

zwischen IFN- γ mRNA nach 3 Stunden Stimulation und IFN- γ Proteinexpression nach 24 Stunden.

Tabelle 5: PrimeFlow RNA Assay mit PBMCs; MFI = mittlere Fluoreszenzintensität

PBMC Stimulationsreihen PrimeFlow RNA Assay						
	unstimuliert		3 Stunden		24 Stunden	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
MFI IFN- γ RNA	613	253	11671	10901	1135	528
n	10		9		7	
MFI IFN- γ Protein	443	119	4950	3010	11021	4940
n	9		9		8	

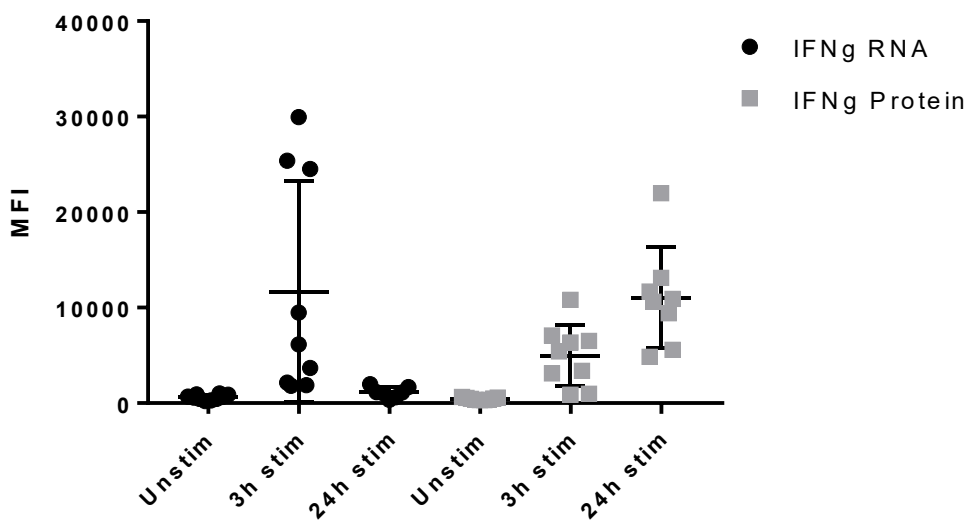


Abbildung 29 (PrimeFlow): IFN- γ RNA und Proteinexpression nach Stimulation, $n \geq 7$: Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). Nach 3 Stunden hatte die IFN- γ mRNA Expression ihr Maximum erreicht, allerdings mit einer hohen Streuung der Ergebnisse. IFN- γ Protein nahm mit zunehmender Stimulation stetig zu.

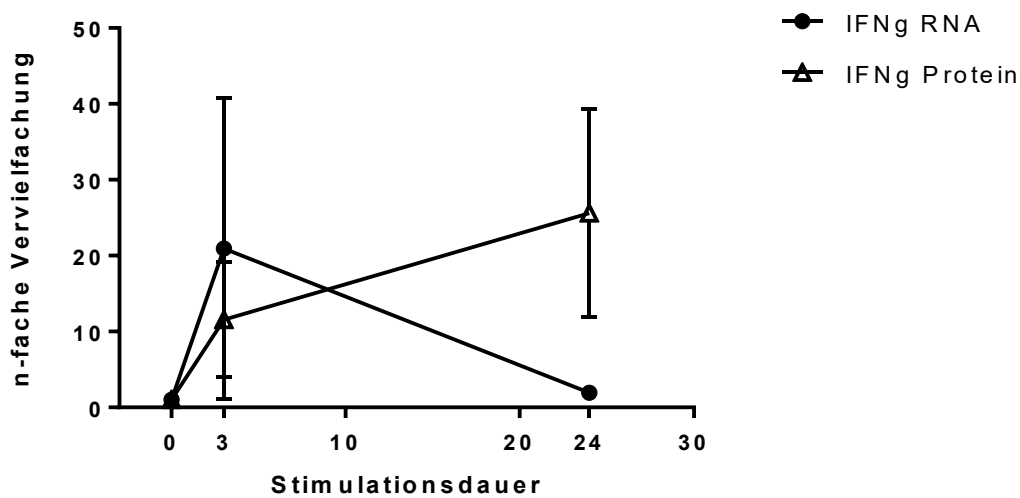


Abbildung 30 (PrimeFlow): Vervielfachung der MFI von IFN- γ RNA und IFN- γ Protein: Es zeigt sich ein Anstieg beider Parameter nach 3 Stunden Stimulation. Dabei war eine im Mittel ca. 20-fache Vervielfachung der MFI des IFN- γ RNA Signals (mit jedoch hoher Standardabweichung) und eine ca. 10-fache Vervielfachung der MFI des IFN- γ Protein Signals zu verzeichnen. Nach 24 Stunden hatte das IFN- γ Protein Signal noch weiter zugenommen, das Signal für IFN- γ RNA hatte wieder abgenommen und lag nahe der Werte von unstimulierten Zellen.

Es zeigte sich mit zunehmender Erfahrung, dass Variationen, die durch das Handling begründet sind, verringert wurden. Für beide Parameter zeigte sich jedoch eine große Streuung der Messwerte, besonders eindrücklich ist diese bei IFN- γ RNA nach 3 Stunden Stimulation (Abbildung 29). In erster Linie halten wir eine große Varianz der Spender-PBMCs als ursächlich für diese Ergebnisse, da IFN- γ mRNA und Protein gut korrelierten. Die für die obigen Versuche verwendeten PBMCs stammen von 7 unterschiedlichen Spendern.

3.1.2.2 IFN- γ mRNA Expression in stimulierten PBMCs, bestimmt mittels RT-qPCR

Die mRNA Expressionsdaten wurden mittels RT-qPCR vergleichend untersucht. Zur RT-qPCR wurden Zellen aus zwei unterschiedlichen Ansätzen, mit und ohne Proteintransportinhibitoren, jeweils separat analysiert (Vgl. 2.2.2.2). Uns interessierte hierbei neben dem Vergleich mit den Ergebnissen des PrimeFlow RNA Assays vor allem, ob die Verwendung der Proteintransportinhibitoren einen Einfluss auf die Resultate hatte. Wie wirkt sich der fehlende Transport der Proteine nach extrazellulär aus? Welche Rolle spielen auto- und parakrine Effekte der sezernierten Proteine, speziell IFN- γ ?

Die RT-qPCR ergab vergleichbare Expressionsmuster wie der PrimeFlow RNA Assay: Die IFN- γ mRNA Expression war stark erhöht nach 3h, um nach 24h abzufallen. Dabei korrelierten die Werte für IFN- γ mRNA nach 3 Stunden Stimulation für Ansätze mit und ohne Proteintransportinhibitoren mäßig bis stark mit Daten aus dem PrimeFlow RNA Assay ($r=0,64$ mit PTI, $r=0,71$ ohne PTI). Beim Vergleich der RT-qPCR Versuche mit und ohne Proteintransportinhibitoren fiel kein signifikanter Unterschied bei unstimulierten Zellen, sowie nach 3 Stunden Stimulation auf ($p=0,969$). Nach 24 Stunden war die IFN- γ RNA Expression jedoch im Ansatz mit Proteintransportinhibitoren signifikant ($p=<0,0001$) geringer als im Ansatz ohne Proteintransportinhibitoren (Abbildung 31).

Tabelle 6: IFN- γ RNA Quantifizierung relativ zur B2M Expression (mit Proteintransportinhibitoren). Zur Berechnung siehe 2.2.4.

PBMC Stimulationsreihen RT-qPCR (+PTI)						
	unstimuliert		3 Stunden		24 Stunden	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
IFN- γ RNA norm. Ratio	4×10^{-4}	4×10^{-4}	5,81	2,89	0,51	0,48
n	11		11		10	

Tabelle 7: IFN- γ RNA Quantifizierung relativ zur B2M Expression (ohne Proteintransportinhibitoren). Zur Berechnung siehe 2.2.4.

PBMC Stimulationsreihen RT-qPCR (ohne PTI)						
	unstimuliert		3 Stunden		24 Stunden	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
IFN- γ RNA norm. Ratio	2×10^{-4}	4×10^{-4}	5,02	3,81	2,11	0,83
n	10		9		10	

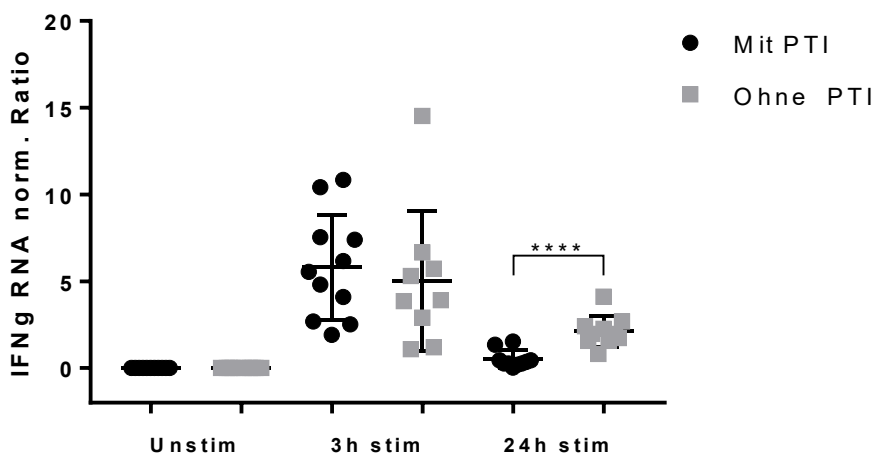


Abbildung 31 (PCR): Relative IFN- γ RNA Expression, normiert auf Referenzgen B2M, n \geq 9: Vergleich mit und ohne Proteintransportinhibitoren.

Zusammenfassend lassen sich die RT-qPCR Ergebnisse somit als vergleichbar zu denen des PrimeFlow RNA Assays ansehen. Die Dynamik der IFN- γ RNA Expression ist in beiden Methoden gut nachzuvollziehen (Vgl. Abbildung 29). Auffallend ist der signifikante Unterschied in der IFN- γ RNA Expression nach 24 Stunden in Ansätzen mit und ohne Proteintransportinhibitoren (Abbildung 31).

3.1.2.3 IFN- γ Proteinexpression in stimulierten PBMC, bestimmt mittels ELISA

Mittels ELISA wurde die Konzentration von IFN- γ Protein in den Überständen der Zellen anhand einer Standardkurve mit definierten Konzentrationen von IFN- γ bestimmt. Unstimulierte PBMCs produzierten kaum messbare Werte von IFN- γ . Nach 3 Stunden Stimulation waren geringe Werte um 180 pg/mL zu verzeichnen. Nach 24 Stunden Stimulation hatte sich der Spiegel des IFN- γ im Vergleich zum Wert bei 3 Stunden meist über 25-fach verstärkt und lag im Durchschnitt bei 5300 pg/mL (Abbildung 32). Für IFN- γ Protein nach 24 Stunden Stimulation bestand zwischen ELISA und PrimeFlow RNA Assay eine mäßige Korrelation ($r=0,46$). Bei der Korrelation mit IFN- γ mRNA nach 3 Stunden aus RT-qPCR Versuchen (ohne/mit PTI) und IFN- γ Protein aus ELISA Versuchen zeigten sich unterschiedliche gerichtete, schwache Korrelationen ($r= -0,32$ mit PTI, $r= 0,24$ ohne PTI).

Tabelle 8: IFN- γ Bestimmung aus Überständen mittels ELISA

PBMC Stimulationsreihen ELISA						
	unstimuliert		3 Stunden		24 Stunden	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
IFN- γ in pg/mL	0,52	1,33	178,3	199,8	5261	2899
n	12		10		11	

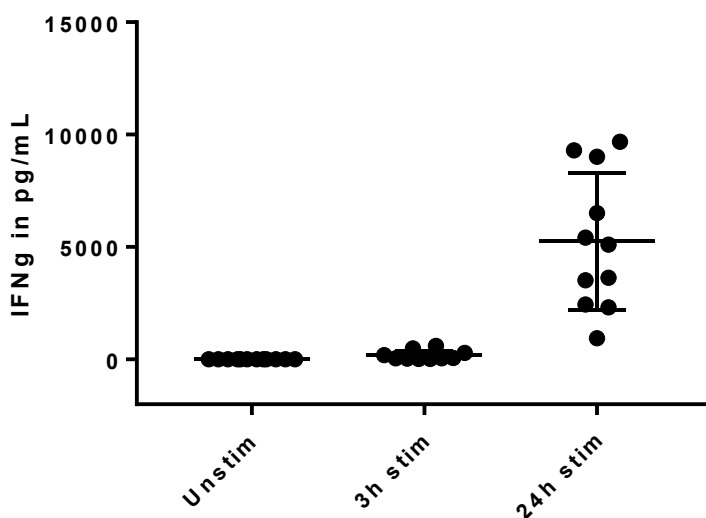


Abbildung 32 (ELISA): IFN- γ in pg/mL in Überständen, $n \geq 10$

Die Ergebnisse der ELISA Versuche weisen eine ähnliche Dynamik einer mit längerer Stimulation zunehmenden IFN- γ Protein-Expression im Vergleich mit dem PrimeFlow RNA Assay auf. In beiden Methoden ist die stark angestiegene IFN- γ Protein Produktion nach 24 Stunden Stimulation deutlich zu verzeichnen. Unterschiede gibt es in der n-fachen Steigerung der IFN- γ Proteinexpression. Während sich beim PrimeFlow RNA Assay beim Vergleich von 3 und 24 Stunden eine Verdoppelung (2,2-fach, Vgl. Tabelle 5) des Fluoreszenzsignals für IFN- γ Protein zeigte, war im ELISA eine 30-fache (29,6-fach, Vgl. Tabelle 8) Steigerung der IFN- γ Protein-Konzentration zu verzeichnen (Vgl. 4.3).

Sowohl die zeitliche Dynamik der IFN- γ RNA Expression, als auch der IFN- γ Proteinexpression ließen sich mittels PrimeFlow RNA Assay nachvollziehen (Abbildung 29) und wurden durch RT-qPCR und ELISA bestätigt (Abbildung 31 & Abbildung 32). Der PrimeFlow RNA Assay lässt sich daher als geeignete Methode zur zeitgleichen Bestimmung von (IFN- γ) mRNA und Protein ansehen. Die Methode verbindet gute Durchführbarkeit mit Multiplex Analyse von RNA und Protein aus derselben Probe, was bis dato methodisch nicht möglich war. Damit verbunden sind allerdings ein hoher Zeitaufwand, hohe benötigte Zellzahlen und ein teurer Assay. Zudem war die geplante Färbung von CD3 mittels Antikörper zur Identifikation und spezifischen Analyse von T-Zellen mit Schwierigkeiten verbunden, was vermutlich methodisch bedingt war, sodass wir uns auf die Analyse der Lymphozytenpopulation beschränkten. In der Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich der PrimeFlow RNA Assay daher als valide Methode zur Bestimmung von IFN- γ RNA und Protein für PBMCs ansehen, die möglicherweise mit Schwierigkeiten bei der Verwendung bestimmter Oberflächenmarker zu kämpfen hat.

3.2 Immunmodulatorische Fähigkeiten der MSCs

Nach der Etablierung der Methodik wurde sie auf unsere wissenschaftliche Fragestellung angewendet. Wir konnten zuvor bereits zeigen, dass MSC die Proliferation von T-Zellen in PHA-stimulierten PBMC-MSK Kokulturen hemmen (122, 123). Unter Zuhilfenahme des PrimeFlow IFN- γ Protokolls fragten wir uns, ob MSCs auch die IFN- γ Expression, auf mRNA- und Proteinebene beeinflussen. Die MSCs wurden in einem Verhältnis von 1:10 (MSC:PBMC) in einer direkten Kokultur eingesetzt (Abbildung 33). Mittels RT-qPCR wurde bestätigt, dass MSCs (mit und ohne PMA/Ionomycin) keine IFN- γ mRNA bilden (Daten nicht gezeigt). Somit war sichergestellt, dass das gemessene IFN- γ ausschließlich von PBMCs stammte.

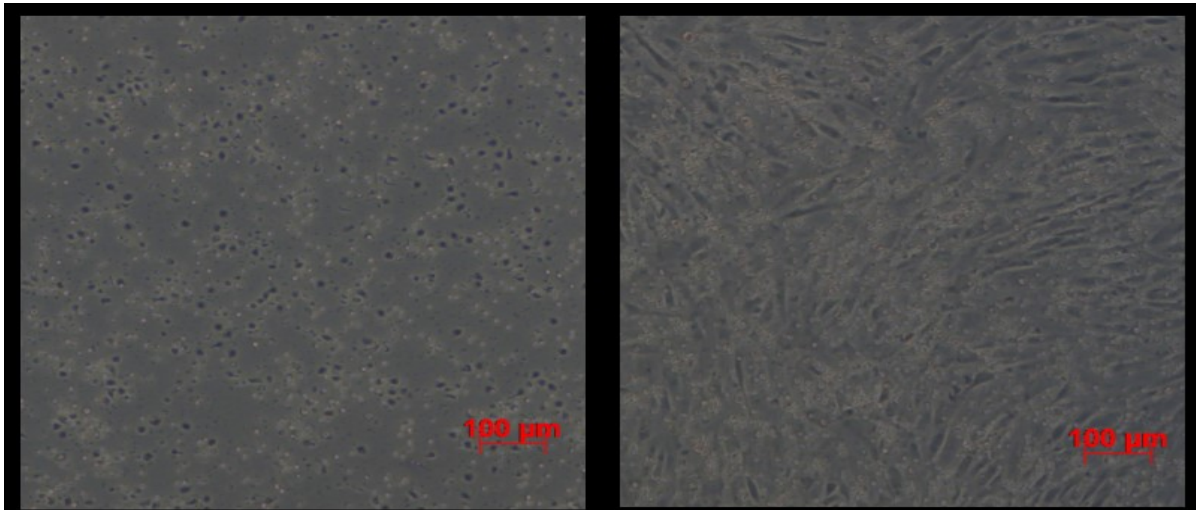


Abbildung 33: Zellkultur PBMCs ohne (links) und mit MSCs (rechts)

3.2.1 MSCs inhibieren die IFN- γ Produktion in PBMCs: PrimeFlow RNA Assay

Mittels PrimeFlow RNA Assay wurde die mittlere Fluoreszenzintensität für IFN- γ mRNA und Protein bestimmt und in Ansätzen mit und ohne MSCs verglichen. Unstimulierte PBMCs exprimierten geringfügig mehr IFN- γ mRNA in Anwesenheit von MSCs ($p=0,045$). Die MSCs hatten in der Tendenz einen suppressiven Effekt auf die IFN- γ mRNA Expression der stimulierten PBMCs nach 3 Stunden ($p=0,194$) (Abbildung 34). Der MFI-Wert für IFN- γ mRNA in Kulturen mit MSCs entsprach nach 3 Stunden Stimulation etwa 40% des MFI-Signals ohne MSCs. Es war allerdings eine sehr hohe Standardabweichung in der Analyse für IFN- γ mRNA nach 3 Stunden, speziell für PBMCs ohne MSCs, zu verzeichnen. Nach 24 Stunden war der Unterschied in der Expression von IFN- γ mRNA nicht mehr zu sehen ($p=0,99$).

Das Fluoreszenzsignal von intrazellulärem IFN- γ Protein wies beim Vergleich mit den IFN- γ mRNA Daten deutlichere Unterschiede bei Kultur mit und ohne MSCs auf, die auf einen hemmenden Effekt der MSCs hinweisen (Abbildung 35). Auch hier waren die MFI-Werte nach 3 Stunden mit MSCs geringer als ohne MSCs ($p=0,087$). Nach 24 Stunden stellte sich jedoch ein signifikanter Unterschied dar ($p=0,013$).

Tabelle 9: PrimeFlow RNA Assay mit PBMCs aus Kokulturen mit MSCs; MFI = mittlere Fluoreszenzintensität

PBMC Stimulationsreihen MSC Kokultur						
	unstimuliert		3 Stunden		24 Stunden	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
MFI IFN- γ mRNA (ohne MSCs)	725	202	9003	8668	927	218
n	5		5		3	
MFI IFN- γ mRNA (mit MSCs)	835	265	3542	2067	970	345
n	5		5		4	
p^*	0,045		0,194		0,99	
MFI IFN- γ Protein (ohne MSCs)	433	83	4656	2267	10661	823
n	5		5		4	
MFI IFN- γ Protein (mit MSCs)	422	71	3309	1281	9010	437
n	5		5		4	
p^*	0,578		0,087		0,013	

* Bestimmt mittels gepaartem t-Test

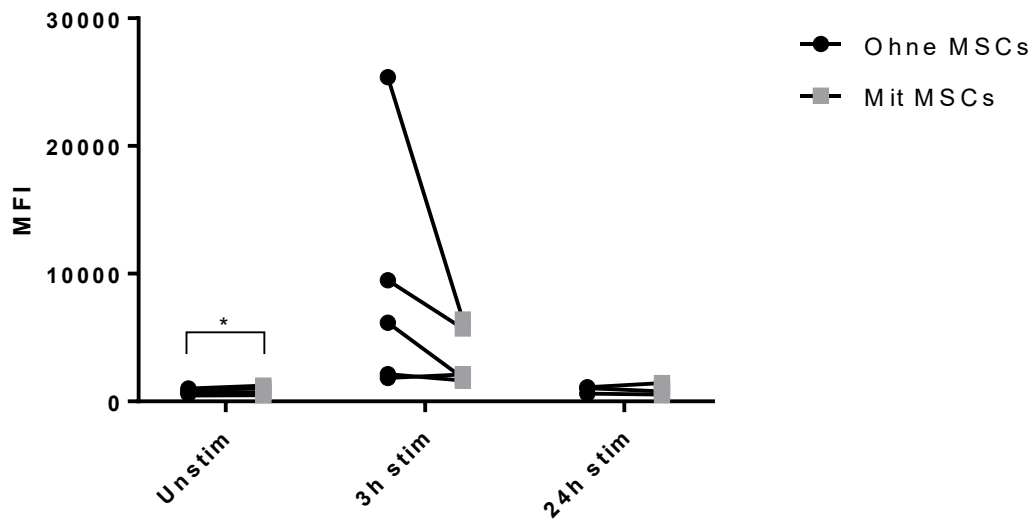


Abbildung 34 (PrimeFlow): Vergleich IFN- γ RNA Expression mit und ohne MSCs, $n \geq 3$

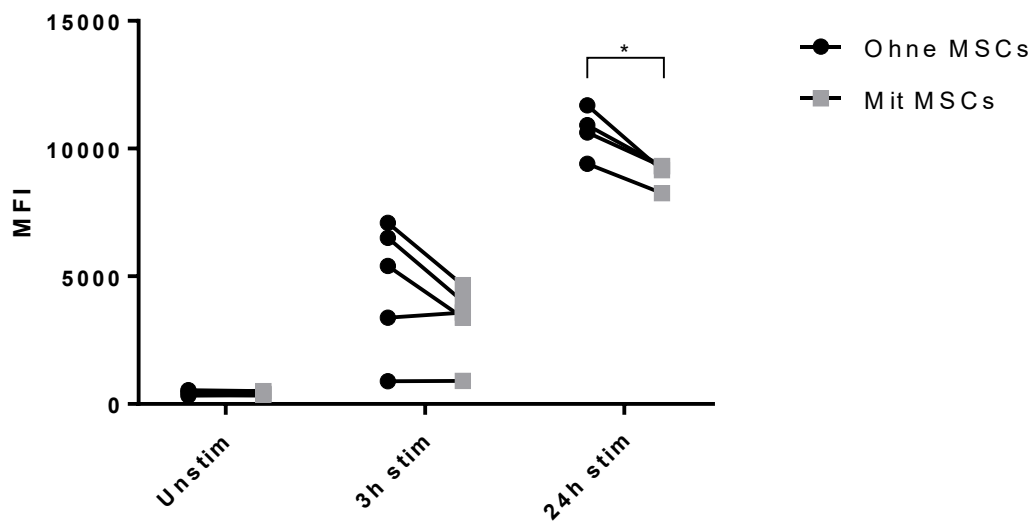


Abbildung 35 (PrimeFlow): Vergleich IFN- γ Proteinexpression mit und ohne MSCs, $n \geq 4$

Die Kokultur-Experimente mit dem PrimeFlow RNA Assay zeigen zusammenfassend im Trend einen suppressiven Effekt der MSCs für IFN- γ mRNA und Protein.

3.2.2 MSCs inhibieren die IFN- γ mRNA Expression von stimulierten PBMCs: RT-qPCR

Wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben, wurden bei den RT-qPCR Analysen jeweils Zellen mit und ohne Proteintransportinhibitoren analysiert. Mit Proteintransportinhibitoren bewirkten die MSCs nach 3 Stunden eine etwa 30%ige Reduktion der IFN- γ mRNA Expression in PBMCs ($6,04 \pm 3,37$ ohne MSCs vs. $4,29 \pm 2,50$ mit MSCs) ($p=0,056$) (Abbildung 36). In zwei von acht Versuchen war allerdings eine Steigerung der IFN- γ mRNA Expression in Anwesenheit von MSCs zu verzeichnen (Abbildung 36). Nach 24 Stunden war die Expression von IFN- γ mRNA wieder auf sehr niedrige Werte, nahe dem unstimulierten Zustand, abgefallen. Dieser Abfall nach 24 Stunden erschien jedoch vermindert in MSC-Kokulturen, da die Expression mit MSCs geringfügig höher war ($0,26 \pm 0,13$ ohne MSCs vs. $0,32 \pm 0,13$ mit MSCs) ($p=0,209$).

Auch in den Ansätzen ohne Proteintransportinhibitoren zeigten die MSCs suppressive Eigenschaften auf die IFN- γ mRNA Expression (Abbildung 37). Nach 3 Stunden war die IFN- γ mRNA Expression ebenso im Mittel um etwa 30 % in Kultur mit MSCs abgefallen ($3,74 \pm 2,28$ ohne MSCs vs. $2,54 \pm 2,27$ mit MSCs) ($p=0,087$). Auch hier wurde in zwei Versuchen überhaupt kein suppressiver Effekt der MSCs beobachtet (Abbildung 37). Von diesen Versuchen war einer der korrespondierende Ansatz ohne Proteintransportinhibitoren zum eben erwähnten Versuch, in dem die Steigerung der IFN- γ mRNA verzeichnet wurde (siehe oben). Nach 24 Stunden Stimulation war die IFN- γ mRNA Expression im Mittel wieder abgefallen und in Kulturen mit MSCs durchschnittlich um 24 % reduziert ($1,70 \pm 0,46$ ohne MSCs vs. $1,30 \pm 0,71$), allerdings auch hier nicht signifikant ($p=0,109$).

Beim Vergleich der Versuche mit und ohne Proteintransportinhibitoren fallen, wie auch in vorangegangenen Versuchen (Vgl. 3.1.2.2), teils deutliche Unterschiede auf. So wird in Ansätzen mit Proteintransportinhibitoren nach 3 Stunden Stimulation mehr IFN- γ mRNA exprimiert als ohne Proteintransportinhibitoren (Abbildung 38). In Ansätzen ohne MSCs ist dieser Unterschied nicht signifikant ($p=0,120$). In Ansätzen mit MSCs ist der Unterschied jedoch signifikant ($p=0,036$). Nach 24 Stunden sind die Verhältnisse umgekehrt und es wird in Ansätzen mit Proteintransportinhibitoren signifikant weniger IFN- γ mRNA exprimiert (Abbildung 38). Dies trifft für Ansätze ohne MSCs ($p < 0,0001$), sowie für Ansätze mit MSCs zu ($p=0,009$).

RT-qPCR (mit PTI):Tabelle 10: IFN- γ mRNA Quantifizierung aus Kokulturen mit MSCs mit Proteintransportinhibitoren

PBMC Stimulationsreihen RT-qPCR (mit PTI)						
	unstimuliert		3 Stunden		24 Stunden	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
IFN- γ mRNA norm. Ratio (ohne MSCs)	5×10^{-3}	5×10^{-3}	6,04	3,37	0,26	0,13
n	8		8		7	
IFN- γ mRNA norm. Ratio (mit MSCs)	4×10^{-3}	5×10^{-3}	4,29	2,5	0,32	0,13
n	8		8		7	
p*	0,920		0,056		0,209	

RT-qPCR (ohne PTI):Tabelle 11: IFN- γ mRNA Quantifizierung aus Kokulturen mit MSCs ohne Proteintransportinhibitoren

PBMC Stimulationsreihen RT-qPCR (ohne PTI)						
	unstimuliert		3 Stunden		24 Stunden	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
IFN- γ mRNA norm. Ratio (ohne MSCs)	2×10^{-3}	5×10^{-3}	3,74	2,28	1,70	0,46
n	7		6		7	
IFN- γ mRNA norm. Ratio (mit MSCs)	3×10^{-3}	5×10^{-3}	2,54	2,27	1,30	0,71
n	7		6		7	
p*	0,341		0,087		0,109	

* Bestimmt mittels gepaartem t-Test

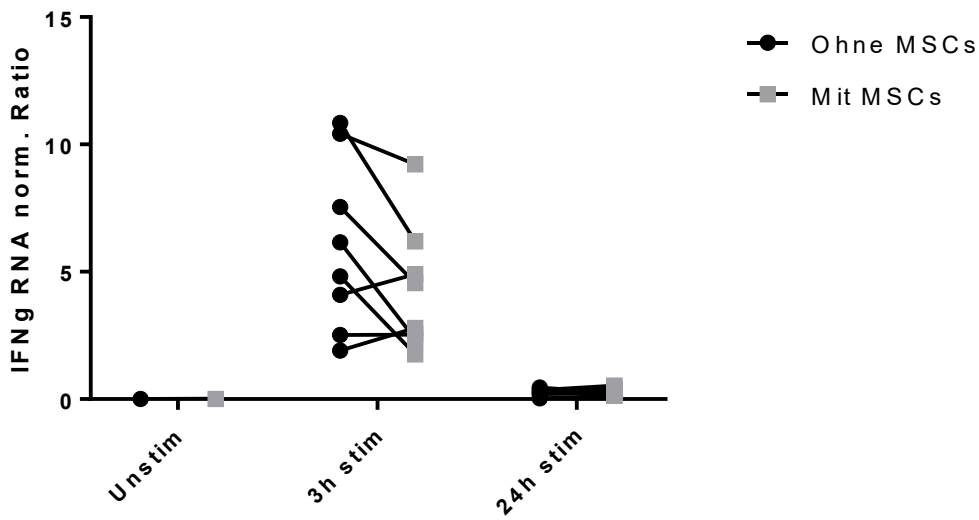


Abbildung 36 (PCR): IFN- γ mRNA Expression im Vergleich mit und ohne MSCs (mit Proteintransportinhibitoren), n \geq 7

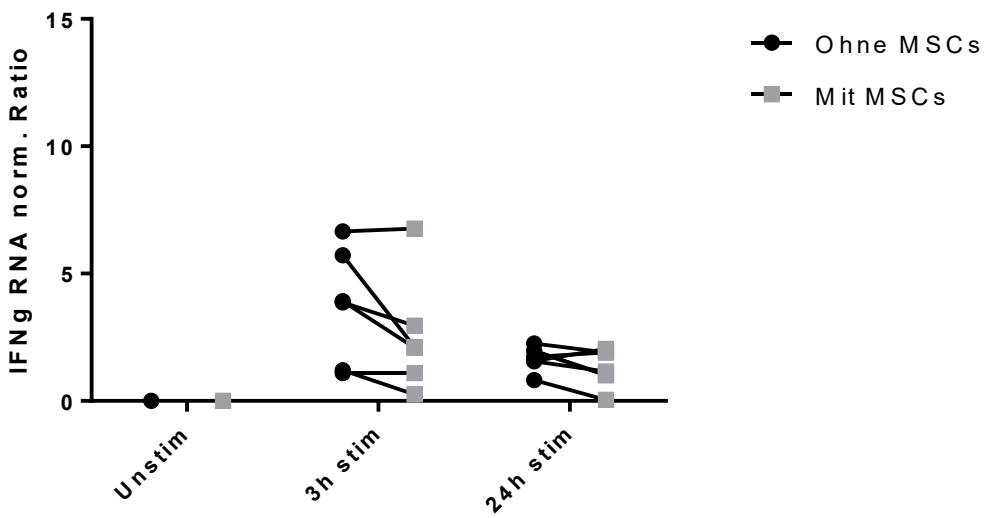


Abbildung 37 (PCR): IFN- γ mRNA Expression im Vergleich mit und ohne MSCs (ohne Proteintransportinhibitoren), n \geq 6

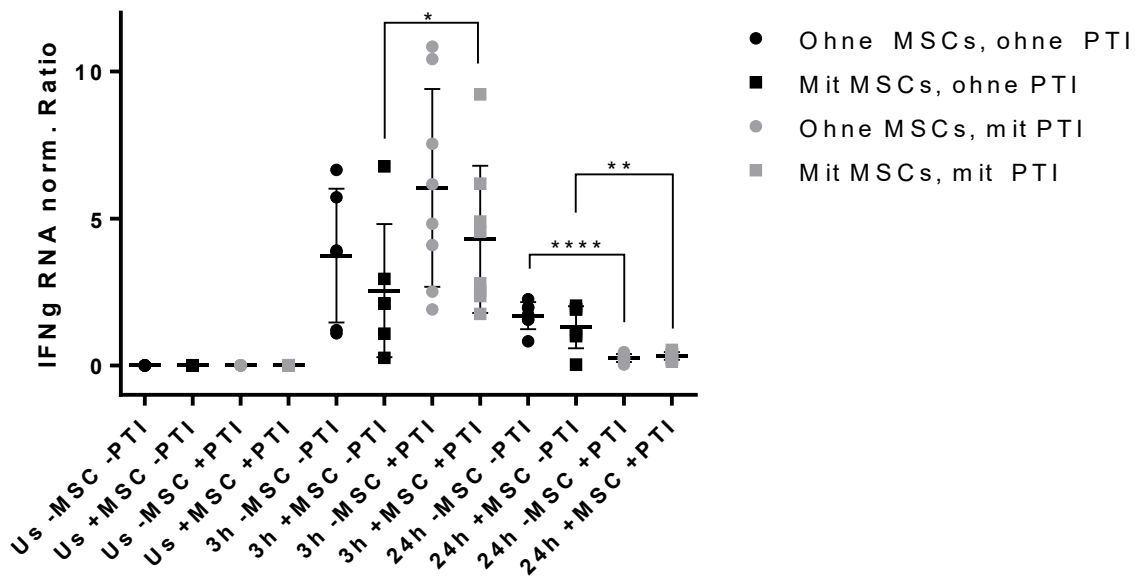


Abbildung 38 (PCR): IFN- γ mRNA Expression im Vergleich mit und ohne MSCs sowie mit und ohne Proteintransportinhibitoren, $n \geq 6$: Nach 3 Stunden Stimulation zeigt sich eine höhere IFN- γ mRNA Expression mit Proteintransportinhibitoren in Ansätzen ohne ($p=0,120$) und mit ($p=0,036$) MSCs. Nach 24 Stunden Stimulation sind die Verhältnisse umgekehrt und es kommt durch Proteintransportinhibitoren zu einer signifikant verminderten IFN- γ mRNA Expression in Ansätzen ohne ($p<0,0001$) und mit ($p=0,009$) MSCs. Vergleich der Ansätze mit und ohne PTI mittels gepaartem t-Test.

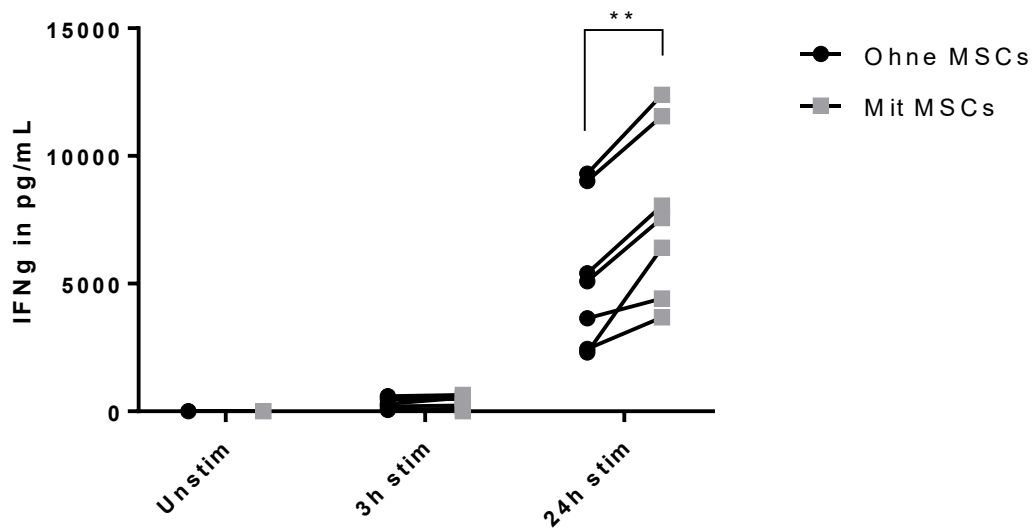
Zusammenfassend lässt sich in den RT-qPCR Experimenten die gleiche Tendenz wie in den oben beschriebenen Experimenten mittels PrimeFlow RNA Assay ausmachen (Vgl. 3.2.1). Auch in RT-qPCR Ansätzen wurde die IFN- γ mRNA Expression supprimiert. Die Ergebnisse sind somit vergleichbar zu denen des PrimeFlow RNA Assays. Für den entscheidenden Zeitpunkt nach 3 Stunden Stimulation wurde das Signifikanzniveau jedoch in beiden RT-qPCR Ansätzen jeweils knapp verfehlt (mit PTI $p=0,056$; ohne PTI $p=0,087$). Nach 24 Stunden war kein signifikanter Unterschied mehr für den Vergleich mit und ohne MSCs festzustellen. Auffallend sind jedoch die Unterschiede beim Vergleich der Ansätze mit und ohne Proteintransportinhibitoren (Abbildung 38). Hier scheint der Einsatz von Proteintransportinhibitoren einen Einfluss zu haben, der sich nach 3 Stunden Stimulation als verstärkte IFN- γ mRNA Expression zeigt, besonders deutlich aber nach 24 Stunden, dann jedoch als deutlich verminderte IFN- γ mRNA Expression.

3.2.3 Im Konflikt stehende Ergebnisse zur Proteindetektion: ELISA

Durch die Versuche mit dem ELISA Assay wurde die Menge an produziertem IFN- γ Protein der PBMCs quantifiziert und verglichen, inwieweit sich die Produktion durch die Anwesenheit der MSCs ändert. Auffallend bei den ELISA Ergebnissen war, dass die gemessenen Spiegel von IFN- γ in den Ansätzen mit MSCs höher waren als ohne MSCs (Abbildung 39). Damit deuten die Daten nicht auf einen hemmenden Effekt der MSCs auf die IFN- γ Protein Produktion hin, im Gegenteil, die Anwesenheit der MSCs scheint die IFN- γ Protein Produktion sogar zu steigern. Am stärksten war der Unterschied nach 24 Stunden Stimulation, der Zeitpunkt, nach dem auch am meisten IFN- γ Protein produziert wurde. Hierbei war der Unterschied zwischen Ansätzen mit und ohne MSCs deutlich signifikant (24h $p=0,001$; 3h $p=0,142$). Diese Daten weisen damit grundsätzlich in eine andere Richtung als die Daten, welche mit den anderen Methoden bestimmt wurden. PrimeFlow und RT-qPCR weisen im Trend auf einen hemmenden Effekt der MSCs auf die IFN- γ RNA und Protein Produktion hin (Vgl. 3.2.1 & 3.2.2). Die ELISA Daten im Gegensatz dazu deuten eine verstärkte Produktion von IFN- γ Protein in Anwesenheit von MSCs an.

Tabelle 12: IFN- γ Bestimmung aus Überständen mit und ohne MSCs mittels ELISA

PBMCs Stimulationsreihen Kokultur ELISA						
	unstimuliert		3 Stunden		24 Stunden	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
IFN- γ in pg/mL (ohne MSC)	0	0	270,6	232,6	5317	2879
n	8		6		7	
IFN- γ in pg/mL (mit MSC)	0,08	0,23	333,1	254,0	7725	3305
n	8		6		7	
p*	0,350		0,142		0,001	

Abbildung 39 (ELISA): IFN- γ in Überständen im Vergleich mit und ohne MSCs, n \geq 6

* Bestimmt mittels gepaartem t-Test

3.3 Einfluss der Glucosekonzentration auf die immunmodulatorischen Eigenschaften der MSCs

Nachdem gezeigt werden konnte, dass MSCs die IFN- γ mRNA und Protein Expression stimulierter PBMCs beeinflussen – wenngleich offenbar unterschiedlich bei der Betrachtung von mRNA und Protein und gewählter Analysemethode – interessierte uns, zu testen, ob die Kultur in hoher Glucose diese Effekte modifiziert. Bisherige Daten der Arbeitsgruppe deuteten an, dass Kultur unter hohen Glucose die immunmodulatorischen Eigenschaften nicht verändert (Daten noch nicht publiziert).

Für die Kultur der MSCs wurde ein spezielles Normale Glucose (NG) Medium mit 1 g/L Glucose (5,56 mM), sowie ein Hohe Glucose (HG) Medium mit 4,5 g/L Glucose (25 mM) eingesetzt. Hierbei wurde die Glucosekonzentration des HG Mediums so gewählt, dass sie in einem pathophysiologisch sehr hohen Bereich liegt. Sehr hohe Blutzuckerwerte können bei verschiedenen Krankheitsbildern auftreten, beispielsweise bei unbehandeltem bzw. sehr schlecht eingestelltem Diabetes mellitus oder beim septischen Schock (124, 125).

3.3.1 Diskrepante Ergebnisse für Effekte hoher Glucosespiegel auf die Immunmodulation durch MSCs: PrimeFlow RNA Assay

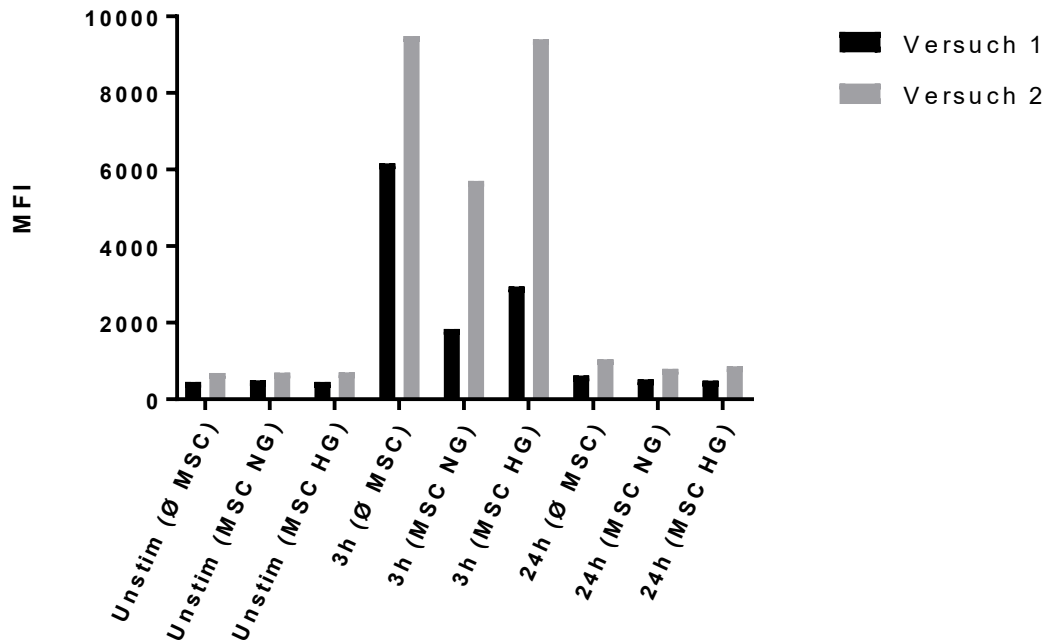
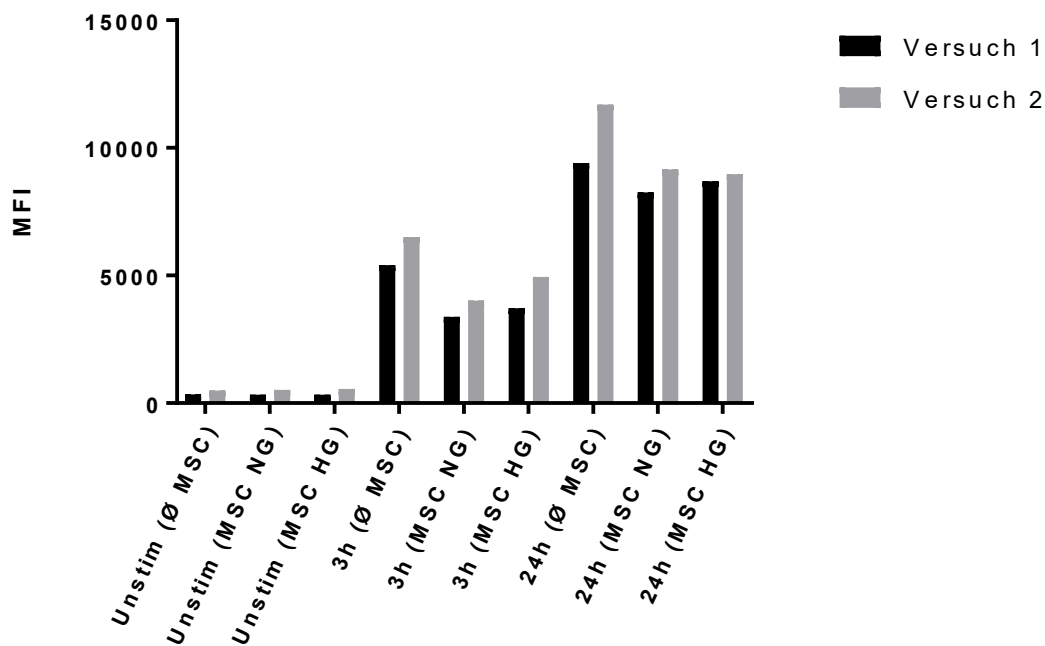
Mit Hilfe des PrimeFlow RNA Assays wurden zwei Versuche zur IFN- γ RNA- und Proteinexpression unter dem Einfluss hoher Glucosespiegel durchgeführt (Abbildung 40 & Abbildung 41). Nach Abschluss dieser beiden Versuche war das PrimeFlow RNA Assay Kit aufgebraucht. Hierbei zeigte sich nach 3 Stunden in Anwesenheit von NG MSCs eine Reduktion der IFN- γ RNA Expression um 70% bzw. 40% (Versuch 1 bzw. Versuch 2) verglichen mit PBMCs ohne MSCs (Abbildung 40). In Anwesenheit von HG MSCs betrug die Reduktion der IFN- γ RNA Expression in Versuch 1 noch 52%, was für einen abgeschwächten, aber noch vorhandenen immunmodulatorischen Effekt von HG MSCs spricht. Dieser Effekt konnte allerdings in Versuch 2 nicht reproduziert werden und betrug lediglich 1%, was die Inhomogenität der Ergebnisse unterstreicht. Nach 24 Stunden war die IFN- γ RNA Expression wieder auf ein Level gesunken, welches geringfügig höher als das von unstimulierten Zellen war (Abbildung 40). Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Konditionen waren hierbei marginal.

Betrachtet man die Proteinproduktion der Zellen, so fand sich in Versuch 1 nach 3 Stunden ein um 37% verringertes Fluoreszenzsignal in Anwesenheit von NG MSCs verglichen mit PBMCs ohne MSCs, in Kokultur mit HG MSCs war das Signal um 31% verringert (Abbildung 41). Nach 24 Stunden waren die Unterschiede in der Proteinexpression zwischen den verschiedenen Konditionen abgeschwächt und nur noch gering vorhanden. So war das Signal mit NG MSCs um 12% verringert und das Signal mit HG MSCs um 8% verringert (Abbildung 41). In Versuch 2 fand sich nach 3 Stunden ein um 38% bzw. 24% (NG MSCs bzw. HG MSCs) verringertes Fluoreszenzsignal für IFN- γ Protein, sowie nach 24 Stunden ein um 22% bzw. 23% (NG MSCs bzw. HG MSCs) verringertes Signal (Abbildung 41).

Wir beschränkten uns in darauffolgenden Experimenten auf die intrazelluläre Proteinbestimmung mittels Durchflusszytometrie (Vgl. 3.3.2); RT-qPCR und ELISA als Vergleich. Um die Spendervariabilität zu minimieren, wurden im Gegensatz zu vorangegangenen Versuchen für alle drei Experimente PBMCs desselben Spenders verwendet, während die MSCs von verschiedenen allogenen Spendern stammten.

Tabelle 13 PrimeFlow RNA Assay zum Einfluss des Glucosespiegels: V1 = Versuch 1; V2 = Versuch 2

PBMC Stimulationsreihen NG/HG (Werte)						
	unstimuliert		3 Stunden		24 Stunden	
	V1	V2	V1	V2	V1	V2
MFI IFN- γ RNA (no MSCs)	453	685	6160	9491	622	1042
MFI IFN- γ RNA (+MSCs NG)	494	695	1839	5701	525	798
MFI IFN- γ RNA (+MSCs HG)	454	702	2946	9406	491	860
MFI IFN- γ Protein (no MSCs)	339	491	5404	6502	9406	11693
MFI IFN- γ Protein (+MSCs NG)	337	513	3379	4024	8262	9156
MFI IFN- γ Protein (+MSCs HG)	336	550	3723	4944	8697	8973

Abbildung 40 (PrimeFlow): IFN- γ RNA Expression in Kokultur mit NG MSCs und HG MSCsAbbildung 41 (PrimeFlow): IFN- γ Proteinexpression in Kokultur mit NG MSCs und HG MSCs

Die beiden mittels PrimeFlow RNA Assay durchgeführten Versuche ergaben bei identischen methodischen Bedingungen diskrepante Ergebnisse bezüglich der Immunmodulation, besonders nach 3 Stunden Stimulation auf RNA Ebene. Hier deutete sich in einem Versuch ein offenbar sehr starker Einfluss hoher Glucosespiegel

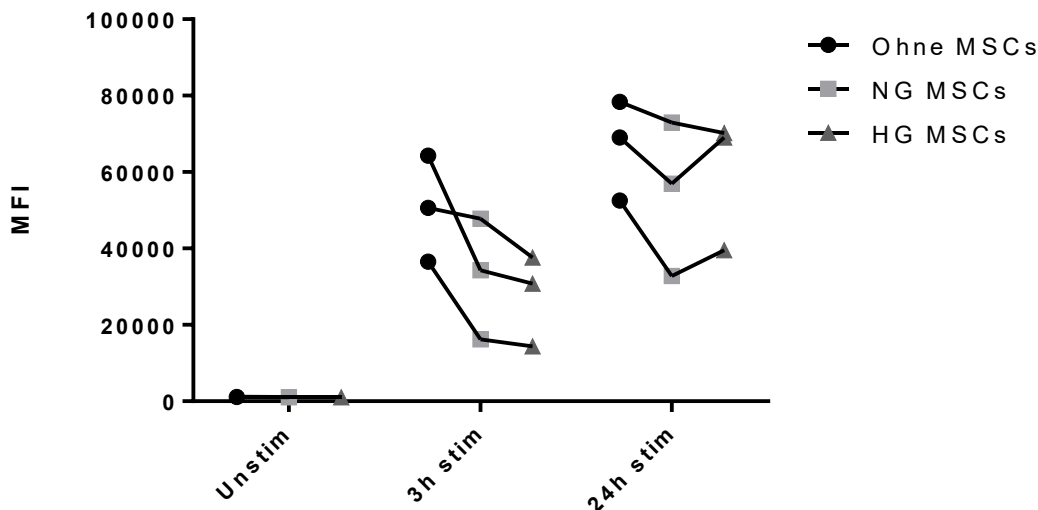
an, im anderen Versuch erschien der Einfluss der Glucose zwar noch vorhanden, allerdings deutlich schwächer (Abbildung 40). Auf Proteinebene war besonders nach 3 Stunden IFN- γ reduziert. Der Einfluss hoher Glucose war nicht eindeutig zu erkennen, zudem bestand eine zu geringe Anzahl an Experimenten, um eine klare Aussage darüber treffen zu können. Um genaueren Einblick in den möglichen Einfluss hoher Glucose zu erhalten, wurden daraufhin durchflusszytometrische Experimente ohne die simultane Detektion von IFN- γ mRNA, sowie jeweils RT-qPCR und ELISA Versuche, durchgeführt.

3.3.2 Hohe Glucosespiegel haben keinen eindeutigen Einfluss auf die Immunmodulation durch MSCs: Durchflusszytometrie

Um den Einfluss verschiedener PBMC Spender zu eliminieren, wurden in diesen Versuchen zum Einfluss der Glucosekonzentration auf die immunmodulatorischen Fähigkeiten der MSCs PBMCs eines einzelnen Spenders für sämtliche Versuche (n=3) verwendet und mit MSCs von verschiedenen allogenen Spendern in Kokultur gegeben. Wie zu erwarten ist die Fluoreszenzintensität bei unstimulierten Zellen in allen drei Konditionen minimal (Abbildung 42). Beim Vergleich nach 3 Stunden zeigte sich der deutlichste Unterschied zwischen PBMCs ohne MSCs und PBMCs mit MSCs aus NG Medium oder HG Medium (Abbildung 42). MSCs aus HG Medium supprimierten dabei die IFN- γ Produktion sogar noch etwas mehr als MSCs aus NG Medium. So war nach 3 Stunden die Proteinexpression durch NG MSCs um 35% bzw. durch HG MSCs um 45% reduziert. Nach 24 Stunden war die Reduktion der IFN- γ Produktion geringer ausgeprägt und in Anwesenheit von NG MSCs am größten (19% Reduktion mit NG MSCs, 11% Reduktion mit HG MSCs). In der statistischen Analyse mittels One Way ANOVA konnte allerdings auch hier weder nach 3 Stunden noch nach 24 Stunden ein signifikanter Unterschied gefunden werden (3 Stunden $p=0,096$; 24 Stunden $p=0,095$). Steigerungen der Proteinexpression in Anwesenheit von MSCs wurden, in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus PrimeFlow RNA Assay und RT-qPCR, nicht beobachtet. Es fallen im Vergleich zu früheren Experimenten deutlich höhere MFI-Werte auf (Vgl. Tabelle 14 & Tabelle 9). Auch war die Fluoreszenzintensität des CD3-Antikörpers deutlich stärker als in Versuchen mit PrimeFlow RNA Assay (Vgl. Abbildung 43 & Abbildung 44).

Tabelle 14: IFN- γ Proteinexpression in Kokultur mit NG MSCs und HG MSCs

PBMC Stimulationsreihen NG/HG Durchflusszytometrie						
	unstimuliert		3h stimuliert		24h stimuliert	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
MFI IFN- γ Protein (ohne MSCs)	1181	42	50496	11326	66627	10672
n	3		3		3	
MFI IFN- γ Protein (mit NG MSCs)	1132	71	32770	12947	54235	16516
n	3		3		3	
MFI IFN- γ Protein (mit HG MSCs)	1109	73	27595	9769	59589	14162
n	3		3		3	
p*	0,102		0,096		0,095	

Abbildung 42 (Durchflusszytometrie): IFN- γ Proteinexpression in Kokultur mit NG und HG MSCs, n= 3

Auch in den durchflusszytometrischen Versuchen zeigte sich kein eindeutig schädlicher Einfluss hoher Glucose auf die immunmodulatorischen Fähigkeiten der MSCs. IFN- γ Protein war nach 3 Stunden Stimulation sogar am niedrigsten in Ansätzen hoher Glucose (Abbildung 42).

Der CD3 Antikörper hingegen zeigte eine deutlich bessere Expression im Vergleich zu PrimeFlow Experimenten (Vgl. Abbildung 43 & Abbildung 44). Dies basiert höchstwahrscheinlich auf unterschiedlich aufwendigen Protokollen von PrimeFlow RNA Assay und reiner Durchflusszytometrie und liefert einen Hinweis auf ein methodenimmanentes Problem des PrimeFlow RNA Assays (Vgl. 4.2.1).

* Bestimmt mittels One Way ANOVA

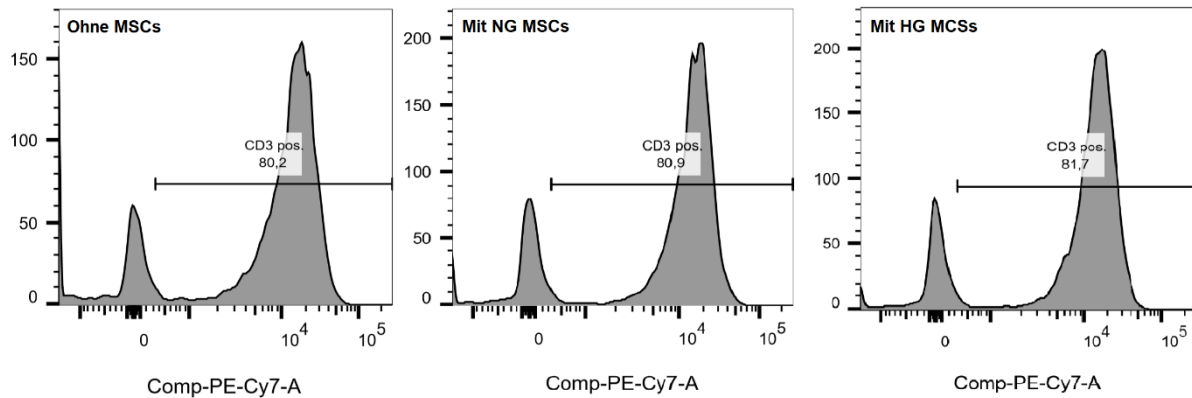


Abbildung 43 (Durchflusszytometrie): Fluoreszenzintensität für CD3 (PE-Cy7): Das Signal für CD3 ist deutlich positiv für alle drei Konditionen. Werte jeweils nach 3 Stunden Stimulation.

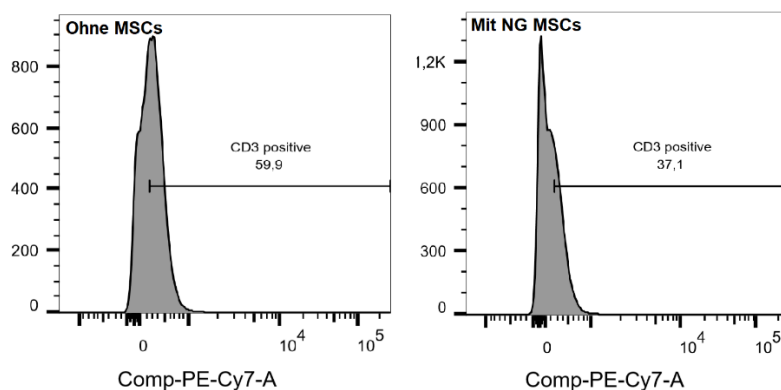


Abbildung 44 (PrimeFlow): Fluoreszenzintensität für CD3 (PE-Cy7): Es zeigt sich eine im Vergleich sehr schwache Expression des CD3 Markers. Werte jeweils nach 3 Stunden Stimulation.

3.3.3 Hohe Glucosespiegel haben keinen eindeutigen Einfluss auf die Immunmodulation durch MSCs: RT-qPCR

Versuche mit Proteintransportinhibitoren:

Bei den RT-qPCR Experimenten zeigte sich in Ansätzen mit NG MSCs und HG MSCs mit Proteintransportinhibitoren ein supprimierender Effekt der MSCs auf die IFN- γ mRNA Expression (Abbildung 45). Dabei war nach 3 Stunden die IFN- γ RNA Expression in Anwesenheit von NG MSCs am geringsten, gefolgt von Ansätzen mit HG MSCs und schließlich ohne MSCs. So war durch NG MSCs nach 3 Stunden die IFN- γ mRNA Expression um 41% vermindert. Mit HG MSCs war die Expression im Vergleich um 23% verringert. Das Signifikanzniveau wurde allerdings mittels One Way ANOVA knapp verfehlt ($p=0,087$). Nach 24 Stunden war die IFN- γ mRNA erwartungsgemäß wieder stark abgefallen und es lag die gleiche Reihenfolge wie nach 3 Stunden Stimulation vor (IFN- γ mRNA: NG MSCs < HG MSCs < ohne MSCs).

Insgesamt lag jedoch die Expression von IFN- γ RNA relativ eng beieinander. Auch nach 24 Stunden konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,556$).

Tabelle 15: IFN- γ RNA Quantifizierung aus Kokulturen mit MSCs aus Normale Glucose und Hohe Glucose Medium (mit Proteintransportinhibitoren)

PBMCs Stimulationsreihen RT-qPCR (mit PTI)						
	unstimuliert		3 Stunden		24 Stunden	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
IFN- γ RNA norm. Ratio (no MSCs)	5×10^{-3}	4×10^{-3}	6,70	2,67	0,30	0,10
n	5		5		5	
IFN- γ RNA norm. Ratio (+MSCs NG)	4×10^{-3}	4×10^{-3}	3,95	1,85	0,35	0,12
n	5		5		5	
IFN- γ RNA norm. Ratio (+MSCs HG)	3×10^{-3}	5×10^{-3}	5,16	3,21	0,42	0,33
n	5		5		5	
p*	0,920		0,087		0,556	

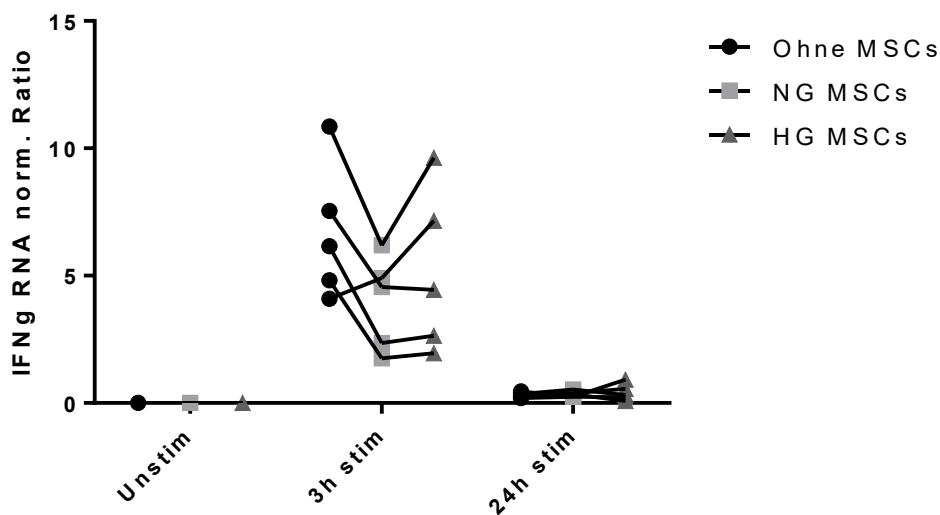


Abbildung 45 (PCR): Vergleich IFN- γ mRNA Expression, normalisiert auf B2M Referenzen in Kokultur mit NG MSCs und HG MSCs (mit Proteintransportinhibitoren), n= 5

* Bestimmt mittels One Way ANOVA

Versuche ohne Proteintransportinhibitoren:

In den Ansätzen ohne Proteintransportinhibitor zum Vergleich von NG MSCs und HG MSCs zeigten sich supprimierende Effekte beider MSC Populationen auf die IFN- γ RNA Expression (Abbildung 46). Die Effekte von HG MSCs waren nach 3 Stunden sogar noch geringfügig stärker als die Effekte von NG MSCs. Hier war die Expression von IFN- γ mRNA in Anwesenheit von NG MSCs um 47% vermindert, in Anwesenheit von HG MSC waren es 54%. Nach 24 Stunden waren die suppressiven Effekte von beiden MSC Populationen in etwa ähnlich und nicht mehr so stark ausgeprägt wie nach 3 Stunden. Es konnte nach 3 Stunden kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden ($p=0,091$). Auch nach 24 Stunden konnte kein Unterschied in den Gruppen gefunden werden ($p=0,460$).

Auffallend ist auch hier, dass die Expression von IFN- γ mRNA in Versuchen mit Proteintransportinhibitoren nach 3 Stunden Stimulation stärker zu sein scheint, als in Versuchen ohne Proteintransportinhibitoren (Abbildung 47). Nach 24 Stunden Stimulation verhält es sich umgekehrt und in Ansätzen ohne Proteintransportinhibitoren ist mehr IFN- γ mRNA exprimiert (Abbildung 47). Ähnliche Ergebnisse konnten wir auch in vorherigen Versuchen beim Vergleich der Ansätze mit und ohne Proteintransportinhibitoren beobachten (Abbildung 38).

Tabelle 16: IFN- γ RNA Quantifizierung aus Kokulturen mit MSCs aus Normale Glucose und Hohe Glucose Medium (ohne Proteintransportinhibitoren)

PBMC Stimulationsreihen RT-qPCR (ohne PTI)						
	unstimuliert		3 Stunden		24 Stunden	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
IFN- γ RNA norm. Ratio (no MSCs)	8×10^{-4}	7×10^{-7}	4,50	1,06	1,76	0,20
n	5		3		5	
IFN- γ RNA norm. Ratio (+MSCs NG)	9×10^{-4}	2×10^{-4}	2,39	0,49	1,43	0,51
n	5		3		5	
IFN- γ RNA norm. Ratio (+MSCs HG)	1×10^{-3}	5×10^{-4}	2,06	0,34	1,37	0,68
n	4		3		5	
p*	0,764		0,091		0,460	

* Bestimmt mittels One Way ANOVA

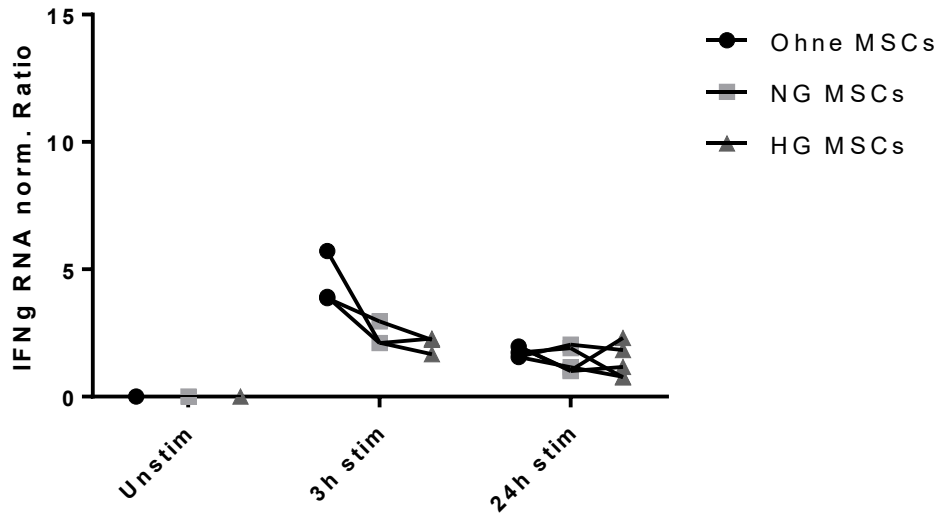


Abbildung 46 (PCR): Vergleich IFN- γ RNA Expression in Kokultur mit NG MSCs und HG MSCs (ohne Proteintransportinhibitoren), n \geq 3

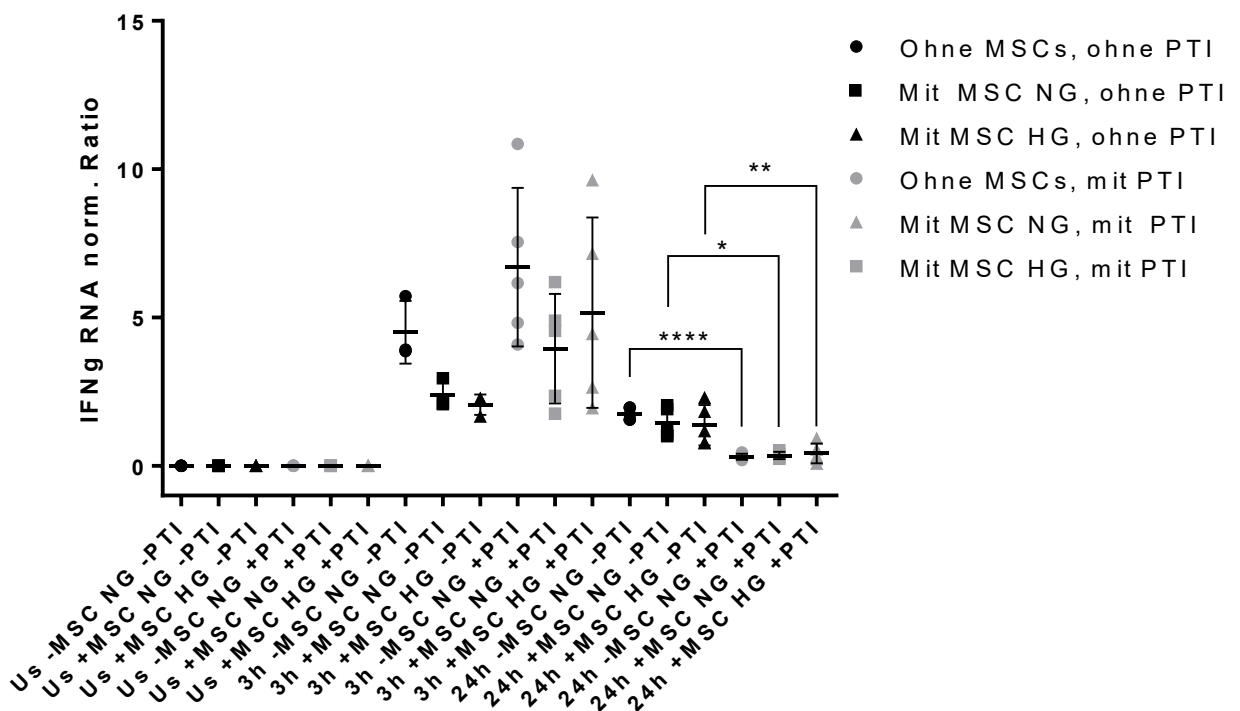


Abbildung 47 (PCR): IFN- γ mRNA Expression im Vergleich mit NG und HG MSCs, sowie mit und ohne Proteintransportinhibitoren, n \geq 3

Ähnlich zu den PrimeFlow RNA Assay Versuchen und den durchflusszytometrischen Versuchen ohne mRNA Detektion (Vgl. 3.3.1 & 3.3.2), zeigte sich auch in den Versuchen mittels RT-qPCR kein eindeutiger Einfluss hoher Glucosespiegel auf MSCs. Weder in Versuchen mit Proteintransportinhibitoren noch in Versuchen ohne Proteintransportinhibitoren gab es signifikante Unterschiede in Ansätzen

unterschiedlich hoher Glucose. Auffallend waren jedoch wieder die Unterschiede durch Proteintransportinhibitoren (Abbildung 47). So führten PTI zu einer höheren, allerdings nicht signifikanten IFN- γ mRNA Expression nach 3 Stunden. Nach 24 Stunden war die Expression durch Proteintransportinhibitoren jedoch (hoch-) signifikant supprimiert.

3.3.4 Hohe Glucosespiegel haben keinen Einfluss auf die Immunmodulation durch MSCs: ELISA

Die Auswertung der Überstände mittels ELISA ergab die gleiche Tendenz wie auch in den Vorversuchen mit NG MSCs (Vgl. Abbildung 39). Mit NG MSCs war mehr IFN- γ zu verzeichnen als ohne MSCs (Abbildung 48). Auch mit HG MSCs war ein erhöhter IFN- γ Spiegel zu verzeichnen, der ähnlich hoch war wie in Kokultur mit NG MSCs.

Tabelle 17: Vergleich von MSCs aus Normale Glucose Medium und Hohe Glucose Medium mittels ELISA

PBMC Stimulationsreihen ELISA						
	unstimuliert		3 Stunden		24 Stunden	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
IFN- γ in pg/mL (ohne MSCs)	0	0	455,3	153,4	5963	3104
n	5		3		5	
IFN- γ in pg/mL (mit NG MSCs)	0	0	551,0	79,5	8020	3980
n	5		3		5	
IFN- γ in pg/mL (mit HG MSCs)	0	0	535,3	71,6	8321	3923
n	5		3		5	
p*			0,290		0,006	

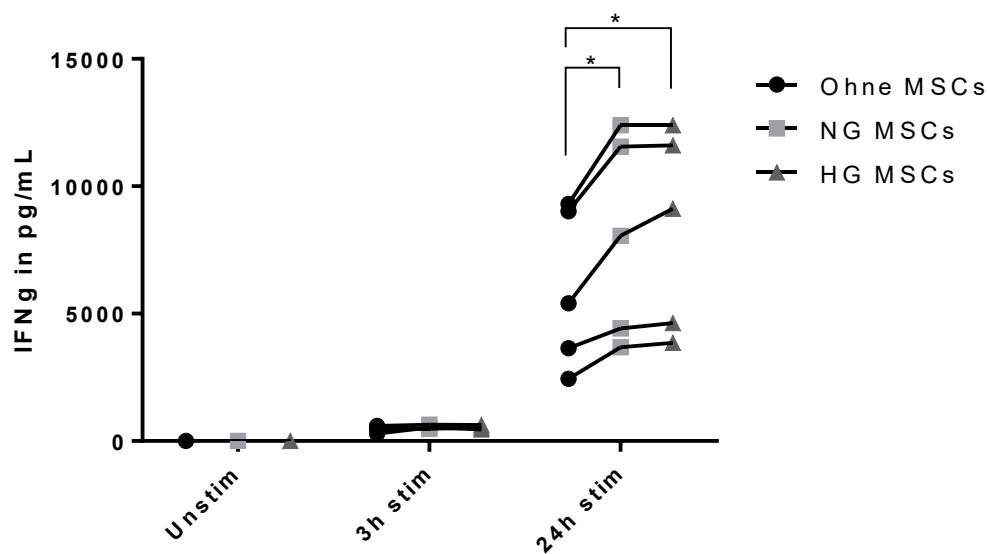


Abbildung 48 (ELISA): Vergleich von IFN- γ in Überständen aus Kokulturen mit NG MSCs und HG MSCs, n \geq 3

* Bestimmt mittels One Way ANOVA

Nach 3 Stunden, sowie nach 24 Stunden Stimulation, war in jedem Experiment eine Steigerung von IFN- γ Protein in Anwesenheit von (NG bzw. HG) MSCs zu verzeichnen. Mittels One Way ANOVA war nach 3 Stunden kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Populationen zu verzeichnen ($p=0,290$). Nach 24 Stunden war mittels One Way ANOVA ein signifikanter Unterschied zu finden ($p=0,006$). In der Post Hoc Analyse per Tukey-Test zeigten sich signifikante Unterschiede jeweils beim Vergleich mit und ohne (NG bzw. HG) MSCs ($p=0,021$ für NG MSCs, $p=0,021$ für HG MSCs).

Zusammenfassend zeigt sich in den ELISA Experimenten zum Einfluss von Glucose auf die Immunmodulation von MSCs kein Unterschied für NG und HG MSCs. Damit besteht kein Hinweis auf einen schädlichen Einfluss hoher Glucosespiegel auf MSCs. Es fällt jedoch, wie auch in vorangegangenen Experimenten beobachtet, eine durchgehend verstärkte IFN- γ Expression in Anwesenheit von MSCs (NG und HG) auf. Wiederum liefert eine Methode zur Proteindetektion (ELISA) widersprüchliche Ergebnisse im Vergleich mit RT-qPCR und PrimeFlow RNA Assay.

3.4 Messung des Gesamtproteins in Überständen

Während der PrimeFlow RNA Assay und auch die RT-qPCR erlaubt, die mRNA bzw. Protein Menge auf einen Referenzwert (Expression des Referenzgens) zu beziehen, besteht diese Möglichkeit beim ELISA nicht. Veränderungen könnten folglich aus deutlich unterschiedlichen Zellzahlen resultieren, die die Proteinkonzentration im Überstand bedingen. So kann beispielsweise die IFN- γ Konzentration einer Probe schlicht dadurch erhöht sein, dass die Probe doppelt so viel IFN- γ produzierende Zellen wie ihre Vergleichsprobe enthält, diese Zellen aber einzeln betrachtet weniger IFN- γ pro Zelle produzieren. Um sicherzustellen, dass die gemessenen Differenzen des IFN- γ Proteins aus den ELISA Versuchen nicht durch ungleiche Zellzahlen in den Versuchen entstanden, wurden Messungen des Gesamtproteins in den Überständen der Proben durchgeführt. Den Erwartungen entsprechend verhält sich das Gesamtprotein ohne signifikante Schwankungen zwischen den einzelnen Proben (Abbildung 49). In einer One Way ANOVA-Analyse ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Proben feststellen ($p=0,346$). Geringfügige Unterschiede in den Messungen des Gesamtproteingehalts sind nicht ausreichend groß, um die beobachteten Schwankungen der IFN- γ Protein Produktion

mengenmäßig erklären zu können. Damit konnten wir sicherstellen, dass die Differenzen in der Konzentration des IFN- γ Proteins tatsächlich durch eine Veränderung in der Produktion und nicht durch unterschiedliche Zellzahlen entstanden waren.

Tabelle 18: Gesamtproteinbestimmung in Überständen

PBMC Stimulationsreihen Gesamtprotein						
	unstimuliert		3 Stunden		24 Stunden	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Protein in $\mu\text{g/mL}$ (ohne MSCs)	4191	351	4084	342	4396	632
n	8		6		7	
Protein in $\mu\text{g/mL}$ (mit NG MSCs)	4210	242	4049	388	4382	209
n	8		6		7	
Protein in $\mu\text{g/mL}$ (mit HG MSCs)	3988	169	3811	250	4369	403
n	4		3		5	

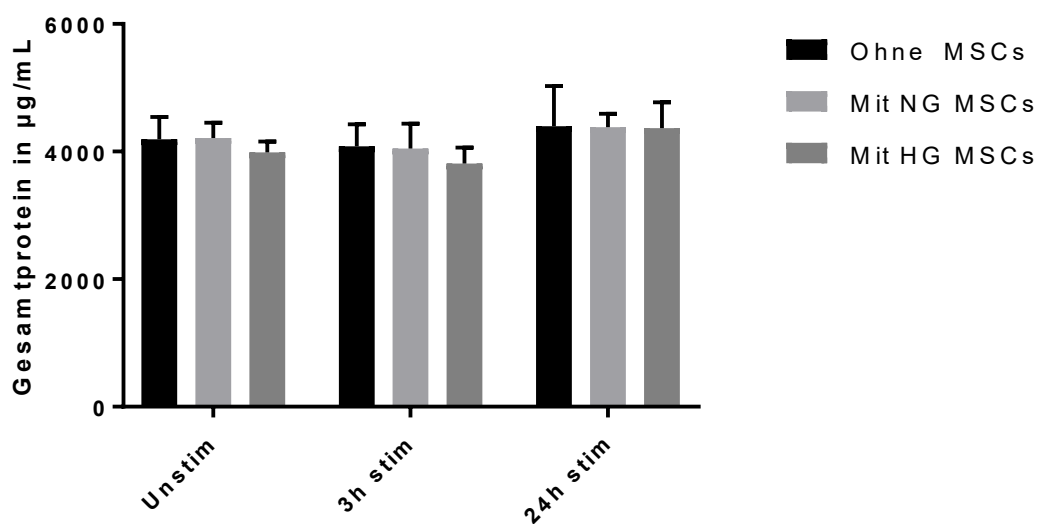


Abbildung 49 (Gesamtproteinassay): Vergleich des Gesamtproteingehalts, $n \geq 3$

Die Daten des Gesamtproteinassays zeigen eine nicht signifikant unterschiedliche Gesamtproteinkonzentration über alle analysierten Proben. Damit war gewährleistet, dass ähnlich hohe Zellzahlen in allen Proben vorhanden waren, sowie dass die

beobachteten Differenzen durch tatsächlich veränderte Proteinproduktion entstanden waren.

4 DISKUSSION

Neue, noch wenig verwendete Methoden in der Wissenschaft, mit denen noch vergleichsweise wenig Erfahrung besteht, müssen sich immer dem Vergleich mit bereits etablierten und validierten Methoden unterziehen. Der PrimeFlow RNA Assay schafft mit seiner Kombination aus Elementen der Durchflusszytometrie, der Fluoreszenz in situ Hybridisierung und des branched DNA Assays die Möglichkeit, zielgenau die RNA-Expressionsanalyse auf Einzelzellebene mit einer hohen Durchsatzrate zu kombinieren.

Durch die Einführung des Verfahrens erst vor wenigen Jahren sind die vorliegenden Daten sowie der Erfahrungsschatz mit dem Assay begrenzt. Wir sehen in dem Assay jedoch aufgrund seiner vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten ein hohes Potenzial. Allerdings müssen sich neue, noch wenig verwendete Methoden in der Wissenschaft, mit denen noch vergleichsweise wenig Erfahrung besteht, dem Vergleich mit bereits etablierten und validierten Methoden unterziehen.

Im Rahmen der Etablierung des PrimeFlow RNA Assays in der FlowCore Facility führte ich daher vergleichende Versuche mit RT-qPCR und ELISA an stimulierten PBMCs durch. Aufbauend auf dem Herstellerprotokoll, das die IFN- γ Expression in der Jurkat Zelllinie beschreibt, wurde das Protokoll auf primäre humane PBMCs ausgeweitet. Im Rahmen einer wissenschaftlichen Fragestellung wurden diese Methoden in Kokulturen aus PBMCs mit MSCs angewendet, um die immunmodulatorischen Einflüsse der MSCs zu untersuchen.

Das Feld der Forschung über MSCs und ihre Möglichkeiten zur Anwendung ist noch jung, wächst aber rasant. MSCs werden in immer zahlreicheren Studien erfolgreich zur Behandlung von verschiedensten Krankheitsentitäten eingesetzt. Ihre hohe Sicherheit und die sehr geringe Rate an Nebenwirkungen und Komplikationen machen sie zu einer sehr attraktiven Therapieform für Anwender und Patienten.

Ziel dieser Arbeit war es, die immunmodulatorischen Einflüsse von MSCs auf die IFN- γ Expression von PBMCs auf RNA und Proteinebene mit einer neuen Methode zu untersuchen. Zudem wurden Versuche angestellt, um einen möglichen hemmenden Effekt von hohen Glucosespiegeln auf die Fähigkeit der MSCs, in den Entzündungsprozess regulierend einzugreifen, zu untersuchen.

Die Daten zeigten eine unerwartet schwache, nicht signifikante Hemmung der Expression von IFN- γ RNA und Protein durch MSCs, nicht eindeutige Ergebnisse zum Einfluss einer hohen Glucosekonzentration, sowie diskrepante Ergebnisse beim Vergleich von ELISA Daten mit denen aus PrimeFlow und RT-qPCR Experimenten. Zusätzlich zeigten sich signifikante Unterschiede beim Vergleich von Ansätzen mit und ohne Proteintransportinhibitoren. Im folgenden Abschnitt möchte ich diese Ergebnisse zusammenfassend betrachten und kritisch diskutieren.

4.1 Vor- und Nachteile des PrimeFlow RNA Assays

4.1.1 Betrachtung einzelner Zellpopulationen einer komplexen Gesamtheit

Der PrimeFlow RNA Assay bietet mit der Möglichkeit der RNA Expressionsanalyse auf Einzelzellebene einen interessanten und vielversprechenden Ansatz, der einen Fortschritt für die Anwendbarkeit und Vielfältigkeit durchflusszytometrischer Analysen darstellt. Er erweitert die Möglichkeiten der Durchflusszytometrie, wie die Markierung von Oberflächenmolekülen, sowie intrazellulären Proteinen und Analysen von distinkten Subpopulationen, um die Fähigkeit, gleichzeitig bis zu drei spezifische mRNA Transkripte zu detektieren.

Was die Durchflusszytometrie bzw. den PrimeFlow RNA Assay von Methoden wie RT-qPCR oder ELISA unterscheidet, ist die Möglichkeit der Identifikation von Subpopulationen, die möglicherweise differenziert auf zelluläre Reize reagieren und sich damit von der Gesamtpopulation unterscheiden. Gerade dieses Alleinstellungsmerkmal macht den PrimeFlow RNA Assay interessant für Fragestellungen, in denen Subpopulationen anhand bestimmter Oberflächenmarker differenziert und analysiert werden sollen. RT-qPCR und ELISA vermögen nicht zu differenzieren, ob in einer Probe wenige Zellen sehr stark oder viele Zellen eher schwach stimuliert sind. Diese Möglichkeit ist hingegen bei durchflusszytometrischen Ansätzen durch das Prinzip der Einzelzellanalyse gegeben.

Durch gezielte Gating-Strategien können in der Durchflusszytometrie bestimmte Populationen von Zellen mit spezifischen Markern isoliert betrachtet und ausgewertet werden. Es kann so in eine Gesamtpopulation von Zellen „hineingezoomt“ werden und eine sehr hohe Menge an Information gewonnen werden. Mit der Entwicklung des PrimeFlow RNA Assays ist es nun seit Kurzem möglich, die RNA Expression für verschiedene Targets zeitgleich zur Proteinbestimmung und Markierung von

Oberflächenmarkern auf Einzelzellebene durchzuführen. Damit verbessert der Assay die Möglichkeiten der kombinierten Informationsgewinnung über Zellpopulationen durch simultane Untersuchung der Vorgänge auf mehreren Ebenen. Ersetzen kann der Assay die etablierten Methoden jedoch nicht, vielmehr ergänzt er sie.

Nicht jede Fragestellung bedarf einer Aufschlüsselung der Daten auf Einzelzellebene, nicht immer sollen Subpopulationen differenziert betrachtet werden. Oftmals stellt der Assay ein Werkzeug dar, welches bei der Bearbeitung einer wissenschaftlichen Fragestellung nicht am Anfang steht, sondern nach Durchführung grundlegender Experimente (bspw. mittels RT-qPCR oder ELISA) zur gezielten weiteren Analyse bestimmter Details herangezogen wird und dann als wertvolle Methode betrachtet werden kann.

4.1.2 Hoher Bedarf an Zellen, Kosten und Zeit

Dennoch sind mit der Methode einige Herausforderungen und Nachteile verknüpft. Es sind für den Versuch hohe Zellzahlen zu Beginn nötig. Bedingt durch das aufwändige Protokoll, genauer, das zahlreiche Waschen und Resuspendieren der Zellen, sind anfangs viele Zellen vonnöten, um schlussendlich bei der Analyse am Durchflusszytometer ein ausreichend starkes Signal und genügend Zellen zur statistischen Auswertung zu erhalten. In Versuchsapplikationen, in denen Zellen nicht in beliebig hohen Zahlen zur Verfügung stehen, können so Engpässe bei der Analyse am Durchflusszytometer entstehen.

Der Assay ist zeitintensiv. Im Protokoll wird von ca. 6-8 Stunden am Tag 1 des Protokolls und von ca. 6 Stunden am Tag 2 des Protokolls gesprochen. Für Versuche mit wenigen Versuchsparametern, also wenig unabhängigen Variablen, mag dies zutreffen. Dennoch findet man sich ob der Vielschichtigkeit und Komplexität mancher Versuche oft mit einer hohen Anzahl von Parametern und notwendigen Kontrollen, und folglich mit einer hohen Anzahl an einzelnen Proben konfrontiert. Nicht anders auch in unseren Versuchen. Durch die unterschiedliche Dauer der Stimulationen, sowie den Vergleich des Einflusses von HG und NG Medium auf die immunmodulatorischen Fähigkeiten von MSCs ergab sich eine Dauer des Protokolls von ca. 10 Stunden am ersten Tag, sowie von ca. 9-10 Stunden am zweiten Tag. Falls eine Stimulation im Zeitraum von wenigen Stunden vorgesehen ist, kommt diese Zeit zusätzlich zum Arbeitsaufwand des ersten Tages hinzu.

Betrachtet man den preislichen Aspekt des PrimeFlow RNA Assays, so ist diese Methode relativ teuer. Bedingt durch die komplexen Ressourcen, die für den Versuch nötig sind, ist diese Methode pro Probe deutlich teurer als RT-qPCR oder ELISA. Da der PrimeFlow RNA Assay momentan die einzige Methode darstellt, welche die gleichzeitige Bestimmung von Protein, RNA und Oberflächenmarkern auf Einzelzellebene in dieser Größenordnung ermöglicht, spiegelt sich dieser Vorteil im Preis des Versuchs wider und kann zu einer positiven Kosten-Nutzen-Rechnung führen. Allerdings ist es dafür erforderlich, dass die Resultate kongruent mit denen alternativer Methoden sind.

4.1.3 Begrenzte Erfahrungswerte und kalkulierte Versuchsplanung

Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit sind die Erfahrungen und die Menge an Literatur, in der diese Methode zum Einsatz kommt, noch begrenzt, wuchsen im Verlauf der Untersuchung aber stetig. Beim Zugriff auf PubMed am 27.06.2017 fanden sich 17 Arbeiten, in denen die Ursprungsarbeit von Porichis *et al.* (4) zitiert wird, in 8 davon kam die Methode tatsächlich zum Einsatz. Am 14.03.2019 waren auf der Website des Herstellers (www.thermofisher.com) schon 28 Arbeiten gelistet, in denen der PrimeFlow RNA Assay zur simultanen Detektion von RNA und Protein genutzt wurde. Vergleichende Fragestellungen zu Versuchen, oder dem verwendeten Protokoll, werden daher angesichts der stetig wachsenden Anzahl der Arbeiten immer besser möglich.

Ein weiterer Aspekt bei der Planung der Experimente und der Verwendung des PrimeFlow RNA Assays ist die unterschiedliche Kinetik von mRNA und (korrelierenden) Proteinen. Es konnte in den Versuchen gezeigt werden, dass der optimale Zeitpunkt zur Detektion von IFN- γ mRNA nach 3 Stunden mit einer noch schwachen Proteindetektion einhergeht (Abbildung 29). Diese ist wiederum nach 24 Stunden deutlich besser zu detektieren, dann ist allerdings das mRNA Signal schon wieder auf sehr niedrige Werte abgefallen (Abbildung 29). Um folglich beide Parameter (oder noch mehr, je nach Design des Experiments) zu untersuchen, werden mehrere Ansätze benötigt, was sich letztlich in höheren benötigten Zellzahlen, größerem Zeitaufwand und letztlich auch höheren Kosten widerspiegelt. Somit sollte sich die Frage stellen, in welchen Ansätzen sich die Kombination der Bestimmung von mRNA und korrelierendem Protein eignet und in welchen Ansätzen sie zugunsten einer

leichteren Durchführbarkeit, aber auch weniger Informationsgewinn unterlassen werden kann.

Durch den Vergleich mit Methoden zur mRNA und Proteindetektion in unseren Versuchen erachteten wir eine simultane Analyse von IFN- γ mRNA und Protein mittels PrimeFlow RNA Assay für sinnvoll, um sie mit den jeweiligen Ergebnissen der etablierten Methoden vergleichen zu können. Für weitere Versuche bezüglich unserer wissenschaftlichen Fragestellung wäre mit etabliertem PrimeFlow RNA Assay eine ausgewählte Analyse bestimmter Parameter denkbar und es wäre nicht mehr nötig, zu jedem Zeitpunkt jeden Parameter zu bestimmen, was Aufwand und Kosten signifikant reduzieren würde.

Da die Anwendungsgebiete des PrimeFlow RNA Assays so vielfältig sind, fällt es schwer, eine Empfehlung für die individuelle Auswahl der simultan zu bestimmenden Parameter auszusprechen. Mit zunehmender Datenmenge und Erfahrung im jeweiligen Anwendungsgebiet sollte diese Entscheidung jedoch leichter fallen. Somit sehen wir gerade in der Anfangsphase der Nutzung des PrimeFlow RNA Assays, gerade in Bezug auf die Etablierung der Methode, einen Nutzen in der simultanen Bestimmung von mRNA und Protein desselben Targets, welche im Verlauf zugunsten gezielterer Auswahl der Parameter verlassen werden kann.

4.2 Etablierung des PrimeFlow RNA Assays

Der PrimeFlow RNA Assay konnte nach Herstellerangaben problemlos durchgeführt werden. Als kritische/relevante Schritte konnten die exakte Temperatur bei der Hybridisierung sowie exaktes Durchführen der Waschschriffe identifiziert werden. Eine gewisse zeitliche Flexibilität ist durch die Inkubation über Nacht gegeben. Die Hands-on Zeit beträgt ungefähr 6-8 Stunden an Tag 1 und 5-7 Stunden an Tag 2, variiert jedoch je nach Versuchsdesign. Insgesamt umfasst der Assay 10 Inkubations- und 23 Waschschriffe, wenn mRNA, intrazelluläres Protein und Oberflächenmarker simultan bestimmt werden.

Abschließend erachten wir den PrimeFlow RNA Assay unter Berücksichtigung nachfolgend aufgeführter Punkte als problemlos durchführbar und werden ihn in der FlowCore als möglichen Test für entsprechende Fragestellungen empfehlen können.

Wir konnten jedoch auch Aspekte identifizieren, die unbedingt bei der Planung, Durchführung und Interpretation der Experimente zu beachten sind:

4.2.1 Schlechte Bindung des CD3 Antikörpers

Als ein wichtiger Vorteil des PrimeFlow RNA Assays wird die Möglichkeit der Kombination mit einer Oberflächenmarkerfärbung beworben. In unseren Versuchen mit dem PrimeFlow RNA Assay zeigte sich jedoch ein unerwartet schwaches Signal für den Oberflächenmarker CD3 der PBMCs (Vgl. 3.1.1 & 3.3.2). Eine gezielte Auswertung der Subpopulation der CD3 positiven T-Lymphozyten war uns damit nicht zweifelsfrei möglich. Analysiert wurden daraufhin durch entsprechendes Gating jeweils die Lymphozytenpopulation der Proben.

Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass CD3 nach Stimulation schwächer exprimiert ist. Es ist eine verminderte Expression der Oberflächenmarker CD3 und CD4 in T-Zellen und Lymphozyten nach Stimulation mit PMA beschrieben (119-121). Dabei werden CD3 und CD4 in Größenordnungen von 50% und mehr internalisiert und sind damit nicht mehr an der Zelloberfläche exprimiert (119, 126).

Im Protokoll des PrimeFlow RNA Assays wurde die Färbung des Oberflächenmarkers CD3 vor Permeabilisierung der Zellen durchgeführt (Vgl. 2.2.3). Eine Internalisierung von CD3 würde folglich mit einem schwächeren Fluoreszenzsignal einhergehen, da intrazelluläre CD3 Moleküle nicht mit dem Antikörper markiert werden würden. Dies könnte das schwache Signal für CD3 in den durchgeführten Experimenten erklären. Ein Lösungsansatz wäre, die Färbung von CD3 nach der Permeabilisierung der Zellen durchzuführen, um so auch internalisierte CD3 Moleküle anzufärben (127).

Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass eine methodisch-bedingte Abschwächung des CD3 Signals vorliegt (Vgl. 3.3.2). Der PrimeFlow RNA Assay bedingt durch sein aufwendiges Protokoll eine hohe Anzahl an Schritten, die mehrmaliges Waschen der Zellen nötig machen. Das häufige Waschen, Zentrifugieren und Resuspendieren der Zellen könnte Einfluss auf die Bindung des Oberflächenantikörpers nehmen. In den Versuchen, in denen nur Oberflächenmarker sowie IFN- γ Protein per Durchflusszytometrie bestimmt wurden, und das verwendete Protokoll deutlich kürzer als das des PrimeFlow RNA Assays war, zeigte sich ein deutlich stärkeres Signal für CD3.

Zum Vergleich: Die reine durchflusszytometrische Bestimmung von intrazellulärem IFN- γ Protein sowie von CD3 erfordert 9-maliges Waschen und Resuspendieren. Zur beispielhaften Durchführung des PrimeFlow RNA Protokolls mit Färbung von IFN- γ RNA, B2M RNA, IFN- γ Protein, CD3, sowie Verwendung eines Lebend-Tot-Farbstoffs

sind 23 Wasch- und Resuspensionsschritte über einen Zeitraum von 48 Stunden vonnöten. Die vorliegenden Daten belegen, dass die höhere Anzahl von Manipulationen der Zellen über einen längeren Zeitraum zu einer geringeren Bindung des Antikörpers und so zu einem abgeschwächten Signal führt. Folglich sollte bei jeder erstmaligen Durchführung des PrimeFlow RNA Assays ein Vergleich der Oberflächenexpression mit/ohne PrimeFlow Protokoll verglichen werden, um die Signalabschwächung einschätzen und ggf. das Protokoll adaptieren zu können.

Es sei in diesem Zusammenhang auch auf die unterschiedlich hohen MFI-Werte von intrazellulärem IFN- γ Protein beim Vergleich von Versuchen mit PrimeFlow RNA Assay und reiner Durchflusszytometrie hingewiesen (siehe 3.3.1 und 3.3.2). Hier zeigten sich in den Versuchen mit dem PrimeFlow RNA Assay deutlich niedrigere MFI Werte nach 3 und 24 Stunden als in den durchflusszytometrischen Versuchen zum Einfluss der Glucosekonzentration, in denen lediglich IFN- γ Protein und Lebend-Tot-Farbstoff gefärbt wurden. In Letzteren waren deutlich weniger Waschschrte mit folglich geringerer Manipulation erforderlich. Es zeigt sich möglicherweise auch hier eine Einflussnahme auf den gemessenen Parameter, welche auf die Anzahl von Wasch- und Resuspensionsschritten zurückzuführen sein könnte.

Es sind also nicht nur Oberflächenmarker von einer schwächeren Expression durch lange, aufwendige Protokolle betroffen, sondern auch intrazellulär markierte Proteine. Vorsichtiges Waschen und Resuspendieren der Zellen sollte natürlich gewährleistet sein, allerdings darf dieses nicht zu vorsichtig durchgeführt werden, da dann der Effekt verloren geht und es zu gehäufte unspezifischer Bindung kommt, die man verhindern möchte. Für per se schwach exprimierte Antigene könnte die PrimeFlow Methode daher zu harsch sein. Eine vorherige Austestung ist in jedem Falle anzuraten.

4.2.2 Geänderte Expression von Haushaltsgen RPL13A unter Stimulation

Vor Beginn der Versuche mit dem PrimeFlow RNA Assay wurden in RT-qPCR Experimenten verschiedene Haushaltsgene auf deren gleichmäßige Expression mit und ohne Stimulation untersucht. Auf Basis dieser Versuche entschieden wir uns dazu, beim PrimeFlow RNA Assay das Haushaltsgen RPL13A zu verwenden, da dieses in der RT-qPCR eine hohe Homogenität aufwies. Dies steht in Einklang mit Daten zum Vergleich der Expressionsstabilität verschiedener Haushaltsgene, in denen sich RPL13A als sehr stabil herausstellte (128).

In ersten Versuchen mit dem PrimeFlow RNA Assay stellten wir allerdings Diskrepanzen in der Fluoreszenzintensität von RPL13A in stimulierten und unstimulierten Zellen fest. Das in anfänglichen Versuchen verwendete Haushaltsgen RPL13A wies in stimulierten Zellen eine höhere Expression als in unstimulierten Zellen auf (Abbildung 23). Dies konnte in mehreren Folgeversuchen reproduziert werden.

Nach Rücksprache mit dem Hersteller (ThermoFisher, ehemals Affymetrix) berichtete dieser uns, dass auch andere Gruppen ein ähnliches Problem mit erhöhter Expression von RPL13A unter Stimulation verzeichneten. Eine genaue Erklärung zur Ursache dieses Problems konnte dieser uns allerdings nicht liefern. Mit Empfehlung des Herstellers entschieden wir uns, für weitere Versuche statt RPL13A das Haushaltsgen B2M zu verwenden. Auch dieses ist als stabil exprimiertes Haushaltsgen unter unterschiedlichsten Bedingungen bekannt (129). Dieses war deutlich weniger anfällig für Schwankungen der Expression durch Stimulation (Abbildung 24) und wurde für alle folgenden Versuche mit PrimeFlow RNA Assay und RT-qPCR verwendet.

Der klassische Weg einer Auswahl des Haushaltsgens mittels RT-qPCR, in welcher sich RPL13A als stabil bewies, zur Validierung einer neuen Methode war in unserem Fall also nicht möglich. In der Literatur gibt es zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit keine Erwähnung der gesteigerten Expression von RPL13A unter Stimulation bei Verwendung des PrimeFlow RNA Assays. Henning *et al.* scheinen in ihrer Arbeit zum Einfluss einer fettreichen Mahlzeit auf PBMCs RPL13A ohne Probleme einer gesteigerten Expression verwendet zu haben (31). In einer Arbeit zur mRNA Expression in Leukämie- und Neuroblastomzellen wurde RPL13A ebenfalls erfolgreich mit dem PrimeFlow RNA Assay verwendet (130). Auch zeigten nicht alle Zellen ein erhöhtes RPL13A Signal, erkennbar an zwei Peaks im Fluoreszenzhistogramm (Abbildung 23). Möglicherweise ist daher nur eine Subpopulation der PBMCs von der Signaländerung betroffen. In der PCR wurde auch keine veränderte Expression beobachtet, was für ein PrimeFlow RNA Assay bedingtes Artefakt spricht. Letztlich kann nur spekuliert werden, ob es durch die Stimulation mittels PMA/Ionomycin oder anderer Versuchsreagenzien zu einer gesteigerten (möglicherweise unspezifischen) Bindung von RPL13A in stimulierten Zellen kam. Aufgrund der vorliegenden Literatur und eigener Erfahrungen sehen wir die verzeichnete gesteigerte Expression von RPL13A unter Stimulation daher als nicht valide an, können aber nur Vermutungen über die Ursache anstellen.

4.3 Einfluss der Proteintransportinhibitoren

Um die Zellen mittels PrimeFlow und ELISA untersuchen zu können, war es vonnöten, zwei Versuchsansätze zu erstellen, da in der Durchflusszytometrie intrazelluläres Protein und im ELISA die Menge an Protein im Überstand der Zellen bestimmt wird. Dies bedeutet, dass im PrimeFlow Ansatz die Sekretion und damit auch autokrine/parakrine Feedback-Loops des sezernierten Proteins mit seinen Rezeptoren unterbunden werden. Im ELISA wird jedoch genau dieses ungehindert sezernierte Protein quantifiziert.

Im Vergleich der RT-qPCR Daten aus den Ansätzen mit und ohne Proteintransportinhibitoren zeigte sich eine signifikant geringere Expression von IFN- γ mRNA nach 24 Stunden in Ansätzen mit Proteintransportinhibitoren. Diese Auffälligkeiten zeigten sich schon bei anfänglichen Versuchen mit PBMCs ohne MSCs (Vgl. 3.1.2.2), werden also nicht durch MSCs hervorgerufen. Die Unterschiede waren bei Versuchen ohne MSCs ($p < 0,001$), mit NG MSCs ($p = 0,026$), sowie mit HG MSCs ($p = 0,022$) nachzuweisen. Nach 3 Stunden hingegen zeigte sich in Ansätzen mit Proteintransportinhibitoren eine höhere Expression von IFN- γ mRNA, allerdings ließen sich für die verschiedenen Bedingungen keine signifikanten Unterschiede feststellen (ohne MSCs $p = 0,403$; mit NG MSCs $p = 0,204$; mit HG MSCs $p = 0,157$). Die Protein Daten, welche mittels PrimeFlow RNA Assay (mit PTI) generiert wurden, ergeben eine durch MSCs reduzierte IFN- γ Expression, während ELISA Daten (ohne PTI) eine durch MSCs erhöhte IFN- γ Konzentration nachweisen. Wie und auf welchen Ebenen könnten die PTIs die Proteinexpression beeinflussen?

4.3.1 Zelluläre Toxizität von Monensin und Brefeldin A

Bei den verwendeten Proteintransportinhibitoren handelte es sich um Monensin und Brefeldin A. Monensin ist ein Ionophor und wirkt damit an Lipidmembranen als Ionenkanal (Abbildung 9). Über diesen Effekt hemmt Monensin den inter- und intrazellulären Proteintransport vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat bis zur Sekretion.

In Stimulationsversuchen anderer Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass Monensin zwar die Detektion von IFN- γ mittels Durchflusszytometrie verbessert, es auf der anderen Seite aber zu einer geringeren Expression von Zytokinen wie IL-6 und IL-10 führt (23, 131). IL-10 ist eines der wichtigsten antiinflammatorischen Zytokine

des Immunsystems (132), was es umso wichtiger macht, bei der Interpretation von Daten die Effekte von Monensin zu berücksichtigen. Je nach untersuchtem Zytokin (bspw. IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17A) scheint Monensin einen unterschiedlichen Einfluss auf die Detektionsraten zu haben (131). Schon in früheren Untersuchungen stellte sich heraus, dass Monensin eine Toxizität besitzt. Dies ist unter anderem durch die direkte Blockade des Golgi-Apparates bedingt (23, 133, 134). Diese bedingt die sog. „Golgi stress response“, bei der sowohl die Syntheseleistung des Golgi-Apparates erhöht wird, als auch die Zelle auf eine möglich Apoptose vorbereitet wird, indem Gene für Lipidsynthese und Apoptose hochreguliert werden (135). Monensin bewirkt im Endoplasmatischen Retikulum (ER) eine ähnliche Reaktion, die „ER stress response“ oder „unfolded protein response“ (UPR) genannt wird (136). Ergebnis dieser Stressreaktionen ist unter anderem eine erhöhte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-2, IL-6 und IL-8 (137, 138). Weitere Daten deuten darauf hin, dass IFN- γ die UPR zusätzlich stimuliert (139, 140).

Muris *et al.* schlagen in ihren Arbeiten vor, die Toxizität von Monensin minimal zu halten, indem sie eine kurze Inkubation von 2 Stunden verwendeten, was allerdings die Unterscheidbarkeit der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in Zytokin-positiven Zellen erschwert. In unseren Versuchen wirkte das Monensin zusammen mit Brefeldin A jedoch jeweils so lange auf die Zellen, wie diese stimuliert wurden, da die Proteintransportinhibitoren zusammen mit PMA und Ionomycin zu den Zellen gegeben wurden. Dementsprechend waren die am längsten stimulierten Zellen den Proteintransportinhibitoren am stärksten ausgesetzt.

Bei Brefeldin A handelt es sich um ein Molekül, welches durch Blockierung essenzieller Faktoren die Vesikelbildung und damit den Proteintransport verhindert und dazu führt, dass der Golgi-Apparat dissoziiert und sich in das ER eingliedert (141) (Abbildung 9). Brefeldin A wird in vergleichenden Arbeiten mit Monensin als überlegen angesehen, da es eine geringere Toxizität, sowie eine höhere Effektivität aufweist (23, 142).

4.3.2 Kumulative Verwendung der Proteintransportinhibitoren

In unseren Versuchen wurden nach PrimeFlow Protokoll beide Proteintransportinhibitoren zusammen verwendet. Es stellt sich die Frage nach dem Einfluss der Proteintransportinhibitoren auf die Viabilität der Zellen. Zwar wurde in den durchflusszytometrischen Experimenten ein Lebend-Tot-Farbstoff verwendet, um nur lebende Zellen in die Analyse aufzunehmen, Änderungen des Zytokinmilieus der noch

lebenden Zellen durch die Proteintransportinhibitoren konnten allerdings nicht gesondert betrachtet werden. Es wurden für die Zellen in Ansätzen zur Analyse mittels Durchflusszytometrie bzw. PrimeFlow immer Proteintransportinhibitoren verwendet. Ein direkter Vergleich am Durchflusszytometer mit und ohne Proteintransportinhibitoren wurde nicht durchgeführt. In weiterführenden Versuchen könnte ein Vergleich der Viabilität in Ansätzen mit und ohne Proteintransportinhibitoren die Frage beantworten, inwieweit die Viabilität der Zellen nach Stimulation von 3 bzw. 24 Stunden beeinflusst wird. Zudem sollten mögliche additive Auswirkungen auf die Toxizität oder die Proteinproduktion in vergleichenden Ansätzen unter Verwendung eines einzelnen Proteintransportinhibitors weiter untersucht werden.

4.3.3 Unterschiede in der mRNA Kinetik durch Proteintransportinhibitoren

Angesichts der stärkeren Expression von IFN- γ mRNA nach 3 Stunden sowie der signifikant geringeren Expression nach 24 Stunden in Ansätzen mit Proteintransportinhibitoren (Abbildung 38) könnte eine mögliche Erklärung folgendermaßen lauten: Nach Stimulation der Zelle durch PMA und Ionomycin erfolgt in der frühen Phase ein Anstieg der IFN- γ mRNA und von IFN- γ Protein, welches durch die PTI nicht nach extrazellulär gelangen kann. Mit ausbleibender bzw. stark reduzierter Proteinsekretion werden autokrine und parakrine Effekte von IFN- γ und anderen produzierten Zytokinen gehemmt. Für NK-Zellen konnte gezeigt werden, dass IFN- γ seine eigene Expression hochregelt (143). Ein Ausbleiben dieses sich selbst verstärkenden Mechanismus würde damit zu geringerer IFN- γ Expression in der späten Phase der Stimulation führen.

IL-12, welches von PBMCs, vornehmlich Monozyten und Makrophagen, produziert wird (144), induziert direkt die Transkription (145) und Sekretion (146) von IFN- γ in T-Zellen und NK-Zellen. Demgegenüber wird die IL-12 Produktion in Makrophagen und Monozyten durch IFN- γ gefördert (146, 147). Auch dieser sich gegenseitig verstärkende Mechanismus würde voraussichtlich durch Proteintransportinhibitoren eingeschränkt werden und sich in geringerer IFN- γ mRNA in der späten Phase der Stimulation widerspiegeln.

Zum Schutz der Zelle vor Überstimulation induziert IFN- γ in T-Zellen eine Desensibilisierung über eine verminderte Expression des IFN- γ Rezeptors (148). Auch die intrazellulär erhöhte Konzentration von IFN- γ mRNA führt zu einer negativen Rückkopplung der IFN- γ mRNA Expression, die dem Schutz der Zelle vor

Überstimulation und Apoptose dient (149), was in Übereinstimmung mit unseren Daten wäre. Trilling *et al.* stellen auf Basis ihrer Versuche allerdings die Überlegung an, dass bestimmte Zellen diese negative Rückkopplung unter Umständen unterdrücken können, beispielsweise, wenn zusätzliche inflammatorische Stimuli vorliegen (149). Wie weiter oben erwähnt, wird durch die Stressreaktionen von ER und Golgi-Apparat durch Proteintransportinhibitoren eine erhöhte Expression von inflammatorischen Zytokinen registriert. Dadurch könnte, wie von Trilling *et al.* vorgeschlagen (149), die Hemmung der IFN- γ mRNA Expression durch die höhere Konzentration von inflammatorischen Zytokinen in der Zelle in der frühen Phase der Stimulation unterdrückt werden. Dies könnte die höheren RNA Werte nach 3 Stunden für Ansätze mit PTI erklären. Ähnliche Ergebnisse haben auch Muris *et al.* erzielt, indem sie die Rate an IFN- γ positiven Zellen nach Stimulation für 5 Stunden mit PMA und Ionomycin in Ansätzen mit und ohne Proteintransportinhibitoren verglichen und dabei eine höhere Rate in Ansätzen mit Proteintransportinhibitoren vorfanden (131).

Nach Stimulation über 24 Stunden haben Prozesse eingesetzt, welche die Stimulation limitieren sollen und zum Schutz der Zelle vor Apoptose dienen (149). Diese Prozesse hemmen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ . Möglicherweise könnte der Punkt, an dem diese Prozesse wirksam einsetzen, durch die Anwesenheit von PTI früher erreicht sein, da die Konzentration von IFN- γ mRNA schneller ein kritisches Level erreicht. Dies könnte, zusammen mit ausbleibenden autokrinen und parakrinen Effekten (siehe oben) die signifikant geringere Expression von IFN- γ mRNA nach 24 Stunden erklären. Die Effekte von Proteintransportinhibitoren sollten daher bei der Auswertung von Versuchsdaten unbedingt bedacht werden. Weitere vergleichende Versuche zur Untersuchung der Wirkung von PTI auf die Viabilität und Proteinproduktion wären notwendig, um ein besseres Verständnis über die genauen Auswirkungen zu erhalten.

4.4 Diskrepanz zwischen RT-qPCR, PrimeFlow und ELISA Ergebnissen

4.4.1 Die Ebenen der Proteinproduktion

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Betrachtung und Charakterisierung einzelner Zellen in einem Gemisch heterogener Populationen. Allerdings ist dabei die Verfügbarkeit von Antikörpern, welche gegen die zu untersuchenden Antigene gerichtet sind, eine grundlegende Voraussetzung. So wichtig die Betrachtung von

Proteinexpression in Zellen zum Verständnis der Reaktionen auf externe Stimuli ist, es sollten nach Möglichkeit alle Ebenen der Proteinproduktion und -expression beachtet werden. Durch Korrelation mit Daten der RNA Expression lassen sich neue Informationen gewinnen, da diese der Proteinexpression vorausgeht und damit einen Einblick in die der Proteinproduktion vorausgehende Reaktion der Zellen auf externe Stimuli ermöglicht.

Der Grad der Korrelation von RNA und dazugehörigem Protein variiert allerdings (150, 151). Produkte der Transkription sowie der Translation von Genen, welche Teile komplexer regulatorischer Mechanismen darstellen, zeigen wechselnde Grade der Übereinstimmung (152, 153). IFN- γ zeigte jedoch in Untersuchungen eine außerordentlich hohe Korrelation (153, 154). Auch in unseren mittels PrimeFlow RNA Assay durchgeführten Experimenten zeigte sich eine hohe ($r=0,71$) Korrelation für IFN- γ mRNA nach 3 Stunden und IFN- γ Protein nach 24 Stunden in Ansätzen ohne MSCs.

Die verwendeten Methoden Durchflusszytometrie, RT-qPCR und ELISA detektieren jeweils unterschiedliche Zielstrukturen und quantifizieren damit unterschiedliche Schritte in der Produktion eines Proteins. Der PrimeFlow RNA Assay quantifiziert die mRNA, indem die Bindungsstellen für fluoreszenz-markierte Sonden vervielfältigt und damit das Fluoreszenzsignal verstärkt wird. Für die RT-qPCR wird die mRNA in cDNA umgeschrieben, dann enzymatisch vervielfältigt und anschließend quantifiziert. Hier wird also das zu bestimmende Molekül direkt vervielfältigt und nicht das Fluoreszenzsignal amplifiziert. Mit dem ELISA wird das fertige Endprodukt, in unserem Fall das IFN- γ Protein, im Überstand der Zellen direkt quantifiziert.

Die in den Methoden beobachtete unterschiedliche n-fache Vervielfachung des Signals für IFN- γ Protein (Vgl. 3.1.2.3) deutet primär nicht auf die Ungültigkeit einer der Methoden hin, sondern lässt sich durch die individuellen dynamischen Messbereiche der Methoden, basierend auf ihren unterschiedlichen Funktionsprinzipien (Vgl. 1.1.1 & 1.1.4), erklären. Während der ELISA indirekt durch enzymatische Signalverstärkung die IFN- γ Konzentration in Überständen misst, bestimmt die Durchflusszytometrie das Fluoreszenzsignal markierter Antikörper, welche gegen in der Zelle vorhandenes IFN- γ Protein gerichtet sind.

4.4.2 Mehr IFN- γ Protein bei weniger IFN- γ mRNA – geht das?

Grundsätzlich kann davon ausgegangen werden, dass eine erhöhte Expression von mRNA letztendlich auch eine erhöhte Produktion des korrelierenden Proteins zur Folge hat (150). In vergleichenden Versuchen von Favre *et al.* konnte für die Produktion von TNF- α zwar eine signifikante Steigerung der RNA Expression detektiert werden, die sich allerdings weder in den ELISA noch in den ELISPOT Experimenten nachweisen ließ (154). Favre *et al.* geben hierfür mehrere mögliche Erklärungen. Erstens wird die Expression von TNF- α auf transkriptionaler und translationaler Ebene reguliert (155). Zweitens würde eine erhöhte Expression von membrangebundenem TNF- α , welches eine aktive Form von TNF- α darstellt (156), nicht mit einem ELISA detektierbar sein. Drittens könnte der verwendete ELISA möglicherweise nicht TNF- α detektieren, welches rezeptorgebunden vorliegt. Für IFN- γ hingegen konnte eine starke Korrelation zwischen drei Methoden (RT-qPCR, ELISA und ELISPOT) für die Produktion in stimulierten murinen Leukozyten festgestellt werden (154).

Die in unseren Versuchen beobachteten Ergebnisse für IFN- γ weisen allerdings eine genau umgekehrte Problematik auf: Weniger IFN- γ mRNA (Daten aus PrimeFlow RNA Assay und RT-qPCR) bei mehr IFN- γ Protein (Daten aus ELISA). Die Proteinbestimmung mittels PrimeFlow RNA Assay zeigte hingegen, wie erwartet, eine geringere Proteinexpression in Anwesenheit von MSCs (Abbildung 35).

Daten aus PrimeFlow und RT-qPCR Experimenten (Vgl. 3.2.1 & 3.2.2) deuteten dabei in eine ähnliche Richtung. Hier zeigte sich in Anwesenheit der MSCs eine verringerte Expression von IFN- γ RNA und Protein. Ein signifikanter Unterschied ($p=0,0129$) ließ sich allerdings nur für IFN- γ Protein mittels PrimeFlow nach 24 Stunden Stimulation nachweisen (Vgl. Abbildung 35). Die Daten aus den ELISA Versuchen hingegen zeigten, anders als zunächst erwartet, eine erhöhte Konzentration von IFN- γ Protein in den Überständen der PBMCs in Anwesenheit von MSCs und widersprechen damit den Ergebnissen aus PrimeFlow RNA Assay und RT-qPCR, sowie der logischen Überlegung, dass primär geringere RNA Spiegel folgend mit geringerer Proteinexpression einhergehen.

Der ELISA stellt die einzige verwendete Methode der Proteinbestimmung dar, bei der keine Proteintransportinhibitoren zum Einsatz kommen. Die beobachtete Änderung der IFN- γ mRNA Expression durch PTI (Vgl. Abbildung 38 & 4.3) findet demnach nicht statt. Auto- und parakrine Effekte von IFN- γ und anderen Faktoren können ungehindert

stattfinden. Es stellt sich die Frage, wie die laut ELISA höheren Spiegel von IFN- γ Protein in Anwesenheit von MSCs zu erklären sind, wenn RT-qPCR Daten von Zellen des gleichen Versuchsansatzes (ergo ebenfalls ohne PTI) eine erniedrigte IFN- γ mRNA Expression zeigen (Vgl. 3.2.2 & 3.2.3). Zusätzlich widersprechen die ELISA Ergebnisse den Ergebnissen des PrimeFlow RNA Assays, bei dem mRNA und Protein simultan in den Zellen bestimmt wird.

Es ist eine transiente Steigerung von IFN- γ durch MSCs gefolgt von einer Proliferationshemmung in stimulierten T-Zellen beschrieben (157). Allerdings liegen in dieser Arbeit keine IFN- γ mRNA Daten vor, so dass unklar ist, ob die mRNA in diesem Setting erhöht oder erniedrigt ist.

Es bestehen biologische Mechanismen, bei denen durch doppelsträngige RNA (dsRNA) oder microRNA (miRNA) eine sequenzspezifische Regulierung von Genen stattfindet (158). Diese Regulierung kann durch Modifikation des Chromatins, Hemmung der Translation, Abbau der mRNA bis hin zur Stilllegung von Genen passieren (158). Vornehmlich wurde gezeigt, dass dsRNA und miRNA eine Herunterregulierung von Genen verursachen (159). Es gibt jedoch auch zunehmende Hinweise darauf, dass miRNA posttranskriptional die Genexpression steigern kann (159). So wäre zumindest theoretisch eine verminderte mRNA Expression mit einer gesteigerten Proteinexpression zu vereinbaren. In PBMCs ist eine miRNA beschrieben, die eine erhöhte Expression von IFN- γ induziert, dies allerdings spezifisch im Setting einer HIV-Infektion (160).

Eine posttranskriptionale Steigerung der Translation scheint jedoch auf Zellen limitiert zu sein, welche sich in der G0 Phase des Zellzyklus befinden (159, 161). Diese Phase beschreibt einen Zustand der Zellen, bei dem Zellgröße und metabolische Aktivität reduziert sind und keine Proliferation stattfindet (162). Der Eintritt der Zellen in die G0 Phase kann auf unterschiedliche Arten induziert werden, darunter durch den Mangel an Serum mit die Zellteilung anregenden Proteinen (Wachstumsfaktoren und Mitogenen), sowie durch Kontakt mit antiproliferativen Signalen (163). Auch scheinen MSCs in T-Zellen einen Arrest in der G0 Phase induzieren zu können (164), allerdings bestehen hier widersprüchliche Ergebnisse (165). In den Experimenten wurden die Zellen jedoch jederzeit in Serum-haltigen Medium kultiviert (Vgl. 2.2.2). Die Stimulation der PBMCs mittels PMA und Ionomycin (Vgl. 2.2.2.2), welche beide Mitogene

darstellen (166, 167), spricht ebenfalls gegen einen Eintritt der PBMCs in eine G0 Phase.

Letztlich ist diese biologische Erklärung von erhöhtem IFN- γ Protein bei geringerer IFN- γ mRNA durch miRNA aber rein spekulativ und als eher unwahrscheinlich zu betrachten. Da keine Proliferationsassays oder Zellzyklusanalysen durchgeführt wurden, kann keine exakte Aussage über Phasen des Zellzyklus getroffen werden. Die ELISA Ergebnisse widersprechen den in der Literatur beschriebenen immunmodulatorischen Fähigkeiten der MSCs sowie den Ergebnissen der anderen Methoden. Daher sollte neben einer biologischen Erklärung unbedingt auch eine methodisch bedingte Ursache der Ergebnisse in Betracht gezogen werden.

4.4.3 ELISA Ergebnisse – widersprüchlich aber homogen

Es wurden durchweg in allen PrimeFlow Experimenten mit Kokulturen nach 24 Stunden erniedrigte mittlere Fluoreszenzintensitäten für IFN- γ Protein in Anwesenheit von MSCs gemessen (Abbildung 50), wohingegen in ELISA Versuchen die Konzentration von IFN- γ Protein in Kokultur mit MSCs durchweg erhöht war (Abbildung 51). Die Reduktion des IFN- γ Proteinsignals im PrimeFlow RNA Assay war im Mittel 0,85-fach. Die Steigerung von IFN- γ Protein im ELISA Assay war 1,58-fach.

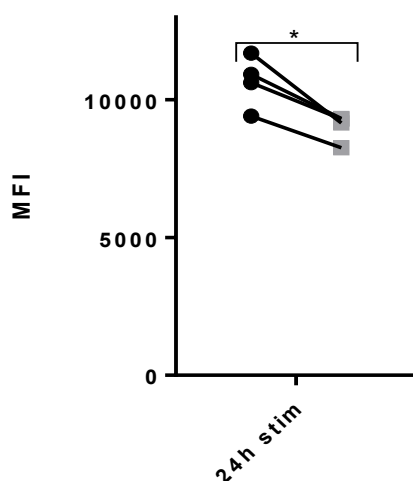


Abbildung 50: PrimeFlow IFN- γ Protein nach 24 Stunden Stimulation, n=4

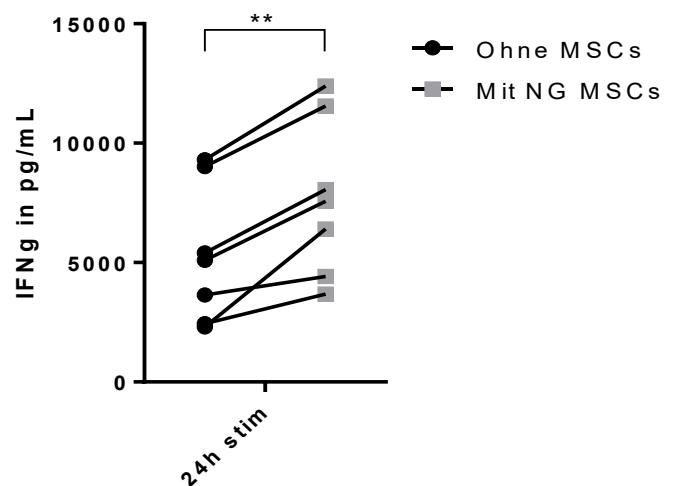


Abbildung 51: ELISA IFN- γ Protein nach 24 Stunden Stimulation, n=7

Zwar ist für die Kokultur aus MSCs aus Lipoaspirat, wie auch in unseren Versuchen verwendet, und gereinigten T-Zellen eine Steigerung der IFN- γ Produktion beschrieben, allerdings nicht für die Kokultur mit PBMCs (168). Zusätzlich wurde für eine Subpopulation der PBMCs, den NK-Zellen, welche bis zu 15% der PBMC

Population ausmachen können, eine gesteigerte Expression von IFN- γ in Anwesenheit von MSCs aus Knochenmark beschrieben (169). Der Großteil der vorliegenden Literatur beschreibt allerdings einen die IFN- γ Produktion hemmenden Effekt der MSCs auf PBMCs (168, 170, 171).

Es ergeben sich somit generell Diskrepanzen zwischen den einzelnen Methoden, speziell aber auch Unterschiede in den Ergebnissen der IFN- γ Proteinbestimmung. Einerseits weisen damit die Methoden PrimeFlow und RT-qPCR in eine andere Richtung als die Methode ELISA, andererseits liefern damit auch zwei Methoden zur Bestimmung von IFN- γ Protein, nämlich PrimeFlow und ELISA, gegensätzliche Ergebnisse bezüglich der Effekte von MSCs.

Damit stellen sich einige Fragen bezüglich der Interpretation und der Bedeutung der Ergebnisse. Zunächst einmal interessiert, welches der Ergebnisse mit einer größeren Wahrscheinlichkeit den tatsächlichen Verhältnissen entspricht. Da zwei unterschiedliche Methoden (PrimeFlow und ELISA) denselben Parameter (IFN- γ Protein) zu bestimmen versuchen aber gegensätzliche Resultate liefern, können entweder nicht beide Ergebnisse richtig sein, oder methodenimmanente Unterschiede führen zu diesen Differenzen.

Angenommen, der Effekt von MSCs auf die IFN- γ Protein Produktion wäre nur sehr schwach ausgeprägt, so könnten Ungenauigkeiten der beiden Methoden in den Messungen letztendlich zu gegensätzlichen Ergebnissen führen. Bei geringer Präzision der jeweiligen Methode könnten die bestimmten Mittelwerte für PBMCs mit und ohne MSCs auf einen die IFN- γ Produktion steigernden Effekt hinweisen, obwohl die wahren Mittelwerte auf einen die IFN- γ Produktion hemmenden Effekt hindeuten. Dagegen einzuwenden ist allerdings, dass in jedem PrimeFlow Experiment der Wert für IFN- γ Protein in Anwesenheit von MSCs verringert war (Abbildung 50), wohingegen in jedem ELISA Experiment IFN- γ Protein in Anwesenheit von MSCs als erhöht gemessen wurde (Abbildung 51). Wären reine Ungenauigkeiten der Messungen die Ursache, so würde man erwarten, dass wenigstens einige wenige Messungen in eine andere Richtung weisen würden.

Betrachtet man nur Ergebnisse aus Kulturen ohne MSCs, so korrelieren die Ergebnisse aus PrimeFlow und PCR gut für mRNA (Vgl. 3.1.2.2) und die Ergebnisse aus PrimeFlow und ELISA mäßig gut für Protein (Vgl. 3.1.2.3). Es sei darauf hingewiesen, dass in unseren PrimeFlow und RT-qPCR Versuchen ein

supprimierender Effekt von MSCs auf die IFN- γ RNA und Proteinproduktion in PBMCs erkennbar war, der allerdings nicht statistisch signifikant war. Angesichts der zahlreichen Literatur zu den nachgewiesenen immunmodulatorischen Effekten von MSCs auf PBMCs halten wir die geringe Anzahl an Replikaten für einen Hauptgrund, warum kein signifikanter Unterschied nachzuweisen war.

Somit stellt sich die Frage, was für die Ergebnisse des PrimeFlow RNA Assays spricht und was mögliche Gründe für die gegensätzlichen Ergebnisse in ELISA Experimenten sind. Für die Validität der Ergebnisse des PrimeFlow RNA Assays sprechen in erster Linie Daten aus der Literatur. Es wird als bewiesen angesehen, dass MSCs aus verschiedenen Quellen immunmodulierende Effekte auf PBMCs haben, die sich in der Hemmung der Produktion von inflammatorischen Zytokinen äußern (96, 111). Es existieren zahlreiche Daten, die eine Reduktion von IFN- γ mRNA und Protein in PBMCs in Anwesenheit von MSCs belegen (168, 170, 171). Des Weiteren korrelieren die Daten aus den RT-qPCR Versuchen mit den Ergebnissen des PrimeFlow RNA Assays. In beiden Versuchen ist die INF- γ mRNA Expression in Anwesenheit von MSCs verringert. Dies trifft für RT-qPCR Experimente aus Ansätzen mit und ohne Proteintransportinhibitoren zu. Zudem bietet der PrimeFlow RNA Assay die Möglichkeit, RNA und dazugehöriges Protein aus der gleichen Probe zu bestimmen. Dies vermeidet die Bestimmung von RNA und Protein mit unterschiedlichen Methoden, deren Protokolle unter Umständen Auswirkungen auf die zu bestimmenden Parameter haben und zu Diskrepanzen führen können. In unseren PrimeFlow Experimenten deutete sich sowohl in Daten für RNA als auch für Protein ein hemmender Effekt der MSCs an, wenn auch nicht statistisch signifikant. Damit weisen beide Stufen der Proteinsynthese in eine ähnliche Richtung, was für den PrimeFlow RNA Assay spricht.

In den Versuchen verwendete ich für alle Experimente das gleiche Kit des OptEIA Human IFN- γ ELISA Sets. Somit liegt aktuell kein Vergleich mit Erfahrungsberichten aus anderen Experimenten oder mit Ergebnissen bei Verwendung eines anderen Kits vor. Das ELISA Kit als mögliche Fehlerquelle für die Diskrepanzen zwischen den Methoden wäre daher theoretisch denkbar. Betrachtet man die Homogenität der erzielten Ergebnisse, so wurde in jedem ELISA Versuch die IFN- γ Proteinkonzentration in Anwesenheit von MSCs als erhöht gemessen (Abbildung 51). Dann müssten methodenimmanente Ursachen und nicht Fehler in der Handhabung des Assays für die beobachteten Ergebnisse verantwortlich sein.

4.4.4 IFN- γ Produktion durch mesenchymal stromale Zellen?

IFN- γ zählt nicht zu den Hauptfaktoren des Sekretoms der MSCs (172). Es ist eine Produktion von IFN- γ durch MSCs beschrieben, dies allerdings spezifisch im Setting einer viralen Infektion (173). Eine Produktion von IFN- γ RNA durch die von uns verwendeten MSCs aus Lipoaspirat schlossen wir allerdings mittels RT-qPCR aus. Dort ließ sich in Ansätzen von stimulierten MSCs keine IFN- γ RNA nachweisen. Das gemessene IFN- γ stammt also mutmaßlich ausschließlich von PBMCs. Theoretisch denkbar wäre eine Produktion von IFN- γ durch MSCs nur in Anwesenheit von PBMCs. Nach unserem besten Wissen fanden sich zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit jedoch keine Berichte über solch eine IFN- γ Produktion in MSCs.

4.4.5 Unspezifische Bindung und methodische Präzision

Eine weitere mögliche Erklärung für höhere IFN- γ Spiegel in Ansätzen mit MSCs könnte eine Bindung von Proteinen sein, welche durch MSCs produziert wurden und unspezifisch an IFN- γ Antikörpern binden. Dass unspezifische Bindungen bei ELISA Versuchen vorkommen und Versuchsergebnisse beeinflussen können, ist lange bekannt (174, 175). So kann durch inadäquates Blocken der ELISA Platte eine Bindung von Proteinen direkt an die Polystyrol-Oberfläche stattfinden oder es binden Proteine unspezifisch an das zum Blocken verwendete Reagenz (176-178).

Auch muss die Validität der Messergebnisse kritisch betrachtet werden. Untersuchungen zu Richtigkeit, Genauigkeit und Spezifität von ELISA Assays zur Detektion von IL-4, IL-5, IFN- γ und TNF- α ergaben Unsicherheiten der Ergebnisse von 25% und mehr (179). Weitere Versuche unter Verwendung eines anderen ELISA Kits könnten zur Klärung der möglichen Ursache der Ergebnisse beitragen. Auch eine gleichzeitige Bestimmung der Proliferationsrate der PBMCs in zukünftigen Experimenten würde zeigen, inwieweit diese von den MSCs beeinflusst wird und mit der IFN- γ RNA und Protein Produktion korreliert.

Letzten Endes weisen die beobachteten Tendenzen in den verwendeten Methoden zwar in unterschiedliche Richtungen, jedoch konnte keine der Methoden einen signifikanten Unterschied in der IFN- γ RNA oder Proteinexpression zwischen PBMCs mit und ohne MSCs nachweisen. RT-qPCR und PrimeFlow Experimente konnten keinen eindeutig signifikanten suppressiven Effekt der MSCs auf die PBMCs nachweisen, ebenso konnten ELISA Experimente keinen eindeutig die IFN- γ Proteinproduktion steigernden Effekt nachweisen. Mit höherer Anzahl von Replikaten

lässt sich voraussichtlich eine signifikante Reduktion der IFN- γ RNA und Proteinexpression durch MSCs be- oder widerlegen. ELISA Testungen mit selektierten PBMC Subpopulationen, CD4⁺ T-Zellen oder NK-Zellen könnten helfen, herauszufinden, welcher Zelltyp verantwortlich ist.

4.5 Einfluss des Glucosespiegels auf mesenchymal stromale Zellen

4.5.1 Schwierigkeiten der Therapie mit mesenchymal stromalen Zellen

MSCs haben durch ihre stammzellähnlichen Eigenschaften in den vergangenen Jahren stark an Bedeutung für die Therapie in der regenerativen Medizin gewonnen. Da sie sich durch ihre Proliferations- und Differenzierungskapazität, sowie durch immunmodulatorische Fähigkeiten auszeichnen, werden sie vielfach eingesetzt, um eine schnellere und effektivere Heilung in geschädigtem Gewebe zu erreichen (180-183).

Dennoch ist die Verwendung von MSCs nicht ausnahmslos von Erfolg gekrönt (184, 185). Die positiven Ergebnisse, die in zahlreichen präklinischen Tierstudien mit MSCs verzeichnet wurden, konnten bisher nicht in gleichem Umfang in klinischen Studien reproduziert werden (182). In Untersuchungen zur Maximierung des klinischen Potenzials und der Breite und Effektivität der Anwendung wurden verschiedene mögliche Ursachen, darunter Hyperglykämie, Hypoxie und Entzündung, ausgemacht, die für Fehlschläge in der MSC-Therapie verantwortlich sein könnten (73).

Hingegen gibt es auch hier widersprüchliche Daten, beispielsweise stellten sich in Untersuchungen unter Hypoxie präkonditionierte MSCs aus Nabelschnurblut als effektiver als nicht präkonditionierte CB-MSCs heraus (50). Die Daten zu den *in vitro* Effekten von hohen Glucosespiegeln in den Kulturmedien und den *in vivo* Effekten von Hyperglykämie auf die immunmodulatorischen Fähigkeiten von MSCs sind nicht eindeutig: In einigen *in vitro* Studien zeigte sich ein toxischer Einfluss von hohen Glucosespiegeln auf die Proliferation von MSCs sowie eine erhöhte Seneszenz und Apoptoserate der Zellen (74-76). Interessanterweise zeigte sich in anderen Versuchen unter hoher Glucosekonzentration eine Erhöhung des adipogenen Potenzials von MSCs, bei gleichzeitiger Reduzierung der anderen Differenzierungspfade (79, 80), was zum Verständnis der Pathophysiologie des Diabetes mellitus (Typ 1 & Typ 2) beitragen könnte, da hier lokale Fettgewebsvermehrung und Insulinresistenz eine Schlüsselrolle spielen (186, 187).

Indes existieren aber auch Untersuchungen, in denen MSCs keine Beeinflussung der Proliferation oder der Produktion von Wachstumsfaktoren durch kurzzeitige Exposition gegenüber hohen Glucosekonzentrationen erfahren (78, 188). In einigen Untersuchungen konnten sogar proliferationsfördernde Effekte von hohen Glucosespiegeln nachgewiesen werden (77, 188, 189). Die Versuche von Dhanasekaran *et al.* deuten an, dass MSCs aus verschiedenen Quellen unterschiedlich anfällig für hohe Glucosespiegel sind (76). So reagierten MSCs aus Knochenmark deutlich empfindlicher auf hohe Glucosekonzentrationen als MSCs aus Lipoaspirat. Die in unseren Versuchen verwendeten MSCs stammen ebenfalls aus Lipoaspirat, was (zusätzlich zu der geringen Anzahl von Replikaten) erklären könnte, warum die Unterschiede zwischen normalen und erhöhten Glucosespiegeln so gering und damit nicht signifikant waren (Vgl. 3.3).

Gesamtheitlich betrachtet konnte in unseren Versuchen mittels PrimeFlow RNA Assay, Durchflusszytometrie und RT-qPCR kein eindeutiger Effekt des HG Mediums auf die Fähigkeit der MSCs, die IFN- γ mRNA Expression zu inhibieren, nachgewiesen werden (Vgl. 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3). Auch die Daten der ELISA Experimente (Vgl. 3.3.4), widersprechen sie ja Daten aus PrimeFlow RNA Assay und RT-qPCR in der Aussage zu den Effekten der Zytokinproduktion der PBMCs, konnten nicht zeigen, dass hohe Glucosekonzentrationen hemmend auf die Immunmodulation von MSCs wirken.

4.5.2 Großer Bedarf an neuen, gezielten Studien

Einige Studien konnten zeigen, dass MSCs durch Diabetes mellitus und damit assoziierten hohen Glucosekonzentrationen Beeinflussungen verschiedener Parameter erfahren. Diese umfassen erhöhte Apoptoserate und Seneszenz (75, 190, 191), sowie verminderte Proliferation (75, 192) und osteogene Differenzierungskapazität (193, 194). Genauso allerdings zeigten andere Studien, dass MSCs verschiedener Quellen von hohen Glucosekonzentrationen unbeeinflusst in ihrer Apoptoserate (195), Proliferation (196-199) und Differenzierungskapazität (200, 201) waren.

Unsere Daten sind im Einklang mit vorliegender Literatur, die ebenfalls geringe bis keine schädlichen Effekte von hohen Glucosespiegeln auf MSCs, gerade für MSCs aus Fettgewebe (76), postuliert (198, 202, 203). Gegensätzliche Ergebnisse wurden indessen von Serena *et al.* präsentiert, indem MSCs aus Fettgewebe von Patienten mit Adipositas oder Diabetes mellitus Typ 2 geringere immunmodulatorische

Fähigkeiten zeigten als MSCs schlanker Patienten (204). Es kann spekuliert werden, ob die beobachteten Unterschiede nicht durch hohe Glucosespiegel sondern durch den metabolischen Phänotyp mit Fettleibigkeit hervorgerufen wurden (202).

De Lima *et al.* konnten zeigen, dass sich MSCs aus Knochenmark von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 nicht in Morphologie, Immunphänotyp oder Differenzierungspotenzial, allerdings in der Expression der mRNA immunmodulatorischer Moleküle (VCAM-1, CXCL12, HGF und CCL2) von MSCs gesunder Patienten unterscheiden (199). VCAM-1 ist an der Bindung von MSCs an aktivierte T-Zellen beteiligt (113) und könnte so durch Diabetes beeinflusst werden (199).

Trotz zahlreicher Untersuchungen sind die Daten zu Effekten von hoher Glucose auf MSCs immer noch inkonklusiv. Verfügbare Studien konnten nicht einheitlich zeigen, dass veränderte Funktionen der MSCs auch mit schlechteren Therapieergebnissen einhergehen (205). Zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen und Signalwege von MSCs unter dem Einfluss hoher Glucosekonzentrationen sind daher zusätzliche Studien unbedingt notwendig. Diese sollten den Energiehaushalt der MSCs, sowie durch Diabetes hervorgerufene Einschränkungen der Mitochondrienfunktion und der antioxidativen Kapazität beinhalten (205). Dies könnte zu neuen Erkenntnissen über MSCs, besserem Verständnis der Pathophysiologie bestimmter Krankheitsbilder und letztendlich zu besseren Therapien mit MSCs führen.

4.6 IFN- γ als Parameter zur Immunmodulation

4.6.1 IFN- γ als Effektor für mesenchymal stromale Zellen

In unseren Experimenten wurde IFN- γ als Parameter zur Immunmodulationsfähigkeit der MSCs bestimmt. Eine geringere Expression von IFN- γ wurde so gedeutet, dass sie einem höheren immunsuppressiven bzw. antiinflammatorischen Effekt der MSCs auf die PBMCs entspricht. IFN- γ hat aber auch direkte Effekte auf MSCs: Seit etwas mehr als einem Jahrzehnt ist die Bedeutung von IFN- γ für die immunmodulatorischen Effekte von MSCs bekannt. Krampera *et al.* konnten 2006 erstmals zeigen, dass die antiproliferativen Fähigkeiten von MSCs auf T- und NK-Zellen in Anwesenheit von IFN- γ stark zunehmen (206). In Kokultur von MSCs mit T-Zellen, in denen das IFN- γ Gen ausgeschaltet war, war die immunmodulatorische Funktion der MSCs praktisch aufgehoben (207). Weitere Daten unterstützen die Vermutung, dass die immunmodulatorischen Effekte und damit das therapeutische Potenzial von MSCs

nach einer Präaktivierung durch das proinflammatorisch wirkende IFN- γ erhöht wird (109, 113, 207, 208), IFN- γ aber nicht essenziell für diese Effekte ist (209). Durch MSCs produziertes IDO stellt in diesem Pathway ein zentrales Molekül der Immunsuppression dar (111). Es konnte so gezeigt werden, dass das sonst stark proinflammatorisch wirkende IFN- γ unter bestimmten Umständen ein wichtiger Botenstoff in der Vermittlung der Immunsuppression durch MSCs ist.

Es kann kritisch diskutiert werden, inwieweit ein Protein als Parameter zur Bestimmung der Fähigkeiten der Immunmodulation von bestimmten Zellpopulationen nützlich ist, wenn es direkten Einfluss auf die Zellen nimmt, die diese Immunmodulation bewirken. Zu Beginn der Planung unserer Experimente entschieden wir uns als Parameter der Immunmodulation für IFN- γ , da es einen klassischen, gut untersuchten Marker der T-Zell-Stimulation darstellt und da IFN- γ problemlos mit allen drei verwendeten Methoden (Durchflusszytometrie, RT-qPCR, ELISA) zu detektieren ist. Zudem ist es einer der Parameter, die im ursprünglichen PrimeFlow Protokoll (4) erwähnt sind und bot sich so zur Validierung der Methode und Bearbeitung der wissenschaftlichen Frage an. Aufbauend auf diesen anfänglichen Experimenten wurden alle weiteren Versuche ebenfalls mit IFN- γ konzipiert. Alternative Methoden als Nachweis der immunmodulatorischen Fähigkeiten der MSCs wurden von uns z.T. bereits etabliert, beispielsweise ein mixed lymphocyte reaction (MLR) Assay, ein Proliferationsassay, die Analyse der Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker, oder die Bestimmung eines anderen Zytokins (bspw. TNF α) gewesen (210, 211).

4.6.2 Unterschiedliche Anteile bestimmter Zellpopulationen

Lymphozyten als zu analysierende Zellpopulation stellen eine Gruppe bestehend aus T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen dar, welche durchaus unterschiedlich auf Stimulation bzw. Kontakt mit MSCs reagieren. Aufgrund nicht ausreichender Bindung des CD3 Antikörpers in den durchflusszytometrischen Versuchen (Vgl. 4.2.1) konnte keine spezifische Analyse der T-Zell Population durchgeführt werden, sondern es konnte nur die Lymphozytenpopulation isoliert betrachten werden.

Relativ gut untersucht sind die inhibitorischen Effekte der MSCs auf die Lymphozytenproliferation (46, 93, 157, 206, 207, 212, 213). Diese Effekte scheinen aber abgeschwächt zu sein, wenn die Lymphozyten schon mit proinflammatorischen Zytokinen in Kontakt waren (214). Weniger eindeutig sind die Untersuchungen zur Zytokinexpression, in diesem Fall IFN- γ . Eine Vielzahl an Untersuchungen konnte

einen hemmenden Effekt der MSCs auf die IFN- γ Produktion von PBMCs nachweisen (48, 92, 108, 170, 215). Eindeutig sind diese Ergebnisse aber nicht, da andere Arbeiten auch eine Steigerung von IFN- γ in PBMCs oder deren Subpopulationen durch MSCs beschreiben (157, 168, 169). So konnte gezeigt werden, dass aufgereinigte T-Zellen in Kontakt mit MSCs ihre IFN- γ Produktion steigern (168). Auch für NK-Zellen konnte eine Steigerung der IFN- γ Produktion nachgewiesen werden (169). Es wird angenommen, dass IFN- γ hauptsächlich von NK-Zellen und natürlichen-Killer-T-(NKT) Zellen als Teil der angeborenen Immunität und von TH1 CD4+ und CD8+ Effektor-T-Zellen als Teil der erworbenen Immunität produziert wird (216).

B-Zellen spielen eine untergeordnete Rolle, allerdings sind Subpopulationen von IFN- γ produzierenden B-Zellen bekannt (217). Die Verwendung von PBMCs verschiedener Spender geht mit einer Variabilität der Zellen unter anderem bezüglich Zusammensetzung, Überleben und Zytokinproduktion einher (218). Unterschiedliche Anteile der einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen in den PBMC Proben könnten so eine Erklärung dafür sein, warum es zu Differenzen der IFN- γ Produktion mit dementsprechend hoher Standardabweichung in den einzelnen Experimenten kam.

4.6.3 Aktivierung der mesenchymal stromalen Zellen durch IFN- γ

Durch die Bedeutung von IFN- γ für die Immunmodulation von MSCs ergeben sich zudem weitere Fragestellungen bezüglich des Versuchsaufbaus. Kommt es in den Experimenten zur Aktivierung der MSCs durch IFN- γ oder sind die MSCs dafür nicht ausreichend lange in Kultur mit den PBMCs? In unseren Experimenten wurde keine Stimulationsdauer länger als 24 Stunden verwendet. Ergebnisse anderer Forschungsgruppen, in denen PBMCs bis zu 72 Stunden stimuliert wurden, zeigen, dass dort noch höhere IFN- γ Spiegel als nach 24 Stunden zu erwarten sind (219). In Arbeiten zu den Effekten von mit IFN- γ behandelten MSCs, wurden die MSCs meist für mehrere Tage dem IFN- γ ausgesetzt und es konnte eine hemmende Wirkung auf die Proliferation von Lymphozyten gezeigt werden (206, 212-214).

In *in vivo* Experimenten zur Untersuchung der förderlichen Wirkung von MSCs auf unterschiedliche inflammatorische Krankheitsbilder (GvHD, Colitis, Enzephalomyelitis) und die Rolle von IFN- γ , sind die MSCs auch Tage bis Wochen dem IFN- γ ausgesetzt (48, 208, 220). Doch die Frage, wie lange die Anwesenheit von IFN- γ notwendig ist, bis es zu einer Aktivierung der MSCs kommt, kann noch nicht genau beantwortet werden. Vergleichende Arbeiten zu unterschiedlich lange dauernden

Vorbehandlungen der MSCs mit IFN- γ würden helfen, einen Zeitpunkt zu identifizieren, nach dem eine Aktivierung begonnen bzw. stattgefunden hat. Dies sollte in der Konzeption und Interpretation von zukünftigen Versuchsansätzen Beachtung finden, besonders bei länger dauernden Stimulationen über mehrere Tage, da sich durch die Aktivierung der MSCs deren suppressive Eigenschaften, Oberflächenmarker oder Zytokinprofil maßgeblich ändern können (95, 109, 206, 213, 220, 221).

In einer Arbeit zur Prävention der T-Zell vermittelten GvHD durch MSCs konnte eine wirksame Prävention nur bei Behandlung der MSCs mit sehr hohem IFN- γ Spiegel (500 U/mL), nicht aber bei geringen Spiegeln (5 & 50 U/mL) gezeigt werden (208). Dies deutet zumindest eine Dosis-Wirkungs-Beziehung an, wodurch die immunmodulatorischen Fähigkeiten gesteigert werden. Falls also in unseren Versuchen eine Aktivierung der MSCs stattfand, dann möglicherweise nur in den letzten Stunden der Experimente, da nur zu diesem Zeitpunkt ausreichend hohe Spiegel von IFN- γ bestanden. Auch hier wären weitere Versuche nötig, um ein besseres Verständnis über die Aktivierung der MSCs durch IFN- γ zu erhalten.

Zudem wurden mit Fokus auf die IFN- γ RNA Kinetik nur die ersten 24 Stunden nach Stimulation untersucht. Ergebnisse anderer Gruppen deuten darauf hin, dass eine längere Exposition gegenüber MSCs mit einer stärkeren Proliferationshemmung und einer Reduktion der IFN- γ Proteinproduktion einhergeht (222, 223), was erklären könnte, warum die Reduktion der IFN- γ Produktion (noch) nicht signifikant war.

4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Der PrimeFlow RNA Assay stellt mit der Erweiterung der Möglichkeiten der Durchflusszytometrie um die gleichzeitige Bestimmung von RNA eine vielversprechende und zukunftssträchtige Methode dar. Trotz der erörterten Nachteile der Methode bietet sie eine interessante Plattform zur detailreichen Analyse von komplexen Zellpopulationen. Das Alleinstellungsmerkmal des PrimeFlow RNA Assays, die gleichzeitige Bestimmung von RNA, Protein und Oberflächenmarkern einer Zellpopulation aus der gleichen Probe, macht diese Methode zu einer attraktiven Option beim Design von Experimenten. Durch die Verwendung von lebenden, funktionsfähigen Zellen besteht die Möglichkeit, gezielt Subpopulationen zu identifizieren und diese nach Sortierung am Durchflusszytometer für weitere Versuche isoliert zu verwenden. Dahingehend weitere interessante Fragestellungen wären,

inwieweit die durchflusszytometrische Sortierung von Zellen anhand ihres mRNA- oder Proteinprofils in Zukunft mit Hochdurchsatz-Charakterisierung des Genoms, Epigenoms, Transkriptoms, Proteoms und Metaboloms kombiniert werden kann.

Bei der Etablierung des PrimeFlow RNA Assays für unser Labor mit Vergleich gegen die zwei bereits etablierten Methoden RT-qPCR und ELISA lieferte der ELISA überraschenderweise widersprüchliche Ergebnisse in Experimenten mit Kokulturen. Neben den von uns gelieferten möglichen Erklärungen (unspezifische Bindung, geringe Effektstärke, geringe Anzahl an Replikaten, Richtigkeit und Genauigkeit der Ergebnisse), wären in erster Linie weitere Versuche, auch unter Verwendung eines anderen Kits und Bestimmung weiterer Parameter (bspw. Proliferationsrate) anzustreben, um zu einer Klärung der Resultate beizutragen. Wir sehen den PrimeFlow RNA Assay trotz der ELISA Daten, einerseits aufgrund plausibler Korrelation mit RT-qPCR Daten und andererseits aufgrund Übereinstimmung mit vorliegender Literatur, als interessante Methode zur weiteren Verwendung in unserem Labor für aktuelle und zukünftige Fragestellungen an.

Bei Betrachtung der immunmodulatorischen Fähigkeiten von MSCs und dem Einfluss von hoher Glucose zeigten sich nur schwache Effekte, die nicht das Signifikanzniveau erreichten. Die Herkunft der MSCs scheint ein wichtiger Faktor für die Effekte hoher Glucosespiegel zu sein. MSCs aus Fettgewebe gelten als weniger anfällig für hohe Glucosespiegel und könnten so die geringe Beeinflussung erklären. Auch wären eine größere Anzahl Versuche nötig, um eine mögliche geringe Effektstärke der MSCs und der Glucose sicher nachweisen zu können. Zunehmende Erkenntnisse über MSCs zeigen, dass diese Zellen eine komplexere Population darstellen, als zunächst angenommen. Ihre Differenzierungsmöglichkeiten und immunmodulatorischen Eigenschaften stehen in komplexem Bezug zum umgebenden Zellmilieu und vorliegenden Zytokinen. Weitere Erkenntnisse werden dazu beitragen, MSCs als attraktive Therapie für klinische Krankheitsbilder, besonders chronisch entzündliche Erkrankungen und Prozesse mit langer Heilungsphase, zu etablieren und Fehlschläge in klinischer Anwendung erklären und minimieren zu können.

In unseren Experimenten fiel ein signifikanter Unterschied für IFN- γ mRNA durch Proteintransportinhibitoren auf. Durch Verwendung der beiden Proteintransportinhibitoren Monensin und Brefeldin A kam es zu höheren IFN- γ mRNA Spiegeln nach 3 Stunden und signifikant geringeren IFN- γ mRNA Spiegeln nach 24 Stunden.

Erklärungen hierfür sind eine höhere Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch PTI in der frühen Phase und hypothetisch früher einsetzende autoregulatorische, zum Schutz dienende Prozesse der Zellen. Die simultane Verwendung beider PTI dürfte die Toxizität noch gesteigert haben. Der Einfluss der PTI ist eindrücklich und nicht zu vernachlässigen, gerade bei der Interpretation von Versuchsergebnissen, die sich mit pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und deren Effekten befassen. Weitere vergleichende Versuche zur Toxizität der einzelnen Substanzen bei getrennter und unterschiedlich langer Verwendung, sowie die genauere Untersuchung der Effekte auf das Zytokinmilieu der Zellen, halten wir für angebracht. Proteintransportinhibitoren sollten daher nicht als Hilfsmittel zur intrazellulären Proteindetektion ohne weitere Auswirkungen angesehen werden, sondern als ein Mittel zur verbesserten Detektion einiger Proteine, dessen komplexe Auswirkungen beim Design der Experimente und vor allem bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden muss.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Zellen unseres Körpers agieren *in vivo* auf höchst komplexe Art miteinander. Um diese Vielschichtigkeit von *in vivo* stattfindenden Prozessen *in vitro* abbilden zu können, werden immer komplexere Ansätze und Modelle, wie Kokulturen multipler Zellpopulationen, 3D-Kulturen oder 3D-Miniorgane konzipiert. Die Herausforderung bei der Auswertung und Interpretation solcher Systeme besteht unter anderem darin, eindeutig bestimmen zu können, welcher Zellpopulation im System welche biologische Funktion zugeordnet werden kann. Mittels Polymerase Chain Reaction und Enzyme-linked Immunosorbent Assay ist eine Quantifizierung von RNA und Protein einer Probe möglich. Eine Aufschlüsselung nach etwaigen Subpopulationen, die unterschiedliche RNA- respektive Proteinexpressionsprofile besitzen, ist mit diesen Methoden jedoch nicht möglich.

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine neu entwickelte durchflusszytometrische Methode, den PrimeFlow RNA Assay, in unserer FlowCore Abteilung zu etablieren, welcher die funktionelle Analyse, insbesondere intrazellulärer Prozesse, bei gleichzeitiger eindeutiger Zuordnung dieser Funktionen zu bestimmten Populationen in komplexen Zellkulturen erlaubt.

Der PrimeFlow RNA Assay erlaubt die simultane Bestimmung von RNA, Protein und Oberflächenmarkern auf Einzelzellebene einer Probe und ermöglicht so die Identifikation bestimmter Subpopulationen mit distinktem Expressionsprofil der analysierten Parameter. Diesen neuen methodischen Ansatz habe ich in vergleichenden Versuchen mit den bereits etablierten Methoden Polymerase Chain Reaction und Enzyme-linked Immunosorbent Assay durchgeführt, um ihn nach erfolgreicher Etablierung auf die wissenschaftliche Fragestellung unserer Forschungsgruppe anwenden zu können. Diese untersucht mesenchymal stromale Zellen, eine Zellpopulation, die aufgrund von multipotentem Differenzierungspotenzial, trophischer Unterstützung beschädigter Gewebe und immunmodulatorischen Fähigkeiten ein sehr attraktives Ziel aktueller Forschung ist. Genauer untersucht wurden die immunmodulatorischen Einflüsse der mesenchymal stromalen Zellen auf periphere mononukleäre Blutzellen anhand der Expression von Interferon gamma, einem inflammatorischen Zytokin.

Nach erfolgreicher Etablierung wurden stimulierte periphere mononukleäre Blutzellen mit mesenchymal stromalen Zellen kultiviert und es wurde die Expression von Interferon gamma auf RNA- und Proteinebene bestimmt. Hierbei zeigten sich im PrimeFlow RNA Assay und der Polymerase Chain Reaction Ergebnisse, die auf einen immunmodulierenden Effekt der mesenchymal stromalen Zellen, im Sinne einer Reduktion der Interferon gamma Expression, hindeuteten. Gegensätzliche Ergebnisse lieferte der Enzyme-linked Immunosorbent Assay, hier war Interferon gamma in Anwesenheit von mesenchymal stromalen Zellen erhöht.

Da Hyperglykämie als potenziell schädlicher Faktor bei der Therapie mit mesenchymal stromalen Zellen gilt, sollte zudem untersucht werden, ob sich eine erhöhte Glucosekonzentration negativ auf die immunmodulatorischen Fähigkeiten auswirkt. In den durchgeführten Experimenten konnte kein solcher, eindeutig hemmender, Effekt beobachtet werden.

Der PrimeFlow RNA Assay offenbarte mit reduzierter Antikörper-Markierung eines Oberflächenmarkers und geänderter Expression eines Haushaltsgens unter Stimulation methodische Probleme, von denen sich nicht alle suffizient lösen ließen. Die widersprüchlichen Daten aus Versuchen mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay sahen wir aufgrund korrelierender Ergebnisse der anderen Methoden und vorliegender Literatur als primär methodenimmanentes Problem an, für das verschiedene Erklärungen geliefert werden. In den Experimenten zeigte sich ein deutlicher Einfluss der für die Durchflusszytometrie eingesetzten Proteintransportinhibitoren auf die Interferon gamma RNA Expression in der frühen und späten Phase der Stimulation. Dieser Effekt und weitere sollten unbedingt bei der Konzeption von Experimenten sowie der kritischen Interpretation ihrer Ergebnisse beim Einsatz von Proteintransportinhibitoren bedacht werden.

Trotz der geschilderten Nachteile stellt der PrimeFlow RNA Assay eine einzigartige Methode dar, welche sich durch Multiplex Analysen verschiedenster Parameter auf Einzelzellebene, der Identifikation von distinkten Subpopulationen und hohem Durchsatz auszeichnet. Die vorliegende Arbeit konnte kritische Schritte identifizieren, die einer Validierung mit vergleichenden Methoden bedürfen. Damit sehen wir den PrimeFlow RNA Assay als zukunftssträchtige Methode an, die mit neuen Möglichkeiten der Analyse einen Schritt in Richtung eines besseren Verständnisses komplexer Zellpopulationen und zellulärer Interaktionen darstellt und zu neuen Erkenntnissen sowie besseren Therapien unterschiedlichster Krankheitsbilder beitragen wird.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Sandstedt M, Jonsson M, Asp J, Dellgren G, Lindahl A, Jeppsson A, et al. Intracellular flow cytometry may be combined with good quality and high sensitivity RT-qPCR analysis. *Cytometry A*. 2015;87(12):1079-89.
2. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless T, Melamed MR. Conformation of RNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Exp Cell Res*. 1975;95(1):143-53.
3. Wang F, Scoville D, He XC, Mahe MM, Box A, Perry JM, et al. Isolation and characterization of intestinal stem cells based on surface marker combinations and colony-formation assay. *Gastroenterology*. 2013;145(2):383-95 e1-21.
4. Porichis F, Hart MG, Griesbeck M, Everett HL, Hassan M, Baxter AE, et al. High-throughput detection of miRNAs and gene-specific mRNA at the single-cell level by flow cytometry. *Nat Commun*. 2014;5:5641.
5. Gregg EC, Steidley KD. Electrical counting and sizing of mammalian cells in suspension. *Biophys J*. 1965;5(4):393-405.
6. McFarlin BK, Gary MA. Flow cytometry what you see matters: Enhanced clinical detection using image-based flow cytometry. *Methods*. 2017;112:1-8.
7. Comas-Riu J, Rius N. Flow cytometry applications in the food industry. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009;36(8):999-1011.
8. Dittrich W, Gohde W. [Impulse fluorometry of single cells in suspension]. *Z Naturforsch B*. 1969;24(3):360-1.
9. Crosland-Taylor PJ. A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature*. 1953;171(4340):37-8.
10. Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF, Coulter JR. Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. *Science*. 1969;163(3872):1213-4.
11. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018;120:5 1-5 1 11.
12. Dinter A, Berger EG. Golgi-disturbing agents. *Histochem Cell Biol*. 1998;109(5-6):571-90.
13. De Rosa SC, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Roederer M. 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nature medicine*. 2001;7(2):245-8.
14. De Rosa SC, Brenchley JM, Roederer M. Beyond six colors: a new era in flow cytometry. *Nature medicine*. 2003;9(1):112-7.
15. Jani IV, Janossy G, Brown DW, Mandy F. Multiplexed immunoassays by flow cytometry for diagnosis and surveillance of infectious diseases in resource-poor settings. *The Lancet Infectious diseases*. 2002;2(4):243-50.
16. Maciorowski Z, Chattopadhyay PK, Jain P. Basic Multicolor Flow Cytometry. *Curr Protoc Immunol*. 2017;117:5 4 1-5 4 38.
17. Bagwell CB, Adams EG. Fluorescence spectral overlap compensation for any number of flow cytometry parameters. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993;677:167-84.
18. Biosciences B. BD FACS DiVa Option.
19. Seeman NC. DNA enables nanoscale control of the structure of matter. *Quarterly reviews of biophysics*. 2005;38(4):363-71.
20. eBioscience. PrimeFlow RNA Assay Principle Web Page.

21. ThermoFisher Scientific PF, Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/search/results?persona=DocSupport&refinementSearch=true&navId=4294959582&query=primeflow> , zitiert am 12.03.2019. PrimeFlow Frequently Asked Questions.
22. Urdea MS, Horn T, Fultz TJ, Anderson M, Running JA, Hamren S, et al. Branched DNA amplification multimers for the sensitive, direct detection of human hepatitis viruses. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1991(24):197-200.
23. Schuerwegh AJ, Stevens WJ, Bridts CH, De Clerck LS. Evaluation of monensin and brefeldin A for flow cytometric determination of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes. *Cytometry.* 2001;46(3):172-6.
24. eBioscience. PrimeFlow RNA Assay Youtube Video.
25. Henning AL, Sampson JN, McFarlin BK. Measurement of Low-Abundance Intracellular mRNA Using Amplified FISH Staining and Image-Based Flow Cytometry. *Curr Protoc Cytom.* 2016;76:7 46 1-8.
26. Zhang W, Svensson Akusjarvi S, Sonnerborg A, Neogi U. Characterization of Inducible Transcription and Translation-Competent HIV-1 Using the RNAscope ISH Technology at a Single-Cell Resolution. *Front Microbiol.* 2018;9:2358.
27. Grau-Exposito J, Serra-Peinado C, Miguel L, Navarro J, Curran A, Burgos J, et al. A Novel Single-Cell FISH-Flow Assay Identifies Effector Memory CD4(+) T cells as a Major Niche for HIV-1 Transcription in HIV-Infected Patients. *MBio.* 2017;8(4).
28. McDonald EM, Duggal NK, Ritter JM, Brault AC. Infection of epididymal epithelial cells and leukocytes drives seminal shedding of Zika virus in a mouse model. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(8):e0006691.
29. Venable AS, Henning AL, Prado EA, McFarlin BK. Using Image-Based Flow Cytometry with a FISH-Based FlowRNA Assay to Simultaneously Detect Intracellular TNF-alpha Protein and mRNA in Monocytes Following LPS Stimulation. *Methods Mol Biol.* 2016;1389:139-51.
30. Henning AL, Levitt DE, Vingren JL, McFarlin BK. Measurement of T-Cell Telomere Length Using Amplified-Signal FISH Staining and Flow Cytometry. *Curr Protoc Cytom.* 2017;79:7 47 1-7 10.
31. Henning AL, McFarlin BK. Consumption of a high-fat, high-calorie meal is associated with an increase in intracellular co-localization of PPAR-gamma mRNA and protein in monocytes. *Methods.* 2017;112:182-7.
32. Mullis KB. Process for amplifying, detecting, and/or-cloning nucleic acid sequences 1986 [Available from: <http://www.google.co.jp/patents/US4683195>].
33. Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *The Journal of clinical investigation.* 1960;39:1157-75.
34. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clinical chemistry.* 2005;51(12):2415-8.
35. Wide P. Radioimmunoassay of proteins with the use of Sephadex-coupled antibodies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 1966;130(1):257-60.
36. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 1971;8(9):871-4.
37. Van Weemen BK, Schuurs AH. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS letters.* 1971;15(3):232-6.
38. Cohnheim J. Ueber Entzündung und Eiterung. *Path Anat Physiol Klin Med.* 1867(40):1.
39. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic

- tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974;17(4):331-40.
40. Friedenstein AJ, Ivanov-Smolenski AA, Chajlakjan RK, Gorskaya UF, Kuralesova AI, Latzinik NW, et al. Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants. *Experimental hematology*. 1978;6(5):440-4.
41. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell and tissue kinetics*. 1987;20(3):263-72.
42. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276(5309):71-4.
43. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.
44. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Experimental hematology*. 2000;28(8):875-84.
45. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *Journal of translational medicine*. 2014;12:260.
46. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002;99(10):3838-43.
47. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004;103(12):4619-21.
48. Rafei M, Birman E, Forner K, Galipeau J. Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Ther*. 2009;17(10):1799-803.
49. Feng Y, Huang W, Wani M, Yu X, Ashraf M. Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of stem cells through secretion of exosomes by targeting Mecp2 via miR-22. *PLoS One*. 2014;9(2):e88685.
50. Bader AM, Klose K, Bieback K, Korinth D, Schneider M, Seifert M, et al. Hypoxic Preconditioning Increases Survival and Pro-Angiogenic Capacity of Human Cord Blood Mesenchymal Stromal Cells In Vitro. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138477.
51. Murray IR, Corselli M, Petrigliano FA, Soo C, Peault B. Recent insights into the identity of mesenchymal stem cells: Implications for orthopaedic applications. *Bone Joint J*. 2014;96-B(3):291-8.
52. Vangsnest CT, Jr., Sternberg H, Harris L. Umbilical Cord Tissue Offers the Greatest Number of Harvestable Mesenchymal Stem Cells for Research and Clinical Application: A Literature Review of Different Harvest Sites. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. 2015;31(9):1836-43.
53. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant*. 2016;25(5):829-48.
54. Bieback K, Kern S, Kocaomer A, Ferlik K, Bugert P. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Bio-medical materials and engineering*. 2008;18(1 Suppl):S71-6.
55. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells*. 2006;24(5):1294-301.

56. Hass R, Kasper C, Bohm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 2011;9:12.
57. Barlow S, Brooke G, Chatterjee K, Price G, Pelekanos R, Rossetti T, et al. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008;17(6):1095-107.
58. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem cells*. 2004;22(7):1338-45.
59. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
60. Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem cells*. 2010;28(4):788-98.
61. Wang CM, Guo Z, Xie YJ, Hao YY, Sun JM, Gu J, et al. Co-treating mesenchymal stem cells with IL1beta and TNF-alpha increases VCAM-1 expression and improves post-ischemic myocardial function. *Mol Med Rep*. 2014;10(2):792-8.
62. Du W, Li X, Chi Y, Ma F, Li Z, Yang S, et al. VCAM-1+ placenta chorionic villi-derived mesenchymal stem cells display potent pro-angiogenic activity. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7:49.
63. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone marrow transplantation*. 1995;16(4):557-64.
64. Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC, et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS One*. 2012;7(10):e47559.
65. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The Journal of pathology*. 2009;217(2):318-24.
66. Lebouvier A, Poignard A, Cavet M, Amiaud J, Leotot J, Hernigou P, et al. Development of a simple procedure for the treatment of femoral head osteonecrosis with intra-osseous injection of bone marrow mesenchymal stromal cells: study of their biodistribution in the early time points after injection. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:68.
67. Pers YM, Rackwitz L, Ferreira R, Pullig O, Delfour C, Barry F, et al. Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(7):847-56.
68. Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonne A, Delorme B, Herault O, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem cells*. 2007;25(7):1737-45.
69. Si X, Liu X, Li J, Wu X. Transforming growth factor-beta1 promotes homing of bone marrow mesenchymal stem cells in renal ischemia-reperfusion injury. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(10):12368-78.
70. Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion*. 2014;54(5):1418-37.

71. Burst VR, Gillis M, Putsch F, Herzog R, Fischer JH, Heid P, et al. Poor cell survival limits the beneficial impact of mesenchymal stem cell transplantation on acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol*. 2010;114(3):e107-16.
72. Hoffman AM, Paxson JA, Mazan MR, Davis AM, Tyagi S, Murthy S, et al. Lung-derived mesenchymal stromal cell post-transplantation survival, persistence, paracrine expression, and repair of elastase-injured lung. *Stem Cells Dev*. 2011;20(10):1779-92.
73. Velander P, Theopold C, Hirsch T, Bleiziffer O, Zuhaili B, Fossum M, et al. Impaired wound healing in an acute diabetic pig model and the effects of local hyperglycemia. *Wound Repair Regen*. 2008;16(2):288-93.
74. Stolzing A, Bauer E, Scutt A. Suspension cultures of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: effects of donor age and glucose level. *Stem Cells Dev*. 2012;21(14):2718-23.
75. Cramer C, Freisinger E, Jones RK, Slakey DP, Dupin CL, Newsome ER, et al. Persistent high glucose concentrations alter the regenerative potential of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2010;19(12):1875-84.
76. Dhanasekaran M, Indumathi S, Rajkumar JS, Sudarsanam D. Effect of high glucose on extensive culturing of mesenchymal stem cells derived from subcutaneous fat, omentum fat and bone marrow. *Cell Biochem Funct*. 2013;31(1):20-9.
77. Li YM, Schilling T, Benisch P, Zeck S, Meissner-Weigl J, Schneider D, et al. Effects of high glucose on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;363(1):209-15.
78. Weil BR, Abarbanell AM, Herrmann JL, Wang Y, Meldrum DR. High glucose concentration in cell culture medium does not acutely affect human mesenchymal stem cell growth factor production or proliferation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296(6):R1735-43.
79. Keats E, Khan ZA. Unique responses of stem cell-derived vascular endothelial and mesenchymal cells to high levels of glucose. *PLoS One*. 2012;7(6):e38752.
80. Aguiari P, Leo S, Zavan B, Vindigni V, Rimessi A, Bianchi K, et al. High glucose induces adipogenic differentiation of muscle-derived stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(4):1226-31.
81. Bank JR, Rabelink TJ, de Fijter JW, Reinders ME. Safety and Efficacy Endpoints for Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Renal Transplant Recipients. *J Immunol Res*. 2015;2015:391797.
82. Alagesan S, Griffin MD. Autologous and allogeneic mesenchymal stem cells in organ transplantation: what do we know about their safety and efficacy? *Curr Opin Organ Transplant*. 2014;19(1):65-72.
83. Bernardo ME, Fibbe WE. Safety and efficacy of mesenchymal stromal cell therapy in autoimmune disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1266:107-17.
84. Vogel G. Cell biology. To scientists' dismay, mixed-up cell lines strike again. *Science*. 2010;329(5995):1004.
85. Torsvik A, Rosland GV, Svendsen A, Molven A, Immervoll H, McCormack E, et al. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. *Cancer Res*. 2010;70(15):6393-6.
86. Moll G, Rasmusson-Duprez I, von Bahr L, Connolly-Andersen AM, Elgue G, Funke L, et al. Are therapeutic human mesenchymal stromal cells compatible with human blood? *Stem cells*. 2012;30(7):1565-74.
87. Furlani D, Ugurlucan M, Ong L, Bieback K, Pittermann E, Westien I, et al. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. *Microvascular research*. 2009;77(3):370-6.

88. Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD. Intracoronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet*. 2004;363(9411):783-4.
89. Netsch P, Elvers-Hornung S, Uhlig S, Kluter H, Huck V, Kirschhofer F, et al. Human mesenchymal stromal cells inhibit platelet activation and aggregation involving CD73-converted adenosine. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):184.
90. Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol*. 2014;32(3):252-60.
91. Zangi L, Margalit R, Reich-Zeliger S, Bachar-Lustig E, Beilhack A, Negrin R, et al. Direct imaging of immune rejection and memory induction by allogeneic mesenchymal stromal cells. *Stem cells*. 2009;27(11):2865-74.
92. de Mare-Bredemeijer EL, Mancham S, Verstegen MM, de Ruiter PE, van Gent R, O'Neill D, et al. Human graft-derived mesenchymal stromal cells potently suppress alloreactive T-cell responses. *Stem Cells Dev*. 2015;24(12):1436-47.
93. Giuliani M, Fleury M, Vernochet A, Ketrroussi F, Clay D, Azzarone B, et al. Long-lasting inhibitory effects of fetal liver mesenchymal stem cells on T-lymphocyte proliferation. *PLoS One*. 2011;6(5):e19988.
94. Akiyama K, Chen C, Wang D, Xu X, Qu C, Yamaza T, et al. Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell*. 2012;10(5):544-55.
95. Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol*. 2010;184(5):2321-8.
96. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem cells*. 2010;28(3):585-96.
97. Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:563-91.
98. Young HA. Regulation of interferon-gamma gene expression. *Journal of Interferon & Cytokine Research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 1996;16(8):563-8.
99. Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, et al. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol*. 1999;163(9):4647-50.
100. Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends in immunology*. 2001;22(10):556-60.
101. Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, et al. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol*. 1998;161(7):3400-7.
102. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:749-95.
103. Dick TP, Ruppert T, Groettrup M, Kloetzel PM, Kuehn L, Koszinowski UH, et al. Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell*. 1996;86(2):253-62.
104. Groettrup M, Soza A, Eggers M, Kuehn L, Dick TP, Schild H, et al. A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature*. 1996;381(6578):166-8.
105. Groettrup M, Khan S, Schwarz K, Schmidtke G. Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why? *Biochimie*. 2001;83(3-4):367-72.

106. Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Groszpiere B, Mach B. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science*. 1994;265(5168):106-9.
107. Najar M, Raicevic G, Boufker HI, Fayyad Kazan H, De Bruyn C, Meuleman N, et al. Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cell Immunol*. 2010;264(2):171-9.
108. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-22.
109. Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*. 2007;149(2):353-63.
110. Hong J, Hueckelhoven A, Wang L, Schmitt A, Wuchter P, Tabarkiewicz J, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates inhibition of virus-specific CD8(+) T cell proliferation by human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2016;18(5):621-9.
111. Mattar P, Bieback K. Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. *Frontiers in immunology*. 2015;6:560.
112. Castro-Manrreza ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *J Immunol Res*. 2015;2015:394917.
113. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008;2(2):141-50.
114. Nasef A, Mazurier C, Bouchet S, Francois S, Chapel A, Thierry D, et al. Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cell Immunol*. 2008;253(1-2):16-22.
115. Najar M, Raicevic G, Crompton E, Fayyad-Kazan H, Bron D, Toungouz M, et al. The Immunomodulatory Potential of Mesenchymal Stromal Cells: A Story of a Regulatory Network. *J Immunother*. 2016;39(2):45-59.
116. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:77-89.
117. Wadle S, Lehnert M, Rubenwolf S, Zengerle R, von Stetten F. Real-time PCR probe optimization using design of experiments approach. *Biomol Detect Quantif*. 2016;7:1-8.
118. Chapman JR, Waldenstrom J. With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. *PLoS One*. 2015;10(11):e0141853.
119. Boyer C, Auphan N, Gabert J, Blanc D, Malissen B, Schmitt-Verhulst AM. Comparison of phosphorylation and internalization of the antigen receptor/CD3 complex, CD8, and class I MHC-encoded proteins on T cells. Role of intracytoplasmic domains analyzed with hybrid CD8/class I molecules. *J Immunol*. 1989;143(6):1905-14.
120. Yamane Y, Perez M, Edelson R, Agostino N, Pernis B. Endocytosis of the TCR/CD3 complex and the class-I major histocompatibility complex in a human T cell line. *Cell Immunol*. 1991;136(2):496-503.
121. Pelchen-Matthews A, Parsons IJ, Marsh M. Phorbol ester-induced downregulation of CD4 is a multistep process involving dissociation from p56lck, increased association with clathrin-coated pits, and altered endosomal sorting. *J Exp Med*. 1993;178(4):1209-22.

122. Bieback K, Hecker A, Schlechter T, Hofmann I, Brousos N, Redmer T, et al. Replicative aging and differentiation potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells expanded in pooled human or fetal bovine serum. *Cytotherapy*. 2012;14(5):570-83.
123. Gouveia de Andrade AV, Bertolino G, Riewaldt J, Bieback K, Karbanova J, Odendahl M, et al. Extracellular vesicles secreted by bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells fail to suppress lymphocyte proliferation. *Stem Cells Dev*. 2015;24(11):1374-6.
124. Kerner W, Bruckel J, German Diabetes A. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014;122(7):384-6.
125. Wernly B, Lichtenauer M, Hoppe UC, Jung C. Hyperglycemia in septic patients: an essential stress survival response in all, a robust marker for risk stratification in some, to be messed with in none. *J Thorac Dis*. 2016;8(7):E621-4.
126. Bigby M, Wang P, Fierro JF, Sy MS. Phorbol myristate acetate-induced down-modulation of CD4 is dependent on calmodulin and intracellular calcium. *J Immunol*. 1990;144(8):3111-6.
127. Franek KJ, Wolcott RM, Chervenak R. Reliable method for the simultaneous detection of cytoplasmic and surface CD3 epsilon expression by murine lymphoid cells. *Cytometry*. 1994;17(3):224-36.
128. Ledderose C, Heyn J, Limbeck E, Kreth S. Selection of reliable reference genes for quantitative real-time PCR in human T cells and neutrophils. *BMC Res Notes*. 2011;4:427.
129. Banda M, Bommineni A, Thomas RA, Luckinbill LS, Tucker JD. Evaluation and validation of housekeeping genes in response to ionizing radiation and chemical exposure for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Mutat Res*. 2008;649(1-2):126-34.
130. Depreter B, Philippe J, Meul M, Denys B, Vandepoele K, De Moerloose B, et al. Cancer-related mRNA expression analysis using a novel flow cytometry-based assay. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018;94(4):565-75.
131. Muris AH, Damoiseaux J, Smolders J, Cohen Tervaert JW, Hupperts R, Thewissen M. Intracellular IL-10 detection in T cells by flowcytometry: the use of protein transport inhibitors revisited. *J Immunol Methods*. 2012;381(1-2):59-65.
132. Grutz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol*. 2005;77(1):3-15.
133. Nylander S, Kalies I, Brefeldin A, but not monensin, completely blocks CD69 expression on mouse lymphocytes: efficacy of inhibitors of protein secretion in protocols for intracellular cytokine staining by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1999;224(1-2):69-76.
134. Caraher EM, Parenteau M, Gruber H, Scott FW. Flow cytometric analysis of intracellular IFN-gamma, IL-4 and IL-10 in CD3(+)4(+) T-cells from rat spleen. *J Immunol Methods*. 2000;244(1-2):29-40.
135. Oku M, Tanakura S, Uemura A, Sohda M, Misumi Y, Taniguchi M, et al. Novel cis-acting element GASE regulates transcriptional induction by the Golgi stress response. *Cell Struct Funct*. 2011;36(1):1-12.
136. Shinjo S, Mizotani Y, Tashiro E, Imoto M. Comparative analysis of the expression patterns of UPR-target genes caused by UPR-inducing compounds. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013;77(4):729-35.
137. Hu P, Han Z, Couvillon AD, Kaufman RJ, Exton JH. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol*. 2006;26(8):3071-84.

138. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:141-79.
139. Lin Y, Jamison S, Lin W. Interferon-gamma activates nuclear factor-kappa B in oligodendrocytes through a process mediated by the unfolded protein response. *PLoS One.* 2012;7(5):e36408.
140. Feng Y, Ding J, Fan CM, Zhu P. Interferon-gamma contributes to HLA-B27-associated unfolded protein response in spondyloarthropathies. *J Rheumatol.* 2012;39(3):574-82.
141. Chardin P, McCormick F. Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell.* 1999;97(2):153-5.
142. Vicetti Miguel RD, Maryak SA, Cherpes TL. Brefeldin A, but not monensin, enables flow cytometric detection of interleukin-4 within peripheral T cells responding to ex vivo stimulation with *Chlamydia trachomatis*. *J Immunol Methods.* 2012;384(1-2):191-5.
143. Hardy KJ, Sawada T. Human gamma interferon strongly upregulates its own gene expression in peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med.* 1989;170(3):1021-6.
144. Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J Immunol.* 1998;160(12):5936-44.
145. Lederer JA, Perez VL, DesRoches L, Kim SM, Abbas AK, Lichtman AH. Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation. *J Exp Med.* 1996;184(2):397-406.
146. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:251-76.
147. Yoshida A, Koide Y, Uchijima M, Yoshida TO. IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;198(3):857-61.
148. Bach EA, Szabo SJ, Dighe AS, Ashkenazi A, Aguet M, Murphy KM, et al. Ligand-induced autoregulation of IFN-gamma receptor beta chain expression in T helper cell subsets. *Science.* 1995;270(5239):1215-8.
149. Trilling M, Bellora N, Rutkowski AJ, de Graaf M, Dickinson P, Robertson K, et al. Deciphering the modulation of gene expression by type I and II interferons combining 4sU-tagging, translational arrest and in silico promoter analysis. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(17):8107-25.
150. Darmanis S, Gallant CJ, Marinescu VD, Niklasson M, Segerman A, Flamourakis G, et al. Simultaneous Multiplexed Measurement of RNA and Proteins in Single Cells. *Cell Rep.* 2016;14(2):380-9.
151. Halminen M, Klemetti P, Vaarala O, Hurme M, Ilonen J. Interferon-gamma production in antigen specific T cell response: quantitation of specific mRNA and secreted protein. *Scand J Immunol.* 1997;46(4):388-92.
152. Gry M, Rimini R, Stromberg S, Asplund A, Ponten F, Uhlen M, et al. Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC Genomics.* 2009;10:365.
153. Shebl FM, Pinto LA, Garcia-Pineros A, Lempicki R, Williams M, Harro C, et al. Comparison of mRNA and protein measures of cytokines following vaccination with human papillomavirus-16 L1 virus-like particles. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(4):978-81.
154. Favre N, Bordmann G, Rudin W. Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT and semi-quantitative RT-PCR. *J Immunol Methods.* 1997;204(1):57-66.

155. Espel E, Garcia-Sanz JA, Aubert V, Menoud V, Sperisen P, Fernandez N, et al. Transcriptional and translational control of TNF-alpha gene expression in human monocytes by major histocompatibility complex class II ligands. *Eur J Immunol.* 1996;26(10):2417-24.
156. Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell.* 1995;83(5):793-802.
157. Cuerquis J, Romieu-Mourez R, Francois M, Routy JP, Young YK, Zhao J, et al. Human mesenchymal stromal cells transiently increase cytokine production by activated T cells before suppressing T-cell proliferation: effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha stimulation. *Cytotherapy.* 2014;16(2):191-202.
158. Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol.* 2005;15(3):331-41.
159. Vasudevan S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2012;3(3):311-30.
160. Yin LB, Song CB, Zheng JF, Fu YJ, Qian S, Jiang YJ, et al. Elevated Expression of miR-19b Enhances CD8(+) T Cell Function by Targeting PTEN in HIV Infected Long Term Non-progressors With Sustained Viral Suppression. *Frontiers in immunology.* 2018;9:3140.
161. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle.* 2008;7(11):1545-9.
162. Yusuf I, Fruman DA. Regulation of quiescence in lymphocytes. *Trends in immunology.* 2003;24(7):380-6.
163. Collier HA, Sang L, Roberts JM. A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol.* 2006;4(3):e83.
164. Vellasamy S, Tong CK, Azhar NA, Kodiappan R, Chan SC, Veerakumarasivam A, et al. Human mesenchymal stromal cells modulate T-cell immune response via transcriptomic regulation. *Cytotherapy.* 2016;18(10):1270-83.
165. Poltavtsev AM, Poltavtseva RA, Yushina MN, Pavlovich SV, Svirshchevskaya EV. Proliferation of Peripheral Blood Lymphocytes and Mesenchymal Stromal Cells Derived from Wharton's Jelly in Mixed and Membrane-Separated Cultures. *Bull Exp Biol Med.* 2017;163(4):542-9.
166. Chatila T, Silverman L, Miller R, Geha R. Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol.* 1989;143(4):1283-9.
167. Touraine JL, Hadden JW, Touraine F, Hadden EM, Estensen R, Good RA. Phorbol myristate acetate: a mitogen selective for a T-lymphocyte subpopulation. *J Exp Med.* 1977;145(2):460-5.
168. Kronsteiner B, Wolbank S, Peterbauer A, Hackl C, Redl H, van Griensven M, et al. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue and amnion influence T-cells depending on stimulation method and presence of other immune cells. *Stem Cells Dev.* 2011;20(12):2115-26.
169. Thomas H, Jager M, Mauel K, Brandau S, Lask S, Flohe SB. Interaction with mesenchymal stem cells provokes natural killer cells for enhanced IL-12/IL-18-induced interferon-gamma secretion. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:143463.
170. Kang JW, Koo HC, Hwang SY, Kang SK, Ra JC, Lee MH, et al. Immunomodulatory effects of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Sci.* 2012;13(1):23-31.
171. Conforti A, Scarsella M, Starc N, Giorda E, Biagini S, Proia A, et al. Microvesicles derived from mesenchymal stromal cells are not as effective as their cellular counterpart in the ability to modulate immune responses in vitro. *Stem Cells Dev.* 2014;23(21):2591-9.

172. Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, Barbosa MA, Almeida-Porada G, Goncalves RM. Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Pre-conditioning. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2837.
173. Kang HS, Habib M, Chan J, Abavana C, Potian JA, Ponzio NM, et al. A paradoxical role for IFN-gamma in the immune properties of mesenchymal stem cells during viral challenge. *Experimental hematology*. 2005;33(7):796-803.
174. Reen DJ. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Methods Mol Biol*. 1994;32:461-6.
175. Butler JE. Enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunoassay*. 2000;21(2-3):165-209.
176. Jorgensen CS, Hansen KB, Jacobsen S, Halberg P, Ullman S, Hansen D, et al. Absence of high-affinity calreticulin autoantibodies in patients with systemic rheumatic diseases and coeliac disease. *Scand J Clin Lab Invest*. 2005;65(5):403-12.
177. Peterfi Z, Kocsis B. Comparison of blocking agents for an ELISA for LPS. *J Immunoassay*. 2000;21(4):341-54.
178. Xiao Y, Isaacs SN. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and blocking with bovine serum albumin (BSA)--not all BSAs are alike. *J Immunol Methods*. 2012;384(1-2):148-51.
179. Borg L, Kristiansen J, Christensen JM, Jepsen KF, Poulsen LK. Evaluation of accuracy and uncertainty of ELISA assays for the determination of interleukin-4, interleukin-5, interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(5):509-19.
180. Ruiz M, Cosenza S, Maumus M, Jorgensen C, Noel D. Therapeutic application of mesenchymal stem cells in osteoarthritis. *Expert Opin Biol Ther*. 2016;16(1):33-42.
181. Kim J, Shapiro L, Flynn A. The clinical application of mesenchymal stem cells and cardiac stem cells as a therapy for cardiovascular disease. *Pharmacol Ther*. 2015;151:8-15.
182. Wang LT, Ting CH, Yen ML, Liu KJ, Sytwu HK, Wu KK, et al. Human mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment towards immune- and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials. *J Biomed Sci*. 2016;23(1):76.
183. Zheng GP, Ge MH, Shu Q, Rojas M, Xu J. Mesenchymal stem cells in the treatment of pediatric diseases. *World J Pediatr*. 2013;9(3):197-211.
184. Galipeau J. The mesenchymal stromal cells dilemma--does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road? *Cytotherapy*. 2013;15(1):2-8.
185. Tyndall A. Mesenchymal stem cell treatments in rheumatology: a glass half full? *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(2):117-24.
186. Polsky S, Ellis SL. Obesity, insulin resistance, and type 1 diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2015;22(4):277-82.
187. Pandey A, Chawla S, Guchhait P. Type-2 diabetes: Current understanding and future perspectives. *IUBMB Life*. 2015;67(7):506-13.
188. Ryu JM, Lee MY, Yun SP, Han HJ. High glucose regulates cyclin D1/E of human mesenchymal stem cells through TGF-beta1 expression via Ca2+/PKC/MAPKs and PI3K/Akt/mTOR signal pathways. *J Cell Physiol*. 2010;224(1):59-70.
189. Balint E, Szabo P, Marshall CF, Sprague SM. Glucose-induced inhibition of in vitro bone mineralization. *Bone*. 2001;28(1):21-8.
190. Nawrocka D, Kornicka K, Szydlarska J, Marycz K. Corrigendum to "Basic Fibroblast Growth Factor Inhibits Apoptosis and Promotes Proliferation of Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Isolated from Patients with Type 2 Diabetes by Reducing Cellular Oxidative Stress". *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1083618.

191. Cheng NC, Hsieh TY, Lai HS, Young TH. High glucose-induced reactive oxygen species generation promotes stemness in human adipose-derived stem cells. *Cytotherapy*. 2016;18(3):371-83.
192. Liu Y, Li Z, Liu T, Xue X, Jiang H, Huang J, et al. Impaired cardioprotective function of transplantation of mesenchymal stem cells from patients with diabetes mellitus to rats with experimentally induced myocardial infarction. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:40.
193. Koci Z, Turnovcova K, Dubsy M, Baranovicova L, Holan V, Chudickova M, et al. Characterization of human adipose tissue-derived stromal cells isolated from diabetic patient's distal limbs with critical ischemia. *Cell Biochem Funct*. 2014;32(7):597-604.
194. Liu Q, Hu CH, Zhou CH, Cui XX, Yang K, Deng C, et al. DKK1 rescues osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from periodontal ligaments of patients with diabetes mellitus induced periodontitis. *Sci Rep*. 2015;5:13142.
195. Lafosse A, Dufey C, Beauloye C, Horman S, Dufrane D. Impact of Hyperglycemia and Low Oxygen Tension on Adipose-Derived Stem Cells Compared with Dermal Fibroblasts and Keratinocytes: Importance for Wound Healing in Type 2 Diabetes. *PLoS One*. 2016;11(12):e0168058.
196. Gu JH, Lee JS, Kim DW, Yoon ES, Dhong ES. Neovascular potential of adipose-derived stromal cells (ASCs) from diabetic patients. *Wound Repair Regen*. 2012;20(2):243-52.
197. Policha A, Zhang P, Chang L, Lamb K, Tulenko T, DiMuzio P. Endothelial differentiation of diabetic adipose-derived stem cells. *J Surg Res*. 2014;192(2):656-63.
198. Davies LC, Alm JJ, Heldring N, Moll G, Gavin C, Batsis I, et al. Type 1 Diabetes Mellitus Donor Mesenchymal Stromal Cells Exhibit Comparable Potency to Healthy Controls In Vitro. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(11):1485-95.
199. de Lima KA, de Oliveira GL, Yaochite JN, Pinheiro DG, de Azevedo JT, Silva WA, Jr., et al. Transcriptional profiling reveals intrinsic mRNA alterations in multipotent mesenchymal stromal cells isolated from bone marrow of newly-diagnosed type 1 diabetes patients. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):92.
200. Phadnis SM, Ghaskadbi SM, Hardikar AA, Bhonde RR. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow of diabetic patients portrait unique markers influenced by the diabetic microenvironment. *Rev Diabet Stud*. 2009;6(4):260-70.
201. Dentelli P, Barale C, Togliatto G, Trombetta A, Olgasi C, Gili M, et al. A diabetic milieu promotes OCT4 and NANOG production in human visceral-derived adipose stem cells. *Diabetologia*. 2013;56(1):173-84.
202. Boland L, Burand AJ, Brown AJ, Boyt D, Lira VA, Ankrum JA. IFN-gamma and TNF-alpha Pre-licensing Protects Mesenchymal Stromal Cells from the Pro-inflammatory Effects of Palmitate. *Mol Ther*. 2018;26(3):860-73.
203. Yaochite JN, de Lima KW, Caliari-Oliveira C, Palma PV, Couri CE, Simoes BP, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells from patients with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus exhibit preserved in vitro and in vivo immunomodulatory properties. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7:14.
204. Serena C, Keiran N, Ceperuelo-Mallafre V, Ejarque M, Fradera R, Roche K, et al. Obesity and Type 2 Diabetes Alters the Immune Properties of Human Adipose Derived Stem Cells. *Stem cells*. 2016;34(10):2559-73.
205. Mahmoud M, Abu-Shahba N, Azmy O, El-Badri N. Impact of Diabetes Mellitus on Human Mesenchymal Stromal Cell Biology and Functionality: Implications for Autologous Transplantation. *Stem Cell Rev*. 2019.

206. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells*. 2006;24(2):386-98.
207. Sheng H, Wang Y, Jin Y, Zhang Q, Zhang Y, Wang L, et al. A critical role of IFN-gamma in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res*. 2008;18(8):846-57.
208. Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, et al. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol*. 2008;38(6):1745-55.
209. Gieseke F, Schutt B, Viebahn S, Koscielniak E, Friedrich W, Handgretinger R, et al. Human multipotent mesenchymal stromal cells inhibit proliferation of PBMCs independently of IFN-gammaR1 signaling and IDO expression. *Blood*. 2007;110(6):2197-200.
210. Bieback K, Kinzschbach S, Karagianni M. Translating research into clinical scale manufacturing of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Int*. 2011;2010:193519.
211. Bieback K, Schallmoser K, Kluter H, Strunk D. Clinical Protocols for the Isolation and Expansion of Mesenchymal Stromal Cells. *Transfus Med Hemother*. 2008;35(4):286-94.
212. Patel SR, Copland IB, Garcia MA, Metz R, Galipeau J. Human mesenchymal stromal cells suppress T-cell proliferation independent of heme oxygenase-1. *Cytotherapy*. 2015;17(4):382-91.
213. Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-inflammatory cytokines, IFN-gamma and TNF-alpha, influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One*. 2010;5(2):e9016.
214. Mancheno-Corvo P, Menta R, del Rio B, Franquesa M, Ramirez C, Hoogduijn MJ, et al. T Lymphocyte Prestimulation Impairs in a Time-Dependent Manner the Capacity of Adipose Mesenchymal Stem Cells to Inhibit Proliferation: Role of Interferon gamma, Poly I:C, and Tryptophan Metabolism in Restoring Adipose Mesenchymal Stem Cell Inhibitory Effect. *Stem Cells Dev*. 2015;24(18):2158-70.
215. Ciccocioppo R, Cangemi GC, Kruzliak P, Gallia A, Betti E, Badulli C, et al. Ex vivo immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells on Crohn's disease mucosal T cells are largely dependent on indoleamine 2,3-dioxygenase activity and cell-cell contact. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:137.
216. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*. 2007;96:41-101.
217. Bao Y, Liu X, Han C, Xu S, Xie B, Zhang Q, et al. Identification of IFN-gamma-producing innate B cells. *Cell Res*. 2014;24(2):161-76.
218. Gonzalez S, Beck L, Wilson N, Spiegelberg HL. Comparison of interferon-gamma and interleukin-4 production by peripheral blood mononuclear cells and isolated T cells after activation with polyclonal T cell activators. *J Clin Lab Anal*. 1994;8(5):277-83.
219. Godoy-Ramirez K, Franck K, Mahdavi S, Andersson L, Gaines H. Optimum culture conditions for specific and nonspecific activation of whole blood and PBMC for intracellular cytokine assessment by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2004;292(1-2):1-15.
220. Duijvestein M, Wildenberg ME, Welling MM, Hennink S, Molendijk I, van Zuylen VL, et al. Pretreatment with interferon-gamma enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. *Stem cells*. 2011;29(10):1549-58.

221. Rameshwar P. IFN γ and B7-H1 in the immunology of mesenchymal stem cells. *Cell Res.* 2008;18(8):805-6.
222. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol.* 2003;57(1):11-20.
223. Jones S, Horwood N, Cope A, Dazzi F. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J Immunol.* 2007;179(5):2824-31.

7 EIGENANTEIL AN DATENERHEBUNG UND –AUSWERTUNG UND EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

Diese Arbeit wurde am Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie (ITI) des Universitätsklinikums Mannheims durchgeführt. Sämtliche Daten der Experimente wurden von mir erhoben. Die Auswertung der Daten erfolgte ebenso vollständig durch mich.

Im Rahmen der Tätigkeit als Doktorand am ITI habe ich folgenden Artikel publiziert:

1. Mattar, P., Bieback, K. Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. *Frontiers in Immunology*. 2015;6:560.

Hierbei handelt es sich um einen Übersichtsartikel, welcher aktuelle Erkenntnisse über immunmodulatorische Fähigkeiten von mesenchymal stromalen Zellen aus verschiedenen Geweben und deren Effekte auf unterschiedliche Zellen des Immunsystems aufbereitet.

8 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Philipp Hanns Eike Mattar
Geburtsdatum: 14.10.1991
Geburtsort: Baden-Baden
Familienstand: Ledig
Vater: Dr. med. Johannes Michael Mattar
Mutter: Dr. med. Elvira Siglinde Mattar

SCHULISCHER WERDEGANG

2003 – 2010 Droste-Hülshoff-Gymnasium Meersburg
07/2010 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2011/12 Beginn des Studiums der Medizin
An der Universität Heidelberg Mannheim
12.09.2013 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
2013 – 2017 Hauptstudium
06.04.2017 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
13.11.2018 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)

9 DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. Karen Bieback danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten.

Besonderen Dank schulde ich Frau Stefanie Uhlig von der FlowCore Mannheim und dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie der Universität Heidelberg, die mir fachlich zur Seite stand, zum Verständnis vieler Quellen verhalf und mir wichtige sachliche Hinweise gab.

Ebenso danke ich Frau Susanne Elvers-Hornung vom Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie der Universität Heidelberg, die mir in vielen Belangen beratend geholfen hat.

Besonders dankbar bin ich Elli, Johannes und Thomas Mattar für die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen Hinweise, die zur Vollendung derselben notwendig waren.