



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Medizinische Fakultät Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

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

Autor: Philipp Mattar  
Institut / Klinik: Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie  
Doktormutter: Prof. Dr. Med Dr. rer. nat. K. Bieback

Angesichts der immer komplexer werdenden Bedingungen von Zellkulturexperimenten durch Kulturen aus mehr als zwei Zellpopulationen, 3D-Kulturen oder 3D-Miniorganen, besteht der Bedarf, in diesen Kulturen biologische Prozesse auf RNA und Proteinebene zu untersuchen und sie bestimmten Zellpopulationen zuordnen zu können.

Die vorliegende Dissertation hatte die Etablierung einer neuen Methode zum Ziel, die die mRNA Detektion auf Einzelzellebene mittels Durchflusszytometrie ermöglicht. Diese neue durchflusszytometrische Methode, der PrimeFlow RNA Assay, ermöglicht eine simultane Detektion spezifischer mRNA Transkripte, intrazellulären Proteinen, sowie zellulären Oberflächenmarkern. Damit lassen sich zelluläre Subpopulationen einer Probe identifizieren, die für bestimmte biologische Prozesse verantwortlich sind und distinkte Oberflächenmarker sowie mRNA- und Proteinexpressionsprofile aufweisen.

Zur Etablierung der Methode wurde diese in vergleichenden Untersuchungen mit den beiden bereits etablierten Methoden Polymerase Chain Reaction (PCR) und Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) angewendet. Nach erfolgreicher Etablierung wurde die Methode für die wissenschaftliche Fragestellung unserer Forschungsgruppe genutzt. Diese befasst sich mit mesenchymal stromalen Zellen, eine Zellpopulation, die Eigenschaften, wie beispielsweise multipotentes Differenzierungspotenzial, trophische Unterstützung beschädigter Gewebe und Immunmodulation besitzt und daher attraktives Ziel aktueller Forschung geworden ist.

Es wurden die immunmodulatorischen Fähigkeiten der mesenchymal stromalen Zellen anhand der Fähigkeit, Interferon gamma, ein inflammatorisches Zytokin, in stimulierten peripheren mononukleären Blutzellen zu supprimieren, mit allen drei Methoden vergleichend untersucht. Dabei wiesen PrimeFlow RNA Assay und PCR Ergebnisse auf, 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. Zusätzlich wurde der Einfluss hoher Glucosekonzentrationen auf die Immunmodulation der mesenchymal stromalen Zellen untersucht. Hierbei konnte kein eindeutig hemmender Effekt beobachtet werden.

In der Etablierung des PrimeFlow Assays zeigten sich methodische Probleme bei der Markierung der Oberflächenmarker und der Expression eines Haushaltsgens unter Stimulation. Nicht alle ließen sich suffizient lösen. Die überraschend widersprüchlichen Ergebnisse aus ELISA Versuchen werden aufgrund korrelierender Daten aus PCR und PrimeFlow RNA Assay und vorliegender Literatur als primär methodenimmanentes Problem angesehen und erklärt. Zudem wiesen die für die Durchflusszytometrie eingesetzten Proteintransportinhibitoren deutliche Einflüsse auf die Interferon gamma mRNA Expression der peripheren mononukleären Blutzellen auf. Diese beobachteten Effekte sollten bei der Konzeption und Interpretation von Versuchen unbedingt bedacht werden.

Der PrimeFlow Assay stellt, trotz beobachteter Schwierigkeiten, eine einzigartige Methode dar, die mittels Multiplex Analysen unterschiedlicher Parameter auf Einzelzellebene die Identifikation von Subpopulationen mit distinktem Expressionsprofil ermöglicht und mit hohem Durchsatz kombiniert. Wir freuen uns, den PrimeFlow RNA Assay zukünftig in unserer FlowCore Abteilung anbieten zu können und sehen die Methode als einen Schritt in Richtung eines besseren Verständnisses komplexer Zellpopulationen und zellulärer Interaktionen an.