

**Schätzung der absoluten Anzahl von
Alveolarepithelzellen Typ 2 in Mauslungen:
Ein Vergleich zwischen Stereologie und
Durchflusszytometrie**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von **Dzhuraev, Georgy**
aus Moskau, Russische Föderation

Gießen (2020)

Aus dem
Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Die experimentellen Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden durchgeführt am
Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim
Abteilung: Entwicklung und Umbau der Lunge
Direktor: Prof. Dr. Werner Seeger

Gutachter: Prof. Dr. Werner Seeger

Gutachter: PD Dr. Ahlemeyer

Tag der Disputation: 17.12.2020

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Absolute <i>versus</i> relative Zellzahlen.....	1
1.2	Stereologie.....	3
1.2.1	Allgemeines.....	3
1.2.2	Probenauswahl (<i>Sampling</i>).....	3
1.2.3	Strukturparameter und Messverfahren (geometrische Testsysteme).....	4
1.2.4	<i>Disector</i>	5
1.2.5	<i>Fractionator</i>	7
1.2.6	Erwartungstreue und Präzision.....	8
1.3	Durchflusszytometrie.....	9
1.3.1	Allgemeines.....	9
1.3.2	Zähl-Beads.....	10
1.4	Zielsetzung.....	11
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Material.....	12
2.1.1	Chemikalien.....	12
2.1.2	Chemische Zusammensetzungen.....	13
2.1.3	Antikörper, Farbstoffe und Beads.....	15
2.1.4	Geräte und Instrumente.....	16
2.1.5	Verwendete Software.....	18
2.2	Methoden.....	19
2.2.1	Versuchstiere und Zellen.....	19
2.2.2	Stereologie.....	19
2.2.2.1	Gewinnung und Verarbeitung des Lungengewebes.....	19
2.2.2.2	<i>Physical Fractionator</i> : Probenauswahl (<i>Sampling</i>) und Zählung von Alveolarepithelzellen Typ 2.....	20

2.2.2.3	Schätzung der absoluten Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 durch die Stereologie.....	23
2.2.3	Immunhistochemische Färbung der Paraffinschnitte	24
2.2.4	Anfertigung von Gefrierschnitten und Immunfluoreszenzfärbung für die Kolokalisation zwischen der pro-Surfactant Protein C-Färbung und dem <i>Yellow Fluorescent Protein</i> der <i>Sftpc</i> -YFP Mäuse	26
2.2.5	Durchflusszytometrie.....	27
2.2.5.1	Basisprotokoll für die Durchflusszytometrie.....	27
2.2.5.2	Protokoll für die C57BL/6J Mäuse.....	29
2.2.5.3	Protokoll für die <i>Sftpc</i> -YFP Mäuse	30
2.2.5.4	Schätzung der absoluten Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 durch die Durchflusszytometrie	32
2.2.5.5	Kolokalisation zwischen der pro-Surfactant Protein C-Färbung und dem <i>Yellow Fluorescent Protein</i> der <i>Sftpc</i> -YFP Mäuse.....	32
2.2.5.6	Validierung der Beads-Zählmethode.....	33
2.2.6	Zytospin-Experiment zur Validierung der Herstellung von Einzelzellsuspensionen	33
2.2.7	Statistische Analysen	34
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Hauptergebnisse.....	35
3.1.1	Schätzung der absoluten Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 in Mauslungen durch die Stereologie	35
3.1.2	Schätzung der absoluten Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 in C57BL/6J Mauslungen durch die Durchflusszytometrie	37
3.1.3	Absolute Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 in C57BL/6J Mauslungen: Vergleich zwischen Stereologie und Durchflusszytometrie	38
3.1.4	Schätzung der absoluten Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 in <i>Sftpc</i> -YFP Mauslungen durch die Durchflusszytometrie.....	39
3.1.5	Absolute Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 in <i>Sftpc</i> -YFP Mauslungen: Vergleich zwischen Stereologie und Durchflusszytometrie	40
3.2	Nebenergebnisse	41

3.2.1	Vergleich zwischen der manuellen und automatischen Dissoziation für die Durchflusszytometrie.....	41
3.2.2	Kolokalisation zwischen der pro-Surfactant Protein C-Färbung und dem <i>Yellow Fluorescent Protein</i> der <i>Sftpc</i> -YFP Mäuse.....	42
3.2.3	Validierung der Beads-Zählmethode und der Herstellung von Einzelzellen ..	44
4	Diskussion	46
4.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	46
4.2	Diskussion der Methoden	46
4.2.1	Stereologie	46
4.2.2	Durchflusszytometrie.....	48
4.3	Diskussion der Ergebnisse	49
4.4	Ausblick.....	52
5	Zusammenfassung.....	54
6	Summary.....	55
7	Abkürzungsverzeichnis	56
8	Abbildungsverzeichnis.....	58
9	Tabellenverzeichnis.....	60
10	Literaturverzeichnis	61
11	Anhang	70
12	Publikationen und Kongressbeiträge.....	72
13	Ehrenwörtliche Erklärung.....	73
14	Danksagung	74

1 Einleitung

1.1 Absolute *versus* relative Zellzahlen

Sowohl in der medizinischen Diagnostik als auch in der Zell- und Molekularbiologie werden routinemäßig Zellen gezählt und geschätzt. Oftmals verlassen sich die Untersucher dabei auf relative Zellzahlen. Das bedeutet beispielsweise, dass die Menge eines bestimmten Zelltyps entweder ins Verhältnis zu einem Gewebevolumen (exemplarisch: Zellzahl pro μl Blut), zu einer bestimmten Querschnittsfläche (exemplarisch: Zellzahl pro Fläche eines mikroskopischen Feldes) oder zu anderen Zellen (exemplarisch: Zellzahl im Verhältnis zur Zellzahl einer übergeordneten Gruppe) gesetzt wird. In Studien, in denen allerdings insbesondere die Organentstehung und -entwicklung aber auch der pathologische Umbau und die Reparatur eines Gewebes erforscht werden, können sich sowohl das Volumen, als auch die Zellmenge und -zusammensetzung in dem untersuchten Gewebeabschnitt sehr schnell und erheblich verändern (Endale et al. 2017; Hsia et al. 1993; Paisley et al. 2014; Rodríguez-Castillo et al. 2018; Schittny 2017). So gibt es während der postnatalen Reifung der Mauslungen bereits innerhalb der ersten 14 Tage außerordentliche Veränderungen, die unter anderem das Volumen, die Architektur der Alveolen (Pozarska et al. 2017) und die zelluläre Zusammensetzung der distalen Lungenabschnitte (Schittny 2017) betreffen. Falls in diesem Fall zu verschiedenen Zeitpunkten Zellen gezählt und nur als relative Zellzahlen angegeben werden, könnten Informationen verloren gehen oder falsche Schlussfolgerungen gezogen werden. So könnte zum Beispiel die Gesamtzahl der interessierenden Zellen zwar zunehmen, aber falls das Volumen im Verhältnis dazu noch stärker wächst und das Ergebnis als Zellzahl pro Volumen präsentiert wird, könnte daraus fälschlicherweise abgeleitet werden, dass sich die Gesamtzahl der interessierenden Zellen verringert hat. In diesem Zusammenhang wird auch von einer „*reference trap*“ (Braendgaard und Gundersen 1986) gesprochen, da die Daten missinterpretiert werden könnten, wenn sie nicht als absolute Werte angegeben sind. Die erwartungstreue (*unbiased*) Schätzung der absoluten Anzahl eines bestimmten Zelltyps könnte also in solchen Fällen aufschlussreicher sein.

Die Stereologie gilt als der Goldstandard zur erwartungstreuen Schätzung der absoluten Zellzahl in einem Organ wie beispielsweise der Lunge (Mühlfeld und Ochs 2013; Ochs und Mühlfeld 2013) und wird von der American Thoracic Society und der European Respiratory Society empfohlen (Hsia et al. 2010). Es ist jedoch eine vergleichsweise

arbeitsintensive und zeitaufwendige Methode. Daher werden vermehrt relative Zellzahlen geschätzt.

Es gibt zwei Methoden, die für gewöhnlich verwendet werden, um relative Zellzahlen zu schätzen:

- 1.) das Zählen in zweidimensionalen histologischen Schnitten ohne Gebrauch stereologischer Prinzipien, von manchen Autoren auch als Planimetrie (*planimetry*) bezeichnet
- 2.) die Durchflusszytometrie.

Gegen die Planimetrie wurden bereits in der Vergangenheit viele Bedenken geäußert: unter anderem, dass größere Zellen auch mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit gezählt werden oder dass ein und dieselbe Zelle in einem Schnitt oder in mehreren aufeinanderfolgenden Schnitten mehrmals gezählt werden könnte (Anzahl der Profilanschnitte \neq Anzahl der Zellen) (Boyce et al. 2010; Bratu et al. 2014; Hsia et al. 2010).

Die Durchflusszytometrie hingegen wird vor allem in der klinischen Routinediagnostik und in der Grundlagenforschung zur Schätzung von relativen Zellzahlen genutzt. Dabei befinden sich die Zellen in einer Einzelzellsuspension und werden als Probenstrom fokussiert, sodass sie idealerweise einzeln nacheinander an einem oder mehreren Lasern und Detektoren vorbeifließen. Im Gegensatz zur Planimetrie wird damit verhindert, dass Zellen mehrfach oder mit einer unterschiedlichen Wahrscheinlichkeit gezählt werden. Allerdings wird in der klinischen Routinediagnostik vor allem Blut im flüssigen Zustand verwendet. Dagegen muss ein Festkörper wie die Lunge erst dissoziiert werden, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Dies ist verbunden mit zusätzlichen Waschschrinen und birgt damit die Gefahr von möglichen Zellverlusten. Theoretisch könnte aber die Durchflusszytometrie unter Einsatz von sogenannten Zähl-Beads (*counting beads*) eine mögliche Alternative zur vergleichsweise arbeits- und zeitintensiven Stereologie darstellen.

1.2 Stereologie

1.2.1 Allgemeines

Quantitative Analysen von dreidimensionalen biologischen Objekten wie der Lunge werden für gewöhnlich auf mikroskopischer Ebene durchgeführt, wobei grundsätzlich zwei Probleme bestehen:

- 1.) Es wird nur eine kleine Auswahl und nicht das ganze Organ analysiert (Größenreduktionsproblem)
- 2.) Die Analyse erfolgt in annähernd zweidimensionalen Schnitten, obwohl Informationen über das dreidimensionale Objekt gewonnen werden sollen (Dimensionsreduktionsproblem) (Ochs 2015; Schneider und Ochs 2013).

Die Lösung dieser Probleme stellt die Stereologie (griechisch *stereos* = räumlich, körperlich) dar, die als Teilgebiet der stochastischen Geometrie unabhängig von bestimmten Anwendungsgebieten oder Bildgebungsverfahren ist (Baddeley und Vedel Jensen 2005; Miles und Davy 1976; Ochs 2015; Weibel 1980). Das heißt, die Stereologie kann dementsprechend auch in der Mikroskopie eingesetzt werden und ist mit ihrem soliden mathematischem Fundament die Methode der Wahl, um quantitative Analysen von dreidimensionalen Objekten vorzunehmen (Howard und Reed 2010; Mouton 2003, 2011; Ochs 2015; Ochs und Mühlfeld 2013; West 2012). Dabei stellt die Stereologie Werkzeuge zur Verfügung, um statistisch repräsentative Proben für das ganze Objekt auszuwählen (*Sampling*) und zu vermessen (Bolender et al. 1993; Mühlfeld et al. 2013; Ochs und Mühlfeld 2013; Weibel 1979). Durch die statistisch repräsentative Probenauswahl wird das Größenreduktionsproblem und durch die Messverfahren das Dimensionsreduktionsproblem gelöst (Ochs 2015; Schneider und Ochs 2013). Mit diesem Design wird folglich die Grundlage geschaffen, um erwartungstreue (*unbiased*) Ergebnisse zu erhalten und systematische Fehler (*bias*) zu vermeiden. Die Stereologie ist also „*unbiased by design*“ und wird deswegen in englischsprachigen Publikationen auch als „*unbiased stereology*“ oder „*design-based stereology*“ bezeichnet. (Howard und Reed 2010; Mouton 2003, 2011; Ochs 2015).

1.2.2 Probenauswahl (*Sampling*)

Damit die Probenauswahl im statistischen Sinne repräsentativ ist, muss sie über alle Auswahllebenen randomisiert durchgeführt werden, sodass alle Teile des Ganzen (z. B.

eines Organs) die gleiche Wahrscheinlichkeit haben ausgewählt zu werden (Cochran 1977; Cruz-Orive und Weibel 1981; Gundersen und Jensen 1987; Miles und Davy 1976; Stuart 1976). Die Randomisierung der Lokalisation ist dabei obligatorisch und in manchen Fällen ist zusätzlich die Randomisierung der räumlichen Orientierung (bei Oberflächen- und Längenschätzungen) erforderlich (Ochs 2015; Ochs und Mühlfeld 2013). Eine sehr gebräuchliche Methode, um die Lokalisation zu randomisieren, ist das SURS (*Systematic Uniform Random Sampling*) (Fehrenach H 1998; Howard und Reed 2010; Ochs 2015). Dabei werden die Proben systematisch in einem konstanten *Sampling*-Intervall aufgenommen (*Systematic Uniform*-Komponente), wobei der Beginn der ersten Probenauswahl zufällig zwischen 0 und dem *Sampling*-Intervall festgelegt wird (als Beispiel für die *Random*-Komponente) (Mayhew 2008; Schneider und Ochs 2013). So kann exemplarisch die fixierte Lunge in 15 gleich dicke Scheiben geschnitten, das *Sampling*-Intervall als 3 und der Beginn der ersten Scheibenaufnahme zufällig zwischen Scheibe 1 und 3 festgelegt werden. Falls zufällig mit der Scheibe 2 gestartet wird, werden nachfolgend noch die Scheiben 5, 8, 11 und 14 in die Stichprobe aufgenommen.

1.2.3 Strukturparameter und Messverfahren (geometrische Testsysteme)

Bei der quantitativen Schätzung von Strukturparametern in einem dreidimensionalen Objekt (3D) wie der Lunge anhand von dünnen histologischen, also annähernd zweidimensionalen Schnitten (2D) muss bedacht werden, dass sich die Dimension um 1 reduziert. Volumina (3D, z. B. Alveolarvolumen) erscheinen als Flächen (2D), Oberflächen (2D, z. B. Alveolaroberfläche) als Linien (1D) und Längen (1D, z. B. Kapillarlänge) werden zu Punkten (0D) (Ochs und Mühlfeld 2013; Weibel et al. 2007). Als Besonderheit gilt zu beachten, dass die *Anzahl* von Partikeln (z. B. *Anzahl* von Alveolen oder Alveolarepithelzellen Typ 2) von vornherein dimensionslos (0D) ist und sich in dünnen histologischen Schnitten gar nicht darstellt (Ochs 2015; Weibel et al. 2007). Das bedeutet, dass die alleinige Betrachtung von histologischen Schnitten ohne stereologische Prinzipien (wie es bei der Planimetrie üblich ist) nicht erwartungstreu auf die Partikelzahl schließen lässt (Bratu et al. 2014). Denn größere Partikel haben eine erhöhte Wahrscheinlichkeit angeschnitten zu werden und ein und dasselbe Partikel kann in einem oder mehreren aufeinanderfolgenden Schnitten mehrmals als Profil sichtbar sein

(Anzahl der Profilanschnitte \neq Anzahl der Zellen) (Boyce et al. 2010; Bratu et al. 2014; Howard und Reed 2010).

Die Stereologie stellt wie erwähnt Messverfahren zur Verfügung, um dieses Dimensionsreduktionsproblem zu lösen. Als Messverfahren werden hierzu für gewöhnlich geometrische Testsysteme (z. B. Punkte, Linien, Ebenen, Volumina) eingesetzt. Für jeden Strukturparameter existiert dabei ein geometrisches Testsystem, welches das „Messen“ auf ein einfaches Zählen der Interaktionen mit diesem Testsystem reduziert (Ochs 2015; Ochs und Mühlfeld 2013; Schneider und Ochs 2013). Die Grundregel besagt: Werden die Dimension des zu schätzenden Strukturparameters und die Dimension des angewandten geometrischen Testsystems zusammenaddiert, muss die Summe mindestens 3 ergeben. Daraus folgt, dass Volumina (3D) mit Testpunkten (0D), Oberflächen (2D) mit Testlinien (1D), Längen (1D) mit Testebenen (2D) und als spezieller Fall die Partikelzahlen (0D) mit Testvolumina (3D) geschätzt werden (Boyce et al. 2010; Howard und Reed 2010; Ochs 2006, 2015; Ochs und Mühlfeld 2013).

1.2.4 *Disector*

Zur erwartungstreuen Schätzung der Partikelzahl (z. B. Zellzahl) wird wie bereits erwähnt ein Volumen als Testsystem benötigt. Die Lösung dieses Problems stellt der sogenannte *Disector* dar, wobei es grundsätzlich zwei verschiedene Arten gibt (Gundersen 1986; Gundersen et al. 1988; Sterio 1984). Beim *Physical Disector* werden von demselben Gewebeblock zwei parallele histologische Schnitte in einer bekannten Distanz (auch *Disector*-Höhe genannt) zueinander angefertigt und miteinander verglichen (Abb. 1). Beim *Optical Disector* wird hingegen ein dicker histologischer Schnitt verwendet, durch den optisch in z-Richtung (Höhe) durchfokussiert wird. Dadurch entstehen optische Schnitte (Brennebenen) mit einer bekannten Distanz (*Disector*-Höhe) zueinander, die auch miteinander verglichen werden können. Das optische Durchfokussieren kann dabei mit einem Öl-Immersion-Objektiv (West und Gundersen 1990), mit einem Konfokalmikroskop (Howell et al. 2002) oder durch andere tomografische Techniken (z. B. Micro-CT oder Elektronentomographie) (Vanhecke et al. 2007) erfolgen (Hsia et al. 2010).

Für beide *Disector*-Arten ergeben sich die Testvolumina (V_T) dadurch, dass auf die Schnitte Zählrahmen mit einer bekannten Fläche (A_T) projiziert werden (Weibel et al. 2007). Bei bekannter *Disector*-Höhe (h) berechnet sich ein Testvolumen wie folgt:

$V_T = A_T \times h$. In diesen Testvolumina werden dann Partikel gezählt, indem die Schnitte miteinander verglichen werden. Einer der beiden Schnitte wird als der Referenzschnitt (*reference section*) und der andere als der Nachschauschnitt (*look-up section*) festgelegt. Ist ein Partikel in dem Referenzschnitt zu sehen, aber nicht in dem Nachschauschnitt, wird es gezählt (Hsia et al. 2010). Es muss allerdings für dieses Vergleichen ein einmaliges Merkmal des untersuchten Partikels gewählt werden, damit es zu keinen Mehrfachzählungen kommt (Howard und Reed 2010; Mouton 2003, 2011; Ochs 2015; Ochs und Mühlfeld 2013). Denn wenn beispielsweise ein Neuron mit mehreren Dendriten angeschnitten wird, könnten sich mehrere Profilanschnitte ergeben. In so einem Fall sollte nicht das Vorhandensein und Verschwinden von Profilanschnitten als Zählereignis definiert werden, sondern stattdessen zum Beispiel das Vorhandensein und Verschwinden eines Nucleus (Oorschot 1996; West und Gundersen 1990) oder Nucleolus (Golub et al. 2015; Meitzen et al. 2010), wenn diese Strukturen charakteristischerweise nur einmal in dem untersuchten Zelltyp vorkommen. Zusätzlich muss die Zählrahmen-Zählregel (Gundersen 1977) beachtet werden. Ein Partikel kann nur gezählt werden, wenn sein einmaliges Merkmal (z. B. Nucleus) zumindest teilweise innerhalb des Zählrahmens liegt. Dabei darf es definitionsgemäß die Einschlusslinie aber nicht die Ausschlusslinie berühren. Für den *Physical Disector* wird außerdem empfohlen, dass die *Disector*-Höhe $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{4}$ der mittleren Höhe des untersuchten Zelltyps beträgt, damit keine Zellen zwischen den beiden Schnitten (Referenz- und Nachschauschnitt) des *Disector*-Paares verloren gehen und gleichzeitig effizient gezählt werden kann (Boyce et al. 2010; Gundersen et al. 1988; Schneider und Ochs 2013).

Aus der Anzahl der gezählten Partikel in einem bekannten Volumen kann dann eine numerische Dichte, also eine relative Zellzahl (Partikelzahl pro Volumen) gebildet werden. Diese numerische Dichte wird schließlich mit dem zuvor bestimmten Referenzvolumen (z. B. Volumen eines Organs) multipliziert, um absolute Werte zu erhalten. Hierdurch werden Fehler durch die „*reference trap*“ vermieden (Boyce et al. 2010; Ochs und Mühlfeld 2013; Weibel et al. 2007). Das Referenzvolumen kann dabei entweder mit dem Archimedes-Prinzip (Scherle 1970) oder der Cavalieri-Methode (Gundersen und Jensen 1987) bestimmt werden.

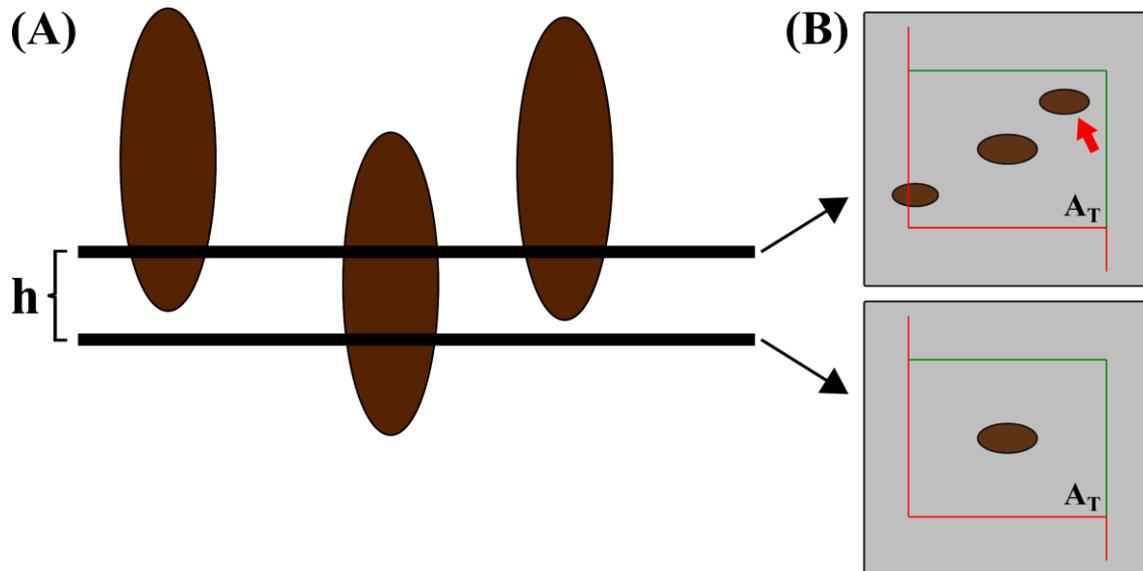


Abbildung 1: Schematische Darstellung des *Physical Disector-Prinzips*. (A) Es werden zwei parallele Schnitte in einer bekannten Distanz (h) zueinander angefertigt. (B) Auf die Schnitte werden Zählrahmen mit einer bekannten Testfläche (A_T) projiziert. Es werden dann die Partikel in dem sich ergebenden Testvolumen (V_T) gezählt: $V_T = A_T \times h$. Der obere Schnitt wird als Referenz- und der untere als Nachschauschnitt festgelegt. Als Zählereignis wird beispielsweise das Vorhandensein eines Partikelprofils in dem Referenz- und dessen Verschwinden in dem Nachschauschnitt definiert. Dabei muss das Partikelprofil teilweise innerhalb des Zählrahmens liegen und darf die Einschluss- (grüne Linie) aber nicht die Ausschlusslinie (rote Linie) berühren. Dementsprechend wird nur das mit dem roten Pfeil markierte Partikel gezählt.

1.2.5 *Fractionator*

Der *Fractionator* (Gundersen 1986) ist eine Erweiterung des ursprünglichen *Disector-Prinzips* (Sterio 1984) und dient der erwartungstreuen Schätzung der absoluten Partikelzahl, wobei kein Referenzvolumen gebraucht wird. Denn nachdem das Referenzvolumen (z. B. Volumen der Lunge) bestimmt ist, wird das Gewebe für gewöhnlich weiterverarbeitet und unter anderem fixiert. Wenn Paraformaldehyd als Fixiermittel verwendet wird, kann es zu einer Volumen-Schrumpfung von 40 % bis 50 % kommen (Boyce et al. 2010; Dorph-Petersen et al. 2001; Haug et al. 1984; Iwadare et al. 1984; Miller und Meyer 1990). Wenn in diesem geschrumpften Gewebe mithilfe des *Disectors* wie oben beschrieben eine numerische Dichte (Partikelzahl pro Volumen) bestimmt und anschließend mit dem Referenzvolumen vom Anfang multipliziert wird, würde das nicht zu erwartungstreuen Resultaten führen.

Der *Fractionator* umgeht dieses Problem der Gebeschumpfung und ist im Grunde ein ziemlich einfaches Prinzip, welches in vielen wissenschaftlichen Disziplinen benutzt wird (Howard und Reed 2010). Es wird von dem Ganzen (z. B. von einem Organ) in einem oder mehreren randomisierten Auswahlritten eine bekannte Fraktion entnommen und in dieser Fraktion mithilfe des *Physical-* oder *Optical Disectors* die Partikelzahl bestimmt. Es werden aber dann keine numerischen Dichten gebildet, sondern die gezählte Partikelzahl mit den Kehrwerten der vorherigen Fraktionen multipliziert, um absolute Werte zu schätzen (Howard und Reed 2010; Mouton 2003, 2011; Ochs und Mühlfeld 2013).

Die Kombination aus dem *Fractionator* und dem *Physical Disector* wird als *Physical Fractionator* und die Kombination aus dem *Fractionator* und dem *Optical Disector* als *Optical Fractionator* bezeichnet (Boyce et al. 2010; Howard und Reed 2010)

1.2.6 Erwartungstreue und Präzision

Da die Stereologie ein Teilgebiet der stochastischen Geometrie ist, sind die mit ihr gewonnenen Daten grundsätzlich Schätzwerte (Ochs 2015; Ochs und Mühlfeld 2013). Solche Schätzwerte können dabei durch zwei Kategorien charakterisiert werden: Erwartungstreue und Präzision (Abb. 2).

Erwartungstreue (*unbiased, accurate*) Methoden liefern Schätzungen, deren Mittelwert mit steigender Stichprobengröße gegen den wahren Mittelwert der Population konvergiert. Das heißt, es sind keine systematischen Fehler (*bias*) vorhanden (Mouton 2011; Ochs 2015). Da in biologischen Untersuchungen der wahre Mittelwert der Population meistens nicht bekannt ist, kann das Ausmaß an systematischen Fehlern nicht bestimmt und dementsprechend nicht korrigiert werden (Hsia et al. 2010). Erwartungstreue Ergebnisse können also nur dann gewonnen werden, wenn von Anfang an systematische Fehler vermieden werden (Gundersen 1992; Hsia et al. 2010; Mouton 2011; Ochs 2015; Ochs und Mühlfeld 2013).

Die Präzision oder Reproduzierbarkeit lässt sich hingegen statistisch ermitteln und falls notwendig verbessern, indem die Stichprobengröße erhöht wird (Ochs und Mühlfeld 2013). Wie groß die Stichprobengröße sein soll, um eine hinreichende Präzision zu erreichen, hängt von der jeweiligen Studie ab. Als Faustregel wird empfohlen, 100-200 Zählereignisse (z. B. Zellen mit dem *Disector*) pro Studien-Individuum (z. B. Maus) zu zählen und in die Berechnung einfließen zu lassen (Ochs und Mühlfeld 2013; Weibel et

al. 2007). Dabei sollte aus Effizienzgründen mehr Aufwand auf höheren Ebenen (z. B. Anzahl der Mäuse, Anzahl der Gewebelöcke pro Maus) anstatt auf den unteren Ebenen (z. B. Anzahl der Schnitte pro Gewebelöcke, Anzahl der verwendeten Zählrahmen) investiert werden, weil diese mehr zur Gesamtvarianz der Daten beitragen (Ochs 2015; Ochs und Mühlfeld 2013; Weibel et al. 2007). Dieses Prinzip ist auch als „*Do more less well*“ (Gundersen und Osterby 1981) bekannt.

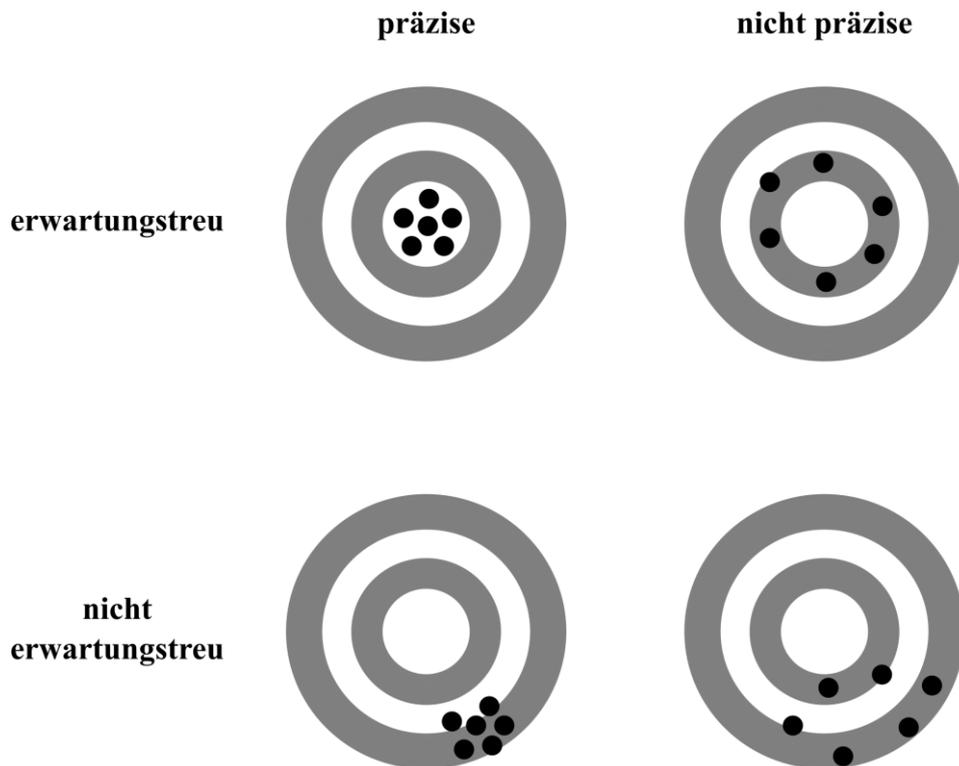


Abbildung 2: Schematische Illustration des Konzepts von Erwartungstreue und Präzision. Die Mitte der Schießscheibe kennzeichnet den wahren Mittelwert der Population. Die obere Reihe gibt erwartungstreue Ergebnisse an, die entweder präzise (linke Scheibe) oder unpräzise (rechte Scheibe) sind. Die untere Reihe zeigt hingegen Ergebnisse, die mit systematischen Fehlern behaftet sind und dementsprechend nicht erwartungstreu sind. Modifiziert nach Gundersen 1992.

1.3 Durchflusszytometrie

1.3.1 Allgemeines

Die Durchflusszytometrie wird routinemäßig in der Klinik und Grundlagenforschung eingesetzt, um unter anderem Partikel (z. B. Zellen) zu zählen, zu sortieren und deren verschiedene physikalische und chemische Parameter zu quantifizieren. In der Regel

liegen die verwendeten Zellen in einer Einzelzellsuspension vor und können mit verschiedenen Antikörpern markiert werden, an die Fluorochrome (Fluoreszenzfarbstoffe) gebunden sind (Adan et al. 2017; Betters 2015; Gompf 2016; Macey 2007; Virgo und Gibbs 2012)

Der Durchflusszytometer ist ganz grob aus vier Systemen aufgebaut: dem Flüssigkeitssystem, der Optik, der Elektronik und dem Computer. Die Zellen werden zunächst als Probenstrom in der Mitte einer Hüllflüssigkeit hydrodynamisch fokussiert (Flüssigkeitssystem). Auf diese Weise fließen die Zellen idealerweise einzeln nacheinander an einem oder mehreren Lasern vorbei. Dabei wird das Streu- und Fluoreszenzlicht gesammelt (Optik). Das Vorwärtsstreulicht (FSC: *Forward Scatter*) lässt Rückschlüsse auf die Zellgröße zu. Das Seitwärtsstreulicht (SSC: *Side Scatter*) ist ein Maß für die Komplexität oder Granularität von Zellen. Die optischen Signale (Licht, Photonen) werden dann durch Photodetektoren in elektrische Signale umgewandelt und an den Computer gesendet. Die so gewonnenen Informationen können anschließend in Form von verschiedenen Diagrammen, zum Beispiel als Punktdiagramm (*dot plot*) oder Histogramm, grafisch dargestellt werden. In den Punktdiagrammen können außerdem die zu interessierenden Zellen für weitere Analysen ausgewählt werden, indem um sie sogenannte *Gates* gezogen werden (Adan et al. 2017; Betters 2015; Gompf 2016; Macey 2007; Virgo und Gibbs 2012).

1.3.2 Zähl-Beads

Sogenannte Zähl-Beads (*counting beads*) können als interner Standard verwendet werden, um absolute Partikelzahlen (z. B. Zellen) in einem Probevolumen zu schätzen (Frey 2016; Gratama 2007; Mandy et al. 2003). Dabei können durch den Gebrauch der Zähl-Beads konventionelle Durchflusszytometer eingesetzt werden, die im Gegensatz zur neuen Gerätegeneration keine exakten Volumina messen können (Alkhatatbeh et al. 2018; Frey 2016).

Die Zähl-Beads an sich sind Mikrosphären, die in einer bekannten Konzentration vorliegen und über einen breiten Bereich von Erregungs- und Emissionswellenlängen hell fluoreszieren. Das heißt, sie können in dem Fluoreszenzkanal ausgewählt werden, der in dem jeweiligen Experiment nicht für die Detektion von anderen Fluorochromen benötigt wird.

Die Funktionsweise sieht folgendermaßen aus. Es wird eine bekannte Anzahl von Zähl-Beads zu dem untersuchten Probevolumen hinzugefügt und diese Suspension gemischt. Es werden dann gleichzeitig die Zähl-Beads und die zu interessierenden Partikel im Durchflusszytometer akquiriert (gezählt). Aus dem Verhältnis von den insgesamt hinzugefügten Beads (Gesamtbeads) zu den akquirierten Beads und dem Verhältnis der Gesamtpartikelzahl zur akquirierten Partikelzahl kann mit dem Dreisatz die unbekannte Gesamtpartikelzahl geschätzt werden:

$$\text{Gesamtpartikelzahl} = \frac{\text{Gesamtbeads}}{\text{akquirierte Beads}} \times \text{akquirierte Partikelzahl}$$

Falls die untersuchte Probe nur eine Fraktion von der ganzen Suspension war, muss noch mit dem Kehrwert der Fraktion multipliziert werden, um die absolute Partikelzahl in der ganzen Suspension zu schätzen.

1.4 Zielsetzung

Die Stereologie gilt als der Goldstandard zur Schätzung der absoluten Zellzahl in einem Organ, ist jedoch eine vergleichsweise arbeitsintensive und zeitaufwendige Methode. Aus diesem Grund sollen in dieser Arbeit alternative Methoden zur Schätzung von absoluten Zellzahlen untersucht werden. Die Durchflusszytometrie wurde als eine solche schnelle und weniger arbeitsintensive Methode in Erwägung gezogen, welche die Stereologie ersetzen könnte. Deshalb wurden die Stereologie als der Goldstandard und die Durchflusszytometrie als die alternative Methode miteinander verglichen. Als Vergleichsgrundlage dient die Schätzung der absoluten Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 (AEZ2) in den Lungen von zwei Mausstämmen: in den Wildtyp-Mäusen C57BL/6J und in den *Sfipc*-YFP Mäusen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
2-Methylbutan	Carl Roth, Deutschland
Agar für Mikrobiologie	Sigma-Aldrich, Deutschland
Bovines Serumalbumin 1%	Sigma-Aldrich, Deutschland
Citronensäure Monohydrat	Carl Roth, Deutschland
Cytofix™ Fixation Buffer	BD Biosciences, USA
Deoxyribonuclease I from bovine pancreas (DNase)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Destilliertes Wasser	Carl Roth, Deutschland
Dispase	Corning, USA
DMEM, high glucose (4.5g/l), HEPES	Thermo Fisher Scientific, USA
Dulbecco's phosphate buffered saline 10×	Sigma-Aldrich, Deutschland
Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (ATCC® 30-2003™)	American Type Culture Collection (ATCC), USA
Ethanol ≥99,8 %; 96 %; 70 %	Carl Roth, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS) (ATCC® 30-2020™)	American Type Culture Collection (ATCC), USA
Flow Cytometry Staining Buffer	Thermo Fisher Scientific, USA
H ₂ O ₂ -Lösung 30 % (w/w) in H ₂ O	Sigma-Aldrich, Deutschland
Hämatoxylin-Lösung, Mayer's	Sigma-Aldrich, Deutschland
HBSS 1×	Thermo Fisher Scientific, USA
HEPES solution 1 M, pH 7.0-7.6	Sigma-Aldrich, Deutschland
Isofluran	CP-Pharma, Deutschland
Mowiol	Merck, Deutschland
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth, Deutschland
Penicillin - Streptomycin (100×) für Zellkultur	AppliChem, Deutschland

Chemikalien	Hersteller
Perm/Wash™ (10×)	BD Biosciences, USA
Pertex™ Eindeckmittel	Medite, Deutschland
Roti-Histol	Carl Roth, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Deutschland
Sucrose ≥99.5 %	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tissue Tek® O.C.T™ Compound	Sakura, Niederlande
Triton® X-100	Carl Roth, Deutschland
Trypsin-EDTA (0.25 %)	Thermo Fisher Scientific, USA
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, Deutschland

2.1.2 Chemische Zusammensetzungen

Chemische Zusammensetzungen	Rezept
3 % H ₂ O ₂ -Lösung	– H ₂ O ₂ -Lösung 30 % mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:9 mischen
4 % Agar (1 l)	– 40 g Agar in 1 l destilliertem heißem Wasser auflösen
4 % oder 2 % Paraformaldehyd (1 l)	– 40 g (für 4 %) oder 20 g (für 2 %) Paraformaldehyd und einige Tropfen 1 M NaOH zu 800 ml destilliertem dazugeben und bei 60 °C bis zum Auflösen mischen – danach 100 ml PBS 10× hinzufügen – das Volumen bis zum Erreichen von 1 l mit destilliertem Wasser auffüllen – pH auf 7,2 mit 1 M HCl einstellen
20 % Sucrose-Lösung (100 ml)	– 20 g Sucrose – 10 ml PBS 10× – 90 ml destilliertes Wasser
Blockierungspuffer	– Ziegenserum und Inkubationspuffer im Verhältnis 1:1 mischen
Citronensäure-Puffer (10 mM Citronensäure; 0,05 % TWEEN® 20; pH 6,0) (1 l)	– Citronensäure Monohydrat 2,10 g – destilliertes Wasser 1 l

Chemische Zusammensetzungen	Rezept
	<ul style="list-style-type: none"> – bis zum vollständigen Auflösen mischen und dann pH 6,0 mit 1 M HCl einstellen – 0,5 ml TWEEN® 20 hinzufügen und gut durchmischen – bei Raumtemperatur 3 Monate und bei 4 °C sogar länger haltbar
DMEM/HEPES/P+S (510 ml)	<ul style="list-style-type: none"> – 500 ml DMEM – 5 ml HEPES – 5 ml Penicillin - Streptomycin 1×
DMEM/HEPES/P+S/DNase (25,5 ml)	<ul style="list-style-type: none"> – 25 ml DMEM/HEPES/P+S – 500 µl DNase
Inkubationspuffer (0,5 % Triton® X-100) (10 ml)	<ul style="list-style-type: none"> – 100 mg Bovines Serumalbumin 1% – 10 ml PBST 1× – 50 µl Triton® X-100
PBS 1×	<ul style="list-style-type: none"> – Dulbecco's phosphate buffered saline 10× mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:9 mischen
PBST 1× (0,05 % TWEEN® 20) (2 l)	<ul style="list-style-type: none"> – 2 l PBS 1× – 1 ml TWEEN® 20
Penicillin - Streptomycin 1×	<ul style="list-style-type: none"> – Penicillin - Streptomycin 100× mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:99 mischen
Perm/Wash™ 1×	<ul style="list-style-type: none"> – Perm/Wash™ 10× mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:9 mischen

2.1.3 Antikörper, Farbstoffe und Beads

Antikörper/Farbstoffe	Hersteller (Katalog Nummer)
Anti-pro-Surfactant Protein C (proSPC) antibody	Merck Millipore, USA (AB3786)
APC anti-mouse CD326 (EpCAM) antibody	Miltenyi Biotec, Deutschland (130-102-969)
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol)	Thermo Fisher Scientific, USA (D3571)
FITC anti-mouse CD326 (EpCAM) antibody	BioLegend, USA (118207)
Goat anti-rabbit IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 555	Thermo Fisher Scientific, USA, (A-21428)
Goat anti-rabbit IgG (H+L) cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 647	Thermo Fisher Scientific, USA (A-21244)
ImmPACT DAB Peroxidase (HRP) Substrate	Vector Laboratories, USA (SK-4105)
Kompensations-Beads: OneComp eBeads™ Compensation	Thermo Fisher Scientific, USA (01-1111-41)
PE/Cy7 anti-mouse CD45 antibody	BioLegend, USA (103113)
Purified rat anti-mouse CD16/CD32 (mouse BD Fc Block™)	BD Biosciences, USA (553141)
Rabbit IgG isotype control	Thermo Fisher Scientific, USA (PA5-23090)
VECTASTAIN® ABC-HRP Kit (Peroxidase, Rabbit IgG)	Vector Laboratories, USA (PK-4001)
Zähl-Beads: CountBright™ absolute counting beads, for flow cytometry	Thermo Fisher Scientific, USA (C36950)

2.1.4 Geräte und Instrumente

Geräte/Instrumente	Hersteller
Behälter zum Einbetten der Lungen in Agar	aus hauseigener Spezialanfertigung
Dako Pen	Agilent Technologies, USA
Deckgläser	Carl Roth, Deutschland
Easypet® 3 Pipettierhilfe	Eppendorf, Deutschland
EASYstrainer 100 µm, für 50 ml Rührchen	Greiner-Bio-One, Österreich
EASYstrainer 40 µm, für 50 ml Rührchen	Greiner-Bio-One, Österreich
Einbettkassetten Macro (für Paraffin)	Carl Roth, Deutschland
Falcon-Rührchen 15, 50 ml	Greiner-Bio-One, Österreich
Falcon-Verschlusskappen für 5ml Rundbodenrührchen	Corning, USA
Färbebehälter aus Kunststoff mit Deckel und Gestell	Thermo Fisher Scientific, USA
gentleMACS™ C Tubes	Miltenyi Biotec, Deutschland
gentleMACS™ Dissociator	Miltenyi Biotec, Deutschland
Gewebeschneider (1,5 mm) für die in Agar eingebetteten Lungen	aus hauseigener Spezialanfertigung
Heizplatte	MEDAX, Deutschland
Leica ASP 200S Gewebeinfiltrationsautomat	Leica, Deutschland
Leica CM3050 S Kryostat	Leica, Deutschland
Leica DM6000 B Mikroskop	Leica, Deutschland
Leica EG 1160 Paraffinausgießstation	Leica, Deutschland
Leica RM2255 Mikrotom	Leica, Deutschland
LSRFortessa™ Cell Analyzer	BD Biosciences, USA
Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph Instruments, Deutschland
Menzel SuperFrost Ultra Plus 90° Objektträger	Thermo Fisher Scientific, USA
Metall-Einbettformen (für Paraffin)	Carl Roth, Deutschland

Geräte/Instrumente	Hersteller
Microlance™ 3 Kanüle, 20 G	BD Biosciences, USA
Microlance™ 3 Kanüle, 26 G	BD Biosciences, USA
Mikrozentrifuge	Labnet International, USA
MX35 Ultra Microtome Blade 34°/80	Thermo Fisher Scientific, USA
NanoZoomer 2.0-HT SlideScanner	Hamamatsu Photonics K.K, Japan
PARAFILM® M Verschlussfolie	Pechiney Plastic Packaging, USA
pH-Meter inoLab® pH Level 1	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Deutschland
Pipetten-Spitzen 10, 100, 200, 1000 µl	Greiner-Bio-One, Österreich
Präzisionswaage	VWR International, USA
Serological pipettes 5, 10, 25, 50 ml	Greiner Bio-One, Österreich
Shandon Cytospin 3	Thermo Fisher Scientific, USA
Sicherheitswerkbank NU 437-400E. Klasse II Typ A/B3	NuAire, USA
Supramid Nichtresorbierbares Nahtmaterial USP 4/0, EP 1,5	SERAG-WIESSNER, Deutschland
Tissue Tek® Cryomold®	Sakura, Niederlande
Trimming-Klinge	FEATHER® Safety Razor, Japan
Trockenschrank	Memmert, Deutschland
Unimax 2010 - rotierender Plattformschüttler	Heidolph Instruments, Deutschland
Universal-Tischzentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus, Deutschland
Vortex-Schüttler	IKA®-Werke, Deutschland
Wasserbad	VOGEL med. Technik & Elektronik, Deutschland
Zählkammer Neubauer-improved	Paul Marienfeld, Deutschland
Zeiss LSM 710 Konfokalmikroskop	Carl Zeiss, Deutschland
Zellkultur Inkubator	Thermo Fisher Scientific, USA
Zellkultur Schale, PS, 100/20 mm	Greiner-Bio-One, Österreich
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Österreich
Zellkulturplatte 12 Well	Greiner-Bio-One, Österreich

Geräte/Instrumente	Hersteller
Zellkulturplatte 48 Well	Greiner-Bio-One, Österreich

2.1.5 Verwendete Software

Verwendete Software	Hersteller
Adobe Photoshop	Adobe Systems
FACSDiva Software	BD Biosciences
FlowJo	FlowJo LLC
GIMP	The GIMP Development Team
GraphPad Prism 6	Graphpad Software
Image J	National Institutes of Health (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012)
Inkscape	The Inkscape Team
Leica Application Suite	Leica
Microsoft Excel	Microsoft
Microsoft PowerPoint	Microsoft
Microsoft Word	Microsoft
NDP.scan	Hamamatsu Photonics K.K
NDP.view	Hamamatsu Photonics K.K
Visiopharm newCAST Software	Visiopharm
ZEN Software	Carl Zeiss

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere und Zellen

Als Wildtyp-Mäuse wurden ungefähr 7 Wochen alte ($46 \pm 0,5$ Tage) C57BL/6J Mäuse von Charles River Laboratories International (USA) verwendet.

Als genetisch veränderte Mäuse wurden ungefähr 7 Wochen alte (50 ± 3 Tage) *Sftpc*-YFP Mäuse benutzt, die uns freundlicherweise von der Abteilung „Entwicklung und Umbau des Herzens“ des Max-Planck-Instituts für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim unter Leitung von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. habil. Thomas Braun zur Verfügung gestellt wurden. Die *Sftpc*-YFP Mäuse (Bezeichnung des Stamms: *B6;129-Sftpc^{tm1.1(2A-YFP-2A-tTA-N)Thbr}*) exprimierten YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) unter der Kontrolle des *Sftpc*-Promoters (Surfactant Protein C), sodass die Alveolarepithelzellen Typ 2 (AEZ2) mit YFP markiert waren. Die Publikation des Papers mit Details zu den *Sftpc*-YFP Mäusen wird erwartet.

Die Mäuse bekamen Standardfutter und wurden in einem 12:12 h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Versuchstiere wurden mithilfe einer Überdosis von Isofluran getötet, anschließend gewogen und die Masse notiert. Es wurden fast ausschließlich männliche Mäuse verwendet. Nur für den Vergleich zwischen der automatischen und manuellen Dissoziation für die Durchflusszytometrie wurden ausnahmsweise weibliche *Sftpc*-YFP Mäuse benutzt.

Für das Beads-Validierungs Experiment kamen MLg [Mlg 2908] (ATCC® CCL-206™) – Zellen (Fibroblasten aus Mauslungen) von der American Type Culture Collection (ATCC, USA) zum Einsatz.

2.2.2 Stereologie

2.2.2.1 Gewinnung und Verarbeitung des Lungengewebes

Durch Sternotomie wurden die Lunge und das Herz der Maus freigelegt. Die Vena cava und die Aorta descendens wurden durchtrennt. Es wurde eine 26 G Kanüle in den rechten Ventrikel eingeführt und langsam mit PBS $1 \times$ perfundiert, um das Blut aus der Lunge auszuspülen. Danach wurde eine 20 G Kanüle in der Trachea platziert und die Lunge bei einem hydrostatischen Druck von 20 cm H₂O mit 4 % Paraformaldehyd-Fixativ vollständig aufgefüllt. Die Trachea wurde mit einem 4/0 Faden ligiert und das Herz-Lungenpaket entnommen. Dieses wurde daraufhin im gleichen Fixativ über Nacht bei

4 °C gelagert. Anschließend wurden beide Lungenflügel vom überschüssigen Gewebe gesäubert (Herz, Trachea, Ösophagus, Bindegewebe, etc.) und in einem Behälter (aus hauseigener Spezialanfertigung) in 4 % Agar eingebettet.

2.2.2.2 *Physical Fractionator*: Probenauswahl (*Sampling*) und Zählung von Alveolarepithelzellen Typ 2

Die in Agar eingebettete Lunge (beide Lungenflügel) wurde in einen Gewebeschnneider (aus hauseigener Spezialanfertigung) gelegt und mit einer Trimming-Klinge in Scheiben gleicher Dicke ($d \approx 1,5$ mm) geschnitten (Abb. 3A). Die einzelnen Lungen-Scheiben wurden aus dem umgebenden Agar entnommen und systematisch einheitlich auf drei Einbettkassetten verteilt (Abb. 3B). Anschließend wurden die Lungenscheiben in den Einbettkassetten in einer aufsteigenden Alkoholreihe automatisch dehydratisiert und mit Paraffin infiltriert (Leica ASP 200S) (Tab. 1)

Tabelle 1: Sequenz der Gewebedehydratation und Paraffininfiltration.

Reagenz	Dauer in min	Temperatur in °C
Ethanol 50 %	60	35
Ethanol 70 %	60	35
Isopropanol	30	35
Isopropanol	80	45
Paraffin	60	60
Paraffin	90	60
Paraffin	90	60

Danach wurden die Einbettkassetten noch mit Paraffin übergossen, sodass pro Lunge drei schnittbereite Paraffinblöcke entstanden (Abb. 3B). Nun wurde mithilfe eines Würfels

ein Block randomisiert ausgewählt (Abb. 3B, *block sampling fraction*, $bsf = \frac{1}{3}$). Der entsprechende Block wurde unter Verwendung eines Mikrotoms (Leica RM2255 mit MX35 Ultra Microtome Blade) bei einer eingestellten Schnittdicke von 3 μm (*Disector*-Höhe) vollständig geschnitten (Abb. 3C). Sobald das erste Lungengewebe sichtbar war, wurde mit der Aufnahme der Schnitte begonnen. Dabei wurden alle 100 Schnitte zwei aufeinanderfolgende Schnitte als ein *Disector*-Paar aufgenommen (Abb. 3C, *section sampling fraction*, $ssf = \frac{1}{100}$; über die Distanz von 100 Schnitten gibt es 100 mögliche aufeinanderfolgende Paare). Jedes *Disector*-Paar (bestehend aus einem Referenz- und Nachschauschnitt) wurde jeweils auf einen Objektträger (Menzel SuperFrost Ultra Plus 90°) aufgezogen. Damit die beim Schneiden entstandenen Falten und Verzerrungen verschwinden, wurden die Schnitte in ein 40 °C warmes Wasserbad überführt. Darauffolgend wurden die Schnitte schonend bei 37 °C über Nacht in einem Inkubator getrocknet. Als nächstes wurden die Paraffinschnitte immunhistochemisch gefärbt, zum einen das proSPC als Marker für die AEZ2 und zum anderen die Zellkerne mit Mayer's Hämatoxylin-Lösung. Die gefärbten Paraffinschnitte der C57BL/6J und der *Sfipc*-YFP Mäuse wurden mithilfe des NanoZoomer 2.0-HT SlideScanners digitalisiert und für die stereologische Analyse in die Visiopharm newCAST Software importiert. Das *Autodisector*TM-Modul leitete dabei intuitiv Schritt für Schritt durch das Programm und automatisierte einige Vorgänge. Als Erstes wurde das Lungengewebe auf den Schnitten umrandet und dadurch ausgewählt. Das Gewebe auf den beiden *Disector*-Schnitten wurde automatisch soweit wie möglich zur Deckung gebracht und auf 0,5 % der Gewebefläche Zählrahmen projiziert (Abb. 3D, *area sampling fraction*, $asf = \frac{1}{200}$). Dabei wurden 0,5 % der Gewebefläche untersucht, damit pro Maus mindestens die empfohlene Anzahl von 100-200 gezählten Zellen (siehe Kap. 1.2.6) erreicht wurde. Als Zählrahmen-Größe wurden der Übersicht halber die Maße 75 × 60 μm eingesetzt, sodass pro Zählrahmen ungefähr 2-4 Zellen gezählt werden konnten. Im nächsten Schritt zeigte die Software die beiden Schnitte eines *Disector*-Paares mit den entsprechenden Zählrahmen einzeln an (Abb. 3E). Als Zählereignis wurde das Vorhandensein eines proSPC-positiven Profils (braune Färbung) in dem Referenz- und dessen Verschwinden in dem Nachschauschnitt definiert. Dabei musste das Partikelprofil teilweise innerhalb des Zählrahmens liegen und durfte die Einschluss- (grüne Linie) aber nicht die Ausschlusslinie (rote Linie) berühren.

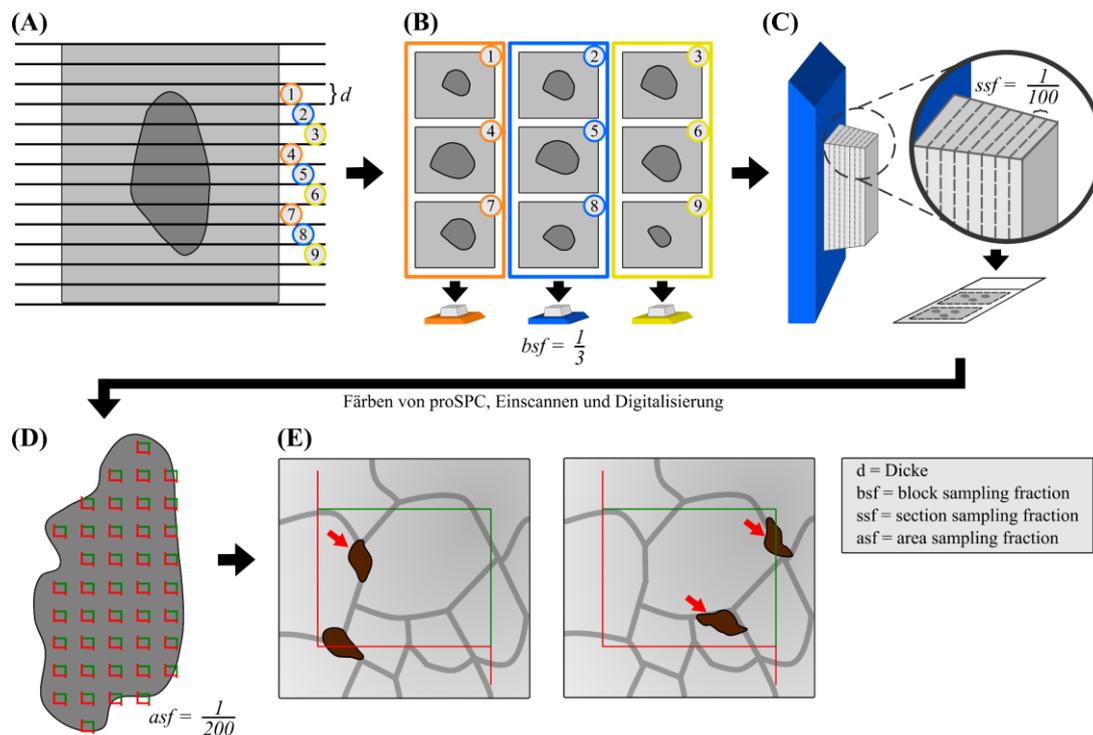


Abbildung 3: Schematischer Überblick der Probenauswahl (Sampling) und der Zählung der Alveolarepithelzellen Typ 2 unter Verwendung des Physical Fractionators. (A) Die in Agar eingebettete Lunge (beide Lungenflügel) wurde in Scheiben gleicher Dicke ($d \approx 1,5$ mm) geschnitten. Die beiden Lungenflügel sind hier repräsentativ als eine dunkelgraue Silhouette dargestellt, die von einem hellgrauen Hintergrund umgeben ist, was den Agar illustrieren soll. (B) Die entstandenen Scheiben wurden systematisch einheitlich auf drei Einbettkassetten verteilt (gekennzeichnet durch die Farben orange, blau und gelb). Danach erfolgte die Dehydratation der Scheiben und Einbettung in Paraffin, sodass drei Paraffinblöcke entstanden. Es wurde ein Paraffinblock (in diesem Fall der blaue) randomisiert ausgewählt (block sampling fraction, $bsf = \frac{1}{3}$). (C) Der ausgewählte Block wurde bei einer eingestellten Schnittdicke von $3 \mu\text{m}$ (*Disector*-Höhe) vollständig geschnitten. Es wurde ein *Disector*-Paar alle 100 Schnitte aufgenommen (*section sampling fraction*, $ssf = \frac{1}{100}$) und auf einen Objektträger aufgezogen. Anschließend wurde immunhistochemisch das pro-Surfactant Protein C (proSPC) als Marker für die Alveolarepithelzellen Typ 2 (AEZ2) gefärbt. Die Schnitte wurden eingescannt und digitalisiert. (D) Die beiden Schnitte eines *Disector*-Paares wurden zur Deckung gebracht und auf 0,5 % der Fläche (*area sampling fraction*, $asf = \frac{1}{200}$) Zählrahmen projiziert. (E) Die Software zeigte dann wieder die beiden Schnitte einzeln an und die AEZ2 wurden gezählt. Als Zählereignis wurde das Vorhandensein eines proSPC-positiven Profils (braune Färbung) in dem einen und dessen Verschwinden in dem anderen Schnitt definiert. Dabei musste das Partikelprofil teilweise innerhalb des Zählrahmens liegen und durfte die Einschluss- (grüne Linie) aber nicht die Ausschlusslinie (rote Linie) berühren. Aus Effizienzgründen wurde in „beide Richtungen“ gezählt. Das heißt, beide Schnitte dienten abwechselnd einmal als Referenz- und Nachschauschnitt. In der Endrechnung musste deswegen mit dem Faktor $\frac{1}{2}$ multipliziert werden. Die roten Pfeile zeigen auf die gezählten AEZ2. Modifiziert nach Dzhuraev et al. 2019.

Aus Effizienzgründen wurde in „beide Richtungen“ gezählt. Das bedeutet, nachdem ein Referenz-/Nachschausschnitt-Paar ausgezählt wurde, wurden die Schnitte umgetauscht: der Referenzschnitt wurde zum Nachschausschnitt und umgekehrt wurde der Nachschausschnitt zum Referenzschnitt. Das so generierte neue *Disector*-Paar wurde auf gleiche Weise ausgezählt. Aus diesem Grund musste in der Endrechnung auch mit dem Faktor $\frac{1}{2}$ multipliziert werden.

2.2.2.3 Schätzung der absoluten Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 durch die Stereologie

Die Formel für das Schätzen der absoluten Anzahl von AEZ2 mithilfe des stereologischen Werkzeugs *Physical Fractionator* sah schließlich so aus:

$$\hat{N}_{(AEZ2)} = \frac{1}{bsf} \times \frac{1}{ssf} \times \frac{1}{asf} \times \frac{1}{2} \times \sum Q^{-} (AEZ2)$$

$\hat{N}_{(AEZ2)}$ = geschätzte absolute Anzahl von AEZ2

$bsf = \text{block sampling fraction} = \frac{1}{3}$

$ssf = \text{section sampling fraction} = \frac{1}{100}$

$asf = \text{area sampling fraction} = \frac{1}{200}$

$\sum Q^{-} (AEZ2)$ = gezählte Anzahl von AEZ2

Das heißt, die in der der Visiopharm newCAST Software gezählte Anzahl von AEZ2 ($\sum Q^{-} (AEZ2)$) wurde mit den Kehrwerten der vorangehenden Fraktionen multipliziert, um die absolute Anzahl von AEZ2 für die gesamte Lunge zu schätzen. Da in beide „Richtungen des Disector-Paares“ gezählt wurde, musste die gezählte Anzahl von AEZ2 mit dem Faktor $\frac{1}{2}$ multipliziert werden.

Falls zum Beispiel für eine Maus 350 Zellen ($\sum Q^{-} (AEZ2)$) in der Software gezählt wurden, stellte sich die Formel mit den eingesetzten Zahlen folgendermaßen dar:

$$\hat{N}_{(AEZ2)} = 3 \times 100 \times 200 \times \frac{1}{2} \times 350 = 10,5 \times 10^6$$

Für die Beispielrechnung ergibt sich somit eine Anzahl von 10,5 Millionen AEZ2.

Als zusätzliche Information sei noch erwähnt, dass für die folgende Arbeit zwischen 15 und 19 Agarscheiben (durchschnittlich: 17,5 Scheiben) pro Mauslunge (beide Lungenflügel) angefertigt wurden. Aus den aus dem Agar entnommenen Lungen-Scheiben wurden wie erwähnt Paraffinblöcke angefertigt. Von einem randomisiert ausgewählten Paraffinblock wurden wiederum 10 bis 23 *Disector*-Paare (durchschnittlich: 15,3 *Disector*-Paare) pro Maus hergestellt und analysiert. Dabei war die Anzahl der *Disector*-Paare davon abhängig, wie die Lungen-Scheiben während der Einbettung im Paraffinblock verteilt wurden. Das heißt, zwischen 1.000 und 2.300 aufeinanderfolgende Schnitte wurden angefertigt, um das gesamte Lungengewebe in einem Paraffinblock zu erfassen. Schließlich wurden zwischen 279 und 406 AEZ2 (durchschnittlich: 329 AEZ2) in den *Disector*-Paaren pro Maus gezählt.

2.2.3 Immunhistochemische Färbung der Paraffinschnitte

Sowohl die Paraffinschnitte der C57BL/6J als auch der *Sftpc*-YFP Mäuse wurden immunhistochemisch gefärbt. Im Grundprinzip funktionierte die Färbung folgendermaßen. Der primäre Antikörper band spezifisch an das proSPC (pro-Surfactant Protein C) der AEZ2. Als Nächstes wurde der mit Biotin versehene sekundäre Antikörper hinzugefügt, der an den Primären band. Danach wurde ein Avidin-Biotin-Enzym-Komplex dazugegeben. Dabei band das Avidin des Komplexes mit hoher Affinität an das Biotin des sekundären Antikörpers. An dem Avidin-Biotin-Enzym-Komplex selbst war, wie der Name es schon sagt, ein Enzym, in diesem Fall die Peroxidase, vorhanden. Es wurde sodann ein Substrat hinzugefügt, welches durch die Peroxidase zu einem Farbstoff umgesetzt wurde. Außerdem wurden noch die Zellkerne aller Zellen mit Mayer's Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt.

Das konkrete Vorgehen wurde wie folgt realisiert. Als erstes wurden die Objektträger für 10 min in einen 60 °C heißen Trockenschrank gestellt, um das Paraffin zu schmelzen. Anschließend wurden die Schnitte 3-mal für jeweils 10 min in Roti-Histol gewaschen, um das Paraffin wegzuspülen. Es folgte die Rehydratation des Gewebes in einer aufsteigenden Alkoholreihe: 2-mal in 100 % Ethanol, 1-mal in 96 % Ethanol und 1-mal in 70 % Ethanol für jeweils 5 min. Dann wurden die Schnitte 3-mal in PBST 1× für jeweils 5 min gewaschen. Als Nächstes wurden die Antigene demaskiert, um später mit Antikörpern konjugiert werden zu können. Dazu wurde ein Citronensäure-Puffer

verwendet. Dieser Puffer wurde in eine mikrowelleneignete Plastikbox gefüllt und ungefähr 5 min bei 850 W in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Die Objektträger wurden in einem Gestell angeordnet und dieses in der Plastikbox platziert. Das Ganze wurde erneut ungefähr 15 min bei 450 W erhitzt und im Anschluss 30 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Es wurde wieder 3-mal für jeweils 5 min in PBST 1× gewaschen. Die Objektträger wurden vorsichtig um das Gewebe herum getrocknet. Das Gewebe wurde mit einem Dako-Pen umkreist, damit die später angewendeten Lösungen innerhalb dieser Barriere blieben. Nun wurden zu jedem umkreisten Gewebe jeweils 100 µl 3 % H₂O₂-Lösung für 5 min hinzugefügt, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Es folgten 2 Waschvorgänge für jeweils 5 min in PBST 1×. Auf jeden Gewebeabschnitt wurden 100 µl Blockierungspuffer für 1 h bei Raumtemperatur hinzugefügt. Dadurch wurde gewährleistet, dass möglichst viele unspezifische Bindungsstellen blockiert wurden. Es folgte ein Waschvorgang für 5 min in PBST 1×. Zu jedem Gewebeabschnitt wurden jeweils 100 µl des primären Antikörpers (anti-proSPC, Kat. Nr.: AB3786, 1:2000 im Inkubationspuffer) für 2 h hinzugefügt. Hiernach wurden die Schnitte wieder 2-mal für jeweils 5 min in PBST 1× gewaschen. Der biotinylierte sekundäre Antikörper (aus VECTASTAIN® ABC-HRP Kit, Kat. Nr.: PK-4001) wurde auf gleiche Weise aufgetragen und für 1 h inkubiert. Es folgten wieder zwei Waschvorgänge in PBST 1× für jeweils 5 min. Anschließend wurde der Avidin-Biotin-Enzym Komplex (aus VECTASTAIN® ABC-HRP Kit, Kat. Nr.: PK-4001) für 30 min hinzugegeben. Es wurde abermals 2-mal in PBST 1× für jeweils 5 min gewaschen. Nun wurde das Substrat (ImmPACT DAB Peroxidase (HRP) Substrate, Kat. Nr.: SK-4105) für 10 min hinzugegeben, welches durch die Peroxidase zu einem Farbstoff umgesetzt wurde. Darauffolgend wurden die Objektträger für 30 s im destillierten Wasser gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellkerne mit Mayer's Hämatoxylin-Lösung für 3 min gegengefärbt und die Objektträger unter laufendem warmen Wasser für 15 min und dann für 30 s mit destillierten Wasser gewaschen. Es erfolgte die Dehydratation des Gewebes in einer aufsteigenden Alkoholreihe: 1-mal in 70 % Ethanol, 1-mal in 96 % Ethanol und 1-mal in 100 % Ethanol für jeweils 5 min. Die Schnitte wurden als Nächstes 2-mal für jeweils 2 min in Roti-Histol gewaschen und anschließend 10 min unter dem Abzug getrocknet. Zum Schluss wurde zu jedem umkreisten Gewebeabschnitt ein Tropfen Pertex-Einbettmedium hinzugefügt und ein Deckgläschen daraufgelegt. Die gefärbten Paraffinschnitte der C57BL/6J und der *Sftpc*-YFP Mäuse wurden mithilfe des NanoZoomer 2.0-HT SlideScanners digitalisiert.

2.2.4 Anfertigung von Gefrierschnitten und Immunfluoreszenzfärbung für die Kollokalisation zwischen der pro-Surfactant Protein C-Färbung und dem *Yellow Fluorescent Protein* der *Sftpc*-YFP Mäuse

Es wurden Gefrierschnitte von der *Sftpc*-YFP Maus angefertigt und das proSPC mit einer Immunfluoreszenzfärbung versehen, um die Kollokalisation (Ausmaß der Überlappung) zwischen der proSPC-Färbung und dem YFP festzustellen.

Die Gefrierschnitte wurden im Detail folgendermaßen erstellt. Durch Sternotomie wurden die Lunge und das Herz der *Sftpc*-YFP Maus freigelegt. Die Vena cava und die Aorta descendens wurden durchtrennt. Es wurde eine 26 G Kanüle in den rechten Ventrikel eingeführt und langsam mit PBS 1× perfundiert, um das Blut aus der Lunge auszuspülen. Die Lunge wurde mit einem 1:1 Gemisch aus 2 % Paraformaldehyd und Tissue Tek® O.C.T™ aufgefüllt. Anschließend wurde die Trachea mit einem 4/0 Faden ligiert. Das Herz-Lungenpaket wurde entnommen und im gleichen 1:1 Gemisch aus 2 % Paraformaldehyd und Tissue Tek® O.C.T™ für 2 Stunden bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt. Als Nächstes wurden beide Lungenflügel vom überschüssigen Gewebe gesäubert (Trachea, Ösophagus, Bindegewebe, etc.) und über Nacht bei 4 °C in eine 20 % Sucrose-Lösung gelegt. Am nächsten Tag wurde eine Styroporbox zur Hälfte mit Trockeneis gefüllt und eine mit 2-Methylbutan gefüllte Plastikbox hineingestellt. In eine Kryoeinbettform (Tissue-Tek® Cryomold®) wurde das Tissue Tek® O.C.T™ eingegossen und die Lunge (beide Lungenflügel) darin platziert. Anschließend wurde diese Kryoeinbettform in die Plastikbox mit dem mittlerweile gekühlten 2-Methylbutan gelegt und gewartet, bis die Lunge vollständig im Kryomedium gefroren war. Schließlich wurde der gefrorene Block aus der Kryoeinbettform entnommen und im Kryostat (Leica CM3050 S mit MX35 Ultra Microtome Blade) bei -20 °C eingespannt. Es wurden ein paar 10 µm dicke Schnitte angefertigt, auf einen Objektträger (Menzel SuperFrost Ultra Plus 90°) aufgezogen und bei Raumtemperatur getrocknet.

Im Anschluss wurde die Immunfluoreszenzfärbung der Gefrierschnitte durchgeführt. Die Färbung erfolgte nach folgendem Prinzip. Der primäre Antikörper band spezifisch an das proSPC der AEZ2. Als Nächstes wurde der sekundäre Antikörper hinzugefügt, der an den primären band und mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Alexa Fluor 647) versehen war. Schließlich wurden noch die Zellkerne aller Zellen mit DAPI gegengefärbt.

Die Durchführung sah im Detail wie folgt aus. Die getrockneten Gefrierschnitte wurden vorsichtig 3-mal in PBST 1× für jeweils 5 min gewaschen. Die Objektträger wurden um das Gewebe herum getrocknet. Das Gewebe wurde mit dem Dako-Pen umkreist, damit die später angewendeten Lösungen innerhalb dieser Barriere blieben. Anschließend wurden 100 µl Blockierungspuffer auf jeden Gewebeabschnitt für 1 h bei Raumtemperatur hinzugefügt. Dadurch wurde gewährleistet, dass möglichst viele unspezifische Bindungsstellen blockiert wurden. Hieran folgte ein Waschvorgang für 5 min in PBST 1×. Danach wurden zu jedem Gewebeabschnitt jeweils 100 µl des primären Antikörpers (anti-proSPC, Kat. Nr.: AB3786, 1:2000 im Inkubationspuffer) für 2 h bei Raumtemperatur hinzugefügt. Die Schnitte wurden wieder 2-mal für jeweils 5 min in PBST 1× gewaschen. Nun wurde auf gleiche Weise der mit Alexa Fluor 647-konjugierte sekundärer Antikörper (Kat. Nr.: A-21244, 1:1000 in PBST 1×) für 1 h hinzugefügt. Im Anschluss folgten zwei Waschvorgänge in PBST 1× für jeweils 5 min. Die Zellkerne wurden mit DAPI (Kat. Nr.: D3571, in PBST 1×) für 10 min gegengefärbt und danach 3-mal mit PBST 1× für jeweils 5 min ausgewaschen. Als letztes wurde zu jedem umkreisten Gewebeabschnitt ein Tropfen Mowiol-Einbettmedium hinzugefügt und ein Deckgläschen daraufgelegt.

Die gefärbten Gefrierschnitte der *Sftpc*-YFP Maus wurden mithilfe des Zeiss LSM 710 Konfokalmikroskops digitalisiert.

2.2.5 Durchflusszytometrie

2.2.5.1 Basisprotokoll für die Durchflusszytometrie

Das folgende Protokoll stellte die Basis für alle Durchflusszytometrie-Versuche dar und wurde entsprechend des jeweiligen Experiments und des verwendeten Maus-Stamms etwas verändert und/oder ergänzt. Das Hauptziel war es, die Lunge als Gewebeverband auf chemischem und mechanischem Wege aufzulösen und eine Einzelzellsuspension herzustellen.

Durch Sternotomie wurden die Lunge und das Herz der Maus freigelegt. Die Vena cava und die Aorta descendens wurden durchtrennt. Es wurde eine 26 G Kanüle in den rechten Ventrikel eingeführt und langsam mit HBSS 1× perfundiert, um das Blut aus der Lunge auszuspülen. Danach wurde eine 20 G Kanüle in der Trachea platziert und die Lunge vorsichtig mit Dispase (50 U/ml) aufgefüllt. Die Trachea wurde mit einem 4/0 Faden ligiert und zusammen mit der Lunge und dem Herz entnommen. Das ganze Organpaket

wurde in ein Well einer 12-Well-Platte gelegt, welches zusätzlich mit 1 ml Dispase (50 U/ml) gefüllt war, und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 7 ml DMEM/HEPES/P+S/DNase in eine Zellkulturschale (10 cm) gegossen, das Organpaket hineingelegt und beide Lungenflügel vom überschüssigen Gewebe gesäubert (Herz, Trachea, Ösophagus, Bindegewebe, etc.)

Nun wurde entweder die manuelle oder die automatische Dissoziation der Lunge durchgeführt. Bei der manuellen Methode wurde die Lunge (beide Lungenflügel) in der Zellkulturschale mithilfe von 2 Pinzetten gleichmäßig zerkleinert. Dann wurde die Zellkulturschale mit PARAFILM® M gesichert und auf einem Plattformschüttler (Unimax 2010) bei mittlerer Geschwindigkeit für 10 min geschüttelt. Hiernach wurde jede Zellsuspension ungefähr 10-mal mit einer 10 ml Pipette hoch- und runterpipettiert, um die Auflösung der Lungen voranzutreiben.

Für die automatische Dissoziation wurde die gesäuberte Lunge in ein gentleMACS™ C Rührchen transferiert, dieses in den gentleMACS™ Dissociator hineingesteckt und beide Lungenprogramme nacheinander ausgeführt (erst m_lung_01_02 und dann m_lung_02.01).

Unabhängig von der verwendeten Dissoziationsart waren die nächsten Schritte wieder identisch. Die entstandene Zellsuspension wurde erst durch einen 100 µm EASYstrainer und dann einen 40 µm EASYstrainer hindurchgefiltert. Dabei waren die EASYstrainer auf jeweils einem 50 ml Falcon-Rührchen platziert. Um möglichst wenige Zellen zu verlieren, wurde jede Zellkulturschale, jeder Filter und jedes Rührchen mit 2 ml DMEM/HEPES/P+S/DNase gewaschen. Daraufhin wurden die 50 ml Falcon-Rührchen mit den gefilterten Zellsuspensionen für 10 min bei 1400 rpm und 4 °C zentrifugiert (Multifuge 3S-R). Der Überstand wurde in ein zweites 50 ml Falcon-Rührchen überführt, auf gleiche Weise zentrifugiert und diesmal der Überstand verworfen. Somit wurden pro Lunge zwei 50 ml Falcon-Rührchen mit jeweils einem Pellet produziert. Beide Pellets wurden in jeweils 1 ml DMEM/HEPES/P+S/DNase resuspendiert und gemeinsam in ein 5 ml Falcon-Rundbodenrührchen überführt. Die beiden 50 ml Falcon-Rührchen wurden jeweils mit 1 ml DMEM/HEPES/P+S/DNase gewaschen und diese Suspensionen auch noch zu dem 5 ml Falcon-Rundbodenrührchen transportiert. Dieses wurde dann für 10 min bei 1400 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und in 500 µl Flow Cytometry Staining Buffer resuspendiert. Anschließend wurde das Volumen durch Rückwärts-Pipettieren gemessen und nur $\frac{1}{10}$ der Zellsuspension in ein neues 5 ml

Rundbodenröhrchen überführt. Es wurden 400 µl Flow Cytometry Staining Buffer hinzugefügt und für 10 min bei 1400 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und schließlich in 500 µl Flow Cytometry Staining Buffer resuspendiert.

2.2.5.2 Protokoll für die C57BL/6J Mäuse

Für die C57BL/6J Mäuse wurde das Basisprotokoll etwas verändert und erweitert, da die AEZ2 zusätzlich mit Fluoreszenzfarbstoffen versehen werden mussten (Abb. 4). Außerdem wurden bei den C57BL/6J Mäusen auch andere Zellen gefärbt, um die AEZ2 besser abgrenzen zu können.

Im Grundprinzip funktionierte die Färbung folgendermaßen. Als erstes mussten die Zellen fixiert und permeabilisiert werden. Danach wurden die primären Antikörper hinzugefügt. Außer dem primären Antikörper für proSPC (pro-Surfactant Protein C) waren alle anderen bereits mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen. Lediglich für die Färbung des proSPC musste zusätzlich ein sekundärer Antikörper hinzugefügt werden.

Das Vorgehen sah im Detail folgendermaßen aus. Das Basisprotokoll wurde zunächst befolgt und unter Verwendung der manuellen Dissoziation die Zellsuspension hergestellt, gefiltert, zentrifugiert und in ein 5 ml Falcon-Rundbodenröhrchen transportiert. Anschließend wurde dieses für 10 min bei 1400 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Nun wurde das Basisprotokoll entsprechend verändert und erweitert. Der Überstand wurde verworfen, 200 µl Cytofix™ Fixation Buffer zu jedem Röhrchen hinzugefügt, resuspendiert und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden jeweils 500 µl Flow Cytometry Staining Buffer hinzugegeben und nochmal resuspendiert. Im Anschluss wurde das Volumen durch Rückwärts-Pipettieren gemessen und nur $\frac{1}{10}$ der Zellsuspension in ein neues 5 ml Rundbodenröhrchen überführt. Es wurden jeweils 500 µl Flow Cytometry Staining Buffer hinzugefügt und für 10 min bei 1400 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 250 µl Perm/Wash™ 1× hinzugegeben, vorsichtig resuspendiert und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Darauf folgend wurden 750 µl Perm/Wash™ 1× hinzugefügt und für 10 min bei 1400 rpm und 4 °C zentrifugiert. Hiernach wurde der Überstand verworfen und 100 µl einer Lösung hinzugegeben, die aus den primären Antikörpern und Perm/Wash™ 1× als Verdünnungsmittel bestand. Als primäre Antikörper wurden benutzt:

(i) anti-proSPC (Kat. Nr.: AB3786, 1:500) oder IgG Isotypkontrolle (Kat. Nr.: PA5-23090, 1:500), (ii) FITC anti-mouse CD326 (EpCAM, Kat. Nr.: 118207, 1:200), (iii) PE/Cy7

anti-mouse CD45 (Kat. Nr.: 103113, 1:300) und (iv) anti-mouse CD16/CD32 (Fc-Blocker, Kat. Nr.: 553141, 1:100).

Diese Suspension wurde für 15 min bei 4 °C inkubiert. Der Fc-Blocker sollte dabei unspezifische Bindungen der primären Antikörper mit dem Fc-Rezeptor verhindern. Im Anschluss wurden 900 µl Perm/Wash™ 1× hinzugefügt und für 10 min bei 1400 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 100 µl des mit Alexa Fluor 555-konjugierten sekundären Antikörpers (Kat. Nr.: A-21428, 1:20 in Perm/Wash™ 1×) hinzugefügt und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Als Nächstes wurden 900 µl Perm/Wash™ 1× hinzugegeben und für 10 min bei 1400 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, nochmal 500 µl Perm/Wash™ 1× hinzugegeben, resuspendiert und für 10 min bei 1400 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl Flow Cytometry Staining Buffer resuspendiert. Schließlich wurden 50.000 Zähl-Beads (CountBright™ absolute counting beads, Kat. Nr.: C36950) hinzugefügt und diese Suspension gemischt. Das Stopp-Gate wurde bei 5.000 Beads festgelegt und die Zählung gestartet. Es wurden gleichzeitig Zell- und Beaddaten akquiriert (Abb. 4). Als Durchflusszytometer wurde der LSRFortessa™ Cell Analyzer benutzt. Die Daten wurden mit FACSDiva und FloJo Software analysiert.

2.2.5.3 Protokoll für die *Sftpc*-YFP Mäuse

Für die *Sftpc*-YFP Mäuse wurde das Basisprotokoll unter Verwendung der manuellen Dissoziation unverändert durchgeführt. Dann wurden zu der Zellsuspension 50.000 Zähl-Beads hinzugefügt und diese Suspension gemischt. Das Stopp-Gate wurde bei 5.000 Beads festgelegt und die Zählung gestartet. Es wurden gleichzeitig Zell- und Beaddaten akquiriert (Abb. 5). Als Durchflusszytometer wurde der LSRFortessa™ Cell Analyzer benutzt. Die Daten wurden mit FACSDiva und FloJo Software analysiert.

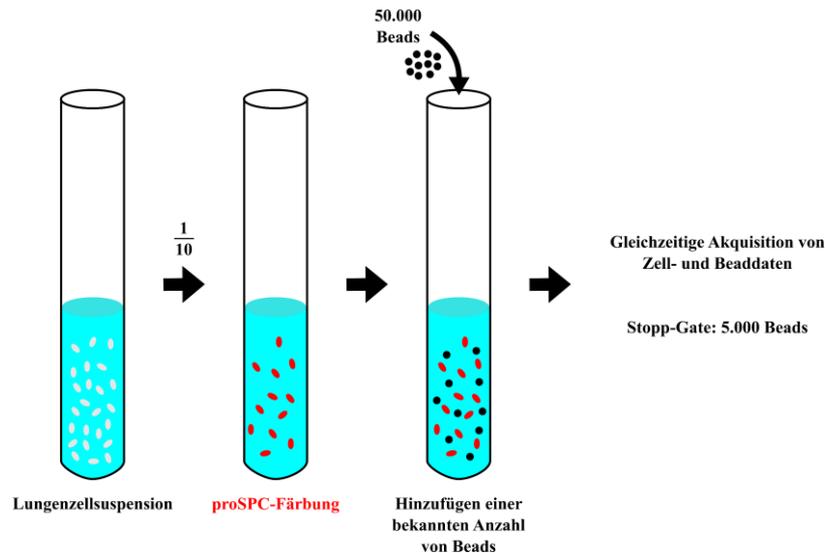


Abbildung 4: Schematischer Überblick des Durchflusszytometrie-Protokolls für eine C57BL/6J Maus. Aus der Mauslunge wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt und $\frac{1}{10}$ davon für pro-Surfactant Protein C (proSPC) gefärbt (zur Vereinfachung sind die anderen Färbungen hier nicht dargestellt). Anschließend wurden zu der Zellsuspension 50.000 Zähl-Beads hinzugefügt und diese Suspension gemischt. Das Stopp-Gate wurde bei 5.000 Beads festgelegt und die gleichzeitige Akquisition der Zell- und Bead-Daten gestartet.

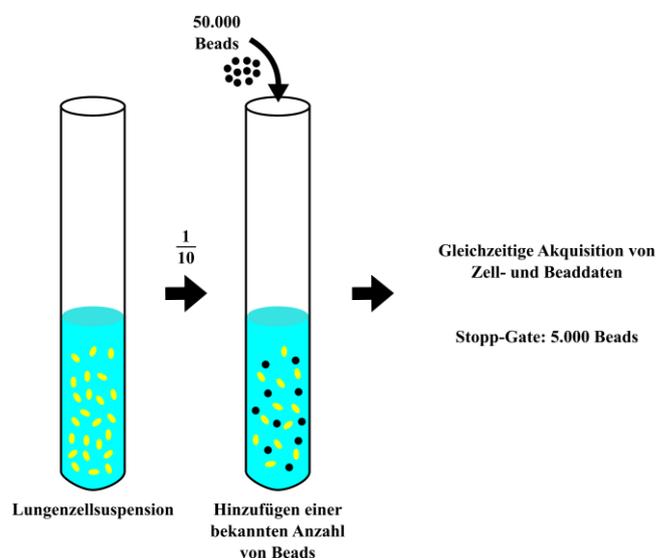


Abbildung 5: Schematischer Überblick des Durchflusszytometrie-Protokolls für eine *Sftpc*-YFP Maus. Aus der Mauslunge wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Dann wurde ein $\frac{1}{10}$ dieser Zellsuspension mit 50.000 Zähl-Beads versetzt, das Stopp-Gate bei 5.000 Beads festgelegt und der Datengewinn gestartet.

2.2.5.4 Schätzung der absoluten Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 durch die Durchflusszytometrie

Die Formel für die Schätzung der absoluten Anzahl von AEZ2 ($\hat{N}_{(AEZ2)}$) für die Durchflusszytometrie unter Verwendung der Zähl-Beads sah folgendermaßen aus:

$$\hat{N}_{(AEZ2)} = 10 \times \frac{\text{Gesamtbeads}}{\text{akquirierte Beads}} \times \text{akquirierte AEZ2}$$

Der Korrekturfaktor 10 am Anfang der Formel rührt daher, dass nur $\frac{1}{10}$ der gesamten Zellsuspension verwendet wurde. Die Gesamtbeads waren die 50.000 hinzugefügten Beads. Die akquirierten Beads repräsentierten das Stopp-Gate von 5.000 Beads, wobei die Anzahl höher sein konnte, je nachdem wie viele von diesen 5.000 Beads als Bead-Singulett (*singulets*), Bead-Doublett (*doublets*), Bead-Triplett (*triplets*) oder höhere Aggregate vorlagen. Eine Bead-Doublette wurde dann entsprechend als zwei Beads und eine Bead-Triplette als drei Beads gezählt.

Falls zum Beispiel 5.050 Beads und gleichzeitig 20.000 AEZ2 akquiriert wurden, sah die Formel mit den eingesetzten Zahlen so aus:

$$\hat{N}_{(AEZ2)} = 10 \times \frac{50.000}{5.050} \times 20.000 \approx 2 \times 10^6$$

Für die Beispielrechnung ergibt sich auf diese Weise eine Anzahl von ungefähr 2 Millionen AEZ2.

2.2.5.5 Kolokalisation zwischen der pro-Surfactant Protein C-Färbung und dem Yellow Fluorescent Protein der *Sftpc*-YFP Mäuse

Wie bei den Gefrierschnitten wurde in diesem Experiment die Kolokalisation (Ausmaß der Überlappung) zwischen der proSPC-Färbung und dem YFP überprüft. In diesem Fall wurde hierzu die Durchflusszytometrie verwendet.

Die *Sftpc*-YFP Mäuse wurden entsprechend dem Protokoll für die C57BL/6J Mäuse aufbereitet. Es wurde jedoch statt der manuellen Dissoziation die automatische gewählt. Außerdem wurden auf den gleichen Antikörpern teilweise andere Fluorophore benutzt. Die primären Antikörper waren also Folgende:

(i) anti-proSPC (Kat. Nr.: AB3786, 1:500) oder IgG Isotypkontrolle (Kat. Nr.: PA5-23090, 1:500), (ii) APC anti-mouse CD326 (EpCAM, Kat. Nr.: 130-102-969, 1:200), (iii) PE/Cy7 anti-mouse CD45 (Kat. Nr.: 103113, 1:300) und (iv) anti-mouse CD16/CD32 (Fc-Blocker, Kat. Nr.: 553141, 1:100).

Als sekundärer Antikörper kam der mit Alexa Fluor 555-konjugierte Antikörper (Kat. Nr.: A-21428, 1:20) zum Einsatz.

2.2.5.6 Validierung der Beads-Zählmethode

Für die Validierung der Beads-Zählmethode kamen MLg [Mlg 2908] (ATCC® CCL-206™) – Zellen (Fibroblasten aus Mauslungen) zum Einsatz. Diese wurden entsprechend der Herstellerangaben kultiviert und die Gesamtzellzahl mithilfe einer Neubauer Zählkammer (*improved*) bestimmt. Dann wurde eine 1:4 Verdünnungsreihe mit 5 Proben erstellt, wobei die Referenzprobe 4.000.000 Zellen enthielt (laut der Neubauer-Zählkammer). Entsprechend enthielten die anderen Proben jeweils $\frac{1}{4}$ der Zellzahl der jeweils vorherigen Probe. Zu jeder Probe wurden 50.000 Zähl-Beads hinzugegeben und diese Probe gemischt. Das Stopp-Gate wurde bei 5.000 Beads festgelegt. Nun wurde als erstes mit dem Durchflusszytometer die Zellzahl in der Referenzprobe geschätzt, die 3.813.947 Zellen betrug. Die Zellzahlen der folgenden Proben konnten demzufolge prognostiziert werden, da diese wie erwähnt 1:4 Verdünnungen der Referenzprobe waren.

Die prognostizierten Zellzahlen wurden gegen die tatsächlich im Durchflusszytometer geschätzten Zellzahlen aufgetragen.

2.2.6 Zytospin-Experiment zur Validierung der Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Dieses Experiment wurde durchgeführt, um zu testen, wie viele Zellen in der „Einzelzellsuspension“ eventuell doch nicht einzeln, sondern in Gruppen (zu zweit, zu dritt oder als höhere Aggregate) vorlagen. Diese gruppierten Zellen werden nämlich im Durchflusszytometer als nur eine Zelle gezählt und würden daher zu einem falsch niedrigen Ergebnis führen. Mit dem Zytospin-Experiment sollte abgeschätzt werden, wie groß diese Fehlerquelle ist. Dazu wurden die Zellen aus der Einzelzellsuspension auf einen Objektträger zentrifugiert und dieser anschließend eingescannt und betrachtet.

Im Einzelnen wurde das Experiment folgendermaßen durchgeführt. Als erstes wurde eine Einzelzellsuspension aus einer *Sftpc*-YFP Maus entsprechend dem Basisprotokoll (mit manueller Dissoziation) angefertigt. Dann wurden 100 µl DAPI (in Flow Cytometry Staining Buffer) hinzugefügt und für 5 min inkubiert, um die Zellkerne anzufärben. Als nächstes wurden 40 µl dieser Einzelzellsuspension mit 160 µl Flow Cytometry Staining Buffer verdünnt. Durch diese Verdünnung sollte gewährleistet werden, dass sich am Ende des Experiments nicht allzu viele Zellen auf einer kleinen Fläche befinden, also möglichst eine Monoschicht entsteht und das Bild übersichtlich ist. Anschließend wurden auf eine Aufspannplatte ein Objektträger (Menzel SuperFrost Ultra Plus 90°), eine Filterkarte mit einem Loch in der Mitte und ein Trichter platziert und eingespannt. In den Trichter wurden 100 µl der verdünnten Einzelzellsuspension gegeben und die Vorrichtung in die Zytospin-Zentrifuge (Thermo Shandon Cytospin 3) gelegt. Es wurde 5 min bei 500 rpm zentrifugiert, wodurch die Zellen durch das Filterloch auf den Objektträger konzentriert wurden. Abschließend wurde der Objektträger mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Leica DM6000 B) eingescannt und digitalisiert.

2.2.7 Statistische Analysen

Zur Schätzung der absoluten Anzahl von AEZ2 wurden für die Stereologie 5 Mäuse pro Mausstamm und für die Durchflusszytometrie jeweils 7 Mäuse untersucht. Für die Pilotstudie, in der die manuelle und automatische Dissoziation für die Durchflusszytometrie miteinander verglichen wurden, wurden 4 Mäuse für die manuelle und 3 Mäuse für die automatische Dissoziation untersucht.

Alle statistischen Analysen wurden mithilfe von Graphpad Prism 6 durchgeführt. Für den Vergleich der absoluten Anzahl der AEZ2 und der Anzahl der AEZ2 pro Gramm zwischen Stereologie und Durchflusszytometrie wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Für die Validierung der Bead-Zählmethode wurde eine nichtlineare Regression (log-log Linie) durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SD dargestellt. Zusätzlich ist in manchen Abbildungen der CV-Wert (*Coefficient of Variation* = $\frac{SD}{\text{Mittelwert}}$) in Klammern angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Hauptergebnisse

3.1.1 Schätzung der absoluten Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 in Mauslungen durch die Stereologie

Unter Verwendung des *Physical Fractionator* (Kombination aus *Fractionator* und *Physical Disector*) ergaben sich folgende Ergebnisse. Für die ungefähr 7 Wochen alten, männlichen C57BL/6J Mäuse wurde die absolute Anzahl von $10,7 \pm 1,4 \times 10^6$ AEZ2 geschätzt. Die absolute Anzahl von AEZ2 für die ungefähr 7 Wochen alten, männlichen *Sftpc*-YFP Mäuse betrug dagegen $9,0 \pm 0,7 \times 10^6$ Zellen.

Die Abbildung 6 zeigt wie die AEZ2 mithilfe des *Physical Disector*-Prinzips gezählt wurden.

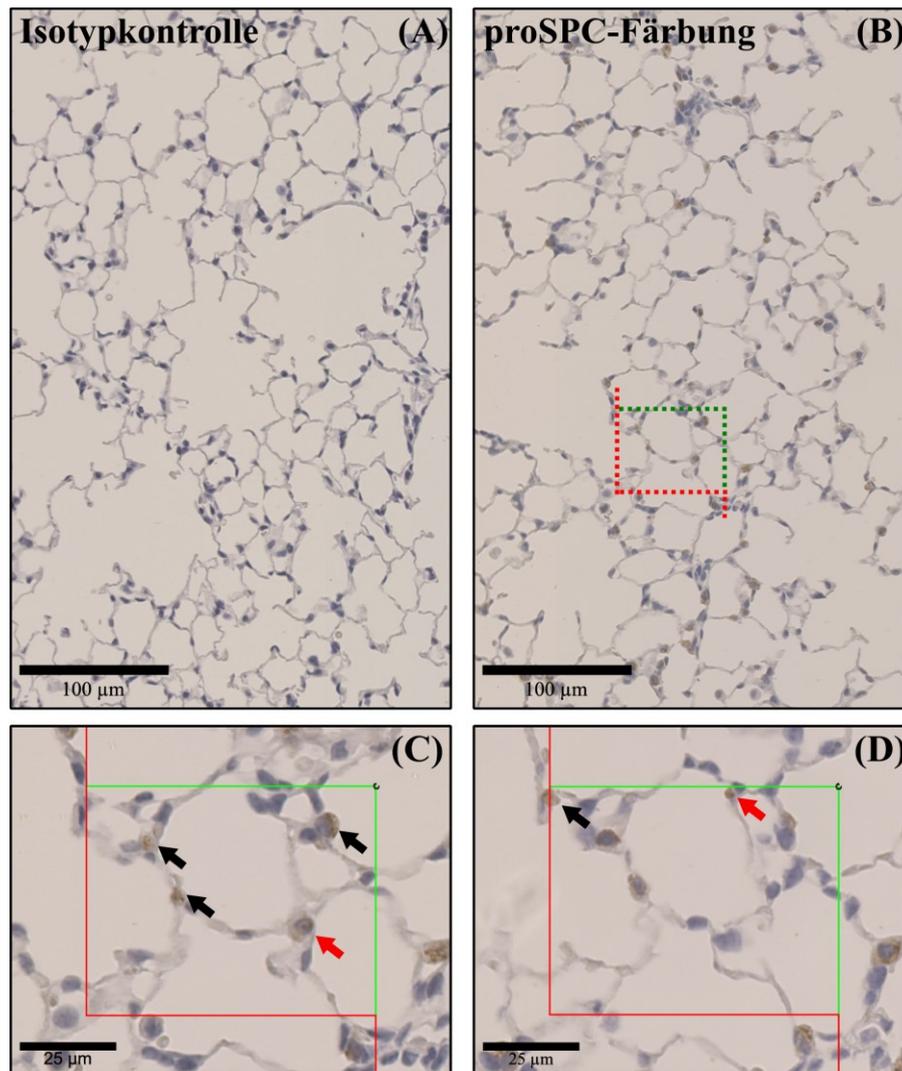


Abbildung 6: Zählung der Alveolarepithelzellen Typ 2 unter Verwendung des *Physical Disector-Prinzips*. Die Paraffinschnitte der C57BL/6J - und der *Sftpc*-YFP Mäuse wurden immunhistochemisch gefärbt. In der Abbildung sind repräsentative Ausschnitte aus einer C57BL/6J Mauslunge dargestellt. (A) Es war keine Färbung bei Gebrauch einer IgG Isotypkontrolle sichtbar. (B) Im Vergleich dazu waren nach der pro-Surfactant Protein C (proSPC)-Färbung die Alveolarepithelzellen Typ 2 (AEZ2) als relativ große braune Zellen in den Ecken der Alveolen erkennbar. Die Schnitte wurden digitalisiert und in die Visiopharm newCAST Software importiert. Die Schnitte eines Disector-Paares wurden dann soweit wie möglich zur Deckung gebracht und darauf Zählrahmen projiziert. Ein repräsentativer Zählrahmen ist in (B) zu sehen. (C, D) Die Schnitte eines Disector-Paares wurden von der Software wieder einzeln angezeigt. Als Zählereignis wurde das Vorhandensein eines proSPC-positiven Profils (braune Färbung) in einem und dessen Verschwinden im anderen Schnitt definiert. Dabei musste das proSPC-positive Profil teilweise innerhalb des Zählrahmens liegen und durfte die Einschluss- (grüne Linie) aber nicht die Ausschlusslinie (rote Linie) berühren. Aus Effizienzgründen wurde in „beide Richtungen“ gezählt. Das heißt, beide Schnitte dienten abwechselnd einmal als Referenz- und Nachschauschnitt. In der Endrechnung musste deswegen mit dem Faktor $\frac{1}{2}$ multipliziert werden. Die roten Pfeile zeigen auf die gezählten und die schwarzen Pfeile auf die nicht gezählten AEZ2. Modifiziert nach Dzhruev et al. 2019.

3.1.2 Schätzung der absoluten Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 in C57BL/6J Mäusen durch die Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie (Abb. 7) wurde für die ungefähr 7 Wochen alten, männlichen C57BL/6J Mäuse die absolute Anzahl von $6,3 \pm 1,2 \times 10^6$ AEZ2 geschätzt.

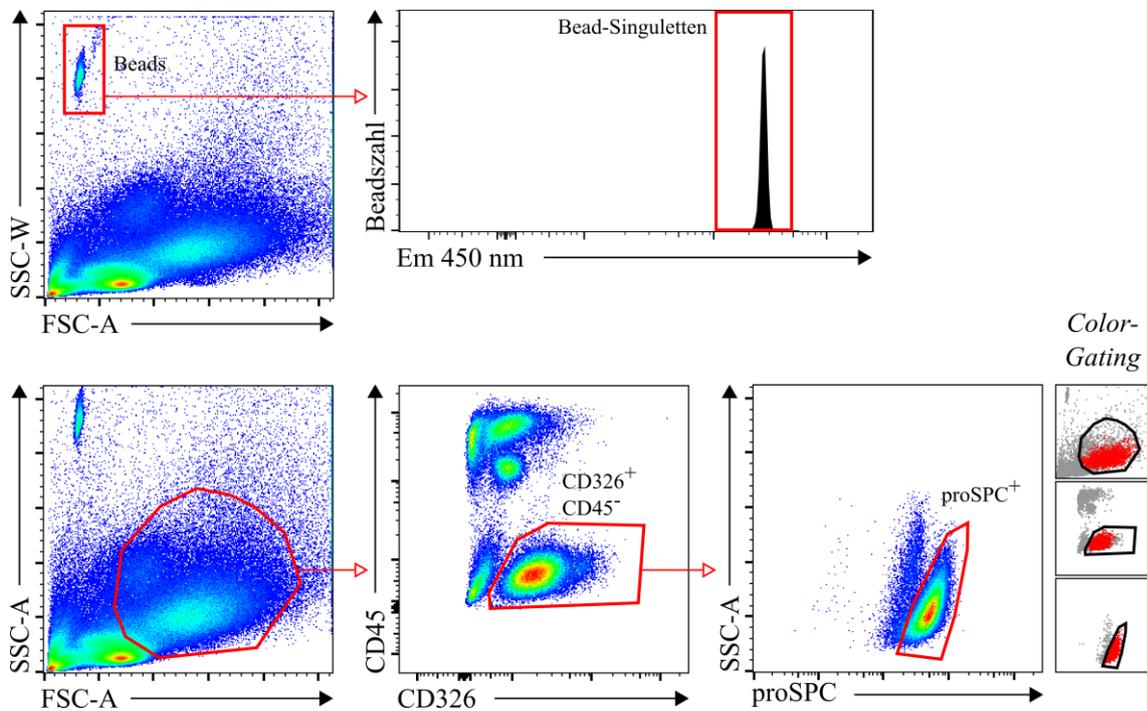


Abbildung 7: Schätzung der absoluten Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 in C57BL/6J Mäusen durch die Durchflusszytometrie. Es ist die *Gating*-Strategie für die Einzelzellsuspension einer C57BL/6J Maus dargestellt, die mit den Zähl-Beads versetzt wurde. Das obere linke Punktdiagramm zeigt die Beads und die gesamte Zellpopulation, wobei die *Forward-Scatter Area* (FSC-A) versus die *Side-Scatter Width* (SSC-W) aufgetragen wurde. Die Beads wurden dann weiter gated, um zu testen, wie viele von ihnen nicht einzeln vorlagen. Das Ergebnis ist in einem Histogramm illustriert, in dem die Emissions-Wellenlänge von 450 nm versus die Beadszahl aufgetragen wurde. Es ist daraus ersichtlich, dass es kaum Bead-Doubletten oder Bead-Tripletten gab. Sie machten weniger als 1,5 % der Beadszahl aus. Noch höhere Aggregate konnten nicht gefunden werden. Falls aber vorhanden, wurden die Bead-Doubletten als zwei- und Bead-Tripletten als drei Beads gezählt. Das untere linke Punktdiagramm zeigt wieder die Beads und die gesamte Zellpopulation; wobei *Forward-Scatter Area* (FSC-A) versus *Side-Scatter Area* (SSC-A) aufgetragen wurde. Es wurde nachfolgend nach den Alveolarepithelzellen Typ 2 (AEZ2) gated. Dazu wurden zunächst die CD326⁺ und CD45⁻ Zellen und dann die proSPC⁺ Zellen ausgewählt, welche die AEZ2 repräsentierten. Das *Color-Gating* auf der rechten Seite dient zur Validierung der *Gating*-Strategie, indem die ausgewählten proSPC-positiven Zellen in einer kleineren Version der unteren drei Punktdiagramme farbig (rot) hinterlegt sind. Modifiziert nach Dzhuraev et al. 2019.

Zusätzlich ist im Anhang die Abbildung 14 zu finden, welche die *Gating*-Strategie für die AEZ2 weiter erklärt. Außerdem wurde untersucht, wie viele AEZ2 womöglich durch die Wahl des initialen Gates im FSC-A *versus* SSC-A-Punktdiagramm in Abbildung 7 verloren wurden. Dazu wurde ein *Backgating* (siehe Abbildung 15 im Anhang) durchgeführt. Dieses ergab, dass nur $\approx 2,7\%$ der proSPC⁺ Zellen außerhalb des im FSC-A *versus* SSC-A-Punktdiagramm (Abbildung 7) dargestellten Gates lagen und dadurch nicht berücksichtigt wurden. Aus diesem Grund wurde diese *Gating*-Strategie als optimal angesehen, um die absolute Anzahl von AEZ2 durch die Durchflusszytometrie zu schätzen. Durch die weitere Vergrößerung des initialen Gates wären nämlich womöglich auch mehr irrelevante Zellen eingeschlossen worden, die das nachfolgende Gaten unter Umständen erschwert und/oder gestört hätten.

3.1.3 Absolute Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 in C57BL/6J

Mauslungen: Vergleich zwischen Stereologie und Durchflusszytometrie

Mit der Stereologie wurde im Vergleich zur Durchflusszytometrie eine deutlich höhere absolute Anzahl von AEZ2 für die ungefähr 7 Wochen alten, männlichen C57BL/6J Mäuse geschätzt: $10,7 \pm 1,4 \times 10^6$ AEZ2 mit der Stereologie *versus* $6,3 \pm 1,2 \times 10^6$ AEZ2 mit der Durchflusszytometrie (Abb. 8). Das heißt, anders ausgedrückt, wurden durchflusszytometrisch 41 % weniger AEZ2 als auf stereologischem Wege geschätzt. Diese Differenz wurde nicht durch die Masse der Mäuse beeinflusst, wie die Abbildung 8 veranschaulicht: $5,1 \pm 0,5 \times 10^5$ Zellen/g mit der Stereologie *versus* $3,0 \pm 0,7 \times 10^5$ Zellen/g mit der Durchflusszytometrie.

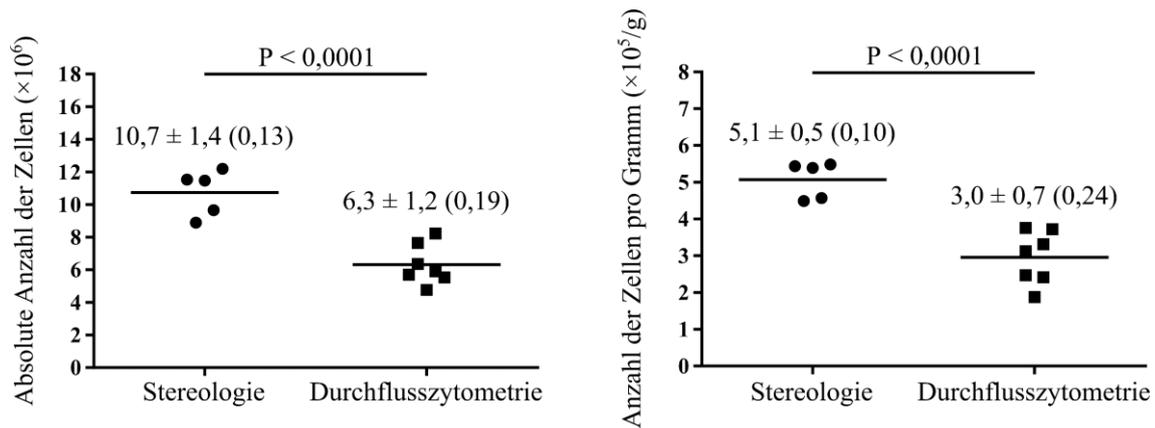


Abbildung 8: Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 in C57BL/6J Mauslungen: Vergleich zwischen Stereologie und Durchflusszytometrie. Das linke Diagramm zeigt die absolute Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 (AEZ2) und das rechte die Anzahl der AEZ2 pro Gramm. Es wurden 5 Mauslungen für die Stereologie und 7 für die Durchflusszytometrie untersucht. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine individuelle Mauslung. Für die vergleichende Analyse wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SD (CV) dargestellt. Modifiziert nach Dzhuraev et al. 2019.

3.1.4 Schätzung der absoluten Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 in *Sftpc*-YFP Mauslungen durch die Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie (Abb. 9) wurde für die ungefähr 7 Wochen alten, männlichen *Sftpc*-YFP Mäuse die absolute Anzahl von $2,1 \pm 0,4 \times 10^6$ AEZ2 geschätzt.

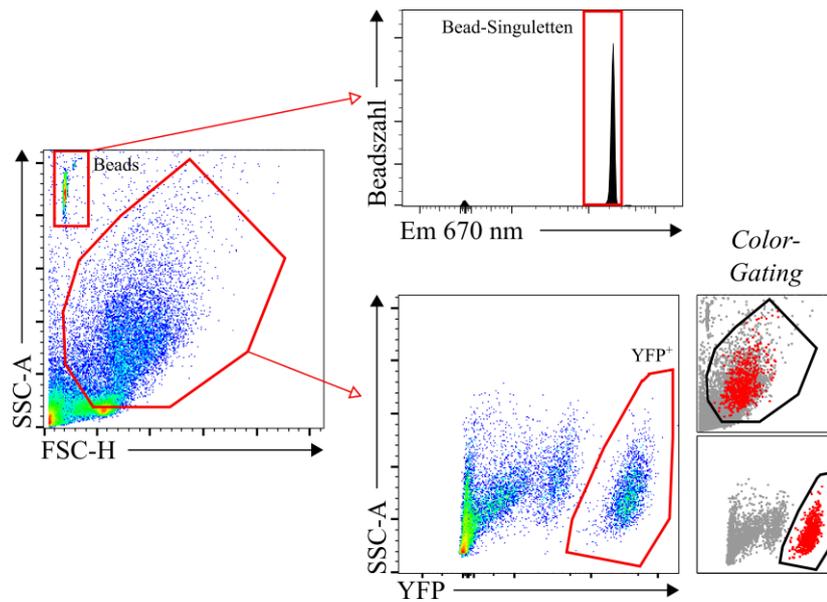


Abbildung 9: Schätzung der absoluten Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 in *Sftpc*-YFP Mäusen durch die Durchflusszytometrie. Es ist die *Gating*-Strategie für die Einzelzellsuspension einer *Sftpc*-YFP Maus dargestellt, die mit den Zähl-Beads versetzt wurde. Das linke Punktdiagramm zeigt die Beads und die gesamte Zellpopulation, wobei die *Forward-Scatter Height* (FSC-H) versus die *Side-Scatter Area* (SSC-A) aufgetragen wurde. Die Beads wurden dann weiter *gated*, um zu testen, wie viele von ihnen nicht als einzelne Beads vorlagen. Das Ergebnis ist in einem Histogramm illustriert, in dem die Emissions-Wellenlänge von 670 nm versus die Beadszahl aufgetragen wurde. Es ist daraus ersichtlich, dass es kaum *Bead-Doubletten* oder *Bead-Tripletten* gab. Sie machten weniger als 1,8 % der Beadszahl aus. Noch höhere Aggregate konnten nicht gefunden werden. Falls aber vorhanden, wurden die *Bead-Doubletten* als zwei- und *Bead-Tripletten* als drei Beads gezählt. Als nächstes wurde nach den Alveolarepithelzellen Typ 2 (AEZ2) *gated*, was unten rechts dargestellt ist. Die ausgewählten *Yellow Fluorescent Protein* (YFP)-positiven Zellen repräsentierten dabei die AEZ2. Das *Color-Gating* auf der rechten Seite dient zur Validierung der *Gating*-Strategie, indem die ausgewählten YFP-positiven Zellen in einer kleineren Version des YFP versus SSC-A-Punktdiagramms und des FSC-H versus SSC-A-Punktdiagramms farbig (rot) hinterlegt sind. Modifiziert nach Dzhuraev et al. 2019.

3.1.5 Absolute Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 in *Sftpc*-YFP Mäusen: Vergleich zwischen Stereologie und Durchflusszytometrie

Mit der Stereologie wurde im Vergleich zur Durchflusszytometrie eine deutlich höhere absolute Anzahl von AEZ2 für die ungefähr 7 Wochen alten, männlichen *Sftpc*-YFP Mäuse geschätzt: $9,0 \pm 0,7 \times 10^6$ AEZ2 mit der Stereologie versus $2,1 \pm 0,4 \times 10^6$ AEZ2 mit der Durchflusszytometrie (Abb. 10). Anders ausgedrückt heißt das, es wurden

durchflusszytometrisch 77 % weniger AEZ2 als auf stereologischem Wege geschätzt. Dieses Ergebnis wurde nicht durch die Masse der Mäuse beeinflusst, wie die Abbildung 10 veranschaulicht: $4,1 \pm 0,7 \times 10^5$ Zellen/g mit der Stereologie *versus* $1,1 \pm 0,2 \times 10^5$ Zellen/g mit der Durchflusszytometrie.

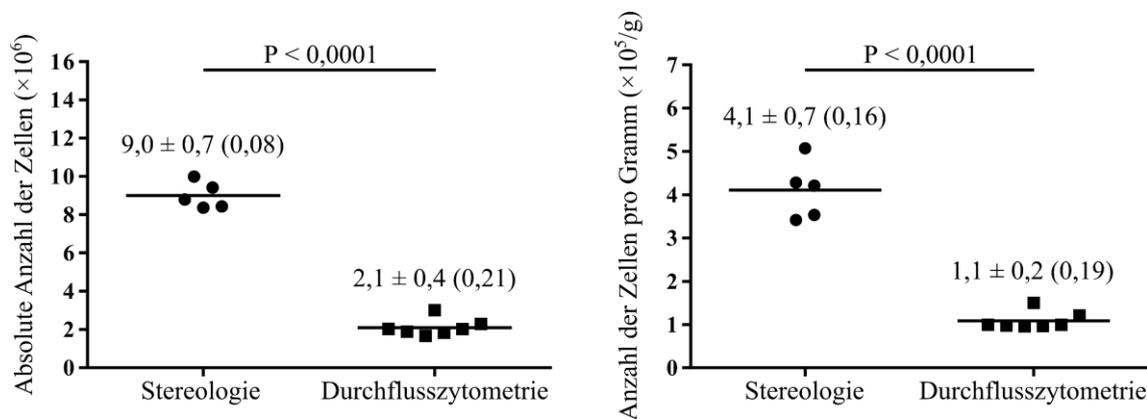


Abbildung 10: Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 in *Sftpc*-YFP Mäusen: Vergleich zwischen Stereologie und Durchflusszytometrie. Das linke Diagramm zeigt die absolute Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 (AEZ2) und das rechte die Anzahl der AEZ2 pro Gramm. Es wurden 5 Mäusen für die Stereologie und 7 für die Durchflusszytometrie verwendet. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine individuelle Maus. Für die vergleichende Analyse wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SD (CV) dargestellt. Modifiziert nach Dzhuraev et al. 2019.

3.2 Nebenergebnisse

3.2.1 Vergleich zwischen der manuellen und automatischen

Dissoziation für die Durchflusszytometrie

In einer Pilotstudie wurde untersucht, welchen Einfluss zwei verschiedene Dissoziationsarten auf die Schätzung der absoluten Anzahl von AEZ2 mithilfe der Durchflusszytometrie haben. Dazu wurden die aus weiblichen *Sftpc*-YFP Mäusen entnommenen Lungen entweder manuell oder automatisch (mit dem gentleMACS™ Dissociator) dissoziiert (siehe Basisprotokoll für die Durchflusszytometrie).

Es zeigte sich ein großer Einfluss der gewählten Dissoziationsmethode auf die absolute Anzahl von AEZ2. So führte die manuelle Dissoziation zu einer deutlich größeren Anzahl von AEZ2 als die automatische. Es wurden mit der manuellen Dissoziation ungefähr 3-mal mehr AEZ2 geschätzt als mit der automatischen Dissoziation (Abb. 11): $2,2 \pm 0,3 \times 10^6$ *versus* $0,7 \pm 0,1 \times 10^6$. Dieses Ergebnis wurde nicht durch die Masse der

Mäuse beeinflusst, wie die Abbildung 11 veranschaulicht: $1,4 \pm 0,05 \times 10^5$ Zellen/g mit der manuellen und nur $0,4 \pm 0,05 \times 10^5$ Zellen/g mit der automatischen Dissoziation. Aus diesem Grund wurde für die Hauptexperimente zur Schätzung der absoluten Anzahl von AEZ2 die manuelle Dissoziation verwendet.

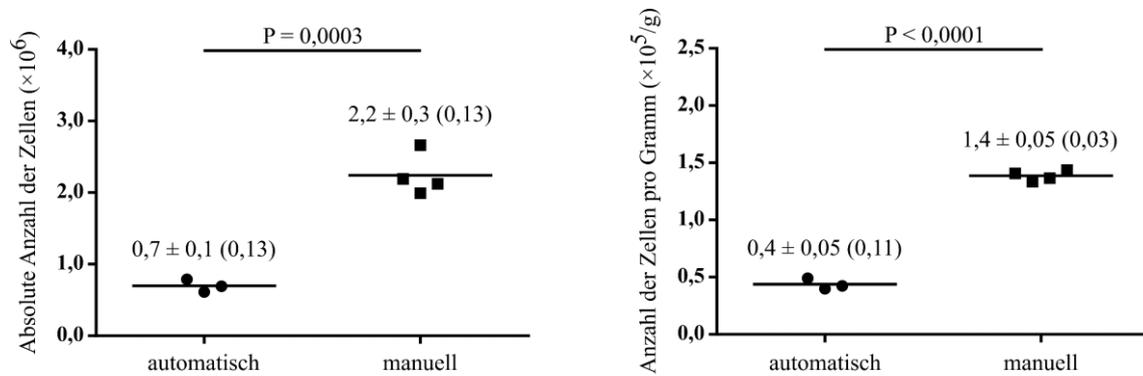


Abbildung 11: Vergleich zwischen der manuellen und automatischen Dissoziation für die Durchflusszytometrie. Das linke Diagramm zeigt die absolute Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 (AEZ2) und das rechte die Anzahl der AEZ2 pro Gramm. Es wurden 3 Mauslungen für die automatische und 4 für die manuelle Dissoziation verwendet. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine individuelle Mauslung. Für die vergleichende Analyse wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SD (CV) dargestellt. Modifiziert nach Dzhuraev et al. 2019.

3.2.2 Kolokalisation zwischen der pro-Surfactant Protein C-Färbung und dem *Yellow Fluorescent Protein* der *Sftpc*-YFP Mäuse

Die AEZ2 wurden entweder direkt durch die YFP-Fluoreszenz oder durch die intrazelluläre proSPC-Färbung identifiziert. Es wurde eine hohe Kolokalisation (Ausmaß der Überlappung) zwischen diesen beiden Detektierungsmöglichkeiten sowohl im Durchflusszytometer (Abb. 12A) als auch anhand von immunfluoreszenzgefärbten Gefrierschnitten (Abb. 12B) geschätzt.

So waren in der Durchflusszytometrie 98,7 % der YFP-Population ebenso positiv für AF 555 (repräsentierte proSPC) und 98,1 % der AF 555-positiven-Population auch YFP-positiv. In den immunfluoreszenzgefärbten Gefrierschnitten konnte durch empirische Datenerhebung ebenfalls eine fast vollständige Kolokalisation ermittelt werden. So waren von 584 YFP-positiven Zellen 580 Zellen ebenfalls positiv für AF647 (repräsentierte proSPC), was einer Kolokalisation von 99,30 % entsprach. Umgekehrt waren von 506 AF 647-positiven Zellen 503 Zellen auch positiv für YFP, was eine Kolokalisation von 99,41 % darstellte.

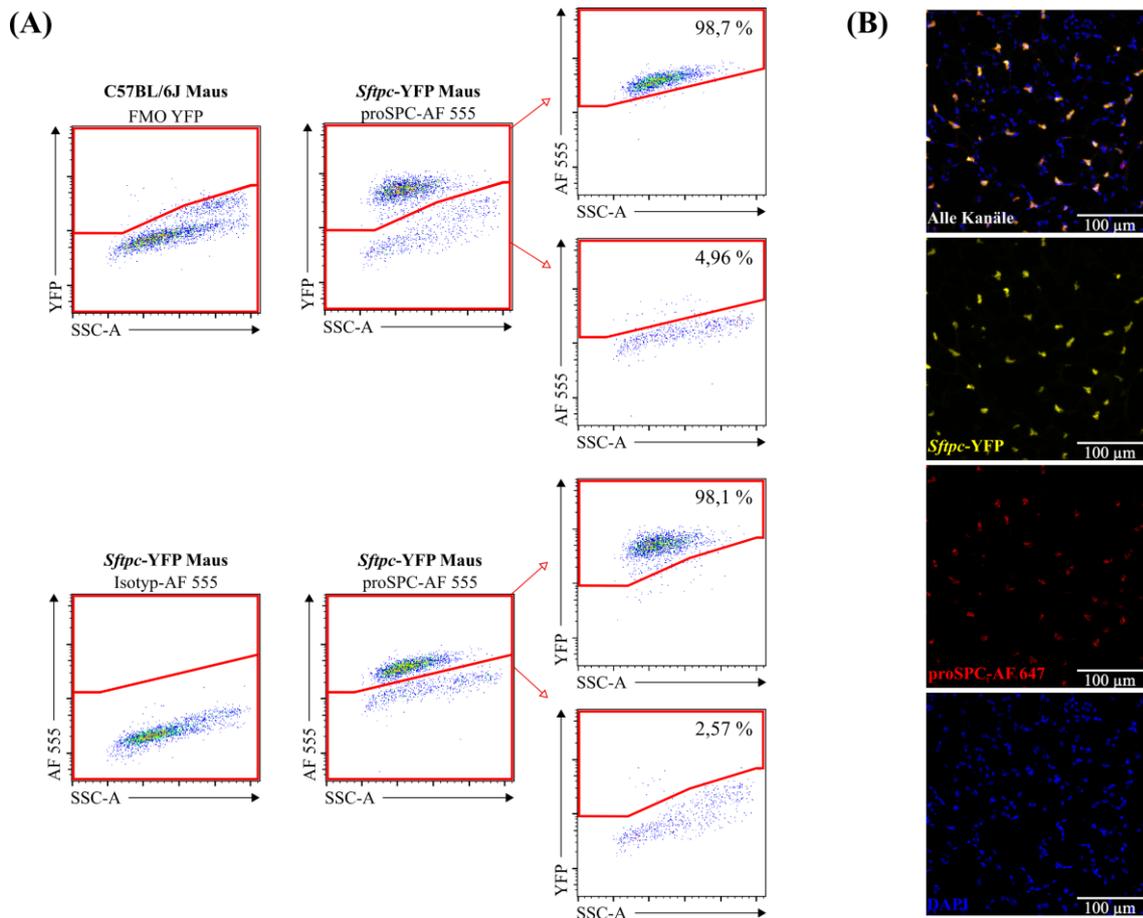


Abbildung 12: Kolokalisation zwischen der pro-Surfactant Protein C (proSPC)-Färbung und dem Yellow Fluorescent Protein (YFP) der *Sftpc*-YFP Mäuse. Es wurden *Sftpc*-YFP Mauslungen verwendet, die zusätzlich für proSPC gefärbt wurden. (A) Es ist die *Gating*-Strategie für die Durchflusszytometrie veranschaulicht. (A, obere Reihe) Als erstes wurde die *Side-Scatter Area* (SSC-A) versus YFP aufgetragen und es konnte eine separate YFP-positive-Population in den *Sftpc*-YFP Mauslungen im Gegensatz zu den C57BL/6J Mäusen detektiert werden. Die C57BL/6J Mauslungen dienten also als *Fluorescence Minus One* (FMO) Kontrolle. Die YFP-positive-Population wurde dann ausgewählt und alternativ in einem Punktdiagramm dargestellt, in dem die SSC-A versus das Alexa Fluor 555 (AF 555) aufgetragen wurde. Das AF 555 repräsentierte dabei die proSPC-Färbung. Die YFP-negative-Population wurde auf gleiche Weise dargestellt. (A, untere Reihe) Als Nächstes wurde die SSC-A versus AF 555 aufgetragen und es konnte eine AF 555-positive-Population detektiert werden. Diese war in Mauslungen, die mit dem Isotyp-Kontrollantikörper versetzt waren, nicht zu sehen. Die AF 555-Population wurde dann ausgewählt und alternativ in einem Punktdiagramm dargestellt, in dem die SSC-A versus das YFP aufgetragen wurde. Gleichermäßen wurde die AF 555-negative-Population abgebildet. (B) Es ist die Kolokalisation in den immunfluoreszenzgefärbten Gefrierschnitten (alle Kanäle) sowie jede einzelne Färbung separat dargestellt. Das Alexa Fluor 647 (AF 647) repräsentierte hierbei die proSPC-Färbung. Das 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) diente der Gegenfärbung der Zellkerne. Modifiziert nach Dzhuraev et al. 2019.

3.2.3 Validierung der Beads-Zählmethode und der Herstellung von Einzelzellen

In der Durchflusszytometrie wurden sowohl für die C57BL/6J – als auch für die *Sftpc*-YFP Mauslungen durchgehend niedrigere absolute AEZ2-Zahlen im Vergleich zur Stereologie geschätzt. Aus diesem Grund sollten mögliche Fehlerquellen abgeklärt werden, die zu falsch niedrigen AEZ2-Zahlen in der Durchflusszytometrie hätten führen können. Dazu wurde zum einen die Beads-Zählmethode validiert, um zu testen, ob diese überhaupt für die Schätzung von absoluten Zellzahlen geeignet ist. Zum anderen wurde untersucht, wie erfolgreich die Herstellung von Einzelzellsuspensionen gelungen war. Denn wenn viele AEZ2 nicht einzeln, sondern als Doubletten (oder als höhere Aggregate) vorgelegen hätten, wären sie trotzdem als Einzelzellen gezählt worden und das Ergebnis wäre fälschlicherweise zu niedrig.

Für die Beads-Validierung wurde in einem Diagramm (Abb. 13A) die prognostizierte Zellzahl *versus* die mit den Zähl-Beads geschätzte Zellzahl aufgetragen, wobei eine starke Korrelation ersichtlich wurde (durchgezogene schwarze Linie, $R^2 = 0,999$). Bei der Validierung der Herstellung von Einzelzellsuspensionen konnten keine Doubletten oder höhere Aggregate von AEZ2 festgestellt werden (Abb. 13B)

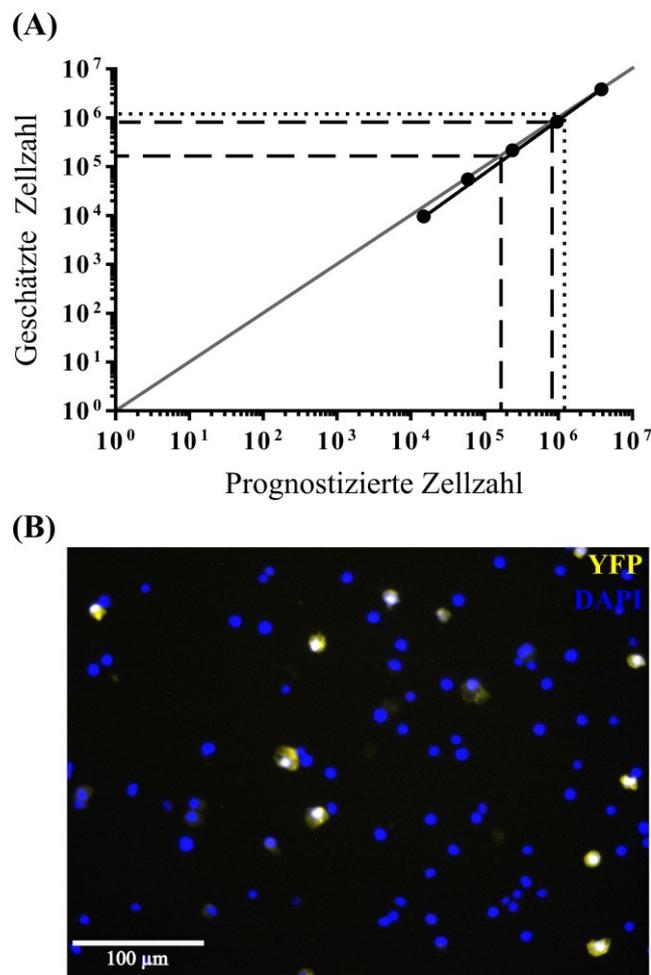


Abbildung 13: Validierung der Beads-Zählmethode und der Herstellung von Einzelzellen. (A) Es ist die Validierung der Beads-Zählmethode illustriert. Die prognostizierte Zellzahl wurde *versus* die mit den Zähl-Beads geschätzte Zellzahl aufgetragen, wobei eine starke Korrelation ersichtlich wurde (durchgezogene schwarze Linie, $R^2 = 0,999$). Diese Korrelation wurde durch eine nichtlineare Regression (log-log Linie) ermittelt. Zum Vergleich zeigt die durchgezogene graue Linie eine perfekte Korrelation ($R^2 = 1, m = 1$, Achsenschnittpunkt bei 0). Außerdem lagen die in den Hauptexperimenten der Durchflusszytometrie geschätzten absoluten Anzahlen von Alveolarepithelzellen Typ 2 (AEZ2) sowohl für die C57BL/6J- als auch für die *Sftpc*-YFP Mäuse im Messbereich der Beads-Validierung, wobei in den Hauptexperimenten jeweils nur $\frac{1}{10}$ der Probe untersucht wurde. Die gestrichelte Linie stellt dementsprechend den höchsten- und den niedrigsten geschätzten Wert für die absolute AEZ2-Zahl dar, der in $\frac{1}{10}$ der jeweiligen Probe durch die Durchflusszytometrie geschätzt wurde. Zum Vergleich wurde genauso der höchste durch die Stereologie geschätzte Wert äquivalent als $\frac{1}{10}$ dargestellt (gepunktete Linie) und befand sich auch im Messbereich der Beads-Validierung. (B) Zur Validierung der Herstellung von Einzelzellen wurde aus einer *Sftpc*-YFP Mauslunge eine Suspension hergestellt und diese in einer Zytospin-Zentrifuge auf einen Objektträger konzentriert. Der Objektträger wurde anschließend in einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die AEZ2 wurden durch die *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) -positiven Zellen repräsentiert. Das 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) diente der Gegenfärbung der Zellkerne. Modifiziert nach Dzhurav et al. 2019.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Mithilfe der Stereologie wurden sowohl für die C57BL/6J- als auch für die *Sftpc*-YFP Mauslungen deutlich höhere absolute AEZ2-Zahlen im Vergleich zur Durchflusszytometrie geschätzt. So wurden bei den ungefähr 7 Wochen alten, männlichen C57BL/6J Mäusen mit der Durchflusszytometrie 41 % weniger AEZ2 geschätzt als auf stereologischem Wege ($6,3 \pm 1,2 \times 10^6$ versus $10,7 \pm 1,4 \times 10^6$). Bei den ungefähr 7 Wochen alten, männlichen *Sftpc*-YFP Mäusen wurden mit der Durchflusszytometrie sogar 77 % weniger AEZ2 im Vergleich zur Stereologie geschätzt ($2,1 \pm 0,4 \times 10^6$ versus $9,0 \pm 0,7 \times 10^6$).

4.2 Diskussion der Methoden

4.2.1 Stereologie

Die Stereologie gilt als der Goldstandard zur quantitativen Schätzung der Lungenstruktur (Mühlfeld und Ochs 2013; Ochs und Mühlfeld 2013) und wird von der American Thoracic Society und der European Respiratory Society empfohlen (Hsia et al. 2010). So hat die Stereologie in den letzten Jahren einen großen Aufschwung verzeichnen können (Weibel 2013) und ist vermehrt das Mittel der Wahl geworden, um pathologische Veränderungen der Lungenstruktur im Rahmen von Krankheiten zu untersuchen (Mühlfeld et al. 2015; Mühlfeld und Ochs 2013; Ochs und Mühlfeld 2013; Surate Solaligue et al. 2017; Weibel 2017), aber auch um die parenchymale (Herring et al. 2014; Hoang et al. 2018; Hyde et al. 2004; Knust et al. 2009; Ochs, Nyengaard et al. 2004; Pozarska et al. 2017; Wulfsohn et al. 2010) und vaskuläre (Knust et al. 2009; Mühlfeld et al. 2018; Willführ et al. 2015) Struktur von gesunden reifen und unreifen Lungen zu quantifizieren. Während die Stereologie auf diesen Gebieten bereits große Anwendung findet, gibt es nur wenige Studien, die die Stereologie verwenden, um Zellen oder zelluläre Elemente in der Lunge zu quantifizieren (Bratu et al. 2014; Jansing et al. 2018; Jung et al. 2005; Knudsen et al. 2007; Knudsen et al. 2014; Mühlfeld et al. 2017; Ochs, Knudsen et al. 2004). Das ist unter anderem dadurch bedingt, dass die Stereologie im Vergleich zu anderen Methoden wie der Durchflusszytometrie eine viel zeit- und arbeitsintensivere Methode darstellt. Des Weiteren ist es sehr wichtig, für die Stereologie

das Studiendesign entsprechend der Anforderungen sorgfältig zu planen, mit Pilotstudien zu kontrollieren und die Experimente standardisiert durchzuführen, um erwartungstreue (*unbiased*) Resultate zu erhalten (Hsia et al. 2010; Mühlfeld und Ochs 2013; Ochs und Mühlfeld 2013).

So wurden in dieser Studie die AEZ2 als Zelltyp ausgewählt, weil sie mit einem spezifischen intrazellulären Marker (pro-Surfactant Protein C, proSPC) identifiziert werden können und als annähernd kubisch geformte Zellen keine länglichen Vorwölbungen oder Fortsätze aufweisen, was die Zählung in den *Disector*-Paaren hätte erschweren können.

Damit etwas gezählt werden kann, muss es natürlich auch sichtbar sein. Aus diesem Grund wurde in einer Pilotstudie das Protokoll für die immunhistochemische Färbung des proSPC als intrazellulären Marker für die AEZ2 optimiert (siehe Abb. 6).

Da allerdings eine immunhistochemische Färbung verwendet wurde, mussten die Lungen mit Paraformaldehyd fixiert werden, weil dieses die Protein-Immunogenität im Gegensatz zu den meisten anderen Fixationsmethoden nicht vollständig zerstört (Griffiths 1993; Hsia et al. 2010; Skepper 2000). Das Paraformaldehyd führt jedoch zu einer Schrumpfung des Gewebes (Boyce et al. 2010; Dorph-Petersen et al. 2001; Schneider und Ochs 2014). Das bedeutet, dass die in histologischen Schnitten gezählten Zellzahlen nicht auf ein Referenzvolumen hochgerechnet werden können, um die absolute Anzahl von AEZ2 zu schätzen. Daher wurde der *Physical Fractionator* als stereologisches Werkzeug angewendet (Gundersen 1986), welcher eine Kombination aus dem *Fractionator* und dem *Physical Disector* darstellt. Mithilfe des *Fractionator*-Prinzips ist es nämlich möglich trotz der Gewebeschrumpfung die absolute Anzahl von AEZ2 zu schätzen. Da der Unterschied zwischen den Ergebnissen der Stereologie und Durchflusszytometrie sehr groß war und die Messbereiche sich nicht überlappten, wurden keine weiteren Verfeinerungen am *Fractionator* vorgenommen. Das heißt, die Verwendung des sogenannten *Smooth Fractionator* zur Verringerung der Streuung der Einzelwerte (Gundersen 2002) wurde deswegen für diese Arbeit nicht als notwendig befunden.

Außerdem ist zu beachten, dass für den *Physical Disector* die *Disector*-Höhe als Empfehlung $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{4}$ der mittleren Höhe des untersuchten Zelltyps betragen sollte, damit keine Zellen zwischen den beiden Schnitten (Referenz- und Nachschauschnitt) des *Disector*-Paares verloren gehen und gleichzeitig effizient gezählt werden kann (Boyce et al. 2010; Gundersen et al. 1988; Schneider und Ochs 2013). Aus diesem Grund wurde in

einer Pilotstudie die mittlere Höhe der AEZ2 geschätzt. Dazu wurden die Haupt- und Nebenachsen von 50 proSPC-gefärbten AEZ2 mithilfe der Software Image J gemessen und daraus der Mittelwert von ungefähr 8,5 μm gebildet. Die verwendete *Disector*-Höhe von 3 μm entsprach dann den Empfehlungen.

4.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wird routinemäßig in der klinischen Diagnostik benutzt, sowohl bei benignen als auch malignen hämatologischen Prozessen (Brown und Wittwer 2000; Carey et al. 2007).

Dabei können sogenannte Zähl-Beads (*counting beads*) als ein interner Standard verwendet werden, um die absolute Zellzahl in einem Probevolumen zu schätzen (Frey 2016; Gratama 2007; Mandy et al. 2003). Durch den Gebrauch der Zähl-Beads ist es daher möglich, konventionelle Durchflusszytometer einzusetzen, die im Gegensatz zur neuen Gerätegeneration keine exakten Volumina messen können (Alkhatatbeh et al. 2018; Frey 2016). Besonders zur Quantifizierung von Lymphozyten-Subpopulationen werden die Zähl-Beads im klinischen Alltag oft gebraucht (Frey 2016; Gratama 2007; Mandy et al. 2003). In dieser Studie wurden die Zähl-Beads allerdings, soweit dem Autor bekannt, zum ersten Mal für die Untersuchung der Lungenbiologie verwendet.

Der Vorteil der Durchflusszytometrie gegenüber der Stereologie besteht vor allem darin, dass es viel weniger Zeit und Arbeit in Anspruch nimmt. Der Nachteil für die vorliegende Arbeit war, dass die Lunge als Festkörper im Gegensatz zu beispielsweise Blut erst einmal aufgelöst (dissoziiert) werden musste, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Das bedeutet, dass dadurch Zellen möglicherweise zerstört oder gar nicht erst herausisoliert wurden, was Gründe für die niedrigere absolute Anzahl von AEZ2 im Gegensatz zur Stereologie sein könnten. Ein weiterer Nachteil für diese Studie ist, dass während der Herstellung der Einzelzellsuspension viele Waschschrte durchgeführt werden mussten, was ebenso das Risiko eines potentiellen Zellverlustes birgt. In der hämatologischen Routinediagnostik (z. B. Quantifizierung von Lymphozyten-Subpopulationen) werden deshalb oft spezielle Kits verwendet, die die Erythrozyten sanft lysieren, die Leukozyten erhalten und ohne Waschschrte auskommen. Diese Vorgehensweise wird als *Lyse/No-Wash-Methode* bezeichnet (Frey 2016).

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Zuerst wurde die absolute Anzahl von AEZ2 für die ungefähr 7 Wochen alten, männlichen C57BL/6J Mäuse geschätzt. Mit der Stereologie wurden dabei $10,7 \pm 1,4 \times 10^6$ geschätzt. Dieser Wert deckt sich mit anderen Berichten, für die etwas ältere, 12 Wochen alte Mäuse verwendet wurden und die Zählung mit dem *Physical Disector* ausgeführt wurde: $7,7 \pm 1,9 \times 10^6$ (Knudsen et al. 2007); $9,7 \pm 0,4 \times 10^6$ (Knudsen et al. 2014); und $13 \pm 1,0 \times 10^6$ (Ochs, Knudsen et al. 2004). Der daraus gebildete Mittelwert ergibt $10,1 \times 10^6$ AEZ2, was im Einklang mit den $10,7 \times 10^6$ AEZ2 aus dieser Studie ist. Mit der Durchflusszytometrie wurden für die 7 Wochen alten, männlichen C57BL/6J Mäuse hingegen 41 % weniger AEZ2 geschätzt als auf stereologischem Weg ($6,3 \pm 1,2 \times 10^6$ versus $10,7 \pm 1,4 \times 10^6$). Es wurde leider keine Vergleichsstudie gefunden, in der schon mal die absolute Anzahl von AEZ2 in C57BL/6J Mauslungen mithilfe der Durchflusszytometrie geschätzt wurde.

Da der Unterschied zwischen der Stereologie und Durchflusszytometrie so groß war, wurde die absolute Anzahl von AEZ2 als nächstes in den ungefähr 7 Wochen alten, männlichen *Sftpc*-YFP Mäusen geschätzt. Die *Sftpc*-YFP Mäuse exprimierten dabei YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) unter der Kontrolle des *Sftpc*-Promoters (Surfactant Protein C), sodass die AEZ2 bereits mit YFP markiert waren. Das heißt also, im Gegensatz zu den C57BL/6J Mäusen mussten die AEZ2 der *Sftpc*-YFP Mäuse für die Durchflusszytometrie nicht mehr permeabilisiert und gefärbt werden, was ansonsten mit vielen Waschschritten einhergeht und eine potentielle Quelle für einen Zellverlust darstellt. Dementsprechend war die Hypothese, dass für die *Sftpc*-YFP Mäuse mehr AEZ2 mit der Durchflusszytometrie geschätzt werden und die Differenz zur Stereologie kleiner wird. Um eine mögliche Fehlerquelle im Vorhinein auszuschließen, wurde zunächst die Kolokalisation (Ausmaß der Überlappung) zwischen der intrazellulären proSPC-Färbung und dem YFP sowohl in histologischen Gefrierschnitten als auch im Durchflusszytometer geschätzt. Hierbei konnte eine fast vollständige Kolokalisation ermittelt werden. Von daher wurde es nicht als ein Hindernis gesehen, die AEZ2 der *Sftpc*-YFP Mäuse für die Stereologie auch immunhistochemisch für das proSPC zu färben. In einer Pilotstudie wurde nämlich herausgefunden, dass das sensitive YFP durch das Einbetten in Paraffin und die folgende Deparaffinierung abblasst und somit das Zählen in der Stereologie erschwert wird. Für die Detektion der AEZ2 in der Durchflusszytometrie wurde wie erwähnt das YFP benutzt. Entgegen der ursprünglichen Hypothese wurden für

die ungefähr 7 Wochen alten, männlichen *Sftpc*-YFP Mäuse mit der Durchflusszytometrie sogar 77 % weniger AEZ2 im Vergleich zur Stereologie geschätzt ($2,1 \pm 0,4 \times 10^6$ versus $9,0 \pm 0,7 \times 10^6$). Das bedeutet, für die *Sftpc*-YFP Mäuse wurden im Vergleich zu den C57BL/6J Mäusen durchflusszytometrisch sogar noch weniger AEZ2 geschätzt ($2,1 \pm 0,4 \times 10^6$ versus $6,3 \pm 1,2 \times 10^6$), obwohl weniger Schritte (insbesondere Waschschrte) benötigt wurden. Ein Erklärungsansatz für dieses unerwartete Ergebnis könnte sein, dass die lebenden, nicht permeabilisierten YFP-markierten AEZ2 sensitiver waren und bei der Herstellung der Einzelzellsuspensionen vermehrt zerstört wurden, sodass sie als Bruchstücke herausgegetet wurden. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte auch die Mausstamm-Herkunft sein, da für die *Sftpc*-YFP Mäuse auch mit der Stereologie ungefähr 1,7 Millionen weniger AEZ2 als für die C57BL/6J Mäuse geschätzt wurden ($9,0 \pm 0,7 \times 10^6$ versus $10,7 \pm 1,4 \times 10^6$). Die verwendeten Wildtyp-Mäuse hatten eine pure C57BL/6J Herkunft, die *Sftpc*-YFP Mäuse hingegen hatten eine gemischte Stammherkunft. Dieser herkunftbezogene Effekt könnte also ebenfalls dazu beigetragen haben, dass für die *Sftpc*-YFP Mäuse durchflusszytometrisch weniger AEZ2 geschätzt wurden als für C57BL/6J Mäuse. Nur in einer weiteren Studie (Jansing et al. 2018) wird die absolute Anzahl von AEZ2 mithilfe der Durchflusszytometrie für eine genetisch veränderte Maus geschätzt und ein Wert von $2,6 \times 10^6$ berichtet. Dieser Wert ist im Einklang mit den hier geschätzten $2,1 \times 10^6$ AEZ2 für die *Sftpc*-YFP Mäuse. In der Arbeit von Jansing et al. aus dem Jahr 2018 werden allerdings weder das Alter noch die Herkunft des Stamms der Mäuse angegeben.

Mit der Durchflusszytometrie wurden also sowohl für die C57BL/6J- als auch für die *Sftpc*-YFP Mäuse weniger AEZ2 geschätzt als mit der Stereologie. Außerdem ist bei Betrachtung der Ergebnisse für die beiden Maus-Stämme ersichtlich, dass die Stereologie konstantere Ergebnisse im Gegensatz zur Durchflusszytometrie produziert hat: $10,7 \times 10^6$ und $9,0 \times 10^6$ (16 % Differenz) versus $6,3 \times 10^6$ und $2,1 \times 10^6$ (67 % Differenz). Es sei aber noch einmal erwähnt, dass sich die Vorgehensweisen für die beiden Maus-Stämme für die Durchflusszytometrie deutlich voneinander unterschieden.

Verschiedene Ursachen könnten Gründe für die geringeren absoluten AEZ2-Zahlen in der Durchflusszytometrie im Vergleich zur Stereologie sein. Wie bereits erwähnt muss die Lunge für die Herstellung von Einzelzellsuspensionen für die Durchflusszytometrie erst einmal dissoziiert und im Laufe des Protokolls viele Schritte (insbesondere Waschschrte) durchgeführt werden, sodass die Zellen beschädigt, gar nicht erst herausisoliert oder gewegewaschen werden könnten. So wurden in einer Pilotstudie mit

der manuellen Dissoziation ungefähr 3-mal mehr AEZ2 geschätzt als mit der automatischen Dissoziation. Das bestätigt die Vermutung, dass die Gewebedissoziation ein entscheidender limitierender Faktor ist. Daraus folgt, dass andere Dissoziations-Protokolle vielleicht zu noch besseren Resultaten geführt hätten und der Unterschied zur Stereologie dann kleiner gewesen wäre. Die Durchflusszytometrie bleibt also nur von begrenzter Nützlichkeit bei der Schätzung von absoluten Zellzahlen aus Festkörpern wie der Lunge, solange die Herstellung von Einzelzellsuspensionen nicht verbessert wird. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass Einzelzellsuspensionen hergestellt werden können, die 100 % der ursprünglichen Zellzahl der Lunge enthalten. Das bedeutet, die Stereologie bleibt der Goldstandard zur Schätzung von absoluten Zellzahlen in Festkörpern.

In dieser Arbeit wurden allerdings noch weitere Experimente durchgeführt, um die Ursachen für die Differenz zwischen der Stereologie und Durchflusszytometrie zu explorieren. Es hätte nämlich sein können, dass die Zähl-Beads nicht richtig funktionieren und so fälschlicherweise zu wenige AEZ2 in der Durchflusszytometrie geschätzt wurden. Aus diesem Grund wurden die Zähl-Beads in einem weiteren Versuch validiert. Dazu wurden MLg-Zellen (Fibroblasten aus Mauslungen) *in vitro* kultiviert, in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt, dann verschiedene Verdünnungen hergestellt und Zähl-Beads hinzugegeben. Dabei wurde eine starke Korrelation zwischen der prognostizierten- und der mit den Zähl-Beads geschätzten Zellzahl festgestellt. Außerdem lagen die in den Hauptexperimenten der Durchflusszytometrie geschätzten absoluten AEZ2-Zahlen sowohl für die C57BL/6J- als auch für die Sftpc-YFP Mäuse im Messbereich der Beads-Validierung. Das heißt, es ist also eher unwahrscheinlich, dass aufgrund der Zähl-Beads zu niedrige absolute AEZ2-Zahlen in der Durchflusszytometrie geschätzt wurden. Weiterhin hätten auch Zellaggregate (Doubletten, Tripletten oder höhere Aggregate) zu falsch niedrigen absoluten AEZ2-Zahlen führen können, weil diese als nur eine Zelle gezählt worden wären. Da das Ziel war, möglichst viele AEZ2 einzuschließen, wurden Zellaggregate im Durchflusszytometrie-Protokoll berücksichtigt. Wobei wahrscheinlich z. B. die Doubletten nicht aus zwei AEZ2 bestanden, sondern aus einer AEZ2 und einer Zelle eines anderen Zelltyps, da die AEZ2 für gewöhnlich im Alveolus der erwachsenen Mauslunge nicht nebeneinander liegen. Es wurde allerdings die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass Zellaggregate aus AEZ2 erst nach Herstellung der Zellsuspensionen entstanden sind. In einem Zytospin-Experiment konnten jedoch keine AEZ2-Aggregate

gesehen werden, sodass diese eher unwahrscheinlich der Grund für die zu niedrigen absoluten AEZ2-Zahlen in der Durchflusszytometrie waren.

Während der Durchführung der folgenden Arbeit haben Jansing et al. 2018 ihre Studie veröffentlicht, in der sie einer ähnlichen Fragestellung nachgehen. Sie haben die Expansion der AEZ2 nach Lungen-Verletzungen untersucht. Dazu haben sie die absolute Anzahl von AEZ2 mit der Stereologie, der Durchflusszytometrie und der Planimetrie geschätzt und miteinander verglichen. Wie erwähnt wird aber leider weder Auskunft über das Alter noch über die Herkunft des Stamms der Mäuse gegeben. Außerdem ist nicht bekannt, ob sie auch Zähl-Beads oder hingegen einen Durchflusszytometer verwendet haben, welcher verlässlich das Volumen der Proben messen konnte. Im Gegensatz zu dieser Arbeit haben sie im Übrigen keinen *Physical Fractionator* (Kombination aus dem *Fractionator* und dem *Physical Disector*) sondern einen *Optical Fractionator* (Kombination aus dem *Fractionator* und dem *Optical Disector*) benutzt, für den dickere Schnitte benötigt werden. Das genaue Vorgehen des Auswählens (*Sampling*) der einzelnen Fraktionen wird allerdings auch nicht beschrieben. Weiterhin wird nicht erklärt, warum für die Stereologie der *Lobus accessorius* der Mauslungen nicht verwendet wurde. Von all dem abgesehen sind die Beobachtungen von Jansing et al. 2018 im Einklang mit den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen. Sie schätzen ebenfalls niedrigere absolute AEZ2-Zahlen in der Durchflusszytometrie im Vergleich zur Stereologie. Sie vermuten, dass es auch unter anderem daran liegen könnte, dass Verletzungen der Lunge den Zellengewinn (*recoverability*) aus dissoziiertem Lungengewebe beeinträchtigten.

Als Fazit lässt sich ziehen, dass die Stereologie das Mittel der Wahl ist, um die absolute Anzahl einer bestimmten Zellenart in der Lunge zu schätzen.

4.4 Ausblick

Die Stereologie verzeichnet ständige Fortschritte, wird effizienter und leichter durchführbar. So haben sich das theoretische Konzept, die Auswahlprinzipien (*Sampling*), die Software und die Hardware über die Jahre verbessert (Boyce et al. 2010; Howard und Reed 2010; Mouton 2003, 2011). Es wurden neue, automatisch arbeitende Scanner für histologische Schnitte entwickelt. Zudem wurde das *Disector*- und *Fractionator*-Prinzip eingeführt (Gundersen 1986; Sterio 1984), aber auch der *Autodisector*TM und *Proportionator* (Gardi et al. 2008; Keller et al. 2013) als Modul in der Visiopharm Software integriert. Der *Autodisector*TM leitet dabei intuitiv durch die

Visiopharm Software und automatisiert einige Schritte, was Einiges an Zeit und Arbeit spart, wenn man mit *Physical Disector*-Paaren arbeitet (Keller et al. 2013). Der *Proportionator* bietet sich besonders dann an und führt zu mehr Effizienz, wenn die absolute Anzahl eines bestimmten Zelltyps geschätzt werden soll, welcher nur spärlich in dem untersuchten Organ oder anatomisch definiertem Gewebereich vorhanden ist (Boyce und Gundersen 2018). Außerdem gibt es Ansätze, das Zählen an sich zu automatisieren. Bislang ist es nämlich üblich, dass der stereologische Untersucher unter großem zeitlichen Aufwand manuell entscheiden muss, ob etwas gezählt wird oder nicht. In einer Veröffentlichung von Schmitz et al. aus dem Jahr 2014 (Schmitz et al. 2014) hieß es noch, dass das manuelle Zählen bevorzugt werden sollte, da das automatische Zählen zu niedrigeren Detektionsraten und höheren falschpositiven Raten führt. In einem Paper von Mouton et al. aus dem Jahr 2017 (Mouton et al. 2017) wird allerdings eine neuartige Methode für das automatische Zählen vorgestellt, die 100 % objektiv, akkurater und 8-10 mal schneller als das manuelle Zählen sein soll. Es bleibt abzuwarten, ob sich diese Methode etabliert.

5 Zusammenfassung

Das Zählen und Schätzen von Zellen ist eine Aktivität, die routinemäßig sowohl in der medizinischen Diagnostik als auch in der Zell- und Molekularbiologie durchgeführt wird. Oftmals verlassen sich die Untersucher auf relative Zellzahlen. Das bedeutet beispielsweise, dass die Menge eines geschätzten Zelltyps entweder im Verhältnis zu einem Gewebevolumen, zu einer bestimmten Querschnittsfläche oder zu anderen Zellen gesetzt wird. In Studien, in denen allerdings insbesondere die Organentstehung und -entwicklung aber auch der pathologische Umbau und die Reparatur eines Gewebes erforscht werden, können sich sowohl das Volumen, als auch die Zellmenge und -zusammensetzung in dem untersuchten Gewebeabschnitt sehr schnell und in großem Umfang verändern. In diesem Fall könnte die erwartungstreue Schätzung der absoluten Anzahl eines bestimmten Zelltyps aufschlussreicher sein. Zu diesem Zweck dient die Stereologie als der Goldstandard, ist jedoch eine vergleichsweise arbeitsintensive und zeitaufwendige Methode. Aus diesem Grund sollten in dieser Arbeit alternative Methoden zur Schätzung von absoluten Zellzahlen untersucht werden. Die Durchflusszytometrie wurde als eine solche schnelle und weniger arbeitsintensive Methode in Erwägung gezogen, die die Stereologie ersetzen könnte. Deshalb wurden die Stereologie als der Goldstandard und die Durchflusszytometrie als die alternative Methode miteinander verglichen und zwar bei der Schätzung der absoluten Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 (AEZ2) in den Lungen von zwei Mausstämmen: in den Wildtyp-Mäusen C57BL/6J und in den *Sftpc*-YFP Mäusen.

Unter Verwendung der Durchflusszytometrie wurden in beiden Mausstämmen erheblich weniger AEZ2 geschätzt. Für die Wildtyp-Mäuse C57BL/6J wurden mithilfe der Durchflusszytometrie 41 % weniger AEZ2 im Vergleich zur Stereologie geschätzt ($6,3 \pm 1,2$ Millionen *versus* $10,7 \pm 1,4$ Millionen). Für die *Sftpc*-YFP Mäuse wurden bei Gebrauch der Durchflusszytometrie sogar 77 % weniger AEZ2 im Vergleich zur Stereologie geschätzt ($2,1 \pm 0,4$ Millionen *versus* $9,0 \pm 0,7$ Millionen). Diese Daten legen nahe, dass bei der Durchflusszytometrie der Zellgewinn aus dem dissoziierten Lungengewebe beeinträchtigt sein könnte, was zu einer niedrigeren Schätzung der absoluten Anzahl von AEZ2 führt. Das Fazit dieser Studie ist, dass die Stereologie die Methode der Wahl bei der erwartungstreuen Schätzung der absoluten Anzahl von Zellen in einem Organ bleibt.

6 Summary

Counting and estimation of cells is an activity performed routinely in both medical diagnostics and cell and molecular biology research. Often, investigators rely on relative numbers of cells. This means for instance, that they put the abundance of a particular cell-type either in relation to the tissue volume, to a defined cross-sectional area or to other cells. However, especially in studies on organ genesis and development, and also pathological tissue remodelling and repair, the tissue volume may change rapidly and in a great amount, as well as the cell abundance, and the cell composition in the investigated tissue space. In such cases, the unbiased estimation of the absolute cell number of a particular cell-type could be more instructive. For this purpose, stereology serves as the gold standard, but is a comparatively labour-intensive and time-consuming approach. Therefore, the aim of this study was to examine alternative methods for the estimation of absolute cell numbers. Flow cytometry was considered as such a faster and less work-intensive method, which could replace stereology. Hence, stereology as the gold standard and flow cytometry as the alternative were compared by estimation of the absolute number of alveolar epithelial type 2 cells (AEC2) in the lungs of two mouse strains: wild type C57BL/6J mice and *Sftpc*-YFP mice.

Substantially fewer AEC2 were estimated using flow cytometry in both mouse strains. For the wild type C57BL/6J mice, 41 % fewer AEC2 were estimated by using flow cytometry compared to stereology (6.3 ± 1.2 million *versus* 10.7 ± 1.4 million). For the *Sftpc*-YFP mice, even 77 % fewer AEC2 were estimated by using flow cytometry in contrast to stereology (2.1 ± 0.4 million *versus* 9.0 ± 0.7 million). These data suggest that there might be an impaired recoverability of AEC2 from dissociated lung tissue for flow cytometry, which leads to an underestimation of the absolute AEC2 number. The conclusion of this study is that stereology remains the method of choice for unbiased estimation of the absolute number of cells in an organ.

7 Abkürzungsverzeichnis

Kürzel	Bedeutung
Abb.	Abbildung
AEZ2	Alveolarepithelzellen Typ 2
AF	Alexa Fluor
APC	Allophycocyanin
asf	<i>area sampling fraction</i>
bsf	<i>block sampling fraction</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cm	Zentimeter
CV	<i>Coefficient of Variation</i>
°C	Grad Celsius
d	Dicke
D	Dimension, -dimensional
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNase	Desoxyribonuklease
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
et al.	und andere
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC-A	<i>Forward-Scatter Area</i>
FSC-H	<i>Forward-Scatter Height</i>
G	Gauge
g	Gramm
h	<i>hour(s)</i> oder Höhe
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobulin G
Kap.	Kapitel

Kat. Nr	Katalog Nummer
l	Liter
M	Molar
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>Phosphate buffered saline mit TWEEN® 20</i>
PE/Cy7	Phycoerythrin/Cyanin 7
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
proSPC	pro-Surfactant Protein C
P+S	Penicillin + Streptomycin
rpm	<i>revolutions per minute</i>
s	Sekunde(n)
SD	Standardabweichung
Sftpc	Surfactant Protein C
SSC-A	<i>Side-Scatter Area</i>
ssf	<i>section sampling fraction</i>
SSS-W	<i>Side-Scatter Width</i>
SURS	<i>Systematic Uniform Random Sampling</i>
Tab.	Tabelle
U	<i>Units</i>
W	Watt
w	<i>weight</i>
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
z. B.	zum Beispiel

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des <i>Physical Disector</i> -Prinzips.....	7
Abbildung 2:	Schematische Illustration des Konzepts von Erwartungstreue und Präzision.....	9
Abbildung 3:	Schematischer Überblick der Probenauswahl (<i>Sampling</i>) und der Zählung der Alveolarepithelzellen Typ 2 unter Verwendung des <i>Physical Fractionators</i>	22
Abbildung 4:	Schematischer Überblick des Durchflusszytometrie-Protokolls für eine C57BL/6J Maus.....	31
Abbildung 5:	Schematischer Überblick des Durchflusszytometrie-Protokolls für eine <i>Sftpc</i> -YFP Maus.....	31
Abbildung 6:	Zählung der Alveolarepithelzellen Typ 2 unter Verwendung des <i>Physical Disector</i> -Prinzips.....	36
Abbildung 7:	Schätzung der absoluten Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 in C57BL/6J Mäusen durch die Durchflusszytometrie.....	37
Abbildung 8:	Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 in C57BL/6J Mäusen: Vergleich zwischen Stereologie und Durchflusszytometrie.....	39
Abbildung 9:	Schätzung der absoluten Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 in <i>Sftpc</i> -YFP Mäusen durch die Durchflusszytometrie.....	40
Abbildung 10:	Anzahl von Alveolarepithelzellen Typ 2 in <i>Sftpc</i> -YFP Mäusen: Vergleich zwischen Stereologie und Durchflusszytometrie.....	41
Abbildung 11:	Vergleich zwischen der manuellen und automatischen Dissoziation für die Durchflusszytometrie.....	42
Abbildung 12:	Kolokalisation zwischen der pro-Surfactant Protein C (proSPC)-Färbung und dem <i>Yellow Fluorescent Protein</i> (YFP) der <i>Sftpc</i> -YFP Mäuse.....	43
Abbildung 13:	Validierung der Beads-Zählmethode und der Herstellung von Einzelzellen.....	45

Abbildung 14: Begründung der Gating-Strategie für die Alveolarepithelzellen Typ 2.....	70
Abbildung 15: Backgating zur Validierung der Gating-Strategie für die Alveolarepithelzellen Typ 2.....	71

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Sequenz der Gewebedehydratation und Paraffininfiltration.....	20
------------	---	----

10 Literaturverzeichnis

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y. & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology* 37 (2), 163–176.
- Alkhatatbeh, M. J., Enjeti, A. K., Baqar, S., Ekinci, E. I., Liu, D., Thorne, R. F. & Lincz, L. F. (2018). Strategies for enumeration of circulating microvesicles on a conventional flow cytometer: Counting beads and scatter parameters. *Journal of circulating biomarkers* 7, 1849454418766966.
- Baddeley, A. & Vedel Jensen, E. B. (2005). *Stereology for statisticians* (Monographs on statistics and applied probability, Bd. 103). Boca Raton, Fla.: Chapman & Hall/CRC.
- Bettors, D. M. (2015). Use of Flow Cytometry in Clinical Practice. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology* 6 (5), 435–440.
- Bolender, R. P., Hyde, D. M. & Dehoff, R. T. (1993). Lung morphometry: a new generation of tools and experiments for organ, tissue, cell, and molecular biology. *The American journal of physiology* 265 (6 Pt 1), L521-48.
- Boyce, R. W. & Gundersen, H. J. G. (2018). The Automatic Proportionator Estimator Is Highly Efficient for Estimation of Total Number of Sparse Cell Populations. *Frontiers in neuroanatomy* 12, 19.
- Boyce, R. W., Dorph-Petersen, K.-A., Lyck, L. & Gundersen, H. J. G. (2010). Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number. *Toxicologic pathology* 38 (7), 1011–1025.
- Braendgaard, H. & Gundersen, H. J. (1986). The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. *Journal of neuroscience methods* 18 (1-2), 39–78.
- Bratu, V. A., Erpenbeck, V. J., Fehrenbach, A., Rausch, T., Rittinghausen, S., Krug, N., Hohlfeld, J. M. & Fehrenbach, H. (2014). Cell counting in human endobronchial biopsies--disagreement of 2D versus 3D morphometry. *PloS one* 9 (3), e92510.
- Brown, M. & Wittwer, C. (2000). Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical chemistry* 46 (8 Pt 2), 1221–1229.
- Carey, J. L., McCoy, J. P. & Keren, D. F. (2007). *Flow cytometry in clinical diagnosis* (4th ed.). Chicago, IL: American Society for Clinical Pathology.

- Cochran, W. G. (1977). *Sampling techniques* (A Wiley publication in applied statistics, 3. ed.). New York: Wiley.
- Cruz-Orive, L. M. & Weibel, E. R. (1981). Sampling designs for stereology. *Journal of microscopy* 122 (Pt 3), 235–257.
- Dorph-Petersen, K. A., Nyengaard, J. R. & Gundersen, H. J. (2001). Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *Journal of microscopy* 204 (Pt 3), 232–246.
- Endale, M., Ahlfeld, S., Bao, E., Chen, X., Green, J., Bess, Z., Weirauch, M. T., Xu, Y. & Perl, A. K. (2017). Temporal, spatial, and phenotypical changes of PDGFR α expressing fibroblasts during late lung development. *Developmental biology* 425 (2), 161–175.
- Fehrenach H, O. M. (1998). Studying lung ultrastructure. In S. Uhlig & A. E. Taylor (Hrsg.), *Methods in Pulmonary Research* (S. 429–454). Basel: Birkhäuser Basel; Imprint; Birkhäuser.
- Frey, O. (2016). Testkits und Fertigreagenzien in der Durchflusszytometrie. In U. Sack (Hrsg.), *Zelluläre Diagnostik und Therapie* (S. 52–72). Berlin/Boston: De Gruyter.
- Gardi, J. E., Nyengaard, J. R. & Gundersen, H. J. G. (2008). Automatic sampling for unbiased and efficient stereological estimation using the proportionator in biological studies. *Journal of microscopy* 230 (Pt 1), 108–120.
- Golub, V. M., Brewer, J., Wu, X., Kuruba, R., Short, J., Manchi, M., Swonke, M., Younus, I. & Reddy, D. S. (2015). Neurostereology protocol for unbiased quantification of neuronal injury and neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience* 7.
- Gompf, A. (2016). Grundlagen der Durchflusszytometrie. In U. Sack (Hrsg.), *Zelluläre Diagnostik und Therapie* (S. 1–28). Berlin/Boston: De Gruyter.
- Gratama, J. W. (2007). *Enumeration of immunologically defined cell populations by flow cytometry. Approved guideline* (Clinical and Laboratory Standards Institute, v. 27 no. 16, 2nd ed.). Wayne, Pa.: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Griffiths, G. (1993). *Fine Structure Immunocytochemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- Gundersen, H. J. (1986). Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *Journal of microscopy* 143 (Pt 1), 3–45.
- Gundersen, H. J. (1992). Stereology: the fast lane between neuroanatomy and brain function--or still only a tightrope? *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum* 137, 8–13.
- Gundersen, H. J., Bagger, P., Bendtsen, T. F., Evans, S. M., Korbo, L., Marcussen, N., Møller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J. R. & Pakkenberg, B. (1988). The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 96 (10), 857–881.
- Gundersen, H. J. & Jensen, E. B. (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of microscopy* 147 (Pt 3), 229–263.
- Gundersen, H. J. & Osterby, R. (1981). Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'do more less well!'. *Journal of microscopy* 121 (Pt 1), 65–73.
- Gundersen, H. J. G. (2002). The smooth fractionator. *Journal of microscopy* 207 (Pt 3), 191–210.
- Gundersen, H. J. G. (1977). Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *Journal of microscopy* 111 (2), 219–223.
- Haug, H., Kühl, S., Mecke, E., Sass, N. L. & Wasner, K. (1984). The significance of morphometric procedures in the investigation of age changes in cytoarchitectonic structures of human brain. *Journal fur Hirnforschung* 25 (4), 353–374.
- Herring, M. J., Putney, L. F., Wyatt, G., Finkbeiner, W. E. & Hyde, D. M. (2014). Growth of alveoli during postnatal development in humans based on stereological estimation. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 307 (4), L338-44.
- Hoang, T.-V., Nardiello, C., Surate Solaligue, D. E., Rodríguez-Castillo, J. A., Rath, P., Mayer, K., Vadász, I., Herold, S., Ahlbrecht, K., Seeger, W. & Morty, R. E. (2018). Stereological analysis of individual lung lobes during normal and aberrant mouse lung alveolarisation. *Journal of anatomy* 232 (3), 472–484.

- Howard, C. V. & Reed, M. G. (2010). *Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy* (2nd ed.). Liverpool: QTP.
- Howell, K., Hopkins, N. & Mcloughlin, P. (2002). Combined confocal microscopy and stereology: a highly efficient and unbiased approach to quantitative structural measurement in tissues. *Experimental physiology* 87 (6), 747–756.
- Hsia, C. C., Fryder-Doffey, F., Stalder-Nayarro, V., Johnson, R. L., Reynolds, R. C. & Weibel, E. R. (1993). Structural changes underlying compensatory increase of diffusing capacity after left pneumonectomy in adult dogs. *Journal of Clinical Investigation* 92 (2), 758–764.
- Hsia, C. C. W., Hyde, D. M., Ochs, M. & Weibel, E. R. (2010). An Official Research Policy Statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: Standards for Quantitative Assessment of Lung Structure. *American journal of respiratory and critical care medicine* 181 (4), 394–418.
- Hyde, D. M., Tyler, N. K., Putney, L. F., Singh, P. & Gundersen, H. J. G. (2004). Total number and mean size of alveoli in mammalian lung estimated using fractionator sampling and unbiased estimates of the Euler characteristic of alveolar openings. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 277 (1), 216–226.
- Iwadare, T., Mori, H., Ishiguro, K. & Takeishi, M. (1984). Dimensional changes of tissues in the course of processing. *Journal of microscopy* 136 (3), 323–327.
- Jansing, N. L., Patel, N., McClendon, J., Redente, E. F., Henson, P. M., Tuder, R. M., Hyde, D. M., Nyengaard, J. R. & Zemans, R. L. (2018). Flow Cytometry Underestimates and Planimetry Overestimates Alveolar Epithelial Type 2 Cell Expansion after Lung Injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* 198 (3), 390–392.
- Jung, A., Allen, L., Nyengaard, J. R., Gundersen, H. J. G., Richter, J., Hawgood, S. & Ochs, M. (2005). Design-based stereological analysis of the lung parenchymal architecture and alveolar type II cells in surfactant protein A and D double deficient mice. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 286 (2), 885–890.

- Keller, K. K., Andersen, I. T., Andersen, J. B., Hahn, U., Stengaard-Pedersen, K., Hauge, E.-M. & Nyengaard, J. R. (2013). Improving efficiency in stereology: a study applying the proportionator and the autodisector on virtual slides. *Journal of microscopy* 251 (1), 68–76.
- Knudsen, L., Atochina-Vasserman, E. N., Guo, C.-J., Scott, P. A., Haenni, B., Beers, M. F., Ochs, M. & Gow, A. J. (2014). NOS2 is critical to the development of emphysema in Sftpd deficient mice but does not affect surfactant homeostasis. *PloS one* 9 (1), e85722.
- Knudsen, L., Ochs, M., Mackay, R., Townsend, P., Deb, R., Mühlfeld, C., Richter, J., Gilbert, F., Hawgood, S., Reid, K. & Clark, H. (2007). Truncated recombinant human SP-D attenuates emphysema and type II cell changes in SP-D deficient mice. *Respiratory research* 8 (1), 70.
- Knust, J., Ochs, M., Gundersen, H. J. G. & Nyengaard, J. R. (2009). Stereological estimates of alveolar number and size and capillary length and surface area in mice lungs. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)* 292 (1), 113–122.
- Macey, M. G. (2007). Principles of Flow Cytometry. In M. G. Macey (Hrsg.), *Flow cytometry. Principles and applications* (S. 1–15). Totowa, NJ: Humana Press.
- Mandy, F. F., Nicholson, J. K. A. & McDougal, J. S. (2003). Guidelines for performing single-platform absolute CD4⁺ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports* 52 (RR-2), 1–13.
- Mayhew, T. M. (2008). Taking tissue samples from the placenta: an illustration of principles and strategies. *Placenta* 29 (1), 1–14.
- Meitzen, J., Pflipsen, K. R., Stern, C. M., Meisel, R. L. & Mermelstein, P. G. (2010). Measurements of neuron soma size and density in rat dorsal striatum, nucleus accumbens core and nucleus accumbens shell: differences between striatal region and brain hemisphere, but not sex. *Neuroscience letters* 487 (2), 177–181.
- Miles, R. E. & Davy, P. (1976). Precise and general conditions for the validity of a comprehensive set of stereological fundamental formulae. *Journal of microscopy* 107 (3), 211–226.

- Miller, P. L. & Meyer, T. W. (1990). Effects of tissue preparation on glomerular volume and capillary structure in the rat. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 63 (6), 862–866.
- Mouton, P. R. (2003). *Principles and Practices of Unbiased Stereology. An Introduction for Bioscientists*. Baltimore: Johns Hopkins University Press; NetLibrary, Incorporated Distributor.
- Mouton, P. R. (2011). *Unbiased stereology. A concise guide*. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Mouton, P. R., Phoulady, H. A., Goldgof, D., Hall, L. O., Gordon, M. & Morgan, D. (2017). Unbiased estimation of cell number using the automatic optical fractionator. *Journal of chemical neuroanatomy* 80, A1-A8.
- Mühlfeld, C., Hegermann, J., Wrede, C. & Ochs, M. (2015). A review of recent developments and applications of morphometry/stereology in lung research. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 309 (6), L526-36.
- Mühlfeld, C., Knudsen, L. & Ochs, M. (2013). Stereology and morphometry of lung tissue. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 931, 367–390.
- Mühlfeld, C., Madsen, J., Mackay, R.-M., Schneider, J. P., Schipke, J., Lutz, D., Birkelbach, B., Knudsen, L., Botto, M., Ochs, M. & Clark, H. (2017). Effect of irradiation/bone marrow transplantation on alveolar epithelial type II cells is aggravated in surfactant protein D deficient mice. *Histochemistry and cell biology* 147 (1), 49–61.
- Mühlfeld, C. & Ochs, M. (2013). Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 2: stereological parameters and study designs in various diseases of the respiratory tract. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 305 (3), L205-21.
- Mühlfeld, C., Wrede, C., Knudsen, L., Buchacker, T., Ochs, M. & Grothausmann, R. (2018). Recent developments in 3-D reconstruction and stereology to study the pulmonary vasculature. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 315 (2), L173-L183.
- Ochs, M. (2006). A brief update on lung stereology. *Journal of microscopy* 222 (Pt 3), 188–200.

- Ochs, M. (2015). Morphometrie in der Mikroskopie: stereologische Methoden. In M. Mulisch & U. Welsch (Hrsg.), *Romeis - Mikroskopische Technik* (S. 515–524). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Ochs, M., Knudsen, L., Allen, L., Stumbaugh, A., Levitt, S., Nyengaard, J. R. & Hawgood, S. (2004). GM-CSF mediates alveolar epithelial type II cell changes, but not emphysema-like pathology, in SP-D-deficient mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 287 (6), L1333-41.
- Ochs, M. & Mühlfeld, C. (2013). Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 1: basic principles of lung stereology. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 305 (1), L15-22.
- Ochs, M., Nyengaard, J. R., Jung, A., Knudsen, L., Voigt, M., Wahlers, T., Richter, J. & Gundersen, H. J. G. (2004). The number of alveoli in the human lung. *American journal of respiratory and critical care medicine* 169 (1), 120–124.
- Oorschot, D. E. (1996). Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: a stereological study using the cavalieri and optical disector methods. *The Journal of comparative neurology* 366 (4), 580–599.
- Paisley, D., Bevan, L., Choy, K. J. & Gross, C. (2014). The pneumonectomy model of compensatory lung growth: insights into lung regeneration. *Pharmacology & therapeutics* 142 (2), 196–205.
- Pozarska, A., Rodríguez-Castillo, J. A., Surate Solaligue, D. E., Ntokou, A., Rath, P., Mižíková, I., Madurga, A., Mayer, K., Vadász, I., Herold, S., Ahlbrecht, K., Seeger, W. & Morty, R. E. (2017). Stereological monitoring of mouse lung alveolarization from the early postnatal period to adulthood. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 312 (6), L882-L895.
- Rodríguez-Castillo, J. A., Pérez, D. B., Ntokou, A., Seeger, W., Morty, R. E. & Ahlbrecht, K. (2018). Understanding alveolarization to induce lung regeneration. *Respiratory Research* 19 (1), 148.
- Scherle, W. (1970). A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* 26 (1), 57–60.

- Schittny, J. C. (2017). Development of the lung. *Cell and Tissue Research* 367 (3), 427–444.
- Schmitz, C., Eastwood, B. S., Tappan, S. J., Glaser, J. R., Peterson, D. A. & Hof, P. R. (2014). Current automated 3D cell detection methods are not a suitable replacement for manual stereologic cell counting. *Frontiers in neuroanatomy* 8, 27.
- Schneider, J. P. & Ochs, M. (2013). Stereology of the lung. *Methods in cell biology* 113, 257–294.
- Schneider, J. P. & Ochs, M. (2014). Alterations of mouse lung tissue dimensions during processing for morphometry: a comparison of methods. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 306 (4), L341-50.
- Skepper, J. N. (2000). Immunocytochemical strategies for electron microscopy: choice or compromise. *Journal of microscopy* 199 (Pt 1), 1–36.
- Sterio, D. C. (1984). The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of microscopy* 134 (Pt 2), 127–136.
- Stuart, A. (1976). *Basic ideas of scientific sampling* (Griffin's statistical monographs and courses, Bd. 4, 2. ed.). London: Griffin.
- Surate Solaligue, D. E., Rodríguez-Castillo, J. A., Ahlbrecht, K. & Morty, R. E. (2017). Recent advances in our understanding of the mechanisms of late lung development and bronchopulmonary dysplasia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 313 (6), L1101-L1153.
- Vanhecke, D., Studer, D. & Ochs, M. (2007). Stereology meets electron tomography: towards quantitative 3D electron microscopy. *Journal of structural biology* 159 (3), 443–450.
- Virgo, P. F. & Gibbs, G. J. (2012). Flow cytometry in clinical pathology. *Annals of clinical biochemistry* 49 (Pt 1), 17–28.
- Weibel, E. R. (1979). *Stereological methods. Vol. 1: Practical methods for biological morphometry*. London: Acad. Press.
- Weibel, E. R. (1980). *Stereological methods. Vol. 2: Theoretical foundations*. London: Acad. Press.

- Weibel, E. R. (2013). A retrospective of lung morphometry: from 1963 to present. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 305 (6), L405-8.
- Weibel, E. R. (2017). Lung morphometry: the link between structure and function. *Cell and Tissue Research* 367 (3), 413–426.
- Weibel, E. R., Hsia, C. C. W. & Ochs, M. (2007). How much is there really? Why stereology is essential in lung morphometry. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 102 (1), 459–467.
- West, M. J. & Gundersen, H. J. (1990). Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *The Journal of comparative neurology* 296 (1), 1–22.
- West, M. J. (2012). *Basic stereology. For biologists and neuroscientists*. Cold Spring Harbor, NY: CSH Laboratory Press.
- Willführ, A., Brandenberger, C., Piatkowski, T., Grothausmann, R., Nyengaard, J. R., Ochs, M. & Mühlfeld, C. (2015). Estimation of the number of alveolar capillaries by the Euler number (Euler-Poincaré characteristic). *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 309 (11), L1286-93.
- Wulfsohn, D., Knust, J., Ochs, M., Nyengaard, J. R. & Gundersen, H. J. G. (2010). Stereological estimation of the total number of ventilatory units in mice lungs. *Journal of microscopy* 238 (1), 75–89.

11 Anhang

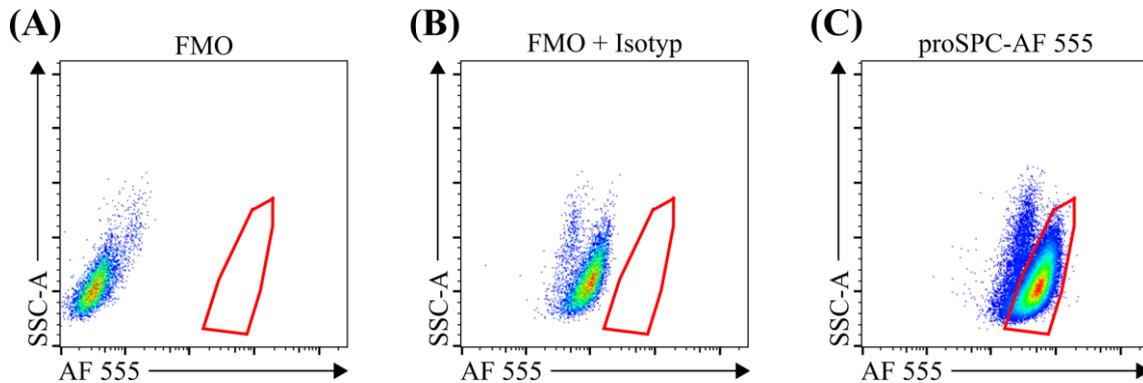


Abbildung 14: Begründung der Gating-Strategie für die Alveolarepithelzellen Typ 2. Es wurden zwei Kontroll-Analysen durchgeführt, um die Gating-Strategie für die Alveolarepithelzellen Typ 2 (AEZ2) im pro-Surfactant Protein C (proSPC) versus Side-Scatter Area (SSC-A)-Punktdiagramm in Abb. 7 zu begründen: (A) eine Fluorescence Minus One (FMO)-Kontrolle und (B) eine FMO + Isotyp-Kontrolle. Das heißt, in (A) wurden die Zellen mit allen Antikörpern außer dem anti-proSPC Antikörper gefärbt, wobei das Gate für die AEZ2 leer ist. In (B) wurde zusätzlich zu der FMO-Kontrolle ein Isotyp-Kontrollantikörper zusammen mit dem passenden sekundären Antikörper (AF 555) hinzugefügt. Dabei wurde wie erwartet eine Verschiebung der Zellpopulation nach rechts festgestellt, da aufgrund der intrazellulären Färbemethode einige Fluorochrome in den Zellen eingeschlossen wurden. Das AEZ2-Gate blieb aber leer. Erst als in (C) der Isotyp-Kontrollantikörper durch den anti-proSPC Antikörper ersetzt wurde, ist die gegatete AEZ2-Population zu sehen sowie sie im proSPC versus SSC-A-Punktdiagramm in Abb. 7 dargestellt ist. Im Grunde wurde dieses Punktdiagramm aus Abb. 7 hier als Punktdiagramm (C) dupliziert, um eine bessere Vergleichbarkeit herzustellen. Das gleiche Punktdiagramm in Abb. 7 ist nur als proSPC versus SSC-A beschriftet, da Alexa Fluor (AF 555) verwendet wurde, um proSPC zu detektieren. Modifiziert nach Dzhuraev et al. 2019.

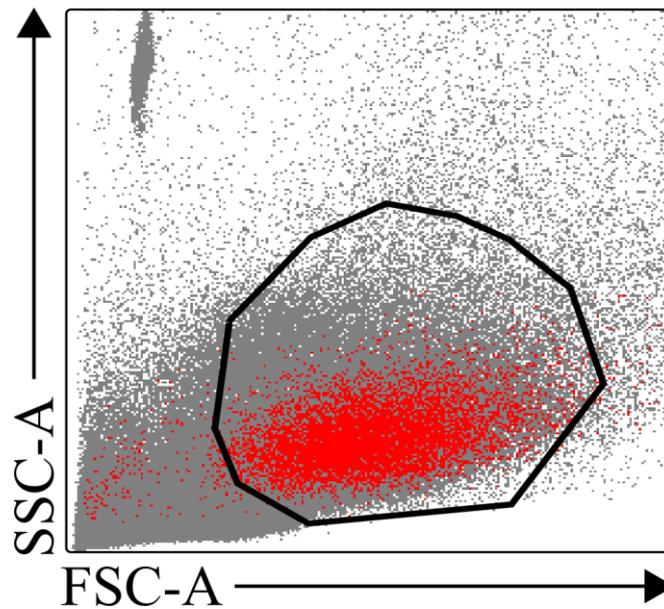


Abbildung 15: Backgating zur Validierung der Gating-Strategie für die Alveolarepithelzellen Typ 2. Es wurde ein *Backgating* durchgeführt, um die *Gating*-Strategie für die Alveolarepithelzellen Typ 2 (AEZ2) in Abb. 7 zu validieren. Das bedeutet, es wurden alle Zellen identifiziert, die im ungegateden *Forward-Scatter Area* (FSC-A) versus *Side-Scatter Area* (SSC-A)-Punktdiagramm in Abb. 7 auch hätten in der gegateden AEZ2-Population im pro-Surfactant Protein C (proSPC) versus SSC-A-Punktdiagramm in Abb. 7 landen können. Diese Zellen wurden dann in das FSC-A versus SSC-A-Punktdiagramm gebackgated und sind hier in roter Farbe gekennzeichnet. Auf diese Weise wurde festgestellt, dass $\approx 2,7\%$ von den in roter Farbe dargestellten AEZ2 außerhalb des initialen Gates im FSC-A versus SSC-A-Punktdiagramm in Abb. 7 lagen und nicht eingeschlossen wurden. Modifiziert nach Dzhuraev et al. 2019.

12 Publikationen und Kongressbeiträge

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht und als Poster auf einer Konferenz vorgestellt.

Veröffentlichung:

Dzhuraev, G., Rodríguez-Castillo, J. A., Ruiz-Camp, J., Salwig, I., Szibor, M., Vadász, I., Herold, S., Braun, T., Ahlbrecht, K., Atzberger, A., Mühlfeld, C., Seeger, W. & Morty, R. E. (2019). Estimation of absolute number of alveolar epithelial type 2 cells in mouse lungs: a comparison between stereology and flow cytometry. *Journal of Microscopy* 275 (1), 36–50.

Posterpräsentation am 22.05.2018 auf der American Thoracic Society Conference (ATS) in San Diego (USA): “Estimation of absolute number of alveolar epithelial type 2 cells: a comparison between flow cytometry and stereology”.

13 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

14 Danksagung

Es haben viele Menschen zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen und ich möchte mich an dieser Stelle dafür ganz herzlich bei allen bedanken.

Ich danke Prof. Dr. Werner Seeger und Dr. Rory E. Morty dafür, dass ich bei Ihnen die Dissertation anfertigen durfte und für die freundliche Überlassung des Themas. Insbesondere danke ich Dr. Rory E. Morty dafür, dass er mich mit all seiner Ruhe und Erfahrung unterstützt hat und es mir ermöglichte, die Forschungsaktivitäten aus verschiedenen Facetten zu erleben. So durfte ich abseits des Labors auch beim „Annual Retreat“ auf dem Schloss Rauischholzhausen dabei sein und meine Ergebnisse auf der ATS-Konferenz 2018 in San Diego präsentieren. Das waren wirklich einzigartige Erfahrungen und dadurch konnte ich außerdem viele inspirierende Persönlichkeiten kennenlernen.

Ganz besonderer Dank gilt auch Dr. Alberto Rodríguez-Castillo, der mich die ganze Zeit über hervorragend betreut und sein Wissen mit mir geteilt hat. Er ist ein exzellenter Wissenschaftler, von dem ich viel lernen konnte. Die Gespräche mit ihm waren sehr bereichernd und er konnte mich immer wieder mit seiner Neugierde und Begeisterung für wissenschaftliche Erkenntnisse faszinieren.

Ebenso danke ich Dr. Jordi Ruiz-Camp, der mir am Anfang viel über die verschiedenen Färbungen beigebracht hat. Gleichmaßen bin ich Ann Atzberger dankbar, die mich mit ihrem Wissen zur Durchflusszytometrie beraten hat. Prof. Dr. Christian Mühlfeld von der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) danke ich dafür, dass er mir bei Fragen zur Stereologie als Experte eine große Hilfe war. Ich danke Prof. Dr. Dr. Thomas Braun und seinen Mitarbeitern dafür, dass sie mir freundlicherweise die *Sftpc*-YFP Mäuse zur Verfügung gestellt haben. Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der AG Morty für die Unterstützung und die wertvollen Tipps und Tricks.

Zum Schluss gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, die mich auf diesem Weg begleitet, unterstützt, motiviert und immer an mich geglaubt haben.