Aus dem Department für Pathobiologie

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut/Klinik für Immunologie

(Leiter: Univ.-Prof. Dr. Armin Saalmüller)

Etablierung einer Methode zur Isolation und Phänotypisierung porziner Basophiler Granulozyten

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Patricia Franková

Wien, im Mai 2021

Betreuerin: Ass.-Prof. Dr. Dipl.Tzt. Martina Patzl
Begutachter/in: Dr. Barbara Rütgen

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst bei Frau Ass.Prof. Dr. Dipl.Tzt. Martina Patzl für die hervorragende Betreuung bedanken. Ihre Unterstützung bei der praktischen Durchführung und der Ausarbeitung der Diplomarbeit haben diese Arbeit ermöglicht.

Ebenfalls ein großer Dank gebührt dem Institutsleiter Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Armin Saalmüller für die Ermöglichung dieser Arbeit am Institut für Immunologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie für die nette Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft bedanken.

Zuletzt möchte ich mich in besonderem Maß bei meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung bei meinem Studium bedanken. Ihr habt mir in meinem Leben den Rückhalt gegeben und ohne Euch wäre das Studium im Ausland nicht möglich gewesen. Vielen Dank!

Ein herzliches Dankeschön an alle, die mich bei meinem Studium unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Fragestellung 1

1.1 Basophile Granulozyten 1

1.1.1 Erforschung der Basophilen 1

1.1.2 Morphologie und Phänotyp 2

1.1.3 Funktion der Basophilen 4

1.2 Isolierung von Zellen (Anreicherung) 6

1.2.1 Passive Sedimentation, Pelletierung 7

1.2.2 Dichtegradientenzentrifugation 7

1.2.3 Adhäsion 10

1.2.4 Spezifische Isolation und Anreicherung von Zellen mittels Antikörperbindung 11

1.3 Isolierung der Basophilen Granulozyten 13

1.4 Möglichkeiten der Identifikation von Basophilen Granulozyten 14

1.4.1 Differenzierung und Auszählung der Basophilen nach Färbung 14

1.4.2 Hämatologische Messung 15

1.4.3 Durchflusszytometrische Charakterisierung 16

1.5 Fragestellung 17

2 Material und Methoden 18

2.1 Material 18

2.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte 18

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien 19

2.1.3 Puffer 20

2.1.4 hergestellte Lösungen 20

2.1.5 Antikörper für die FCM Markierung 22

2.1.6 Blut Proben 22

2.2 Methoden 23

2.2.1 Isolation der Leukozyten aus porzinem Blut 23

2.2.2 Separation der Leukozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation 23
2.2.3 Entfernung der restlichen Erythrozyten 25
2.2.4 Mikroskopische Beurteilung 25
2.2.5 Lagerung der Proben/Zellfraktionen 26
2.2.6 Durchflusszytometrie 26
3 Ergebnisse 31
3.1 Isolation der Leukozyten aus porzinem Blut 31
3.1.1 Anreicherung der Leukozyten 31
3.1.2 Isolation der Granulozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation 32
3.2 Beurteilung der Effizienz der Anreicherung 42
3.3 Durchflusszytometrie 47
3.3.1 L/D + FSC/SSC 47
3.3.2 Granulozyten spezifische Marker 51
3.3.3 Darstellung der Basophilen 54
4 Diskussion 56
4.1 Isolation der Granulozyten 56
4.2 Durchflusszytometrie 59
4.3 Schlussbemerkung 61
5 Zusammenfassung 62
6 Summary 63
Abkürzungsverzeichnis 64
7 Literaturverzeichnis 65
Internetquellen 69
8 Abbildungs-/ Tabellenverzeichnis 70

1 Einleitung und Fragestellung

Die Abwehrkräfte des Körpers, die zusammen als Immunsystem bezeichnet werden, sind ein komplexes System von biochemischen und zellulären Reaktionen. Diese Abwehrfront kann in eine physikalische Barriere, und das angeborene und erworbene Immunsystem unterteilet werden. Der Körper verwendet mehrere sich überlappende Verteidigungsmechanismen, um fremden Organismen das Eindringen zu erschweren (Tizard, 2018).

In dieser Arbeit konzentriere ich mich auf eine Zellart des angeborenen Immunsystems beim Schwein, konkret auf die basophilen Granulozyten. Ich gebe einen Überblick über deren Morphologie, Funktionen und Rolle bei Immunreaktionen weiters Möglichkeiten ihrer Separation und Identifizierung.

1.1 Basophile Granulozyten

Basophile gehören zu den Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie entwickeln sich aus $CD34^+$ Vorläuferzellen, differenzieren und reifen im Knochenmark und wandern danach in die Peripherie. Sie stellen die seltenste Gruppe der Granulozyten im Blut dar (Tizard, 2018). Im Blut gesunder Schweine haben sie eine Häufigkeit von 0 - maximal 2 %, das heißt etwa 0 - 50 Basophile pro 1 µl Blut. Das ist in absoluten Zahlen im Vergleich mit anderen Tierarten (Hund, Katze, Pferd, Rind, Schaf, Ziege) die geringste Frequenz (Moritz, 2014). Ihre Halbwertszeit beträgt nur 2 - 3 Tage, somit zählen sie zu den kurzlebigen Zellen im Blut (Stone et al., 2010). Außer im peripheren Blut sind sie auch im Knochenmark, in Milz und Leber zu finden (Denzel, 2010). Ihre niedrige Frequenz erschwert auch ihre Erforschung, daher ist ihre genaue physiologische Funktion noch immer nicht detailliert bekannt.

1.1.1 Erforschung der Basophilen

Im Jahr 1879 identifizierte Paul Ehrlich die Basophilen anhand ihres einzigartigen mikroskopischen Erscheinungsbildes, nachdem sie einer basischen Färbung ausgesetzt wurden. Aufgrund der Tatsache, dass sie die seltensten Zellen im Blut sind, wurde ihnen früher keine größere Bedeutung beigemessen, und sie waren daher auch nicht Gegenstand von Forschungen. Erst fast hundert Jahre später wurde entdeckt, dass die basophilen Granula Histamin enthalten und die Zellen den hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI) exprimieren.

Vor ungefähr 50 Jahren wurde mit einer intensivierten Forschung an Basophilen begonnen und Studien an Ratten und Meerschweinchen zeigten, dass die Basophilen als Reaktion auf verschiedene parasitierende Helminthen und Antigene, die von Parasiten stammten, reagierten, was darauf hindeutete, dass Basophile bei der Th2-vermittelten Immunantwort gegen einige Parasiten eine Rolle spielen könnten. Jedoch konnte diese Beobachtung nicht weiter untersucht werden, da zu dieser Zeit geeignete Tiermodelle und spezifischeReagenzien noch nicht etabliert waren (Stone et al., 2010).

Im Jahr 1981 wurde erstmalig eine Histamin-produzierende Zellpopulation bei Mäusen identifiziert und ein Jahr später eine basophile Granula aufweisende Zellpopulation in deren Knochenmark (Siracusa et al., 2013).

1.1.2 Morphologie und Phänotyp

Basophile haben einen Durchmesser von 10 – 15 µm, enthalten große basophile Granula, die unter anderem mit Heparin und Histamin gefüllt sind und diese werden bei Aktivierung der Zellen freigesetzt (Murphy und Weaver, 2016). Diese Granula können mit basischen Farbstoffen wie Toluidinblau oder Alcianblau angefärbt und identifiziert werden. Im Vergleich zu Mastzellen sind die Granula der Basophilen größer und die Zellen haben eine geringere Proliferationskapazität (Stone et al., 2010). Tierartlich bestehen große Unterschiede bezüglich ihres Erscheinungsbildes, diese betreffen die Größe der Zellen, Gestalt des Zellkerns und die Größe, Anzahl und Färbbarkeit ihrer Granula (Tizard, 2018).

Phänotypisch werden Granulozyten mittels Oberflächenproteinmarkern, CD (cluster of differentiation) Marker, die von monoklonalen Antikörpern (mAk) erkannt werden, charakterisiert und von anderen Leukozyten unterschieden. Die Anzahl der gut dokumentierten Marker für die Untersuchung der myeloischen Linie bei Schweinen liegt weit hinter der für Mensch und Maus (Ezquerra et al., 2009, Denzel, 2010).

Dennoch ist es auch mit dem derzeit zur Verfügung stehendem Panel an mAk, die für wesentliche Marker spezifisch die porzinen Moleküle erkennen, möglich, die unterschiedlichen Leukozytenpopulationen bei Schweinen mittels Durchflusszytometrie (flow cytometry, FCM) Analysen zu unterscheiden. Basophile Granulozyten haben allerdings viele Oberflächenrezeptoren mit neutrophilen und eosinophilen Granulozyten und Monozyten gemeinsam (Pérez et al., 2007). Sie teilen auch viele Merkmale mit den Mastzellen, wie Expression von FcεRI, Sekretion von Th2-Zytokinen, metachromatische Anfärbbarkeit der Granula und Freisetzung von Histamin nach Aktivierung. Für verschiedene Spezies werden

unterschiedliche Markerkombinationen zur Identifizierung und Differenzierung der myeloiden Zellen herangezogen.

Der erste etablierte myeloide Marker bei Schweinen war SWC3 (Belcha et al., 1994). Er wurde als porzines Homolog zu CD172a identifiziert (Alvarez et al., 2000; Saalmüller et al., 2005) und wird als Hauptmarker für myeloide Zellen angesehen. Die Expression von SWC3 erfolgt ab den frühen Vorläuferzellen der myeloischen Reihe und bleibt während der Differenzierung und auch in reifen Zellen in der Peripherie erhalten.

SWC1, als porzines Homolog zu CD52 identifiziert (Leitner et al., 2012), wird von ruhenden T-Lymphozyten (Ezquerra et al., 2009), Neutrophilen und Basophilen exprimiert, nicht jedoch von B-Lymphozyten (Cossarizza et al., 2019). Dieser CD-Marker ermöglicht gemeinsam mit CD172a eine gute primäre Differenzierung der Granulozyten beim Schwein.

CD11a-d umfasst eine Gruppe von heterodimeren Adhäsionsmolekülen. Diese Integrine haben dieselbe β-Kette (CD18) und unterschiedliche α-Ketten. Alle vier wurden auch beim Schwein beschrieben. Während CD11a von allen Lymphozyten exprimiert wird, sind die anderen drei nur auf bestimmten Zellpopulationen zu finden. Kreuzreaktive, gegen die humanen Moleküle gerichtete, monoklonale Ak (mAk), spezifisch für bestimmte α-Ketten, binden auch an die porzinen Moleküle, jedoch stimmt deren Expressionsmuster nicht mit denen auf den entsprechenden funktionshomologen humanen Zellen überein. Die Expression dieser Gruppe von Integrinen ist daher zur Differenzierung von Granulozyten und Monozyten beim Schwein nicht geeignet (Ezquerra et al., 2009).

CD16 (FcεRIII) ist ein Rezeptor für IgG-Antigen Komplexe und wird vor allem von NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert (Ezquerra et al., 2009). Mit geringer Expressionsrate wird dieser Marker auch auf porzinen Myeloblasten und Granulozyten gefunden, wobei die Expression bei der Reifung steigt. Im Gegensatz zum Menschen, wo CD16 nur von reifen Granulozyten exprimiert wird (Pérez et al., 2007).

CD14 wird von Monozyten und Makrophagen und etwas geringer von reifen Granulozyten exprimiert (Ezquerra et al., 2009). Die Expression von CD14 ist jedoch auf Neutrophile beschränkt, Basophile und Eosinophile sind negativ (Cossarizza et al., 2019). Das wird auch durch die Funktion von CD14 erklärt. Als Ko-Rezeptor von Toll-like Rezeptor 4 hat es Anteil an der Immunreaktion auf bakterielles Lipopolysaccharid. Basophile und Eosinphile sind an dieser Immunreaktion nicht beteiligt.

SWC8 ist ein schweinespezifischer Marker, welcher bei anderen Spezies nicht identifizert wurde. Er erlaubt die Detektion der Granulozyten im Blut und ihrer Entwicklungsstadien im Knochenmark und die unterscheidung von den Monozyten, welche im Gegensatz zu den Granulozyten SWC8$^-$ sind. Jedoch ist die Expression von SWC8 nicht nur für die Granulozyten spezifisch, denn er wird auch von den B-Lymphozyten und Subpopulationen der T-Lymphozyten exprimiert (Ezquerra et al., 2009).

Die von den beiden mAk 6D10 und 2B2 erkannten, bisher noch nicht identifizierten, Antigene werden nur von Granulozyten und ihren Vorstufen im Knochenmark exprimiert. Die 6D10 Expression nimmt während der Granulozytenreifung ab und reifen Granulozyten färben nur noch 6D10^{low}. Im Gegensatz dazu wird das 2B2-Antigen nur von reifen Granulozyten in Blut und Knochenmark exprimiert. Die 6D10-Antigenexpression ist auf die Neutrophilen beschränkt, während das 2B2-Antigen auch bei Eosinophilen und Basophilen gefunden wird (Pérez et al., 2007).

Die Phänotypisierung porziner Granulozyten mittels Durchflusszytometie (FCM) erfolgt einerseits durch ihr hohes Messsignal im Vorwärts-und Seitwärtsstreulicht (forward scatter und side scatter, FSC und SSC) und die Expression von CD172a. Diese Parameter ermöglichen eine Abgrenzung von anderen Leukozyten (Cossarizza et al., 2019). Die weitere Unterscheidung in reife Neutrophile, Eosinophile und Basophile kann mit Hilfe von SWC8, CD52, CD14, 6D10 und 2B2 getroffen werden (Pérez et al., 2007).

Tab. 1: Färbepanel zur Differenzierung der Graulozyten nach Cossarizza et al., 2019

Granulozyten	SWC3 (CD172a)	SWC1 (CD52)	CD14	SWC8	6D10	2B2
Neutrophile	+	+	+	+	+	+
Eosinophile	+	-	-	+	-	+
Basophile	+	+	-	-	-	+

1.1.3 Funktion der Basophilen

Granulozyten spielen eine wichtige Rolle bei Reaktionen des angeborenen Immunsystems. Besonders die Neutrophilen werden schnell an Stellen mit akuter Infektion rekrutiert und sind die erste Verteidigung gegen eindringende Mikroorganismen. Ihre Granula enthalten antimikrobielle Peptide und chemotaktisch wirkende Moleküle, die Monozyten, dendritische

Zellen und T-Zellen anlocken und somit auch zur Entwicklung einer adaptiven Immunität beitragen (Pérez et al., 2007). Über die pathophysiologische Funktion der Basophilen sind jedoch nur rudimentäre Kenntnisse vorhanden (Stone et al., 2010). Sie wird mit verschiedenen Entzündungsreaktionen bei parasitären Infekten und mit Allergien in Zusammenhang gebracht. Es wird angenommen, dass Basophile und Eosinophile hauptsächlich zur Abwehr von Parasiten wichtig sind, die zu groß sind, um von Neutrophilen oder Makrophagen phagozytiert zu werden. Die Bedeutung von Basophilen bei Infektion mit extrazellulären, vielzelligen Parasiten wird durch die höhere Histaminfreisetzung aus den Basophilen von mit Ascaris suum Oozyten sensibilisierten Schweinen, im Vergleich zu nicht sensibilisierten Schweinen, belegt (Uston et al., 2007).

Bei allergischen Entzündungsreaktionen ist ihre Wirkung eher schädlich als protektiv für den Organismus (Murphy and Weaver, 2016). Allerdings konnte in *in vivo* Experimenten bisher kein direkter Beitrag der Basophilen zu IgE-vermittelter Anaphylaxie nachgewiesen werden. Bei Versuchen an Mäusen wurde gezeigt, dass sie einen alternativen Weg der Anaphylaxie als Reaktion auf IgG-Antigen-Komplexe fördern, da sie einen Thrombozytenaktivierungsfaktor produzieren. Auch bei einer anaphlylaktischen Reaktion auf Penicillin-IgG-Antikörperkomplexe wurde ihre Beteiligung nachgewiesen (Siracusa et al., 2013). Weiters scheint ihr Beitrag zu allergischen Entzündungen von der Art des Allergens abhängig zu sein, da nicht immer Basophile gefunden wurden. Bei Menschen wurde eine Anreicherung von Basophilen auch bei einer Reihe anderer Erkrankungen wie Organabstoßung, Autoimmunreaktionen und Tumoren entdeckt (Siracusa et al., 2013). Obwohl Basophile nicht überwiegend Gewebezellen sind, exprimieren sie Integrine und Chemokinrezeptoren und können entzündete Gewebe infiltrieren, insbesondere die Haut bei atopischer Dermatitis und die Atemwege bei Atemwegsallergien. Sie wurden bei kutanen und pulmonalen Spätphasenallergien identifiziert und wurden postmortal in erhöhter Anzahl in der Lunge von Asthmapatienten gefunden (Stone et al., 2010).

Basophile können durch eine Reihe von Signalen aktiviert werden. Prinzipiell wird eine IgE abhängige von einer IgE unabhängigen Aktivierung unterschieden. Der am besten untersuchte und bekannteste Modus der Aktivierung ist jener über den hochaffinen IgE-Rezeptoren FcεRI und dessen IgE-vermittelte Vernetzung. IgE ist das einzige Immunglobulin, das vor Bildung eines Antigen-Antikörperkomplexes an seinen spezifischen Rezeptor bindet. FcεRI wird in seiner kompletten tetrameren Form nur von Basophilen und Mastzellen exprimiert und in einer trimeren Form, der die β-Kette fehlt, auch von

dendritischen Zellen hauptsächlich in der Haut (Tizard, 2018). Durch Antigenbindung werden die Rezeptoren vernetzt, was zu einer Signaltransduktion ins Zellinnere führt und damit zu einer Aktivierung der Zellen.
Eine Aktivierung kann auch durch Zytokine und Proteasen erfolgen. Basophile sind in der Lage aktive Proteasen zu erkennen und darauf zu reagieren. Zum Beispiel kann die Hausstaubmilben-Protease bei humanen Basophilen die Produktion von Interleukinen fördern. Jedoch sind die Mechanismen, wie dies geschieht, noch unbekannt. Die Basophilen reagieren auch auf eine Vielzahl von Umweltreizen wie Drogen, Gifte und Pollen, die ihre Funktion beeinflussen können (Siracusa et al., 2013). Das macht es auch schwierig, sie vor allem bei allergischen Entzündungen als auslösende oder induzierte Zellen einzustufen.

Ihre Aktivierung bedingt eine unmittelbare Freisetzung von Histamin, Serotonin und weiteren tierartlich etwas unterschiedlichen vaso- und neuroaktiven Substanzen aus den Granula an die unmittelbare Umgebung (Tizard, 2018). Etwas verzögert werden Leukotriene und Prostaglandine aus Vorstufen freigesetzt und sezerniert. Ihre Aktivierung bewirkt auch die Bildung und Exkretion von Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-13 innerhalb weniger Stunden. Sie spielen eine wesentliche Rolle bei allergischen Reaktionen, sind aber auch an Immunreaktionen gegen Parasiten und an immunregulatorischen Prozessen beteiligt (Stone et al., 2010). Je nach Konzentration und Lokalisation wirken die Mediatorstoffe lokal begrenzt oder systemisch.

1.2 Isolierung von Zellen (Anreicherung)

Vor der Isolierung von Zellen sollte überlegt werden, wie viel Zeit man für die Probenvorbereitung braucht und wie die Proben gelagert werden. Die Geschwindigkeit des Prozesses vom Gewebe zu Isolierung der Zellen ist ein sehr wichtiger Faktor, da es im Laufe der Zeit zum Zelltod kommt. Die Lebensfähigkeit der Zellen beginnt durch Wirkung verschiedener gewebespezifischer degradierender Enzyme und Nährstoffeinschränkungen nach der Isolierung schnell zu sinken, wenn die Proben bei Raumtemperatur belassen werden. Der Zelltod kann Qualität und Erfolg der Zelltrennung negativ beeinflussen, da sich Zellaggregate bilden und unspezifischen Antikörperbindungen entstehen können. Damit isolierte Zellen als lebensfähig gelten, muss die Probe weniger als 50 % tote Zellen aufweisen. Um den Zelltod im Gewebe zu minimieren, sollte mit der Zellisolierung sobald als möglich begonnen werden. Die Aufbewahrung des Gewebes bei 4 °C ist eine wirksame kurzfristige Maßnahme zur Verringerung der Nekrose, ist aber nicht länger als 24 Stunden

effektiv. Auch die Auswahl eines geeigneten Transportmediums kann die Lebensfähigkeit des Gewebes und der Zellen signifikant verbessern (Tomlinson et al., 2013, O'Driscoll et al, 1999, D'Armini et al, 1995, Laiho und Penttilä, 1981).

Die Technologien der Zellisolierung sind wichtige Werkzeuge in der Zellbiologie, Immunologie, Stammzell- und Krebsforschung (Dainiak et al., 2007). Derzeit gibt es eine Vielzahl von Zelltrennverfahren, die überwiegend auf drei Methoden basieren: Adhärenz, Dichte und Antikörperbindung. Auch weitere Techniken, wie zum Beispiel Mikrofluidik-Technologien verwenden, wird zur Analyse einzelner Zellen herangezogen. Sie ist jedoch sehr teuer und findet derzeit noch keine breite Verwendung (Tomlinson et al., 2013).

1.2.1 Passive Sedimentation, Pelletierung

Die Sedimentation basiert auf der Schwerkraft. Größere und dichtere Komponenten sedimentieren schneller als die kleineren mit geringerer Dichte. Zusätzlich zu einer passiven Sedimentation kann eine fraktionierende Zentrifugation durchgeführt werden. Beginnend mit einer sehr niedertourigen Zentrifugation können die größten und dichtesten Komponenten in einer Probe aufgrund ihrer hohen Sedimentationsrate pelletiert werden. Durch aufeinanderfolgende Zentrifugationen des jeweils erhaltenen Überstandes mit steigender Zentrifugalkraft können Komponenten mit abnehmender Dichte isoliert werden. Diese Methode ist kostengünstig, führt jedoch im Allgemeinen zu einer geringeren Reinheit verglichen mit anderen Methoden, ist jedoch zur Trennung unterschiedlicher Zelltypen nicht gut geeignet (Pretlow und Pretlow, 1982).

1.2.2 Dichtegradientenzentrifugation

Im Gegensatz zur Pelletierung wird bei einer Dichtegradientenzentrifugation das homogene flüssige Medium durch eine Lösung definierter Dichte ersetzt (Sharpe, 1988). Die Dichte des Mediums im Röhrchen nimmt zum Boden hin zu, was Vorteile bei der Auflösung bringt. Die Konvektionsströme, die bei der Zentrifugation entstehen können, werden minimiert, und die Zellen sammeln sich als dichtes Band bei einer bestimmten Dichte an. Zellen gleicher Dichte und Größe sedimentieren gemeinsam. Es gibt zwei Prinzipien der Dichtegradienten-zentrifugation: geschwindigkeitszonal und isopyknisch.

Die **geschwindigkeitszonale Zentrifugation** entspricht im Wesentlichen der Zentrifugation bei der Pelletierung, mit der Ausnahme, dass die Zellen ein Dichtemedium durchwandern müssen (Sharpe, 1988). Bei dieser Art der Zelltrennung beeinflusst der Größen- und

Dichteunterschied zwischen Partikeln ihre Trennung. Die Dichte des Mediums im Röhrchen nimmt zu, überschreitet aber nie die Dichte der zu trennenden Zellen. Zellen unterschiedlicher Größe sedimentieren auf unterschiedliche Weise mit unterschiedlichen Raten (Peritoft und Laurent, 1977). Die geschwindigkeitszonale Zentrifugation ist zeitabhängig, da die Dichte aller Zellen größer ist als die des Dichtenmediums. Wird zu lange zentrifugiert, bilden alle Zellen ein Pellet. Diese Zentrifugationsmethode kann verwendet werden, um mehr als zwei Zellpopulationen zu trennen.

Bei der **isopyknischen**- oder **Gleichgewichtszentrifugation** ist die Dichte des Gradienten an seinem höchsten Punkt größer als die größte Dichte der zu trennenden Zellen. Diese Methode basiert auf dem Prinzip, dass Zellen so lange sedimentieren, bis sie den Punkt erreicht haben, an dem ihre Dichte dieselbe ist wie die des Gradientenmediums (isopyknische Position). Die Zellen können nicht mehr weiter sedimentieren unabhängig von der Zentrifugationsdauer, weil das Medium unter ihnen eine größere Dichte hat.
Die Zellen werden Gradienten überschichtet oder mit dem Gradientenmedium vermischt, und der Gradient bildet sich erst während der Zentrifugation. Selbstformende Gradienten werden aber für die meisten Zellen nicht empfohlen, da eine mehrstündige Zentrifugation bei hohen g-Kräften erforderlich wäre, damit sich der Gradient von selbst bildet. Diese Methode kann für stabilere Strukturen wie Bakterien oder für Viren verwendet werden (Sharpe, 1988).

1.2.2.1 Gradientenmedien

Die wichtigsten Kriterien, die ein Gradientenmedium erfüllen sollte:

1. inert und nicht toxisch gegenüber Zellen
2. gute Löslichkeit in Puffern, um den erforderlichen Dichtebereich zu erzeugen und um für die Zellen eine kompatible Umgebung zu schaffen
3. leichte Entfernbarkeit aus der Zellensuspension
4. darf keine nachfolgenden Assays stören

Die am häufigsten genutzte Gradientenmedien sind Saccharose, Ficoll, Percoll und jodierte Verbindungen (Metrizamide und Nycodenz) (Sharpe, 1988).

Saccharose

Die Saccharose ist ein ideales Dichtegradientenmedium bei Trennung vieler biologischer Materialien, aber nicht für Zellen, da die hohe Osmolarität ungepufferter Saccharoselösungen für die Zellen hypertonisch ist. Diese Eigenschaft überwiegt alle

anderen Vorteile, wie Inaktivität, Stabilität, hohe Löslichkeit, keine toxische Wirkung und niedrige Kosten (Sharpe, 1988).

Ficoll

Ficoll ist ein synthetisches Polymer mit hohem Molekulargewicht, welches durch eine Kopolymerisation von Saccharose und Epichlorhydrin entsteht. Ficoll wird speziell für die Zelltrennung hergestellt. Es hat aber nur einen engen Dichtebereich zwischen 1,00 und 1,17 g/ml. Die Lösung ist sehr viskös und diffundiert nur langsam, sodass keine kontinuierlichen Gradienten erzeugt werden können. Ficoll ist für Zellen nicht toxisch und kann in einigen Fällen sogar eine schützende Funktion haben. Der Gradient ist stabil, muss aber vorgeformt werden. Die meisten biologischen Tests werden nicht beeinflusst und die Entfernung erfolgt am besten durch mehrmaliges Waschen der getrennten Zellen in einem geeigneten Puffer. Als besonders nützlich hat sich Ficoll bei der Isolation von Lymphozyten aus Vollblut erwiesen. Der Hauptnachteil von Ficoll sind die hohen Kosten (Sharpe, 1988).

Percoll

Percoll ist eine Suspension kolloidaler Siliciumdioxidpartikel, die mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) beschichtet sind, wodurch die Wechselwirkung mit biologischen Materialien minimiert wird. Es wird synthetisch als 23%ige Lösung in Wasser mit einer Dichte von 1,130 g/ml hergestellt und kann durch isoosmotische Puffer auf niedrigere Dichten verdünnt werden. Die osmotische Stärke von Percoll ist sehr gering und ändert sich mit der Dichte fast nicht (Sharpe, 1988). Der ursprüngliche pH-Wert von 9,0 und kann ohne Änderung der Eigenschaften von pH 5,5 bis 10,0 eingestellt werden (Ullmer und Flad, 1979). Die Gradienten bilden sich leicht von selbst, jedoch sedimentiert bei hohen g-Kräften das gesamte Kolloid unter Bildung eines harten Pellets. Von großem Nachteil ist die phagozytotische Aufnahme von Percoll durch Monozyten und der damit verbundenen Zunahme ihrer Dichte, was zu zusätzlichen Banden im Dichtgradienten führt (Sharpe, 1988).

Jodierte Medien (Metrizamid und Nycodenz®)

Jodierte Medien sind wässrige Lösungen jodierter Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht auf Basis einer Benzolringstruktur. Die am häufigsten verwendeten Verbindungen sind Metrizamid und Nycodenz®. Beide wurden ursprünglich als Röntgenkontrastmittel entwickelt, sind gut wasserlöslich und unterscheiden sich durch ihre Empfindlichkeit gegenüber Temperaturen über 55 °C. Metrizamid ist nicht autoklavierbar, daher wird das autoklavierbare Nycodenz®, das auch selbstformende Gradient ausbilden

kann, bei einer Vielzahl von Anwendungen zur Isolation von Zellen und subzellulären Strukturen eingesetzt (Sharpe, 1988).

1.2.2.2 Arbeiten mit Dichtegradienten

Schichten der Zellen auf den Gradienten

Beim Aufbringen der Zellen auf den Gradienten sollen die Zellen am besten in demselben Puffer suspendiert werden mit dem auch das Gradientenmedium verdünnt ist. Die Zellsuspension muss eine geringere Dichte als die oberste Stufe des Gradienten haben. Die Zentrifugation sollte unmittelbar nach dem Überschichten der Zellen beginnen. Das Volumen der Zellsuspension bei geschwindigkeitszonaler Trennung sollte klein (wenige ml) bemessen sein, da die gebildete Bande sonst zu breit und die Auflösung schlecht ist. Eine viel größere Anzahl von Zellen kann bei der isopyknischen Zentrifugation überschichtet werden, ohne die Trennschärfe negativ zu beeinflussen. Die Zellsuspension kann dem Gradienten vorsichtig überschichtet werden, wenn sich die Zellen in einer Lösung geringerer Dichte befinden oder dem Gradienten unterschichtet werden, wenn sie in einer dichteren Lösung aufgenommen wurden. In diesem Fall flotieren sie dann während der Zentrifugation (Sharpe, 1988).

Ernten der Zellen vom Gradienten

Auch die Entfernung von Zellen aus einem Gradienten nach der Zentrifugation erfordert hohe Sorgfalt. Das Entfernen der Röhrchen aus der Zentrifuge muss vorsichtig erfolgen, damit die Gradienten und die entstandenen Banden nicht gestört werden. Die Bildung von Konvektionsströmen, die die Gradienten auch stören könnten, wird minimiert, indem die Röhrchen bei der gleichen Temperatur wie der Rotor gehalten werden. Die einfachste Methode, einen Gradienten direkt zu entladen, besteht darin, den Boden des Röhrchens mit einer scharfen Nadel zu durchstechen und den Gradienten in ein Sammelgefäß tropfen zu lassen. Diese Methode kann aber nicht verwendet werden, wenn ein Zellpellet vorhanden ist. Wenn sich die Zellen in Banden angeordnet haben, die deutlich sichtbar sind, können sie mit einer Pipette oder einer Spritze der Schicht entnommen werden (Sharpe, 1988).

1.2.3 Adhäsion

Techniken, die auf einer Zelladhäsion beruhen, sind einige der einfachsten Methoden zur Zelltrennung. Diese werden routinemäßig bei der Isolierung von Zellen aus verdauten oder explantierten Primärgeweben angewendet (Tomlinson et al. 2013). Durch Auswahl geeigneter Wachstumsfaktoren und Zellkulturplatten zur selektiven Begünstigung oder

Hemmung der Adhäsion können anhaftende Zellen von suspendierten Zellen getrennt werden (Stemcell Technologies, https://www.stemcell.com/cell-separation/methods#microfluidic, Zugriff 31.12.2020).

Vorteil dieser Methode besteht in ihrer einfachen Durchführung und niedrigen Kosten. Nachteil ist die sehr niedrige Spezifität. Deshalb ist diese Methode nur anwendbar, wenn die Zellreinheit keine Rolle spielt und die Isolierung verschiedener Populationen nicht erforderlich ist. (Tomlinson et al. 2013)

1.2.4 Spezifische Isolation und Anreicherung von Zellen mittels Antikörperbindung

Eine sehr spezifische Isolation und Anreichung bestimmter Zellpopulationen kann durch Markierung der Zellen mit Ak erfolgen, meist werden mAk verwendet. Sie sind spezifisch für ein charakteristisches Oberflächenmolekül der Zielzellen. Die spezifischen mAk können unmarkiert oder bereits mit einem Marker konjugiert eingesetzt werden (direkte Markierung). Bei nativen Ak wird in einem zweiten Markierungsschritt ein sogenannter Sekundärantikörper verwendet. Dieser ist nun mit einem Marker konjugiert und bindet an die konstante Region des Primärantikörpers (indirekte Markierung). Je nach Markierung – magnetisch oder mittels eines Fluorochroms können zwei sehr spezifische Isolationsmethoden unterschieden werden. Oft werden die Zielzellen mit Antikörpern gegen unterschiedliche Oberflächenmoleküle gleichzeitig markiert, um eine bessere Trennung von anderen Zellpopulationen zu erreichen (Murphy und Weaver, 2016).

1.2.4.1 Selektion mit immunomagnetischen Beads

Bei dieser Technik werden magnetische Partikel verwendet, um Zielzellen aus heterogenen Zellsuspensionen zu isolieren. Diese Methode wird auch als magnetic-activated cell sorting (MACS) bezeichnet. Die Zellen werden über spezifische Ak an Magnetkügelchen gebunden. Eine Vielzahl verschiedener Substanzen wie Stärke, Cellulose, Albumin, Thacrylat oder Polystyrol zur Formung der Magnetpartikeln wurden getestet, alle verhalten sich inert und nicht toxisch. Mittlerweile sind fast alle Magnetkügelchen paramagnetisch, das bedeutet, dass der Magnetismus nur in einem starken Magnetfeld induziert wird. Die Zellsuspension mit den magnetisch markierten Zellen wird in ein Magnetfeld gebracht, die markierten Zellen binden an den Magneten und die nicht markierten bleiben in Suspension. Die Anreicherung von Zielzellen durch magnetische Separationstechniken kann unter Verwendung positiver oder negativer Selektionsstrategien erreicht werden.

Positive Selektion ist der spezifische und direkte Weg, um die Zielzellen aus einer heterogenen Zellsuspension zu isolieren. Die Zielzellen werden magnetisch markiert (direkt oder indirekt), in einem Magnetfeld zurückgehalten, die anderen Zellen ausgewaschen und nach Entfernen vom Magneten als angereicherte Fraktion eluiert. Der Nachteil dieser Strategie besteht darin, dass die für die Markierung verwendeten Ak abhängig von der Art der Zellen und ihrer weiteren Verwendung störend sein können (Dainiak et al., 2007).

Bei der indirekten oder negativen Selektion werden unerwünschte Zellpopulationen über spezifische Ak an Magnetpartikel gebunden und in einem Magnetfeld zurückgehalten, während die Zielzellen unbeeinflusst und nativ isoliert werden. Bei dieser Vorgehensweise ist die Reinheit der Zielpopulation jedoch etwas geringer verglichen mit der direkten Selektion (Stemcell Technologies, https://www.stemcell.com/cell-separation/methods#microfluidic, Zugriff 31.12.2020).

1.2.4.2 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung

Die fluoreszenzaktivierte Hochgeschwindigkeitssortierung (FACS) ist eine spezielle Art der FCM, bei der fluoreszierende Marker genutzt werden (Dainiak et al., 2007). Die Zellen werden anhand ihrer Größe, Granularität und spezifischen Fluoreszenz isoliert. Die gesuchte Zellpopulation wird mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Ak ebenfalls direkt oder indirekt markiert. Die Isolation mit Hilfe von FACS erfordert ein spezielles Durchflusszytometer mit Sortierkapazität und entsprechender Software. Das Fluoreszenzdetektionssystem erkennt die gesuchten Zellen basierend auf vorbestimmten Fluoreszenzparametern. Das Gerät legt eine Ladung auf das Tröpfchen, das die gesuchte Zelle enthält, und ein elektrostatisches Ablenksystem leitet das geladene Tröpfchen in das entsprechende Sammelröhrchen. Vorteil dieser Methode ist vor allem die sehr hohe Reinheit der gewünschten Population. FACS ist auch die einzige verfügbare Technik zur Isolierung der Zellen basierend auf nukleärer Färbung oder intrazellulärer Proteinexpression (Basu et al., 2010).
Trotz der hohen Genauigkeit und der Fähigkeit, äußerst seltene Populationen zu reinigen, weist die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung auch einige wesentliche Einschränkungen auf. Zum Beispiel hohe Kosten, Ertragsverluste, besonderes technisches Fachwissen und vergleichsweise geringen Durchsatz. Viele Experimente erfordern eine höhere Anzahl an Zellen, um ein Ergebnis repräsentativ nachweisen zu können, was eine Prozesszeit von mehreren Stunden bedingt. Eine Herausforderung ist, die Zellen während einer langen Verarbeitungszeit in ihrem besten Zustand zu halten (Dainiak et al., 2007). Daher empfiehlt

sich eine Voranreicherung der Zielzellen mittels Dichtegradientenzentrifugation und MACS (Tomlinson et al., 2013).

1.3 Isolierung der Basophilen Granulozyten

Da die Basophilen zu den seltensten zirkulierenden Leukozyten im Blut gehören, stellt ihre Isolierung eine gewisse Herausforderung dar. Als eine Möglichkeit der Isolierung von Basophilen wurden bei Menschen die Dichtegradientenzentrifugation (Kepley et al., 1994) und die negative Immunoselektion mit immunomagnetischen Beads verwendet (Schroeder und Bieneman, 2016).

Zelltrennung durch Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll oder Ficoll wird schon seit längerer Zeit für die Isolierung von hämatopoetischen Stammzellen angewendet. In neueren Studien war diese Methode auch für die Anreicherung von Basophilen erfolgreich (Shiono et al., 2016). In zwei verschiedenen Studien wurde beschrieben, dass sich die humanen Basophilen hauptsächlich auf der Schicht mit der Dichte 1,08 g/ml befinden (Kepley et al., 1994; Shiono et al., 2016). Bei Kaninchen wurden die Basophilen bei einer Dichte zwischen 1,07 und 1,078 g/ml mit einem Peak bei 1,074 g/ml ermittelt (Nouri-Shirazi et al., 1993). Mit dieser Methode erhält man Basophile, die funktionell kompetent und morphologisch intakt sind, da die Membran der Basophilen im Gegensatz zu einer Anreicherung mittels MACS oder FACS nicht von Ak beeinflusst wird. Auch bei negativer Selektion mit diesen beiden Methoden, könnten die Zellen durch antikörpervermittelte Aktivierung anderer Zellpopulationen beeinflusst werden. Nachteil ist, dass nach einer Percoll-Anreicherung die Basophilen noch mit Monozyten und Lymphozyten kontaminiert sind, und die Gesamtausbeute nur zwischen 5 % bis 28 % liegt (Kepley et al., 1994).
Es gibt mittlerweile kommerzielle Kits, die eine weitere Reinigung von Basophilen unter Verwendung negativer Selektion mit immunomagnetischen Beads ermöglichen. Die Versuche mit humanem Blut haben ergeben, dass eine Kombination dieser Methode zusammen mit einer vorangehenden Dichtegradientenzentrifugation zu einer Reinheit von über 90 % und Ausbeuten zwischen 50 und 100 % führen (Schroeder und Bieneman, 2016).
Leider sind diese kommerziell erhältlichen Beads nur für die Isolation humaner und muriner Basophiler geeignet.

1.4 Möglichkeiten der Identifikation von Basophilen Granulozyten

Basophile können durch verschiedene Methoden identifiziert und gezählt werden: manuelles Auszählen der Zellen im gefärbten Blutausstrich, in einem Zytospin ebenfalls nach Anfärben der Zellen, durch einen Hämatologie Analysator oder mittels FCM.

Manuelles Auszählen der Zellen wird als die Referenzenmethode angesehen. Nichts desto trotz hat diese Methode viele Limitationen. Ein automatischer Hämatologie Analysator bietet die Möglichkeit, eine große Anzahl von Zellen in kurzer Zeit zu analysieren, ist aber bekannt für seine inkonsistente analytische Leistung bei der Auszählung von Basophilen. Die FCM Zählung von Basophilen unter Verwendung von mAk wird in der Humanmedizin als Kandidat für eine neue Referenzmethode für die absolute Basophilenzahl im peripheren Blut angesehen und entsprechend entwickelt. Diese Methode ist hoch präzise und zeigt eine geringe Variabilität (Borzova und Dahinden, 2014).

1.4.1 Differenzierung und Auszählung der Basophilen nach Färbung

1.4.1.1 Diff-Quick-Färbung

Romanowsky-Färbung ist eine allgemeine Beschreibung der Azurblau/polychromierten Methylenblau-Eosin-Färbungen. Dieses Protokoll beruht auf Färben von sauren- und basischen Stellen, die reich an Polykationen beziehungsweise Polyanionen sind. Dieses resultiert in einer blauen Färbung des ribosomen-reichen, basophilen Zytoplasmas und der Kerne, sowie in einer roten Färbung der eosinophilen Granula und Erythrozyten. Eine zusätzliche Farbe, Purpur, wird an einer begrenzten Anzahl relativ schnell sich färbender Bestandteile erzeugt, insbesondere an Chromatin und bestimmten Granula von Neutrophilen und Thrombozyten. Diese Farbe entsteht in dem die anfängliche Azurblau-B-Färbung in einen Azurblau-B-Eosin-Komplex umgewandelt wird. Die schnellere Anfärbung ist auf DNA-reiches Chromatin zurückzuführen, das eine porösere Struktur als RNA-reiche Ribosomen aufweist (Horobin, 2011). Eine modifizierte Version des Romanowsky Typs ist die Diff-Quick-Färbung. Diese Methode ist schnell, einfach durchzuführen, kostengünstig und liefert gute Ergebnisse. Für Mastzellen und Basophile ist diese Methode jedoch nicht sensitiv genug, weil es möglich ist, dass sich die Granula nicht färben. (Peters, 2015)

1.4.1.2 Toluidinblau Färbung

Toluidinblau, auch als Toloniumchlorid bekannt, ist ein acidophiler metachromatischer Farbstoff, der selektiv saure Gewebekomponenten färbt. Toluidinblau ist affin zu Nukleinsäuren, bindet daher an Kernmaterial und wurde zur Färbung von Schleimhautläsionen verwendet. Aufgrund seiner metachromatischen Eigenschaften hat er auch Anwendung in der Histologie gefunden, um bestimmte Komponenten spezifisch zu färben. Zu den wichtigsten Strukturen, die eine Metachromasie aufweisen, gehören Mucin, Knorpel und Granula der Mastzellen und Basophilen. Substanzen, die auf diese Weise gefärbt werden können, werden als Chromotrope bezeichnet. Während die meisten Farbstoffe Gewebe in unterschiedlichen Intensitätsgraden derselben Farbe darstellen, färben basische Farbstoffe der Kohlenteergruppe bestimmte Gewebekomponenten, in einer anderen Farbe als der des Farbstoffs. Solche Färbereaktion werden als Metachromasie bezeichnet. Diese Farbstoffe absorbieren je nach Konzentration und Umgebung Licht mit unterschiedlichen Wellenlängen und können die Farbe durch eine speziell geordnete Form der Farbstoffaggregation modulieren ohne Veränderung ihrer chemischen Struktur. Die so gefärbten Strukturen erscheinen im Fall von Toluidinblau rot-violett statt blau (Sridharan und Shankar, 2012).

1.4.1.3 Alcainblau-Färbung

Alcainblau wird zur Färbung der heparin-haltigen Granula von Basophilen bei niedrigem pH-Wert in Gegenwart von Lanthanionen verwendet. In einer Dreifachblindstudie wurde ein Vergleich mit der Toluidinblau Färbung durchgeführt, dabei hat die Alcainfärbemethode eine höhere Genauigkeit und verbesserte Reproduzierbarkeit gezeigt (Gilbert and Ornstein, 1975).

1.4.2 Hämatologische Messung

Die Referenzmethode für die Auszählung der Basophilen ist die mikroskopische Objektträgeruntersuchung. Jedoch sind bei der Zählung der empfohlenen 400 Leukozyten, nur 0 - 4 Basophile zu erwarten, was zu einer schlechten Präzision der Auszählung führt. Deshalb ist die manuelle Zählung nicht gut geeignet für Zellen, deren Frequenz weniger als 5 % der gesamten Leukozytenzahl beträgt.

Automatische Zellzählgeräte, die in der Hämatologie verwendet werden, zählen einige tausende Leukozyten und könnten daher eine zuverlässigere Bestimmung der Basophilenzahl bieten. Allerding zeigen viele Studien, dass die Korrelation verschiedener

Instrument-Typen und zwischen Instrumenten und der Referenzmethode gering ist und somit diese Methode für die Zählung von Basophilen wegen mangelhafter Spezifität und Präzision nicht geeignet ist. Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass mit keiner Methode eine zuverlässige Auszählung möglich ist (Amundsen et al., 2012).

1.4.3 Durchflusszytometrische Charakterisierung

Die Methode beruht auf der Analyse von Einzelzellen, die zuvor über spezifische mAk, die direkt oder indirekt mit Fluorochromen markiert wurden. Die so vorbereiteten Zellen werden einzeln in einem Flüssigkeitsstrom an einem oder mehreren Lasern vorbeigeführt, dabei werden die Fluorochrome angeregt und emittieren entsprechendes Fluoreszenzlicht, das von einem optischen System detektiert wird, anschließend verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Von Einzelzellen können Größe, Granularität und spezifische Fluoreszenz erfasst und mittels geeigneter Software ausgewertet werden. Vorausgesetzt, dass entsprechende spezifische mAk vorhanden sind, und die Ausstattung des FCM es zulässt, können bis zu 20 spezifische oberflächlich oder intrazellulär lokalisierte Moleküle gleichzeitig erfasst werden. Mit dieser Methode können Zellen nach Abstammung, Aktivierungsstatus und Funktion unterschieden werden. Durch die hohe Sensitivität der Methode können auch Zellpopulationen sehr geringer Prävalenz erfasst und charakterisiert werden.

Die Erfassung der Basophilen mittels FCM erfordert die Verfügbarkeit entsprechender Ak zur Markierung der Zellen. Ein mögliches Panel für porzine Basophile wurde schon weiter oben diskutiert. Für die Analyse in der Humanmedizin stehen noch weitere Ak zur Verfügung. Am eindeutigsten ist der Nachweis der FcεRI Expression auf den Zellen. Für die α-Kette des humanen Rezeptors gibt es Antikörper (Nechansky et al., 2001). Zur Unterscheidung von Mastzellen in Zellisolaten von Organen wird ein mAk gegen cKit verwendet. Dieser Oberflächenmarker findet sich nur auf Mastzellen nicht aber an Basophilen (Min et al., 2012).

1.5 Fragestellung

Basophile Granulozyten haben auf ihrer Oberfläche IgE spezifisch über den hochaffinen Oberflächenrezeptor für IgE gebunden. Sie sollen als Grundlage für die Validierung monoklonaler Antikörper gegen porzines IgE dienen. Wegen der geringen Prävalenz im peripheren Blut, ist eine Anreicherung der Zellen nötig. Methoden zur Isolierung sind in der humanen und murinen Forschung beschrieben, nicht jedoch bei Schweinen. Daten der klinischen Hämatologie geben wenig Auskunft über die Frequenz der Basophilen bei gesunden Schweinen und legen außerdem nahe, dass ihre Frequenz verglichen mit anderen Tierarten niedriger ist. Zur Nutzung der Basophilen als Grundlage für weiterführende Analysen muss daher eine Methode zu ihrer Anreicherung etabliert werden.

Da die Expressionsrate des hochaffinen IgE-Rezeptors nicht bekannt ist, werden für die Analyse der porzinen Basophilen mittels Durchflusszytometrie weitere Granulozytenmarker zur Abgrenzung der relevanten Population mitgeführt.

Für diese Arbeit wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

- Aus dem Blut gesunder Schweine lassen sich Basophile Granulozyten isolieren und anreichern.
- Die porzinen Basophilen haben IgE über den hochaffinen IgE Rezeptor an ihrer Oberfläche gebunden.
- Die Spezifität der monoklonalen Antikörper für porzines IgE kann durch Bindung an Basophile bestätigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tab. 2: Verbrauchsrmaterial

Verbrauchsmaterial	Firma	Land
Einmalspitzen (2,5; 10; 20; 200; 1000 µl)	Greiner Bio-one	Österreich
Objektträger	VWR	Österreich
Polystyrolröhrchen für FACS-Analyse	BD Falcon	Frankreich
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf	Deutschland
Serologische Pipetten (2; 5; 10; 25 ml)	VWR	Österreich
Zellkulturplatten (6-Loch)	Greiner Bio-one	Österreich
Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel (15, 50 ml)	Greiner Bio-one	Österreich

Tab. 3: Geräte

Geräte	Typ	Firma	Land
Analysewaage	PJL560-3M	Kern	Deutschland
Brutschrank	Hera Cell 150i	Thermo-Fisher Scient.	USA
Durchflusszytometer	BD CANTO II	BD Bioscieneces	Österreich
Durchlichtmikroskop	H600L	Nikon	Japan
Hämotologieanalysator	XP-300	Sysmex Corporation	Japan
Kolbenhubpipetten	Research plus	Eppendorf	Deutschland
Multipipette	M4	Eppendorf	Deutschland
Peristaltikpumpe	101U/R	Whatson and Marlow	USA
pH-Meter	inoLab pH Level 2	WTW	Deutschland
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Pipetboy 2	Integra Bioscineces KK	Japan
Sterilbank	Hera Safe KS	ThermoFisher Scient.	USA
Ultrafiltrationsanlage zur Herstellung von ddH_2O	Arium 611	Sartorius	Österreich
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries	USA
Wasserbad	WB10	Medingen	Deutschland
Zentrifuge	Megafuge 40R	Heraeus	Deutschland

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tab.4: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller	Land
$CaCl_2.2H_2O$	Merck, VWR	Österreich
dd H_2O	in house	Österreich
Diff-Quick	VWR	Österreich
Ethanol 96 %	Merck, VWR	Deutschland
EDTA	Merck, VWR	Österreich
Fötales Kälber Serum (FCS)	PAN-Biotech	Deutschland
Formalin 37 %	Merck, VWR	Österreich
Gelatine from cold water fisch skin	Sigma-Aldrich	Österreich
Glukose	Sigma-Aldrich	Österreich
HCl 1 mol/l	Merck, VWR	Österreich
HEPES	Merck, VWR	Österreich
KCl	Merck, VWR	Österreich
KH_2PO_4	Merck, VWR	Österreich
$MgCl_2.H_2O$	Merck, VWR	Österreich
$MgSO_4.7\ H_2O$	Merck, VWR	Österreich
$Na_2HPO_4.2\ H_2O$	Merck, VWR	Österreich
NaCl	Merck, VWR	Österreich
$NaHCO_3$	Merck, VWR	Österreich
NH_4Cl	Merck, VWR	Österreich
Pancoll (Dichte 1,077 g/ml)	PAN-Biotech	Deutschland
Penicillin 10 000 I/ml Streptomycin 10 mg/ml	PAN-Biotech	Deutschland
Phenolrot	Sigma-Aldrich	Österreich
porzines Plasma	in house	Österreich
Toluidinblau O	Serva	Deutschland
Whole mouse IgG	Jackson Immuno Research	USA

2.1.3 Puffer

Tab. 5: Kommerzielle Puffer und Zellkulturmedien

Kommerzielle Puffer und Zellkulturmedien	Hersteller	Land
FACSClean	BD Biosciences	USA
FACSFlow	BD Biosciences	USA
Phosphat gepufferte Salzlösung (Dulbecco) ohne Ca^{++} und Mg^{++} (PBS) 10 x	PAN-Biotech	Deutschland
PBS 1 x	PAN-Biotech	Deutschland
RPMI 1640 Medium	PAN-Biotech	Deutschland

Tab. 6: Hergestellte Puffer

Hergestellte Puffer	Zusammenstellung
Hank´s gepufferte Salzlösung 10 x (HBSS)	5,6 mmol Glukose, in 10 x PBS
HBSS 1 x	10 x HBSS 1:10 mit sterilem ddH_2O
HEPES, pH 7,2	HEPES 0,25 mmol/l; pH mit HCl 1 mol/l bei 20 °C
FCM-Waschpuffer für kultivierte Zellen (WP-K)	3 % (v/v) FCS, in PBS
FCM-Waschpuffer für frische Zellen (WP-F)	10 % (v/v) porzines Plasma, in PBS
Waschpuffer nach Isolation (WP-I)	1 x HBSS, EDTA 0,001 mol/l

2.1.4 hergestellte Lösungen

Fisch-Gelatine 3 %

- Gelatine (cold water fish skin) 15 g
- ad 500 ml PBS

Fixierungslösung (Formalinlösung)

- Formalin 37 % 0,81 ml
- PBS 9,19 ml

Heparinlösung für Blutproben vom Schlachthof

- Heparin 400 U/ml
- Amphotericin B 2,5 µg/ml
- Gentamycin 1 µg/ml
- in PBS;
  Amphotericin B und Gentamicin wurde erst nach dem Heparin zugegeben.
  Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

Gey´s-Solution (10 x)

- NH_4Cl 7 g
- KCl 0,37 g
- $Na_2HPO_4.2\ H_2O$ 0,15 g
- KH_2PO_4 0,024 g
- Glukose 1 g
- Phenolrot 10 mg
- $MgCl_2.6\ H_2O$ 8,4 mg
- $MgSO_4.7\ H_2O$ 7 mg
- $CaCl_2.2\ H_2O$ 9 mg
- $NaHCO_3$ 45 mg
- in 1000 ml dd H_2O, autoklaviert.

Toluidinblau Stock

- Toluidinblau O 1 g
- ad 100 ml Ethanol 70 % (53,6 ml Ethanol 96 % (v/v), 46,4 ml dd H_2O)

Toluidinblau Gebrauchslösung

- Toluidinblau Stock 5 ml
- NaCl 1 % (w/v), pH 2,3 45 ml

  Die Lösung muss vor jeder Anwendung frisch zubereitet werden.

Zellkulturmedium

- Penicillin/Streptomycin 5 ml
- FCS (v/v) 10 %
- in 500 ml RPMI 1640 Medium

2.1.4.1 Lösungen für Dichtegradientenzentrifugation:

Percoll Stock 1,11 g/ml

- Percoll 1,13 g/ml 90 g
- 10 x HBSS 9 ml
- HEPES 0,25 mol/l 1 ml
- HCl mol/l 0,4 ml

Tab. 7: Herstellung der Lösungen mit definierter Dichte für die Dichtegradientenzentrifugation

Dichte (g/ml)	Percoll Stock	1 x HBSS
1,070	0,56 ml	0,44 ml
1,080	0,64 ml	0,36 ml
1,085	0,68 ml	0,32 ml
1,088	0,71 ml	0,29 ml
1,090	0,72 ml	0,28 ml

2.1.5 Antikörper für die FCM Markierung

Tab. 8: Antikörper

Spezifität	Speziesspezifität	Klon	Herkunft	Konjugat	Hersteller
CD14	anti-human	Tük4	Maus IgG1	unkonjugiert	Kingfisher
CD14	anti-human	CAM36A	Maus IgG2a	unkonjugiert	Biorad Antibodies
CD172a	anti-pig	74-22-15	Maus IgG1	AlexaFluor647	in house
CD52	anti-pig	11/305/44	Maus IgG2a	unkonjugiert	in house
Fixable Viability Dye				eFluor 780	Thermo Fisher
porzines IgE		38D3	Maus IgG1	unkonjugiert	in house

(Saalmüller et al., 2005)

Tab. 9: Isotypkontrollen

Spezifität	Klon	Herkunft	Konjugat	Hersteller
IgG1	P3.6.2.8.1	Maus	unkonjugiert	eBioscience
IgG1	MOPC-21	Maus	PE	BD Biosciences
IgG1	MOPC-21	Maus	AlexaFluor647	Life Tchnologies
IgG2a	NCG2A.01	Maus	unkonjugiert	Dianova
IgG2b	NCG2B.01	Maus	unkonjugiert	Dianova

Tab. 10: sekundäre Antikörper

Spezifität	Klon	Herkunft	Konjugat	Hersteller
anti IgG1	RMG1-1	Ratte	BV421	BioLegend/Biozym
anti IgG1	polyclonal	Ziege	PE	Southern Biothech
anti IgG1	M1-14D12	Ratte	PerCP-eF710	eBioscience
anti IgG2a	polyclonal	Ziege	BV421	Jackson Immuno Research
anti IgG2a	polyclonal	Ziege	PE	Southern Biotech
anti IgG2b	polyclonal	Ziege	AlexaFluor488	Jackson Immuno Research
anti IgG2b	polyclonal	Ziege	PE-Cy7	Southern Biotech

2.1.6 Blut Proben

Für alle Versuche wurde Blut von Schlachtschweinen, das nach der Tötung der Tiere gesammelt wurde, verwendet. Becher für 100 ml in die 10 ml Heparinlösung vorgelegt wurde, wurden dem Schlachthof zur Verfügung gestellt, wo diese bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt wurden. Das Blut wurde innerhalb von maximal zwei Stunden nach der Entnahme ins Labor gebracht.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation der Leukozyten aus porzinem Blut

Die Anreicherung der Leukozyten (WBC) aus dem Vollblut wurde auf zwei verschiedene Arten durchgeführt. Eine Methode war Entnahme des Buffy-Coat (BC) nach einer Zentrifugation und die zweite basierte auf einer passiven Sedimentation der Erythrozyten nach Mischen des Vollbluts mit einer Gelatinelösung und anschließender Gewinnung eines mit Leukozyten angereicherten Plasmas (LEP).
Zur Evaluation der Anreicherung wurde in allen erhaltenen Zellfraktionen einschließlich des Vollbluts die Anzahl der WBC und der Erythrozyten mit einem hämatologischen Zellzählgerät (Sysmex) ermittelt.

Buffy-Coat

Heparin-Blut wurde in 15 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt und bei 1000 x g für 20 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die weiße BC-Schicht mit einer Pasteurpipette entnommen und darauf geachtet nicht zu viele Erythrozyten mit aufzunehmen. Die Suspension wurde mit demselben Volumen WP-I verdünnt.

Leukozyten angereichertes Plasma

Heparin-Blut wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen mit der 3 % Gelatine-Lösung in einem Verhältnis 1:3 vermischt und für 90 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Die sedimentierten Erythrozyten bildeten ein gut abgegrenztes Pellet. Das mit Leukozyten angereicherte Plasma (LEP) war nur mehr leicht rot gefärbt, ein Hinweis dafür, dass nur mehr wenige Erythrozyten vorhanden waren. Es wurde in frische 50 ml Zentrifugenröhrchen transferiert.

2.2.2 Separation der Leukozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die einzelnen Zelltypen wurden mittels einer Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Ein-, zwei- und dreistufige Gradienten kamen zur Anwendung. Alle Trennungen wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen durchgeführt.
Von der gewonnenen Zellsuspension (BC, LEP) wurden jeweils 25 ml dem Gradientenmedium mit der geringsten Dichte überschichtet, von dem 10 - 15 ml vorgelegt wurden. Bei mehrstufigen Gradienten wurden die dichteren Gradientenlösungen unterschichtet, wobei streng darauf geachtet wurde, keine Luftblasen einzubringen. Das

Unterschichten erfolgte mit einer Peristaltikpumpe und einem dünnen, relativ steifen Silikonschlauch, welcher, schon befüllt, langsam bis zum Boden des Röhrchens eingeführt wurde, dann wurde die Pumpe, eingestellt auf die Geschwindigkeitsstufe zwölf (von 20), eingeschaltet. Sobald der konische Teil des Zentrifugenröhrchens befüllt war, konnte die Geschwindigkeit bis auf Stufe 14 erhöht werden. Bei dreistufigen Gradienten wurde beim Wechsel der Lösungen die Pumpe ausgeschaltet, um keine Luftblasen einzubringen. Anschließend wurden die Röhrchen bei 920 x g für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zentrifuge wurde auf langsamen Anlauf und ungebremsten Auslauf eingestellt.

Nach der Zentrifugation wurden die einzeln Zellschichten in frische 50 ml Zentrifugenröhrchen transferiert. Die einzelnen Zellfraktionen wurden mit PBS gewaschen.

Alle in der Folge erwähnten Waschschritte wurden auf dieselbe Weise durchgeführt: Röhrchen mit den in geringem Volumen resuspendierten Zellen wurden mit dem entsprechenden Waschpuffer aufgefüllt oder mit einem angegebenen Volumen und bei 350 x g für 8 - 10 Minuten bei Raumtemperatur oder 4 ° C pelletiert, anschließend wurde der Waschpuffer dekantiert und die Zellen im verbliebenem Volumen resuspendiert.

Dreistufiger Gradient

Gradientenlösungen mit den Dichten 1,07; 1,08 und 1,09 g/ml wurden hergestellt. Zuerst wurde 10 ml des 1,07 g/ml Gradientenmediums in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt, danach vorsichtig 20 ml der vorbereiteten Zellsuspension dem Gradienten überschichtet und anschließend jeweils 10 ml des 1,08 und 1,09 g/ml Mediums unterschichtet.

Zweistufiger Gradient

Für den zweistufigen Gradienten wurden Lösungen mit den Dichten 1,077 und 1,088 g/ml verwendet. Zuerst wurde 10 ml des 1,077 g/ml Gradientenmediums (Pancoll human) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt, danach vorsichtig 25 ml der Zellsuspension dieser Lösung überschichtet und anschließend wurden 10 ml der Lösung mit der Dichte 1,088 g/ml unterschichtet.

Einstufiger Gradient

Für den einstufigen Gradienten wurde Pancoll human mit der Dichte 1,077 g/ml verwendet. Von diesem wurden 15 ml in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt und danach die Zellsuspension überschichtet.

2.2.3 Entfernung der restlichen Erythrozyten

Da nicht alle Erythrozyten bei der Zellseparation entfernt werden konnten und diese bei der FCM Analyse störten, wurden zwei verschiedene Methoden der Erythrolyse angewendet und verglichen. Einerseits mittels Gey's Solution unmittelbar nach der Separation und andererseits mittels hypotonem Milieu nach Fixierung der Leukozyten im Anschluss an eine Markierung für die FCM Analyse.

2.2.3.1 Lyse der Erythrozyten mit Gey´s Solution

In 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden die vom Gradienten entnommenen und zwei Mal mit PBS gewaschenen Zellen zu je ca. 10^8 WBC/Röhrchen pelletiert und in geringem Volumen resuspendiert. Dann wurden 5 ml der auf 37 °C vorgewärmten Gey's Solution zugegeben, gemischt und für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen.

2.2.3.2 Lyse der Erythrozyten nach der Markierung der Zellen für die Durchflusszytometrie

Für die Erythrolyse nach der Markierung für die FCM wurden 200 µl der Formalinlösung zu den markierten, gewaschenen Zellen zugegeben, die Zellsuspension gemischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Erythrozyten durch Zugabe von 1 ml dd H_2O und Inkubation für 10 Minuten auf Eis lysiert. Danach wurden die Zellen 2 Mal mit je 2 ml PBS bei 4 °C gewaschen.

2.2.4 Mikroskopische Beurteilung

Um den Erfolg der Isolierung zu verifizieren, wurde neben der Zellzahl nach den verschiedenen Trenn- und Reinigungsschritten eine mikroskopische Beurteilung und Auszählung der einzelnen Zelltypen in allen gewonnenen Zellfraktionen durchgeführt.
Dafür wurden Ausstriche von je 5 µl der konzentrierten Zellsuspension angefertigt, die anschließend alle mit Diff-Quick, und ausgewählte Fraktionen auch mit Toluidinblau, gefärbt wurden. Mindestens 100 WBC wurden in einem Durchlichtmikroskop bei Verwendung eines Immersionsobjektives mit 100-facher Vergrößerung beurteilt und differenziert.

2.2.4.1 Diff-Quick Färbung

Nachdem die Ausstriche ausreichend getrocknet waren, wurden sie mit der Schnellfärbung Diff-Quick gefärbt. Die Färbereihe bestand aus drei Lösungen, in die die Ausstriche jeweils fünf Mal für je eine Sekunde getaucht wurden. Nach jeder Lösung wurde der Farbüberschuss vom Rand des Objektträgers abgetupft. Die erste Lösung diente der Fixierung des Ausstrichs. Nach der Färbung wurden die Ausstriche mit Leitungswasser gespült und zum Trocknen auf eine saugende Unterlage gestellt.

2.2.4.2 Toluidinblau Färbung

Mit Toluidinblau wurden nur jene Ausstriche gefärbt, bei denen mittels der Diff-Quick-färbung mehrheitlich Granulozyten gefunden wurden. Die Ausstriche wurden für zwei bis drei Minuten in Färbeküvetten mit der Gebrauchslösung gestellt und danach drei Mal in dd H_2O gewaschen und ebenfalls getrocknet. Die Adspektion und Auszählung der Basophilen erfolgte bei Immersionsvergrößerung.

2.2.5 Lagerung der Proben/Zellfraktionen

Da die Proben nicht am gleichen Tag für die Durchflusszytometrie markiert werden konnten, wurden sie in Kulturmedium (KM) entweder im Brutschrank oder im Kühlschrank für 24 bis 36 Stunden gelagert.
Für die Inkubation bei 37 °C wurden 2 x 10^7 Zellen je Näpfchen einer 6-Loch Zellkulturplatte in 4 ml KM inkubiert. Für die Lagerung bei 4 °C wurden maximal 1 x 10^8 Zellen in 10 ml Kulturmedium in sterilen 50 ml Zentrifugenröhrchen gelagert.

2.2.6 Durchflusszytometrie

Zellen aus der mit Basophilen angereicherten Fraktion wurde für eine Messung im FCM mit Antikörpern markiert. Für die Messung wurden 1 x 10^7 WBC pro Röhrchen verwendet. Wenn zur Reduktion des Volumens nötig, wurden die Zellen pelletiert, der überschüssige Puffer oder KM dekantiert und die Zellen resuspendiert. Die Färbung wurde in 4,5 ml Polystyrolröhrchen durchgeführt. Nach Zugabe der Primärantikörper (Tab. 11) wurden die Zellen für 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zwei Mal mit je 2 ml WP-F oder WP-K, je nachdem, ob die Zellen bis zur Markierung bei 4 °C (WP-F) oder 37 °C (WP-K)

inkubiert wurden, gewaschen (300 x g für 6 Minuten bei 4 °C). Die entsprechenden WP wurden für alle Waschschritte des gesamten Färbeprotokolls verwendet.
Nach Zugabe der Sekundärantikörper (Tab. 11) wurden die Zellen wieder für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert und nach der Inkubation mit demselben WP zweimal gewaschen. Da zwei mAk desselben Isotyps verwendet wurden, musste nun ein Blockierungsschritt mit Mausserum (1,05 µl/Tube) durchgeführt werden. Auch für diesen Schritt wurden die Zellen 20 min auf Eis inkubiert und anschließend zwei Mal gewaschen. Danach wurden die Zellen noch mit dem direkt markierten anti-CD172a-AF647 und dem Farbstoff zur lebend-tot Diskriminierung für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend gewaschen. Da die Zellsuspension bei Einsatz von 10^7 Zellen sehr dicht war, wurde das resuspendierte Pellet durch Zugabe von ca. 200 µl WP für die Messung im FCM verdünnt. Die Markierung wurde für alle Proben auf dieselbe Weise durchgeführt, jedoch wurden für einige Marker entweder unterschiedliche Klone oder unterschiedlich markierte Sekundärantikörper verwendet. Da die mit anti-pIgE anfärbbare Zellpopulation sehr klein und auch die mittlere Fluoreszenzintensität nicht besonders hell war, wurde für diesen Antikörper zur Abgrenzung der negativen Population eine *Fluorescence Minus One* (FMO) Kontrolle mitgeführt (Tab. 11 - Tube 3). In diesem Tube wurden alle Antikörper des Panels bis auf den anti-pIgE eingesetzt. Der korrespondierende Sekundärantikörper aber wurde im entsprechendem Inkubationsschritt zugegeben.

Zusätzlich wurde der Zellkulturüberstand von laboreigenen Klon 38D3 (Maus IgG1) mittels HEK 293T Zellen titriert, die transient mit einem Plasmid zur intrazellulären Expression der schweren Kette von porzinem IgE transfiziert waren. Zur Kontrolle der Expression in den HEK-293T Zellen trug das rekombinante Protein noch einen N-terminalen Flag®Tag, der ebenfalls im FCM mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden konnte. Für die Titration wurde ein Anfangsvolumen von 10 µl, welches in einer Verdünungsreihe 1:2 weiter verdünnt wurde, verwendet. (Diese Untersuchung wurde nicht im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführt.)

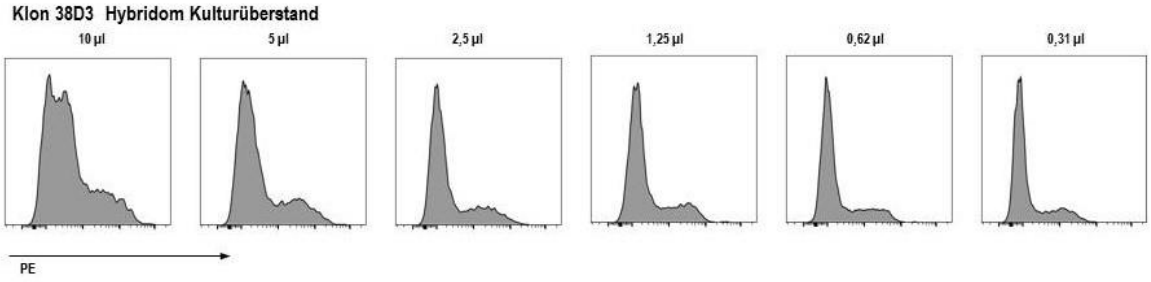

Abb. 1: Titration von anti pIgE haltigem Zellkultrüberstand des Klons 38D3 auf transient transfizierten HEK293T Zellen, diese exprimieren intrazellulär rpIgE. Zellkulturüberstand wurde ausgehend von konzentriertem in einer geometrischen Verdünnungsreihe (Faktor 2) eingesetzt.

.

Tab. 11: FCM Färbeprotokoll; für andere Klone oder Fluorochrome wurde dasselbe Schema beibehalten

Tube	primär Antikörper	µl	2 x 2 ml	sekundär Antikörper	in 30 µl	2 x 2 ml	Blocking 1,05 µl	2 x 2 ml	3.mAk L/D stain	µl	2 x 2 ml
1	ohne		WP	ohne		WP	ohne	PBS	ohne		WP
2	IsoKO IgG1	21	WP	anti IgG1-PE	1:200	WP	whole mouse IgG	PBS	IsoKO-IgG1 AF647	2	WP
	IsoKO IgG2a	21		anti IgG2a-BV 421	1:150						
	ISOKO IgG2b	21		anti IgG-2b-AF488	1:500				VD eF780	0,075	
3		0,6	WP	anti IgG1-PE	1:200	WP	whole mouse IgG	PBS	CD172a-AF647	1,2	WP
	CD14 (Tük4)			anti IgG2a-BV 421	1:150						
	CD52	30		anti IgG-2b-AF488	1:500				VD eF780	0,075	
4	anti IgE (38D3)	5	WP	anti IgG1-PE	1:200	WP	whole mouse IgG	PBS	CD172a-AF647	1,2	WP
	CD14 (Tük4)	0,6		anti IgG2a-BV 421	1:150						
	CD52	30		anti IgG-2b-AF488	1:500				VD eF780	0,075	

2.2.6.1 *Auswertung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie*

Für die Analyse wurde ein FACS Canto II FCM (3 Laser mit 407, 488 und 633 nm, BD Biosciences) mit der FACS Diva Software Version 6.1.3. (BD Biosciences) verwendet. Die Ergebnisse wurden mittels FlowJo Version 10.6.2 (BD Biosciences) bearbeitet und ausgewertet. Von allen Ansätzen wurden alle Zellen aufgezeichnet. Das Stop-gate für 10^6 Zellen lag auf WBC.

Für die Auswertung wurden über FCS-A/FSC-H Dubletten ausgegrenzt und im Anschluss mittels der fixable Viability Dye eFluor780 die toten (positiven) Zellen ausgeschlossen. In der FSC/SSC Ansicht wurden die Granulozyten in einem erweiterten „Gate“ eingegrenzt und die Evaluierung der Zellen an Hand der spezifischen Marker vorgenommen.

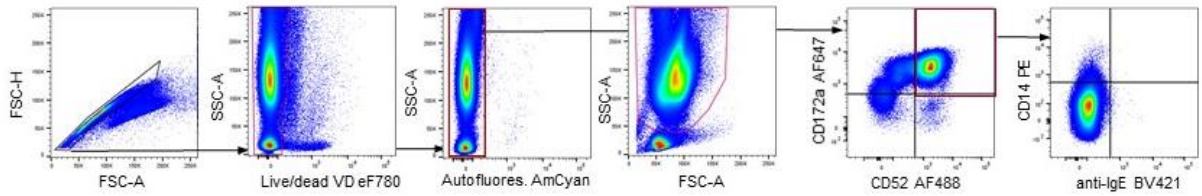

Abb. 2: Gatingstrategie: Ausgehend von Einzelzellen wurden die lebenden Zellen eingegrenzt und im Anschluss jene, die keine Autofluoreszenz aufwiesen. Die Graunlozytenpopulation wurde im erweiterten FSC/SSC eingegrenzt. Von den CD52 CD172a doppeltpositiven Zellen wurden die CD14$^-$ auf ihre spezifische Anfärbbarkeit mit anti-pIgE untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Isolation der Leukozyten aus porzinem Blut

3.1.1 Anreicherung der Leukozyten

Bei sechs Tieren mit variablem Ausgangsvolumen wurde die Ausbeute an WBC bei Isolation aus BC und LEP verglichen (Tab. 12 und Abb. 3). Bei Anreicherung über LEP konnten durchschnittlich um 32 % (19 – 43 %) mehr WBC isoliert werden.

Tab. 12: Vergleich der WBC Ausbeute bei Verwendung von BC und LEP zur Anreicherung. Die Angaben in Prozent beziehen sich auf die Anzahl der WBC im Vollblut.

Schwein	Vollblut			BC gesamt		LEP gesamt	
	ml	x 10^6	%	x 10^6	%	x 10^6	%
1	25	175	100	32	18	99	57
2	25	172	100	23	14	99	57
3	50	1110	100	316	28	750	68
4	50	1200	100	551	46	780	65
5	50	810	100	297	37	590	73
6	50	1660	100	713	43	1030	62

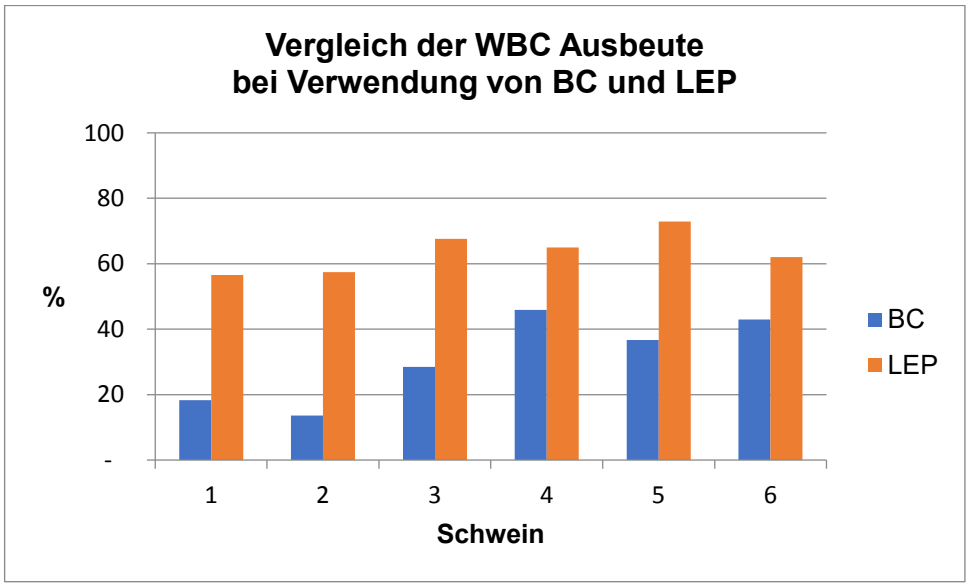

Abb. 3: Vergleich der Ausbeute bei Verwendung von BC und LEP zur Anreicherung der WBC aus VB. Die Angaben in Prozent beziehen sich auf die Anzahl der WBC im Vollblut.

3.1.2 Isolation der Granulozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation

Eine weitere Isolation bzw. Anreicherung der Granulozyten wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation erreicht. Dafür wurden mehrere Varianten verglichen und zur Beurteilung der Effizienz Ausstriche aus den jeweiligen Zellpellets angefertigt. Diese wurden mit Diff-Quick und Toluidinblau gefärbt, um die enthaltenen Zelltypen zu charakterisieren.

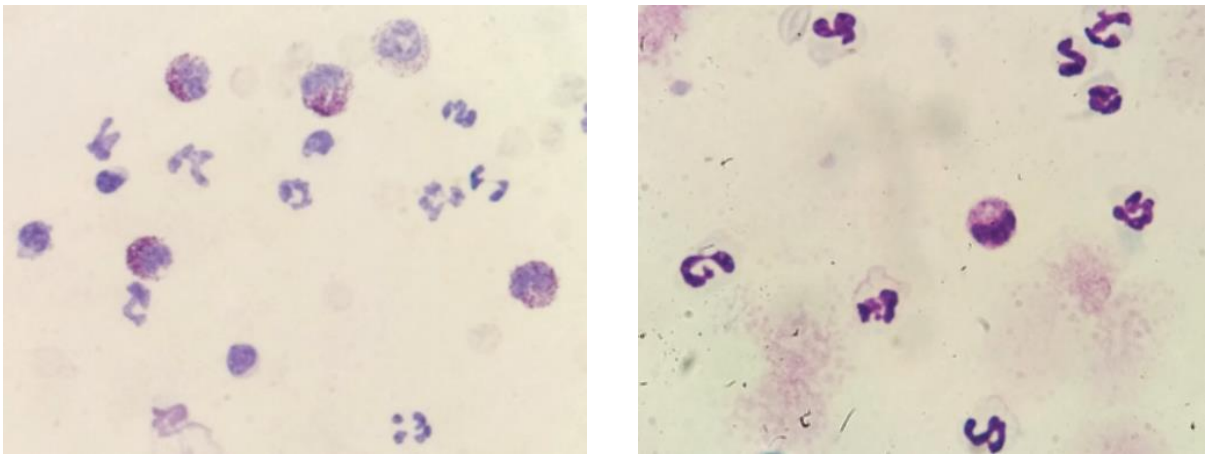

Abb. 4: Basophile in Ausstrichen eines Zellpellets nach Lyse der Erythrozyten. Bild links Toluidinblau-Färbung, Bild rechts Diff-Quick-Färbung

Dreistufiger Gradient

Für die Etablierung einer geeigneten Isolationsmethode wurde als erstes die Zelltrennung über einen dreistufigen Gradienten beurteilt. Nach der Zentrifugation waren vier Zonen erkennbar.

A: Schicht auf dem 1,07 g/ml Gradienten
B: Schicht auf dem 1,08 g/ml Gradienten
C: Schicht auf dem 1,09 g/ml Gradienten
D: Schicht am Boden des Zentrifugenröhrchens (Pellet)

Schicht A war weiß und gut sichtbar, Schicht B war weiß, sehr dünn und fast nicht sichtbar, Schicht C war weiß mit rötlichem Überzug und gut sichtbar und Schicht D war rötlich, wolkig und nicht gut abgrenzbar.

Mikroskopische Beurteilung

Die meisten Basophilen wurden in der Fraktion C, d.h. auf dem Gradienten der Dichte 1,09 g/ml, gefunden. Wie erwartet waren die meisten Lymphozyten in der Fraktion A (auf dem Gradienten der Dichte 1,07 g/ml) und die Erythrozyten im Pellet unter dem Gradienten

der Dichte 1,09 g/ml (Fraktion D). In der B-Fraktion waren wenige Lymphozyten und diese Fraktion war insgesamt sehr zellarm.
Die vorgefundenen Zellpopulationen in den Ausstrichen der einzelnen Fraktionen sind in den Tab. 13 (Diff-Quick-Färbung) und Tab. 14 (Toluidinblau-Färbung) zusammengefasst.

Tab. 13: WBC in den jeweiligen Schichten eines dreistufigen Gradienten nach vorangegangener Anreicherung der Zellen mittels BC. Die Ausstriche wurden mit Diff-Quick gefärbt.

Schwein	A (auf 1,07 g/ml)	B (auf 1,08 g/ml)	C (auf 1,09 g/ml)	D (unter 1,09 g/ml)
1	Lymphozyten Monozyten	Lymphozyten	Neutrophile Eosinophile **Basophile** Monozyten Erythrozyten	Neutrophile Monozyten Erythrozyten
2	Lymphozyten Monozyten	Lymphozyten	Neutrophile Eosinophile Monozyten Lymphozyten Erythrozyten	Neutrophile Erythrozyten

Tab. 14: WBC in der C-Fraktion des dreistufigen Gradienten nach vorangegangener Anreicherung mittels BC. Die Ausstriche wurden mit Toluidinblau gefärbt.

Schwein	C (auf 1,09 g/ml)
1	andere Granulozyten, Lymphozyten
2	**Basophile,** andere Granulozyten

Bie beiden Schweinen konnten in der Fraktion C die Basophile identifiziert werden, wenn auch nicht mittels beider Färbemethoden gleichzeitig. Mittels der Toluidinblau-Färbung sollten verglichen mit der Diff-Quick-Färbung die Basophile besser darstellbar sein, jedoch konnte man dieses anhand der Ergebnisse nicht nachvollziehen.

Zweistufiger Gradient

Nachdem die meisten Lymphozyten bei einer Dichte von 1,07 g/ml zu finden waren und bei einer Dichte von 1,09 g/ml viele Erythrozyten nicht von den übrigen WBC zu trennen waren, wurde die Trennung über einen zweistufigen Gradienten versucht. Für diese Isolation wurden WBC aus BC und LEP Anreicherung verwendet. Nach der Zentrifugation waren 3 Schichten entstanden:

A: Schicht auf dem 1,077 g/ml Gradienten

B: Schicht auf dem 1,088 g/ml Gradienten

C: Schicht am Boden des Zentrifugenröhrchens

Schicht A war weiß, Schicht B war weiß mit rötlichem Überzug, dick und gut sichtbar und Schicht C war rötlich, wolkig ohne ein deutliches Pellet zu bilden.

Mikroskopische Beurteilung

Bei Verwendung von zweistufigen Gradienten der Dichten 1,077 und 1,088 g/ml wurden die meisten Basophilen in der Fraktion B (auf dem Gradienten der Dichte 1,088 g/ml) zusammen mit Neutrophilen, Eosinophilen und wenigen Monozyten gefunden. In dieser Schicht war auch eine erhebliche Anzahl an Erythrozyten, die im Anschluss mit Gey‘s Solution lysiert wurden. Bei ungefähr der Hälfte der untersuchten Proben wurden die vom Gradienten abgenommenen Zellen so behandelt, daher waren in den Ausstrichen nur noch Fragmente der Erythrozyten oder keine zu finden. Bei den anderen wurde keine Gey‘s Solution angewendet und viele Erythrozyten waren dem zu Folge in den Ausstrichen der Fraktion B zu finden. In der Fraktion A (auf dem Gradienten der Dichte 1,077 g/ml) konnten die meisten Lymphozyten festgestellt werden und bei den meisten Proben auch Thrombozyten (diese werden in der folgenden und auch in den weiteren Tabellen nicht eigens erwähnt). In der Fraktion C (unter dem Gradienten der Dichte 1,088 g/ml) waren fast keine Zellen auffindbar.

Eine Übersicht über die, in den einzelnen Ausstrichen (Diff-Quick- und Toluidinblau-Färbung) vorgefundenen Zellpopulationen geben die Tab. 15 bis 18 an. Die Frequenzen der einzelnen WBC in der B-Fraktion sind in absoluten Zahlen und in Prozentwerten in den Tab. 19 und 20 zusammengefasst.

Tab. 15: WBC in den einzelnen Schichten eines zweistufigen Gradienten. Zellen aus dem BC wurden verwendet. Die Ausstriche wurden mit Diff-Quick gefärbt.

Schwein	**A (auf 1 077 g/ml)**	**B (auf 1 088 g/ml)**	**C (unter 1 088 g/ml)**
3	Lymphozyten Monozyten	Neutrophile Eosinophile Monozyten Lymphozyten	Keine Zellen
4	Lymphozyten Monozyten	Neutrophile Monozyten	Neutrophile Lymphozyten Monozyten
5	Lymphozyten Monozyten Neutrophile	Neutrophile Eosinophile **Basophile** Monozyten Lymphozyten	ggr. Neutrophile
6	Lymphozyten	Neutrophile Monozyten	ggr. Neutrophile Lymphozyten

Tab.16: WBC in der B-Fraktion eines zweistufigen Gradienten. Zellen aus dem BC wurden verwendet. Die Ausstriche wurden mit Toluidinblau gefärbt

Schwein	B (auf 1,088 g/ml)
3	andere Granulozyten, Monozyten
4	**Basophile,** andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
5	**Basophile**, andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
6	**Basophile**, andere Granulozyten, Monozyten

Tab.17: WBC in den einzelnen Schichten eines zweistufigen Gradienten. Zellen aus LEP wurden verwendet. Die Ausstriche wurden mit Diff-Quick gefärbt.

Schwein	A (auf 1,077 g/ml)	B (auf 1,088 g/ml)	C (unter 1,088 g/ml)
1	Lymphozyten	Neutrophile, Eosinophile, Monozyten, Lymphozyten, Erythrozyten	Erythrozyten
2	Lymphozyten, Monozyten	Neutrophile, **Basophile**, Monozyten, Lymphozyten, Erythrozyten	Erythrozyten, Neutrophile
3	Lymphozyten	Neutrophile , Monozyten, Lymphozyten	Erythrozyten Fragmente, Neutrophile
4	Lymphozyten	Neutrophile, Monozyten	Erythrozyten Fragmente
5	Lymphozyten	Neutrophile, Monozyten, Lymphozyten	keine Zellen
6	Lymphozyten	Neutrophile	Neutrophile
7	Lymphozyten	Neutrophile, Eosinophile, Lymphozyten	keine Zellen
8	Lymphozyten, ggr. Neutrophile, Monozyten	Neutrophile, Eosinophile, Monozyten, Lymphozyten	keine Zellen
9	Lymphozyten	Neutrophile, **Basophile**, Monozyten, Lymphozyten	ggr. Neutrophile
10	Lymphozyten	Neutrophile, Eosinophile, **Basophile**, Monozyten, Lymphozyten	keine Zellen
11	Lymphozyten, ggr. Neutrophile	Neutrophile, Monozyten, Lymphozyten	Erythrozyten, ggr. Neutrophile
12	Lymphozyten	Neutrophile, Monozyten, Lymphozyten	Erythrozyten
13	Lymphozyten, ggr. Neutrophile	Neutrophile, Monozyten, Lymphozyten	keine Zellen
14	Lymphozyten, ggr. Neutrophile	Neutrophile, **Basophile**, Lymphozyten	Erythrozyten, ggr. Neutrophile
15	Lymphozyten	Neutrophile, **Basophile**, Monozyten, Lymphozyten	Erythrozyten, ggr. Neutrophile
16	Lymphozyten, ggr. Neutrophile	Neutrophile, Eosinophile, Monozyten, Lymphozyten	Erythrozyten
17	Lymphozyten	Neutrophile, Monozyten	Erythrozyten
18	Lymphozyten, Monozyten	Neutrophile, Eosinophile, **Basophile**, Monozyten, Lymphozyten	Erythrozyten, ggr. Neutrophile
19	Lymphozyten, ggr. Neutrophile, Monozyten	Neutrophile, Monozyten	Erythrozyten, ggr. Neutrophile
20	Lymphozyten, ggr. Neutrophile	Neutrophile, Monozyten, Lymphozyten	Erythrozyten, ggr. Neutrophile
23	Lymphozyten	Neutrophile, Eosinophile, **Basophile**, Monozyten, Lymphozyten, Erythrozyten	Erythrozyten
24	Lymphozyten	Neutrophile, Monozyten, Lymphozyten, Erythrozyten	Erythrozyten, ggr. Neutrophile, Monozyten
25	Lymphozyten	Neutrophile, Eosinophile, Monozyten, Lymphozyten, Erythrozyten	Erythrozyten, ggr. Neutrophile
26	Lymphozyten	Neutrophile, Eosinophile, **Basophile**, Monozyten, Lymphozyten, Erythrozyten	Erythrozyten
27	Lymphozyten	Neutrophile, Eosinophile, **Basophile**, Monozyten, Lymphozyten, Erythrozyten	Erythrozyten
28	Lymphozyten	Neutrophile, Eosinophile, **Basophile**, Monozyten, Lymphozyten, Erythrozyten	Erythrozyten, ggr. Neutrophile, Eosinophile

Tab. 18: WBC in der B-Fraktion eines zweistufigen Gradienten. Zellen aus LEP wurden verwendet. Die Ausstriche wurden mit Toluidinblau gefärbt.

Schwein	B (auf 1,088 g/ml)
1	**Basophile,** andere Granulozyten, Lymphozyten
2	**Basophile,** andere Granulozyten, Lymphozyten
3	**Basophile**, andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
4	**Basophile**, andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
5	**Basophile**, andere Granulozyten, Monozyten
6	andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
7	**Basophile**, andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
8	**Basophile**, andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
9	**Basophile**, andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
10	**Basophile**, andere Granuloyzten, Monozyten
11	andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
12	**Basophile**, andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
13	andere Granulozyten, Monozyten
14	**Basophile**, andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
15	**Basophile**, andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
16	andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
17	**Basophile**, andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
18	**Basophile**, andere Granulozyten, Monozyten
19	**Basophile**, andere Granulozyten
20	andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
23	**Basophile**, andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
24	**Basophile**, andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
25	andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
26	**Basophile**, andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
27	**Basophile**, andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten
28	**Basophile**, andere Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten

Tab. 19: Übersicht der Frequenzen der einzelnen Zelltypen in der B-Fraktion bei Trennung der angereicherten WBC über einen zweistufigen Gradienten. Die Auszählung erfolgte an Ausstrichen nach Diff-Quick-Färbung bei einer Gesamtvergrößerung von 1000 x. Je Ausstrich wurden mindestens 100 Zellen erfasst.

DIFF-QUICK	Neutrophile		Eosinophile		Basophile		Monozyten		Lymphozyten	
Fraktion	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%
BC 3	137	93,8	2	1,4	**0**	**0,0**	4	2,7	3	2,1
BC 4	106	87,6	0	0,0	**0**	**0,0**	15	12,4	0	0,0
BC 5	194	97,0	2	1,0	**1**	**0,5**	1	0,5	2	1,0
BC 6	93	93,9	0	0,0	**0**	**0,0**	6	6,1	0	0,0
LEP 3	123	82,0	0	0,0	**0**	**0,0**	9	6,0	18	12,0
LEP 4	95	89,6	0	0,0	**0**	**0,0**	11	10,4	0	0,0
LEP 5	91	91,0	0	0,0	**0**	**0,0**	3	3,0	6	6,0
LEP 6	100	100,0	0	0,0	**0**	**0,0**	0	0,0	0	0,0
LEP 7	87	87,0	11	11,0	**0**	**0,0**	0	0,0	2	2,0
LEP 8	73	73,0	21	21,0	**0**	**0,0**	2	2,0	4	4,0
LEP 9	97	97,0	0	0,0	**1**	**1,0**	1	1,0	1	1,0
LEP 10	99	66,0	2	1,3	**2**	**1,3**	44	29,3	3	2,0
LEP 11	88	88,0	0	0,0	**0**	**0,0**	6	6,0	6	6,0
LEP 12	94	94,0	0	0,0	**0**	**0,0**	2	2,0	4	4,0
LEP 13	142	94,7	0	0,0	**0**	**0,0**	7	4,7	1	0,7
LEP 14	98	98,0	0	0,0	**1**	**1,0**	0	0,0	1	1,0
LEP 15	96	96,0	0	0,0	**1**	**1,0**	1	1,0	2	2,0
LEP 16	188	94,0	5	2,5	**0**	**0,0**	5	2,5	2	1,0
LEP 17	99	99,0	0	0,0	**0**	**0,0**	1	1,0	0	0,0
LEP 18	111	92,5	1	0,8	**2**	**1,7**	1	0,8	5	4,2
LEP 19	195	97,5	0	0,0	**0**	**0,0**	5	2,5	0	0,0
LEP 20	94	94,0	0	0,0	**0**	**0,0**	2	2,0	4	4,0
LEP 23	141	70,5	2	1,0	**1**	**0,5**	13	6,5	43	21,5
LEP 24	88	88,0	0	0,0	**0**	**0,0**	3	3,0	9	9,0
LEP 25	70	70,0	1	1,0	**0**	**0,0**	7	7,0	22	22,0
LEP 26	62	60,8	16	15,7	**5**	**4,9**	2	2,0	17	16,7
LEP 27	52	55,3	4	4,3	**3**	**3,2**	5	5,3	30	31,9
LEP 28	53	50,0	5	4,7	**4**	**3,8**	5	4,7	39	36,8

Tab. 20: Übersicht der Frequenzen der einzelnen Zelltypen in der B-Fraktion bei Trennung der angereicherten WBC über einen zweistufigen Gradienten. Die Auszählung erfolgte an Ausstrichen nach Toluidinblau-Färbung bei einer Gesamtvergrößerung von 1000 x. Je Ausstrich wurden mindestens 100 Zellen erfasst.

TOLUIDINBLAU	Basophile		andere Granulozyten		Monozyten		Lymphozyten	
Fraktionen	**abs.**	**%**	**abs.**	**%**	**abs.**	**%**	**abs.**	**%**
BC 3	**0**	**0,0**	98	97,0	3	3,0	0	0,0
BC 4	**1**	**0,9**	90	84,1	3	2,8	13	12,1
BC 5	**1**	**1,0**	89	89,0	4	4,0	6	6,0
BC 6	**1**	**1,0**	98	97,0	2	2,0	0	0,0
LEP 3	**1**	**1,0**	69	68,3	20	19,8	11	10,9
LEP 4	**1**	**0,8**	91	72,8	24	19,2	9	7,2
LEP 5	**1**	**1,0**	98	98,0	1	1,0	0	0,0
LEP 6	**0**	**0,0**	95	95,0	3	3,0	2	2,0
LEP 7	**3**	**3,0**	94	94,0	2	2,0	1	1,0
LEP 8	**2**	**2,0**	86	86,0	10	10,0	2	2,0
LEP 9	**3**	**3,0**	70	70,0	18	18,0	9	9,0
LEP 10	**3**	**2,0**	89	59,7	57	38,3	0	0,0
LEP 11	**0**	**0,0**	77	77,0	14	14,0	9	9,0
LEP 12	**1**	**1,0**	94	93,1	5	5,0	1	1,0
LEP 13	**0**	**0,0**	94	94,0	6	6,0	0	0,0
LEP 14	**4**	**4,0**	91	91,9	3	3,0	1	1,0
LEP 15	**1**	**0,5**	188	94,0	1	0,5	10	5,0
LEP 16	**0**	**0**	97	97,0	2	2,0	1	1.0
LEP 17	**1**	**0,7**	129	92,8	5	3,6	4	2,9
LEP 18	**2**	**2,0**	95	95,0	3	3,0	0	0,0
LEP 19	**3**	**3,0**	97	97,0	0	0,0	0	0,0
LEP 20	**0**	**0,0**	90	90,0	1	1,0	9	9,0
LEP 23	1	**0,9**	77	72,6	11	10,4	17	16,0
LEP 24	1	**1,0**	75	75,0	18	18,0	6	6,0
LEP 25	0	**0,0**	57	57,0	8	8,0	35	35,0
LEP 26	9	**8,5**	82	77,4	1	0,9	14	13,2
LEP 27	3	**3,0**	67	67,0	3	3,0	27	27,0
LEP 28	7	**7,0**	53	53,0	3	3,0	37	37,0

Mittels der Toluidinblau-Färbung können verglichen mit der Diff-Quick-Färbung in den meisten Ausstrichen mehr Basophile gefunden werden. Die Auswahl den beiden Dichten von 1,077 und 1,088 g/ml brachte nur einen einseitigen Erfolg. Die Lymphozyten konnten Großteiles von den Granulozyten isoliert werden, während die bei der LEP-Anreicherung verbliebenen Erythrozyten über den Dichtegradienten aus der Granulozytenfraktion nicht angereichert werden konnten.

Einstufiger Gradient

Da arbeitsaufwändigere zweistufige Gradienten nicht zum gewünschten Erfolg führten, wurden nur die Lymphozyten aus dem LEP über einen einfachen Gradienten mit einer Dichte von 1,077 g/ml abgereichert. Nach der Zentrifugation entstanden 2 Schichten:

A: Schicht auf dem 1,077 g/ml Gradienten

B: Schicht unter dem 1,077 g/ml Gradienten, Pellet

Die Schicht A war weiß, dick und gut sichtbar und die Schicht B war ein rotes Pellet mit einem weißen Überzug.

Mikroskopische Beurteilung

Bei Verwendung eines einstufigen Gradienten der Dichte 1,077 g/ml wurden die meisten Basophilen wie erwartet in der Fraktion B (unter dem Gradienten am Boden des Zentrifugenröhrchens) zusammen mit Neutrophilen und Eosinophilen, Monozyten und Erythrozyten gefunden und in der A-Fraktion (auf dem Gradienten) die meisten Lymphozyten.

Eine Übersicht über die in den einzelnen Ausstrichen vorgefundenen Zellpopulationen (Diff-Quick- und Toluidinblau-Färbung) sind in den Tab. 21 und 22 dargestellt. Die Frequenzen der einzelnen Zelltypen in der B-Fraktion sind in absoluten Zahlen und in Prozentwerten in den Tab. 23 und 24 zusammengefasst. WBC aus LEP der Tiere 26 – 28 wurde sowohl über einen zweistufigen wie auch über einen einstufigen Gradienten (26 x – 28 x) isoliert.

Tab. 21: Zelltypen in den Fraktionen eines einstufigen Gradienten. WBC aus LEP wurden verwendet. Die Ausstriche wurden mit Diff-Quick gefärbt.

Schwein	A (auf 1,077 g/ml)	B (unter 1,077 g/ml)
26 x	Lymphozyten, **Basophile**, Neutrophile	Neutrophile, Eosinophile, **Basophile**, Lymphozyten, Erythrozyten
27 x	Lymphozyten, **Basophile**, Neutrophile, Monozyten	Neutrophile, Eosinophile, **Basophile**, Lymphozyten, Erythrozyten
28 x	Lymphozyten, Neutrophile, Monozyten	Neutrophile, Eosinophile, **Basophile**, Lymphozyten, Erythrozyten
29	Lymphozyten	Neutrophile, Eosinophile, **Basophile**, Monozyten, Lymphozyten, Erythrozyten
30	Lymphozyten	Neutrophile, Eosinophile, **Basophile**, Lymphozyten, Erythrozyten
31	Lymphozyten	Neutrophile, Lymphozyten, Erythrozyten
32	Lymphozyten	Neutrophile, Eosinophile, **Basophile**, Lymphozyten, Erythrozyten

Tab. 22: Zelltypen in den Fraktionen eines einstufigen Gradienten. WBC aus LEP wurden verwendet. Die Ausstriche wurden mit Toluidinblau gefärbt.

Schwein	B (unter 1,077 g/ml)
26 x	**Basophile**, andere Granulozyten, Lymphozyten
27 x	**Basophile**, andere Granulozyten, Lymphozyten
28 x	**Basophile**, andere Granulozyten, Lymphozyten
29	**Basophile**, andere Granulozyten, Lymphozyten
30	**Basophile**, andere Granulozyten
31	andere Granulozyten, Lymphozyten
32	**Basophile**, andere Granulozyten, Lymphozyten

Tab. 23: Übersicht der Frequenzen der einzelnen Zelltypen in der B-Fraktion bei Trennung der WBC aus LEP und Anreicherung über einen einstufigen Gradienten. Die Auszählung erfolgte an Ausstrichen nach Diff-Quick-Färbung bei einer Gesamtvergrößerung von 1000 x. Je Ausstrich wurden mindestens 100 Zellen erfasst.

	Neutrophile		Eosinophile		Basophile		Monozyten		Lymphozyten	
Fraktionen	**abs.**	**%**	**abs.**	**%**	**abs.**	**%**	**abs.**	**%**	**abs.**	**%**
26 x	62	62,0	16	16,0	**7**	**7,0**	0	0,0	15	15,0
27 x	62	62,0	3	3,0	**4**	**4,0**	0	0,0	31	31,0
28 x	55	55,0	24	24,0	**5**	**5,0**	0	0,0	16	16,0
29	91	91,0	2	2,0	**3**	**3,0**	1	1,0	3	3,0
30	93	93,0	2	2,0	**4**	**4,0**	0	0,0	1	1,0
31	99	99,0	0	0,0	**0**	**0,0**	0	0,0	1	1,0
32	78	78,0	2	2,0	**4**	**4,0**	0	0,0	16	16,0

Tab. 24: Übersicht der Frequenzen der einzelnen Zelltypen in der B-Fraktion bei Trennung der WBC Anreicherung über einen einstufigen Gradienten. Die Auszählung erfolgte an Ausstrichen nach Toluidinblau -Färbung bei einer Gesamtvergrößerung von 1000 x. Je Ausstrich wurden mindestens 100 Zellen erfasst.

	Basophile		andere Granulozyten		Monozyten		Lymphozyten	
Fraktionen	**abs.**	**%**	**abs.**	**%**	**abs.**	**%**	**abs.**	**%**
26 x	12	**10,3**	71	60,7	0	0,0	34	29,1
27 x	7	**5,9**	80	67,8	0	0,0	31	26,3
28 x	2	**2,0**	67	67,0	0	0,0	31	31,0
29	13	**13,0**	85	85,0	0	0,0	2	2,0
30	3	**3,0**	97	97,0	0	0,0	0	0,0
31	0	**0,0**	97	97,0	0	0,0	3	3,0
32	4	**4,0**	75	75,0	0	0,0	21	21,0

3.2 Beurteilung der Effizienz der Anreicherung

Von allen Fraktionen wurde mittels eines Zellzählgerätes (Sysmex) die Anzahl der WBC und der Erythrozyten bestimmt. Die Anreicherung der WBC und die Anzahl der verbliebenen Erythrozyten bei unterschiedlichen Methoden wurde gegenübergestellt.

Der Ertrag der WBC bei der Anreicherung aus Vollblut betrug für den ersten Schritt mittels LEP 61,5 ± 10,2 % (Tab. 25). Davon konnten 41,1 ± 14,6 % in jener Schichte des Dichtegradienten versammelt werden, in der der Hauptanteil der Basophilen zu finden war. Dies entspricht einer Nettoausbeute für die Anreicherung der Granulozyten von durchschnittlich 25 % (Tab. 26). Die Ausbeute an WBC mittels BC war, wie schon im Kap. 3.1.1. beschrieben wurde, im Durchschnitt um 32 % geringer. Diese Wiederfindungsrate stellt nur eine ungefähre Schätzung dar, da in den Ausstrichen von Vollblut keine Differenzierung der Leukozyten durchgeführt wurde. Die Tiere 7, 13, 26 x, 27 x und 28 x wurden bei der Berechnung nicht miteinbezogen, da es zu einem Fehler bei der WBC-Zellzahlbestimmung gekommen war.

Nach der Anreicherung der WBC mittels LEP verblieben durchschnittlich 1,01 ± 0,28 % der Erythrozyten. Durch Dichtegradientenzentrifugation konnten ihre Anzahl in der basophil-reichen Fraktion um durchschnittlich 40 % der im LEP vorgefunden Erythrozyten vermindert werden (Tab. 27). Eine nachträgliche Lyse mit Gey´s Solution konnte sie um 95 % reduzieren (Tab. 28).

Tab. 25: Wiederfindung der WBC aus Vollblut im LEP
Die Zellzahlen beziehen sich auf alle im Ausgangsvolumen enthaltenen Zellen.

Schwein	Vollblut.	LEP ges.	
	x 10^6	x 10^6	%
1	175,0	99,0	56,6
2	172,0	99,0	57,6
3	1110,0	750,0	67,6
4	1200,0	780,0	65,0
5	810,0	590,0	72,8
6	1660,0	1030,0	62,0
7	571,2	470,0	82,3
8	571,2	440,0	77,0
9	643,2	370,0	57,5
10	840,0	460,0	54,8
11	1200,0	670,0	55,8
12	1209,6	560,0	46,3
13	609,6	510,0	83,7
14	729,6	560,0	76,8
15	1046,4	630,0	60,2
16	902,4	440,0	48,8
17	1737,6	1100,0	63,3
18	2553,6	1320,0	51,7
19	2544,0	1240,0	48,7
20	1392,0	560,0	40,2
23	600,0	270,0	45,0
24	494,4	380,0	76,9
25	782,4	560,0	71,6
26	1022,4	750,0	73,4
27	1392,0	940,0	67,5
28	604,8	450,0	74,4
26x	1051,2	950,0	90,4
27x	1228,8	990,0	80,6
28x	537,6	520,0	96,7
29	590,4	400,0	67,8
30	729,6	510,0	69,9
31	700,8	240,0	34,2
32	744,0	590,0	79,3

Tab. 26: Anreicherung der WBC aus LEP in den einzelnen Fraktionen des zweistufigen Dichtegradienten. Die Zellzahlen beziehen sich auf alle im Ausgangsvolumen des Vollbluts enthaltenen Zellen.

Schwein	LEP ges.	Fraktion A		Fraktion B		Fraktion C	
	x 10^6	x 10^6	%	x 10^6	%	x 10^6	%
1	99,0	2,7	2,7	52,4	52,9	1,5	1,5
2	99,0	7,1	7,2	48,4	48,9	3,5	3,5
3	750,0	7,0	0,9	80,0	10,7	23,9	3,2
4	780,0	3,0	0,4	251,8	32,3	8,4	1,1
5	590,0	1,9	0,3	214,0	36,3	1,8	0,3
6	1030,0	1,9	0,2	251,9	24,5	17,3	1,7
7	470,0	Nicht gemessen		140,0	29,8	2,4	0,5
8	440,0	Nicht gemessen		179,0	40,7	1,9	0,4
9	370,0	11,0	3,0	106,0	28,6	3,2	0,9
10	460,0	3,5	0,8	239,0	52,0	4,8	1,0
11	670,0	9,2	1,4	164,0	24,5	10,6	1,6
12	560,0	3,0	0,5	138,0	24,6	6,8	1,2
13	510,0	2,2	0,4	100,0	19,6	6,0	1,2
14	560,0	11,8	2,1	334,0	59,6	37,0	6,6
15	630,0	2,2	0,3	284,0	45,1	8,8	1,4
16	440,0	29,4	6,7	74,0	16,8	35,0	8,0
17	1100,0	12,8	1,2	660,0	60,0	13,2	1,2
18	1320,0	20,8	1,6	858,0	65,0	9,2	0,7
19	1240,0	9,0	0,7	429,0	34,6	24,2	2,0
20	560,0	9,3	1,7	207,0	37,0	5,0	0,9
23	270,0	1,0	0,4	98,0	36,3	7,0	2,6
24	380,0	1,0	0,3	120,0	31,6	8,0	2,1
25	560,0	5,2	0,9	133,0	23,8	34,4	6,1
26	750,0	2,0	0,3	696,0	92,8	13,4	1,8
27	940,0	2,2	0,2	750,0	79,8	14,0	1,5
28	450,0	14,0	3,1	184,0	40,9	21,2	4,7
26x	950,0	182,5	19,2	394,8	41,6		
27x	990,0	92,5	9,3	441,6	44,6		
28x	520,0	107,5	20,7	174,9	33,6		
29	400,0	105,0	26,3	157,0	39,3		
30	510,0	162,0	31,8	179,0	35,1		
31	240,0	54,0	22,5	168,0	70,0		
32	590,0	165,0	28,0	214,0	36,3		

Tab. 27: Anzahl der Erythrozyten im LEP und in der Fraktion B nach der Dichtegradienten-zentrifugation. Die Prozentsätze in LEP beziehen sich auf Vollblut (entspricht 100 %) und jene in der Fraktion B auf LEP. Die Erythrozyten in den WBC Isolaten wurden nach der Dichtagradientenzentrifugation mittels Gey´s Solution Großteils lysiert.

Schwein	Vollblut	LEP ges		Fraktion B	
	x 10^9	x 10^9	%	x 10^9	%
3	443,00	14,00	3,16	**0,18**	**1,29**
4	446,00	3,00	0,67	**0,74**	**24,67**
5	395,50	4,00	1,01	**0,32**	**8,00**
6	373,00	3,00	0,80	**0,23**	**7,67**
7	420,96	5,00	1,19	**0,20**	**4,00**
8	361,92	4,00	1,11	**0,20**	**5,00**
9	326,88	3,00	0,92	**0,10**	**3,33**
10	342,24	3,00	0,88	**0,20**	**6,67**
11	379,20	5,00	1,32	**0,00**	**0,00**
12	379,68	5,00	1,32	**0,20**	**4,00**
13	457,44	3,00	0,66	**0,20**	**6,67**
14	359,04	4,00	1,11	**0,20**	**5,00**
15	360,96	3,00	0,83	**0,20**	**6,67**
16	414,72	2,00	0,48	**0,00**	**0,00**
17	692,16	10,00	1,44	**0,30**	**3,00**
18	788,16	6,00	0,76	**0,30**	**5,00**
19	759,36	6,00	0,79	**0,30**	**5,00**
20	607,68	7,00	1,15	**0,30**	**4,29**
23	345,60	3,00	0,87	**0,10**	**3,33**
24	385,44	4,00	1,04	**0,20**	**5,00**
25	336,48	4,00	1,19	**0,10**	**2,50**
26	372,96	4,00	1,07	**0,22**	**5,50**
27	346,08	3,00	0,87	**0,24**	**8,00**
28	363,84	3,00	0,82	**0,00**	**0,00**

Tab. 28: Anzahl der Erythrozyten in der basophil-reichen Fraktion nach einer Anreicherung mittels LEP und einer Dichtegradientenzentrifugation ohne Erythrolyse.

Schwein	LEP ges	LEP_B	
	x 10^9	x 10^9	%
1	0,22	0,16	72,73
2	1,65	0,92	55,76
23	3,00	0,60	20,00
24	4,00	0,80	20,00
25	4,00	0,50	12,50
26x	3,00	1,40	46,67
27x	2,00	0,96	48,00
28x	3,00	0,77	25,67
29	5,00	2,30	46,00
30	4,00	1,80	45,00
31	2,00	1,20	60,00
32	3,00	1,00	33,33

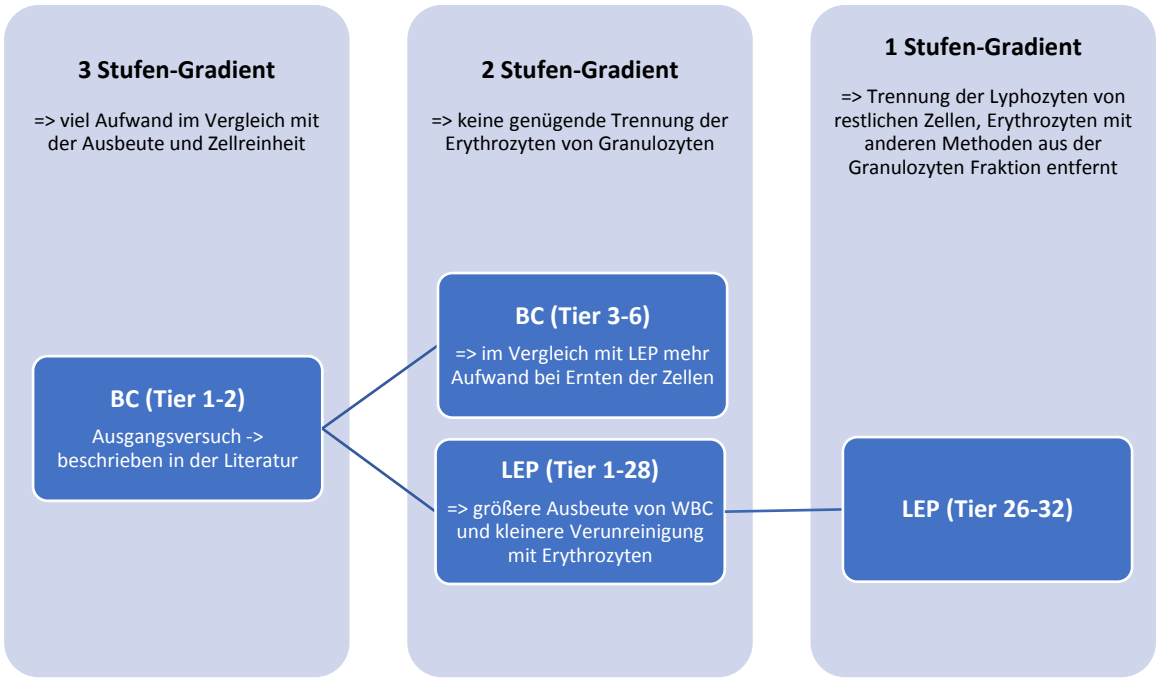

Abb. 5: Chronologischer Ablauf der Versuchsabfolge mit dargestellten Entscheidungsgründen der weiter gewählten Isolationsmethoden

3.3 Durchflusszytometrie

Die unterschiedlichen Strategien zur Anreicherung und Isolierung der Granulozyten wurden auch mittels FCM an Hand des Vorwärtsstreulichtes (FSC) und des Seitwärtsstreulichts (SSC) sowie eines Fluoreszenzfarbstoffs, der die Unterscheidung von lebenden und toten Zellen ermöglicht (tote Zellen nehmen den Farbstoff auf), beurteilt.

Die Eingrenzung der einzelnen WBC Populationen, Ausschluss von Dubletten und toten Zellen erfolgte bei allen Experimenten wie im Kapitel Material und Methoden dargestellt.

3.3.1 L/D + FSC/SSC

Als erstes wurde die Anzahl an lebenden Granulozyten, die mit den beiden Anreicherungsmethoden LEP und BC und anschließender Isolation der Granulozytenfraktion über einen zweistufigen Gradienten erhalten wurden, bewertet. Bei diesen Versuchen war für die FCM Messung die Voltage für FSC und SSC etwas zu niedrig eingestellt (Abb. 6), da nur auf die Darstellung der Granulozytenpopulation wertgelegt wurde. Die Lebensfähigkeit der WBC war bei beiden Isolationsmethoden annähernd gleich. Da aber nach der Anreicherung mittels BC wesentlich mehr Erythrozyten vorhanden waren, wurde für die weiteren Versuche nur mehr mit einer Anreicherung mittels LEP gearbeitet.

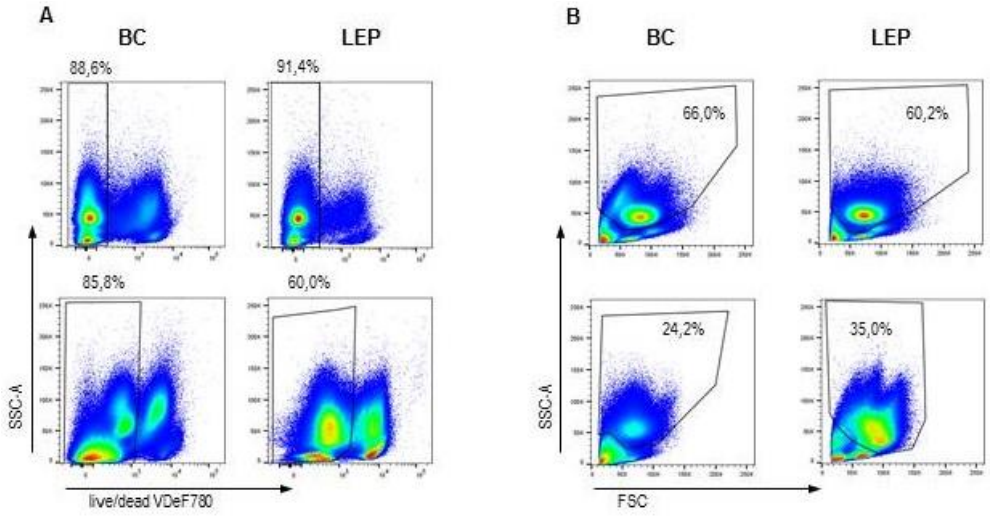

Abb. 6: Lebend/tot Diskriminierung und Darstellung der Granulozyten. Die Granulozytenfraktion wurde über einen zweistufigen Gradienten entweder aus einer Voranreicherung über BC oder LEP isoliert. Für die FCM wurden die Zellen der Fraktion B verwendet, die vor der FCM Analyse für 36 h bei 37 °C in KM inkubiert wurden. Die Ergebnisse von zwei Tieren von insgesamt vier aus zwei unabhängigen Versuchen sind dargestellt. (A) zeigt die Diskriminierung mittels einer L/D Färbung und (B) die Darstellung der WBC mittels FSC/SSC.

Tab. 29: Prozentualer Anteil der lebenden Zellen in der Fraktion B nach Isolation über einen zweistufigen Gradienten; Vergleich BC und LEP nach Gey´s Solution und Inkubation bei 37 °C für 36 h. Die Standardabweichung (SD) gibt die Variation zwischen den Teströhrchen innerhalb einer Probe wieder.

BC	%	SD	LEP_B	%	SD
BC 3	87,60	4,78	**LEP 3**	61,66	9,47
BC 4	85,82	7,15	**LEP 4**	59,88	18,13
BC 5	88,58	5,74	**LEP 5**	91,36	9,74
BC 6	ausgefallen		**LEP 6**	88,92	0,78
MW	87,33		MW	75,46	
SD	1,40		SD	17,00	

Der zweistufige Gradient wurde verwendet, um Granulozyten bei einer Dichte von 1,088 g/ml von einem Großteil der Erythrozyten abtrennen zu können. Dies wurde bei ungefähr der Hälfte aller Präparationen durchgeführt, ohne damit eine markante Reduktion der Erythrozyten zu bewirken (→3.2). Daher wurde bei den folgenden Präparationen nur mehr ein einstufiger Gradient zur Exklusion der Lymphozyten angewendet.

Um die, bei der FCM Messung und auch bei projektierten weiterführenden Untersuchungen störenden, Erythrozyten zu entfernen, wurden zwei unterschiedliche Vorgangsweisen verglichen. Erythrozyten können vor oder nach einer Markierung für eine FCM Messung lysiert werden. Zu einer Entfernung vor der FCM Färbung wurden die Zellpräparationen unmittelbar nach der Isolation mit Gey's Solution behandelt. Wurden die Erythrozyten nach einer FCM Färbung entfernt, mussten die WBC zuerst mittels eines formalinhältigen Puffers fixiert werden, dann konnten die Erythrozyten im Anschluss durch Zugabe von ddH_2O lysiert werden. Die Erythrolyse durch Gey's Solution war nie vollständig und sehr variabel und barg weiters die Gefahr einer Schädigung der WBC bzw. ihrer Oberflächenmarker in einem nicht verifizierbaren Ausmaß. Im Vergleich dazu war die Erythrolyse nach einer FCM Färbung nahezu vollständig und die zu analysierenden Oberflächenmoleküle waren schon mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert, sodass es zu keiner Veränderung mehr kommen konnte.

In vergleichenden Experimenten wurden daher die beiden Methoden zur Entfernung der Erythrozyten in Bezug auf die Lebensfähigkeit und die Anfärbbarkeit und Darstellung der zur Diskriminierung wesentlichen Marker, evaluiert.

Für die Vorbereitung der Zellen für eine FCM Analyse wurden ebenfalls zwei Vorgehensweisen verglichen. In Studien wurde die Empfehlung ausgesprochen, die isolierten Zellen für mindestens 24 h zur Regeneration bei 37 °C in KM zuhalten (Willheim et al., 1995; Saini et al., 1999). Dieser Methode steht entgegen, dass Zellen, möglicherweise zellartspezifisch, auch absterben können, und dass auch hier Oberflächenmoleküle verändert werden könnten.

Bei der Inkubation der Zellen bei 37 °C starben wesentlich mehr Zellen verglichen mit der Lagerung bei 4 °C (Abb. 7 und Tab. 30). Die Anwendung von Gey's Solution zur Lyse der Erythrozyten beeinflusste die Lebensfähigkeit der gesamt WBC nicht, jedoch war eine relative Verschiebung zugunsten der Lymphozyten zu bemerken. Auch Größe und Granularität der Granulozyten wurden unter der Einwirkung von Gey's Solution vermindert.

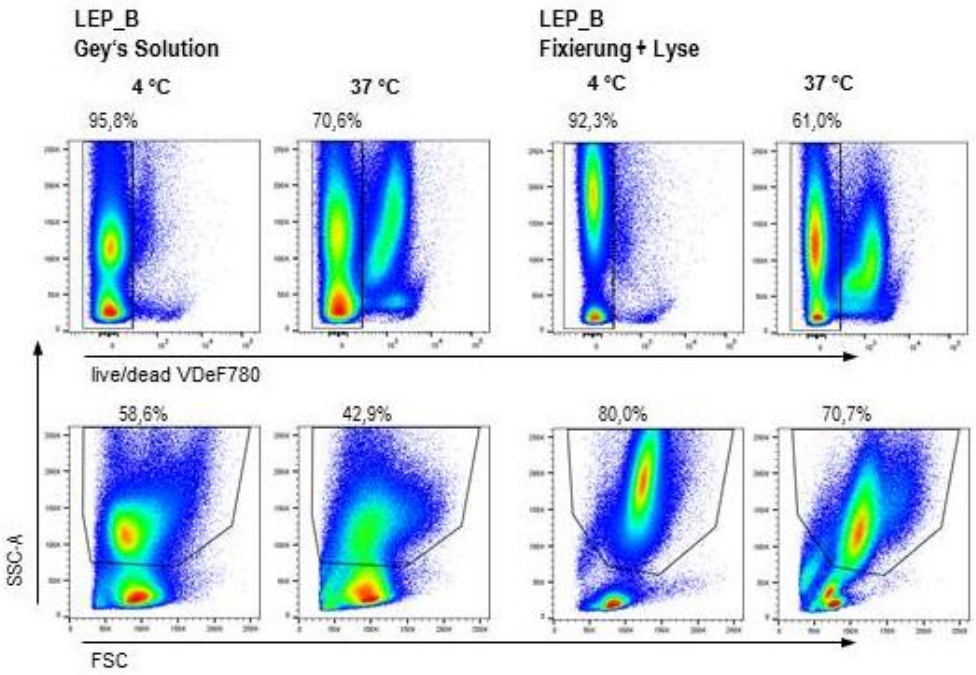

Abb. 7: Lebensfähigkeit und Lage im FSC/SSC von WBC (Fraktion B) bei unterschiedlicher Vorbehandlung. Die Zellen wurden bei 4 °C oder 37 °C für 36 h in KM inkubiert. Zusätzlich wurde auch die Auswirkung von zwei unterschiedlichen Methoden zur Lyse der Erythrozyten verglichen. In der oberen Reihe wurde die Lebensfähigkeit mittels Inkorporation von L/D VDe780 analysiert („Gate" liegt auf den lebenden Zellen) und in der unteren Reihe die Lage der Granulozyten („gegatete" Zellen) im FSC/SSC.

Tab. 30: Lebensfähigkeit der WBC bei Lagerung bei 4 °C und 37 °C für 36 h und Lyse der Erythrozyten mit Gey's Solution vor der FCM Markierung oder mittels Fixierung/Lyse (Fix/ddH_2O) nach der FCM Markierung (Mittelwert aus drei Proben).

nach 36 h		**Lebensfähigkeit**		**Autofluoreszenz**	
Temperatur	**Lyse**	**MW**	**SD**	**MW**	**SD**
4 °C	Fix/ddH_2O	88,53	3,43	2,77	0,70
37 °C	Fix/ddH_2O	74,97	13,21	14,73	8,05
4 °C	Gey's Solution	95,97	0,24	3,10	0,30
37 °C	Gey's Solution	77,93	5,29	11,80	4,60

Um einen Überblick über das Verhalten der Granulozytenpopulation bei Inkubation/Lagerung zu geben, wurde in der folgenden Tabelle (Tab. 31) noch die Anzahl der Granulozyten relativ zur Gesamtzahl aller isolierten WBC zusammengefasst. Die prozentuale Abnahme der Granulozytenzahl bei Behandlung mit Gey's Solution im Vergleich zu Fixierung und Lyse war individuell sehr unterschiedlich. Da die Analyse der Zellen für diese Gegenüberstellung mittels FCM durchgeführt wurde, sind die Zellzahlen mit denen im Kapitel 3.2 nicht direkt vergleichbar.

Tab. 31: Relative Häufigkeit der Granulozyten bezogen auf die Gesamtzahl der isolierten WBC aus Fraktion B nach Entfernung der Erythrozyten mittels Gey's Solution oder Fixierung/Lyse sofort nach der Isolation oder nach 36 h bei 4 °C oder 37 °C in KM.

	sofort		**nach 36 h**			
			4 °C		**37 °C**	
Schwein	**Gey's Solution**	**Fixierung/ Lyse**	**Gey's Solution**	**Fixierung/ Lyse**	**Gey's Solution**	**Fixierung/ Lyse**
33	38,8	74,9	33,5	74,9	24,4	68,2
34	67,5	82,7	58,6	80,0	42,9	70,7
35	41,3	58,3	34,7	55,2	24,7	27,9

Da die Inkubation der WBC bei 37 °C negative Auswirkungen auf Vitalität und auch auf die Qualität der Zellen hatte, wurden für die weiteren Versuche die Zellen nach der Isolation im KM bei 4 °C gelagert. Für die Isolation wurde eine Anreicherung der WBC mittels LEP und anschließender Abreicherung der Lymphozyten über einen einstufigen Dichtegradienten mit 1,077g/ml gewählt. Die Erythrolyse mit beiden Methoden wurde noch bei weiteren Versuchen vergleichend verwendet, jedoch entschieden, dass die Entfernung nach der Markierung für die Phänotypisierung besser geeignet war.

3.3.2 Granulozyten spezifische Marker

Neben der Lebensfähigkeit und Lage der Granulozytenpopulation im FSC/SSC wurde auch die Färbung für jene Marker, die zur Diskriminierung der drei Granulozytenpopulationen verwendet wurden, bei den unterschiedlichen Bedingungen für Isolation und Weiterbehandlung evaluiert.

3.3.2.1 CD52 und CD172a

Auf einer Vielzahl von Immunzellen wird CD52 exprimiert und dient gemeinsam mit CD172a auch zur Diskriminierung der Granulozyten. Zur Evaluierung des Einflusses unterschiedlicher Präparationen von WBC wurde die Expression auf Granulozyten mit jener auf Monozyten unter den schon genannten Versuchsbedingungen verglichen (Abb. 8). Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) von CD52 war, wie bekannt, auf Monozyten höher, und wurde durch die unterschiedlichen Lysebedingungen weder auf Granulozyten noch auf Monozyten beeinflusst. Monozyten wurden zur Validierung der Markierung zum Vergleich der Vorbehandlung und der Erythrolyse ebenfalls analysiert. Wurden die Lymphozyten bei der Isolation nicht abgereichert (Abb. 8A, 8D), kam es einerseits zu sehr langen Messzeiten, um die nötige Anzahl an Granulozyten aufzunehmen und andererseits konnten die drei WBC Hauptpopulationen in der FSC/SSC Darstellung schlecht voneinander abgegrenzt werden.

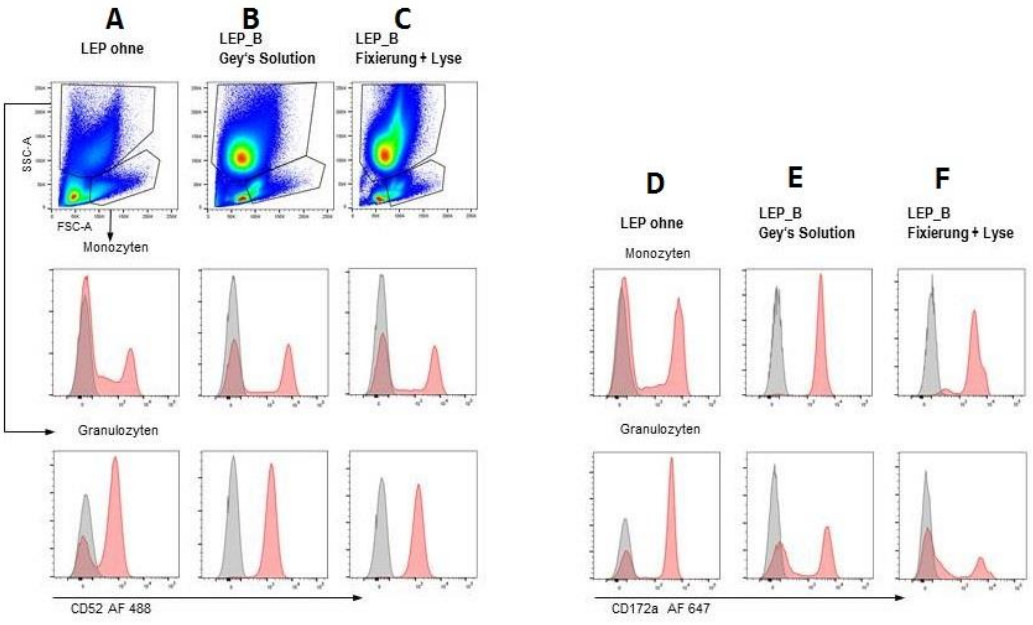

Abb. 8: CD52 und CD172a: Vergleich der Expression auf Monozyten (mittlere Reihe) und Granulozyten (untere Reihe) bei Anwendung beider Methoden zur Entfernung störender Erythrozyten. A – C Darstellung der CD52 Expression, D – F Darstellung der CD172a Expression. Verglichen wurde die Färbung der Zellen ohne Entfernung der Erythrozyten (A, D), Behandlung mit Gey's Solution (B, E) und hypotone Lyse (C, F). Die Zellen wurden vor der FCM Analyse für 36 h bei 4 °C in KM gelagert. Die Gesamtheit aller aufgezeichneten Zellen wurde auf lebende Einzelzellen ohne Autofluoreszenz gegatet. Die Abbildung ist stellvertretend für die Analyse von 10 Tieren aus 3 unabhängigen Versuchen.

Da Granulozyten und Monozyten CD172a exprimieren, während es auf Lymphozyten nicht detektierbar ist (wird nicht gezeigt), ist dieses somit ein weiterer Marker zur Diskriminierung der Granulozyten innerhalb der WBC. Die MFI von CD172a wurde durch die beiden zur Lyse der Erythrozyten verwendeten Methoden nicht beeinflusst, sehr wohl aber von der Vorbehandlung der WBC. Bei Inkubation der Zellen bei 37 °C verminderte sich die MFI von CD172a nicht jedoch jene von CD52. Weiters war bei Inkubation der Zellen bei 37 °C eine von Tier zu Tier unterschiedlich starke Autofluoreszenz in mehreren Kanälen zu beobachten, wie auch an der Isotyp Kontrolle in Abb. 9A ersichtlich ist.

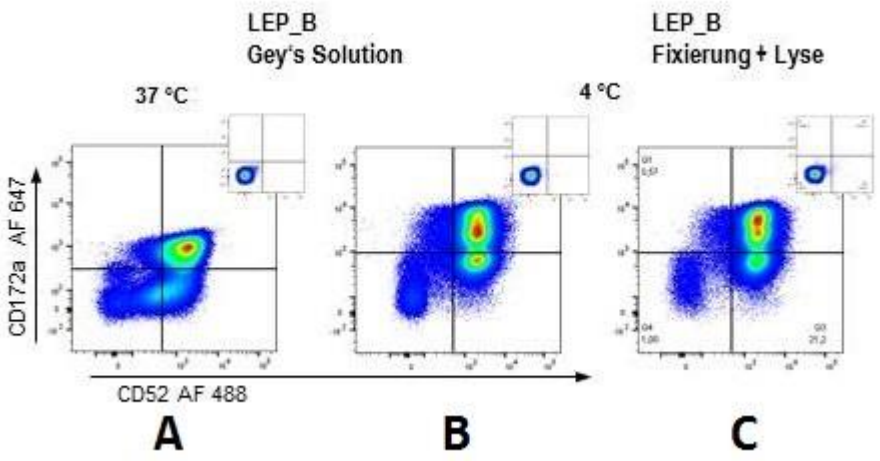

Abb. 9: Expression von CD52, CD172a auf Granulozyten. Die Gesamtheit aller aufgezeichneten Zellen wurde auf lebende Einzelzellen ohne Autofluoreszenz und Granulozyten „gegatet". Der jeweils im rechten oberen Quadranten eingefügte Dot blot bezieht sich auf die Iso-typ Kontrolle. Der Einfluss beider Methoden zur Entfernung störender Erythrozyten wurde verglichen und zusätzlich noch der Einfluss einer Inkubation der WBC bei 37 °C für 36 h (A). Die Zellen (B, C) wurden vor der FCM Analyse für 36 h bei 4 °C in KM gelagert. Die Abbildung ist stellvertretend für die Analyse von 10 Tieren aus 3 unabhängigen Versuchen.

3.3.2.2 CD14

Für die Markierung von CD14, das zur Unterscheidung der Neutrophilen von den beiden minoren Granulozytenpopulationen Basophile und Eosinophile wichtig ist, wurden für die

einzelnen Versuche zwei monoklonale Antikörper mit unterschiedlichem Isotyp verwendet, da in den Experimenten noch zwei weitere monoklonale Antikörper gegen Granulozyten Oberflächenantigene (2B2, 6D10) verwendet wurden. Diese Ergebnisse wurden aber nicht im Rahmen dieser Diplomarbeit behandelt. Zusätzlich wurden die entsprechenden Sekundärantikörper noch in unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen angewendet.

Mit jedem Markierungschema war die Abgrenzung von $CD14^+$ Zellen möglich, auch wenn die MFI bei Verwendung des Fluorochroms BV421 vergleichsweise niedrig ausfiel (Abb. 10). Ursache dafür könnte die Inkubation der Zellen bei 37 °C gewesen sein, die bei diesen Versuchen vorgenommen wurde. Diese Annahme wird, durch die in Abb. 10 dargestellten Versuche, bestätigt. Bei diesen Versuchen wurden die Zellen nach der Isolation für 36 h bei 4 °C in KM gelagert. Wie auch schon bei der Markierung von CD172a festgestellt wurde, erwies sich die Lagerung der Zellen bei 37 °C als nachteilig für die Analyse verschiedener Oberflächenmarker der Zellen. Für den Vergleich der Erythrolysemethoden wurden hingegen nur Zellen, die in KM bei 4 °C gelagert wurden, herangezogen (Abb. 11).

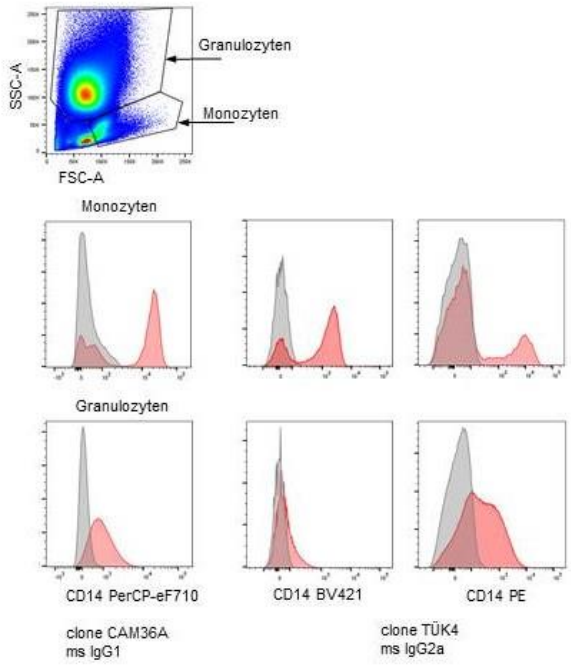

Abb. 10: Expression von CD14: Vergleich von anti-CD14 Klon CAM36A (ms IgG1) und anti-CD14 Klon TÜK4 (ms IgG2a) mit den Fluorochromen PerCP eF710, BV421 und PE. In der Population der lebenden Einzelzellen wurden in FSC/SSC Monozyten und Granulozyten „gegatet". Die WBC aus der Fraktion B wurden vor der Markierung 36 h bei 37 °C in KM inkubiert.

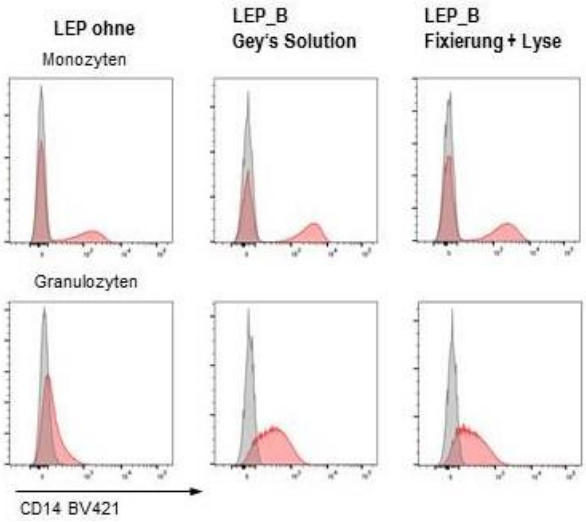

Abb. 11: Auswirkung der beiden Erythrolysemethoden auf die Analyse von anti-CD14 Klon TÜK4 (ms IgG2a). Die Zellen wurden vor der FCM Analyse für 36 h bei 4 °C in KM gelagert. Die Gesamtheit aller aufgezeichneten Zellen wurde auf lebende Einzelzellen ohne Autofluoreszenz „gegatet", im Anschluss wurden die Grenzen für Granulozyten und Monozyten festgelegt (wie Abb. 8). Die Abbildung ist stellvertretend für die Analyse von 10 Tieren aus 3 unabhängigen Versuchen.

3.3.3 Darstellung der Basophilen

Die Arbeitshypothese war, dass die Gesamtheit der FcεRI der Basophilen mit IgE besetzt sind, und daher die Basophilen mit einem Antikörper gegen porzines IgE detektierbar sind.

Der laboreigene Klon 38D3 (Maus IgG1) erkennt die schwere Kette von rekombinantem porzinem IgE (Haiden, 2019). In der Folge wurde ebenfalls angenommen, dass auch natives porzines IgE spezifisch erkannt wird.

Für die Analyse der Basophilen wurde nach „Gating" auf lebende Einzelzellen, die keine Autofluoreszenz aufwiesen, die Granulozytenpopulation eingegrenzt. Das „Gate" wurde in Richtung FSC^{low}/SSC^{low} vergrößert, da auch im Grenzbereich zu den Lymphozyten Basophile vermutet wurden. Die $CD52^{+}CD172a^{+}$ Granulozyten wurden weiter untersucht. Da Basophile CD14 nicht exprimieren, wurden die $CD14^{-}$ Granulozyten auf ihre Anfärbbarkeit mit anti-pIgE analysiert. Da die Anzahl an $pIgE^{+}$ Zellen sehr gering war, wurde bei jeder Probe eine FMO Kontrolle mitgeführt und die Anzahl der IgE^{+} Zellen mit jener in der FMO-Kontrolle verglichen (Abb. 12). In keiner der auf diese Weise markierten und analysierten Proben konnte ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der spezifisch mit anti-pIgE anfärbbaren Zellen zur FMO-Kontrolle festgestellt werden (Tab. 32).

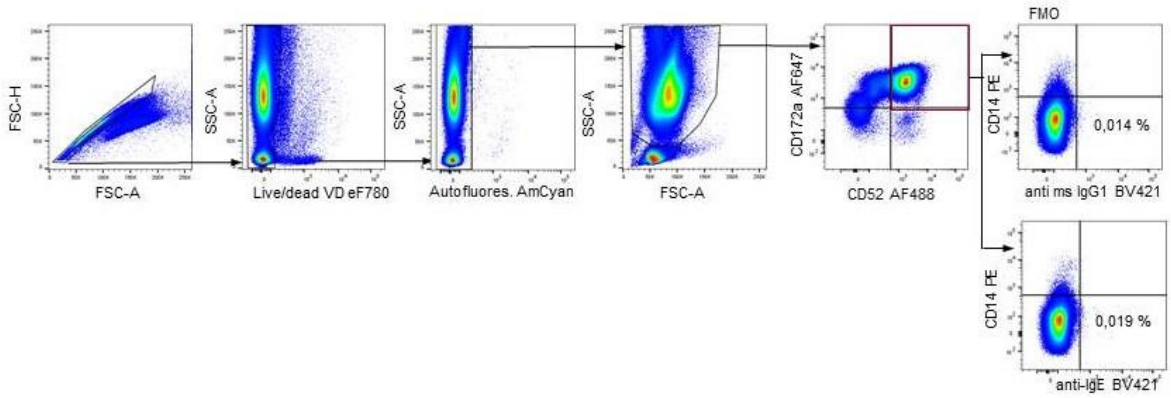

Abb. 12: Analyse der vermuteten Basophilen. Die „Gatingstrategie" folgte der schon beschrieben Vorgangsweise. Ausgehend von Einzelzellen wurden die lebenden Zellen eingegrenzt und im Anschluss jene, die keine Autofluoreszenz aufwiesen. Die Granulozytenpopulation wurde im FSC/SSC eingegrenzt. Von den CD52 CD172a doppeltpositiven Zellen wurden die CD14$^-$ auf ihre spezifische Anfärbbarkeit mit anti-pIgE untersucht, indem mit der FMO-Kontrolle verglichen wurde. Diese Abb. ist repräsentativ für die Analyse von 10 Tieren aus 3 unabhängigen Versuchen verwendet. Die verwendeten WBC aus der Fraktion B wurden vor der Färbung für 36 h bei 4 °C inkubiert.

Tab. 32: Häufigkeit der CD14$^-$ anti-pIgE$^+$ Granulozyten in Relation zur Gesamtzahl der „gegateten" Granulozyten

Schwein	FMO (%)	IgE positive (%)
23	0,280	0,290
24	0,140	0,160
25	0,082	0,110
26	0,006	0,039
27	0,034	0,037
28	0,110	0,100
29	0,290	0,290
30	0,079	0,095
31	0,120	0,120
32	0,063	0,090

4 Diskussion

Bezogen auf die Gesamtheit aller Leukozyten im Blut, wird die Frequenz der Basophilen bei Schweinen in der Labormedizin mit 0 - 2 % angegeben und bezieht sich auf Auszählungen zur Ermittlung des Differentialblutbildes im Rahmen einer hämatologischen Untersuchung (Luke, 1953, Reiner et al., 2008, Ježek et al., 2018). Somit stellen die Basophilen die Granulozytenpopulation mit der geringsten Frequenz im periphären Blut dar.

Ihr Differenzierungsmerkmal sind mikroskopisch betrachtet die basophilen Granula und bei Analyse mittels FCM die Expression oder fehlende Expression myeloider Marker. In der Literatur werden die Basophilen als $CD52^+$ $CD172a^+$ $SWC8^-$ $CD14^-$ $6D10^-$ $2B2^+$ beschrieben (Ezquerra et al., 2009). Die Moleküle, die von den beiden mAk 6D10 und 2B2 erkannt werden, sind noch nicht näher charakterisiert und werden aber auch zur Phänotypisierung von Entwicklungsstufen myeloider Zellen aus dem Knochenmark eingesetzt (Pérez et al., 2007).

Die Rolle der Basophilen bei parasitären Infektionen und allergischen Erkrankungen wurde bereits in der Mitte des 20. Jahrhunderts erkannt, jedoch gibt es noch immer viele offene Fragen zu ihrer Funktion und ihrem Beitrag zum Krankheitsgeschehen.

Schweine sind wertvolle Großtiermodelle für viele medizinische Fragestellungen auch für allergische Erkrankungen. Eine gute Charakterisierung der Basophilen würde einen wesentlichen Beitrag für Arbeiten mit diesem Großtiermodell leisten.

Ziel dieser Arbeit war es, Basophile anzureichern und zu charakterisieren, um sie als Grundlage zur Evaluation von mAk gegen porzines IgE zu verwenden. Auch diese sind im Rahmen der Nutzung des Schweins als Großtiermodell für allergische Erkrankungen von Bedeutung. Unsere Arbeitshypothese war, dass die FcεRI der Basophilen mit IgE besetzt sind, und daher mit einem mAk gegen porzines IgE detektierbar sind. Da Basophile jedoch in einer sehr geringen Anzahl im Blut zu finden sind, ist eine Anreicherung und Isolation vor ihrer Analyse im FCM nötig.

4.1 Isolation der Granulozyten

Als erstes wurden zwei verschiedene Methoden der Leukozytenisolierung aus Vollblut verglichen, in dem vor und nach der Anreicherung von den entsprechenden Zellpellets Ausstriche angefertigt wurden, die neben einer Beurteilung mit Diff-Quik noch Toluidinblau

gefärbt wurden. Mit diesem Farbstoff können Basophile durch metachromatische Färbung ihrer Granula eindeutig detektiert werden. In den Ausstrichen von LEP und BC konnte kein Unterschied bezüglich der angereicherten Zellarten erkannt werden. Wesentliche Unterschiede waren jedoch nach Bestimmung der Zellzahl zu bemerken. Im Durchschnitt war die Ausbeute an WBC bei LEP doppelt so groß. Auch die „Verunreinigung“ mit Erythrozyten in der isolierten Fraktion war bei LEP kleiner als bei BC. Die angereicherten Leukozyten wurden anschließend mittels Dichtegradientenzentrifugation nach Zelltypen getrennt. Da die Trennung allein anhand der Dichte der Zellen erfolgte, wurden die einzelnen Zelltypen nur angereichert nicht jedoch vollständig voneinander getrennt.

Ein dreistufiger Gradient wurde in einer Studie bei humanen Basophilen als erfolgreich beschrieben. Mit der Schichtung 1,07; 1,08 und 1,09 g/ml wurden die meisten humanen Basophilen auf der Schicht mit der Dichte 1,08 g/ml zusammen mit Lymphozyten gefunden (Shiono et al., 2016). Bei porzinen Leukozyten jedoch waren die meisten Basophilen auf der Schicht der Dichte 1,09 g/ml gemeinsam mit den anderen Granulozyten, Monozyten und Erythrozyten zu finden. In den Ausstrichen von Zellen auf dem Gradienten der Dichte 1,08 g/ml wurden hingegen nur in geringem Ausmaß Lymphozyten gefunden. Für die porzinen Basophilen waren die Ergebnisse im Vergleich zu einem zweistufigen Gradienten nicht besser. Da diese Methode mit mehr Aufwand an Material und längerer Arbeitszeit verbunden war, wurde für einen Teil der Versuche mit einem zweistufigen Gradienten weitergearbeitet. Basierend auf den Ergebnissen des dreistufigen Gradienten wurde eine Abtrennung der Erythrozyten aus der relevanten Fraktion mit der Dichte 1,088 g/ml versucht, und die Abreicherung der Lymphozyten, wie routinemäßig für die Isolation von porzinen mononuklären Zellen aus den Blut angewandt, bei einer Dichte von 1,077 g/ml vorgenommen. Leider verblieben die Erythrozyten Großteils in derselben Zellfraktion wie die Basophilen. Wegen der sehr ähnlichen Dichte von porzinen Erythrozyten und Basophilen konnten diese über eine Dichtegradientenzentrifugation nicht getrennt werden. Daher wurde final nur ein einstufiger Gradient mit der Dichte 1,077 g/ml verwendet, welcher die Lymphozyten zum größten Teil zurückhält.

Die isolierten, gewaschenen und pelletierten Zellen aller Fraktionen wurden in gefärbten Ausstrichen evaluiert. Zusammengefasst kann man davon ausgehen, dass die porzinen Granulozyten eine Dichte zwischen 1,088 g/ml und 1,09 g/ml, die Lymphozyten eine Dichte zwischen 1,077 g/ml und 1,08 g/ml und die Erythrozyten eine Dichte über 1,088 g/ml, besitzen. Damit sind die porzinen Basophilen dichter als jene des Menschen, welche eine Dichte zwischen 1,075 g/ml bis 1,08 g/ml besitzen (Kepley et al., 1994; Shiono et al., 2016).

In einer Studie über porzine Granulozyten wird ein zweistufiger Gradient mit 1,077g/ml und einem unterschichteten kommerziellen „Neutrophil isolation medium“ beschrieben, dessen Dichte aber leider nicht angegeben und auch nicht recherchierbar war (Haverson et al., 1994). Diese Vorgehensweise bestätigt unsere Methode.

Da es nicht gelungen war, die Erythrozyten aus der basophilreichen Fraktion mittels einer Dichtegradientenzentrifugation zu entfernen und diese bei der weiteren Färbung und Auswertung im FCM störten, wurden zwei Methoden der Erythrolyse verglichen. Die Lyse vor der FCM Markierung mittels Gey‘s Solution hat die Erythrozyten erfolgreich aus der Fraktion entfernt, jedoch war die Vitalität der WBC etwas vermindert und eine Veränderung der für ihre Phänotypisierung wichtigen Oberflächenmoleküle konnte nicht ganz ausgeschlossen werden. Verglichen wurde diese Vorgehensweise mit einer hypotonen Erythrolyse nach der FCM Markierung bei vorheriger Fixierung der Zellen mittels einer Formalinlösung. Bei dieser Methode können Oberflächenmoleküle nicht verändert werden. Jedoch wurde bei der FCM Analyse eine etwas höhere Frequenz an Zellen, die den L/D Farbstoff aufgenommen hatte, beobachtet. Da nicht anzunehmen ist, dass vor der FCM Markierung mehr tote Zellen in der unbehandelten Zellsuspension vorhanden waren, lagt die Vermutung nahe, dass bei den Waschschritten vor Fixierung und hypotoner Lyse der überschüssige Farbstoff nicht vollständig entfernt wurde, und die fixierten WBC nachträglich noch L/D Farbstoff aufnahmen.

Der L/D Marker war auch in Bezug auf die beiden Präparationsmethoden von Bedeutung. Dieser zeigte, dass die Anzahl der lebenden Zellen nach einer BC Isolierung 87,33 % ± 1,4 betrug, wobei über LEP isolierte Zellen im Mittel 75,46 % ± 17,0 lebenden Zellen hatten. Es ist aber wichtig festzustellen, dass die Zellen vor der Messung für 24 - 48h bei 37 °C im Kulturmedium inkubiert wurden, was einen wichtigen Einfluss auf die Sterberate der Zellen hat.

In einigen Studien wurde eine Inkubation der Zellen nach Isolation durchgeführt (Willheim et al., 1995; Saini et al., 1999). Die WBC wurden daher vor der FCM-Markierung mindestens 24 Stunden bei 37 °C in KM inkubiert. Bei einigen Experimenten wurden die WBC vergleichend für dieselbe Zeit in KM bei 4 °C gelagert. Die beiden Vorbehandlungen der WBC wurden in Bezug auf Vitalität und auch auf die FCM Darstellung der verwendeten Marker gegenübergestellt. Besonders mit Gey’s Solution vorbehandelte WBC wiesen nach Inkubation bei 37 °C eine erhöhte Aufnahme des L/D Farbstoffes auf. Auch die MFI besonders von CD172a war bei diesen WBC vermindert. Deshalb wurde auch eine

Inkubation bei 4 °C in KM untersucht, welche zu erheblich besseren Ergebnissen, was sowohl die Zellschädigung als auch das Zellüberleben betraf, führte.

4.2 Durchflusszytometrie

Humane Basophile können leicht durch ihre vielen großen Granula identifiziert werden. Murinen Basophilen fehlen jedoch größtenteils diese Granula, stattdessen haben sie im Unterschied zu den humanen einen mehrlappigen Kern und ein leicht basophiles Zytoplasma mit wenigen Granula (Sokol und Medzhitov, 2010). Neben diesen mikroskopisch feststellbaren Eigenschaften gibt es für diese Spezies bei FCM Analysen ein umfangreiches „Panel“ an Oberflächenmarkern zur eindeutigen Abgrenzung der Basophilen von den anderen Granulozyten. Für die porzinen Basophilen gibt es derzeit noch wenige geeignete Marker für ihre eindeutige Phänotypisierung und zusätzlich auch wenig Daten bezüglich Größe und Granularität für ihre Eingrenzung bei FCM Analysen. Daher wurde das FSC/SSC „Gate“ zur Eingrenzung der Granulozyten größer gewählt, d.h. in den Bereich SSC^{low}/FSC^{low} vergrößert.

Die myeloischen Zellen tragen Oberflächenmarker, die sie von lymphoiden Zellen unterscheidbar machen, wie CD172a und auch CD52, das allerdings auch von einigen Lymphozytensubpopulationen exprimiert wird. Die zahlenmäßig größte Population der Granulozyten sind die Neutrophilen, die gemeinsam mit Monozyten und Makrophagen CD14 exprimieren. Jedoch ist die MFI von CD14 bei reifen Granulozyten geringer als bei Monozyten und nur bei Neutrophilen nicht aber bei Basophilen und Eosinophilen detektierbar (Ezquerra et al 2009). Bei den Analysen dieser Arbeit wurden 2 unterschiedliche Klone verwendet, da in den Experimenten noch zwei weitere monoklonale Antikörper gegen Granulozyten Oberflächenantigene (2B2, 6D10) verwendet wurden. Diese Ergebnisse wurden nicht im Rahmen dieser Diplomarbeit behandelt. Beide CD14 Klone konnten die Granulozyten als auch Monozyten gut darstellten. Die porzinen Monozyten zeigten eine hohe CD14 Expression, während Granulozyten eine mittlere bis schwache Expression aufwiesen. Mit diesem Marker konnten die Monozyten gut von den Granulozyten abgegrenzt werden und die Monozyten konnten als Kontrolle für die Qualität der Markierungen und den Zustand der Zellen im Allgemeinen herangezogen werden. Dies war im Hinblick darauf, dass unterschiedliche Isolationsmethoden, Vorbehandlungen und Methoden zur Entfernung der Erythrozyten verglichen wurden, sehr hilfreich.

IgE positive Zellen

Obwohl die Basophilen die Population der Leukozyten mit der geringsten Häufigkeit sind, war anzunehmen, dass bei der Messung von 10^6 Zellen/Probe doch einige Basophile zu finden wären. In den meisten Arbeiten ist eine Prävalenz von unter 1 % ausgewiesen. Bei Annahme, dass bei gesunden Schweinen ungefähr 50 % aller Leukozyten Granulozyten sind, und diese in den Versuchen auch noch spezifisch angereichert wurden, konnte erwartet werden, dass ungefähr 5000 Basophile in einem Versuchsansatz identifizierbar wären. In den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Blutproben gesunder Schlachtschweine konnten jedoch mit dem verwendeten Panel an Markern überhaupt keine Basophilen identifiziert werden. Über die Gründe lässt sich mutmaßen. Einerseits könnten bei der Anreicherung und Isolierung Basophile spezifisch verloren gegangen sein. Dagegen spricht jedoch die Tatsache, dass in den Ausstrichen der jeweiligen Zellfraktionen Basophile eindeutig identifiziert wurden und auch eine Anreicherung verglichen mit Vollblut erzielt wurde. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die FcεRI bei gesunden Tieren nur schwach exprimiert sind und daher auch bei der Färbung nur eine geringe MFI zu finden war, die von einer unspezifischen Färbung nicht zu unterscheiden war. Von Allergikern ist bekannt, dass die Expressionsrate von FcεRI auf Basophilen und Mastzellen bei vermehrter IgE Bildung erhöht wird, also einem positiven Feedback unterliegt. Andererseits bestünde auch die Möglichkeit, dass die FcεRI kein IgE gebunden hatten. Nach meinem Wissen gibt es keine Untersuchung bei der Basophile über FcεRI-gebundenes IgE mittels FCM identifiziert wurden. Die IgE Beladung wird in Studien bei Mensch und Maus und auch in der Allergiediagnostik im Histaminrelease Assay durch Bindung von Molekülen für die IgE spezifisch ist, verwendet (Sabroe et al., 1998). In diesen Arbeiten wird auch erwähnt, dass die Basophilen vor einem solchen Test mit IgE sensibilisiert werden. Dieses Vorgehen impliziert, dass nicht alle FcεRI einer Zelle IgE gebunden haben. Andererseits könnte es auch sein, dass die Basophilen bei der Anreicherung ihre FcεRI internalisieren. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden $Ca2^+$- und Mg^{2+} freie Puffer verwendet und zusätzlich EDTA zur Bindung $Ca2^+$- und Mg^{2+} Ionen den Puffern zugesetzt, damit eine unspezifische Aktivierung der Basophilen unterbunden wurde. $Ca2^+$- und Mg^{2+} Ionen sind für die Aktivierung der Basophilen essenziell. Bei einer Aktivierung, wenn auch einer unspezifischen könnte es auch zu einer Internalisierung des Rezeptors kommen, wie dies für den T-Zell-Rezeptor beschrieben wurde (Sigalov, 2005).

Eine Möglichkeit, die nicht von der Qualität der Basophilen abhängt, ist die Spezifität des anti-pIgE mAk. Das Antigen für die Generierung dieses mAk war die rekombinant von

HEK293T-EBNA Zellen exprimierte schwere Kette von pIgE (Vernersson et al., 1997). Dieses Antigen wurde auch für die Selektion der positiven Klone im Zuge der mAk Erzeugung verwendet. Es kann spekuliert werden, dass die Faltung des Proteins trotz Expression in einer Säugerzelle nicht korrekt war und deshalb natives IgE nicht gebunden wurde.

Eine weitere Anreicherung der Basophilen wäre hilfreich zur Abklärung der Probleme bei ihrer spezifischen Phänotypisierung. Über MACS oder FACS könnten z.B. die Neutrophilen mit dem mAk 6D10 aus der basophilreichen Fraktion großteils entfernt werden.
Mittels eines mAk gegen die α-Kette des murinen oder humanen FcεRI, dessen Kreuzreaktivität mit der porzinen noch getestet werden müsste, die aber bei einer Homologie von ungefähr 60 % wahrscheinlich ist, könnte die Expressionsrate des hochaffinen Rezeptors für IgE ermittelt werden und mit einer gleichzeitigen Markierung, des vermutlich an den Rezeptor gebundenen IgE, auch abgeklärt werden, ob alle FcεRI IgE gebunden haben. Weiters wäre ein Vergleich der MFI vor und nach Sensibilisierung der Basophilen mit IgE geeignet, den Grad der IgE-Sättigung der FcεRI noch genauer abzuklären. Allerdings müssten bei einer derartigen Versuchsanordnung ausreichende und entsprechende Kontrollen mitgeführt werden, um eine mögliche Aktivierung der Basophilen zu dokumentieren.

4.3 Schlussbemerkung

Eine geeignete Methode zur Isolierung und Anreicherung porziner Basophiler konnte etabliert werden. Die Herstellung eines mit Leukozyten angereichertem Plasma wurde durch Sedimentation des mit einer Gelatinelösung verdünnten Vollbluts erreicht. Im Anschluss wurde die Mehrzahl der Lymphozyten über einen einstufigen Dichtegradienten abgetrennt. Die Basophilen wurden nach Anreicherung in mit Toluidinblau gefärbten Blutausstrichen nachgewiesen.
Eine spezifische FCM Phänotypisierung durch Markierung des an die FceRI gebunden IgE mit einem spezifischen Antikörper schlug jedoch fehl.

5 Zusammenfassung

Zwei Anreicherungsmethoden für Leukozyten aus Vollblut wurden verglichen. Heparinisiertes Blut gesunder Schlachtschweine, das nach der Schlachtung genommen wurde, wurde verwendet. Leukozyten angereichertes Plasma (LEP) wurde durch Verdünnung des Blutes (1:3) mit 3%iger Gelatinelösung in phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewonnen oder es wurde ein Buffy coat (BC) zur Anreicherung verwendet. Mittels LEP konnten beinahe doppelt so viele Zellen isoliert werden, als aus dem BC. Auch die Eliminierung der Erythrozyten war mittels LEP erfolgreicher. Eine Trennung der Leukozytenpopulationen mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden mit drei- (1,07; 1,08; 10,9 g/ml), zwei- (10,77; 1,088 g/ml) und einstufigen (1,077 g/ml) Gradienten durchgeführt. Mit Gradienten der Dichte 10,07 – 1,08 g/ml konnten die porzinen Lymphozyten von den restlichen Leukozyten sehr gut getrennt werden. Durchschnittlich 25 % der im Vollblut enthalten Granulozyten konnten isoliert werden. Die in der Anreicherung verbliebenen Erythrozyten waren jedoch mittels Dichtegradientenzentrifugation nicht von den Granulozyten zu trennen. Die porzinen Granulozyten zeigten eine Dichte zwischen 1,088 g/ml und 1,09 g/ml und wiesen daher verglichen mit humanen Basophilen eine höhere Dichte auf. Von allen Zellfraktionen nach Anreicherung und Dichtegradientenzentrifugation wurden Ausstriche angefertigt, in denen mikroskopisch nach Färbung mit Diff-Quick oder Toluidinblau die relative Häufigkeit der einzelnen Leukozytenpopulationen ermittelt wurde. Bei 80 % der untersuchten Blutproben konnten in der Granulozytenfraktion Basophile in den mit Toluidinblau gefärbten Ausstrichen gefunden werden.

Zur Darstellung der Granulozyten mittels Durchflusszytometrie wurden folgende Marker verwendet: CD52, CD172a, CD14 und anti porzines (p) IgE. Basophile wurden definiert als $CD52^+$ $CD172a^+$ $CD14^-$ und anti $pIgE^+$. Obwohl Basophile eindeutig in den gefärbten Ausstrichen nachgewiesen wurden, ist es nicht gelungen, sie für eine FCM Messung eindeutig zu markieren. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund wäre, dass die Basophilen gesunder Tiere den hochaffinen IgE Rezeptor nur schwach exprimierten und daher auch wenig IgE an der Zelloberfläche gebunden war, oder zwar Rezeptoren vorhanden waren, aber diese kein IgE gebunden hatten.

6 Summary

Two methods for enrichment of leukocytes from whole blood were compared: leukocyte enriched plasma (LEP) and buffy coat (BC). Heparinized blood from healthy pigs from an abattoir was used. LEP was gained by sedimentation of erythrocytes (RBC) by diluting blood 1:3 with 3 % gelatine in phosphate buffered saline and almost twice as many cells could be isolated compared to BC. Elimination of RBC was also more successful with LEP. On average 25 % of the granulocytes contained in whole blood could be isolated. Further separation of leukocytes by means of a density gradient centrifugation was carried out with three- (1.07; 1.08; 10.9 g/ml), two- (1.077; 1.088 g/ml) and one-stage (1.077 g/ml) gradients. With densities of 1.077 - 1.08 g/ml porcine lymphocytes could be separated very well from the remaining leukocytes. However, RBC remaining within the granulocyte rich fraction could only be removed partially. Based on these results, the porcine granulocytes exhibited a density between 1.088 g/ml and 1.09 g/ml. Compared to human basophils, the porcine showed a higher density.

Smears were prepared from all cell fractions after enrichment and density gradient centrifugation to document the process. After staining with Diff-Quick or Toluidine blue the smears were examined microscopically. In 80 % of the examined blood samples stained with toluidine blue basophils were found in the smears of the layer upon the 1,088 g/ml.

To differentiate the granulocytes by flow cytometry following markers were used: CD52, CD172a, CD14 and anti-porcine (p) IgE. Basophils were defined as $CD52^+$ $CD172a^+$ $CD14^-$ and anti $pIgE^+$. Although basophils were clearly detected in the stained smears, it was not possible to stain them specifically for FCM. A possible explanation would be that the basophils of healthy animals only weakly express the high-affinity IgE receptor (FcεRI) and therefore little IgE was bound to the cell surface, or that receptors were present but not saturated with IgE.

Abkürzungsverzeichnis

Al	Alexafluor
BV	Brilliant Violet
CD	cluster of differentiation; Oberflächenproteine von Zellen
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fc	fragment cristallizable, konstanter Anteil eines Immunoglobulins
FCM	Durchflusszytometrie
FCS	fetales Kälberserum
FcεRI	hochaffiner IgE-Rezeptor
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward side scatter)
G-Solution	Gey´s Balanced Salt Solution
HBSS	Hanks´ Balances Salt Solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIS	Histidin getaggte Proteine
IgE	Immunoglobulin E
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
IsoKO	Isotypkontrolle
LEP	Leukozyten angereichertes Plasma (Leukocyte enriched plasma)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PerCP cy	Peridinin-Chlorophyll-Protein with cyanine dye
pP	porzines Plasma
SSC	Seitwärtsstreulicht (sideward side scatter)
VD eF	Fixable Viability Dye eFluor
WBC	weiße Blutzellen/Leukozyten (white blood cells)
WP-F	Waschpuffer für frische Zellen
WP-I	Waschpuffer nach Isolation
WP-K	Waschpuffer für kultivierte Zellen

7 Literaturverzeichnis

Alvarez B, Sánchez C, Bullido R, Marina A, Lunney J, Alonso F. et al. 2000. A porcine cell surface receptor identified by monoclonal antibodies to SWC3 is a member of the signal regulatory protein family and associates with protein-tyrosine phosphatase SHP-1. Tissue Antigens 55 (4), 342–351.

Amundsen EK, Henriksson CE, Holthe MR, Urdal P. 2012. Is the blood basophil count sufficiently precise, accurate, and specific? Three automated hematology instruments and flow cytometry compared. American Journal of Clinical Pathology 137 (1), 86–92.

Basu S, Campbell HM, Dittel BN, Ray A. 2010. Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS). Journal of Visualized Experiments. JoVE (41).

Blecha F, Kielian T, McVey DS, Lunney JK, Walker K, Stokes CR, Stevens K, Kim YB, Chu RM, Chen TS, Murtaugh MP, Choi C, Molitor TW, McCullough K, Pescovitz MD. 1994. Workshop studies on monoclonal antibodies reactive against porcine myeloid cells. Veterinary Immunology and Immunoplathology 43, 269-272.

Borzova E, Dahinden CA. 2014. The absolute basophil count. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.) 1192, 87–100.

Cossarizza A, Chang H, Radbruch A, Acs A, Adam D, Adam-Klages S. et al. 2019. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). European Journal of Immunology 49 (10), 1457–1973.

Dainiak MB, Kumar A, Galaev IY, Mattiasson B. 2007. Methods in cell separations. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 106, 1–18.

D'Armini AM, Tom EJ, Roberts CS, et al. 1995. When does the lung die? Time course of high energy phosphate depletion and relationship to lung viability after 'Death'. J Surg Res 59, 468–474.

Denzel AJ. 2010. Bedeutung Basophiler Granulozyten für Zustandekommen einer humoralen Gedächtnisimmunantwort [Dissertation]. Regensburg: Universität Regensburg.

Ezquerra A, Revilla C, Alvarez B, Pérez C, Alonso F, Domínguez J. 2009. Porcine myelomonocytic markers and cell populations. Developmental and Comparative Immunology 33 (3), 284–298.

Gilbert HS, Ornstein L. 1975. Basophil counting with a new staining method using alcian blue. Blood 46 (2), 279–286.

Haiden E. 2019. Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen porcine IgE [Diplomarbeit]. Wien: Veterinärmedizinische Universität Wien.

Haverson K, Bailey M, Higgins VR, Bland P W, Stokes CR. 1994. Characterization of monoclonal antibodies specific for monocytes, macrophages and granulocytes from porcine peripheral blood and mucosal tissues. Journal of Immunological Methods 170 (2), 233–245.

Horobin RW. 2011. How Romanowsky stains work and why they remain valuable - including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. Biotechnic & Histochemistry

Jezek J, Starič J, Nemec M, Plut J, Oven IG, Klinkon M, Štukelj M. 2018. The influence of age, farm, and physiological status on pig hematological profiles. J Swine Health Prod 26 (2). 72-78.

Kepley C, Craig S, Schwartz L. 1994. Purification of human basophils by density and size alone. Journal of Immunological Methods 175 (1), 1–9.

Laiho K, Penttilä A. 1981. Autolytic changes in blood cells and other tissue cells of human cadavers. I. Viability and ion studies. Forensic Sci Int 17, 109–120.

Leitner J, Reutner K, Essler SE, Popow I, Gerner W, Steinberger P, Saalmüller A. 2012. Porcine SWC1 is CD52--final determination by the use of a retroviral cDNA expression library. Veterinary Immunology and Immunopathology 146 (1), 27–34.

Luke D. 1953. The differential leukocyte count in the normal pig. Journal of Comparative Pathology and Therapeutics 63, 346-354.

Min B, Brown MA, Legros G. 2012. Understanding the roles of basophils: breaking dawn. Immunology 135 (3), 192–197.

Moritz A, Hrsg. 2014. Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Stuttgart: Schattauer GmbH.

Murphy K, Weaver C, Hrsg. 2016. Janeway's Immunobiology. Neunte Aufl. New York: Garland Science/Taylor & Francis Group LLC.

Nechansky A, Robertson MW, Albrecht BA, Apgar JR, Kricek F. 2001. Inhibition of Antigen-Induced Mediator Release from IgE-Sensitized Cells by a Monoclonal Anti-FcεRI α-Chain

Receptor Antibody: Implications for the Involvement of the Membrane-Proximal α-Chain Region in FcεRI-Mediated Cell Activation. Journal of Immunology 166, 5979-5990.

Nouri-Shirazi M, Fukuta K, Ohta Y. 1993. Purification of rabbit blood basophils by isopycnic banding on Percoll. In Vivo 7 (1), 31–35.

O'Driscoll SW, Meisami B, Miura Y, et al. 1999. Viability of periosteal tissue obtained postmortem. Cell Transplant 8, 611–616.

Pérez C, Revilla C, Alvarez B, Chamorro S, Correa C., Domenech N. et al. 2007. Phenotypic and functional characterization of porcine granulocyte developmental stages using two new markers. Developmental and Comparative Immunology 31 (3), 296–306.

Peritoft H, Laurent TC. 1977. Isopycnic separation of cells and cell organelles by centrifugation in modified colloidal silica gradients. Methods of Cell Separation 1 (Catsimpoolas, N., Ed), 25-65.

Peters S, Hrsg. 2015. DermaSkills. Stuttgart: Schattauer GmbH.

Pretlow TG, Pretlow TP, Hrsg. 1982. Cell Separation Methods and Selected Applications. Birmingham. Elsevier.

Reiner G, Fischer R, Hepp S, Berge T, Köhler F, Willems H. 2008. Quantitative trait loci for white blood cell numbers in swine. Animal Genetics 39 (2). 163-168.

Saalmüller A, Lunney JK, Daubenberger C, Davis W, Fischer U, Göbel TW, Griebel P, Hollemweguer E, Lasco T, Meister R, et al. 2005. Summary of the animal homologue section of HLDA8. Cellular Immunology. 51–58.

Sabroe R, Francis D, Barr R, Black A, Greaves M. 1998. Anti-FcεRI autoantibodies and basophil histamine releasability in chronic idiopathic urticaria. Journal of Allergy and Clinical Immunology 102 (4), 651–658.

Saini SS, MacGlashan DW Jr, Sterbinsky SA, Togias A, Adelman DC, Lichtenstein LM, Bochner BS. 1999. Down-Regulation of Human Basophil IgE and FcεRIα Surface Densities and Mediator Release by Anti-IgE-Infusions Is Reversible In Vitro and In Vivo. Journal of Immunology 162, 5624-5630.

Sharpe PT. 1988. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Methods of Cell Separation 18.

Shiono H, Matsui T, Okada T, Ito Y. 2016. Single-step enrichment of basophils from human peripheral blood by a novel method using a Percoll density gradient. Journal of Separation Science 39 (15), 3062–3071.

Schroeder JT, Bieneman AP. 2016. Isolation of Human Basophils. Current Protocols in Immunology 112, 7.24.1-7.24.8.

Sigalov A. 2005. Multi-chain immune recognition receptors: spatial organization and signal transduction. Seminars in Immunology 17 (1), 51-64.

Siracusa M C, Kim BS, Spergel JM, Artis D. 2013. Basophils and allergic inflammation. The Journal of allergy and clinical immunology 132 (4), 789-801.

Sokol CL, Medzhitov R. 2010. Emerging functions of basophils in protective and allergic immune responses. Mucosal immunology 3 (2), 129–137.

Sridharan G, Shankar AA. 2012. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology 16 (2), 251–255.

Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. 2010. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 125 (Suppl 2), 73-80.

Tizard IR, Hrsg. 2018. Veterinary immunology. Zehnte Aufl. St. Louis Mo: Elsevier/Saunders.

Tomlinson MJ, Tomlinson S, Yang XB, Kirkham J. 2013. Cell separation: Terminology and practical considerations. Journal of Tissue Engineering 4.

Ullmer AJ, Flad HD. 1979. Discontinuous density gradient separation of human mononuclear leucocytes using Percoll as gradient medium. Immunological Methods 30, 1-10.

Uston PI, Urban JF, Ashraf M, Lee CM, Ampy FR. 2007. L3L4ES antigen and secretagogues induce histamine release from porcine peripheral blood basophils after Ascaris suum infection. Parasitology Research 100 (3), 603–611.

Vernersson M, Gunnar P, Kristersson T, Alving K, Hellman L. 1997. Cloning, structural analysis, and expression of the pig IgE ε chain. Immunogenetics 46, 461-468.

Willheim M,Agis H, Sperr WR, Köller M, Bankl H, Kiener H. et al. 1995. Purification of human basophils and mast cells by multistep separation technique and mAb to CDw17 and. Journal of Immunological Methods 182 (1), 115–129.

Internetquellen

Stemcell Technologies. https://www.stemcell.com/cell-separation/methods#microfluidic (Zugriff 31.12.2020)

8 Abbildungs-/ Tabellenverzeichnis

Abb. 1 Titration von anti pIgE hältigem Zellkulturüberstand der Klons 38D3 auf transient.. transifizierten HEK293T Zellen, diese experimieren intrazelluläre rpIgE.…….28

Abb. 2 „Gatingstrategie“ für die Analyse der Basophilen……..30

Abb. 3 Vergleich der Zellausbeute bei Verwendung von BC und LEP…… zur Anreicherung der WBC aus VB.....31

Abb. 4 Basophile in Ausstrichen eines Zellpellets nach Lyse der Erythrozyten……32

Abb. 5 Chronologischer Ablauf der Versuchsabfolge ……...46

Abb. 6 Lebend/tot Diskriminierung und Darstellung der Granulozyten……...47

Abb. 7 Lebensfähigkeit und Lage im FSC/SSC von WBC (Fraktion B)…… bei verschiedener Vorbehandlung.……..……..…49

Abb. 8 CD52 und CD172a: Vergleich der Expression auf Monozyten und Granulozyte… unter Einfluss beider Methoden zur Entfernung störender Erythrozyten ……..…51

Abb. 9 Expression von CD52, CD172a auf Granulozyten ……52

Abb. 10 Expression von CD14: Vergleich von CD14 Klon CAM36A ms IgG1 und CD14….. Klon TÜK ms IgG2a mit den Fluorochromen PerCP eF710, BV421 und PE……53

Abb. 11 Auswirkung der beiden Erythrolysemethoden auf die Analyse von CD14……...54

Abb. 12 Analyse der vermuteten Basophilen…….55

Tab. 1 Färbepanel zur Differenzierung der Granulozyten nach Cossarizza…….. et al. 2019……4

Tab. 2 Verbrauchsmaterial……18

Tab. 3 Geräte……..……18

Tab. 4 Chemikalien und Reagenzien…….……...19

Tab. 5 Komerzielle Puffer und Zelkulturmedien……..20

Tab. 6 Hergestellte Puffer……..20

Tab. 7 Herstellung der Lösungen mit definierter Dichte für……... Dichtegradientenzentrifugation……..……..21

Tab. 8 Antikörper……..22

Tab. 9 Isotypkontrollen……22

Tab. 10 Sekundäre Antikörper……22

Tab. 11 FCM Färbeprotokoll……29

Tab. 12 Vergleich der WBC Ausbeute bei Verwendung von BC und LEP…… zur Anreicherung……31

Tab. 13 WBC in den einzelnen Schichten eines dreistufigen Gradienten nach…… Anreicherung mittels BC (Diff-Quick-Färbung)……..….33

Tab. 14 WBC in der C-Fraktion des dreistufigen Gradienten nach…… Anreicherung mittels BC (Toluidinblau)……..…….33

Tab. 15 WBC in den einzelnen Schichten eines zweistufige Gradienten nach…… Anreicherung mittels BC (Diff-Quick-Färbung)……..…….34

Tab. 16 WBC in der B-Fraktion eines zweistufigen Gradienten nach……... Anreicherung mittels BC (Toluidinblau)……..…….35

Tab. 17 WBC in den einzelnen Schichten eines zweistufigen Gradienten nach…… Anreicherung mittls LEP (Diff-Quick-Färbung)..……36

Tab. 18 WBC in der B-Fraktion eines zweistufigen Gradienten nach…… Anreichrung mittels LEP (Toluidinblau)……..….37

Tab. 19 Frequenz der einzelnen Zelltypen in der B-Fraktion bei Trennung……. der angereicherten WBC über einen zweistufigen Gradienten……..…. (Diff-Quick-Färbung) ……..38

Tab. 20 Frequenz der einzenlnen Zelltypen in der B-Fraktion bei Trennung…… der angereicherten WBC über einen zweistufigen Gradienten (Toluidinblau)…..39

Tab. 21 Zelltypen in den Fraktionen eines einstufigen Gradienten…… nach Anreicherung mittels LEP (Diff-Quick-Farbung)……..….41

Tab. 22 Zelltypen in den Fraktionen eines einstufigen Gradienten……
nach Anreicherung mittels LEP (Toluidinblau)……..….41

Tab. 23 Frequenz der einzelnen Zelltypen in der B-Fraktion bei Trennung der……..
angereicherten WBC über einen einstufigen Gradienten (Diff-Quick-Färbung)...41

Tab. 24 Frequenz der einzenlnen Zelltypen in der B-Fraktion bei Trennung……
der angereicherten WBC über einen einstufigen Gradienten (Toluidinblau)…… 42

Tab. 25 Widerfindung der WBC aus Vollblut im LEP……..…….43

Tab. 26 Anreicherung der WBC aus LEP in den einzelnen Fraktionen des zweistufigen…..
Dichtegradienten……..44

Tab. 27 Anzahl der Erythrozyten im LEP und in der Fraktion B nach……
der Dichtegradientenzentrifugation und Gey´s Solution……..….45

Tab. 28 Anzahl der Erythrozyten in der basophil-reichen Fraktion nach einer……
Anreicherung mittels LEP und einer Dichtegradientenzentrifugation……
ohne Erythrozytenlyse……46

Tab. 29 Prozentualer Anteil der lebenden Zellen in der Fraktion B nach Isolation über…….
einen zweistufigen Gradienten, Vergleich BC und LEP nach Gey´s Solution……
und Inkubation bei 37°C für 36 h……..48

Tab. 30 Lebensfähigkeit der WBC bei Lagerung bei 4°C und 37°C für 36 h und Lyse der…
Erythrozyten mit Gey´s Solution vor der FCM Markierung oder……..
mittels Fixierung/Lyse nach der FCM Markierung……..50

Tab. 31 Relative Häufigkeit der Granulozyten bezogen auf die Gesamtzahl der isolierten...
WBC aus Fraktion B nach Entfernung der Erythrozyten mittels Gey´s Solution…...
oder Fixierung nach der Isolation oder nach 36 h bei 4 °C oder 37 °C im KM…..50

Tab. 32 Häufigkeit der $CD14^-$ anti-$pIgE^+$ Granulozyten in Relation zur Gesamtzahl……
der gegateten Granulozyten……..…55