

Aus dem CharitéCentrum für Innere Medizin mit Gastroenterologie und Nephrologie

Medizinische Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie

(einschließlich Arbeitsbereich Ernährungsmedizin)

Direktorin: Universitäts-Professorin Dr. med. Britta Siegmund

Habilitationsschrift

Die Bedeutung der Histopathologie in translationalen Studien zu chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach Experimentelle Medizin

von

Dr. rer. medic. Anja A. Kühl

Eingereicht: Juli 2016

Dekan: Professor Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter: Professor Dr. med. Jochen Hampe

2. Gutachterin: Professorin Dr. med. Elke Roeb

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
1. Einleitung	3
1.1 Entwicklung der Histopathologie.....	3
1.2 Experimentelle Modelle intestinaler Entzündung	4
1.3 Histopathologische Methoden in translationalen Studien	6
2. Fragestellung und Zielsetzung	11
3. Ergebnisse	12
3.1 Histomorphologische Veränderungen in Mausmodellen intestinaler Entzündung und deren Bezug zur menschlichen Erkrankung.....	12
3.2 Charakterisierung funktionaler Immunzellpopulationen im Gewebeverband mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	70
3.3 Darstellung zellulärer Interaktionen und die räumliche Zuordnung intrazellulärer Strukturen mittels Immunfluoreszenz	131
4. Diskussion	164
4.1 Die Translation histomorphologischer Veränderungen in Mausmodellen intestinaler Entzündung auf chronisch-entzündliche Darmerkrankungen beim Menschen	164
4.2 Charakterisierung lokaler Zellpopulationen in chronischen Entzündungen in Mausmodellen und beim Menschen	168
4.3 Lokaler Nachweis zellulärer Interaktionen und die zugrundeliegenden subzellulären Mechanismen der T-Zellmigration im Mausmodell.....	174
5. Zusammenfassung	179
6. Literatur	181
Abkürzungen	189
Danksagung.....	190
Erklärung.....	191

1. Einleitung

1.1 Entwicklung der Histopathologie

Der Pathologe Rudolf Ludwig Karl Virchow wurde 1856 an die Berliner Universität berufen. Im Jahr 1858 hält er 20 Vorlesungen im pathologischen Institut der Charité über „Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre“, die er noch in demselben Jahr veröffentlichte [1]. Mit seiner Lehre der Zellularpathologie löste Virchow die jahrhundertealte Lehre der Humoralpathologie ab, die davon ausging, dass Krankheiten durch ein gestörtes Säftesystem hervorgerufen werden [2]. Dieses System bestand aus den Körpersäften Blut, Galle und Schleim. Die Zellularpathologie hingegen besagt, dass Krankheiten auf Störungen einzelner Zellen basieren. Ihr vorausgegangen ist Virchows Zellehre (*omnis cellula e cellula*), in der die Zelle als kleinste Einheit sowohl der Struktur als auch der Vermehrung beschrieben wird. Virchow entwickelte mit seiner Zellehre die Zelltheorie von Schleiden und Schwann weiter. Theodor Schwann postulierte als Ursprung der Zelle eine strukturlose Substanz. Matthias Schleiden formulierte 1838 die Zelltheorie für Pflanzen, Theodor Schwann für tierische Organismen [3]. Ein Jahr später fasste Schwann die Ergebnisse in „Mikroskopische Untersuchungen über die Uebereinstimmung in der Struktur und dem Wachsthum der Thiere und Pflanzen“ zusammen [4]. Rudolf Virchow erlangte mit seiner Lehre der Zellularpathologie Weltruhm und gilt noch heute als der Vater der modernen Pathologie. Sein Leben lang hielt Rudolf Virchow an der Bedeutung der mikroskopisch-histologischen Untersuchung sowohl für die klinische Diagnostik als auch für die wissenschaftliche Forschung fest. Er war ein Vertreter der naturwissenschaftlichen Medizin und hielt seine Studenten an, „mikroskopisch zu denken“.

Als Teilgebiet der Pathologie ist die Histopathologie immer noch ein bedeutendes Verfahren zur Krankheitsdiagnostik anhand gefärbter Gewebeschnitte, die mikroskopisch beurteilt werden. Sie stellt die häufigste Untersuchungsmethode dar, und das Gewebe stammt entweder aus Biopsien, Operationen oder Autopsien. Die Färbung der Gewebeschnitte erfolgt (immun)histochemisch und/oder mittels Immunfluoreszenz. Die Histopathologie erlaubt somit einen Blick in den menschlichen Körper, wobei aufgrund der histologischen Präparation immer ein Äquivalentbild erzeugt wird. Letztendlich stellt sie nicht nur ein Verfahren zur Diagnostik von Tumoren sowie infektiösen Erkrankungen und Entzündungen dar, sondern auch zur Prognostik und Differenzierung. Generelle Abläufe und Methoden eines histopathologischen Labors sind beispielhaft in Abbildung 1 dargestellt.

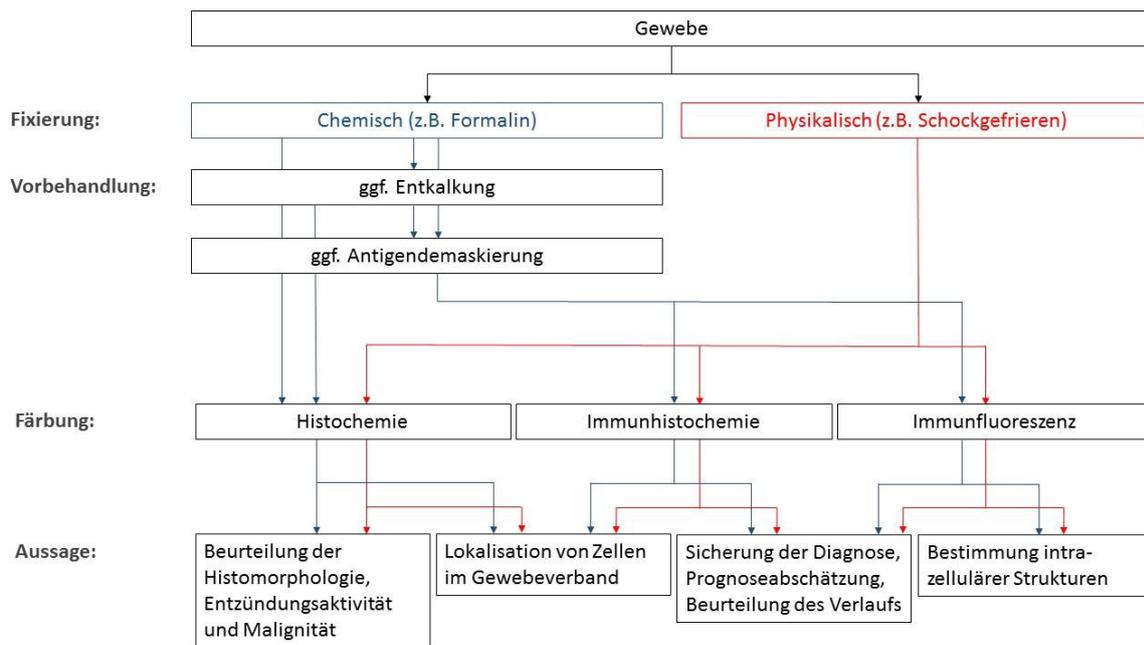


Abb. 1: Schematische Darstellung typischer Abläufe und Methoden im histopathologischen Labor vom entnommenen Gewebe bis zur Aussage.

In der praktischen Anwendung ist das Schema in Abbildung 1 jedoch in umgekehrter Reihenfolge zu lesen. Die Fragestellung entscheidet über die Art der Färbungen und hiernach richtet sich die Art der Vorbehandlung, Fixierung und Entnahme.

Nachfolgend werden histopathologische Färbungen mit Fokus auf die experimentelle Medizin erläutert. Die Bedeutung der Histopathologie in translationalen Studien wird anhand experimenteller Modelle durch die Beurteilung der Histomorphologie, der zellulären Zusammensetzungen und subzellulärer Strukturen begründet. Dies erfolgt in Abgrenzung zu weiteren histopathologischen Methoden wie der *in situ*-Hybridisierung, Molekularpathologie oder besonderen Mikroskopie-Techniken.

1.2 Experimentelle Modelle intestinaler Entzündung

Als Prototyp experimenteller Modelle wurden für diese Arbeit Tiermodelle intestinaler Entzündung verwendet. Zu den intestinalen Entzündungen beim Menschen zählen die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED), deren Hauptformen die Colitis ulcerosa (CU) und der Morbus Crohn (MC) sind. Patienten, die unter CED leiden, zeigen ein breites Spektrum klinischer Symptome wie blutige Durchfälle, Tenesmen und Gewichtsverlust, häufig begleitet von Fieber und Bauchschmerzen [5,6]. Beim MC kann der gesamte Gastrointestinaltrakt entzündet sein. Bei 30-40% der Patienten beschränkt sich die Entzündung auf den Dünndarm, wobei mehrheitlich das

terminale Ileum betroffen ist, und bei 15-25% beschränkt sich die Entzündung auf den Dickdarm [7]. Bei dem MC handelt es sich um eine transmurale Entzündung mit segmentalem Befallsmuster [6]. Bei der CU sind ausschließlich die Mukosa und Submukosa des Kolons entzündet. Die Entzündung breitet sich kontinuierlich von rektal nach proximal aus, wobei verschiedene Befallsmuster unterschieden werden: Proktitis, Linksseitenkolitis und Pankolitis [8]. Selten kann es bei Patienten mit einer Pankolitis zu einer Entzündung des terminalen Ileums kommen; dies wird als *backwash ileitis* bezeichnet [9,10]. In Deutschland liegt die Inzidenz für CU bei 3,0-3,9 und für MC bei 5,2-8,6 jährlichen Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner [5,11]. Für das Auftreten der Erkrankung gibt es zwei Altersgipfel. Der größere liegt zwischen 15 und 25 Jahren, der kleinere bei über 60 Jahren [12].

Die Pathogenese der CED ist bisher noch nicht vollständig verstanden. Es ist jedoch akzeptiert, dass folgende Faktoren eine wesentliche Rolle spielen: die genetische Prädisposition [13-15], das Immunsystem [16-18] und die Umwelt einschließlich der intestinalen Mikrobiota [19-21]. In umfangreichen genomweiten Assoziationsstudien wurden über 200 Risikoallele für die Entstehung von CED identifiziert, von denen jedoch nur ein geringer Prozentsatz mit MC oder CU assoziiert ist [15,22]. Viele dieser Kandidatengene codieren für Proteine, die in der intestinalen Immunantwort eine Rolle spielen. Bereits 2001 wurden CED mit einer Mutation in der *Nukleotid-bindenden Oligomerisierungsdomäne 2* assoziiert, die bei der Erkennung bakterieller Bestandteile in der angeborenen Immunantwort eine Rolle spielt [23]. Der Zusammenhang zwischen genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen zeigt sich auch anhand eines weiteren Kandidatengens, *AHR*, das für den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor codiert, der von T-Helfer (Th)17-Zellen verstärkt exprimiert wird, und dessen Defizienz zu einer verminderten Kontrolle der mikrobiellen Last führt [22]. Dass die genetische Veranlagung nicht als einzelner Faktor über die Entstehung von CED entscheidet, sondern weitere Faktoren wie Umwelteinflüsse hinzukommen müssen, verdeutlichen die relativ geringen Konkordanzraten eineiiger Zwillinge mit 30-35% beim MC und 10-15% bei der CU [24].

Zum Verständnis der Pathogenese haben Tiermodelle intestinaler Entzündung maßgeblich beigetragen. Seit der Entwicklung des ersten Modells 1957 im Kaninchen [25] entstanden bisher über 90 Modelle allein in der Maus [26,27]. Die Vielzahl dieser Modelle verdeutlicht, dass bisher keines für sich die multifaktorielle Erkrankung der CED vollständig widerspiegelt. Die unterschiedlichen Modelle gewähren jedoch Einblicke in verschiedene Aspekte der CED und erlauben Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Genetik, der Umwelt, der epithelialen Barriere und des mukosalen Immunsystems. Während Patienten erst mit klinischen Symptomen

beim Arzt vorstellig werden, erlauben experimentelle Modelle Untersuchungen vor Ausbruch der Erkrankung sowie gezielt in allen Phasen des Krankheitsverlaufs. In vorklinischen Studien sind diese Modelle ein unverzichtbares Mittel für die Entwicklung neuer Therapien. Diese werden benötigt, da die Inzidenz der CED stetig ansteigt und ein kurativer Therapieansatz bisher fehlt.

Um Ergebnisse aus dem Tiermodell auf die menschliche Erkrankung übertragen zu können, wird eine standardisierte Beschreibung der Modelle intestinaler Entzündung benötigt. Schon bei der Einteilung dieser Modelle, z.B. auf Grundlage des Auslösers der intestinalen Entzündung, mangelt es jedoch an Konsens [27-30]. Unabhängig von der Kategorie, erlauben die verschiedenen Einteilungen keine direkten Rückschlüsse auf die Eignung eines Modells in Bezug auf CED-relevante Fragestellungen beim Menschen. Weitere Ansätze zur Einteilung in CU- und MC-relevante Modelle richten sich nach den betroffenen Organen: Modelle mit Dickdarm-Beteiligung werden den CU-Modellen zugeordnet und diejenigen mit einer Beteiligung des Dünndarms zu den MC-Modellen [31]. Eine andere Einteilung folgt dem Paradigma des mukosalen Zytokinmilieus. Das von Th17-Zellen produzierte Zytokin Interleukin (IL)-17 ist in der entzündeten Mukosa von sowohl MC-Patienten als auch Patienten mit CU erhöht [32]. Beim MC dominieren zusätzlich Th1-Zytokine, während CU-Patienten eine atypische Th2-Zytokinantwort zeigen [33-35]. Diese atypische Th2-Zytokinantwort zeichnet sich durch geringe IL-4-Produktion und die Sekretion von IL-13 durch Natürliche Killer-T-Zellen aus [35,36]. Tiermodelle zeigen, dass IL-13 bei der Kolitisinduktion eine Rolle spielt [37,38]. Bei Patienten mit mittelgradiger bis schwerer CU führte jedoch eine Zusatztherapie mit anti-IL-13 zu keiner signifikanten Verbesserung [39].

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, welchen Beitrag die Histopathologie durch die Darstellung morphologischer Strukturen und lokaler Zellpopulationen *in situ* für a) die Einteilung der Modelle intestinaler Entzündung und b) die Translation der Ergebnisse aus Tiermodellen auf die menschliche Erkrankung leisten kann.

1.3 Histopathologische Methoden in translationalen Studien

Wie für alle diagnostischen und experimentellen Ansätze gilt auch für histopathologische Untersuchungen, dass die Aussage durch die Qualität des Probenmaterials bestimmt wird. Schon die Entnahme, Fixierung und Vorbehandlung der Gewebeproben sollte standardisiert erfolgen, da jeder Arbeitsschritt nicht nur die nachfolgenden Färbungen, sondern auch die mikroskopische Untersuchung und Auswertung und somit das Ergebnis beeinflusst.

In der **Histochemie** werden chemische Gruppen und Komponenten mittels Farbreaktionen identifiziert. Die histochemischen Färbungen sind ebenso zahlreich wie das Vorkommen der chemischen Komponenten in Organismen und reichen von der Alzianblau-Färbung für saure und sulfatierte Mukosubstanzen bis zur Ziehl-Neelsen-Färbung für säurefeste Bakterien. Die gebräuchlichste histochemische Färbung ist die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin, bei der alle basophilen Substanzen (z.B. Desoxyribonukleinsäure) blau gefärbt werden und alle azidophilen Substanzen wie Zellplasmaproteine und Kollagen rot. Sie wird i.d.R. als Übersichtsfärbung für die histomorphologische Beurteilung angewendet. Einige Immunzellpopulationen, z.B. eosinophile Granulozyten, lassen sich aufgrund ihrer typischen Zellmorphologie und rötlich erscheinenden Granula gut in dieser Übersichtsfärbung oder mittels zusätzlicher histochemischer Färbung der Granula identifizieren [40]. Die Darstellung des Phänotyps von Immunzellen über definierte Moleküle erfolgt mittels Immunhistochemie.

Die **Immunhistochemie** macht antigene Strukturen mittels markierter Antikörper sichtbar. Die Markierung von Antikörpern wurde 1941 von Albert Coons beschrieben [41] und zur Immunhistochemie/-fluoreszenz weiter entwickelt [42]. Die Idee der Antikörpermarkierung kam Albert Coons bei seinem Aufenthalt an der Charité im Institut der Pathologie im Sommer 1939. Umgesetzt wurde sie jedoch erst am Institut für Bakteriologie und Immunologie der Harvard Medical School [43]. Für die Enzym-Markierung wird entweder die Meerrettichperoxidase oder die alkalische Phosphatase verwendet. An einen Antikörper werden mehrere Enzymmoleküle gekoppelt, die ein Chromogen zu einem stabilen Farbprodukt umsetzen, das sich auf dem Gewebeschnitt niederschlägt. Zum Beispiel setzt die Meerrettichperoxidase Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid zu einem braunen, die alkalische Phosphatase das Chromogen *Fast-Red* zu einem roten Farbprodukt um. Immunhistochemische Färbungen werden direkt mittels markierter Primärantikörper oder indirekt in mehrschrittigen Färbungen mittels markierter Sekundärantikörper durchgeführt. Über die Färbemethode entscheidet die Expressionshöhe des Antigens. Stark exprimierte Antigene können direkt gefärbt werden, wohingegen schwach exprimierte eine Signalverstärkung mittels indirekter Färbemethode erfordern. Ein wichtiger Schritt vor der Detektion des Antigens durch den Primärantikörper ist die Demaskierung des Antigens in Paraffinschnitten, da das Fixierungsmittel Epitope verändern kann, z.B. die Bildung von Methylenbrücken infolge Formaldehydfixierung [44]. Diese maskierten Epitope können hitzeinduziert oder enzymatisch demaskiert und für die Bindung eines Primärantikörpers zugänglich gemacht werden. Empfindliche Antigene verändern sich infolge der Fixierung so stark, dass sie nur an Gefrierschnitten nachgewiesen werden können. Das Ziel jeder

immunhistochemischen Färbung ist ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis. Hierfür müssen die Arbeitsschritte und Materialien optimiert und aufeinander abgestimmt werden.

Die Immunhistochemie ermöglicht die Zuordnung der Proteinexpression zu bestimmten Zellkompartimenten wie dem Kern, dem Zytoplasma oder der Membran. Dies liegt in der Detektionsmethode begründet, bei der es zur Entwicklung eines Farbniederschlags in unmittelbarer Nähe des Antigens auf dem Gewebeschnitt kommt. Die Zuordnung subzellulärer Strukturen ist immunhistochemisch nicht möglich, sondern durch die Verwendung Fluorochrom-markierter Antikörper in der Immunfluoreszenz.

Grundsätzlich sind die Techniken der **Immunfluoreszenz** mit denen der Immunhistochemie vergleichbar. Antigene Strukturen werden hier mittels Fluorochrom-markierter Antikörper sichtbar gemacht. Die Liste dieser Fluorochrome ist weitaus länger als die der Chromogene und reicht von Aminomethylcoumarinazetat (Anregung bei 345 nm, Emission bei 445 nm) bis Alexa Fluor® 790 (Anregung bei 782 nm, Emission bei 805 nm). Das Prinzip der Immunfluoreszenz folgt der Stokes-Verschiebung, die die Wellenlängenverschiebung zwischen Anregung und Emission beschreibt. D.h. die Anregung eines Fluorochroms erfolgt mit spezifischer Wellenlänge, nachfolgend wird Licht längerer Wellenlänge emittiert. Das Emissionsspektrum zeigt Fluorochrom-spezifische Scheitelpunkte, die für die Detektion herangezogen werden. Die Emissionsspektren verschiedener Fluorochrome können sich jedoch teilweise überlagern. Für Anregung und Detektion werden daher Filtersätze benötigt, die sowohl die spezifische Anregungswellenlänge als auch die spezifische Emissionswellenlänge eines Fluorochroms passieren lassen. Der Einsatz verschiedener Fluorochrome in multiparametrischen Messungen ist daher durch die Filtersätze limitiert. Im Durchflusszytometer wird die spektrale Überlagerung mathematisch kompensiert, d.h. das Signal eines bestimmten Fluorochroms wird aus allen benachbarten Kanälen herausgerechnet. Derart kompensierte Daten sind jedoch nicht uneingeschränkt verwertbar [45]. Beim Fluoreszenzmikroskop können diese Interferenzen nicht kompensiert werden, so detektiert z.B. der Filtersatz für das Fluorochrom Alexa Fluor® 555 zusätzlich emittiertes Licht des Fluorochroms Alexa Fluor® 594.

Einsatz findet die Immunfluoreszenz hauptsächlich bei der Detektion von Proteinen, die in demselben Zellkompartiment exprimiert werden. Die immunhistochemische Detektion dieser koexprimierten Proteine führt zu einer Mischfarbe, die mit dem menschlichen Auge nicht oder nur sehr schwer von den Einzelfarben zu unterscheiden ist. In der Immunfluoreszenz werden sichtbare Mischfarben erzeugt. Somit ermöglicht die Immunfluoreszenz die Charakterisierung von Immunzellen anhand der Definition von Phänotyp und Effektormolekülen in multiparametrische

Färbungen (*multiplexing*). *Multiplexing* erfolgt z.B. an Gefrierschnitten mittels Multi-Epitop-Ligand-Kartographie (MELK). Das Prinzip der MELK beruht auf einem repetitiven Färbeprozess von Inkubation, Bildgebung und Ausbleichen [46]. Der Gewebeschnitt wird mit einem Fluorochrom-markierten Primärantikörper inkubiert und nach Bildaufnahme ausgebleicht. Nachfolgend wird ein weiterer Primärantikörper aufgetragen, der mit demselben Fluorochrom markiert ist. Die Fluoreszenz wird photodokumentiert und der Schnitt nachfolgend wieder ausgebleicht. Unter Verwendung von 32 Primärantikörpern wurden mittels MELK unterschiedliche T-Zellpopulationen in der intestinalen Mukosa von CU- und MC-Patienten nachgewiesen [47].

Vor- und Nachteile der histopathologischen Färbemethoden sind in Tabelle 1 aufgelistet. Nicht aufgelistet ist die Eigenfluoreszenz des Gewebes, die in der Immunfluoreszenz, vor allem wenn sie durch die Fixierung eingeführt wurde, ein Problem darstellt. Eine zu hohe Eigenfluoreszenz verringert das Signal-Rausch-Verhältnis. Sie kann jedoch auch von diagnostischem Nutzen sein, z.B. bei der Bestimmung von Kollagen, das über ein breites Spektrum von Wellenlängen angeregt werden und grün bis gelb fluoresziert. Kollagen spielt bei der Fibrosierung und Bildung von Stenosen beim MC eine Rolle [48].

Tabelle 1: Vor- und Nachteile verschiedener histopathologischer Färbemethoden

Färbemethode	Vorteile	Nachteile
Histochemie	<ul style="list-style-type: none"> – Beurteilung von Einzelzellen und Zellverbänden – Orientierung im Gewebeverband – Jahrzehntelange Haltbarkeit – Einfach, schnell und preiswert durchführbar 	<ul style="list-style-type: none"> – Keine spezifische Zellcharakterisierung – Einsatz gefährdender Chemikalien
Immunhistochemie	<ul style="list-style-type: none"> – Beurteilung von Einzelzellen und Zellverbänden – Orientierung im Gewebeverband – Jahrzehntelange Haltbarkeit – Spezifische Charakterisierung von Zellen – Darstellung zellulärer Strukturen (Kern, Zytoplasma, Membran) 	<ul style="list-style-type: none"> – Limitierte Auswahl an Farbstoffen – Antigendemaskierung – Keine Darstellung subzellulärer Strukturen oder koexprimierter Proteine
Immunfluoreszenz	<ul style="list-style-type: none"> – Beurteilung von Einzelzellen und Zellverbänden – Darstellung koexprimierter Proteine – Vielzahl an Fluorochromen – Spezifische Charakterisierung von Zellen – Darstellung zellulärer und subzellulärer Strukturen 	<ul style="list-style-type: none"> – Geringe bis keine Orientierung im Gewebeverband – Antigendemaskierung – Begrenzte Haltbarkeit – Photobleichung

Ein großer Vorteil der Histopathologie ist die Möglichkeit der räumlichen Zuordnung, d.h. sowohl die Zuordnung von Zellen im Gewebeverband als auch die Zuordnung zellulärer Bestandteile und subzellulärer Strukturen. So zeichnet sich basale Plasmazytose bei CED durch das Vorkommen von Plasmazellen an der Kryptenbasis aus [49]. Dieser Befund ist nur histopathologisch zu erheben. Die besonderen Eigenschaften und Fähigkeiten der Histopathologie begründen ihren hohen klinischen Stellenwert. Ihr Stellenwert in translationalen Studien soll im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit anhand experimenteller Modelle intestinaler Entzündung dargestellt werden.

2. Fragestellung und Zielsetzung

Die Histopathologie nimmt als Teilgebiet der Pathologie einen großen Stellenwert in der klinischen Diagnostik ein. Welchen Stellenwert die Histopathologie in translationalen Studien einnimmt, soll am Beispiel experimenteller Modelle intestinaler Entzündung anhand der hier zusammengefassten Arbeiten gezeigt werden. Tiermodelle haben zum Verständnis der Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) maßgeblich beigetragen. Seit der Beschreibung des ersten Tiermodells wurde eine Vielzahl weiterer Modelle, mehrheitlich in der Maus, entwickelt. Diese unterschiedlichen Modelle gewähren Einblicke in relevante Aspekte der CED, aber keines für sich spiegelt diese multifaktorielle Erkrankung vollständig wider. Für die Translation der Ergebnisse aus experimentellen Modellen auf die menschliche Erkrankung müssen die Tiermodelle standardisiert beschrieben werden. Den Beitrag, den die Histopathologie bei der Charakterisierung der Tiermodelle leistet, wird an den folgenden Aspekten verdeutlicht:

1. Die Histopathologie ermöglicht die Translation histomorphologischer Veränderungen in Mausmodellen intestinaler Entzündung auf CED beim Menschen unter Verwendung histochemischer Standardfärbungen und spezifischer Bewertungsschemata.
2. Die Histopathologie unterstützt die Charakterisierung lokaler Zellpopulationen in chronischen Entzündungsmodellen über die Darstellung des Phänotyps einschließlich der Effektormoleküle mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz und zeigt die Grenzen der Übertragbarkeit der Befunde aus Tiermodellen auf die menschliche Erkrankung auf.
3. Die Histopathologie zeigt zelluläre Interaktionen anhand der Darstellung kolokalisierter Proteine und weist am Modell der experimentellen antigenspezifischen Entzündung zugrundeliegende subzelluläre Mechanismen für die Interaktion von T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen mittels Immunfluoreszenz nach.

3. Ergebnisse

3.1 Histomorphologische Veränderungen in Mausmodellen intestinaler Entzündung und deren Bezug zur menschlichen Erkrankung

[Erben U, Loddenkemper C, Doerfel K, Spieckermann S, Haller D, Heimesaat MM, Zeitz M, Siegmund B, Kühl AA. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. 2014; Int J Clin Exp Pathol, 7(8): 4557-4576.]

www.ijcep.com /ISSN:1936-2625/IJCEP0018684; e-Century Publishing Corporation

Im Sinne einer Anleitung zur Beurteilung histomorphologischer Veränderungen wurde die intestinale Histomorphologie in Mausmodellen systematisch untersucht und daraus einheitliche Bewertungskriterien abgeleitet. Ausgangspunkt war die Vielzahl von Bewertungsschemata in wissenschaftlichen Veröffentlichungen, deren Anzahl mittlerweile die der Modelle übersteigt.

Die Anwendung eines allgemeingültigen Schemas scheitert an der spezifischen histomorphologischen Ausprägung verschiedener Modelle. Die Definition von Kategorien und Standardkriterien aus dieser Arbeit ermöglicht die Beurteilung histomorphologischer Veränderungen nicht nur in etablierten, sondern auch in neu entwickelten Mausmodellen. Diese basiert auf drei Kategorien: I. Entzündungsinfiltrat, II. Epithelveränderung, III. Architekturschäden und bietet sechs Beurteilungsschemata an: Schema 1 für chemisch-induzierte Dickdarmentzündung, Schema 2 für antigenvermittelte Dickdarmentzündung, Schema 3 für die Dickdarmentzündung aufgrund einer gestörten Immunzellhomöostase, Schema 4 für die Dickdarmentzündung genetisch veränderter Mäuse mit definiertem Zytokindefekt, Schema 5 für die Dünndarmentzündung genetisch veränderter Mäuse mit definiertem Zytokindefekt und Schema 6 für antigenvermittelte Dünndarmentzündung. Die Eingruppierung des zu beurteilenden Modells in eines dieser Beurteilungsschemata erfolgt nach dem Prinzip der initialen Schädigung der intestinalen Homöostase, d.h. ob diese von äußeren oder von inneren Faktoren ausgelöst wird. Eine Schädigung von außen erfolgt z.B. durch die rektale Applizierung einer erosiven Chemikalie wie bei der Trinitrobenzolsulfonsäure-induzierten Kolitis. Eine Schädigung von innen erfolgt z.B. durch die Störung des Gleichgewichts des intestinalen Immunsystems wie bei der Transferkolitis. Dieses Eingruppierungsschema erleichtert jedem Anwender die histomorphologische Beurteilung des verwendeten Mausmodells sowie die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppen.

[Erben U, Loddenkemper C, Spieckermann S, Heimesaat MM, Siegmund B, Kühl AA. Histomorphology of intestinal inflammation in IBD mouse models and its relevance for IBD in men. 2016; Int J Clin Exp Pathol, 9(2):408-442.]

www.ijcep.com /ISSN:1936-2625/IJCEP0018684; e-Century Publishing Corporation

Die Befunde aus der systematischen Beurteilung der Histomorphologie in Mausmodellen intestinaler Entzündung führen zurück zu der Frage, welches Mausmodell typische Merkmale eines MC oder einer CU widerspiegelt. Bisherige Übersichtsarbeiten beschäftigen sich mit zellulären und molekularen Mechanismen in Modellen intestinaler Entzündung, deren Stellenwert in präklinischen Studien oder dem Einfluss der Mikrobiota auf die intestinale und systemische Immunantwort. Histopathologische Aspekte wurden bisher nur an ausgewählten Modellen bewertet. Das Wissen über histomorphologische Gemeinsamkeiten von Mausmodellen mit dem MC oder der CU beim Menschen bietet hier eine Entscheidungshilfe bei der Wahl des geeigneten Mausmodells für das Testen einer Hypothese. Diese Entscheidungshilfe stellt histopathologische Merkmale der Mausmodelle denen für den MC typischen Merkmalen wie z.B. diskontinuierliche und transmurale Entzündung, Ausbildung von Granulomen, lymphoide Aggregate, ödematöse und fibrotische Submukosa sowie denen für die CU typischen Merkmalen wie z.B. kontinuierliche Entzündung der Mukosa, Kryptitis und Becherzelldepletion gegenüber.

Von den über 90 Mausmodellen weisen lediglich 17% eine Dünndarmentzündung auf, die histopathologisch dem MC ähnelt. Zusätzlich zeigt die Arbeit vom histopathologischen Standpunkt aus auf, dass nicht alle Mausmodelle intestinaler Entzündung für präklinische Studien oder die Beurteilung der Pathogenese geeignet sind. Vor allem Mausmodelle, die in neuerer Zeit entwickelt wurden und auf einer Störung der epithelialen Barriere beruhen, bilden die Rolle der Mikrobiota bei den CED ab.

Histomorphologische Kriterien stellen eine zusätzliche Entscheidungshilfe für die Auswahl geeigneter Mausmodelle dar und ermöglichen die systematische und einheitliche Beurteilung intestinaler entzündlicher Veränderungen.

3.2 Charakterisierung funktionaler Immunzellpopulationen im Gewebeverband mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

[Duque-Correa MA, Kühl AA, Rodriguez PC, Zedler U, Schommer-Leitner S, Rao M, Weiner J 3rd, Hurwitz R, Qualls JE, Kosmiadi GA, Murray PJ, Kaufmann SH, Reece ST. Macrophage arginase-1 controls bacterial growth and pathology in hypoxic tuberculosis granulomas. 2014; PNAS, 111(38): E4024-4032.]

<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1408839111>

Infolge einer Infektion mit *Mycobacterium (M.) tuberculosis* bilden sich in der Lunge Granulome von organisierter Struktur, die die Ausbreitung des Bakteriums im Körper verhindern. *M. tuberculosis* kann sich in einem nekrotischen Zentrum, das aus abgetöteten Makrophagen und Bakterien besteht, vermehren, wodurch die geordnete Struktur des Granuloms bis zur Ausbreitung des Bakteriums immer weiter aufgehoben wird und sich schließlich eine Tuberkulose entwickelt. Da die schützende Funktion der Granulome vor allem auf die strukturierte Zusammenarbeit von T-Zellen und Makrophagen zurückzuführen ist, sind lokale Bezüge im Gewebe für das Verständnis besonders wichtig. Die Entwicklung von Granulomen über die Stadien solide, nekrotisch und verkäsend kann im Mausmodell der Tuberkulose abgebildet und so der Beitrag einzelner Zellpopulationen im definierten zeitlichen und örtlichen Verlauf untersucht werden.

Makrophagen sind mit Enzymsystemen ausgestattet, die ihnen die Ausführung ihrer Schlüsselfunktionen unter hypoxischen Bedingungen, wie sie im Zentrum von Granulomen vorherrschen, ermöglichen. Eines dieser Enzyme ist Arginase I, die den letzten Schritt des Harnstoffzyklus katalysiert und vor allem in Hepatozyten vorkommt. Arginase I verbindet man vor allem mit anti-inflammatorischen Immunantworten, da durch Substratlimitierung die Bildung von Stickoxiden gehemmt wird. Um die Beteiligung der Arginase I in der Tuberkulose zu untersuchen, wurden Wildtypmäuse und Mäuse mit einer Defizienz für die Stickoxidsynthase (*nitric oxide synthase*, NOS)-2 allein oder in Kombination mit Arginase I mit *M. tuberculosis* infiziert. Immunhistochemisch sowie mittels Immunfluoreszenz konnte im Lungengewebe eine Korrelation zwischen der Expression von Arginase I und dem Auftreten von Nekrosen gezeigt werden. Hauptproduzenten dieser Arginase I sind Makrophagen. Diese Arginase I-exprimierenden Zellen finden sich in hypoxischen Bereichen der Granulome, hauptsächlich ringförmig um das verkäsende Zentrum konzentriert. Zusätzlich korreliert die Arginase I-Expression mit einer verminderten T-Zellproliferation. Die räumliche Zuordnung der Arginase I-exprimierenden Makrophagen und

Der spezifische Erkenntnisgewinn aus der Histopathologie ist die Herstellung eines räumlichen Bezuges für individuelle Zellen. Die Zuordnung von Makrophagen und T-Zellen innerhalb der Struktur der Granulome in der experimentellen Tuberkulose zeigt, dass die lokale Produktion von Arginase I durch Makrophagen eine wesentliche Rolle für die Kontrolle des Pathogens spielt, da sie u.a. exzessive T-Zellantworten verhindert.

[Kredel LI, Batra A, Stroh T, Kühl AA, Zeitz M, Erben U, Siegmund B. Adipokines from local fat cells shape the macrophage compartment of the creeping fat in Crohn's disease. 2013; Gut, 62(6):852-862.]

<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301424>

Über lange Zeit wurde Fettgewebe als Energiespeicher angesehen. Mittlerweile ist es als Organ mit endokrinen und immunologischen Funktionen akzeptiert. Charakteristisch für den MC ist hyperplastisches mesenteriales Fettgewebe, das vor allem transmural entzündete Bereiche des Dünndarms umschließt, das sogenannte *creeping fat*. Wesentliche Befunde zur immunologischen Bedeutung des Fettgewebes stammen aus Untersuchungen dieses *creeping fat*, das in Mausmodellen so nicht beobachtet wird. Im *creeping fat* von MC-Patienten sind die Konzentrationen von Leptin und Adiponektin, maßgeblich immunmodulatorisch wirkende Adipokine, erhöht. In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluss dieser Faktoren aus dem Fettgewebe auf die Funktionalität von Makrophagen im lokalen Immungeschehen bestimmt.

Makrophagen exprimieren Rezeptoren für Leptin und Adiponektin, und die Behandlung polarisierter Makrophagen aus dem peripheren Blut mit beiden Liganden führt zu einer gesteigerten Sekretion sowohl anti- als auch pro-inflammatorischer Zytokine. Dieser Effekt ist auf eher anti-inflammatorisch wirkende, alternativ-aktivierte (M2) Makrophagen ausgeprägter als auf pro-inflammatorisch wirkende, klassisch-aktivierte (M1) Makrophagen. M1-Makrophagen zeigen infolge Leptin-Stimulation eine gesteigerte Phagozytoseaktivität, während Adiponektin keinen Einfluss hat. Zusätzlich steigert Adiponektin die Chemokinproduktion und somit das chemotaktische Potenzial der M2-Makrophagen. Auch Leptin steigert das chemotaktische Potenzial der Makrophagen, wobei auch hier der Effekt auf M2-Makrophagen ausgeprägter ist.

Mit der Frage nach der Relevanz dieser Befunde für das Geschehen im *creeping fat*, wurden Makrophagen im mesenterialen Fettgewebe von Patienten mittels Immunhistochemie näher untersucht. Im *creeping fat* von MC-Patienten zeigt sich eine massive Infiltration von CD68⁺ Makrophagen im Vergleich zu mesenterialem Fettgewebe von Patienten mit CU, kolorektalem Karzinom und nicht entzündetem Kontrollgewebe. In dieser Makrophagenpopulation finden sich sowohl der M1- als auch der M2-Phänotyp, wobei M2-Makrophagen stärker vertreten sind. Dies korreliert mit einer deutlich erhöhten Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10. Eine gleichfalls erhöhte Infiltration CD3⁺ T-Zellen weist auf ein lokal gesteigertes chemotaktisches Potenzial der M2-Makrophagen infolge Adipokin-Stimulation hin.

die adipokinvermittelte Anreicherung von M2-Makrophagen herrscht u.a. im *creeping fat* ein eher anti-inflammatorisches Milieu vor, das vermutlich eine systemische Ausbreitung verhindert.

[Epple H-J, Allers K, Tröger H, Kühl A, Erben U, Fromm M, Zeitz M, Loddenkemper C, Schulzke J-D, Schneider T. Acute HIV infection induces mucosal infiltration with CD4⁺ and CD8⁺ T cells, epithelial apoptosis, and a mucosal barrier defect. 2010; *Gastroenterology*, 139(4): 1289-1300.]

<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2010.06.065>

Die gastrointestinale Mukosa nimmt in der Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) als Ort der Virusreplikation und der Depletion von CD4⁺ T-Zellen eine zentrale Rolle ein. Die zusätzliche Schädigung der epithelialen Barriere ist an der Progredienz der Infektion beteiligt. Durch die durchlässige Barriere translozieren nicht nur kommensale Bakterien aus dem Darmlumen in die Lamina propria, sondern auch Pathogene und Nahrungsmittelantigene, die das mukosale Immunsystem zusätzlich stimulieren. Die Frage nach der Ursache und dem Zeitpunkt des Auftretens einer Barriere-Schädigung im Rahmen einer HIV-Infektion kann nur direkt am Ort des Geschehens, d.h. unmittelbar am Epithel beantwortet werden. Über die Darstellung relevanter T-Zellpopulationen und ihrer Funktion *in situ* zeigt die Histopathologie, dass die Schädigung der epithelialen Barriere bereits ein frühes Ereignis im akuten Infektionsstadium ist. Mit Hilfe duodener Biopsien aus Patienten in verschiedenen Phasen einer HIV-Infektion wurden CD4⁺ T-Gedächtniszellen und zytotoxische CD8⁺ T-Zellen zeitlich und räumlich zugeordnet. In der akuten Infektion zeigt sich im Vergleich zu gesundem Gewebe ein deutlicher Anstieg intestinaler T-Zellen, sowohl in der Lamina propria als auch direkt im Epithel. Während CD8⁺ T-Zellen in der Lamina propria und intraepithelial vorkommen, finden sich CD4⁺ T-Zellen hauptsächlich in der Lamina propria. Im Gegensatz zur chronischen HIV-Infektion, bei der mukosale CD4⁺ T-Zellen depletiert werden, ist ihre Zahl in der Lamina propria im frühen akuten Stadium erhöht. Dieser Anstieg in der CD4⁺ T-Zellzahl wird von einem Anstieg mukosaler CD8⁺ T-Zellen begleitet. Immunhistochemische und Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit Perforin identifizierten diese CD8⁺ T-Zellen als zytotoxische T-Zellen. Die gleichzeitige Zunahme Caspase-3⁺ apoptotischer Epithelzellen belegt, dass diese zytotoxischen T-Zellen maßgeblich zur Schädigung der Epithelschicht beitragen.

Frühere durchflusszytometrische Analysen nahmen die CD4⁺ T-Zelldepletion selbst als mögliche Ursache für die Schädigung der epithelialen Barriere an. Nur die detaillierte Untersuchung duodener CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in ihrer Position und Funktion im Gewebeverband konnte zeigen, dass im frühen akuten Infektionsstadium die Zahl der CD4⁺ T-Zellen erhöht ist und mit einer Zunahme an zytotoxischen T-Zellen einhergeht, die mit vermehrter Apoptose der Epithelzellen korreliert.

[Muñoz M, Eidenschenk C, Ota N, Wong K, Lohmann U, Kühl AA, Wang X, Manzanillo P, Li Y, Rutz S, Zheng Y, Diehl L, Kayagaki N, van Lookeren-Campagne M, Liesenfeld O, Heimesaat M, Ouyang W. Interleukin-22 induces interleukin-18 expression from epithelial cells during intestinal infection. 2015; *Immunity*, 42(2): 321-31.]

<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.01.011>

Die orale Infektion mit hohen Dosen von *Toxoplasma (T.) gondii* induziert im Darm von Mäusen eine Immunantwort durch Th1-Zellen. Diese Th1-Zellen produzieren entzündliche Zytokine wie IL-12, Tumornekrosefaktor (TNF) α und Interferon (IFN) γ . Diese Zytokine sind im Zusammenspiel mit neutrophilen Granulozyten für die Immunpathologie im betroffenen Darm verantwortlich. Die Produktion von IFN γ durch Th1-Zellen wird zusätzlich durch IL-12 und -18 gefördert. IL-18 wird als inaktive Vorstufe (proIL-18) konstitutiv in myeloiden und Epithelzellen gebildet. Nach Inflammation wird aktives IL-18 enzymatisch durch Caspase-1 aus dem proIL-18 freigesetzt. IL-22-defiziente Mäusen zeigen in der *T. gondii*-Infektion eine im Vergleich zu Wildtypmäusen geringere Sekretion von IL-18 und IFN γ . Ursächlich für die verminderte IFN γ -Sekretion ist eine verminderte Anzahl IFN γ -produzierender Th1-Zellen in der Lamina propria und im intraepithelialen Kompartiment. Mit dem geringeren Vorkommen der Th1-Zellen geht eine verminderte Anzahl neutrophiler Granulozyten in der Lamina propria einher. Während infizierte Wildtypmäuse epitheliales IL-18 vor allem in den Zotten des Ileums aufweisen, fehlt dieses in den IL-22-defizienten Tieren vollständig, obwohl die Epithelzellen histologisch intakt erscheinen.

Exogen zugegebenes IL-22 verdeutlicht die Notwendigkeit dieses Zytokins für die Expression von epitheliale IL-18. Die Stimulation mit IL-22 steigert die Expression der IL-18-Boten-RNS sowohl *ex vivo* in Organoidkulturen als auch *in vivo* in Wildtypmäusen. Immunhistochemische Färbungen bestätigten die epitheliale Lokalisation des IL-18-Proteins. IL-18 wiederum fördert im Zusammenspiel mit IL-23 die Sekretion von IL-22 durch lymphoide Zellen des angeborenen Immunsystems. Abhängig von ihrer Quelle üben IL-18 und IL-22 sowohl protektive als auch entzündungsfördernde Funktionen aus. IL-18 aus Epithelzellen wirkt in der frühen, akuten Phase protektiv. Wird es von inflammatorischen Makrophagen produziert, verstärkt IL-18 intestinale Entzündungen. Ob IL-22 die epitheliale Integrität stärkt oder schädigt, wird von mehreren Faktoren beeinflusst, u.a. vom betroffenen Organ und dem Zytokinmilieu. In der *T. gondii*-Infektion verstärken beide Zytokine die Th1-Antwort und damit die Entzündung und Nekrosen. Zusätzlich bilden IL-18 und IL-22 eine positive Rückkopplungsschleife. IL-22 steigert die Expression von epitheliale IL-18, das wiederum die Sekretion von IL-22 fördert. Diese gegenseitige

Immunhistochemische Färbungen unterstützen den Befund, dass IL-22 für die Expression von IL-18 in den Epithelzellen des Dünndarms bei *T.gondii*-Infektion notwendig ist und beide Zytokine an der Schädigung des Darmes maßgeblich beteiligt sind.

3.3 Darstellung zellulärer Interaktionen und die räumliche Zuordnung intrazellulärer Strukturen mittels Immunfluoreszenz

[Seidel D, Eickmeier I, Kühl AA, Hamann A, Loddenkemper C, Schott E. *CD8 T cells primed in the gut-associated lymphoid tissue induce immune-mediated cholangitis in mice.* 2014; *Hepatology*; 59(2): 601-611.]

<http://dx.doi.org/10.1002/hep.26702>

Die primär sklerosierende Cholangitis ist eine chronische Entzündung der intra- und extrahepatischen Gallengänge, die gehäuft bei CED- und hier insbesondere bei CU-Patienten auftritt. Daraus ergab sich die Frage, ob T-Zellen, die im darmassoziierten lymphatischen Gewebe aktiviert wurden, in die Leber migrieren und dort zur Entzündung beitragen oder diese sogar verursachen. Die enterohepatische Migration wurde mit Hilfe antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen in zwei Tiermodellen untersucht: 1. in transgenen Mäusen, die als Modellantigen Ovalbumin (OVA) sowohl in den Cholangiozyten der Leber als auch in den Enterozyten des Dünndarms exprimieren und 2. im Modell der OVA-induzierten Kolitis. In beiden Modellen wurden antigenspezifische T-Zellen induziert und deren enterohepatische Migration nachgewiesen. Die Immunhistochemie zeigte im Entzündungsinfiltrat Makrophagen sowie B- und T-Zellen. OVA-spezifische T-Zellen befinden sich dort in direktem, engem Kontakt mit den OVA⁺ Cholangiozyten der entzündeten Gallengänge. Eine chronische OVA-spezifische Kolitis in Mäusen, die OVA in den Cholangiozyten exprimieren, führt ebenfalls zu einer Cholangitis, mit strikt antigenspezifischer Auslösung.

Eine chronische intestinale Entzündung ruft in der Leber ein pro-inflammatorisches Milieu hervor, das zum einen aus dem Darm ausgewanderte antigenspezifische T-Zellen zurückhält und zum anderen diese vor Ort zusätzlich aktiviert. Hier unterstützen immunhistochemische Analysen den durchflusszytometrischen Nachweis einer enterophepatischen Migration antigenspezifischer T-Zellen, indem sie die Lokalisation der eingewanderten antigenspezifischen Zellen an intrahepatischen Gallengängen aufdecken. Diese Befunde aus Mausmodellen der primär sklerosierenden Cholangitis tragen zum Verständnis der Pathogenese dieser extraintestinalen Manifestation in CED bei.

[Neumann K, Erben U, Kruse N, Wechsung K, Schumann M, Klugewitz K, Scheffold A, Kühl AA. Chemokine transfer by liver sinusoidal endothelial cells contributes to the recruitment of effector CD4⁺ T cells into the murine liver. 2015; PLOS ONE, 10(6):e0123867.]

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0123867>

Die Migration von T-Zellen in umliegende Gewebe erfolgt in einem mehrschrittigen Prozess. Chemokinabhängige Migrationsprozesse, die an der Interaktion von T-Zellen mit Endothelzellen beteiligt sind, können am Sinusoidendothel der Leber besonders gut exemplarisch untersucht werden. In diesen Interaktionen spielen Chemokinrezeptoren auf den T-Zellen und deren korrespondierende Liganden auf der Seite der Lebersinusoidendothelzellen (LSEZ) eine zentrale Rolle. Die chemokinvermittelte Migration unter homöostatischen Bedingungen dient der Kontrolle der physiologischen Rezirkulation der Leukozyten. Homöostatische Chemokine werden konstitutiv exprimiert, während pro-inflammatorische Zytokine die Expression entzündlicher Chemokine für die Rekrutierung von Effektorzellen induzieren. Um diesen Prozess zu beschleunigen, können LSEZ aktiv basolateral vorliegende Chemokine aufnehmen und auf der apikalen Seite für die T-Zellrekrutierung lokal zur Verfügung stellen. Dieser Prozess wurde u.a. in einem Mausmodell der T-Zell-vermittelten Hepatitis untersucht. Im Verlauf der Hepatitis finden sich vermehrt die entzündlichen Chemokine CXC-Ligand (CXCL)9 und CXCL10. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen zeigt sich eine Kollokalisierung des CXCL9 mit CD146. Der Laminin α 4-Rezeptor CD146 wird von LSEZ exprimiert. LSEZ nehmen sowohl entzündliches CXCL10 als auch homöostatisches CXCL12 *in vitro* aktiv auf. Die Endozytose der Chemokine erfolgt dabei clathrinabhängig und wird folglich durch den Clathrin-Inhibitor Chlorpromazin stark reduziert. Somit führt die Behandlung der LSEZ mit Chlorpromazin zu einer Verminderung der CXCL9- und CXCL10-vermittelten Transmigration von CD4⁺CXCR3⁺ T-Effektor-/Gedächtniszellen sowie der CXCL12-vermittelten Transmigration von CD4⁺ T-Zellen durch eine *monolayer*-Kultur von LSEZ. Beteiligte subzelluläre Strukturen in den LSEZ konnten mit Hilfe der konfokalen Laserrastermikroskopie (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM) aufgelöst werden. Die Kollokalisierung von CXCL10 und CXCL12 mit dem *early endosome antigen 1* aber nicht mit dem Transferrinrezeptor oder dem *lysosomal-associated membrane protein 1* beweisen, dass beide Chemokine über Endosomen transportiert werden, aber nicht mit *recycling*-Endosomen oder -Endolysosomen assoziiert sind.

Die Kombination funktioneller *in vitro*-Experimente mit der Darstellungstiefe der CLSM ermöglichte den Nachweis, dass die Transmigration der T-Zellen in das Lebergewebe u.a. chemokinvermittelt über die Sinusoide erfolgt. Die Endothelzellen der Sinusoide sind in der Lage,

entzündliche Chemokin CXCL10 und das homöostatische Chemokin CXCL12 werden hierfür clathrinvermittelt aufgenommen und endosomal transportiert.

4. Diskussion

4.1 Die Translation histomorphologischer Veränderungen in Mausmodellen intestinaler Entzündung auf chronisch-entzündliche Darmerkrankungen beim Menschen

Die Pathologie genießt den Ruf des „Goldstandards der Diagnostik“, und die Histopathologie nimmt als Teilgebiet der Pathologie einen großen Stellenwert in der differenzierten Diagnostik von Krankheiten ein. Die Aufarbeitung und Befundung der Gewebe erfolgt nach festgelegten Standards oder leitlinienbasiert. Für die Histopathologie in Tiermodellen intestinaler Entzündung fehlt bisher dieser Konsens. Am Beispiel intestinaler Entzündungen unter Beteiligung der enterohepatischen Achse verdeutlichen die hier vorgestellten Arbeiten den Stellenwert der Histopathologie in translationalen Studien zu chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Die Histopathologie liefert hier Informationen bezüglich histomorphologischer Veränderungen, der Zusammensetzung und der Lokalisation des Immunzellkompartiments sowie subzellulärer Strukturen direkt am Ort des Entzündungsgeschehens.

In translationalen Studien stellt sich die Frage, welches experimentelle Modell für die Beantwortung spezifischer Fragestellungen zur menschlichen Erkrankung geeignet ist und inwieweit die gewonnenen Ergebnisse für die menschliche Erkrankung tatsächlich relevant sind. Wie hier am Beispiel der CED gezeigt, bietet die Histopathologie für die Einteilung der Mausmodelle intestinaler Entzündung die Möglichkeit der Zuordnung nach dem Prinzip der initialen Schädigung. Dieses Prinzip berücksichtigt den auslösenden Schritt, der zur Schwächung der Barriere und Störung der intestinalen Homöostase und letztendlich zur intestinalen Entzündung führt. Diese Schwächung kann von außen, z.B. durch die Applikation einer erosiven Chemikalie erfolgen, oder von innen, z.B. durch ein Ungleichgewicht der Zytokine. Dies ermöglicht eine Unterteilung der Mausmodelle intestinaler Entzündung in sechs Kategorien, wobei sich die Modelle einer Kategorie durch vergleichbare histomorphologische Veränderungen auszeichnen. So zeigen alle Modelle, bei denen eine Entzündung des Kolons durch eine erosive Chemikalie induziert wurde, vergleichbare epitheliale und mukosale Veränderungen sowie ein vergleichbares Infiltrationsmuster der Entzündungszellen. Folglich ergeben sich 6 Schemata für die Bewertung der histomorphologischen Veränderungen: Schema 1 für chemisch-induzierte Kolitis, Schema 2 für antigenvermittelte Kolitis, Schema 3 für Kolonentzündungen aufgrund einer gestörten Immunzellhomöostase, Schema 4 für Entzündungen des Kolons genetisch veränderter Mäuse mit definiertem Zytokindefekt, Schema 5 für Dünndarmentzündungen genetisch veränderter Mäuse mit definiertem Zytokindefekt und Schema 6 für antigenvermittelte Entzündungen des

Dünndarms. Der Vorteil einer histomorphologischen Bewertung als ersten Schritt bei der Beurteilung neuer Modelle intestinaler Entzündung besteht im strukturierten Vergleich mit anderen Modellen.

Damit ist für die Vergleichbarkeit der histopathologischen Ergebnisse aus Mausmodellen intestinaler Entzündung eine standardisierte Beurteilung notwendig. Ein allgemeingültiges Bewertungssystem, das, vergleichbar der systematischen Einteilung in der Tumordiagnostik, auf alle Mausmodelle intestinaler Entzündung gleichermaßen anwendbar ist, fehlt selbst in der klinischen Diagnostik. Für die Bewertung histologischer Krankheitsaktivität beim Menschen sind nicht weniger als 22 Schemata entwickelt worden [50], von denen die nach Geboes [51] und nach Riley [52] am häufigsten verwendet werden [50]. Ein neueres Bewertungsschema wurde am Universitätsklinikum Nancy entwickelt, das sich als allgemeingültiges Schema für die Bewertung der histologischen Krankheitsaktivität bei Colitis ulcerosa (CU) etablieren könnte, da es einfach anzuwenden und praxisnah ist [50]. Der Nancy-Index stellt das erste validierte Bewertungsschema dar und berücksichtigt alle Faktoren, die zur Krankheitsaktivität beitragen [50].

Ein allgemeingültiges Bewertungsschema für Mausmodelle intestinaler Entzündung erwies sich als nicht praktikabel, da sich die Modelle in den einzelnen Kategorien in ihrer histomorphologischen Ausprägung stark unterscheiden. So zeichnet sich eine chemisch-induzierte Kolitis vor allem durch Erosionen und großflächige Ulzerationen aus, während eine Kolitis, die auf eine gestörte Immunzell-Homöostase zurückzuführen ist, diese Merkmale sehr selten zeigt [53]. Diese präsentiert sich vor allem mit Kryptenhyperplasie und –abszessen [53]. Wenig praktikabel erscheint auch die Entwicklung spezifischer Bewertungsschemata (*scores*) für jedes einzelne Modell, da mittlerweile über 90 verschiedene Mausmodelle beschrieben sind [26,27]. Zudem finden sich in der Literatur nicht nur so viele Bewertungsschemata wie Modelle der intestinalen Entzündung, sondern eher so viele Bewertungsschemata wie Anwender. Die Arbeitsgruppe von Fiona Powrie, die das Modell der Transferkolitis entwickelte, bewertete anfänglich die Schwere der Kolitis mit *scores* von 0 bis 5 [54]. Ein verfeinertes Bewertungsschema derselben Arbeitsgruppe beurteilt die maximale Entzündung inzwischen mit einem Wert von 12 [55], die Arbeitsgruppe von Matthew Grisham mit 17 [56]. Diese Unterschiede spiegeln den Grad der Unterteilungen der zu beurteilenden Parameter wider. Dies zeigt in erster Linie, dass diese *scores* vor dem Hintergrund einer konkreten Fragestellung entwickelt wurden. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist somit erschwert. Die Festlegung einheitlicher Kriterien für die Beurteilung ist daher zwingend erforderlich.

Eigene Arbeiten und eine systematische Analyse der Literatur ergaben, dass für die Beurteilung folgende drei Kategorien herangezogen werden sollten: I. das zelluläre Infiltrat, II. epitheliale Veränderungen und III. die mukosale Architektur. Als Kriterium für Kategorie I gelten die Schwere und das Ausmaß der Infiltration. Zu den epithelialen Veränderungen zählen die Kryptenhyperplasie, der Verlust von Becherzellen, die Entzündung und Abszesse der Krypten sowie Erosionen. Für die Einschätzung der mukosalen Architektur werden Ulzerationen, Granulationsgewebe, Kryptenarchitektur und –verlust sowie die Zottenstruktur im Dünndarm beurteilt. Das Bewertungsschema sollte einfach und schnell anzuwenden sein. Zu viele Unterkategorien verlängern den Bewertungsprozess unnötig. Für eine weiterführende Beurteilung können zusätzliche (immun)histochemische Färbungen durchgeführt werden, um spezifische Parameter näher zu charakterisieren. So kennzeichnet Granulationsgewebe Wundheilungsprozesse und zeichnet sich selbst durch Gefäßneubildung und das Vorhandensein von Fibroblasten und Leukozyten aus [57,58]. Diese Zellen lassen sich mittels immunhistochemischer Färbungen im Gewebe nachweisen, z.B. das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (CD31) und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor als Zeichen der Angiogenese [59,60].

Modelle intestinaler Entzündung, die Aspekte der CED widerspiegeln, sind in vielfältigen Übersichtsarbeiten beschrieben worden. Anfang der neunziger Jahre wurden gängige Modelle hinsichtlich Methodik, Pathologie und Anwendung [30,61,62] beschrieben. Daraufaufgehend konzentrierte sich die Beschreibung auf spezielle Aspekte wie die Rolle der intestinalen Mikrobiota [63-65] und die Verwendung experimenteller Modelle in präklinischen Studien [31,66,67]. Die Diskussion histopathologischer Aspekte beschränkt sich hierbei auf ausgewählte, gut charakterisierte Modelle wie die IL10-defiziente-, SAMP/YitFc- und TNF^{ΔARE}-Maus, die Transferkolitis sowie die Natrium-Dextransulfat- und Trinitrobenzolsulfonsäure-induzierte Kolitis [68]. Histopathologische Merkmale der Modelle intestinaler Entzündung unterstützen die Wahl geeigneter Modelle für spezifische Fragestellungen mit Bezug auf CED beim Menschen. D.h. für die Wahl des geeigneten Modells eignet sich nicht nur das Zytokinprofil (Th1 vs. Th2) oder das betroffene Organ (Dickdarm vs. Dünndarm), sondern auch die histopathologische Ausprägung. Wobei auch hier kein Mausmodell alle histopathologischen Merkmale einer Entität aufweist. Vielmehr gibt es Modelle, z.B. die Transferkolitis, die sowohl typische Merkmale des Morbus Crohn (MC) aufweist wie transmurale Entzündung, als auch der CU wie Kryptenhyperplasie [69]. Auch beim Menschen wird in 10% der Fälle die Diagnose der Colitis indeterminata gestellt, da endoskopisch und histomorphologisch nicht sicher zwischen den beiden Erkrankungen unterschieden werden kann [70]. Andere Merkmale des MC werden in Mausmodellen seltener

oder gar nicht abgebildet, wie z.B. *creeping fat*. Dieses findet sich im Rattenmodell der Indomethacin-induzierten Kolitis [71]. Einerseits erscheinen vom histopathologischen Standpunkt aus einige Mausmodelle für translationale Studien weniger geeignet. So wird die SAMP/Yit-Maus mit einer Entzündung des Dünndarms vielfach als Modell für den MC verwandt [72]. Diese Entzündung breitet sich jedoch weder transmural aus, noch entwickeln sich lymphoide Aggregate oder Granulome. Vielmehr weist die SAMP/Yit-Maus CU-typische hyperplastische Krypten und Becherzellverlust auf [72]. Weitaus besser wird der MC in der SAMP/YitFc-Maus abgebildet. Bei diesem Modell handelt es sich um einen Unterstamm der SAMP/Yit-Maus, der an der Universität von Virginia gezüchtet wurde [73]. Dieses Modell zeigt die MC-typische transmurale Entzündung sowie vermehrte Becherzellen, neuronale Hyperplasie, Granulome und Fisteln [74]. Andererseits werden Mausmodelle, die sich mit intestinaler Schädigung oder Entzündung präsentieren, als Modelle für CED in der Literatur geführt, obwohl sich diese histomorphologisch nicht mit typischen Merkmalen der CED präsentieren. Ein Beispiel stellen Mäuse mit einer Defizienz im Gen *cbl-b* dar [27]. *Cbl-b* reguliert die Aktivierung von B- und T-Zellen, indem es das Ansprechen auf kostimulatorische Signale heraufsetzt. Somit führt eine *cbl-b*-Defizienz zu einer gesteigerten IL-2-Produktion und T-Zell-Proliferation. Dies führt vor allem in lymphatischen Organen zu einer massiven Zunahme an Lymphozyten, die sich auch in anderen Organen wie Pankreas, Leber, Lunge und eben auch im Darm zeigt [75]. Die parenchymale Schädigung in den betroffenen Organen [75] scheint allerdings eher auf die lymphoproliferativen Veränderungen in den Organen als auf histomorphologische Ausprägungen einer Entzündung zurückzuführen zu sein. Dementsprechend findet sich in den Tieren keine erhöhte Anfälligkeit für eine Autoimmunerkrankung [76]. Zusätzlich zum Fehlen CED-typischer morphologischer Veränderungen im Darm dieser Mäuse, zeigt sich keine gesteigerte Sekretion der Zytokine $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$, die auch bei CED erhöht sind [75].

Neben histomorphologischen Gemeinsamkeiten der Mausmodelle mit den menschlichen Erkrankungen, darf nicht vernachlässigt werden, dass sich Maus und Mensch in ihrer Immunologie und Anatomie unterscheiden. So ist u.a. das Zökum der Maus verhältnismäßig größer als das menschliche Zökum, das zudem einen Appendix besitzt. Maus und Mensch unterscheiden sich zudem in der Verteilung der Paneth-Zellen, die beim Menschen auch im Kolon zu finden sind, während ihre Lokalisation in der Maus auf den Dünndarm beschränkt ist [77,78].

Auch histomorphologische Unterschiede lassen sich nur in angemessen vorbereitetem Probenmaterial beurteilen. Deswegen muss schon die Entnahme, Fixierung und Verarbeitung der Gewebeproben aus Tiermodellen standardisiert erfolgen. Gerade im Gastrointestinaltrakt erschweren sowohl hetero- als auch autolytische Prozesse die Verarbeitung und Befundung der

Gewebe, wenn die Fixierung nicht schnellstmöglich nach Organentnahme erfolgt. Eigene Erfahrungen zeigen, dass bereits im Tierstall, während der Sektion, ein repräsentatives Gewebestück von angemessener Größe entnommen und fixiert werden sollte. Repräsentativ bedeutet, dass die Entnahme an Orten makroskopischer Veränderungen erfolgen sollte oder zumindest dort, wo eine ausgeprägte Entzündung vermutet wird. Am Beispiel der Natrium-Dextransulfat-induzierten Kolitis bedeutet dies die Entnahme am distalen Kolon. Angemessen ist ein Gewebestück der Größe 1,0 x 0,5 cm. Diese Größe sollte weder unter- noch überschritten werden, da das Gewebestück zum einen das gesamte Organ repräsentieren soll, zum anderen erschweren zu große Gewebestücke die Fixierung. Da 10%iges Formalin in einer Stunde nur 1 mm Gewebe durchdringt, die Penetrationszeit jedoch nicht der Fixierungszeit entspricht, bergen zu große Gewebestücke das Risiko der Unterfixierung der inneren Bereiche. Optimal ist die Fixierung bei Raumtemperatur. Zu niedrige Temperaturen würden die Kondensationsreaktion, bei der Formaldehyd mit Proteinen Methylenbrücken ausbildet, verlangsamen. Zu hohe Temperaturen würden diesen Prozess beschleunigen. Dies führt im Extremfall zu einer Überfixierung und Härtung des Gewebes. Zudem sollte die Fixierung lichtgeschützt erfolgen, da Formaldehyd leicht zu Ameisensäure oxidiert. Nach Fixierung des Gewebes wird dieses in Paraffin eingebettet und in Blöcken ausgegossen. Während Paraffinblöcke bei angemessener Lagerung jahrelang haltbar sind, weisen Paraffinschnitte selbst lichtgeschützt und gekühlt nur eine begrenzte Haltbarkeit auf. Vor allem Bestandteile des Zellkerns lassen sich an zu lange asservierten Schnitten nur noch schwer oder sogar nicht mehr anfärben.

Histomorphologische Veränderungen im Gewebe von Patienten mit CED lassen sich in Tiermodellen abbilden. Keines der Modelle für sich zeigt alle Merkmale der menschlichen Erkrankungen, und MC-typische Modelle sind weniger stark vertreten als Modelle mit CU-typischen Merkmalen. Die hier vorgestellten Arbeiten begründen, weshalb alle histopathologischen Arbeitsschritte einschließlich der Beurteilung standardisiert erfolgen sollten.

4.2 Charakterisierung lokaler Zellpopulationen in chronischen Entzündungen in Mausmodellen und beim Menschen

Neben der Darstellung histomorphologischer Veränderungen in entzündlichen Erkrankungen ist die Histopathologie das einzige Verfahren zur Darstellung definierter Zellpopulationen am Ort eines Entzündungsgeschehens. Mit Hilfe eines Markers werden spezifische Strukturen sichtbar gemacht, so dass diese einer bestimmten Zellpopulation zugeordnet werden können. Eine einfache Zuordnung erfolgt z.B. für Mastzellen über die histochemische Färbung der Granula

mittels Toluidinblau oder über die immunhistochemische Färbung der Rezeptor-Tyrosinkinase KIT (CD117) [79]. Mittels *multiplexing* mit weiteren Markern lassen sich einfach zugeordneten Zellen näher charakterisieren, wie z.B. CD3⁺ T-Zellen über die Färbung des T-Zellkorezeptors CD4, der α -Kette des IL-2-Rezeptors CD25 und des Transkriptionsfaktors *forkhead-box-protein* P3 als regulatorische T-Zellen [80]. *Multiplexing* ermöglicht zusätzlich die Zuordnung der Zellen im Gewebeverband. Ein Beispiel für räumliche Zuordnungen bietet die experimentelle Tuberkulose. Dieses Mausmodell eignet sich für die Darstellung spezifischer Ansammlungen myeloider Zellen und deren räumliche Anordnung in Bezug auf T-Zellen. In der experimentellen Tuberkulose zeigten Immunhistochemie und -fluoreszenz das parallele Auftreten der T-Zellproliferation und der Arginase I-Produktion durch Makrophagen. Gleichzeitig erfolgte die Zuordnung dieser Zellen zu spezifischen Strukturen in der Lunge, den Granulomen, und zusätzlich zu bestimmten Bereichen innerhalb dieser Granulome, dem Ringbereich um das verkäsende Zentrum. Diese Aussage ist mit keiner anderen Untersuchungsmethode zu treffen. Durchflusszytometrische Untersuchungen bestätigten Makrophagen als die Hauptproduzenten der Arginase I [81]. Dies erforderte die Isolation pulmonaler Leukozyten und deren Analyse nach Antikörperfärbung im Durchflusszytometer. Anhand exprimierter Proteine wurden diese als neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen, Monozyten sowie inflammatorische und alveolare Makrophagen identifiziert. Da nur wenige Monozyten Arginase I exprimieren [81], wird diese Expression vermutlich nach deren Rekrutierung in die Lunge induziert. Nachfolgend differenzieren die Monozyten zu inflammatorischen Makrophagen und zeigen eine kontinuierliche Arginase I-Expression. Arginase I zählt zu einem der beiden Enzyme, die mit den Schlüsselfunktionen der Makrophagen in Granulomen bei Tuberkulose assoziiert sind. Das andere Enzym ist NOS-2, und beide konkurrieren um dasselbe Substrat. NOS-2 metabolisiert L-Arginin zu L-Citrullin und Stickoxid, das an der Abwehr intrazellulärer Pathogene beteiligt ist [82,83]. Arginase I-Aktivität wird vor allem mit anti-inflammatorischen Immunantworten in Verbindung gebracht [84,85]. Die hier vorgestellte Arbeit zeigt, dass dies nicht nur auf die Substratlimitierung und somit auf die Suppression von NOS-2 zurückzuführen ist, sondern auch auf die Suppression exzessiver T-Zellantworten [81].

Sowohl Immunhistochemie als auch Durchflusszytometrie erlauben die zellspezifische Zuordnung eines exprimierten Proteins. Die Immunhistochemie erlaubt hierbei zusätzlich die räumliche Zuordnung der Zellen im Gewebeverband, die Durchflusszytometrie zusätzlich die Bestimmung der Expressionsstärke. Da die Zellen im Durchflusszytometer vereinzelt werden, entspricht die Signalstärke der Expressionsstärke des gemessenen Parameters. Diese Korrelation ist in der Immunhistochemie nur eingeschränkt möglich. Zum einen handelt es sich um Zellen in einem

Gewebe, das nicht gleichmäßig angeschnitten ist, zum anderen handelt es sich bei der Farbentwicklung um eine enzymatische Reaktion, die das Signal ungleichmäßig verstärkt. Die durchflusszytometrische Untersuchung erfordert jedoch, im Gegensatz zur Histopathologie, die Isolation der Zellen aus ihrem Gewebeverband und nachfolgend deren Kultivierung und/oder Stimulation. D.h. im Verlauf der Aufarbeitung erfahren die Zellen eine Manipulation resultierend in veränderten Eigenschaften. So müssen für die durchflusszytometrische Bestimmung intrazellulärer Zytokine die Zellen stimuliert werden, da frisch isolierte Zellen keine oder nur eine geringe spontane Zytokinproduktion zeigen [86,87]. Eine gängige Methode der unspezifischen T-Zellaktivierung bei unbekanntem Antigen ist die Kurzzeit-Stimulation mit Phorbol 12-Myristat 13-Azetat in Kombination mit Ionomycin [87]. Routineprotokolle empfehlen eine 6-stündige Stimulation, bei der die letzten zwei Stunden unter Hemmung der Proteinsekretion erfolgen. Die Zytokine werden folglich nicht sekretiert, sondern verbleiben innerhalb der Zelle. Für die Detektion dieser intrazellulären Zytokine mittels Fluorochrommarkierter Antikörper müssen die stimulierten Zellen fixiert und permeabilisiert werden. Die Summe dieser Behandlungen bedeutet für die Zellen bis zur durchflusszytometrischen Messung im Vergleich zur Immunhistochemie eine massive Manipulation. Zusätzlich kommt es infolge Stimulation mit Phorbol 12-Myristat 13-Azetat zu einem lysosomalen Abbau von CD4, das sich folglich nicht mehr auf der Zelloberfläche nachweisen lässt [88].

Die Translation der Befunde aus der experimentellen Tuberkulose auf die menschliche Erkrankung wird durch den Umstand erschwert, dass Arginase I beim Menschen nicht von Monozyten oder Makrophagen produziert wird [89]. So zeigt sich in Granulomen von Tuberkulose-Patienten zwar auch die Expression von Arginase I, diese kann jedoch nicht eindeutig den Makrophagen zugeordnet werden [90,91]. Somit eignet sich dieses Tuberkulosemodell für Untersuchungen organisierter Strukturen in der Lunge sowie über den Effekt von Arginase I auf die Proliferation von T-Zellen, der sich *in vitro* auch an T-Zellen aus dem peripheren Blut zeigt [92], jedoch nicht für spezifische Untersuchungen zu den Arginase I-produzierenden Zellen. Bezüglich der Rolle der Makrophagen bleibt dieses Tuberkulosemodell doch nur ein Modellsystem mit geringer Relevanz für die menschliche Erkrankung.

Dies führt zurück zu den CED beim Menschen und die MC-typische Ausprägung des *creeping fat*, das in keinem Mausmodell abgebildet wird. Fragen zu Makrophagen im *creeping fat* bei MC lassen sich daher vornehmlich an menschlichem Untersuchungsmaterial beantworten. Da Makrophagen eine bemerkenswerte Plastizität besitzen und auf Signale ihrer Umgebung reagieren, verändern sie entsprechend dem vorherrschenden Milieu ihren Phänotyp [93]. Im vorliegenden Fall bestätigen immunhistochemische Untersuchungen die *in vitro*-Befunden mit primären

Makrophagen. Das vorherrschende Milieu im *creeping fat* von MC-Patienten mit erhöhten Konzentrationen von Adiponektin, Leptin und IL-6 führt zu einer Vermehrung von vornehmlich anti-inflammatorisch wirkenden M2-Makrophagen mit vermutlich erhöhtem chemotaktischem Potenzial, da gleichzeitig vermehrt T-Zellen sowie IL-10-produzierende Zellen vorkommen [94]. Mittels *multiplexing* sollten die Makrophagensubpopulationen näher charakterisiert werden, um deren Rolle in der Barrierefunktion des *creeping fat* und funktionale Zusammenhänge besser zu verstehen.

Immunhistochemische Färbungen stellen nicht nur die Lokalisation von Zellen im Gewebeverband dar, sondern zeigen auch funktionale Eigenschaften wie Proliferation und Apoptose oder die Produktion von Effektormolekülen. So deuten durchflusszytometrische Untersuchungen auf eine Schädigung der epithelialen Barriere in der HIV-Infektion aufgrund CD4⁺ T-Helferzelldepletion hin [95,96]. Histopathologische Untersuchungen zeigen jedoch eine Zunahme der CD4⁺ T-Zellzahlen im frühen akuten Infektionsstadium, die mit einem Anstieg zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen einhergeht [97]. Diese zytotoxischen T-Zellen zeichnen sich für die Apoptose von Epithelzellen und dem damit verbundenen Barriereverlust verantwortlich [97]. In der experimentellen Toxoplasmose zeigen *microarray*-Daten eine massive Suppression des IL-18-Gens im Ileum IL-22-defizienter Tiere [98]. Die Bestimmung des Proteins im Enzym-gekoppelten Immunadsorptionsassay bestätigt den auf der Ebene der Boten-RNS erhobenen Befund [98]. Dies erlaubt noch keinen direkten Rückschluss auf die entsprechenden Proteine, da deren Expression von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird, u.a. durch die Genaktivität, epigenetische Regulation oder regulatorische Signale der Boten-RNS [99-102]. Die Immunhistochemie erweitert beide Befunde um die zelluläre Zuordnung und deutet darauf hin, dass IL-22 essentiell an der Produktion von IL-18 durch intestinale Epithelzellen beteiligt ist. Die genaue Kenntnis der zellulären Lokalisation von IL-18 ist hier für die Funktion entscheidend, da von Epithelzellen produziertes IL-18 vor allem in der akuten Entzündungsphase protektiv wirkt [103,104]. Im Gegensatz zu IL-18, das von pro-inflammatorischen Monozyten/Makrophagen sezerniert wird, welches entzündungsfördernd wirkt [105].

Die hier vorgestellten multiparametrischen immunhistochemischen Analysen verdeutlichen die Zweckmäßigkeit des *multiplexing*. Viele Aussagen lassen sich an konsekutiven Schnitten über die Zuordnung der einzelnen Färbungen zu bestimmten Strukturen treffen. Auf diese Weise wurden in der experimentellen Tuberkulose Arginase I-produzierende Zellen im konsekutiven Schnitt der Randzone um ein Pimonidazol-positives Zentrum innerhalb eines Granuloms zugeordnet [81]. Pimonidazol dient dem Nachweis von Hypoxie; es wird *in vivo* verabreicht und bindet unter hypoxischen Bedingungen an Thiol-Gruppen [106]. Nachfolgend wurden Makrophagen, die das

EGF-like module containing mucin-like receptor-like 1-Protein exprimieren anhand Doppelfärbungen als Hauptproduzenten der Arginase I identifiziert [81]. Generell bilden konsekutive Paraffinschnitte aufgrund der geringen Schnittdicken von 1-2 μm einen bestimmten Bereich bzw. eine Zellebene besser ab als Schnitte von Gefriermaterial, die i.d.R. dicker geschnitten werden (etwa 5 μm). Geht man von einer durchschnittlichen Zellgröße von 10-15 μm aus, hat man nach zwei bis drei Gefrierschnitten diese Zellebene schon wieder verlassen. Mit anderen Worten, Aussagen, die anhand konsekutiver Gewebeschnitte getroffen werden können, sind durch die Größe und Menge des Probenmaterials begrenzt. Dies gilt umso mehr bei der Verwendung von Biopsiematerial; die Stanzbiopsie eines Mammakarzinoms weist z.B. nur eine Länge von 2 mm auf. Die Verwendung konsekutiver Schnitte würde das Probenmaterial schnell verbrauchen. Folglich sollten möglichst viele Parameter auf einem Gewebeschnitt nachgewiesen werden. Dem Mehrwert an Informationen aus multiparametrischen Färbungen stehen wiederum Einschränkungen aufgrund methodischer Anforderungen gegenüber. *Multiplexing* an Paraffinschnitten erfordert mehrere Demaskierungsschritte, die eine chemische und physikalische Belastung für das Gewebe darstellen. Bei Gefrierschnitten entfallen die Demaskierungsschritte zwar, dafür erhöht sich die Anzahl notwendiger Blockierungsschritte, da endogene Enzyme nicht deaktiviert wurden und Proteine unvernetzt vorliegen. Gleichzeitig bedeutet eine Vermehrung der Arbeitsschritte eine länger dauernde Beanspruchung der Gewebeschnitte. Ein weiteres Problem stellt die Detektion dar. Im Gegensatz zur Immunfluoreszenz ergibt sich bei immunhistochemischem *multiplexing* das Problem der Kombinierbarkeit der Chromogene. Während in der Immunfluoreszenz sichtbare Mischfarben der Fluoreszenzfarbstoffe erzeugt werden, sind chromogene Mischfarben für das menschliche Auge schwer oder nicht mehr zu differenzieren. Vor über 10 Jahren ist die MELK zum *multiplexing* für Gefrierschnitte entwickelt worden und bietet die Möglichkeit, eine fast unbegrenzte Anzahl an Epitopen zu detektieren [107,108]. Diese hohe Anzahl an Parametern wird durch die Verwendung eines einzigen Fluorochroms ermöglicht. Methodisch bedeutet dies, dass sich die repetitiven Arbeitsschritte aus Inkubation mit einem Fluorochrom-markierten Primärantikörper, Waschen, Aufnahme eines Fluoreszenzbildes, Ausbleichen des Fluorochroms, Aufnahme eines Fluoreszenz- und eines Phasenkontrastbildes zusammensetzen [46,107,108]. Die Limitierungen der MELK liegen u.a. in der ausschließlichen Verwendung von Gefrierschnitten, der Beanspruchung dieser Schnitte in langen Färbeprozeduren, der Verwendung Fluorochrom-markierter Primärantikörper ohne Signalverstärkung und im Zeitaufwand. Ein Zyklus in der MELK dauert über 40 Minuten, d.h. die Messung von 100 Parametern dauert an die 67 Stunden. Es ist schwer vorstellbar, dass die Eigenschaften eines Gefrierschnittes in einer derart langen Analyse konstant bleiben. Neben der

fast 3-tägigen Färbung des einen Schnittes müssen die Gesamtzeit aller zu untersuchenden Proben sowie der Zeitaufwand für die Auswertung in Betracht gezogen werden. Einen weiteren Nachteil stellt die ausschließliche Verwendung direkt-markierter Primäantikörper dar [46]. Hier fehlt die Signalverstärkung für schwach exprimierte Antigene. Von Nachteil sind ferner die sterische Hinderung der Primäantikörper, der konstant gehaltene Bildausschnitt während der Aufnahmen sowie fehlende Blockierungsschritte. Positiv- und Negativkontrollen werden ebenfalls nicht mitgeführt.

Eine wesentlich elegantere Methode stellt die *imaging mass cytometry* dar, eine Kombination von Immunhistochemie und *cytometry by time of flight* (CyTOF), für die Detektion von bis zu 32 Proteinen auf einem Gewebeschnitt [109]. Die Anzahl der Parameter ist auf 32 beschränkt, da für die Detektion Isotope seltener Metalle definierter Atommasse verwendet werden, von denen derzeit nur 32 verfügbar sind [109]. Diese Metallisotope werden an Primäantikörper gekoppelt [109]. Für die Signalverstärkung werden Nanopartikel oder chelatisierende Polymere eingesetzt [109]. Die Färbung erfolgt nach Routineprotokollen mit kommerziell erhältlichen Antikörpern, die durch die Kopplung in ihrer Spezifität unverändert bleiben [109]. Im Unterschied zur Immunhistochemie werden die mit Antikörpern markierten Schnitte luftgetrocknet und der Massenzytometrie zugeführt. Die Messung erfolgt nach Abtragung des Gewebes durch den Laser im CyTOF [110]. Im Gegensatz zur MELK können in der *imaging mass cytometry* auch Paraffinschnitte verwendet werden. Da die Schnitte mit allen Antikörpern gleichzeitig inkubiert werden, ist die Beanspruchung des Gewebes im Vergleich zur MELK deutlich, aber auch im Vergleich zur herkömmlichen Immunhistochemie geringer. Der Nachteil zur herkömmlichen Immunhistochemie ist die Abtragung des Gewebes durch den Laser während der Messung. Während immunhistochemisch gefärbte Gewebeschnitte eine unbegrenzte Haltbarkeit aufweisen und noch nach Jahrzehnten analysiert werden können, wird das Gewebe im CyTOF verbraucht. Weitere Nachteile sind der Kostenaufwand und die Einschränkung auf nur eine Demaskierungsmethode, die gegebenenfalls nicht für alle 32 Parameter optimal ist.

Die optimale Vorbehandlung verschiedener Epitope und Signalverstärkung bei schwach exprimierten Antigenen bietet das *multiplexing* mittels multispektraler Bildaufnahme. Die Gewebeschnitte, Paraffin- und Gefrierschnitte, werden nach Routineprotokollen gefärbt, die die optimale Demaskierungs- und Detektionsmethode berücksichtigen. Die Detektion kolokalisierter Proteine über Mischfarben, die das menschliche Auge nicht diskriminieren kann, erfolgt über die Entmischung der spektralen Eigenschaften der Einzelfarben und deren anschließende Visualisierung über Fehlfarben [111]. Die multispektrale Bildaufnahme nutzt hier das spezifische

Absorptionsverhalten der einzelnen Farbstoffe. Im Gegensatz zu Bildern, die im üblichen roten (R), grünen (G) und blauen (B) Wellenlängenbereich von 630 nm, 545 nm und 435 nm aufgenommen werden (RGB-Bilder) und sich am menschlichen Auge orientieren, erfolgt die multispektrale Bildaufnahme über einen Wellenlängenbereich von 420-720 nm [112]. Während z.B. eine blau-braune Mischfarbe im RGB-Bild nicht von den Einzelfarben diskriminiert werden kann, erlaubt die multispektrale Bildaufnahme die spektrale Entmischung, d.h. die Zerlegung der Mischfarbe in ihre Einzelkomponenten [112]. Diese Methode ermöglicht die Detektion von fünf Parametern in einer stabilen immunhistochemischen Färbung [111,113] und von bis zu acht in der Immunfluoreszenz [114]. Die Korrelation der Parameter im *multiplexing* mit den Einzelfärbungen ist mehrheitlich stark, nimmt jedoch mit steigender Parameteranzahl teilweise ab [115]. Die Anzahl der Parameter, die mit der multispektralen Methode erfasst werden, ist im Vergleich zu anderen multiparametrischen Methoden gering. Andererseits fehlen sowohl für die MELK als auch für die *imaging mass cytometry* die Validierungen der erfassten Parameter. Die multispektrale Bildaufnahme ist auch in der Immunfluoreszenz anwendbar. Hier ermöglicht sie den Einsatz von Fluorochromen, deren Emissionsspektren interferieren und mit den herkömmlichen Filtersätzen nicht voneinander getrennt werden können. Zusätzlich bietet die Möglichkeit, die Eigenfluoreszenz in einem separaten Kanal zu erfassen.

Histopathologische Methoden erlauben die Charakterisierung lokaler Zellpopulationen über die Darstellung des Phänotyps einschließlich der Effektormoleküle in chronischen Entzündungen in Mausmodellen und beim Menschen unter Einbeziehung des Gewebeverbands. Die Translation von Ergebnissen aus experimentellen Modellen wird durch funktionelle Unterschiede der Immunzellen zwischen Maus und Mensch erschwert, und nicht alle Merkmale der menschlichen Erkrankung lassen sich im Mausmodell abbilden.

4.3 Lokaler Nachweis zellulärer Interaktionen und die zugrundeliegenden subzellulären Mechanismen der T-Zellmigration im Mausmodell

In der intestinalen Homöostase sowie der chronischen intestinalen Entzündung spielt nicht nur der Ort der Generierung regulatorischer und Effektorzellen eine Rolle, sondern auch deren Migration in das Zielorgan. Die Migration von T-Zellen in intestinales Gewebe ist die Voraussetzung für die Entstehung einer Kolitis im Modell des adoptiven T-Zelltransfers. In diesem Modell werden CD4⁺ T-Zellen aus immunkompetenten Tieren in syngene, immundefiziente Mäuse transferiert [116]. Arbeiten aus dem Universitätsklinikum Ulm zeigen sehr eindrucksvoll die Migration, das *homing* und die Expansion dieser transferierten T-Zellen mittels

histopathologischer Methoden [117-121]. Syngen transferierte CD4⁺ T-Zellen wandern vor allem in Lymphknoten, die Milz und den Darm ein [119]. Auf dem Hintergrund der homöostatischen Proliferation erfahren die CD4⁺ T-Zellen in spezifischen intestinalen Strukturen ein *priming* für definierte Antigene durch dendritische Zellen [117,119]. Das Empfängertier entwickelt nachfolgend eine intestinale Entzündung, die der CU beim Menschen ähnelt, aber auch MC-typische Aspekte aufweist [117]. Mit der Zeit entwickeln die Mäuse zusätzlich eine Hepatitis [122]. Zellinteraktionen im Kontext des Lebergewebes und subzelluläre Prozesse, die mit der Migration von T-Zellen sind deswegen im Zusammenhang mit intestinalen Entzündungen von besonderem Interesse. Die Leber spielt bei der Induktion immunologischer Toleranz eine entscheidende Rolle. Dort werden T-Zelltoleranz [123,124] und regulatorische T-Zellen [125] induziert, alloreaktive T-Zellen deletiert [126,127] und entzündliche T-Zellaktivität inhibiert [128]. Antigenunabhängig kommt es jedoch in der Leber kolitischer Mäuse zur Ausbildung eines pro-inflammatorischen Milieus, das dazu führt, dass CD8⁺ T-Zellen vermehrt in der Leber zurückgehalten und aktiviert werden. Untersuchungen zur enterohepatischen Migration von T-Zellen in antigenspezifischen Mausmodellen zeigen deren Beteiligung an der primär sklerosierende Cholangitis als extraintestinale Manifestation der CED [129]. *In-vivo* wurde gezeigt, dass T-Zellen, die im darmassoziierten lymphatischen Gewebe geprägt wurden, hauptsächlich in den Dünndarm, die Lunge und die Leber migrieren [129]. Mittels Durchflusszytometrie wurden die T-Zellen hinsichtlich ihrer Rezeptorausstattung und ihres Aktivierungszustandes phänotypisiert. Immunhistochemische Färbungen der Cholangiozyten und T-Zellen verdeutlichen, dass sich die T-Zellen in der Leber vor allem im Bereich der Gallengänge konzentrieren [129]. Zusätzliche Färbungen zeigen den engen Zellkontakt von T-Zellen und Cholangiozyten [129]. Weiterführende Untersuchungen zu den Mechanismen der Cholangitisinduktion durch T-Zellen, die im darmassoziierten lymphatischen Gewebe geprägt wurden, sollten z.B. die Kolo-kalisation von Rezeptoren auf T-Zellen und Cholangiozyten unter Anwendung der Immunfluoreszenz beinhalten.

Welche Kriterien entscheiden über den Einsatz der Immunhistochemie oder der Immunfluoreszenz? Die herkömmliche Immunfluoreszenz ist weniger sensitiv als die Immunhistochemie, da die Verstärkung durch das chromogene Detektionssystem entfällt, so dass schwach exprimierte Antigene mittels enzymvermittelter Signalverstärkung detektiert werden müssen [130,131]. Das Signal in der Immunfluoreszenz ist linear und additiv und daher quantifizierbar [114,132]. Ein weiterer Vorteil der Immunfluoreszenz ist die selektive Darstellung subzellulärer Strukturen, da nur der Antikörper selbst den Farbstoff trägt und dieser nicht wie bei

der Immunhistochemie in der Nähe des Antikörpers gebildet wird und dort an das Gewebe bindet [133]. Für die Darstellung und das Verständnis transendothelialer Transportprozesse ist das Sinusoidendothel der Leber besonders geeignet. Dementsprechend wurde mittels Immunfluoreszenz die Kolokalisation des entzündlichen Chemokins CXCL9 mit dem Laminin α 4-Rezeptor CD146 dargestellt. Beim Menschen wird CD146 konstitutiv von allen Endothelzellen aber auch von anderen Zellen exprimiert [134-136]. In der Maus wird CD146 auf allen Endothelzellen der Blutgefäße hoch exprimiert, insbesondere von Lebersinusoidendothelzellen (LSEZ), während Endothelzellen der Lymphgefäße keine und Natürliche Killerzellen nur eine schwache CD146-Expression aufweisen [137]. Infolge Hepatitisinduktion zeigt die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion einen deutlichen Anstieg der entzündlichen Chemokine CXCL9 und -10 im Lebergewebe gefolgt von erhöhten Alanin-Aminotransferase-Werten als Zeichen der Entzündung und Schädigung der Leberzellen [138]. Immunfluoreszenzoptische Untersuchungen verdeutlichen exemplarisch das Vorkommen von CXCL9 hauptsächlich in den LSEZ [138]. Dies ist entweder auf die Expression oder auf die Aufnahme von CXCL9 durch LSEZ zurückzuführen. Molekularbiologische Untersuchungen zeigen eine vermehrte Expression der Boten-RNS von CXCL9 und CXCL10 in stimulierten LSEZ [138]. Die Durchflusszytometrie bestätigt die aktive Aufnahme basolateral präsentierter Chemokine durch die LSEZ [138]. Immunfluoreszenzoptisch wurde die Lokalisation dieser Chemokine in vesikulären Strukturen nachgewiesen [138]. Der endotheliale Chemokintransport wurde mittels CLSM untersucht. Während in der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie der gesamte Gewebeschnitt ausgeleuchtet wird, wird in der CLSM immer nur ein Bruchteil des Schnittes beleuchtet, d.h. im Mikroskop wird kein vollständiges Bild erzeugt, sondern der Schnitt mit einem fokussierten Laser abgerastert und das Bild nachträglich zusammengesetzt. Dies ermöglicht einen hohen Kontrast und eine hohe Auflösung. Für die Anregung werden verschiedene Laser verwendet und die Detektion erfolgt nach spektraler Auftrennung über verschiedene Lochblenden. In *transwell*-Experimenten wurden LSEZ mit Fluorochrom-markierten Chemokinen inkubiert, und die aufgenommenen Chemokine zeigen sich in der Mikroskopie durch ein intrazelluläres Fluoreszenzsignal [138]. Doppelfärbungen zeigen eine Kolokalisation der Signale und folglich der Chemokine mit dem *early endosome antigen 1*, das in frühen Endosomen exprimiert wird, aber keine mit dem Transferrinrezeptor oder dem *lysosomal-associated membrane protein 1* [138]. Der Transferrinrezeptor ist ein transmembranes Transportprotein und indiziert rezeptorvermittelte Endozytose und *recycling* [139], während *lysosomal-associated membrane protein 1* mit endolysosomalem *recycling* assoziiert ist [140]. Je geringer die Überlagerung der Emissionsspektren, d.h. je besser zwischen den Fluorochromen diskriminiert werden kann, desto

präziser fällt die Aussage über kolokalisierte Proteine aus [141]. Im vorliegenden Beispiel wurden die Fluorochrome Alexa Fluor® 488 und Alexa Fluor® 647 verwendet, deren spektrale Überlagerung vernachlässigbar gering ist. Die Aussage über kolokalisierte Proteine ist durch das Verständnis der dreidimensionalen Struktur von Zellen und subzellulärer Strukturen, der Qualität der Färbung und der Auswahl der Proteine sowie durch das optische System und das Auswertesystem beschränkt [142]. Dies gilt jedoch in der Immunfluoreszenz wie in der Durchflusszytometrie. Ein weiterer Nachteil beider Methoden ist das Ausbleichen der Fluorochrome (Photobleichung). Die Photobleichung führt zu einer geringeren Sensitivität des Nachweises. Sie beruht auf dem Verlust der Fluoreszenz infolge Anregung und wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, wie durch das Fluorochrom selbst, die Anregungswellenlänge oder die Anregungsdauer [143,144]. In der Durchflusszytometrie ist die Anregung konstant und beträgt nur wenige Millisekunden, d.h. hier ist die Gefahr durch Photobleichung vergleichsweise gering. Auch deswegen erlaubt die Durchflusszytometrie Aussagen zur Expressionshöhe als Korrelat der Intensität eines Fluoreszenzfarbstoffs bzw. der gebundenen Antikörper [145]. Abhängig vom Fluorochrom liegen bei der Immunfluoreszenz die Belichtungszeiten bei mehreren 100 ms. Der Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol, der sich an doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure anlagert und in RNS interkaliert, wird häufig als Marker für den Zellkern verwendet [146]. Abhängig vom Objektiv und damit von der Größe des Gewebeausschnitts benötigt 4',6-Diamidin-2-phenylindol eine relativ kurze Belichtungszeit von 10-80 ms, während Alexa Fluor® 647 bis zu 1.500 ms benötigen kann. Diese langen Belichtungszeiten erhöhen nicht nur die Photobleichung der eingesetzten Fluorochrome, sondern führen auch zu einer vermehrten Detektion von Eigenfluoreszenz und damit zu einem geringen Signal-Rausch-Verhältnis. Eigenfluoreszenz wird entweder durch Bearbeitungsschritte in das Gewebe eingeführt [147] oder beruht auf intrinsischen Faktoren wie die Emission bestimmter Spektren durch Zellbestandteile. Zum Beispiel weist die reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotid, das im Zytoplasma lokalisiert ist, ein Emissionsspektrum zwischen 400 und 550 nm mit einem Maximum bei 450 nm auf [148] und interferiert folglich mit Fluorochromen, die in diesem Wellenlängenbereich ebenfalls emittieren (z.B. Alexa Fluor® 555 oder Phycoerythrin). Die intrinsische Eigenfluoreszenz ist in der Durchflusszytometrie ebenfalls problematisch. Während in der Immunfluoreszenz Eigenfluoreszenz verschiedener Herkunft blockiert werden kann [149], bietet die Durchflusszytometrie nur die Möglichkeit, die Eigenfluoreszenz in einem separaten Kanal zu erfassen und diese eigenfluoreszenten Zellen nachfolgend mittels *gating* aus der Analyse auszuschließen. In der Immunfluoreszenz kann die Detektion der Eigenfluoreszenz reduziert werden, indem Belichtungszeiten von ≤ 200 ms angestrebt werden [141,150]. Dies wird durch die

Wahl des Fluorochroms in der Detektion beeinflusst und sollte sich nach der Expressionsstärke des zu detektierenden Antigens richten.

Befunde aus Mausmodellen der primär sklerosierenden Cholangitis tragen zum Verständnis der Pathogenese dieser extraintestinalen Manifestation in CED bei. Während immunhistochemische Methoden die enterophepatische Migration antigenspezifischer T-Zellen aufdeckten und deren Lokalisation an intrahepatischen Gallengängen zeigen, ist die Immunfluoreszenz notwendig, um Aussagen über kolokalisierte Proteine zu treffen. Mittels Immunfluoreszenz wurde gezeigt, dass die Transmigration der T-Zellen in das Lebergewebe vermutlich chemokinvermittelt über die Sinusoide erfolgt, da die Kolokalisation der Chemokine mit Strukturen innerhalb dieser LSEZ nachgewiesen wurde. D.h. die Chemokine werden von den Endothelzellen der Sinusoide clathrinvermittelt aufgenommen und endosomal transportiert [138].

Am Beispiel experimenteller Tiermodelle intestinaler Entzündung wurde gezeigt, dass die Histopathologie auch in translationalen Studien einen hohen Stellenwert einnimmt. Bei der Charakterisierung der Tiermodelle leistet die Histopathologie ihren Beitrag durch die Translation histomorphologischer Veränderungen in Mausmodellen auf die CED beim Menschen sowie die Charakterisierung lokaler Zellpopulationen in chronischen Entzündungsmodellen über die Darstellung des Phänotyps einschließlich der Effektormoleküle und zellulärer Interaktionen. Gleichzeitig zeigt sie die Grenzen der Übertragbarkeit der Befunde aus Tiermodellen auf die menschlichen Erkrankungen auf.

5. Zusammenfassung

In den letzten sechs Jahrzehnten verbesserten experimentelle Tiermodelle intestinale Entzündung maßgeblich unser Verständnis der Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CED) und unterstützen in vorklinischen Studien die Entwicklung neuer Therapieansätze. Allein in der Maus wurden bisher über 90 Modelle entwickelt, wobei keines dieser Modelle die multifaktorielle Erkrankung CED vollständig widerspiegelt. In translationalen Studien zu CED nimmt die Histopathologie einen hohen Stellenwert ein. So bietet sie unter Berücksichtigung histomorphologischer Gemeinsamkeiten und Besonderheiten der intestinalen Entzündung einen belastbaren Ansatz für die Einteilung und Bewertung der Tiermodelle intestinaler Entzündung. Nach dem Prinzip der initialen Schädigung, die zur Störung der intestinalen Homöostase und damit zur Ausbildung der intestinalen Entzündung führt, werden die Mausmodelle in verschiedene Kategorien eingeteilt. Modelle einer Kategorie weisen hierbei typische histomorphologische Merkmale auf, die sich über ein Bewertungsschema (*score*) in ihrem Schweregrad beurteilen lassen. Diese *scores* erlauben erstmals die einheitliche und standardisierte Bewertung dieser Modelle und damit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse unter verschiedenen Anwendern. Zusätzlich unterstützt die Berücksichtigung histopathologischer Merkmale die Wahl geeigneter Mausmodelle für CED-spezifische Fragestellungen. Denn obwohl sich Maus und Mensch in vielen immunologischen und anatomischen Merkmalen unterscheiden, zeigen Mausmodelle intestinaler Entzündung histomorphologische Gemeinsamkeiten mit der menschlichen Erkrankung. Der Grad der Übereinstimmung ist sehr variabel; einige Modelle zeigen ein hohes Maß an Übereinstimmungen wie die SAMP/YitFc-Maus, andere weisen nur vereinzelte CED-typische Merkmale auf wie die cbl-b-defiziente Maus. Neben der Lokalisation der Entzündung und dem mukosalen Zytokinmilieu bietet hier die Histopathologie ein weiteres Kriterium für die Wahl geeigneter Mausmodelle.

Eine (immun)histochemische Darstellung der Zellpopulationen direkt am Ort des Entzündungsgeschehens ohne deren vorherige Manipulation erlaubt die räumliche Zuordnung definierter Zellpopulationen in Geweben aus Modellen intestinaler Entzündung. Während andere Verfahren die Isolation, Kultivierung und Stimulation der Zellen erfordern, werden in der (Immun)histochemie zelluläre Phänotypen und Effektormoleküle im Gewebeschnitt räumlich zugeordnet. Infolgedessen werden Interaktionen der Immunzellen untereinander sowie mit Gewebestrukturen erfasst. Auf diese Weise zeigte die Histopathologie in der experimentellen Tuberkulose die räumliche Nähe der T-Zellproliferation zu der Arginase I-Produktion durch

Makrophagen im Bereich um das verkäsende Zentrum in pulmonalen Granulomen, das vermehrte Vorkommen von M2-Makrophagen, T-Zellen und IL-10 im *creeping fat* von Patienten mit Morbus Crohn, und die verminderte IL-18-Produktion in Epithelzellen im Mausmodell der Toxoplasmose.

Die Darstellung subzellulärer Strukturen erfolgte mittels Immunfluoreszenz, da bei dieser Methode Fluorochrom-markierte Antikörper eingesetzt werden, wodurch ein lineares und additives Signal erzeugt wird. Während in der Immunhistochemie die Detektion nukleärer, zytoplasmatischer und membranständiger Antigene über einen Farbniederschlag auf dem Gewebeschnitt erfolgt, wird das Fluorochrom in der Immunfluoreszenz direkt am Bindungsort des Antikörpers detektiert. Auf diese Weise wurde in der konfokalen Laserrastermikroskopie basolateral präsentierter Chemokine in Lebersinusoidendothelzellen nachgewiesen sowie deren clathrinabhängige Endozytose und deren Transport über frühe Endosomen.

Um reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten, muss die Histopathologie auch in experimentellen Modellen in allen methodischen und inhaltlichen Aspekten standardisiert erfolgen.

Die Histopathologie ist als Teilgebiet der Pathologie in experimentellen Modellen entzündlicher Prozesse für das Verständnis menschlicher Erkrankungen von maßgebender Bedeutung. Zum einen unterstützt sie Untersuchungsbefunde aus immun- und molekularbiologischen Methoden, zum anderen stellt sie histomorphologische Veränderungen sowie die Zusammensetzung und Lokalisation des Immunzellkompartiments einschließlich subzellulärer Strukturen direkt am Ort des Entzündungsgeschehens dar.

6. Literatur

1. Virchow R. Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre: Hirschwald; 1858
2. Hippokrates. Schriften: Die Anfänge der abendländischen Medizin. Hamburg: Rowohlt Taschenbuch Verlag 1962
3. Watermann R. Theodor Schwann. Leben und Werk. Düsseldorf: L. Schwann; 1060
4. Schwann T. Mikroskopische Untersuchungen über die Uebereinstimmung in der Struktur und dem Wachsthum der Thiere und Pflanzen: Sander; 1839
5. Dignass A, Preiss JC, Aust DE et al. [Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis, 2011]. *Z Gastroenterol* 2011; 49: 1276-1341
6. Preiss JC, Bokemeyer B, Buhr HJ et al. [Updated German clinical practice guideline on "Diagnosis and treatment of Crohn's disease" 2014]. *Z Gastroenterol* 2014; 52: 1431-1484
7. Strobel D, Goertz RS, Bernatik T. Diagnostics in inflammatory bowel disease: ultrasound. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 3192-3197
8. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005; 19 Suppl A: 5A-36A
9. Muratori F, Monateri PC. [Involvement of the terminal loop of the ileum in cryptogenetic ulcerous rectocolitis (ulcerative colitis with backwash)]. *Minerva Med* 1960; 51: 375-384
10. Saltzstein SL, Rosenberg BF. Ulcerative Colitis of the Ileum, and Regional Enteritis of the Colon. A Comparative Histopathologic Study. *Am J Clin Pathol* 1963; 40: 610-623
11. Hoffmann JC, Preiss JC, Autschbach F et al. [Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease]. *Z Gastroenterol* 2008; 46: 1094-1146
12. Johnston RD, Logan RF. What is the peak age for onset of IBD? *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14 Suppl 2: S4-5
13. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006; 314: 1461-1463
14. Ek WE, D'Amato M, Halfvarson J. The history of genetics in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol* 2014; 27: 294-303
15. Ellinghaus D, Bethune J, Petersen BS et al. The genetics of Crohn's disease and ulcerative colitis--status quo and beyond. *Scand J Gastroenterol* 2015; 50: 13-23
16. Geremia A, Biancheri P, Allan P et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev* 2014; 13: 3-10
17. Laroux FS, Pavlick KP, Wolf RE et al. Dysregulation of intestinal mucosal immunity: implications in inflammatory bowel disease. *News Physiol Sci* 2001; 16: 272-277
18. MacDonald TT, Monteleone G. Overview of role of the immune system in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Adv Exp Med Biol* 2006; 579: 98-107
19. Hold GL, Smith M, Grange C et al. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years? *World J Gastroenterol* 2014; 20: 1192-1210
20. Lakatos PL, Burisch J. Environment and invironment in IBDs: partners in crime. *Gut* 2015; 64: 1009-1010
21. O'Toole A, Korzenik J. Environmental triggers for IBD. *Curr Gastroenterol Rep* 2014; 16: 396
22. Liu JZ, van Sommeren S, Huang H et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet* 2015; 47: 979-986

23. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603
24. Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J et al. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 968-976
25. Kirsner JB, Elchlepp J. The production of an experimental ulcerative colitis in rabbits. *Trans Assoc Am Physicians* 1957; 70: 102-119
26. Erben U, Loddenkemper, C. Spieckermann, S., Heimesaat, M.M., Siegmund, B., Kühl, A.A. Histomorphology of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases (IBD) mouse models and its relevance for IBD in men. *Int J Clin Exp Pathol* 2016; 9: 35
27. Mizoguchi A. Animal models of inflammatory bowel disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012; 105: 263-320
28. Hoffmann JC, Pawlowski NN, Kuhl AA et al. Animal models of inflammatory bowel disease: an overview. *Pathobiology* 2002; 70: 121-130
29. Neurath MF. Animal models of inflammatory bowel diseases: illuminating the pathogenesis of colitis, ileitis and cancer. *Dig Dis* 2012; 30 Suppl 1: 91-94
30. Reimann J, Rudolphi A, Claesson MH. Novel experimental approaches in the study of the immunopathology in inflammatory bowel disease. *J Mol Med (Berl)* 1995; 73: 133-140
31. Maxwell JR, Viney JL. Overview of mouse models of inflammatory bowel disease and their use in drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol* 2009; Chapter 5: Unit5 57
32. Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P et al. Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut* 2009; 58: 1629-1636
33. Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* 2009; 58: 1152-1167
34. Fuss IJ. Is the Th1/Th2 paradigm of immune regulation applicable to IBD? *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14 Suppl 2: S110-112
35. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 329-342
36. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-1497
37. Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE et al. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 2002; 17: 629-638
38. Wilson MS, Ramalingam TR, Rivollier A et al. Colitis and intestinal inflammation in IL10^{-/-} mice results from IL-13 α 2-mediated attenuation of IL-13 activity. *Gastroenterology* 2011; 140: 254-264
39. Danese S, Rudzinski J, Brandt W et al. Tralokinumab for moderate-to-severe UC: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase IIa study. *Gut* 2015; 64: 243-249
40. Peine M, Rausch S, Helmstetter C et al. Stable T-bet(+)/GATA-3(+) Th1/Th2 hybrid cells arise in vivo, can develop directly from naive precursors, and limit immunopathologic inflammation. *PLoS Biol* 2013; 11: e1001633
41. Coons AHC, H.J.; Jones, R.N. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Experimental Biology and Medicine* 1941; 47: 200-202
42. Coons AH, Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med* 1950; 91: 1-13
43. McDevitt HO. Albert Hewett Coons - June 28, 1912-September 30, 1978. *Biogr Mem Natl Acad Sci* 1996; 69: 27-36
44. Metz B, Kersten GF, Hoogerhout P et al. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J Biol Chem* 2004; 279: 6235-6243

45. Roederer M. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* 2001; 45: 194-205
46. Schubert W, Bonnekoh B, Pommer AJ et al. Analyzing proteome topology and function by automated multidimensional fluorescence microscopy. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1270-1278
47. Berndt U, Bartsch S, Philipsen L et al. Proteomic analysis of the inflamed intestinal mucosa reveals distinctive immune response profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis. *J Immunol* 2007; 179: 295-304
48. Lenze F, Wessling J, Bremer J et al. Detection and differentiation of inflammatory versus fibromatous Crohn's disease strictures: prospective comparison of 18F-FDG-PET/CT, MR-enteroclysis, and transabdominal ultrasound versus endoscopic/histologic evaluation. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18: 2252-2260
49. Seldenrijk CA, Morson BC, Meuwissen SG et al. Histopathological evaluation of colonic mucosal biopsy specimens in chronic inflammatory bowel disease: diagnostic implications. *Gut* 1991; 32: 1514-1520
50. Marchal-Bressenot A, Salleron J, Boulagnon-Rombi C et al. Development and validation of the Nancy histological index for UC. *Gut* 2015, DOI: 10.1136/gutjnl-2015-310187:
51. Geboes K, Riddell R, Ost A et al. A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut* 2000; 47: 404-409
52. Riley SA, Mani V, Goodman MJ et al. Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut* 1991; 32: 174-178
53. Erben U, Loddenkemper C, Doerfel K et al. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7: 4557-4576
54. Asseman C, Mauze S, Leach MW et al. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999; 190: 995-1004
55. Izcue A, Hue S, Buonocore S et al. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity* 2008; 28: 559-570
56. Ostanin DV, Bao J, Koboziev I et al. T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G135-146
57. Ryan GB, Cliff WJ, Gabbiani G et al. Myofibroblasts in human granulation tissue. *Hum Pathol* 1974; 5: 55-67
58. Schlingemann RO, Rietveld FJ, Kwaspens F et al. Differential expression of markers for endothelial cells, pericytes, and basal lamina in the microvasculature of tumors and granulation tissue. *Am J Pathol* 1991; 138: 1335-1347
59. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM et al. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol* 1997; 151: 671-677
60. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 549-580
61. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS et al. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 109: 1344-1367
62. Reinshagen M, Eysselein VE. [Animal experiment models of chronic inflammatory bowel diseases]. *Z Gastroenterol* 1993; 31: 315-321
63. Elson CO, Cong Y, McCracken VJ et al. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev* 2005; 206: 260-276
64. Linskens RK, Huijsdens XW, Savelkoul PH et al. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2001, DOI: 29-40

65. Nguyen TL, Vieira-Silva S, Liston A et al. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis Model Mech* 2015; 8: 1-16
66. DeVoss J, Diehl L. Murine models of inflammatory bowel disease (IBD): challenges of modeling human disease. *Toxicol Pathol* 2014; 42: 99-110
67. Valatas V, Bamias G, Kolios G. Experimental colitis models: Insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease and translational issues. *Eur J Pharmacol* 2015; 759: 253-264
68. Jones-Hall YL, Grisham MB. Immunopathological characterization of selected mouse models of inflammatory bowel disease: Comparison to human disease. *Pathophysiology* 2014; 21: 267-288
69. Ostanin DV, Pavlick KP, Bharwani S et al. T cell-induced inflammation of the small and large intestine in immunodeficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G109-119
70. Guindi M, Riddell RH. Indeterminate colitis. *J Clin Pathol* 2004; 57: 1233-1244
71. Stadnicki A, Sartor RB, Janardham R et al. Kallikrein-kininogen system activation and bradykinin (B2) receptors in indomethacin induced enterocolitis in genetically susceptible Lewis rats. *Gut* 1998; 43: 365-374
72. Matsumoto S, Okabe Y, Setoyama H et al. Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain. *Gut* 1998; 43: 71-78
73. Pizarro TT, Pastorelli L, Bamias G et al. SAMP1/YitFc mouse strain: a spontaneous model of Crohn's disease-like ileitis. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 2566-2584
74. Rivera-Nieves J, Bamias G, Vidrich A et al. Emergence of perianal fistulizing disease in the SAMP1/YitFc mouse, a spontaneous model of chronic ileitis. *Gastroenterology* 2003; 124: 972-982
75. Bachmaier K, Krawczyk C, Kozieradzki I et al. Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature* 2000; 403: 211-216
76. Chiang YJ, Kole HK, Brown K et al. Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. *Nature* 2000; 403: 216-220
77. Bry L, Falk P, Huttner K et al. Paneth cell differentiation in the developing intestine of normal and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 10335-10339
78. Cunliffe RN, Rose FR, Keyte J et al. Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001; 48: 176-185
79. Rehg JE, Bush D, Ward JM. The utility of immunohistochemistry for the identification of hematopoietic and lymphoid cells in normal tissues and interpretation of proliferative and inflammatory lesions of mice and rats. *Toxicol Pathol* 2012; 40: 345-374
80. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P et al. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 1868-1878
81. Duque-Correa MA, Kuhl AA, Rodriguez PC et al. Macrophage arginase-1 controls bacterial growth and pathology in hypoxic tuberculosis granulomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: E4024-4032
82. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2001; 2: 907-916
83. Peranzoni E, Marigo I, Dolcetti L et al. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology. *Immunobiology* 2007; 212: 795-812
84. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 451-483
85. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 723-737
86. Lanzavecchia A. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 1985; 314: 537-539

87. Prussin C. Cytokine flow cytometry: understanding cytokine biology at the single-cell level. *J Clin Immunol* 1997; 17: 195-204
88. Petersen CM, Christensen EI, Andresen BS et al. Internalization, lysosomal degradation and new synthesis of surface membrane CD4 in phorbol ester-activated T-lymphocytes and U-937 cells. *Exp Cell Res* 1992; 201: 160-173
89. Munder M, Mollinedo F, Calafat J et al. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood* 2005; 105: 2549-2556
90. Mattila JT, Ojo OO, Kepka-Lenhart D et al. Microenvironments in tuberculous granulomas are delineated by distinct populations of macrophage subsets and expression of nitric oxide synthase and arginase isoforms. *J Immunol* 2013; 191: 773-784
91. Pessanha AP, Martins RA, Mattos-Guaraldi AL et al. Arginase-1 expression in granulomas of tuberculosis patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; 66: 265-268
92. Munder M, Schneider H, Luckner C et al. Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood* 2006; 108: 1627-1634
93. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012; 122: 787-795
94. Kredel LI, Siegmund B. Adipose-tissue and intestinal inflammation - visceral obesity and creeping fat. *Front Immunol* 2014; 5: 462
95. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006; 12: 1365-1371
96. Sankaran S, George MD, Reay E et al. Rapid onset of intestinal epithelial barrier dysfunction in primary human immunodeficiency virus infection is driven by an imbalance between immune response and mucosal repair and regeneration. *J Virol* 2008; 82: 538-545
97. Epple HJ, Allers K, Troger H et al. Acute HIV infection induces mucosal infiltration with CD4+ and CD8+ T cells, epithelial apoptosis, and a mucosal barrier defect. *Gastroenterology* 2010; 139: 1289-1300
98. Munoz M, Eidenschenk C, Ota N et al. Interleukin-22 induces interleukin-18 expression from epithelial cells during intestinal infection. *Immunity* 2015; 42: 321-331
99. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R et al. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* 2009; 23: 781-783
100. Dethoff EA, Chugh J, Mustoe AM et al. Functional complexity and regulation through RNA dynamics. *Nature* 2012; 482: 322-330
101. Shabalina SA, Spiridonov NA, Kashina A. Sounds of silence: synonymous nucleotides as a key to biological regulation and complexity. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: 2073-2094
102. Sultan M, Schulz MH, Richard H et al. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science* 2008; 321: 956-960
103. Takagi H, Kanai T, Okazawa A et al. Contrasting action of IL-12 and IL-18 in the development of dextran sodium sulphate colitis in mice. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 837-844
104. Zaki MH, Boyd KL, Vogel P et al. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity* 2010; 32: 379-391
105. Chikano S, Sawada K, Shimoyama T et al. IL-18 and IL-12 induce intestinal inflammation and fatty liver in mice in an IFN-gamma dependent manner. *Gut* 2000; 47: 779-786
106. Varia MA, Calkins-Adams DP, Rinker LH et al. Pimonidazole: a novel hypoxia marker for complementary study of tumor hypoxia and cell proliferation in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1998; 71: 270-277
107. Schubert W. Topological proteomics, toponomics, MELK-technology. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2003; 83: 189-209

108. Schubert W, Gieseler A, Krusche A et al. Next-generation biomarkers based on 100-parameter functional super-resolution microscopy TIS. *N Biotechnol* 2012; 29: 599-610
109. Giesen C, Wang HA, Schapiro D et al. Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat Methods* 2014; 11: 417-422
110. Wang HA, Grolimund D, Giesen C et al. Fast chemical imaging at high spatial resolution by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem* 2013; 85: 10107-10116
111. van der Loos CM. Multiple immunoenzyme staining: methods and visualizations for the observation with spectral imaging. *J Histochem Cytochem* 2008; 56: 313-328
112. Ornberg RL, Woerner BM, Edwards DA. Analysis of stained objects in histological sections by spectral imaging and differential absorption. *J Histochem Cytochem* 1999; 47: 1307-1314
113. van der Loos CM, de Boer OJ, Mackaaij C et al. Accurate quantitation of Ki67-positive proliferating hepatocytes in rabbit liver by a multicolor immunohistochemical (IHC) approach analyzed with automated tissue and cell segmentation software. *J Histochem Cytochem* 2013; 61: 11-18
114. Stack EC, Wang C, Roman KA et al. Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: a review, with an assessment of Tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. *Methods* 2014; 70: 46-58
115. Henry Galetta JM, Byers Richard, Kenneth K. Oguejiofor. Validation of multiplex immunofluorescence for use in analysis of tumour infiltrating lymphocytes. *J Immunother Cancer* 2015; 3: 1
116. Powrie F, Leach MW, Mauze S et al. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* 1993; 5: 1461-1471
117. Leithauser F, Krajina T, Trobonjaca Z et al. Early events in the pathogenesis of a murine transfer colitis. *Pathobiology* 2002; 70: 156-163
118. Leithauser F, Meinhardt-Krajina T, Fink K et al. Foxp3-expressing CD103+ regulatory T cells accumulate in dendritic cell aggregates of the colonic mucosa in murine transfer colitis. *Am J Pathol* 2006; 168: 1898-1909
119. Leithauser F, Trobonjaca Z, Moller P et al. Clustering of colonic lamina propria CD4(+) T cells to subepithelial dendritic cell aggregates precedes the development of colitis in a murine adoptive transfer model. *Lab Invest* 2001; 81: 1339-1349
120. Niess JH, Leithauser F, Adler G et al. Commensal gut flora drives the expansion of proinflammatory CD4 T cells in the colonic lamina propria under normal and inflammatory conditions. *J Immunol* 2008; 180: 559-568
121. Trobonjaca Z, Leithauser F, Moller P et al. MHC-II-independent CD4+ T cells induce colitis in immunodeficient RAG-/- hosts. *J Immunol* 2001; 166: 3804-3812
122. Erben U, Pawlowski NN, Doerfel K et al. Targeting human CD2 by the monoclonal antibody CB.219 reduces intestinal inflammation in a humanized transfer colitis model. *Clin Immunol* 2015; 157: 16-25
123. Schildberg FA, Hegenbarth SI, Schumak B et al. Liver sinusoidal endothelial cells veto CD8 T cell activation by antigen-presenting dendritic cells. *Eur J Immunol* 2008; 38: 957-967
124. Schurich A, Berg M, Stabenow D et al. Dynamic regulation of CD8 T cell tolerance induction by liver sinusoidal endothelial cells. *J Immunol* 2010; 184: 4107-4114
125. Kruse N, Neumann K, Schrage A et al. Priming of CD4+ T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25low forkhead box protein 3- regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2009; 50: 1904-1913
126. Tay SS, Lu B, Siervo F et al. Differential migration of passenger leukocytes and rapid deletion of naive alloreactive CD8 T cells after mouse liver transplantation. *Liver Transpl* 2013; 19: 1224-1235

127. Uchiyama H, Kishihara K, Minagawa R et al. Crucial Fas-Fas ligand interaction in spontaneous acceptance of hepatic allografts in mice. *Immunology* 2002; 105: 450-457
128. Carambia A, Frenzel C, Bruns OT et al. Inhibition of inflammatory CD4 T cell activity by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* 2013; 58: 112-118
129. Seidel D, Eickmeier I, Kuhl AA et al. CD8 T cells primed in the gut-associated lymphoid tissue induce immune-mediated cholangitis in mice. *Hepatology* 2014; 59: 601-611
130. Bobrow MN, Litt GJ, Shaughnessy KJ et al. The use of catalyzed reporter deposition as a means of signal amplification in a variety of formats. *J Immunol Methods* 1992; 150: 145-149
131. Wang G, Achim CL, Hamilton RL et al. Tyramide signal amplification method in multiple-label immunofluorescence confocal microscopy. *Methods* 1999; 18: 459-464
132. Hamilton N. Quantification and its applications in fluorescent microscopy imaging. *Traffic* 2009; 10: 951-961
133. Stadler C, Rexhepaj E, Singan VR et al. Immunofluorescence and fluorescent-protein tagging show high correlation for protein localization in mammalian cells. *Nat Methods* 2013; 10: 315-323
134. Bardin N, Frances V, Lesaulle G et al. Identification of the S-Endo 1 endothelial-associated antigen. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 218: 210-216
135. Pickl WF, Majdic O, Fischer GF et al. MUC18/MCAM (CD146), an activation antigen of human T lymphocytes. *J Immunol* 1997; 158: 2107-2115
136. Shih IM. The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *J Pathol* 1999; 189: 4-11
137. Schrage A, Loddenkemper C, Erben U et al. Murine CD146 is widely expressed on endothelial cells and is recognized by the monoclonal antibody ME-9F1. *Histochem Cell Biol* 2008; 129: 441-451
138. Neumann K, Erben U, Kruse N et al. Chemokine Transfer by Liver Sinusoidal Endothelial Cells Contributes to the Recruitment of CD4+ T Cells into the Murine Liver. *PLoS One* 2015; 10: e0123867
139. van Dam EM, Ten Broeke T, Jansen K et al. Endocytosed transferrin receptors recycle via distinct dynamin and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem* 2002; 277: 48876-48883
140. Humphries WHt, Szymanski CJ, Payne CK. Endo-lysosomal vesicles positive for Rab7 and LAMP1 are terminal vesicles for the transport of dextran. *PLoS One* 2011; 6: e26626
141. Waters JC. Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy. *J Cell Biol* 2009; 185: 1135-1148
142. Bolte S, Cordelieres FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 2006; 224: 213-232
143. Benson DM, Bryan J, Plant AL et al. Digital imaging fluorescence microscopy: spatial heterogeneity of photobleaching rate constants in individual cells. *J Cell Biol* 1985; 100: 1309-1323
144. Song L, Hennink EJ, Young IT et al. Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* 1995; 68: 2588-2600
145. Dux R, Kindler-Rohrborn A, Lennartz K et al. Calibration of fluorescence intensities to quantify antibody binding surface determinants of cell subpopulations by flow cytometry. *Cytometry* 1991; 12: 422-428
146. Tanious FA, Veal JM, Buczak H et al. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 1992; 31: 3103-3112
147. Del Castillo P, Llorente AR, Stockert JC. Influence of fixation, exciting light and section thickness on the primary fluorescence of samples for microfluorometric analysis. *Basic Appl Histochem* 1989; 33: 251-257

148. Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev* 2005; 11: 227-256
149. Baschong W, Suetterlin R, Laeng RH. Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning microscopy (CLSM). *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 1565-1572
150. Coffman VC, Wu JQ. Counting protein molecules using quantitative fluorescence microscopy. *Trends Biochem Sci* 2012; 37: 499-506

Abkürzungen

AHR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Unterscheidungsgruppen)
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i> (konfokale Laserrastermikroskopie)
CU	Colitis ulcerosa
CXCL	CXC-Motiv-Ligand
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
CyTOF	<i>cytometry by time of flight</i> (Massenzytometrie)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LSEZ	Lebersinusoidendothelzellen
M	<i>Mycobacterium</i>
MC	Morbus Crohn
MELK	Multi-Epitop-Ligand-Kartographie
NOS	<i>nitric oxide synthase</i> (Stickoxid-Synthase)
OVA	Ovalbumin
RNS	Ribonukleinsäure
T	<i>Toxoplasma</i>
Th	T-Helfer
TNF	Tumornekrosefaktor

Danksagung

Ich danke besonders Frau Professor Dr. Britta Siegmund für das wissenschaftlich-forschende Klima an ihrer Klinik, in dem ich mich über die Jahre entwickeln und neue Schwerpunkte setzen konnte sowie für ihre konstruktive Begleitung meiner wissenschaftlichen Laufbahn.

Ausgesprochen dankbar bin ich Herrn Professor Dr. Christoph Loddenkemper, auf dessen Unterstützung ich mich all die Jahre immer verlassen konnte. Unsere Zusammenarbeit begann schon während meiner Doktorandenzeit, setzte sich über meine PostDoc-Zeit in seiner Arbeitsgruppe fort und besteht bis heute. Er hat nicht nur meine Begeisterung für die Histopathologie geweckt, sondern ist immer noch ein wertvoller Ansprechpartner, dessen Büro ich immer klüger verlasse als ich es betreten habe, in fachlicher wie menschlicher Hinsicht.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Arbeitsgruppe, die diese Arbeit erst ermöglicht hat. Die engagierte, zuverlässige, exzellente und unermüdliche Mitarbeit und Unterstützung von Frau Dr. Ulrike Erben, Frau Simone Spieckermann und Frau Constanze Cieluch hat wesentlich zum Erfolg der Projekte und Kooperationen beigetragen. Besonders dankbar bin ich für die vorherrschend gutgelaunte Arbeitsstimmung, die mich jeden Tag gerne zur Arbeit kommen lässt und mich stets motiviert und stärkt. Unverzichtbar sind für mich die Ideen, konstruktiven Diskussionen und Motivationen im „Chef-Meeting“. Frau Katja Dörfel war mir lange Jahre eine perfekte Kollegin und Mitarbeiterin. Mittlerweile ist ihr Arbeitgeber das Cold Spring Harbor Laboratory, aber mir bleibt die beste Freundin, der ich für ihre persönliche Unterstützung aus tiefstem Herzen danke.

Besonderer Dank gilt meinem Mentor Professor Dr. Hans-Dieter Volk für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft, konstruktiven Ratschläge und großartige Unterstützung in allen Belangen und Fragen zu Forschung und Wissenschaft. Herzlicher Dank gilt auch meinem Doktorvater Professor Dr. Jörg C. Hoffmann, der den Grundstein für diese Arbeit gelegt hat und Professor Milan Popovic, der mich früh gefördert und gefordert hat. Frau Dr. Ingar Abels und Frau Dr. Christine Kurmeyer danke ich für die Aufnahme ins Mentoring-Programm der Charité, das mich in meiner persönlichen und beruflichen Entwicklung voran gebracht hat. Der Kommission für Nachwuchsförderung der Charité danke ich für die Unterstützung zur Anfertigung dieser Arbeit durch das Rahel Hirsch-Stipendium.

Für den wissenschaftlichen Austausch, die erfolgreichen Kooperationen und das Feiern der Feste, wie sie fallen, danke ich allen Arbeitsgruppen und Kooperationspartnern innerhalb unserer Klinik und außerhalb, besonders den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Siegmund, Schneider/Moos, Heimesaat, Hartmann, Radbruch und Schott.

Meinen Eltern, Christa und Peter Molenda, werde ich immer dankbar sein, dass sie mich meinen Weg gehen ließen und versuchten, diesen zu ebnen. Ihre stete Unterstützung erfolgte nicht nur aktiv, sondern auch durch Rücksichtnahme und Zurückhaltung. Meine Schwester Heiki Knischewski versteht mich nicht nur an dieser Stelle ohne Worte.

Ich widme diese Arbeit meiner Familie, die in vielerlei Hinsicht zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Mein größter Dank gilt Bert, Lennart und Konstantin. Ich musste mich nie zwischen meiner Arbeit und euch entscheiden, und ihr habt mich immer rückhaltlos unterstützt und ertragen. Ich bin euch unsagbar dankbar für eure Geduld und euren Zuspruch. Euer schönstes Lob für mich ist euer Interesse an den Naturwissenschaften.

Erklärung

Gemäß § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

.....

Unterschrift