

Teil II:

Die Interaktion von murinen Langerhanszellen mit *Trypanosoma cruzi*

(Die im Text des zweiten Teils verwendeten Abkürzungen sind im Anhang erläutert.)

7.1 Das Immunsystem der Haut bei der Maus

Die Haut stellt gewissermaßen einen Außenposten des Immunsystems dar. Eine Vielzahl von Zellen spielen dort bei der Vermittlung und Amplifizierung von Immunreaktionen zusammen. Zu dem von Streilein (1983) als "hautassoziiertes Lymphoidgewebe" (skin-associated lymphoid tissue=SALT) bezeichneten speziellen Abwehrsystem gehören *Keratinocyten*, *Langerhanszellen* und *epidermotrope T-Lymphocyten*-Populationen, die unter physiologischen Bedingungen die Dermis und Epidermis durchstreifen und dort auch für gewisse Zeiträume ansässig werden können, weiter die die Haut drainierende Lymph- und Blutgefäße und die regionalen Lymphknoten. Unter den genannten Zellen kommt es ähnlich den Verhältnissen im darmassoziierten Lymphoidgewebe (gut-associated lymphoid tissue=GALT) zu einer zunächst lokalen, aber vollständigen Immunstimulation. Auf eine Noxe hin sind Keratinocyten in der Lage, eine große Menge an Zytokinen freizusetzen und somit eine Immunantwort auszulösen (Kupper 1990). Sie veranlassen die in der Epidermis situierten Langerhanszellen, sich aus dem Zellverband zu lösen, Antigen aufzunehmen, damit in den regionalen Lymphknoten zu wandern und dort geprägte und ruhende T-Zellen zu aktivieren. Aufgrund des Epidermotropismus bestimmter Lymphocyten wandern diese daraufhin in kürzester Zeit in die Hautpartie ein, in der die Noxe gesetzt wurde. Die Immunreaktion der Haut wird also durch eigene Zellelemente angestoßen, die fähig sind zur Antigenerkennung, -aufbereitung und -präsentation und die eng zusammenarbeiten mit den dazugehörigen Lymphknoten und epidermotropen Effektorzellen, die die Bekämpfung der Noxe im betroffenen Hautareal ausführen (Streilein 1983). Dieses spezielle Abwehrsystem wird ergänzt durch andere immunologisch relevante Zellen, die im gesamten Körper an Abwehr- und Entzündungsreaktionen beteiligt sind und bei Bedarf in die betreffenden Regionen einwandern (Haustein 1987, Stünzi & Weiss 1990):

- Als erste Zellen der unspezifischen Abwehr treten bei Gewebsverletzung oder dem Eindringen von Fremdorganismen oder -substanzen *polymorphkernige Granulozyten* auf. Diese Zellen befinden sich in Ruhezustand innerhalb der Blutgefäße, können aber auf chemotaktische Reize hin durch das Endothel hindurchtreten und zum Ort des Entzündungsgeschehens wandern, um dort Fremdpartikel oder Zelldetritus zu phagozytieren (Stünzi & Weiss 1990).

- Auch *Makrophagen* haben die Aufgabe, Fremdmaterial aufzunehmen und zu zerstören. Von ihnen gibt es in der Dermis sessile, morphologisch unterschiedliche Zelltypen, deren Anzahl sich auf ein Drittel der Langerhanszell-Zahl beläuft (Weber-Matthiesen & Sterry 1990). Nach einer Noxe wandern aus den Blutkapillaren weitere Makrophagen ein. Wie die Granulozyten können sie durch Komplementfragmente, Bakterienprodukte oder Adhäsion zur Phagozytose angeregt werden. Darüber hinaus sind sie jedoch in der Lage, Antigene zu prozessieren und vorüberwandernden Lymphozyten zu präsentieren. Weiter können Makrophagen durch IFN γ zu einem "oxidative burst" angeregt werden: Die Zellen bilden im aktivierten Zustand Sauerstoffradikale und werden dadurch um ein vielfaches effektiver in der Bekämpfung von Fremdorganismen. Diese Fähigkeiten der Makrophagen können die Immunreaktion um ein Vielfaches verstärken (Stünzi & Weiss 1990).
- *Keratinocyten* und *Endothelzellen* sind ebenfalls in begrenztem Maße zur Phagozytose und Lymphokinausschüttung befähigt (Wolff & Konrad 1972).
- Ortsansässige *Mastzellen* können eine große Zahl verschiedener Mediatoren freisetzen und damit Kapillarfunktion, Chemotaxis und T-Zell-Bewegung beeinflussen (Haustein 1987) .
- *Natürliche Killerzellen* wandern wahrscheinlich auch aus dem Blut in die Haut ein. Sie können phagozytieren und IFN γ freisetzen und spielen somit eine Rolle bei der frühen Makrophagenaktivierung (Gessner et al. 1994).
- Nach ihrem Phänotyp übernehmen bei der Maus die *dendritischen T-Zellen* der Haut, auch genannt Thy1⁺ oder V γ 3 DETC, die Rolle der Natürlichen Killerzellen. Diese Zellen scheinen eine Rolle in der Antigenerkennung und auch für das Haarwachstum zu spielen, ihre genaue Funktion ist bisher nicht bekannt (Romani et al.1985, Tigelaar & Lewis 1995).

7.2 Histologie und Funktion von Langerhanszellen: Ein kurzer Überblick

7.2.1 Herkunft und Histologie

Langerhanszellen entwickeln sich wie fast alle Immunzellen aus Vorläuferzellen im Knochenmark. Ihre Entwicklung zweigt schon früh von der anderer myeloischer Zellen ab (Inaba et al. 1992). Die größte Anzahl an LC befindet sich in der Epidermis. Sie liegen dort vor allem basal im Bereich der Lamina lucida und in den Haarfollikeln, bilden eine gleichmäßige Gitterstruktur mit ihren langen, verzweigten Dendriten und stellen so den peripheren Außenposten des dendritischen Zellsystems dar (Moll et al. 1996b). Eine "zweite Garde" an LC befindet sich in der Dermis. Die Zellen sind dort allerdings nicht so dicht angeordnet und unterscheiden sich durch fehlende "Birbeck-Granula" von denen der Epidermis (Lenz et al. 1993). Birbeck-Granula sind LC-spezifische, aber nur elektronenmikroskopisch erkennbare Zellorganellen, deren Funktion noch nicht bekannt ist. Die epidermalen LC sind regelmäßig, aber in ungleichmäßiger Dichte über die gesamte Körperoberfläche verteilt. Dabei gibt es deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Tierarten und sogar -rassen: Bei Bl/6 Mäusen finden sich auf dem Rücken 760 LC/cm², unter der Fußsohle 820 LC/cm², in der Ohrhaut 470 LC/cm² und am Schwanz nur 110 LC/cm²; bei Nacktmäusen liegen die Zahlen mit 1330 LC/cm² unter der Fußsohle, 960 LC/cm² in der Ohrhaut und 260 LC/cm² deutlich höher. (Bergstresser et al. 1980).

Neben Langerhanszellen gibt es in der Epidermis weitere Arten dendritischer Zellen, die histologisch von ihnen differenziert werden müssen:

- *Dendritische T-Zellen* haben einen gelappten Kern (s.o.). Ihre Verteilung entspricht in etwa der der LC, in der Dichte gibt es aber auch hier tierartige Unterschiede (Bergstresser et al. 1983, Romani et al. 1985).
- Auch die *Melanozyten*, die für die Pigmentierung der Haut sorgen, liegen basal in der Epidermis. Bei Maus und Hamster kommen sie nur in den Haarfollikeln vor (Bergstresser et al. 1980).
- *Merkel-Zellen* sind Mechanorezeptoren der Haut. Es sind kleine, von einem Nervenfasergeflecht umgebene Zellen mit einer der Dermis zugewandten Tastscheibe (Bucher & Warthenberg 1989b).

7.2.2 Funktion und Wandlung der Langerhanszellen

(hauptsächlich nach Steinman et al., Kämpgen et al., Neiß et al., Kimber et al. in: Moll 1995)

Langerhanszellen wandern auf bestimmte Zeichen hin aus der Epidermis ab. Wenn die Keratinozyten bei Irritation durch geringgradige Verletzungen oder durch Kontaktallergene das Gewebshormon TNF α freisetzen, lösen sich die Adhäsine auf der Oberfläche der LC. Die Zellen beginnen dann, aus ihrem Zellverband heraus in die tiefer in der Haut gelegene Dermis einzuwandern, und bilden in den beginnenden Lymphgefäßen der unteren Hautschichten deutlich erkennbare Zellstränge (Larsen et al. 1990). Über die Lymphbahnen gelangen sie schließlich in den regionalen Lymphknoten. Die Langerhanszellen durchlaufen auf diesem Weg ein komplexes Muster an Funktionen und Stadien, sie "reifen".

Innerhalb der ersten 12 Stunden ihrer Reise sind LC in der Lage, Antigene aufzunehmen. Lösliches Antigen wird durch Pinozytose aufgenommen, größere Fremdpartikel können phagozytiert werden. Interessant ist, daß sich Langerhanszellen dabei völlig anders verhalten als andere Freßzellen wie z.B. Makrophagen: Sie benötigen keine Anregung durch IFN γ oder entsprechende Gewebshormone, um Fremdpartikel aufnehmen zu können. LC phagozytieren sehr selektiv: Kohlepartikel oder artfremde Erythrozyten werden nicht aufgenommen, nachgewiesen ist aber die Phagozytose von *Saccaromyces cervisiae*, gram⁺-Bakterien wie *Corynebakterium parvum*, *Staphylococcus aureus* und Einzellern, z.B. Borrelien und Leishmanien. Sogar Latex-Partikel bis zu einer Größe von 6 μm wurden schon von Langerhanszellen aufgenommen und füllten den Zellkörper gut zur Hälfte aus! Diese Phagozytose dauert bedeutend länger als bei Makrophagen: Für die Aufnahme von Feststoffen benötigen LC viele Stunden, Makrophagen hingegen nur 10-15 min. In dieser Zeit nehmen die LC nur ein oder zwei Partikel oder Erreger auf, während Makrophagen so viel wie möglich aufnehmen. Die Funktion von Langerhanszellen kann also nicht darin liegen, Eindringlinge zahlenmäßig zu reduzieren (Reis e Sousa et al. 1993).

Während die Langerhanszellen weiter wandern, verändern sie ihre immunologische Funktion. Ausgelöst wird ihre Reifung von GM-CSF, einem weiteren Gewebshormon. Die Zellen verlieren die Fähigkeit zur Phagozytose und beginnen, das aufgenommene Antigen zu prozessieren – d.h. es aufzubereiten – und es dann auf ihrer Oberfläche mit MHC II-Molekülen zusammen zu exprimieren. Dieser Molekülkomplex kann von anderen Immunzellen "erkannt"

werden und induziert so die Bekämpfung des präsentierten Antigens. Auch werden neue Integrine gebildet, die es den Langerhanszellen ermöglichen, sich in den T-Zell-Arealen der regionalen Lymphknoten einzunisten, um dort eine heftige Immunantwort auszulösen. LC können in kürzester Zeit eine ungeheure Menge an MHC II produzieren und sind durch diese Fähigkeit sehr effektive T-Zell-Stimulatoren. Sie können nicht nur bereits geprägte T-Zellen stimulieren, sie können auch ruhende T-Zellen auf ein neues Antigen hin stimulieren. Da ihre MHC-Moleküle zudem sehr langsam umgebaut werden, dienen sie über mehrere Monate hinweg zusätzlich als Bewahrer immunologischer Information. Im Verlauf der Wanderung verändern die Langerhanszellen auch ihre äußere Form: Die zunächst dendritischen Zellen runden sich bei Verlassen der Epidermis ab, entwickeln aber bald darauf neue Ausläufer. In den Lymphbahnen erscheinen sie als "Schleierzellen" und im Lymphknoten wieder als Zellen mit langen Dendriten.

Ohne besonderen Reiz haben die Langerhanszellen der Haut eine geringe Turn-over-Rate, das gesamte LC-Netz der Haut wird innerhalb von ca. 7 Wochen einmal erneuert (Fossum 1989). Schon die Ex- oder Transplantation eines Hautstückes ohne Verletzung der Dermis beschleunigt die Abwanderung: Nach 24 Stunden haben viele LC die unteren Schichten der Dermis erreicht (Larsen et al. 1990). Auf einen gezielten Reiz hin, der zu der Ausschüttung von $\text{TNF}\alpha$ führt, kommt es bereits nach 16 Stunden zu einer maximalen Abwanderung aus der Epidermis. Schon nach 6 Stunden erscheinen die ersten LC im Lymphknoten, die meisten Zellen erreichen diesen aber erst nach 24-48 Stunden (van Wilsem et al. 1994). Die Auswanderung dauert insgesamt bis zu fast zwei Wochen an (Ortner et al. 1996). Ein Wiederauffüllen der Epidermis mit Langerhanszellen erfolgt über das Blut und beginnt bereits 24 Stunden nach einer epidermalen Verletzung. Dieser Vorgang kann durch ein Entzündungsgeschehen beschleunigt werden und erreicht einen Peak nach 72 Stunden (Lessard et al. 1968, Sato & Kamiya 1995).

In Kultur durchlaufen LC offenbar die gleichen Stadien wie in situ. Sie sind dabei allerdings auf die Anwesenheit der oben genannten Gewebshormone angewiesen: Erhalten sie kein $\text{TNF}\alpha$ oder GM-CSF, reifen die Zellen nicht oder sterben sehr bald (Witmer-Pack et al. 1987, Kämpgen et al. 1994).

7.3 Bedeutung von Langerhanszellen bei der Infektion mit Leishmanien

Bei einer Leishmaniasis kommt es bei den kutanen und muko-kutanen Formen immer, bei der viszeralen Form häufig zu einer Hautreaktion an der Eintrittspforte der Erreger. In diesem sogenannten "Leishmaniom" entwickeln sich massenhaft Parasiten, die nur bei der viszeralen Form disseminieren (Krauss et al. 1997). Makrophagen sind die wichtigsten Wirtszellen für Leishmanien. Ihre Interaktion mit NK-Zellen und verschiedenen T-Zell-Typen (Th1 und Th2) ist dafür ausschlaggebend, ob die immunologische Abwehr schon am Infektionsort erfolgreich verläuft oder nicht.

Langerhanszellen betätigen sich bei der Infektion mit Leishmanien als Initiatoren der zellvermittelten Immunantwort. Werden Leishmanien durch eine Injektion in das subkutane Gewebe verbracht, wandern die Langerhanszellen der darüberliegenden Epidermis in die Dermis ab und nehmen einzelne Parasiten auf. Die Phagozytose erfolgt über C3-Rezeptoren, die Parasiten werden intrazellulär von einer Vakuole umgeben. Jede Langerhanszelle nimmt dabei nur eine oder zwei Leishmanien auf (Blank et al. 1993). Die Funktion dieser Zellen liegt im Gegensatz zu der der Makrophagen nicht in einer Verringerung der Parasitenzahl: Eine Langerhanszelle wandert mit dem Parasiten in den regionalen Lymphknoten, reift dabei und prozessiert das Leishmanien-Antigen, um es für T-Zellen zu präsentieren. Erste LC erscheinen schon nach 24-48 Stunden im Lymphknoten (Moll et al. 1993 und 1996). Nur einige wenige parasitenbeladene Langerhanszellen reichen aus, um eine beachtliche Anzahl von naiven Immunzellen zu stimulieren und damit die spezifische Immunreaktion auszulösen. Sie sind dabei wesentlich effektiver als andere dendritische Zellen (Will et al. 1992).

Neben der Immunstimulation im Lymphknoten verbleiben einige Langerhanszellen mit phagozytierten Parasiten in der Dermis, prozessieren die Antigene an Ort und Stelle und können so infiltrierende T-Zellen stimulieren (Moll 1993). Um die Immunstimulation durch Antigen-Präsentation für einen längeren Zeitraum aufrecht zu erhalten, können die Langerhanszellen Parasiten in ihren Vakuolen am Leben erhalten, hemmen aber gleichzeitig deren Vermehrung. Möglicherweise erlaubt das Milieu innerhalb der "Speichervakuolen" den Parasiten keine Replikation, denn Langerhanszellen besitzen weder NO noch Sauerstoffradikale, um die Vermehrung der Parasiten zu verhindern. Ob sie diese Stoffe aus ihrer Umgebung – z.B. von Makrophagen gebildet – aufnehmen, ist nicht bekannt (Moll et al. 1996b). Leishmania-Antigene können so noch lange immer wieder prozessiert werden. Zudem werden die experi-

mierten MHC II-Antigen-Komplexe nur sehr langsam wieder abgebaut: Mit Parasitenantigen beladene Zellen konnten sogar bis zu neun Monaten p. inf. nachgewiesen werden (Moll 1995). LC scheinen also einen Teil des "immunologischen Gedächtnisses" darzustellen und sorgen somit für eine belastbare Immunität gegen Reinfektionen mit Leishmania. Bei immunsupprimierten Individuen stellen persistierende Erreger allerdings eine große Gefahr dar, es kann durch sie zu einem erneuten Aufflammen der Erkrankung kommen (Aebischer 1994).

7.4 Zelluläre Reaktionen an der Eintrittspforte von Trypanosoma cruzi

Bei der Infektion mit *Trypanosoma cruzi* kommt es nicht regelmäßig zu einem krankheitstypischen Symptom an der Eintrittspforte. Das sogenannte Chagom tritt hauptsächlich bei dafür prädestinierten Wirtsspezies auf, und auch dort erscheint es nur unregelmäßig (s. Kap. 2.1.2). Die Hautreaktion tritt zumeist direkt am Eintrittsort der Trypanosomen auf, sie kann aber auch in einiger Entfernung davon entstehen (Hofflin & Urdaneta-Morales 1987). Nach ca. 8-10 Tagen entwickelt sich eine entzündliche, aber schmerzlose Schwellung, die über Wochen persistieren kann und sich dann spontan zurückbildet. Dieses Symptom ist nicht gleichzusetzen mit einer verzögerten Allergiereaktion, wie sie auf den Wanzenstich folgt (Lumbreras 1959). Bei der histologischen Untersuchung wurden das Chagom bei Tieren als Granulom mit vielen darin enthaltenen Erregern beschrieben (Marsden 1968, Texeira 1983, Bonencini-Almeida 1990). Eine gezielte Untersuchung dieses Phänomens erwies sich aber als nur schwer möglich, da durch die Lymphdrainage der Haut die Erreger normalerweise sehr schnell abgeschwemmt werden. Nur bei Injektion von Flagellaten in den immunologisch besonderen Bereich der Hamsterbackentasche, der nicht lymphatisch versorgt wird, ließen sich die inokulierten Parasiten regelmäßig bis zu 14 Tagen an der Eintrittspforte beobachten. Aus diesem Areal erfolgt die Verbreitung der Erreger nur über das Blut, wodurch es zu einer wesentlich geringeren Disseminierung kommt als bei einer vergleichbaren Infektion der Fußsohle (Bijovsky et al. 1984).

Verschiedene histologische Untersuchungen der zellulären Abläufe an der Eintrittspforte von *Trypanosoma cruzi* und den Verbleib der Parasiten sind bereits vorgenommen worden. Dabei wurden die Flagellaten intradermal oder subkutan in die Sohlen von Mäusepfoten injiziert. Als erste Zellen der unspezifischen Abwehr reagieren polymorphkernige neutrophile Granulozyten. Sie treten schon nach einer Stunde am Infektionsort auf, erreichen ihre höchste Anzahl

nach 24 Stunden und sind bis zu einem Zeitraum von 4 Tagen anzutreffen. Nach 24 Stunden tauchen die ersten mononukleären Zellen auf. Der Höhepunkt ihres Auftretens liegt bei 15 Tagen, sie sind bis zu 30 Tage lang nachweisbar (Monteón et al. 1996).

Nach 6 Stunden befinden sich die meisten Trypanosomen noch extrazellulär. Einige von ihnen bleiben sogar bis zu 4 Tagen extrazellulär und werden bis zu diesem Zeitpunkt offensichtlich nicht zerstört. Sie scheinen sich sogar zunächst im Zellebris vermehren zu können (Abrahamsohn 1987, Bijovsky & Milder 1988). Bei den meisten Untersuchungen fand man den größeren Teil der Flagellaten jedoch nach ca. 8 Stunden nur noch innerhalb von Zellen (Abrahamsohn 1987). Schon ab 8-24 Stunden sind in neutrophilen Granulozyten Trypanosomen zu finden, die sich in diesen Zellen vermehren (Abrahamsohn 1987, Bijovsky & Milder 1988). Ab 3-7 Tagen sind erste Nester von Amastigoten in Makrophagen zu finden, ihre Zahl steigt zunächst und sinkt nach einigen Tagen wieder ab. Es findet eine Verschiebung des Zellbefalls hin zu Muskelfasern und anderen angrenzenden Gewebszellen statt. Mit dem Auftreten von Plasmazellen und somit dem Einsetzen der spezifischen Immunantwort nach drei bis vier Wochen nimmt die Zahl der intrazellulären Trypanosomen rapide ab (Vollerthun et al. 1980, Bijovsky & Milder 1988).

Obwohl die Lymphbahnen der Hauptabflußweg der Flagellaten vom Inokulationsort in der Haut zu sein scheinen, erscheinen dennoch kaum Trypanosomen im regionalen Lymphknoten (Deutschländer et al. 1978, Monteón et al. 1996).