

9 ERGEBNISSE VON TEIL II UND DEREN BESPRECHUNG

9.1 Langerhanszellen in uninfizierten und infizierten "Epidermal Sheets"

Bei Färbung eines unbehandelten Epidermal Sheets mit dem Antikörper I-a^d zeigte sich über die ganze Fläche des Ohres ein gleichmäßiges Netz aus stark verzweigten, regelmäßig gefärbten Langerhanszellen, in dem nur vereinzelt heller leuchtende Zellen auffielen (Abb. 79 und 80). Betrachtete man ein entsprechend gefärbtes Ohr 24 Stunden nach "trockenen" Nadelstichen bzw. nach der Infektion mit *T. cruzi*, war fast keine Veränderung im Zellbild feststellbar. Nach 48 Stunden zeigten sich lokale Veränderungen im Zellbild deutlicher: Direkt an den Rändern der Einstichlöcher waren die Langerhanszellen offenbar stark angeregt, sie leuchteten kräftiger und schienen ein größeres Zellvolumen zu haben. Ihre Anzahl war jedoch nicht auffallend reduziert (Abb. 81 und 82).

Auf der Fläche des gesamten Ohres waren ebenso wie beim unbehandelten Ohr einzelne angeregte Zellen verteilt, ihre Anzahl war nicht gestiegen. Bereiche, an denen die Langerhanszellen durch Abwanderung fast ganz fehlten, gab es weder in der Nähe der Einstiche noch entlang der mutmaßlichen Stichkanäle, die durch die Einstichlöcher und eindeutige Stichführung bei der Infektion gut nachzuvollziehen waren. Diese "Löcher" im Zellbild traten bei der Infektion mit Leishmanien nach 48 Stunden p. inf. und bei Infektion mit Schistosomen schon nach 12-24 Stunden p. inf. auf (Blank et al. 1992, Sato & Kamiya 1995). In den vorliegenden Versuchen erschien der Zellschleier an einigen Stellen zwar etwas "löchrig", diese Bereiche entstanden jedoch durch den Sitz der (mit der Dermis entfernten) Haarbälge in der Haut und konnten an jeder beliebigen Stelle des Ohres auftreten. Verbliebene Haarbälge imponierten in anderen Bereichen der Präparate im gleichen Muster als blaß grünlich schimmernde Gebilde (Abb. 83 und 84).

Eine Abwanderung von Langerhanszellen, die durch die Infektion mit *Trypanosoma cruzi* angeregt würde, schien also nicht stattzufinden. Auffallend in den Präparaten waren nur die Ränder der Einstiche, an denen die Zellen auf die Verletzung zu reagierten – unabhängig von einer Infektion (Lessard et al. 1968).

Neben den durch die Haarbälge ungefärbten oder überfärbten Bereichen kam es in einigen Fällen zu färbetechnischen Unregelmäßigkeiten im Zellbild. Bei der Fixierung und Umlagerung der Präparate auf den Objektträger konnten Wellen und winzigen Falten entstehen, die von der Färbelösung nicht gleichmäßig benetzt wurden und demzufolge stärker oder zu schwach angefärbt wurden. Die leichten Wellen im Präparat machten es leider auch unmöglich, größere Bereiche scharf abzufotografieren. Solche Probleme wären bei der modifizierten Färbung nach Wachstein und Meisel (Wolff & Winkelmann 1967, Mackenzie & Squier 1974, Juhlin & Shelley 1977) möglicherweise in geringerem Maße aufgetreten, da sie zu optisch schärferen Kontrasten führt. Dabei wird ATP als Substrat von den Membran-ATPasen der Langerhanszellen im Epidermal Sheet gespalten und die freiwerdenden Phosphate mit Blei zur Reaktion gebracht. Diese Verbindung wird schließlich mit Ammoniumsulfid ausgefällt. Es resultiert eine kräftige Schwarzfärbung der Langerhanszellen mit all ihren Dendriten, die sich deutlich gegen den ungefärbten Hintergrund abheben. Leider konnte in der vorliegenden Untersuchung mit dieser Standardmethode trotz vieler Variationen kein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt und es mußte daher auf Antikörperfärbung ausgewichen werden.

9.2 Befall von in-vitro-infizierten Langerhanszellen mit Trypanosoma cruzi

Die durch Trypsinisierung der Rückenhaut hergestellte Einzelzellsuspension enthielt 1,4% Langerhanszellen bei einer Gesamt-Viabilität von 60%. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnte in keiner der Proben ein Befall von Zellen durch die Parasiten festgestellt werden, weder nach Inkubation mit Trypanosomen des Stammes Chile 5 noch mit Flagellaten des Tulahuén-Stammes. Die Parasiten hätten sich als kleine gelbliche Punkte in direkter Nähe zu den Zellkernen einiger Langerhans- oder anderer Zellen zeigen müssen (Blank et al. 1993). In einigen wenigen Fällen waren innerhalb einer Zelle zwar neben dem Kern weitere helle Einschlüsse sichtbar, bei all diesen Zellen schien es sich jedoch um abgesprengte Kernfragmente zu handeln: In diesen Fällen leuchtete der "Kern", bzw. das größte noch bestehende Fragment innerhalb der Zelle genauso wie die mutmaßlichen Absprengsel gleichmäßig gelbgrünlich, ohne erkennbare Strukturierung. In den meisten dieser Fälle zeigte die Zelle auch im Phasenkontrast eine unregelmäßige Oberfläche und schien nicht mehr intakt. Bei gesunden Zellen erschien der Zellkern meist etwas weniger hell, dafür scharf begrenzt, am Rand etwas heller und in sich leicht strukturiert. Das Zytoplasma fluoreszierte bei vielen der größeren Zellen auch ganz leicht grünlich, so daß die Zellkörper auch im Fluoreszenzbild gerade eben

zu erkennen waren. Intakte Langerhanszellen hatten bei Acridinorange-Färbung einen insgesamt recht blassen, leicht bohnenförmigen Kern und zeigte im Phasenkontrast ihre typische "haarige" Silhouette. In solchen Zellen konnten nie leuchtende Einschlüsse im Zytoplasma festgestellt werden, es ließen sich also keine intrazellulären Parasiten nach In-vitro-Inkubation der Zellen mit *T. cruzi* nachweisen. (Abb. 85-88).

Langerhanszell-spezifischer Antikörper für aus der Epidermis isolierten LC sind z.B. die Antikörper I-a^d oder F4/80, da diese Zellen als einzige in der Epidermis MHC II-Moleküle exprimieren. Eine Doppelfärbung mit Acridinorange und einem Antikörper war aber nicht möglich, da die für den Antikörper günstige Fixierung mit Aceton das Acridinorange beeinträchtigt, während nach der Fixierung mit Formalin die Antikörper nicht mehr in ausreichendem Maße binden.

9.3 Befall von in-vivo-infizierten Langerhanszellen mit Trypanosoma cruzi

Für diesen Versuch wurden Ohren verwendet, die 15-18 Stunden vor Kulturbeginn in situ mit je einem der beiden verfügbaren *T. cruzi*-Stämme infiziert worden waren. Unbehandelte Ohren dienten als Kontrolle.

Viabilität und Ausbeute an Langerhanszellen lagen bei den Auswanderungsversuchen am ersten Tag nur wenig unter den von Ortner et al. (1996) angegebenen Werten (s. Kap. 8.4.1). Die Viabilität ließ an den darauffolgenden Tagen allerdings stark nach, so daß für die Auswertung des Versuches hauptsächlich Zellen verwendet wurden, die in den ersten 24 Stunden nach Beginn der Kultivierung ausgewandert waren. Auffallend war, daß sehr viele Zellen zwar im Trypanblau-Ausschluß-Test viabel erschienen, aber bei Färbung mit Acridinorange und auch nach der Häma-Diff-Färbung deutlich fragmentierte Kerne und somit Degenerationserscheinungen zeigten (60-90% aller Zellen) (Abb. 89-91). Ein großer Prozentsatz an Langerhanszellen wurde relativ kurz nach der Auswanderung immer apoptotisch ($20 \pm 5\%$ nach 12 Stunden, $60 \pm 8\%$ nach 24 Stunden Kultivierung). Dieser Prozentsatz konnte durch Hinzufügen von GM-CSF um zwei Drittel reduziert werden (Kämpgen et al. 1994). Der Anteil degenerierter Zellen variierte während der vorliegenden Untersuchung von Versuch zu Versuch unabhängig von der verwendeten Medium-Charge oder dem gelegentlichen Auftreten

von Pilzen in der Kultur. Dies war vermutlich auf die schlechte Haltbarkeit des verwendeten GM-CSF zurückzuführen: Die Substanz, die nur in Form eines Kulturüberstandes verfügbar war, schien durch Einfrieren und Auftauen deutlich an Wirksamkeit zu verlieren.

Da bei der vielfachen Kernfragmentation nach Acridinorange-Färbung in zu vielen Zellen gleich mehrere leuchtende Punkte vorlagen, war es unmöglich, auf diese Weise eventuell eingeschlossene Parasiten zu entdecken. Erschwerend kam hinzu, daß amastigote Trypanosomen – also die intrazellulär zu erwartenden Parasitenstadien – nach Acridinorange-Färbung sehr viel schneller verblaßten als Epi- und Trypomastigote. (Die Ursache dieses Phänomens konnte nicht gefunden werden). Auch eine Färbung mit dem von Vickerman (1977) empfohlenen Fluoreszenzfarbstoff DAPI hatte keinen befriedigenden Erfolg. Der Farbstoff bindet je nach Anteil an den verschiedenen Basen in unterschiedlichem Maße an die DNA und bringt bei Trypanosomen den Kinetoplasten dadurch besonders hell zum Leuchten. Durch die eindeutige Form dieser Zellorganelle wären die Parasiten eindeutig zu identifizieren und leicht gegen fragmentierte Kerne abzugrenzen gewesen, da DAPI anders als Acridinorange und FITC mit UV-Licht angeregt werden muß und ein Emissionsmaximum bei 450 nm Wellenlänge hat, somit hellblau fluoresziert. Bei Vorversuchen zeigte sich jedoch, daß bei keiner Konzentration und keiner Färbedauer die Färbung aller Trypanosomen erreicht werden konnte. Das beste Ergebnis ergab sich bei einer Konzentration von 10 µg DAPI in PBSG und einer Inkubationszeit von 2 Stunden. Doch auch diese Kombination erbrachte bei fixierten oder auch nur luftgetrockneten Trypanosomen nur eine Färberate von ca. 20-30 % der Flagellaten. Da in den Zellpräparaten nur eine sehr geringe Zahl intrazellulär aufgenommener Parasiten zu erwarten war, erschien diese Färbung ungeeignet. Eine Lösung hierfür hätte nur eine Antikörper-Doppelfärbung mit je einem Antikörper gegen Langerhanszellen und einem gegen *Trypanosoma cruzi* gebracht. Ein Antikörper gegen den Parasiten war jedoch nicht verfügbar.

Die Färbung der ins Medium ausgewanderten Zellen mit einem gegen neutrophile Granulozyten gerichteten Antikörper zeigte, daß keine der polymorphkernig erscheinenden Zellen Granulozyten waren, die nach Verletzung des Ohres durch mind. 50 Nadelstiche mit Sicherheit massiv in das zerstörte Gewebe eingewandert waren.

Um zumindest in irgendwelchen Zellen intrazelluläre Erreger auffinden zu können, wurden Zellzentrifugationspräparate mit einer Übersichtsfärbung – Häma-Diff – behandelt. Neben vielen apoptotischen Zellen fanden sich hier Zellen, die nach ihrem Aussehen und Umriß als

Langerhanszellen bzw. dendritische T-Zellen, Makrophagen oder kleine Lymphozyten zugeordnet werden können (Abb. 92 und 93). In diesen Präparaten konnten nun tatsächlich einige wenige intrazelluläre Parasiten in Zytoplasma meist relativ großer Zellen entdeckt werden. Identifiziert wurden sie anhand der Doppelstruktur von Kinetoplast und Kern, die in vielen Fällen nur durch Fokussierung zu erkennen war. Die Anzahl solcher Parasiten war aber sehr gering: Pro Präparat fanden sich 1-5 vereinzelte intrazelluläre Parasiten in einer Gesamtmenge von mehreren tausend Zellen, darüber hinaus einzelne Parasitennester. Die einzelnen Parasiten schienen sich häufig in einer Vakuole zu befinden, während von den Amastigoten in den Nestern nur die Kerne und dunkleren Kinetoplasten im Zellplasma erkennbar waren. Die Zahl der Einschlüsse war nach Infektion mit dem Stamm Tulahuén etwas höher als bei Infektion mit dem Stamm Chile 5, in beiden Fällen kamen aber auch Präparate ganz ohne Einschlüsse vor. Wurde das infizierte Mausohr früher als 12 Stunden p. inf. kultiviert, fanden sich nie intrazelluläre Parasiten. In dieser Zeit könnten also sowohl Zellen die Parasiten aufgenommen haben, als auch die Parasiten in dieser Zeit aktiv in die Zellen eingedrungen sein (nach 8 Stunden befinden sich fast alle Parasiten intrazellulär, Abrahamsohn 1987) (Abb. 94-99).

In der Peroxidase-Färbung zeigte sich, daß einzelne Parasiten, aber auch Parasitennester sowohl in Langerhanszellen als auch in nicht-Langerhanszellen zu finden waren. Dabei schienen ca. 1 Tag nach Infektion (d.h. 15 Stunden in situ, 12 Stunden Auswanderung) noch viele Parasiten mit Flagellum in den Zellen zu liegen (Abb. 100 und 101). Ein solches Bild könnte auch als Artefakt entstehen, wenn die Trypanosomen nur an die Zelle angeheftet waren und durch den Zytospin genau auf ihr zu liegen kamen. Dies ist bei einem Auswanderungsversuch aber unwahrscheinlich, bei dem das Mausohr erst 15 Stunden nach der Infektion abgenommen wurde: Freie Parasiten innerhalb des Ohres müßten durch den Lymphabfluß abgeschwemmt, Parasiten außerhalb des Ohres vertrocknet oder durch Alkohol abgetötet sein. Nur wenn sich zwischen den Ohrhälften bei der Infektion doch ein kleines Depot gebildet hätte, könnten nach Trennung der Ohrhälften freie Parasiten in das Medium abschwimmen und sich von dort aus an Zellen anheften oder sie befallen. Ganz ausgeschlossen ist diese Möglichkeit nicht.

Noch am zweiten Auswanderungstag lagen neben einigen intrazellulären Parasitennestern auch noch einzelne Amastigote in verschiedenen Zelltypen vor (Abb. 102 und 103).

Abb.79

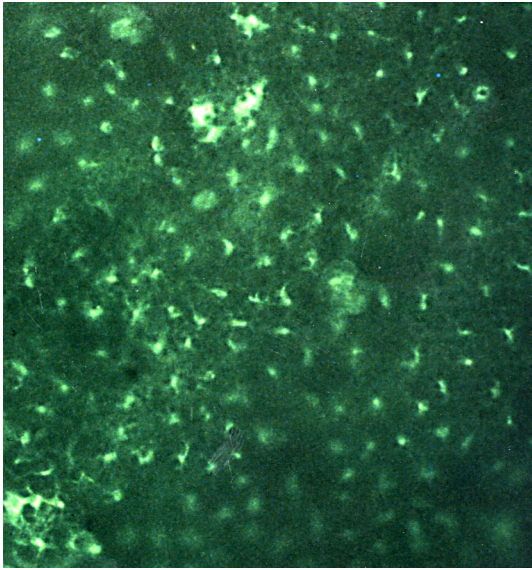


Abb. 80

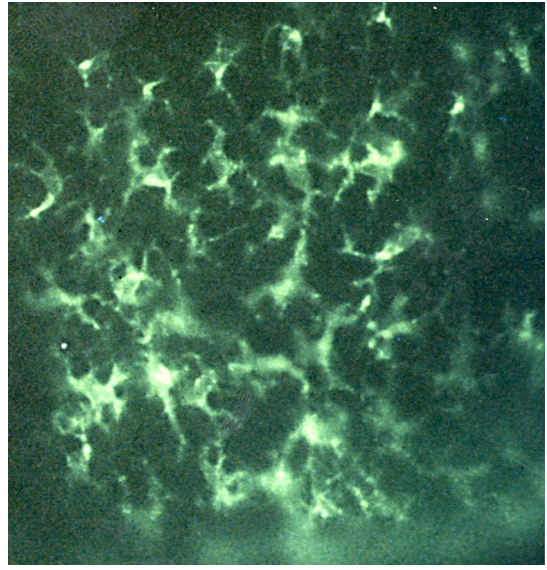


Abb. 81

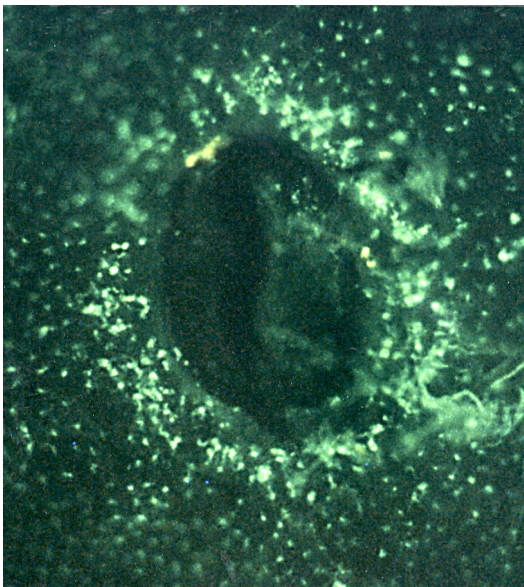


Abb. 82

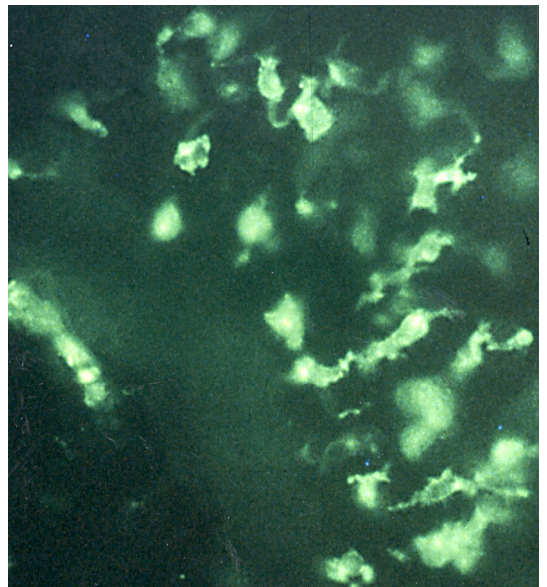


Abb. 79-82: Langerhanszellen der unverletzten Haut eines Mausohres lagen wie ein gleichmäßiges, feines Gitter in der Epidermis. Vereinzelt stärker angefarbte Zellen waren in unregelmäßigen Abständen in dem Netz verteilt (Abb. 79, Vergr. 200×). Alle Zellen hatten nur unauffällige Zellkörper und lange Dendriten (Abb. 80, Vergr. 400×). Nach erfolgtem Einstich mit einer Kanüle waren die Zellen am Rande des Einstichloches stark angeregt (d.h. sie prägten mehr MHC II-Moleküle aus und waren dadurch stärker gefärbt, Abb. 81, Vergr. 200×) und rundeten sich ab, ihr Zellkörper erschien deutlich dicker (Abb. 82, Vergr. 400×). Diese Vorgänge waren unabhängig von einer Infektion mit *T. cruzi* nur direkt am Rand der Einstichlöcher zu finden. (Färbung mit dem gegen MHC II-Proteine gerichteten Antikörper I-a^d).

Abb. 83

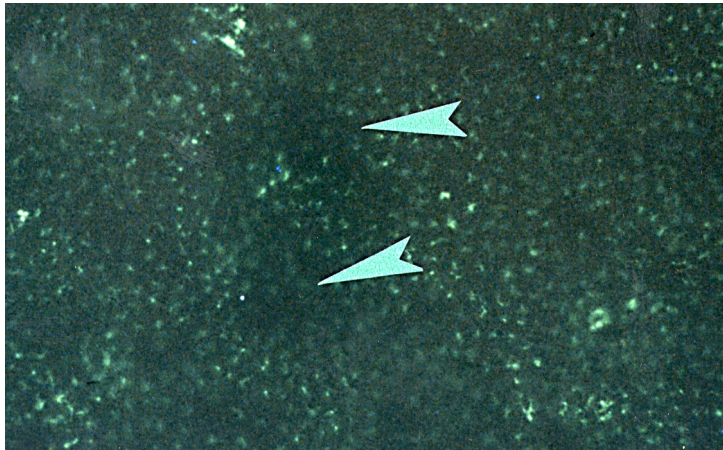


Abb. 84

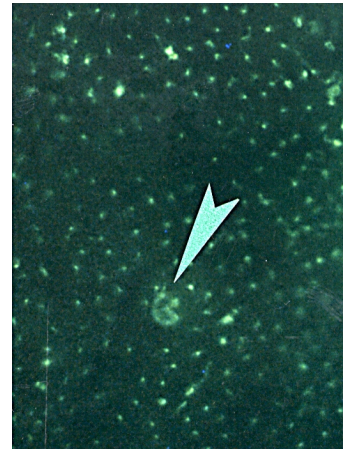


Abb. 83 und 84: Unabhängig von einer Infektion mit *T. cruzi* sah das aus Langerhanszellen gebildete Netz etwas „löchrig“ aus. Dieses Bild ergab sich durch die Haarfollikel, die beim Ablösen der Epidermis vollständig in der Dermis verblieben (wodurch in der Epidermis „Löcher“ entstanden (Pfeile in Abb. 83), oder sich teilweise mit der Epidermis abhoben und sich nach der Färbung als grünlich schimmernde Gebilde darstellten (Pfeil in Abb. 84). (Färbung mit I-a^d, Vergr. 200×).

Abb. 85

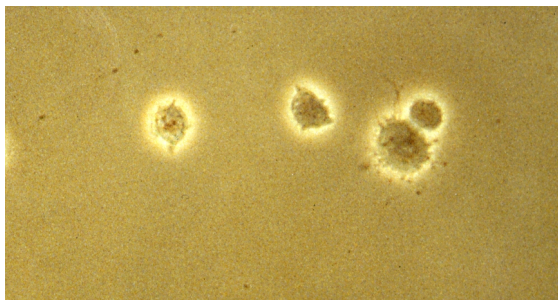


Abb. 86

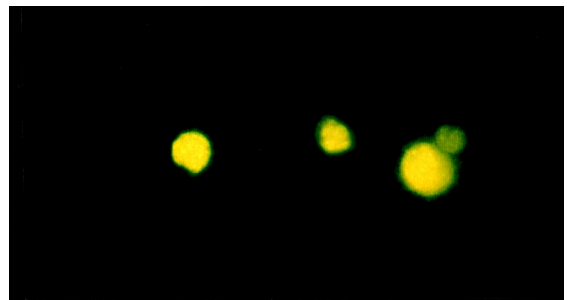


Abb. 87



Abb. 88

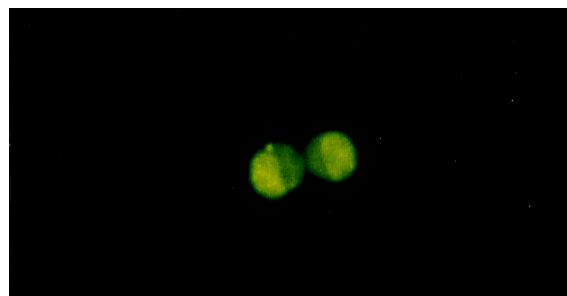


Abb. 85-88: Im Phasenkontrast ließen sich Langerhanszellen an ihren Dendriten bzw. einem stark ausgefranzten Umriß erkennen (Abb. 85 und 87, Vergr. 600×). Nach Färbung mit Acridinorange und unter Fluoreszenzmikroskopie war bei intakten Zellen ein bohnenförmiger Kern sichtbar (Abb. 86 und 88, Vergr. 600×).

Abb. 89

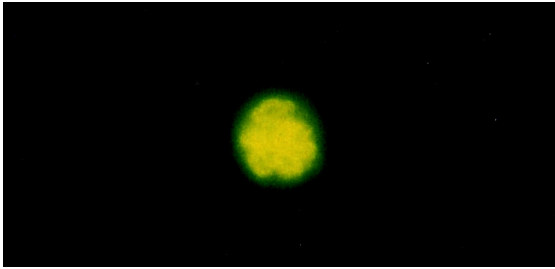


Abb. 91

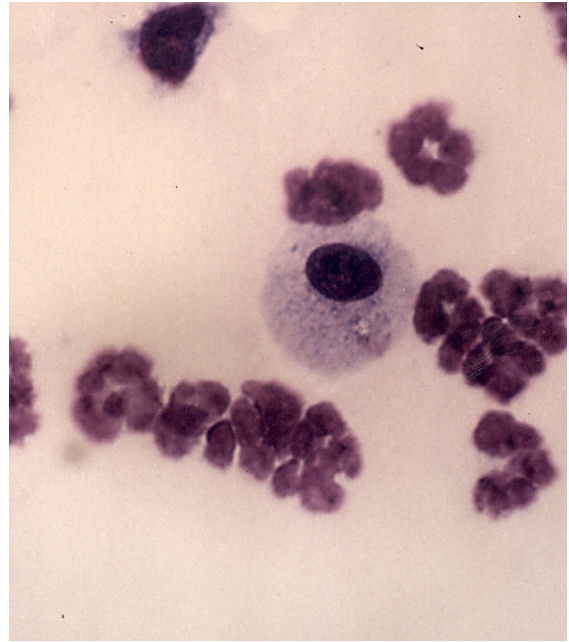


Abb. 90

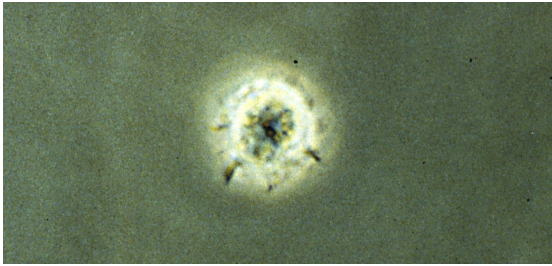


Abb. 89-91: Da Langerhanszellen in Kultur schnell apoptotisch werden können (Kämpgen 1994), waren sowohl nach Färbung mit Acridinorange (Abb. 89, Vergr. 600 \times) als auch nach H&E-Färbung (Abb. 91, Vergr. 1500 \times) bei vielen Langerhanszellen fragmentierte Kerne zu erkennen. Dadurch wurde das Auffinden von intrazellulären Parasiten mit Acridinorange unmöglich. Abb. 90 zeigt die Zelle aus Abb. 89 im Phasenkontrast.

Abb. 92

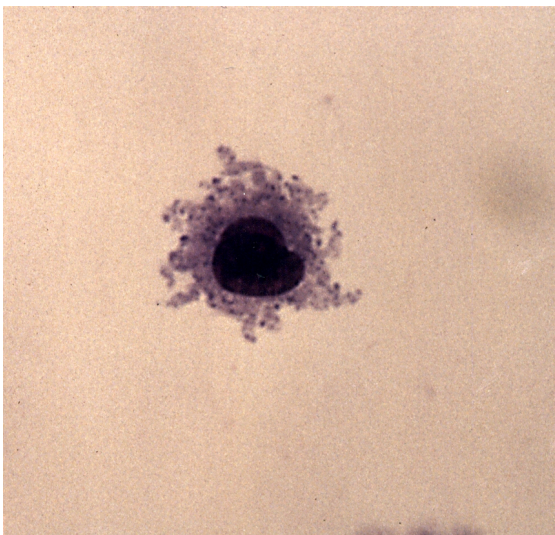


Abb. 93

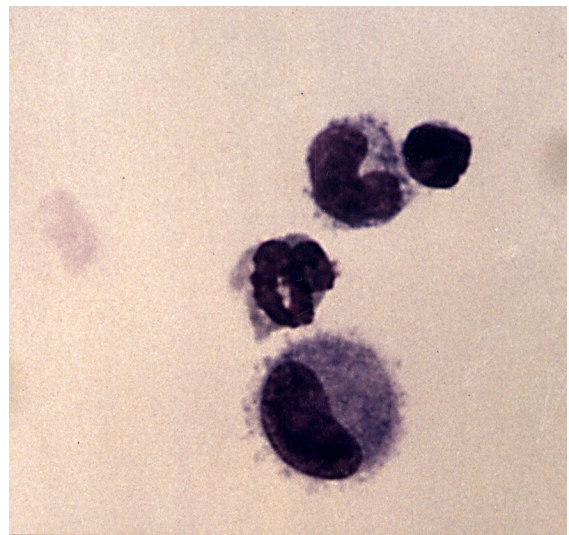


Abb. 92 und 93 zeigen verschiedene dendritisch erscheinende Zellen in H&E-Färbung, die ohne weitere Antikörperfärbung nicht eindeutig als Makrophagen oder Langerhanszellen zuzuordnen sind (Vergr. 1500 \times).

Abb. 94

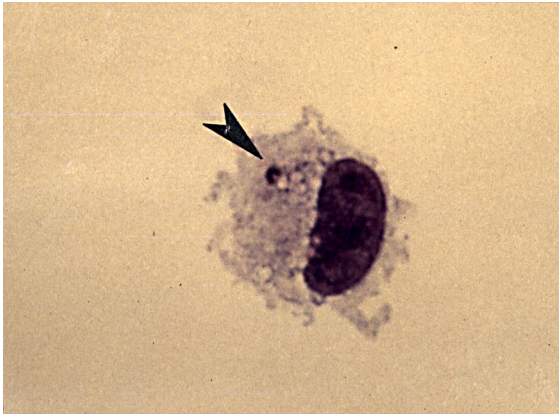


Abb. 95

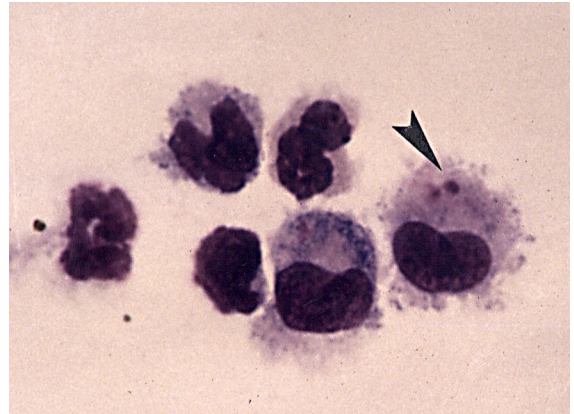


Abb. 96

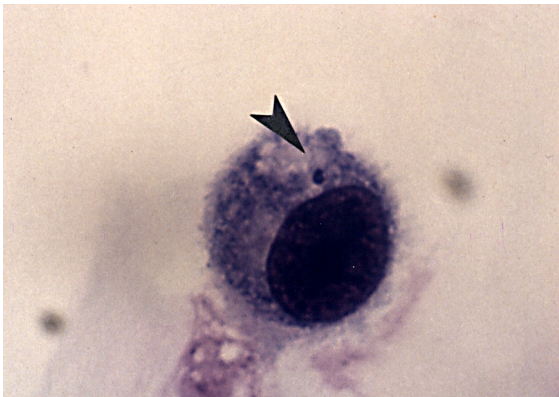


Abb. 97

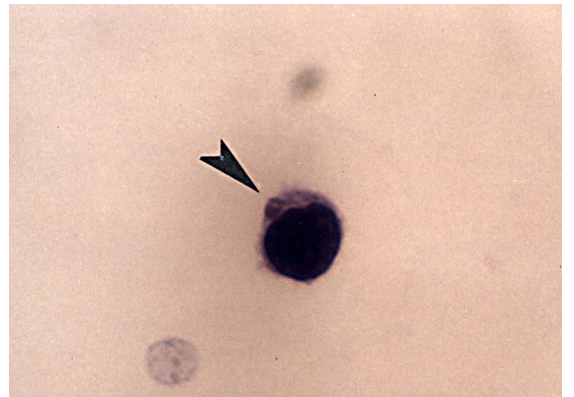


Abb. 98

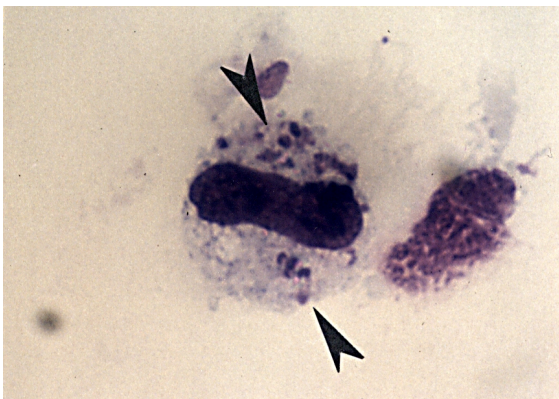


Abb. 99

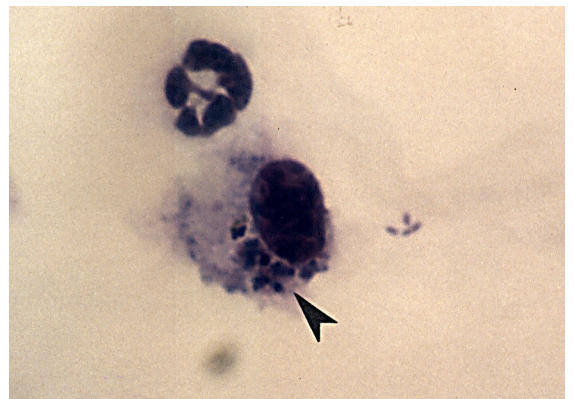


Abb. 94-99 zeigen verschiedene Zellen in Häma-Diff-Färbung, die nach In-vivo-Infektion der Haut mit *T. cruzi* mit intrazellulären Parasiten (Pfeile) in das Kulturmedium wanderten. Auch hier ließen sich die Zellen nach Größe und Erscheinungsbild nur grob als Makrophage oder Langerhanszelle (Abb. 94/95), Makrophage (Abb. 96 und 98/99) oder kleiner Lymphozyt (Abb. 97) einordnen. Während vier der abgebildeten Zellen nur je einen Einschuß aufwiesen, waren in den Zellen in Abb. 98 und 99 viele Amastigote zu finden. Diese Zellen sahen beide nicht mehr vollständig intakt aus, sie begannen zu zerfallen (Vergr. 1500×).

Abb. 100

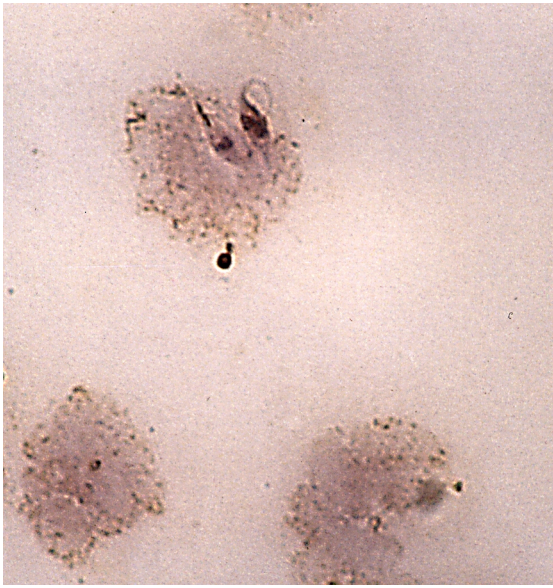


Abb. 101

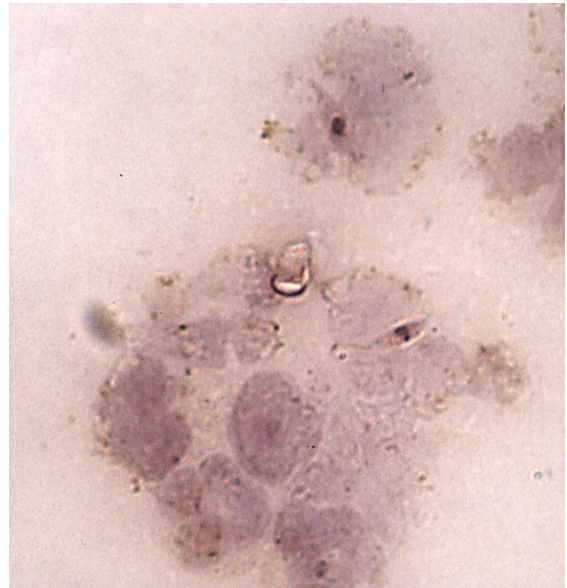


Abb. 100 und 101: In einigen Präparaten lagen ca. 1 Tag p. inf. (d.h. ca. 12 Stunden nach Auswanderung der Zellen ins Medium) noch viele Parasiten mit Flagellum in den Zellen (Färbung mit Mayers Hämalau, Vergr. 1500×).

Abb. 102

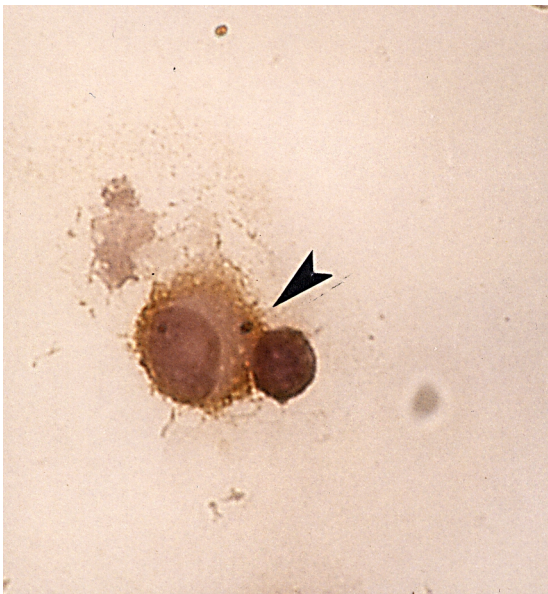


Abb. 103

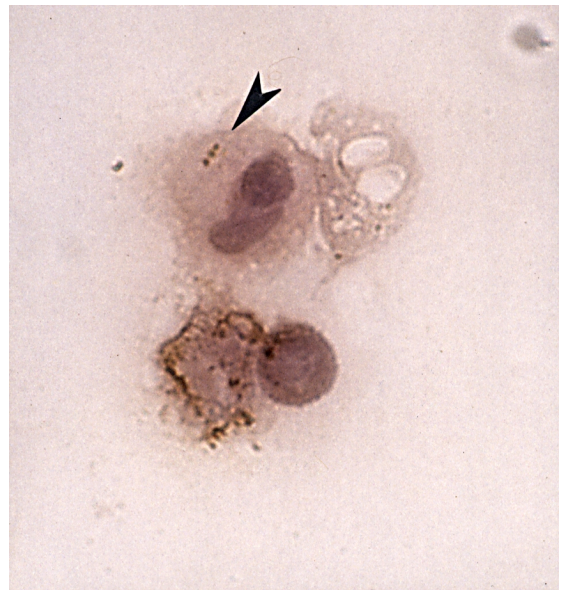


Abb. 102 und 103: Nach spezifischer Färbung zeigte sich, daß nach In-vivo-Infektion der Haut sowohl Langerhanszellen (Abb. 102) als auch andere Zellen – wahrscheinlich Makrophagen – mit intrazellulären Parasiten (Pfeile) in das Medium ausgewanderten. (Markierung mit dem Langerhanszell-spezifischen Antikörper NLDC 145, Färbung mit Peroxidase (gelb) und Gegenfärbung mit Mayers Hämalau (rötlich), (Vergr. 1500×).

Die Langerhanszellen hatten bei In-vitro-Inkubation keine *T. cruzi* aufgenommen; und dies schien darauf hinzudeuten, daß die Zellen dem Flagellaten gegenüber ein anderes Verhalten zeigen als gegenüber den Leishmanien: 15-25% der aus Mausohren durch Trypsinisierung freigesetzten Langerhanszellen hatten nach 24stündiger Inkubation mit Leishmanien (im Verhältnis 2 Parasiten/1 Zelle) ein bis zwei Parasiten aufgenommen. Bei einem Anteil von 1-3% Langerhanszellen in einer epidermalen Einzelzellsuspension wies also jede 500ste bis zu jeder 150sten Zelle einen eingeschlossenen Parasiten auf, bei einer Viabilität von 50% zumindest jede 1000ste bis zu jeder 300sten Zelle. Nach Inkubation von 24 Stunden war eine maximale Befallsrate aufgetreten (Blank et al. 1993). Das abweichende Resultat der vorliegenden Untersuchung könnte auf die verwendeten Parasitenstadien zurückzuführen sein: Langerhanszellen aus epidermaler Einzelzellsuspension nahmen nur amastigote Leishmanien auf, keine promastigoten Formen. Amastigote Trypanosomen standen für In-vitro-Inkubation bei den vorliegenden Experimenten jedoch nicht in ausreichender Zahl zur Verfügung. Es ist also möglich, daß in vitro epi- und trypomastigote Parasiten nicht aufgenommen werden. Die Aufnahme von amastigoten Parasiten durch frisch isolierte Langerhanszellen besagte aber ohnehin nicht viel über die Vorgänge bei einer natürlichen Infektion in der Haut, da diese Stadien bei einer solchen Infektion nicht vorkommen.

Nach In-situ-Infektion konnten in der vorliegenden Untersuchung aber in den ausgewanderten Langerhanszellen einige intrazelluläre *T. cruzi* aufgefunden werden. Ebenso wurden Promastigote – also unter natürlichen Bedingungen infektiöse – Leishmanien nur nach einer ebensolchen Infektion in den LC nachgewiesen, in der Literatur aber keine Befallsrate angegeben (Blank et al. 1993). Die Anzahl der mit *T. cruzi* befallenen Zellen nach In-vivo-Infektion erscheint zunächst im Vergleich zu den In-vitro-Versuchen mit Langerhanszellen und Leishmanien (Blank et al. 1993) gering. Es ist bei einem solchen Vergleich aber zu bedenken, daß sich im Fall eines Auswanderungsversuches zwar mehr Langerhanszellen in der Suspension befanden (30-60%), aber nicht alle von ihnen bei In-situ-Infektion in die direkte Nähe eines Parasiten kamen. Da in der dünnen Haut keine Depots gesetzt werden konnten, war die Zahl der injizierten Parasiten begrenzter als bei In-vitro-Inkubation. Es ist daher möglich, daß die Anzahl der intrazellulären Parasiten nach In-vivo-Infektion der Zellen mit *Trypanosoma cruzi* der nach Infektion mit Leishmanien entspricht.

Zu diesem Schluß scheint nicht zu passen, daß LC anscheinend – wie es bei der Anfärbung der Epidermal Sheets erschien – nach In-vivo-Infektion mit *T. cruzi* nicht aus der Epidermis abwandern. Es wäre aber möglich, daß es zu einer unauffälligen Abwanderung einiger LC kommt: Die Parasiten wurden bei der angewendeten Methode der In-situ-Infektion über das ganze Ohr verteilt und die Infektionsdosen an den einzelnen Eintrittspferten waren sehr klein. Zudem vermehrt sich *Trypanosoma cruzi* – anders als *Leishmania* – in den meisten Fällen nicht massiv an der Eintrittspforte, es kommt zunächst nur zu einem schleichenden Befall der direkt umliegenden Gewebe und dann sehr früh zu einer Dissemination (s. Kap. 7.4). Einzelne Langerhanszellen könnten also – ohne im gesamten Zellbild aufzufallen – abwandern und dabei Parasiten aufnehmen. Die Abwanderung dieser Zellen ist ja nicht antigenbedingt, sondern Teil der unspezifischen Immunabwehr (Moll 1993).

Schließlich ist noch eine ganz andere Variante denkbar, bei der die Langerhans- und andere Zellen die Trypanosomen gar nicht aktiv aufnehmen, sondern von ihnen befallen werden. Für diese Möglichkeit spricht die erhöhte Befallsrate nach der Infektion mit Flagellaten des Tulahuén-Stammes: Als retikulotroper Stamm befällt er sehr viel leichter Immunzellen als der myotrope Stamm Chile 5. Gegenüber Makrophagen ist dieser Verhaltensunterschied extrem deutlich: Bei In-vitro-Inkubation mit Stamm Tulahuén tritt ein massiver Befall der Zellen auf, bei gleicher Inkubation mit Stamm Chile 5 wird fast keine Zelle infiziert (Müller, pers. Mitteilung). Der mangelhafte Befall der Zellen in Versuch II ließe sich in diesem Zusammenhang damit erklären, daß bei einem Verhältnis von 15 Parasiten pro Zelle, von denen nur etwa jede 100ste eine Langerhanszelle war, die Flagellaten ihre Wirts-Immunzellen nur schwer gefunden haben.

Das Ergebnis der In-vivo Infektion hat jedoch gezeigt, daß sich die Trypanosomen – passiv aufgenommen oder aktiv eingewandert – nicht ungehindert in allen Zellen vermehren können. Wenn am zweiten Tag p. inf. noch einzelne Amastigote in z.B. einer Langerhanszelle vorkommen, dann ist es unwahrscheinlich, daß diese Zelle gerade erst von einem Trypanosomen befallen wurde, der bis dahin noch keine andere Wirtszelle gefunden hat. Neu freigesetzte Trypanosomen können zu diesem Zeitpunkt noch keine Zellen befallen, da der Vermehrungszyklus der Parasiten vier Tage dauert. Es besteht also tatsächlich die Möglichkeit, daß Langerhanszellen die Evasion der intrazellulären Parasiten ins Zytoplasma verhindern (einige der Parasiten schienen in Vakuolen zu liegen, Häma-Diff-Färbung) und ihre Vermehrung begrenzen können, wie sie es auch bei Infektion mit Leishmanien tun.

Um diese und weitergehende Immunreaktionen der Langerhans- und verschiedener Effektorzellen eingehender zu verfolgen, könnten als weitere Untersuchungen durchgeführt werden:

- eine Doppelfärbung mit *T. cruzi*- und zellspezifischen Antikörpern, um die Parasiten innerhalb der verschiedenen Zellen eindeutig nachzuweisen (nach Gillitzer & Moll 1993).
- eine T-Zell-Stimulation mit infizierten LC, um die Initiation der Immunantwort durch Langerhanszellen auch für die Infektion mit *Trypanosoma cruzi* nachzuweisen (nach Will et al. 1992)
- Langerhanszellen in situ mit einem Farbstoff zu markieren und die regionalen Lymphknoten daraufhin zu untersuchen, ob in der Haut markierte LC nach ihrer Wanderung dort aufzufinden sind (nach Reinhold & Visser 1983, Brenan & Parish 1984, Cumberbatch & Kimber 1990, Moll 1993)

Fraglich ist jedoch, ob Langerhanszellen in der frühen Phase der Infektion mit *T. cruzi* überhaupt eine bedeutende Rolle spielen, da nach der Infektion über die Haut immer einige *Trypanosomen* mit der Lymphe abgeschwemmt werden und auf diese Weise auch ohne zellulären Transport innerhalb weniger Stunden in den Lymphknoten gelangen, wo sie von den dort ansässigen dendritischen Zellen aufgenommen und präsentiert werden können.

Sollten aber auch bei der Infektion mit *Trypanosoma cruzi* – wie es bei der Leishmaniasis vorkommt – in LC persistierende Parasiten existieren, so würde dies möglicherweise eine große Gefahr darstellen: Diese Parasiten könnten nicht nur für ein Wiederaufflammen der Erkrankung bei Immunsuppression sorgen, wie es überlebende Leishmanien tun (Aebischer 1994), sondern könnten auch den fortschreitenden Prozess der autoimmunen Zerstörung des Körpers weiter vorantreiben. *T. cruzi*-Antigene auf dendritischen Milzzellen sind lange nach klinischer Heilung bei Mäusen festgestellt worden, die noch immer seropositiv waren (Andrade 1991).