

Das adaptive Immunsystem des Haushuhns, eine Einführung

Prof. Dr. B. Kaspers, Dr. T. Göbel (München)

Einen Großteil unseres heutigen Wissens über das Immunsystem des Haushuhns verdanken wir Arbeiten aus der Grundlagenforschung, da zur Beantwortung zahlreicher Fragen die gute Zugänglichkeit des Hühnerembryos, die besonderen anatomischen Gegebenheiten und die große phylogenetische Distanz zum Säuger genutzt wurde. Beispiele hierfür sind die Entdeckung des Interferons (Isaacs und Lindemann, 1957), die Charakterisierung des B- und T-Zellsystems (Cooper et al., 1965) und die interessanten Arbeiten von Le Douarin zur Hämatopoese (Le Douarin und Jotereau, 1975). Erst nachfolgend wurden diese Informationen auch dazu genutzt, die ökonomisch relevanten Probleme der Infektionsbiologie beim Wirtschaftsgeflügel zu bearbeiten.

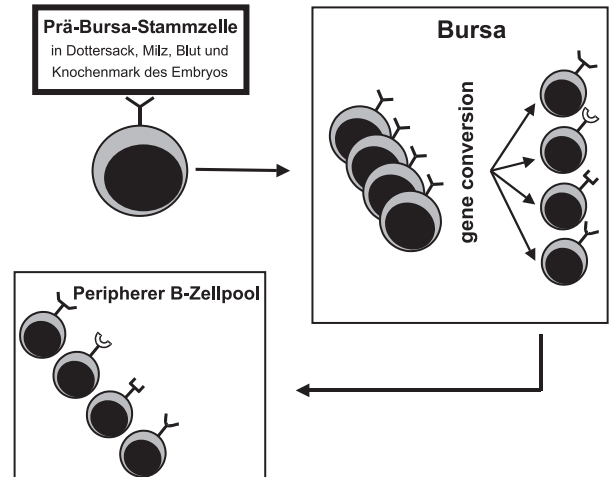
In dieser Arbeit soll eine Übersicht über wichtige Aspekte des adaptiven Immunsystems des Haushuhns und den derzeitigen Wissensstand gegeben werden. Umfassende Darstellungen finden sich bei Toivanen und Toivanen (1997), Sharma (1991) und Vainio und Imhof (1996).

Das B-Zellsystem

B-Zellreifung

Glick und Mitarbeiter beschrieben bereits 1956 die Funktion der Bursa fabricii als zentrales Organ der B-Zellreifung beim Huhn. Aber erst in den vergangenen 15 Jahren gelang es, die eigentlichen Vorgänge der B-Zellentwicklung zu klären (Masteller et al., 1997). B-Zellvorläuferzellen (Prä-Bursa-Stammzellen; Abbildung 1) finden sich demnach nur während der Embryonalentwicklung im Dottersack, dem Blut, der Milz und dem Knochenmark. Diese Zellen tragen auf ihrer Zelloberfläche IgM-Moleküle, die bei allen Prä-Bursa-Stammzellen praktisch identisch sind. Sie besiedeln die Bursa zwischen dem 10. und 15. Embryonaltag und leiten die Bildung von lymphoiden Follikeln ein. In den Bursafollikeln kommt es zu einer massiven Vermehrung und zu einer Weiterentwicklung der Zellen zu reifen B-Zellen. Diese Zellen verlassen die Bursa, beginnend etwa um den Zeitpunkt des Schlupfes, und wandern zu den peripheren lymphatischen Organen, wo sie für den Rest des Lebens den sich selbsterneuernden Vorrat an reifen B-Lymphozyten stellen. Die Aufgabe der Bursa fabricii besteht zum einen darin, den Prä-Bursa-Stammzellen ein Milieu zu bieten, das die Vermehrung der B-Zellen ermöglicht. Zum anderen führt die Reifung in der Bursa zu einer Diversifizierung der auf der B-Zelloberfläche exprimierten Immunglobulinmoleküle. Der molekulare Mechanismus dieser Diversifizierung wird als "gene conversion" bezeichnet. Alle Prä-Bursa-Stammzellen besitzen also identische Immunglobulin-Moleküle, während Post-Bursazellen durch die "gene conversion" in der Bursa ein hochvariables Immunglobulin-Repertoire aufweisen. Sie sind damit in der Lage auf die große Zahl an antigenen Reizen aus der Umwelt adäquat zu reagieren. Mit der Etablierung des peripheren B-Zellpools wird die Reifung neuer B-Zellen in der Bursa überflüssig. Entsprechend kommt es schließlich zur Involution des Organs, die 15 - 24 Wochen nach dem Schlupf beginnt.

Abbildung 1: B-Zellentwicklung beim Haushuhn



Immunglobulinklassen

Das reife B-Zellsystem des Huhns reagiert, ebenso wie das der Säugetiere, auf antigene Stimulation zunächst mit der Bildung antigenspezifischer IgM-Antikörper. Erst nach wiederholter Stimulation kommt es zum Immunglobulinklassenwechsel und so zur IgG- oder IgA-Synthese. IgG (häufig auch als IgY bezeichnet) stellt das quantitativ und qualitativ wichtigste Immunglobulin im Serum dar (Tabelle 1). IgG-Subklassen wurden beim Huhn bisher nicht beschrieben. IgA ist auch beim Huhn das Immunglobulin auf den Oberflächen der Schleimhäute. Ob das sezernierte Hühner-IgA auch über eine Sekretkomponente zum Schutz vor Proteolyse verfügt, ist bisher nicht zweifelsfrei geklärt. Ebenfalls nicht nachgewiesen wurden beim Huhn IgD- und IgE-Antikörper.

Maternale Antikörper

IgG wird während der Eibildung in erheblichen Mengen aktiv vom Blut über das Follikel epithel in den Dotter sezerniert. Etwa ab dem 12. Tag der Embryonalentwicklung kommt es zur Resorption des Dotter-IgGs über die Dottersackgefäße in das Blut des Embryos. Dieser weist zum Schlupf Serum-IgG Konzentrationen von 5-7 mg/ml auf, Werte die denen adulter Tiere nahezu entsprechen (Tabelle 1). Weder IgM noch IgA, die beide in sehr geringen Konzentrationen im Eiklar nachweisbar sind, gelangen in das Blut des Küchens. Sie spielen quantitativ mit großer Wahrscheinlichkeit keine Rolle.

Neonatale Immunglobulin-Synthese

Obwohl bereits zum Schlupf reife B-Zellen die Bursa verlassen, beginnt die Immunglobulin-Synthese erst mit Beginn der 2. Lebenswoche in nennenswertem Umfang. Am Ende des ersten Lebensmonats werden IgM-Werte adulter Tiere gefunden. Ähnliches gilt auch für die Synthese von IgG und IgA.

Tabelle 1: Immunglobulin-Isotypen beim Huhn

Immunglobulin	Kompartiment	Konzentration
IgG	Serum (adultes Tier)	6 - 10 mg/ml
	Serum (Eintagsküken)	5 - 7 mg/ml
	Dotter	10 - 15 mg/ml
IgM	Serum (adultes Tier)	1 - 2 mg/ml
	Serum (Eintagsküken)	< 0,01 mg/ml
	Eiklar	0,1-0,2 mg/ml
IgA	Serum (adultes Tier)	0,4-0,6 mg/ml
	Serum (Eintagsküken)	< 0,01 mg/ml
	Eiklar	0,1-0,7 mg/ml
	Gallenflüssigkeit	2 - 6 mg/ml
	Darminhalt (Jejunum)	1 - 2 mg/ml

Der MHC Komplex

B-Lymphozyten erkennen mit ihren membranständigen Antikörpermolekülen natives, lösliches Antigen und werden so aktiviert. Im Gegensatz dazu können T-Lymphozyten Antigene nur dann erkennen, wenn diese vorher von Zellen in kleine Peptidbruchstücke abgebaut werden. Diese Peptidbruchstücke werden intrazellulär auf die sogenannten MHC-Moleküle geladen und der Komplex aus MHC mit Peptid wird auf der Oberfläche von Zellen präsentiert. T-Lymphozyten werden also nur dann aktiviert, wenn sie die Kombination aus körpereigenen MHC-Molekülen beladen mit körperfremden Peptidmolekülen erkennen (siehe unten und Abbildungen 3 und 4).

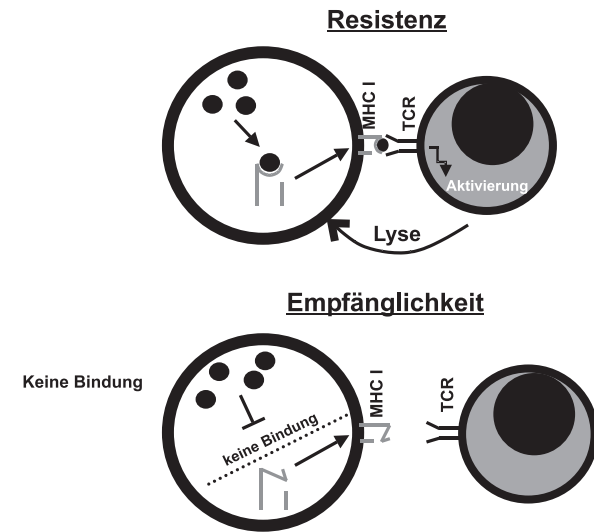
Die MHC-Moleküle weisen beim Säuger eine hohe Variabilität auf, damit eine Vielzahl verschiedener Peptidbruchstücke gebunden und präsentiert werden kann. Dieser Polymorphismus wird durch die Kombination verschiedener Gene und verschiedener Allele ermöglicht, so daß jedes Individuum eine Vielzahl verschiedener MHC-Moleküle zur Bindung verschiedener Peptide besitzt und auf den Zelloberflächen exprimiert. Beim Huhn wurde mittlerweile der gesamte MHC-Komplex intensiv molekularbiologisch untersucht (Kaufman et al., 1999). Der Hühner MHC-Komplex ist wesentlich kleiner und kompakter als der des Säugers (etwa 1/20 Größe) und die Variabilität ist daher erheblich reduziert. Durch diesen eingeschränkten MHC-Polymorphismus lassen sich die seit langem bekannten Phänomene der Krankheitsresistenz bzw. -anfälligkeit verschiedener Hühnerlinien nun immunologisch erklären (Abbildung 2). Wie ausgeführt, müssen Peptidfragmente von Pathogenen an MHC-Moleküle gebunden werden, um T-Lymphozyten zu aktivieren. Da die MHC-Variabilität eingeschränkt ist, können die vorhandenen MHC-Moleküle nach Infektion im ungünstigen Fall kein Peptidfragment des Pathogens binden. T-Lymphozyten werden dann nicht aktiviert und die Tiere sind hochgradig empfänglich für dieses Pathogen. Resistente Hühnerlinien besitzen dagegen MHC-Moleküle mit guten Bindungseigenschaften für Peptide des Pathogens und dadurch werden T-Lymphozyten als Effektorzellen aktiviert.

Das T-Zellsystem

T-Zellentwicklung und Reifung

Embryonale Prä-T-Zellen besiedeln den Thymus in drei Wellen zwischen dem 6. und 8., dem 12. und 14. und dem 18. und 21. Embryonaltag (Abbildung 2). Im Thymus kommt es zur Proliferation und zur Selektion der sich entwickelnden

Abbildung 2: Die Rolle des MHC Haplotyps in der Resistenz gegen und Empfänglichkeit für Infektionserkrankungen beim Huhn



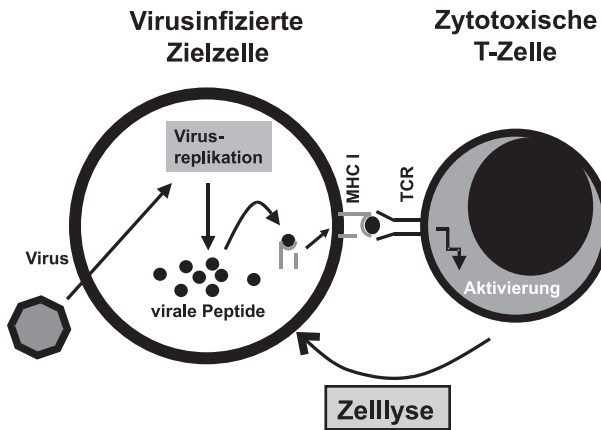
T-Zellen. Die reifen T-Zellen verlassen den Thymus ebenfalls in 3 Wellen. Die Emigration der klassischen T-Zellen, die den α/β -T-Zellrezeptor tragen, erfolgt jeweils etwa 14 Tage nach der Besiedelung des Organs. Die γ/δ -T-Zellen emigrieren jeweils 2-3 Tage vor den α/β -T-Zellen, da ihre Reifung deutlich schneller abläuft. Somit finden sich die ersten reifen T-Zellen bereits vor dem Schlupf in den peripheren Organen.

Während der T-Zellreifung im Thymus kommt es zu zwei Selektionsschritten. Prä-T-Zellen weisen ein hochvariables T-Zellrezeptorrepertoire auf, das heißt diese T-Lymphozyten erkennen eine Vielzahl verschiedener MHC-Moleküle. Während der positiven Selektion werden nun diejenigen T-Lymphozyten selektiert, die an eigene MHC-Moleküle binden. Es folgt ein zweiter, negativer Selektionsschritt. Dabei werden T-Lymphozyten aussortiert, die durch die Bindung von eigenen MHC-Molekülen beladen mit körpereigenen Peptiden aktiviert werden. Diese autoreaktiven T-Lymphozyten müssen im Thymus zerstört werden. Der Thymus hat also als primäres lymphoides Organ die Aufgabe der T-Zellvermehrung und der Selektion.

T-Zellfunktion

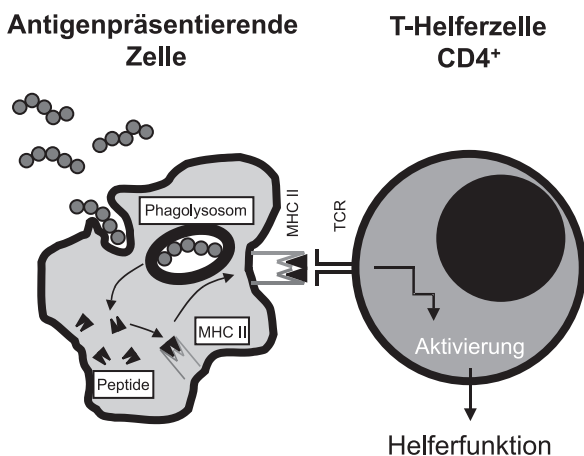
In den vergangenen 15 Jahren wurden zahlreiche monoklonale Antikörper entwickelt, die sich als wertvolle Werkzeuge für die Untersuchung der verschiedenen Lymphozytenpopulationen und ihrer Funktion erwiesen (Ratcliffe et al., 1993). So wurden auch beim Huhn mit Hilfe dieser Antikörper T-Zellen identifiziert, die entweder das CD8-Molekül oder das CD4-Molekül auf der Zelloberfläche exprimieren. CD8⁺-Zellen wurden funktionell als zytotoxische T-Lymphozyten identifiziert, die insbesondere virusinfizierte Zellen über den MHC-Klasse I-Viruspeptid-Komplex erkennen und zerstören. Entsprechend spielen sie bei viralen Infektionserkrankungen eine wichtige Rolle, da sie virusinfizierte Zellen erkennen und zerstören können und somit die Virusreplikation hemmen (Abbildung 3). Die Bildung virusspezifischer zytotoxischer T-Zellen wurde beim Huhn unter anderem nach Infektionen mit Retikuloendotheliose-Virus und Marekvirus nachgewiesen.

Abbildung 3: Lyse virusinfizierter Zielzellen durch zytotoxische T-Zellen



Im Gegensatz zu den zytotoxischen (CD8⁺) T-Zellen erkennen CD4⁺ T-Helferzellen mit Hilfe des T-Zellrezeptors (TCR) antigene Peptide, die durch MHC-Klasse II Moleküle auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC: Langerhans-Zellen der Haut, Dendritische Zellen, Makrophagen) präsentiert werden. APCs nehmen Antigene aus der Zellumgebung auf, prozessieren sie und bringen die so entstandenen antigenen Peptide mit MHC II-Molekülen an die Zelloberfläche (Abbildung 4). Erkennen CD4⁺ Zellen diese Komplexe aus MHC II und Peptid, so werden sie aktiviert, proliferieren und differenzieren entweder zu Gedächtniszellen oder zu Effektorzellen. Cooper und Mitarbeiter (1965) haben in den frühen sechziger Jahren bei Hühnern klar gezeigt, daß T-Lymphozyten für die Ausbildung einer effektiven humoralen (antikörpervermittelten) Immunreaktion unbedingt notwendig sind. Diese Helferfunktion nehmen antigenspezifische CD4⁺-Lymphozyten wahr, indem sie durch Zell-Zell-Interaktionen mit B-Zellen und durch die Sekretion bestimmter Signalmoleküle (Zytokine) die Aktivierung der B-Zellen einleiten.

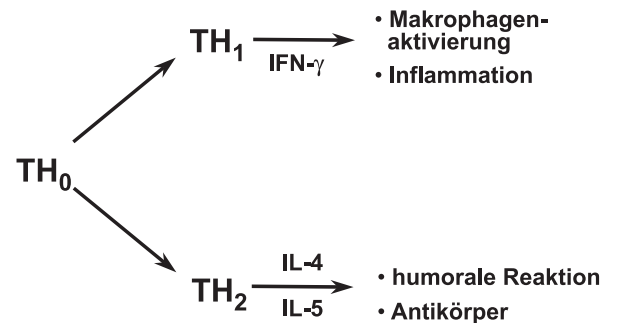
Abbildung 4: Aktivierung von T-Helferzellen durch antigenpräsentierende Zellen



Aus Arbeiten an Mäusen ist bekannt, das CD4⁺-Zellen keine homogene Zellpopulation darstellen. Vielmehr können aufgrund des Musters der Zytokinsekretion zwei funktionell unterschiedliche Gruppen von CD4⁺-Zellen differenziert werden

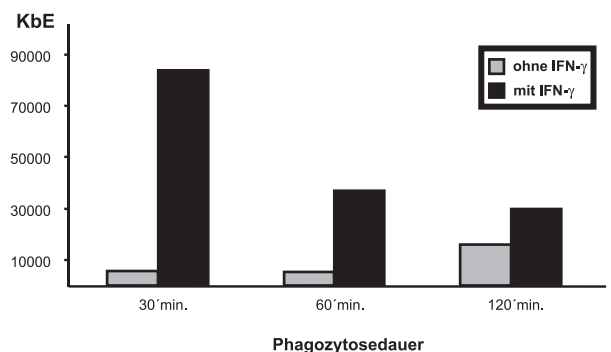
(Abbildung 5). CD4⁺-Zellen, die Interferon-gamma (IFN- γ) bilden, werden als T-Helfer 1 (TH₁) Zellen bezeichnet, wohingegen CD4⁺ TH₂-Zellen durch die Sekretion von Interleukin-4 (IL-4) und IL-5 charakterisiert sind. Die funktionellen Unterschiede dieser T-Helferzellgruppen ergeben sich aus den unterschiedlichen Wirkungen der Zytokine. TH₁-Immunantworten führen über die Aktivierung von Makrophagen zu Entzündungsreaktionen, wogegen TH₂-Immunreaktionen durch die Bildung von Antikörpern (humorale Reaktion) charakterisiert sind.

Abbildung 5: Differenzierung von T-Helferzellen



Der Verlauf von Infektionserkrankungen und die daraus resultierende Immunpathologie hängt in erheblichem Maße davon ab, welche Form der T-Helferreaktionen initiiert wird. Zahlreiche intrazelluläre Parasiten, wie Salmonellen, Mykobakterien oder Listerien können nur dann effektiv kontrolliert werden, wenn eine TH₁-Reaktion etabliert werden kann. Eine wichtige Komponente stellt hierbei das von antigenstimulierten TH₁-Zellen gebildete IFN- γ dar, welches sehr effektiv Makrophagen aktiviert, die daraufhin bakterizide Effektormechanismen ausbilden und so die Mikroorganismen kontrollieren (Abbildung 6). TH₂-Reaktionen kommt dagegen immer dann eine wesentliche Bedeutung zu, wenn spezifische Antikörper die entscheidenden Faktoren zur Kontrolle einer Infektion sind.

Abbildung 6: Phagozytose und Abtötung von Salmonella enteritidis durch IFN- γ aktivierte Hühner-Makrophagen



Obwohl dieses Modell der TH₁-TH₂-Dichotomie seit etwa 15 Jahren diskutiert wird und seine Bedeutung durch zahlreiche Arbeiten an Mäusemodellen und am Menschen untermauert ist, gibt es bisher keine Daten für die Existenz vergleichba-

rer immunregulatorischer Mechanismen beim Huhn. Grund hierfür sind die nach wie vor sehr begrenzten Kenntnisse über das Zytokinsystem des Haushuhns.

Zytokine

Die Zellen des Immunsystems sezernieren zahlreiche lösliche Signalmoleküle, die zusammenfassend als Zytokine bezeichnet werden. Hierzu zählen die Interleukine, die Chemokine, die Interferone und die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren sowie eine Reihe weiterer Faktoren, die keiner dieser Gruppen zugeordnet werden. Mehr als einhundert solcher Moleküle wurden bisher bei Säugetieren biochemisch und funktionell charakterisiert. Einige Zytokine werden inzwischen zu therapeutischen Zwecken verwendet, so beispielsweise das Interferon-alpha (IFN- α) in der Therapie der Virushepatitis des Menschen. Zahlreiche weitere Zytokine befinden sich in der klinischen Erprobung. Auch beim Huhn sind eine Reihe biologischer Aktivitäten beschrieben (Klasing, 1994), in der Regel aber ohne eine genaue Charakterisierung auf molekularer Ebene. Eine Aufstellung klonierter und funktionell charakterisierter Zytokine beim Huhn ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2: Molekular und funktionell charakterisierte Zytokine des Haushuhns

Zytokin	Syntheseort	Biologische Aktivität
Typ I Interferone (Interferon- α/β)	Virusinfizierte Zellen	Antiviral
Typ II Interferon (Interferon- γ)	Aktivierte T-Lymphozyten	Immunmodulatorisch, Makrophagen aktivierend
Interleukin-1	Monozyten/Makrophagen	Proinflammatorisch
Interleukin-2	T-Lymphozyten	Immunregulatorisch, T-Zell aktivierend
Interleukin-8	Makrophagen	Chemotaktisch
Stem Cell Factor (SCF)	Stromazellen des Knochenmarks	Hämatopoetischer Wachstumsfaktor
Myeloid Growth Factor (MGF)	Monozyten/Makrophagen	Wachstum und Differenzierung myeloider Vorläuferzellen

Die Arbeiten der letzten 5 Jahre haben zu einer weitgehenden Beschreibung des Interferonsystems beim Huhn geführt und gezeigt, daß das aviäre Hühner-Interferonsystem dem der Säugetiere in hohem Maße gleicht. Auch beim Huhn können Typ I - (IFN- α und IFN- β) und Typ II- (IFN- γ) Interferone unterschieden werden. Gebildet werden Typ I Interferone von einer Vielzahl virusinfizierter Zellen, nicht nur von Zellen des Immunsystem. Sie zeichnen sich durch potente antivirale Eigenschaften aus, sind aber nur schwache Modulatoren immunologischer Reaktionen. Die antivirale Aktivität konnte in vivo in einem Rous-Sarcom-Modell beim Huhn nach parenteraler Applikation des Zytokins aufgezeigt werden (Plachy et al., 1999). Eine erst kürzlich erschienene Arbeit beschreibt darüber hinaus, daß IFN- α auch über das Trinkwasser verabreicht werden kann und in dieser Untersuchungen hemmend auf eine Newcastle Disease Virus Infektion bei Küken wirkte (Marcus et al., 1999). Möglicherweise bieten sich hier neue Ansätze für die Prävention von Viruserkrankungen bei Küken in den ersten Lebenswochen bis zur vollständigen Ausreifung des spezifischen Immunsystems.

IFN- γ (Typ II Interferon) wird dagegen ausschließlich von T-

Zellen und natürlichen Killerzellen nach einer spezifischen Stimulation gebildet. Es ist das charakteristische Zytokin einer TH₁-Immunreaktion. Als möglicherweise wichtigster Aktivator von Makrophagen spielt es nicht nur in der Abwehr bestimmter intrazellulärer Parasiten (Abbildung 5) eine Rolle, sondern auch als Regulator einer Immunantwort.

Von den bei Säugern bekannten 18 Interleukinen wurden beim Huhn bisher lediglich IL-1, IL-2 und IL-8 kloniert. Über ihre biologischen Aktivitäten liegen beim Huhn nur wenige Berichte vor. Die klassischen Zytokine einer TH₂-Immunreaktion, IL-4 und IL-5 wurden bis heute nicht beschrieben. Während für andere noch nicht charakterisierte Zytokine, wie etwa für den Tumor-Nekrosefaktor (TNF), zumindest experimentelle Hinweise auf ihre Existenz erarbeitet werden konnten, ist dies für IL-4 und IL-5 noch nicht gelungen. Somit konnte die Gültigkeit des TH₁/TH₂-Konzepts hinsichtlich der Regulation immunologischer Reaktionen für das aviäre Immunsystem bisher nicht geprüft werden. Die Zytokinforschung beim Huhn wird sich daher in den kommenden Jahren besonders intensiv mit der Suche nach und der Charakterisierung von TH₂-Zytokinen beschäftigen müssen.

Schlußfolgerungen

Diese kurze Darstellung des adaptiven Immunsystems beim Haushuhn zeigt wie wichtig die Erforschung der Grundlagen des Immunsystems ist, um daraus Erkenntnisse zur Pathogenese von Erkrankungen und für neuartige prophylaktische und therapeutische Ansätze zu gewinnen. Darüber hinaus bilden die vergleichenden Analysen des Immunsystems eine Basis für das Verständnis der Phylognese des Immunsystems.

Literatur

Cooper, M.D., Peterson, R.D.A. und Good, R.A. (1965): Delineation of the thymic and bursal lymphoid system in the chicken. *Nature*, 205, 143-146

Isaacs, A. und Lindemann, J. (1957): Virus interference. I. The interferon. *Proc. Roy. Soc. B.*, 147, 258-267

Kaufman, J., Milne, S., Göbel, T.W.F., Walker, B., Jacob, J.P., Auffray, C., Zoorob, R. und Beck, S. (1999): The chicken B locus: a minimal essential major histocompatibility complex (MHC). *Nature* 401, 923-925.

Klasing, K.C. (1994): Avian leukocytic cytokines. *Poultry Sci.*, 73, 1035-1043

Le Douarin, N. M. und Jotereau, F. V. (1975): Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras. *J. Exp. Med.* 142:17-40.

Marcus, P.I., van der Heide, L. und Sekellick, M.J. (1999): Interferon action on avian viruses. I. Oral administration of chicken interferon- α ameliorates Newcastle Disease. *J. Interferon Cytokine Res.* 19, 881-885.

Masteller, E.L., Pharr, G.T., Funk, P.E. und Thompson, C.B. (1997): Avian B cell development. *Intern. Rev. Immunol.*, 15, 185-206

Plachy, J., Weining, K.C., Kremmer, E., Puehler, F., Hala, K., Kaspers, B. und Staeheli, P. (1999): Protective effects of type I und type II interferons towards Rous Sarco-

ma Virus-induced tumors in chickens. Virology, 256, 85-91

Ratcliffe, M.J.H., Boyd, R., Chen, C.-L. und Vaibio, O. (1993): Avian CD nomenclature workshops. Vet. Immunol. Immunopathol., 38, 375-386

Reynaud, C. A., Anquez, V., Dahan, A. und Weill, J. C. (1985): A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity. Cell 40:283-291.

Sharma, J.M. (1991): Avian cellular immunology. CRC Press, Boca Raton

Toivanen, A. und Toivanen, P. (1987): Avian Immunology: Basis und Practice, Volume I und II. CRC Press, Boca Raton

Vainio, O. und Imhof, B.A. (1996): Immunology und Developmental Biology of the Chicken. Springer, Berlin

Prof. Dr. Bernd Kaspers
Institut für Physiologie, Physiologische
Chemie und Tierernährung
Universität München
Veterinärstr. 13
80539 München
Tel.: +49-89-2180-3758
Fax: +49-89-344937
e-mail:
kaspers@tiph.vetmed.uni-muenchen.de
Internet:
http://www.vetmed.uni-muenchen.de/tiph_p/home.html

Dr. Thomas Göbel
Institut für Physiologie, Physiologische
Chemie und Tierernährung
Universität München
Veterinärstr. 13
80539 München
Tel.: +49-89-2180-3827
Fax: +49-89-344937
e-mail:
thomas.goebel@tiph.vetmed.uni-muenchen.de
Internet:
http://www.vetmed.uni-muenchen.de/tiph_p/home.html