

5 DISKUSSION

Gerade in den letzten Jahren wurden verstärkt Bemühungen unternommen, die Zellentwicklung und die Beziehungen in der Familie der dendritischen Zellen mit ihren spezifischen Subpopulationen aufzuklären. So werden heute neben der lymphoiden oder myeloiden Herkunft, bei den murinen Zellen als Hauptgruppen $CD4^+ CD8^-$ von $CD4^- CD8^+$ dendritischen Zellen unterschieden (STEINMAN, 2003). Bei den humanen dendritischen Zellen sind bislang keine $CD8^+$ Zellen gefunden worden, $CD11c^+$ Zellen entstehen während Infektionen. Erst kürzlich sind mit den IFN- α produzierenden plasmazytoiden dendritischen Zellen, den TNF- α produzierenden und den regulatorischen dendritischen Zellen (MUNN ET AL., 2002) weitere Subpopulationen voneinander abgegrenzt worden.

Gemein ist allen diesen Subpopulationen, dass sie in geringen Anteilen im Blut oder in den Geweben vorkommen. Aus diesem Grund wird der Großteil an Forschungsvorhaben und klinischen Studien mit *in vitro* aus Stammzellen oder Monozyten generierten dendritischen Zellen durchgeführt. Diese Modell-Zellen haben zu einer Vielzahl neuer Erkenntnisse geführt, aber gerade in letzter Zeit mehrt sich die Anzahl von Publikationen, die nachweist, dass diese Ergebnisse nicht direkt auf *in vivo*- und *ex vivo*-Zellen übertragbar sind. So verlassen z. B. antigenbeladende MoDC in vielen Studien erst gar nicht den Applikationsort bei Tumortherapien (MORSE ET AL., 1999), exprimieren in dem Stadium, das bei ihnen als unreif definiert wird, deutlich weniger kostimulatorische Moleküle (KAMATH ET AL., 2000) und induzieren T-Zell-Antworten von geringerem Ausmaß als ihre physiologischen Gegenspieler.

Die Langerhans-Zelle (LC) wird als der Prototyp einer spezialisierten unreifen dendritischen Zelle betrachtet. Viele der elementaren Erkenntnisse über dendritische Zellen in den Zeiten vor der Etablierung von Generierungs-Protokollen (SALLUSTO UND LANZAVECCHIA, 1994) wurden durch Forschungen an LC erworben. Dennoch hat die LC mit der Expression von Langerin, E-Cadherin und dem zytoplasmatischen Vorkommen von Birbeck Granulae exklusive Charakteristika, die sie von anderen dendritischen Zellen unterscheiden. Doch der höheren Gewichtung der mit LC erhobenen Daten stehen die Schwierigkeiten mit der Reinheit der isolierten Zellen gegenüber. Es treten starke Kontaminationen mit Keratinozyten auf und die Ausbeute in absoluter Zellzahl je präpariertes Gewebestück ist gering. Und so sind auch die zahlreichen Ansätze, humane *ex vivo*-LC zu isolieren, methodisch sehr

unterschiedlich: Emigration aus der Epidermis in Haut-Organokulturen (POPE ET AL., 1995), Fraktionierung mit Dichtegradienten-Zentrifugation (PENA-CRUZ ET AL., 2001), Sortierung mit dem Durchflusszytometer (MORHENN ET AL., 1982; ASHWORTH ET AL., 1989), Isolierung mit magnetischen Partikeln über die Oberflächenmoleküle CD1a, HLA-DR oder CLA (NILSSON ET AL., 1987; HANAU ET AL., 1988; SIMON ET AL., 1995; BARTZ ET AL., 2003).

Ein Anliegen dieser Arbeit war die hochreine Isolierung von humanen dendritischen Zellen aus der Epidermis. Diese Zellen wurden phänotypisch und funktionell charakterisiert. Im zweiten Teil dieser Untersuchungen wurden die isolierten LC mit LC, die aus Monozyten generiert wurden, verglichen. Dabei wurde das Potenzial der beiden Zelltypen bestimmt, nach Stimulationen mit Zytokinen, CD40- und TLR-Liganden, inflammatorische und suppressive, T_H1-Zellen-polarisierende Zytokine freizusetzen. Abschließend wurden Expressionsanalysen von LC mit Genchips unternommen, um weitere Daten für das Differenzierungs- und Aktivierungsniveau der Zellen nach Stimulation zu erhalten.

5.1 Isolierungs-Methoden: MACS mit CD1a und CD1c

Im ersten Teil dieser Arbeit wird der neue Ansatz vorgestellt, mit einem gegen das Oberflächenmolekül CD1c gerichteten Antikörper, der an paramagnetische Beads gekoppelt ist, LC in einem starken Magnetfeld zu isolieren. Diese Methode erwies sich als effektiv und zuverlässig, um epidermale LC aus der humanen Haut anzureichern. Der Reinheitsgrad ist bei der Isolierung von LC von hoher Bedeutung, da Keratinozyten 90 % der epidermalen Zellen ausmachen (FRITSCH, 2004). Diese als Hauptkontaminationsquelle in Frage kommenden Zellen können, anders als dendritische Zellen, nach einer zweitägigen Adaptierungsphase in die Zellteilung übergehen. Stimulierte Keratinozyten können eine Vielzahl von Zytokinen freisetzen, die auch LC produzieren. Dabei exprimieren Keratinozyten einige dieser Zytokine bereits konstitutiv (WANG ET AL., 1999). Da sich die Zytokin-Sekretionsspektren von LC und Keratinozyten überschneiden, wird die Bedeutung der Reinheit bei LC-Präparationen für Zytokinanalysen nach einer mehrtägigen Zellkultur plausibel.

Zu Beginn der Experimente wurde das CD1a-Molekül als Ziel des Isolierungs-Antikörpers gewählt, da CD1a in der Epidermis exklusiv auf LC vorkommt und keine Hinweise auf Zellaktivierung durch Bindung von CD1a existierten. Ein anderes auf LC exprimiertes Molekül, HLA-DR, schien weniger geeignet, da die Ligation von HLA-DR bei dendritischen Zellen gleichzeitig Apoptose einleiten kann (LEVERKUS ET AL., 2003). Das CD1a-Antigen war in einer früheren Arbeit mit mäßigem Erfolg zur Isolierung von humanen LC eingesetzt worden (SIMON ET AL., 1995). In dieser Publikation wurden Zellen mit 76 % CD1a-Expression präpariert. Die Reinheit konnte in den hier vorgestellten Untersuchungen durch den Einsatz von direkt gekoppelten CD1a-Mikrobeads, von Separationssäulen für große Zellen und durch einen zusätzlichen Säulen-Auftrag auf im Mittel 93 % CD1a⁺LC gesteigert werden (**Tabelle III**). Die 7 % an isolierten, aber nicht CD1a-exprimierenden Zellen könnten aus anderen Epidermis-Zellen bestehen, die in LC-Aggregaten in der Säule zurückgehalten wurden. Die kleine Partikelgröße der Mikrobeads mit ≤ 100 nm gegenüber 2-5 μ m in vorherigen Isolierungsprotokollen (HANAU ET AL., 1988; MORRIS ET AL., 1992) erwies sich als vorteilhaft, da mit CD1a-Mikrobeads keine artifizielle Zellaktivierung oder phänotypische Manipulation der LC beobachtet werden konnten.

Bei den CD1a-isolierten Zellen konnte auch ein anderes CD1-Molekül, CD1c, auf der Zelloberfläche in Koexpression mit CD1a gemessen werden (**Abb. 4**). Die starke Expression von CD1c auf LC überraschte, war sie doch in einer älteren Publikation im Vergleich zum CD1a mit schwach beschrieben worden (SCHMITT ET AL., 1986). Da in der humanen Epidermis CD1c ebenfalls ausschließlich von LC exprimiert wird (SCHMITT ET AL., 1986; CAUX ET AL., 1992), wurde überprüft, ob auch über CD1c LC mit MACS isoliert werden können. CD1c- wie auch CD1a-MACS isolierte eine homogene Population reiner, viabler und HLA-DR⁺ dendritischer Zellen (**Abb. 6**). Das Vorkommen der typischen Birbeck Granulae in allen separierten Zellen schloss Kontaminationen mit CD1c⁺ wie auch CD1a⁺ dendritischen Zellen aus der Dermis (ELDER ET AL., 1993; MCLELLAN ET AL., 1998) aus. Eventuelle kontaminierende Keratinozyten, die LC-Präparationen für *in vitro*-Studien unbrauchbar machen würden, wurden erfolgreich entfernt.

Im Vergleich zum CD1a-Ansatz erwies sich der CD1c-Ansatz als der effektivere. Der bei der CD1a-Isolierung festgestellte Zellverlust nach zwei Säulen-Passagen konnte bei Verwendung von CD1c deutlich reduziert werden. Es kann spekuliert werden, dass bei der Isolierungs-

effizienz die unterschiedliche Verteilung von CD1a und CD1c im Endozytose-System eine Rolle spielt. Demnach können CD1a-Moleküle nach ihrer Markierung ausschließlich im frühen *recycling*-Endosomen gefunden werden (SUGITA ET AL., 1999; SALAMERO ET AL., 2001). CD1c konnte zusätzlich in späten Endosomen und damit in diesen Strukturen weiter in der Zelle verteilt lokalisiert werden (SUGITA ET AL., 2000). Nach Aufnahme der CD1c-gebundenen paramagnetischen Partikel in die Zelle könnte eine quantitativ stärkere Magnetisierung im magnetischen Feld erfolgen (SAFARIK UND SAFARIKOVA, 1999).

Wie bei der Isolierung von CD34⁺Zellen mit Mikrobeads (HANDGRETINGER ET AL., 1998) wurden die phänotypischen und funktionellen Analysen isolierter LC durch gebundene MACS-Partikel nicht beeinträchtigt. Die Visualisierung der CD1a-Mikrobeads in der Immun-Transmissions-EM (**Abb. 5**) zeigte eine eher ungleichmäßige Markierung der Zelloberfläche (**Abb. 5 G**). Außerdem konnte eine intrazelluläre Aufnahme der Beads (**Abb. 5 E, F, H, I**), die dort ausschließlich periphere endozytotische und endosomale Vesikel und einige Birbeck Granulae anfärbten, beobachtet werden. Das Vorkommen von CD1a-Mikrobeads auf der Zellmembran und in den Birbeck Granulae kann als ein Hinweis für das Zutreffen einer Theorie über die Herkunft dieser Organelle gesehen werden. Der Endozytose-Theorie (ISHII ET AL., 1984) zufolge werden Birbeck Granulae während der Rezeptor-vermittelten Endozytose durch eine Verlängerung und Einstülpung der *coated pits* von der Zellmembran aus gebildet und nicht vom Golgi-Apparat. Die Analysen der morphologischen, phänotypischen und funktionellen Eigenschaften der isolierten LC ergaben, dass sowohl die Mikrobead-Markierung über CD1a oder CD1c als auch die zwei Separations-Läufe weder signifikante Veränderungen noch eine Reifung der Zellen induzierten. Wie auch normale LC in der Epidermis (TEUNISSEN ET AL., 1997B) waren die frisch isolierten Zellen gekennzeichnet von einer dendritischen Morphologie mit wenigen zytoplasmatischen Ausläufern und einer starken Expression von CD1a und HLA-DR.

5.2 Phänotyp der isolierten Zellen

Die FACS-Analysen (**Abb. 4**) ergaben für einige Adhäsionsmoleküle auf frischen LC eine mäßige bis starke Expression. CD11c ist die α X-Untereinheit des Integrins CR4 und bindet Fibrinogen. Diese FACS-Daten werden von früheren Untersuchungen mit der Immun-Histochemie unterstützt (DE GRAAF ET AL., 1995). Das ebenfalls auf nahezu allen LC gefundene CD44 ist ein Oberflächenrezeptor der extrazellulären Matrix für Hyaluronsäure. Es konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen CD44-Epitope die Emigration von LC aus der Epidermis und eine Hapten-induzierte Hypersensibilitätsreaktion des verzögerten Typs inhibieren (WEISS ET AL., 1997). Eine *in vitro*-Studie belegte, dass TNF- α mit einer Verstärkung und IL-10 mit einer Verminderung des Expressionslevels von CD44 bei LC dieses Antigen in der Zellkultur reziprok regulieren können (OSADA ET AL., 1995). Ob CD44 bei der Migration von LC eine Rolle spielt, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Auch für CD49f und CD50 (ICAM-3) konnten hohe konstitutive Level gemessen werden, die älteren Literaturdaten entsprechen (LE VARLET ET AL., 1991; TEUNISSEN ET AL., 1990).

Alle LC exprimieren die gemeinsame β 1-Kette der VLA (*very late antigen*)-Moleküle, aber die Expression der α -Ketten (CD49a-f Subtypen) ist heterogen. Die geringen Level von CD49d und CD49e, die bei der Mehrzahl der LC gefunden werden konnten, stimmen mit den Daten von *ex vivo* generierten humanen LC (RIEDL ET AL., 2000; STRUNK ET AL., 1997) überein. Auch das Adhäsionsmolekül CD54 (ICAM-1) wurde von der Mehrzahl der LC gering exprimiert (**Abb. 4**). Anders als E-Cadherin (BORKOWSKI ET AL., 1994) wird dieses Oberflächenantigen bei der Emigration der LC aus der Epidermis stark hochreguliert (CUMBERBATCH ET AL., 1992), um eine antigenpräsentierende Aktivität zu erwerben oder um Zellaggregate zu bilden.

Die isolierten LC zeigten keine Expression für das kostimulatorische Molekül CD80 oder für den Reifungsmarker CD83. Ein anderes kostimulatorisches Molekül, CD86, wurde schwach exprimiert gefunden und in der Zellkultur nach einem Tag spontan hochreguliert. Dieser Befund steht im Widerspruch zu einem früheren Bericht (SYMINGTON ET AL., 1993), wird andererseits durch neuere Studien mit normalen humanen LC (COMPANJEN ET AL., 2001) bestätigt. Eine Aktivierung der LC konnte nicht durch die Präparation und die CD1-Isolierung

bedingt gewesen sein, da die Dauer der Zellmanipulation mit im Durchschnitt 6 h nicht ausreicht, um CD86 zu neoexprimieren. Insgesamt erscheint eine tatsächliche Oberflächen-Expression des CD86 bei LC in der Haut wahrscheinlich. Das legen auch Beobachtungen über eine konstitutive Expression von CD86 bei drei unreifen Populationen dendritischer Zellen aus der Milz normaler Mäuse (KAMATH ET AL., 2000) und bei aufgereinigten LC (CAUX ET AL., 1994; MCLELLAN ET AL., 1998) nahe. Auf LC, die mit der hier vorgestellten CD1-MACS Methode isoliert worden waren, konnte eine konstitutive Oberflächenexpression für ein weiteres kostimulatorisches Molekül, ICOS-L (*inducible costimulator ligand*), gefunden werden (WITSCH ET AL., 2002).

Die effektive Isolierung von reinen und viablen humanen LC ermöglichte jetzt neue Einblicke in ihre phänotypischen und funktionalen Eigenschaften und ihr Verhalten in der Zellkultur. Die Messungen bestätigten in Bezug auf die Chemokinrezeptoren, dass epidermale unreife LC CCR5 exprimieren (**Abb. 4**), CCR7 jedoch fehlt (YANAGIHARA ET AL., 1998; ZAITSEVA ET AL., 1997). Für den Chemokinrezeptor CXCR4 wurden bislang nur eine intrazelluläre Expression in frischen humanen LC und ein Transport zur Zelloberfläche während der *in vitro* Kultur beschrieben (ZAITSEVA ET AL., 1997; ZOETEWIJ ET AL., 1998). Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen konnte in den hier beschriebenen Versuchen wie auch in einer anderen Publikation (TCHOU ET AL., 2001) deutlich Oberflächen-Expression von CXCR4 gefunden werden.

Außer der hier gemessenen und bereits gut dokumentierten Expression von CD40 (COMPANJEN ET AL., 2001; PEGUET-NAVARRO ET AL., 1995; RATTIS ET AL., 1998) wurde bei CD1-sortierten LC die Expression des entsprechenden Liganden CD154 (CD40L, TRAP) gefunden, wenn auch auf geringem Niveau. Vor kurzem wurde berichtet, dass frisch isolierte LC aus der Maus mRNA und intrazelluläres Protein, jedoch kein CD40L auf der Zelloberfläche zeigen (SALGADO ET AL., 1999).

Die Expression von Todesrezeptoren in normalen LC ist weitgehend unbekannt, abgesehen von TNF-RII. Dieser Rezeptor wird stark von unreifen Zellen gezeigt und spielt eine entscheidende Rolle bei der Auslösung der Migration während der Zellreifung (TAKAYAMA ET AL., 1999). Die durch Sortierung mit CD1a und CD1c gewonnenen Zellen wiesen nicht nur starkes Vorkommen von TNF-RII auf, sondern auch eine wenn auch schwache Expression

von TNF-RI. Darüber hinaus waren die Zellen etwas positiv für den Apoptoserezeptor Fas und den Liganden FasL. Es liegen zurzeit nur Berichte vor, die zeigen, dass reife LC diese Todesrezeptoren exprimieren können (KAWAMURA ET AL., 1999, 2000; SKIBAKI UND KATZ, 2001). Es kann spekuliert werden, dass sich LC in der Zellkultur untereinander über Ligand-Rezeptor-Interaktionen in die spontane Apoptose bringen (**Abb. 12 A**).

Anders als bei früheren Analysen humaner LC, die durch Dichtegradienten aufgereinigt worden waren (PEGUET-NAVARRO ET AL., 1995), konnten GM-CSF und CD40L die Viabilität isolierter LC in der Zellkultur nicht verbessern. Eine höhere Viabilität konnte bei isolierten LC durch in der Zellkultur zugesetztes TGF- β 1 beobachtet werden. Auch bei TGF- β 1-transfizierten dendritischen Zellen wird über ein erhöhtes Überleben bei Transplantationsexperimenten mit allogenen Mäusen berichtet (LEE ET AL., 1998).

5.3 Stimulation von T-Helferzellen

Ein Einwand gegen den Einsatz von CD1-Molekülen bei der Isolierung von LC, eine mögliche Zellaktivierung, konnte durch funktionelle Untersuchungen in der gemischten Leukozyten-Reaktion (MLR) entkräftet werden. Dabei wiesen unstimulierte CD1a- und CD1c-isolierte LC keine Anzeichen einer funktionellen Reifung auf (**Abb. 9, Abb. 20**). Sie hatten unstimuliert nur begrenzte allostimulatorische Kapazität in einer MLR und zeigten mit einer Verstärkung der T-Zell-Antwort Sensitivität gegenüber LPS, SEA und IFN- γ . Zellen, die mit CD1a oder CD1c angereichert wurden, waren also weder durch die Prozedur der Isolierung aktiviert noch war ihr Potenzial eingeschränkt, durch geeignete Stimuli selektiv aktiviert zu werden.

5.4 Zytokinsekretion der isolierten Zellen

Wegen der Schwierigkeiten, reine Präparationen humaner LC aus der Epidermis zu gewinnen, ist ihr Potenzial, inflammatorische Zytokine zu produzieren, noch nicht vollständig

aufgeklärt. Die hier vorgestellten RT-PCR Daten zeigten (**Abb. 7**), dass unstimulierte humane LC durch eine konstitutive Expression von IL-6, IL-8 und TGF- β gekennzeichnet sind. Eine Expression von mRNA und Protein für IL-6 ohne vorherige Stimulation ist bisher nur für murine epidermale LC berichtet worden (CUMBERBATCH ET AL., 1996; SCHREIBER ET AL., 1992). Die Detektion von Transkripten für IL-8 bestätigt neuere Beschreibungen (NAKAGAWA ET AL., 1999) und gibt weitere Hinweise darauf, dass bereits unstimulierte LC zu der Produktion dieses Chemokins in der normalen humanen Epidermis beitragen. TGF- β ist entscheidend an der Entwicklung der LC aus CD34⁺Vorläufern, an der Viabilität und an der Erhaltung des unreifen Stadiums der epidermalen LC beteiligt (BORKOWSKI ET AL., 1996; GEISSMANN ET AL., 1999; STROBL ET AL., 1996). Die beiden zuletzt genannten Effekte werden der Produktion und Freisetzung von TGF- β aus dem epidermalen Mikromilieu zugeschrieben (BORKOWSKI ET AL., 1996; GEISSMANN ET AL., 1999). Die Detektion von TGF- β mRNA in CD1c-isolierten Zellen legt nahe, dass epidermale LC dieses Zytokin selbst produzieren und so zu der Regulation ihrer eigenen zellulären und funktionalen Eigenschaften in autokriner oder parakriner Weise beitragen.

Während der LC-Reifung und insbesondere während der frühen Ereignisse bei der Kontakthypersensibilität wurde eine Hochregulation der Zytokine IL-1 β und TNF- α bei LC gezeigt (ENK UND KATZ, 1992; HEUFLER ET AL., 1992; LARRICK ET AL., 1989; SAUDER ET AL., 1984). Die Mehrzahl dieser Untersuchungen wurde jedoch mit nur zum Teil angereicherten Präparationen von LC durchgeführt und konnte deshalb die Möglichkeit, dass die verstärkte Produktion von IL-1 β und TNF- α durch kontaminierende Keratinozyten hervorgerufen wurde, nicht ausschließen. In den in dieser Arbeit vorgestellten Analysen wurden Transkripte für diese Zytokine in unstimulierten LC gefunden. Erst eine Stimulation mit LPS oder IFN- ω induzierte die Transkription von IL-1 β , TNF- α und zusätzlich die von GM-CSF. GM-CSF war bisher nur in der Immunhistochemie gefunden worden (LORE ET AL., 1998). Die Detektion dieser pro-inflammatorischen Zytokine bereits 4 h nach der Stimulation weist darauf hin, dass unreife LC unmittelbar auf eine Stimulation antworten können.

Die Transkripte der IL-12 Untereinheiten p35 und p40 fehlten in frisch isolierten LC auch nach Stimulation mit LPS. Von humanen myeloiden Blut-DC hingegen ist dieses Zytokin als Antwort auf Bakterien, Viren und Protozoen sezerniert worden (REIS E SOUSA ET AL., 1999).

Die CD1c-isolierten LC setzten jedoch bioaktives IL-12p70 nach Querverbindung mit CD40L frei. Die Sekretion der geringen Mengen IL-12p70 scheint nicht durch die Prozedur der Isolierung verursacht zu sein. LC, die *in vitro* aus Blut-Monozyten generiert worden waren und dann ebenfalls über CD1c sortiert wurden, setzten erst nach Stimulation große Mengen des Proteins von IL-12 frei (**Abb. 16**). Die Ergebnisse dieser Arbeit werden bestätigt durch Berichte, nach denen das IL-12-Protein nicht in den Zellkultur-Überständen von unstimulierten LC und von CD40L- oder IFN- γ -stimulierten humanen LC gefunden wurde (NAKAGAWA ET AL., 1999). Diese Zellen wurden in der Zellkultur durch Auswanderung aus Epidermis-Streifen gewonnen.

In dieser Arbeit konnte erstmals die Untereinheit p28 eines neu beschriebenen Zytokins aus der IL-12-Familie, IL-27, nachgewiesen werden. Die p28-Genexpression war in einer Studie über die Zell- und Gewebe-Verteilung in Monozyten und in murinen, aktivierten Makrophagen, im Thymus der Maus, aber nicht in der Haut gefunden worden (PFLANZ ET AL., 2002). Bei humanen MoDC war eine Expression des p28-Gens durch LPS induziert worden, aber wie in der vorliegenden Untersuchung mit LC konnte die andere Untereinheit für das funktionelle Heterodimer-Protein IL-27, *Epstein Barr virus-induced protein 3*, EBI3, nicht detektiert werden. Des Weiteren zeigten CD40L und LPS in der Induktion von p28 in der zitierten Studie bei MoDC und in den eigenen Analysen bei LC synergistische Wirkung.

Die konstitutive Expression des IFN- γ -induzierenden Zytokins IL-18 in humanen LC ist ein neuer Befund (**Abb. 8**). Bei murinen LC wurde Sekretion von IL-18 einen Tag nach Stimulation der Maus mit dem Allergen TNCB (Trinitrochlorobenzen) gemessen (STOLL ET AL., 1998). Ein anderes T-Zell-regulierendes Zytokin, IL-15, wurde nicht konstitutiv exprimiert und nach keiner Stimulation in LC gefunden. Für CD34-generierte LC ist hohe Sekretion, allerdings nach Stimulation mit IL-1 β , IL-6, TNF- α und PGE₂ publiziert (RATZINGER ET AL., 2004). Da diese Zytokinkombination LC nicht nur stimuliert, sondern auch zu vollständig reifen dendritischen Zellen ausdifferenziert, sind diese Zellen mit epidermalen LC nicht vergleichbar.

Wie die MLR-Untersuchungen der LC (**Abb. 9**) in dieser Arbeit gezeigt hatten, konnte die Stimulation der Zellen mit LPS, SEA oder IFN- γ ihre stimulatorische Kapazität nicht so weit verstärken, wie es für vollreife akzessorische Zellen beschrieben ist (HEUFLER ET AL., 1988).

Die Induktion von IFN- γ bei kokultivierten CD4⁺T-Zellen zeigt eine Differenzierung in Richtung T_H1-Effektorzellen zumindest bei einem Teil der CD4⁺T-Population an. Dieser Befund überrascht in Anbetracht der Tatsache, dass kein IL-12 in ELISA und RT-PCR bei frischen LC gefunden werden konnte. Da CD4-isolierte T-Zellen aus dem Blut hinsichtlich ihres Differenzierungsgrades eine Mischpopulation darstellen, wurde möglicherweise das IFN- γ bei den Kokulturen in bereits ausdifferenzierten T_H1-Effektorzellen induziert. Andere, erst kürzlich beschriebene Mitglieder der IL-12-Zytokin-Superfamilie, wie IL-23 und IL-27, aber auch IL-18 (TRINCHIERI, 2003), könnten bei dieser Induktion von IFN- γ durch epidermale LC eine Rolle spielen. Folglich ist es vertretbar, anzunehmen, dass physiologische, der Epidermis entstammende LC, wie auch andere Thymus- und Milz-DC (HOCHREIN ET AL., 2000; SCHULZ ET AL., 2000), komplexere Aktivierungs-Signale benötigen, um das Niveau professioneller, den *in vitro* generierten reifen MoDC entsprechenden APC zu erreichen.

Seit dem Bericht von SCHULER UND STEINMAN aus dem Jahr 1985 wird allgemein angenommen, dass epidermale LC, die aus normaler humaner oder muriner Haut isoliert werden, in der Zellkultur spontan einen kontinuierlichen Reifungsprozess vollziehen. Dieser Reifungsprozess wurde bei allen Isolierungstechniken, die angewendet wurden, beobachtet und ist assoziiert mit einem hohen Ausmaß an morphologischen, phänotypischen und funktionellen Veränderungen. Dazu zählen der Verlust der Birbeck Granulae und der CD1a-Expression, Hochregulierung der Expression von MHC-II Molekülen, von kostimulatorischen Molekülen und des Reifungsmarkers CD83 (**Abb. 13**). Des Weiteren wurde auch über eine Zunahme der allostimulatorischen Kapazität in der MLR berichtet (TEUNISSEN ET AL., 1997B). Die LC, die durch CD1a- und CD1c-Sortierung erhalten wurden, wiesen keine signifikanten Veränderungen in ihrem Differenzierungsgrad allein durch Zellkultur auf. Nach den ersten Kulturtagen jedoch zeigten die isolierten Zellen eine deutlichen Abnahme ihrer Viabilität (**Abb. 10-12**), ein Phänomen, das auch für kultivierte LC, die mit anderen Anreicherungstechniken erhalten wurden, beschrieben ist (LIU ET AL., 1994; SCHULER UND STEINMAN, 1985; TEUNISSEN ET AL., 1990; WITMER-PACK ET AL., 1987).

Eine ursprünglich für die Anreicherung von murinen und humanen LC entwickelte Präparationstechnik ist die Haut-Organkultur (ROMANI ET AL., 1989; LARSEN ET AL., 1990; POPE ET AL., 1995). Mit dieser Methode kann auf enzymatische Spaltung von Zellkontakten

durch den Einsatz von Trypsin verzichtet werden. Dabei wandern LC in zwei bis drei Tagen Zellkultur spontan aus geschnittenen kutanen Streifen in das Medium. Die Fraktion der nicht-adhärenen Zellen besteht bis zu 80 % aus LC. Im direkten Vergleich mit CD1a/CD1c-isolierten Zellen zeigten nach dem Modell der Haut-Organkultur emigrierte Zellen desselben Spenders deutlich weniger Zellen Expression von CD1a und HLA-DR (**Abb. 6**). Diese migrierten Zellen zeigten in anderen Analysen von Tag 1-3 eine kontinuierliche Ausreifung im Phänotyp und bei allogenen MLR-Tests (ORTNER ET AL., 1996). Aus diesen Gründen haben Haut-Organulturen für die Untersuchung unreifer LC eine eher eingeschränkte Aussagekraft. In Protokollen, bei denen LC mittels diskontinuierlicher Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert wurden, wurde durch den Gradienten Zellstress induziert (ESSER, 1992) und auch der Reinheitsgrad lag unter dem der Methode von CD1c-MACS. Neben CD1a und CD1c lassen sich auch über ein anderes spezifisches Antigen, das kutane Leukozyten-Antigen (CLA), aus TGF- β -generierten CD34⁺Vorläufern LC-ähnliche Zellen anreichern, denen allerdings die Birbeck-Organellen fehlen (BARTZ ET AL., 2003).

Zusammenfassend bietet die CD1a- und insbesondere die CD1c-Mikrobead Zell-Sortierung eine Isolierung von reinen, viablen und funktionell intakten Zellen. Diese Zellen erhalten ihren unreifen Status und erfahren keine signifikante spontane Reifung in der Zellkultur. Deshalb stellen diese Zellen ein geeignetes Modell dar, um phänotypische und funktionelle Eigenschaften von epidermalen LC aufzuklären. Sie bieten sich außerdem an, um die größtenteils immer noch unbekannt, zellulären und molekularen Mechanismen, die ihrer Differenzierung, der immunostimulatorischen Kapazität und der Migration zu Grunde liegen, zu untersuchen. Darüber hinaus ist es vertretbar, anzunehmen, dass die homogene und definierte Population physiologischer LC, die durch das hier vorgestellte Protokoll erhalten werden, für die Entwicklung von immuno-therapeutischen Vakzinen geeignet sein können.

5.5 Stimulation von LC und MoLC

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die CD1c-isolierten LC mit MoLC, die ein Äquivalent aus der *in vitro* Kultur für LC darstellen, auf ihre Antwort nach Stimulation verglichen. Obwohl schon seit längerer Zeit bekannt ist, dass LC funktionelles CD40 auf ihrer

Zelloberfläche exprimieren (CAUX ET AL., 1994; PEGUET-NAVARRO ET AL., 1995), ist relativ wenig bekannt über die Rolle dieses Rezeptors während der phänotypischen und funktionellen Reifung der Zellen. Ursprünglich war herausgefunden worden, dass LC, die aus CD34⁺Vorläufern generiert wurden, in Kokultur mit CD40L-transfizierten T-Zellen eine höhere Überlebensrate zeigen, MHC-Klasse-II-Moleküle auf der Zelloberfläche stabil bleiben und CD58, CD80 und CD86 hochreguliert werden (CAUX ET AL., 1994). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die Ligation von CD40 phänotypische, morphologische und funktionelle Veränderungen in unreifen epidermalen LC induziert. Diese Veränderungen unterschieden sich von denen bei CD40-stimulierten MoLC (**Abb. 14**). Zusätzlich zu dieser Kostimulation wurden die Zellen mit Zytokinen oder Gefahren-Signalen stimuliert. Die TLR-Liganden Petidoglycan und LPS wurden gewählt, da ihre entsprechenden Rezeptoren, TLR2 und TLR4, auf den isolierten LC im FACS detektiert worden waren (nicht gezeigt). Diese Expression wird auch in der RT-PCR Analyse in einem neueren Bericht in murinen LC gefunden (MITSUI ET AL. 2003). Da weitere Daten zur TLR-Expression auf LC auch wegen der noch fehlenden Antikörper nicht vorliegen, ist auch nicht bekannt, ob der Rezeptor von Flagellin, TLR5 auf der Oberfläche von LC zu finden ist.

5.6 Phänotyp und Zytokin-Freisetzung von stimulierten LC

Nach der Ligation von CD40 kennzeichnete die LC eine konservierte Expression von HLA-DR und eine starke Hochregulation des Adhäsionsmoleküls CD54 und des kostimulatorischen Moleküls CD86 (**Abb. 19**). Darüber hinaus neoexprimierten nahezu alle epidermalen LC CD83 (**Abb. 18**) nach Aktivierung über CD40. Dieser phänotypische Reifungsprozess war jedoch nicht von einer verstärkten Expression eines weiteren kostimulatorischen Moleküls, CD80, begleitet und auch nicht von einer starken Freisetzung des inflammatorischen IL-12p70 (**Abb. 16**). Jedoch sezernierten LC nach Stimulation mit LPS noch stärker als MoLC IL-10 (**Abb. 17**).

In einem früheren Bericht wurde die Induktion von CD80 nur bei humanen LC, die in Gegenwart von GM-CSF stimuliert wurden, beobachtet (PEGUET-NAVARRO ET AL., 1995). Das Ausbleiben einer massiveren Sekretion von IL-12, gerade nach einer Stimulation mit IFN- γ ,

LPS oder anderen TLR-Liganden, steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Nakagawa (NAKAGAWA ET AL. 1999), die eine Hochregulation der mRNA für IL-12p35 und p40 feststellten, aber keine Sekretion des bioaktiven IL-12. In einem der wenigen Berichte über IL-12 in LC wurde die Synthese des Zytokins in CD1a-angereicherten humanen epidermalen LC beobachtet. Der mRNA-Level von IL-12p40 nahm bereits spontan zu (KANG ET AL., 1996). Im Gegensatz dazu wurde bei murinen LC eine Sekretion von IL-12 nach Ligation von CD40 festgestellt, aber dieser Effekt ist höchstwahrscheinlich auf die Voraktivierung der Zellen durch das Isolierungsverfahren mit Bindung von Molekülen der MHC-Klasse-II zurückzuführen (TADA ET AL., 2000; 2001).

Wie es bei CD1c⁺dendritischen Zellen des peripheren Blutes festgestellt wurde (JEFFORD ET AL., 2003), induzierten auch LC eine Proliferation von T-Zellen und eine Freisetzung von IFN- γ trotz ausbleibender massiver Produktion von IL-12. Das könnte darauf hinweisen, dass natürliche dendritische Zellen einen bisher noch nicht identifizierten T-Zell-aktivierenden Faktor herstellen.

Die Untersuchungen von CD40-stimulierten LC im Elektronenmikroskop zeigten, dass die Zellen ihre Birbeck Granulae erhalten und Merkmale zellulärer und endozytotischer Aktivierung ausbilden (**Abb. 15**). Ähnliche Veränderungen werden typischerweise bei epidermalen LC nach epikutaner Applikation von kontaktsensibilisierenden Substanzen beobachtet (KOLDE UND KNOP, 1987). Terminal gereifte LC hingegen verlieren ihre Birbeck Granulae und ähneln dem Zell-Segel (veils) ausbildenden Typ dendritischer Zellen (TEUNISSEN ET AL., 1997B). Eine zelluläre Aktivierung ohne terminale Reifung der CD40-stimulierten LC wird auch von den Ergebnissen der MLR-Analysen, die eine mäßige Zunahme der stimulatorischen Kapazität zeigten (**Abb. 20**), bestätigt. Eine solche partielle Aktivierung durch Ligation von CD40 wurde auch bei murinen LC aus der Epidermis gefunden (JOLLES ET AL., 2002).

5.7 Phänotyp und Zytokin-Freisetzung von stimulierten MoLC

Nach den Veröffentlichungen von Geissmann (GEISSMANN ET AL., 1998; 1999; 2002) zu diesem Thema entsprechen MoLC in vieler Hinsicht und trotz der wenigen vorhandenen Birbeck Granulae unreifen epidermalen LC. Es gibt des Weiteren Hinweise aus Untersuchungen mit dendritischen Zellen, dass isolierte CD11c⁺dendritische Zellen, die aus dem Blut über MACS-Depletion gewonnen wurden, trotz ähnlichen Phänotyps eine deutlich geringere proliferative Antwort in der MLR zeigten als generierte dendritische Zellen (OSUGI ET AL., 2002). Die *in vitro* Differenzierung von MoLC unterscheidet sich von der der MoDC nur durch das in der Kultur zugesetzte TGF- β . Da dieses Zytokin in den LC selbst induziert werden konnte und TGF- β eine ubiquitär supprimierende Wirkung vorweist, kann spekuliert werden, ob nicht epidermale LC und MoLC bei Blockierung dieses Zytokins höhere T-Zell-Antworten induzieren können.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass MoLC eine weniger distinkte und homogene Zellpopulation als LC, die aus humaner Epidermis durch CD1c-Sortierung gewonnen wurden, darstellen (**Abb. 14, Abb. 19**). Trotzdem konnte, wie auch bei Geissmann (GEISSMANN ET AL., 1999), beobachtet werden, dass MoLC in ähnlicher Stärke wie LC funktionelles CD40 exprimieren und nach der Bindung mit dem Liganden einem Reifungsprozess unterliegen, der von einer Hochregulation des CD80 begleitet ist.

Eine Stimulation der MoLC mit CD40L erbrachte des Weiteren eine Freisetzung großer Mengen an IL-12p70 (**Abb. 16**). Zusätzliche Stimulation mit TLR-Liganden verstärkte allein im Fall von LPS, aber hier um das fast 10-Fache, die sezernierte Menge an IL-12. Bemerkenswerterweise konnte die Sekretion von IL-12 nicht durch die externe Zugabe von TGF- β gehemmt werden. Im Gegenteil verstärkte dieses anti-inflammatorische Zytokin wie auch das inflammatorische IFN- γ die Level von IL-12 bei MoLC. Trotz der phänotypischen und funktionellen Reifung glichen die CD40-stimulierten MoLC nicht solchen Zellen, die als terminal gereifte APC bezeichnet werden, denn MoLC wiesen, anders als bei den Untersuchungen von Geissmann (GEISSMANN ET AL., 1999), eine mäßige Hochregulierung der Expression von CD83 und eine eher schwache Zunahme der allostimulatorischen Kapazität

auf. Eine nur selektive Reifung war auch auf LC gefunden worden, die aus GM-CSF-mobilisierten Vorläufer-Zellen generiert werden konnten (GATTI ET AL., 2000).

Neben der deutlich erhöhten Freisetzung von IL-12 ergab die Stimulation von MoLC mit LPS, Peptidoglykan oder Flagellin wie bei den epidermalen LC auch eine Sekretion von IL-10 (**Abb. 17**). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Daten früherer Untersuchungen und der vorherrschenden Auffassung, dass LC, anders als dendritische Zellen, dieses immuno-suppressive Zytokin nicht herstellen können (TEUNISSEN ET AL., 1997A; CAUX ET AL., 1999; GEISSMANN ET AL., 1999). In den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten wurden die höchsten Sekretionswerte für beide Zytokine in den Zellkultur-Überständen aus denselben Platten-Näpfen gemessen und zu demselben Zeitpunkt nach 18 Stunden. Dieser Befund weist darauf hin, das TGF- β und IL-10 nicht die Freisetzung des inflammatorischen Gegenspielers, des IL-12, zu hemmen vermögen. Folglich werden IL-12p70 und IL-10 in CD83⁺ MoLC und LC nicht exklusiv exprimiert.

Die Detektion von IL-10 in MoLC kann nicht auf kontaminierende dendritische Zellen, die sich in der Zellkultur aus Monozyten differenziert haben, zurückgeführt werden. Eine verstärkte Sekretion von IL-10 wurde nämlich auch in der Situation, bei der auch während der 18 Stunden Stimulation extern TGF- β zugegeben worden war, gefunden. TGF- β ist entscheidend an der LC-Entwicklung aus Monozyten beteiligt (GEISSMANN ET AL., 1998; GEISSMANN ET AL., 1999). Es ist kürzlich erkannt worden, dass die autokrine IL-10-Produktion bei CD40L- und Bakterien-stimulierten dendritischen Zellen die Reifung, Migration und Sekretion von IL-12 der Zellen einschränkt (CORINTI ET AL., 2001; DEMANGEL ET AL., 2002). Dadurch können unangemessene T_H1-Immunantworten verhindert und erfolgreiche wieder abgeschaltet werden. Sollte dieser Hemmeffekt ebenfalls für reifende LC gelten, zumindest nach entsprechender Stimulation, so muss dieser noch experimentell im Detail überprüft werden.

Um auch bei von MoLC eine homogenere Population zu erhalten, wurde für diese Zellen hier erstmals das CD1c MACS-Protokoll angewendet, das für die Isolierung der epidermalen LC entwickelt worden war. Die MoLC als ganze Population zeigten ähnliche phänotypische Veränderungen auf einem schwächeren Niveau nach der Aktivierung von CD40. Nachdem diese Zellen allerdings über CD1c isoliert worden waren, enthielt die CD1c-positive MoLC-

Fraktion nach Stimulation eine distinkte Population, die zu hoher Expression von HLA-DR, CD54, CD86 und, anders als bei den epidermalen LC, hoher Expression von CD80 befähigt war.

5.8 Expressionsanalyse von stimulierten MoLC auf mRNA-Ebene

Trotz der sehr großen Datenmengen, die mit den Mikroarrays erhalten werden, erbrachten Untersuchungen an dendritischen Zellen bereits konkrete, neue Erkenntnisse. So konnten das T-Zell-Zytokin IL-2 (GRANUCCI ET AL., 2001) in dendritischen Zellen und die entscheidende Rolle des Transkriptionsfaktors Id2 bei der LC-Differenzierung (HACKER ET AL., 2003) entdeckt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Expressionsanalyse von stimulierten MoLC unternommen. Da wegen der benötigten RNA-Mengen nicht mit CD1c-isolierten epidermalen LC gearbeitet werden konnte, wurden die MoLC, um möglichst LC-ähnliche Zellen zu erhalten, nach der Generierung ebenfalls über CD1c isoliert.

In der Analyse wurde ein Schwellenwert für differenzielle Expression bei einem Signalquotienten $\geq 1,5$ festgelegt. Die differenzielle Expression von IL-1 β , TNF- α , GM-CSF, IL-6 und IL-8 bestätigte die Ergebnisse der Multiplex-PCR mit RNA von epidermalen LC (4.1.6). In der Mikroarray-Analyse hatten von den 60 positiv differenziell exprimierten Genen IL-6 und IL-12p40, TNF- α , GM-CSF, CD40L, CD70, I κ B α und Bcl-2-A1 hohe Signalquotienten von 40 bis über 90 (Abb. 22-24). Diese starke Regulation der Transkript-Expression von Genen inflammatorischer Zytokine, der Zellaktivierung und der Apoptose-Inhibition sind deutliche Hinweise auf eine erfolgte Stimulation der MoLC. Dabei können die Effekte nicht direkt dem Einfluss von LPS oder CD40L zugeordnet werden. Diese Stimuli wurden eingesetzt, da eigene Befunde (Sekretion von IL-12p70, 4.3.3) einen starken und synergistischen Effekt zeigten.

In anderen Expressionsanalysen von dendritischen Zellen hatten LPS-tragende gram-negative Bakterien (GRANUCCI ET AL., 2001) und CD40L (TÜRECI ET AL., 2003; MOSCHELLA ET AL.,

2001) eine Regulation der Genexpression gezeigt. In der Stimulationsstudie mit *E. coli* wurde nach 6 h ebenfalls differenzielle Expression für IL-1 α , IL-6, IL-12p40, IL-15, TNF- α , BCL-X, STAT5A und NF κ B1 (p105) gefunden. In den Analysen mit cDNA-Array (MOSCHELLA ET AL., 2001) induzierte das CD40L-Trimer in MoDC nach 6 h verstärkte Expression von IL-6, IL-8 und IL-12p40. Bei der anderen Mikroarray-Untersuchung mit CD40L-stimulierten MoDC (TÜRECI ET AL., 2003) wurden nach einer anderen Stimulationszeit (2 h) IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , NF κ B1 und I κ B ebenfalls positiv differenziell exprimiert gefunden. Zu diesem frühen Zeitpunkt war jedoch keine Zunahme der Transkripte von Bcl-2 und Bcl-X gemessen worden. Eine Aktivierung des NF κ B-Wegs durch die Bindung von CD40 ist jedoch bei dendritischen Zellen nachgewiesen (QUEZADA ET AL., 2004) und bewirkt eine Freisetzung von Entzündungsmediatoren und anti-apoptotischen Faktoren, die für Zellreifung und Überleben der dendritischen Zellen von zentraler Bedeutung sind.

Die Expression der Überlebensfaktoren Iap-1, Bcl-2 und Bcl-X wird von NF κ B verstärkt (KARIN UND LIN, 2002). Dieser Transkriptionsfaktor wurde auf dem MoLC-Array in der vorliegenden Arbeit in den Proteingruppen NF κ B1 (p105) und NF κ B2 (p100) differenziell exprimiert gefunden (**Abb. 24**). Eine Zunahme der Transkriptmenge ergibt keine direkte Aussage über ablaufende Prozesse der Signaltransduktion. Dennoch erscheint eine Verstärkung der Transkription von NF κ B1 und NF κ B2, die nach Prozessierung die Proteine p50 und p52 produzieren, nach einer Zellaktivierung wahrscheinlich. Nachdem I κ B durch das 26 S Proteasom degradiert worden ist, kann das Heterodimer aus p50-RelA im klassischen NF κ B-Signalweg vom Zytoplasma in den Kern gelangen (CHEN ET AL., 2004). Eine solche Translokation läuft auch beim Heterodimer aus p50-RelA im alternativen NF κ B-Signalweg ab. Da der klassische Weg bei Zellstimulation mit LPS, der alternative Signalweg bei Stimulation mit CD40L von der Zelle passiert wird, könnte die verstärkte Expression von NF κ B1 und NF κ B2 ein Hinweis auf Nachproduktion beider Proteine nach einer Stimulation sein. Wie auch beim degradierten I κ B könnten beide auf dem Mikroarray differenziell exprimierten NF κ B1 und NF κ B2 parallel über den klassischen (LPS) und den alternativen Signalweg (CD40L) durch Prozessierung zu p50 und p52 verbraucht worden sein. Dann würde eine verstärkte Expression einen *feedback*-Mechanismus zur Nachproduktion von Transkriptionsfaktoren darstellen. Eine negative *feedback*-Schleife wird in der Folge der NF κ B-Signaltransduktion über Expression von SOCS-Genen, die Signaltransduktion der

Zytokine des Januskinase- (JAK)/STAT-Wegs wieder abschwächen, vermittelt (ALEXANDER UND HILTON, 2004). So könnte über die SOCS-Expression während einer Immunreaktion bereits ihre spätere Abschaltung zur Wiederherstellung der Zellhomöostase eingeleitet werden. Insgesamt zeigten die Mikrochip-Analysen mit der Expression von Genen inflammatorischer Zytokine, von Differenzierungsantigenen und NF κ B-Transkriptionsfaktoren einen Entzündungszustand bei stimulierten MoLC an.

5.9 Ausblick

Wenn die Ergebnisse dieser Arbeit über LC im Zusammenhang betrachtet werden, ergibt sich ein einheitliches Bild. Eine optimierte Isolierungsmethode reichert LC an, die lebendig sind und durch die Präparation möglichst wenig stimuliert werden. Ein Vergleich dieser LC aus der Epidermis mit dendritischen Zellen, die aus Monozyten differenziert werden können, zeigt, dass die LC sich ebenfalls stimulieren lassen. Bei der Messung von Zytokinen, Oberflächenmolekülen und funktioneller Kapazität sind die Antworten auf verschiedene Stimuli größtenteils qualitativ und quantitativ anders. Das bedeutet, dass Forschungsergebnisse, die mit generierten dendritischen Zellen gewonnen werden, nur bedingt auf die Situation in der Haut übertragen werden können. Das gilt für Kontaktallergien, für persistierende Infektionen wie Leishmaniose und wahrscheinlich auch für Tumorerkrankungen der Haut. Möglicherweise benötigen LC in ihrer natürlichen Umgebung verschiedene oder andere Stimuli als MoLC aus der Zellkultur, um vollständig aktiviert zu werden. Anders als bei dem suppressiv wirkenden IL-10 konnte das Entzündungszytokin IL-12 hier bei LC erst nach Stimulation mit CD40-Ligand und einem TLR- oder Zytokinsignal gemessen werden. Und auch bei MoLC konnte eine starke Veränderung der Genexpression nach Stimulation mit zwei Signalen festgestellt werden. Die Wirkungsweisen dieser synergistischen Stimulation könnten für Therapien von Tumor- und Infektionskrankungen mit natürlichen dendritischen Zellen von großem Nutzen sein, um maximal aktivierte, immunreaktive Zellen zu gewinnen.