Universität Ulm
Universitätsklinik für Dermatologie und Allergologie
Ärztliche Direktorin: Prof. Dr. K. Scharffetter-Kochanek

Die Rolle der Mangan-Superoxiddismutase für die Funktion dendritischer Zellen im Kontext des Inflammaging

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Helen-Christine Weber
aus Stuttgart

Ulm 2013

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Johannes Weiss

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Margrit-Ann Geibel

Tag der Promotion: 15.01.2015

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung 1

1.1 Hautalterung 1

1.2 Dendritische Zellen und Langerhanszellen der Haut 2

1.3 Dendritische Zellen als antigenpräsentierende Zellen 3

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) 4

1.5 Mangansuperoxiddismutase in dendritischen Zellen 6

1.6 Ziel der Arbeit und Fragestellung 8

2 Material und Methoden 11

2.1 Material 11

2.1.1 Chemikalien 11

2.1.2 Reagenzien-Kits 12

2.1.3 Geräte 13

2.1.4 Verbrauchsmaterial 14

2.1.5 Antikörper 15

2.1.6 Software 16

2.2 Versuchstiere 16

2.3 Methoden 18

2.3.1 Präparation muriner Haut 18

2.3.2 Differenzierung muriner dendritischer Zellen aus Knochenmark 18

2.3.3 Gewinnung muriner T-Zellen 19

2.3.4 Einzelzellsuspension von Langerhanszellen 20

2.3.5 Zellkulturmethode 20

2.3.6 Immunfluoreszenzfärbung von Langerhanszellen in murinen Ohrhäutchen 21

2.3.7 Durchflusszytometrie 21

2.3.8 ELISA 22

2.3.9 FITC-Dextran Versuch mit und ohne Pyozyanin-Stress 23

2.3.10 Gemischte Lymphozytenreaktion 24

2.3.11 Kontakthypersensitivität gegen TNCB 25

2.3.12 Statistik 26

3 Ergebnisse 27

3.1 Ergebnisse bei Wildtyp-Mäusen 27

3.1.1 In menschlicher Haut und bei Mäusen nimmt die Langerhanszellzahl im Alter ab 27

3.2 Ergebnisse bei SOD2-heterozygot defizienten Mäusen 29
3.2.1 Heterozygote SOD2 Defizienz verändert die Expression von Oberflächenmolekülen auf LZ 29
3.2.2 Nach Behandlung mit Pyozyanin akkumulieren dendritische Zellen SOD2 heterozygoter Mäuse vermehrt ROS 30
3.2.3 Dendritische Zellen aus Knochenmark SOD2 heterozygoter Mäuse sind in ihrer Aktivierbarkeit eingeschränkt 32
3.2.4 Verminderte antigenpräsentierende Funktion bei der gemischten Lymphozytenreaktion 34
3.2.5 SOD2 heterozygote Mäuse haben eine verstärkte Kontakthypersensitivitätsreaktion gegen TNCB 36
3.3 Ergebnisse bei Mäusen mit selektiver SOD2 Defizienz in Langerhanszellen 37
3.3.1 Morphologie und Quantität von Langerhanszellen mit SOD2-Defizienz bei 6 Wochen alten Mäusen 37
3.3.2 Nach Behandlung mit Pyozyanin häufen SOD2 defiziente Langerhanszellen stärker Superoxidanion an, produzieren aber weniger ROS. 39
3.3.3 Kein signifikanter Unterschied im FITC-Dextran Phagozytose-Versuch bei epidermalen LZ 41
3.3.4 Verminderte MHC-II- und CD86-Expression auf SOD2 defizienten LZ 42
3.3.5 SOD2 defiziente Langerhanszellen haben keine veränderte T-Zell stimulatorische Kapazität in der gemischten Lymphozytenreaktion 43
3.3.6 Kontakthypersensitivität gegen TNCB 44

4 Diskussion 46
4.1 LZ Reduktion und Toleranz 46
4.2 Reaktive Sauerstoffspezies und SOD2 48
4.3 Dendritische Zellen, ihre Aktivierbarkeit und der Alterungsprozess 50
4.4 Phagozytosekapazität von LZ 51
4.5 Kontakt-Hypersensitivitätsreaktion (CHS) und antigen-präsentierende Funktion bei SOD2 Mangel und SOD2 Defizienz 52
4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick 54
4.6.1 Ausblick und Perspektiven 54

5 Zusammenfassung 56
6 Literaturverzeichnis 58
Danksagung 68
Lebenslauf 70

Abkürzungsverzeichnis

(m)AK	(monoklonaler) Antikörper
Ag	Antigen
APC	Allophycozyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
BD	Becton Dickinson
bzw.	beziehungsweise
°C	Temperatur in Grad Celsius
CHS	Kontakt-Hypersensitivitätsreaktion (Kontaktallergie)
CXCL1	Chemokine (C-X-C-motif) ligand 1
CXCL2	Chemokine (C-X-C-motif) ligand 2
DAPI	4’,6-Diamino-2-phenylindoldihydrochlorid
DNA	„deoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EDV	elektronische Datenverarbeitung
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EZ	Epidermalzelle
FACScan	Fluoreszenzaktivierter-Zell-Scanner
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HBSS	Hank’s salt solution
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
$[H]^3$-TdR	Tritium (radioaktives chemisches Element)
IgG	Immunglobulin G
IFN-γ	Interferon- γ
l	Liter
LZ	Langerhanszelle
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid

µl	Mikroliter
MACS	magnetic activated cell sorting
M(EC)LR	Mixed (Epidermal Cell) Leukocyte Reaction
mg	Milligramm
MHC Klasse II	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex Klasse II (major histocompatibility complex class II)
ml	Milliliter
mM	Millimol
mmol	millimolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrocin
PI	Propiumjodid
ROS	„reactive oxygen species“ (reaktive Sauerstoffradikale)
RPMI-1640	Zellkulturmedium
SOD	Superoxid Dismutase
TNBS	2,4,6-Trinitro-Benzol Sulfonsäure
TNCB	2,4,6-Trinitro-1-Chloro-Benzol
TNF	Tumornekrosefaktor
TR	Regulatorische T-Zelle
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TZ	Zytotoxische T-Zelle
u.a.	unter anderem
UVA	Ultraviolett-A
UVB	Ultraviolett-B
UVB-LZ	UVB-bestrahlte LZ
w	weiblich
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
%(v/v)	Volumenprozent
%(w/v)	Gewichtsprozent

1 Einleitung

1.1 Hautalterung

Die Alterung des Immunsystems führt nach heutigem Verständnis zu einem Ungleichgewicht zwischen entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Mechanismen, was zu einem chronisch proinflammatorischen Zustand führt, der “Inflamm-aging” genannt wird (Franceschi et al., 2007; Weiskopf et al., 2009). Im Rahmen des “Inflamm-aging” kommt es außerdem zu einem Rückgang der Hautimmunfunktion (Pawelec, 2006; Pawelec et al., 2005; Peters et al., 2009; Weiskopf et al., 2009). Die Haut, das Organ, das den Körper nach außen abschirmt, kommt direkt mit UV-Strahlung, Giften und Krankheitserregern in Berührung. Durch die verminderte Schutzfunktion der Haut treten während des Alterns zunehmend virale, bakterielle und Pilzinfektionen sowie Hauttumoren auf (Farage et al., 2009; Hegde et al., 2009; Sunderkotter et al., 1997). Zum Beispiel sind ältere Organismen anfälliger für invasive Staphylococcus aureus- und Tetanus-Infektionen (Laupland et al., 2003; Pascual et al., 2003) und zeigen eine schlechtere Immunantwort auf Impfstoffe. So ist bei Personen über 75 Jahre die T-Zell vermittelte Immunantwort weniger ausgeprägt und sie können weniger gut gegen Allergene sensibilisiert werden (Thivolet and Nicolas, 1990). Gleichzeitig sind Autoimmunkrankheiten und chronische Entzündungsprozesse in fortgeschrittenem Alter deutlich häufiger (Agrawal et al., 2012).

Der altersassoziierte Zerfall der Immunität wird als Hauptfaktor für diese Probleme angesehen. Es gibt einige Forschungsarbeiten, die sich darauf konzentrieren, altersassoziierte Veränderungen in der Immunfunktion zu identifizieren, in der Hoffnung, Interventionsstrategien zu entdecken, die die Immunalterung verlangsamen oder verhindern (Hodkinson et al., 2006; Miller, 1996; Rink et al., 1998).

1.2 Dendritische Zellen und Langerhanszellen der Haut

Als wichtige Komponente des Immunsystems der Haut kontrollieren verschiedene dendritische Zellen die Immunantwort und halten Immunität und Toleranz im Gleichgewicht (Merad et al., 2008; Nestle et al., 2009). Die Haut besitzt verschiedene DZ-Subtypen. In der Epidermis sind die Langerhanszellen (LZ) die funktionellen DZ, während sich verschiedene andere Typen dendritischer Zellen in der Dermis befinden (Kaplan et al., 2008; Merad et al., 2008; Romani et al., 2003). DZ der Haut nehmen Antigene auf, mit denen sie an der Körperoberfläche in Berührung kommen, und exprimieren sie, nach dem Transport zu den regionalen Lymphknoten, an ihrer Oberfläche, um eine geeignete Immunantwort hervorzurufen. Ein fein abgestimmtes funktionelles Gleichgewicht zwischen den verschiedenen DZ Untergruppen ist essentiell, um die Kontrolle über Toleranz und Immunität zu gewährleisten (Chu et al., 2011). Bei ihrer Auswanderung in den Lymphknoten durchläuft die LZ einen Reifungsprozess, in dessen Verlauf sie ihre Fähigkeit verliert, Antigen aufzunehmen und zu verarbeiten. Außerdem exprimiert sie verstärkt MHC-II und erwirbt eine hohe T-Zell-stimulatorische Kompetenz, indem sie Adhäsionsmoleküle, sowie kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 aufreguliert (Cohen et al., 2006; Steinman et al., 2003). Als reife Antigenpräsentierende Zelle kann die LZ nun bei ruhenden oder sensibilisierten T-Zellen eine Immunreaktion gegen ein Antigen auslösen. Es gibt Daten, die belegen, dass ein genau abgestimmtes funktionelles Gleichgewicht zwischen verschiedenen DZ Untergruppen besteht. Durch dieses Gleichgewicht werden Immunität und Toleranz der Haut kontrolliert (Merad et al., 2008; Nestle et al., 2009).

Informationen über altersabhängigen Umbau im DZ-Kompartiment der Haut gibt es wenig, doch deuten einige Studien, die Alterseffekte auf LZ erforscht haben darauf hin, dass die Anzahl der LZ in alternder Haut vermindert ist und dass gealterte LZ verminderte migratorische und antigenpräsentierende Fähigkeiten aufweisen (Cumberbatch et al., 2002; Gilchrest et al., 1982; Neale et al., 1997; Sprecher et al., 1990). Studien über den Effekt des Alterns auf in vitro aus Knochenmark generierten DZ sind widersprüchlich (Agrawal and Gupta, 2011).

Abweichend von der ehemaligen Annahme, Langerhanszellen seien die wichtigste Komponente antigenspezifischer Immunität, sieht man sie heutzutage als tolerogene Zellen. Vermutlich sind sie sowohl wesentlich am Aufbau von Selbsttoleranz beteiligt, als auch daran, eine Immunantwort zu beenden (Kaplan et al., 2005).
Neuere Studien zeigen, dass DZ, die aus älteren Organismen generiert wurden, weniger effektiv in der Antigenerkennung und -präsentation sind, und möglicherweise an der Überpräsentation von Eigenantigen beteiligt sind (Agrawal et al., 2007b; Agrawal et al., 2008; Zhao et al., 2011). Durch ihre abgeschwächte Funktion könnte unter anderem die Entstehung von Hauttumorerkrankungen bedingt sein.

1.3 Dendritische Zellen als antigenpräsentierende Zellen

Dendritische Zellen sind die potentesten Antigen präsentierenden Immunzellen und bilden das Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität (Steinman, 2008).
Eine weitere wichtige Eigenschaft dendritischer Zellen in verschiedenen Stadien der Differenzierung ist ihre Beweglichkeit (Banchereau et al., 2000; Cumberbatch et al., 2000). Vorläufer von dendritischen Zellen wandern vom Knochenmark über den Blutkreislauf zum peripheren Gewebe, wo sie sich ansiedeln. Dabei können sie sehr schnell an Stellen der Antigenexposition akkumulieren, wie es beispielsweise für das Bronchialepithel nach Antigeninhalation gezeigt wurde (McWilliam et al., 1996; McWilliam et al., 1994). Dies wird vermittelt durch die Chemokinexpression in lokalen Entzündungsherden, die zirkulierende dendritische Vorläuferzellen anlockt (Pendl et al., 2002). Dendritische Zellen sind während ihrer Migration in verschiedene Adhäsionsabläufe eingebunden. Nehmen Langerhanszellen Antigen auf, vermindert sich ihre E-Cadherin-Expression. Dies ermöglicht ihnen das Auswandern aus der Epidermis (Tang et al., 1993). Durch Freisetzung von Typ IV-Kollagenase durchwandern die Langerhanszellen die Basalmembran (Kobayashi, 1997). Auf ihrem Weg von der Haut zu den

drainierenden Lymphknoten verlieren Langerhanszellen ihre Fähigkeit, Antigen aufzunehmen.
Die Kompetenz, Antigen an T-Zellen zu präsentieren und die stimulatorische Kapazität nehmen zu (Streilein and Grammer, 1989). Diese funktionelle Reifung wird durch die epidermalen Zytokine GM-CSF, IL-1 und TNFα eingeleitet (Steinman et al., 1995).
Auch OPN wird während einer Entzündungsreaktion in der Haut exprimiert und trägt zur Migration und Reifung dendritischer Zellen bei (Renkl et al., 2005; Weiss et al., 2001). Während der Reifung dendritischer Zellen werden sowohl MHC-II-Komplexe, als auch kostimulatorische Moleküle, wie zum Beispiel CD86 vermehrt exprimiert. Weiterhin verändert die Reifung dendritischer Zellen die Expression von Chemokinrezeptoren und somit ihr Ansprechen auf entsprechende Chemokine.
Die Funktion DZ kann mittels unterschiedlicher Versuchsansätze erforscht werden. So kann unter anderem die Expression von Oberflächenmolekülen mit Antikörpern differenziert und die Antigenaufnahme mit FITC-Dextran untersucht werden. Die antigenpräsentierende Funktion kann mittels gemischter Lymphozytenreaktion (MLR) mit T-Zellen unter Anderem verschiedener Mausmodelle getestet werden.

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Die „Freie Radikaltheorie des Alterns” besagt, dass eine erhöhte Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eine Ursache der Alterung der einzelnen Zelle und des gesamten Organismus sein kann (Harman, 2003; Muller et al., 2007). Reaktive Sauerstoffspezies bewirken z.B. Proteinoxidation und Lipidperoxidation. Dies wird jedoch kontrovers diskutiert. Ein Grund für diese Diskussion ist eine zu vereinfachte Interpretation. Meist wird diese Theorie dahingehend ausgelegt, dass die ROS-Konzentrationen während des Alterungsprozesses zunehmen und somit zu DNA-, RNA-, Protein- und Lipidschäden führen. Somit führen sie zu Organdysfunktion und Alterung. Unabhängig davon ist es aber unklar, ob hohe ROS-Konzentrationen der Grund oder einfach die Folge des Alterungsprozesses

sind. Es zeichnet sich immer mehr ab, dass sowohl zu viel, als auch zu wenig reaktive Sauerstoffspezies schädlich für den Organismus sein können und damit zum Alterungsprozess beitragen können (Harman, 2003; Muller et al., 2007; Treiber et al., 2011).

Allein die regulierte und ausgeglichene ROS-Generierung wird als förderlich für die Kontrolle von zellulären Schlüsselprozessen, wie Zellsignalweiterleitung, Effektorfunktionen und Apoptose angesehen (Muller et al., 2007).

Die dysregulierte Generation reaktiver Sauerstoffspezies, die sich in zu hohen oder zu niedrigen Konzentrationen äußert, wird zumindest zum Teil für viele altersbedingte Veränderungen verantwortlich gemacht (Peters et al., 2009).

Während ROS wichtige Effektorfunktionen in Zellmetabolismus, Signaltransduktion und Abwehrmechanismen übernehmen, verschlechtert sich die feinabgestimmte Entstehung neuer Zellen mit der Zeit und durch ROS verursachte Schäden an zellulären Komponenten und Signalabweichungen werden immer relevanter. Da verschiedene ROS-assoziierte Pathomechanismen zur Immunseneszenz des angeborenen und adaptiven Immunsystems beitragen, resultieren Veränderungen in Überreaktivität und in einem Mangel an Immunität (Peters et al., 2009).

In physiologisch niedrigen Konzentrationen sind ROS an verschiedenen Funktionen der Zellen beteiligt, wie zum Beispiel Zellwanderung, Zellproliferation sowie an Signaltransduktionskaskaden der Zelldifferenzierung. Die Entgleisung der Menge der reaktiven Sauerstoff-Zwischenstoffe legt nahe, dass damit der Zerfall der Immunfunktion zusammenhängt und die verstärkte Produktion zu oxidativem Stress führt und damit in chronische Entzündung und Autoimmunität münden kann (Muller et al., 2007; Peters et al., 2009). Der spezifische Nachweis definierter ROS-Spezies ist für das Verständnis von Veränderungen in der Signaltransduktion, aber auch für die Wechselwirkung von LZ mit verschiedenen T-Zell-Subpopulationen bedeutend.

1.5 Mangansuperoxiddismutase in dendritischen Zellen

Zelluläre Homöostase erfordert ein Gleichgewicht zwischen freien Radikalen und Antioxidantien. Die Mangansuperoxiddismutase (MnSOD bzw. SOD2), die in den Mitochondrien lokalisiert ist, ist ein antioxidatives Metalloenzym, das freie Radikale neutralisieren kann. Sie ist essentiell für den primären enzymatischen Schutz gegen ROS und katalysiert die Spaltung von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff (Muller et al., 2007). Es gibt drei wichtige Superoxiddismutasen in der Zelle: Die MnSOD, oder SOD2, die Kupfer-Zink-Superoxiddismutase oder Cu/ZnSOD (SOD1) und die extrazelluläre Superoxiddismutase oder EC-SOD (SOD3). Die MnSOD befindet sich in der Mitochondrienmatrix (Weisiger and Fridovich, 1973), die Kupfer-Zink-Superoxiddismutase im Zytosol (McCord and Fridovich, 1969) und im intermembranösen Spalt des Mitochondriums (Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001) und die extrazelluläre SOD befindet sich in der extrazellulären Matrix (Marklund, 1982).

Die MnSOD wird im Zytosol als größerer Ausgangsstoff synthetisiert und via Proteolyse in die Mitochondrienmatrix eingeschleust, wobei sie ausreift (Wispe et al., 1989).

Die SOD2 wurde als ein mögliches Lebenszeit verkürzendes Gerontogen identifiziert (Salmon et al., 2010; Treiber et al., 2011). Van Remmen et al. erforschten an Mäusen mit heterozygoter MnSOD Defizienz die Effekte einer lebenslangen erniedrigten Enzymaktivität der MnSOD. Diese Mäuse haben eine 50%ig reduzierte Enzymaktivität der MnSOD in allen Geweben. Verglichen mit WT-Mäusen resultiert dies in einen altersabhängigen Anstieg an oxidativen DNA-Schäden in mitochondrialer und Zellkern-DNA und somit auch in einen 100%igen Anstieg der Krebsinzidenz (Van Remmen et al., 2003).

Es ist denkbar, dass die SOD2 im Rahmen des „Inflamm-aging“ die Funktionen von DZ beeinflusst. Bei Mäusen wird die Bedeutung der SOD2-Funktion für die Länge der Lebenszeit zwar noch widersprüchlich diskutiert, doch ist es belegt, dass ein funktioneller Teilverlust der SOD2 mit typischen Krankheiten des Alters einhergeht. So steigt im Alter die Rate an Krebserkrankungen, Gefäßkrankheiten

und Herzinfarkten (Salmon et al., 2010; Strassburger et al., 2005; Van Remmen et al., 2003). Erst vor Kurzem wurde belegt, dass eine homozygote SOD2 Deletion in Fibroblasten einen komplex alternden Phänotyp bei Mäusen induziert (Treiber et al., 2011).

DZ können eine Vielzahl von antioxidativen Enzymen exprimieren (Grewe, 2001). Im Verlauf der Reifung, wird vor allem die SOD2 vermehrt exprimiert, was darauf hinweist, dass dieses Enzym wichtig für die LZ/DZ-Funktion ist. Über diesen Mechanismus können DZ Lymphozyten vor Inaktivierung und Apoptose schützen und sind so an der Steuerung der Lymphozytenfunktion beteiligt (Thoren et al., 2007).

Ein Mangel oder gar das Fehlen der mitochondrial exprimierten Mangansuperoxiddismutase ist ein Modell für vorzeitige Alterung (Strassburger et al., 2005). Hierbei fallen bereits unter normalen Bedingungen während der oxidativen Verbrennung vermehrt Sauerstoffradikale in den Mitochondrien an, die eine verstärkte Lipidoxidierung (Strassburger et al., 2005) und Apoptose initiieren können.

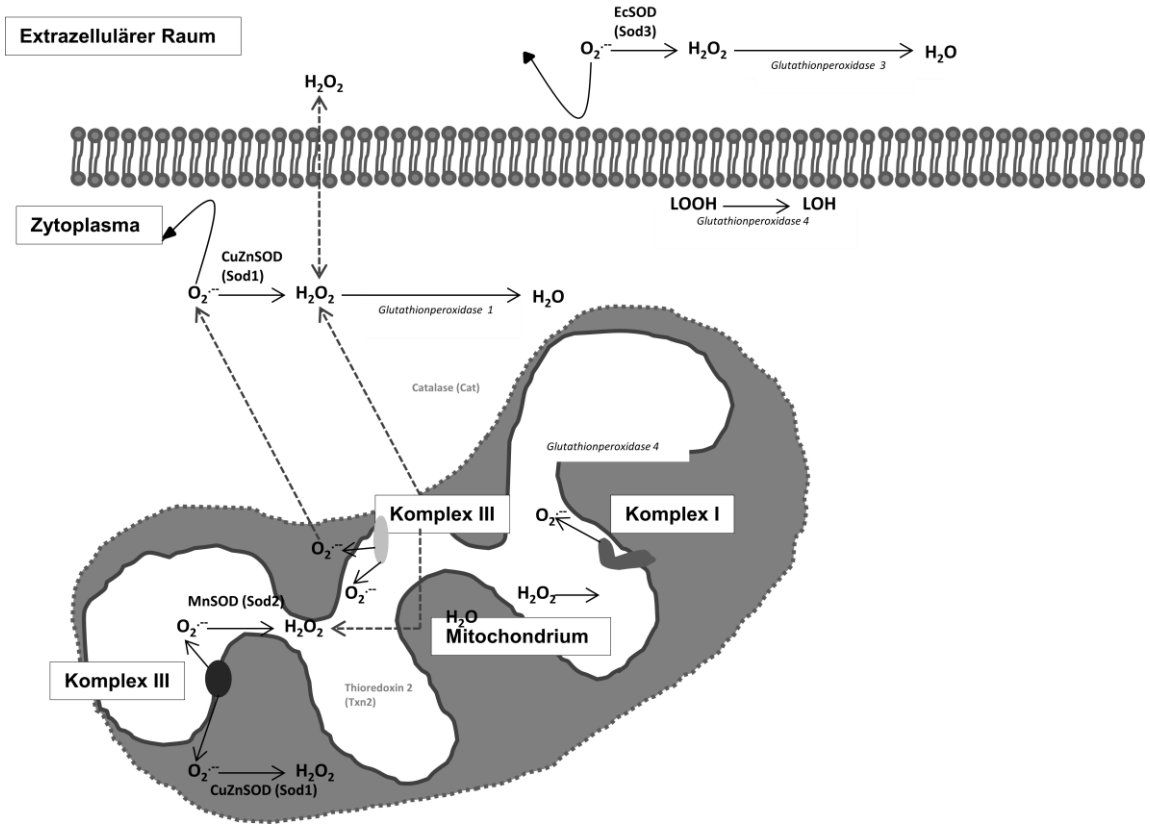


Abb. 1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), ihre Bildungsorte und antioxidativen Entschärfer. Die Abbildung zeigt eine typische Säugetierzelle mit den Orten der wichtigsten antioxidativen Enzyme und die Produktionsstätten Reaktiver Sauerstoffspezies. Es gibt zwar verschiedene zytosolische Enzyme, die Superoxid generieren können, aber das Mitochondrium ist als wichtigster Ort der ROS-Erzeugung anerkannt. Superoxid (O_2^{*-}) ist nicht membrangängig, während Wasserstoffperoxid (H_2O_2) diffusionsfähig ist. Komplex 1 entlässt Superoxid ausschließlich in die Mitochondrienmatrix, während Komplex 3 Superoxid beiderseits der inneren Mitochondrienmembran freisetzen kann (Muller et al., 2004). Superoxid ist instabil und wird entweder spontan oder enzymatisch durch die SOD zu H_2O_2 reduziert (Abbildung nach (Muller et al., 2007)**.**
EcSOD (Sod3) : Extrazelluläre Superoxiddismutase; MnSOD (Sod2) : Mangansuperoxiddismutase; CuZnSOD (Sod1) : Kupfer-Zink- Superoxiddismutase; LOOH: Lipidhydroperoxid; LOH: Lipidhydroxid; H_2O: Wasser

1.6 Ziel der Arbeit und Fragestellung

Im Rahmen des „Inflamm-aging“ kommt es zu einer Abnahme der LZ-Dichte und der Veränderung ihrer Funktion. Nach der „Freien Radikaltheorie des Alterns“ werden erhöhte Konzentrationen von ROS als Ursache der Alterung des Organismus und der einzelnen Zelle betrachtet (Harman, 2003; Muller et al., 2007).

Die SOD2 wurde als Alterung- und Lebensspanne-regulierendes Gerontogen identifiziert, welches auch mit typischen alterungsbedingten Erkrankungen in Verbindung gebracht wurde (Salmon et al., 2010; Treiber et al., 2011). Das in den Mitochondrien lokalisierte Enzym dient der primären enzymatischen Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies (Peters et al., 2009). Es wird von LZ/DZ reguliert exprimiert. Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass eine verminderte SOD2-Expression, die zu einer Störung des Redox-Equilibriums beiträgt, an der Immunseneszenz von LZ beteiligt ist.

Durch selektiven alterungsbedingten Mangel der SOD2 wurden LZ/DZ Funktionen in einem Mausmodell mit heterozygoter SOD2 Defizienz untersucht (Strassburger et al., 2005). Bei diesen Mäusen ist die SOD2-Aktivität in allen SOD2-exprimierenden Zellen des Gesamtorganismus vermindert.

Für eine zweite Versuchsreihe wurde ein Mausmodell etabliert, bei welchem die SOD2 selektiv in epidermalen LZ ausgeschaltet ist (CD207-CreSOD2-/-) (Kaplan et al., 2007; Strassburger et al., 2005). Dies erlaubt, die Vorgänge der Immunseneszenz selektiv an LZ der Haut zu untersuchen. Außerdem soll damit erforscht werden, welche Rolle eine Störung des ROS-Gleichgewichts im LZ-Kompartiment für das „Inflamm-aging“ des Hautimmunsystems spielt und wie dieses Gleichgewicht auch unter therapeutischen Gesichtspunkten wieder hergestellt werden kann. Die Ergebnisse aus dem LZ spezifischen SOD2 defizienten Alterungsmodell sollen mit Veränderungen intrinsisch gealterter Mäuse verglichen werden.

Überprüft werden sollte, wie sich in vivo und in vitro die Resistenz SOD2 heterozygoter DZ und SOD2 defizienter LZ verändert und ob die LZ-Repopulation aus Vorläuferzellen verändert wird. Unterschiede in der Funktion des Hautimmunsystems dieser Mäuse in vivo wurde im Kontakthypersensitivitätsmodel (CHS) untersucht. Hierbei wurden Aktivierbarkeit, Migration, Antigenaufnahme, T-Zell-Aktivierung und Repopulation analysiert und mit nativ gealterten LZ der Maus verglichen.

In vivo wurde außerdem die Rolle der ROS-Dysbalance in LZ anhand des Modells der Kontakthypersensitivität erforscht. Durch dieses Modell soll der Einfluss ROS-abhängigen Alterns im Immunsystem der Haut verstanden werden und so neue

therapeutische Ansätze ermöglichen.
Das Ziel dieser Arbeit ist es somit, die weiterreichenden molekularen Charakteristiken der LZ/DZ-Alterung zu erforschen.

Folgende Fragen sollen im Weiteren verstanden werden:

1. Wie verändern sich die Zahl und Morphologie der LZ mit zunehmendem Alter der SOD2 defizienten Mäuse unter ROS-Belastung?
2. Wie wird die Aktivierbarkeit der LZ/DZ in SOD2 heterozygoten und SOD2 defizienten LZ beeinflusst und sezernieren sie im Vergleich zu WT-LZ/DZ ein verändertes Zytokinmuster?
3. Welche Auswirkungen haben SOD2 Heterozygotie und Defizienz auf die LZ-Antigen-Aufnahme, deren Präsentation durch LZ und die T-Zell-Polarisierung?
4. Kommt es in SOD2 heterozygoten DZ und SOD2 defizienten LZ zur Anreicherung von Superoxidanionen und zur Abnahme von H_2O_2 und anderen Redoxequilibrien?
5. Wie unterscheiden sich DZ SOD2 heterozygoter Mäuse von SOD2 defizienten LZ und von Wildtyp DZ bezüglich ihrer CHS-Antwort in vivo?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

- $[H]^3$-Methylthymidin (GE Healthcare, München)
- Aceton/Dibutylphthalat (Sigma, München)
- ACK-Puffer (NH4CL 0,15M, $KHCO_3$ 1mM, EDTA 0,1M)
- Bradford-Reagenz: Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München)
- CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat N-Succinimidyl Ester) (Sigma, München)
- ConA, Concanavalin A (Sigma, München)
- DAKO-Fluorescent-Mounting-Medium
- DAPI 1 µg/ml (Sigma, München)
- ddH_2O (didestilliertes H_2O)
- DirectPCR-Tail Lyse Reagenz (Peqlab, Erlangen)
- DMSO (Merck, Darmstadt)
- FBS-Superior (Biochrom, Berlin)
- FITC (Sigma, München)
- Forene (Isofluran) (Abbott, Ludwigshafen)
- GMCSF aus Zellkulturüberstand
- HBSS (Hank's balanced salt solution) mit Phenolrot und ohne Ca2+/Mg2+ (Biochrom, Berlin)
- HEPES Pufferlösung, 1M (Biochrom, Berlin)
- HRP (Meerrettichperoxidase) (eBioscience, Frankfurt)
- IL-4 (Peprotech, Hamburg)
- Isoseptol 70% (Apotheke der Universitätsklinik Ulm)

- L-Glutamin, 200 mM (Biochrom AG, Berlin)
- 50 µmol/l 2-Mercaptoethanol (Sigma, München)
- Maus-LHZ-Medium n. Romani: RPMI 1640 (Lonza) + 10% (50 ml) FBS Superior (Biochrom), + 1% (5 ml) L-Glutamine = 2 mmol/l (Biochrom), + 50 µmol/l 2-Mercaptoethanol (1,75 µl), 20 µg/ml Gentamicin (200 µl einer 50 mg/ml Lösung von Sigma) - steril filtriert
- Nicht essentielle Aminosäuren, 100x (Biochrom, Berlin)
- Nycodenz-Lösung, 5-[N-(2,3-Dihydroxypropyl)acetamido]-2,4,6-triiodo-N,N'-bis(2,3-dihydroxypropyl) isophthalamide (Fluka, St. Gallen, Switzerland)
- PBS ohne Ca2+ und Mg2+ (Biochrom, Berlin)
- Penicillin/Streptomycin, 10000 U bzw. 10000 µg (Biochrom, Berlin)
- PFA 4% (Sigma, München)
- Proteinase K-Lösung RNase frei (Peqlab Cat, Erlangen)
- Propiumjodid (Sigma-Aldrich, Frickenhausen)
- Pyozyanin (Sigma, München)
- SEA (Staphylococcus Enterotoxin A) (Sigma, München)
- SeaKem LE Agarose (Lonza, Köln)
- Streptavidin –PE – Cy5 (BD Pharmingen, Heidelberg)
- TMB (Tetramethylbenzidin) (eBioscience, Frankfurt)
- TNCB (VeZerf Laborsynthesen GmbH, Idar-Oberstein)
- Trypsin 10X Solution, 25 g/l porcines Trypsin in HBSS (2,5%) (Sigma, München)

2.1.2 Reagenzien-Kits

- Ready-SET-Go! Reagenzien-Set TNF-alpha IL-6 (eBioscience Frankfurt) (ELISA-Kit)
- Total ROS/Superoxide Detection Kit (Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach)
- Proteome Profiler mouse Cytokine Antibody Array, PanelA (R&D Systems, Wiesbaden)

- BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences, Heidelberg)
- Pan-T-Zell Isolationskit Maus (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach)
- Epidermal Langerhanszell Microbead Kit Maus (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach)

2.1.3 Geräte

- Begasungsbrutschrank: HERAcell 150 (Heraeus, Hanau)
- Cell Harvester (Inotech, Nabburg)
- FACS-CantoII (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)
- FACS-Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)
- Inkubator: Thermomix 1441 (B.Braun, Melsungen)
- Magnetrührer (IKA, Staufen)
- Mikroskop: Inverses Mikroskop Axiovert 200 (Zeiss, Oberkochen)
- PCR-Gerät: GeneAmp PCR System 9700 PE (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- pH-Meter (Schott, Mainz)
- Photometer: Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotec, Buckinghamshire, UK)
- Microplate Reader (Berthold Mithras, Bad Wildbad)
- Pipetten (ABI-Med, Langenfeld)
- quadroMACS und octoMACS -Magnet (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- Sicherheitssterilwerkbank: BDK UVF 1.8 (BDK, Sonnenbühl Genkingen)
- UVA-Lampe: UVASUN 3000S (Mutzhas, München)
- UV-Meter (Fa. Waldmann, VS)
- Vollschutz-Bestrahlungsanlage D400 für Tier- und Zellbestrahlungen, Cäsium 137 Quelle (Buchler, Braunschweig)
- Vortexmixer (VWR, Darmstadt)
- Zählkammer: Neubauer improved (LO-Laboroptik, Bad Homburg)
- Zentrifugen: Multifuge 3S-R (Heraeus, Osterode); Galaxy 16DH (VWR,

Darmstadt), Haraeus Fresco 17 /Thermo scientific, Waltham, USA)
- β-counter 1450 Microbeta Trilux (PerkinElmer, Waltham, USA)

2.1.4 Verbrauchsmaterial

- 96-Well-Rundbodenplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen)
- Eppendorf-Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2 ml (Eppendorf GmbH, Hamburg)
- FACS-Tubes (BD Pharmingen, Heidelberg)
- Falcon-Tubes 50 und 15 ml (Greiner Bio-One, Frickenhausen)
- Filtermatten (PerkinElmer, Waltham, USA)
- Filterpapier: 3 mm (Whatman, Dassel)
- Kulturschalen, Nunclon, 15 cm Durchmesser, Oberflächen beschichtet (Nunc, Wiesbaden)
- LS- und MS-Säule (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- Multischalen, 6-Well oder 24-Well, Oberflächen beschichtet (Greiner, Bio-One)
- PCR-Streifen (Thermo Fisher Scientific, Bremen)
- Pipetten (ABI-Med, Langenfeld)
- Sterilfiltrationseinheit, 500 ml, 2 µm Porengröße (VWR, Darmstadt)
- Zellsieb, 40, 70 und 100 µm (BD, Franklin Lakes, USA)

2.1.5 Antikörper

Tab. 1 Die Durchführung der durchflusszytometrischen Analyse erfolgte mit Hilfe der folgenden Antikörper.

Antigen	Hersteller	Isotyp	Klon	Konjugat
CD11b	BD Pharmingen	Rat IgG	M1/70	FITC,
CD11b	BD Pharmingen	Rat IgG	M1/70	AlexaFluor647
CD11c	eBioscience	Hamster IgG	N418	APC
CD44	BD Pharmingen	Ratte IgG	IM7	Biotin
Anti-MHC-II	Miltenyi	Rat IgG2b	unbekannt	Mag-Beads
Anti-MHC-II (I-A / I-E)	Abcam	Rat IgG	M5/114.15.2	Biotin
Anti-MHC-II (I-A / I-E)	BD Pharmingen	Rat IgG	M5/114.15.2	PE, Anti I-A/I-E
Anti-MHC-II (I-A / I-E)	BioLegend	Rat IgG	M5/114.15.2	AlexaFluor647
CD86 (B7-2)	BD Pharmingen	Rat IgG	GL1	PE
CD207	Acris Antibodies	Rat IgG	929F3.01	AlexaFluor488
CD207	eBioscience	Rat IgG	eBioL31	Purified
Anti-MHC-II (I-Ab)	BD Pharmingen	Mouse IgG	AF6-120.1	FITC

2.1.6 Software

- Adobe Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems Inc., San Jose, USA)
- AxioVision LE 4.2 (Carl Zeiss, Jena)
- CellQuest Software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)
- CorelDRAW 11.0 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada)
- FlowJo 7.6.4 (Tree Star, Inc., Ashland, Oregon, U.S.A.)
- Microsoft Office 2007 (Microsoft Corporation, Unterschleißheim)

2.2 Versuchstiere

Die Experimente wurden an SOD2 heterozygoten Mäusen, bei denen die SOD2-Aktivität in allen SOD2-exprimierenden Zellen vermindert ist (Muller et al., 2007) und deren Wildtyp-Wurfgeschwistern durchgeführt. Die Mäuse waren auf C57Bl/6J Hintergrund in der 10. Generation zurückgekreuzt worden.

Um den proinflammatorischen Effekt einer ROS-Anreicherung im Gesamtorganismus zu umgehen und spezifisch die Funktion einer SOD2-Defizienz im epidermalen LZ-Kompartiment untersuchen zu können, wurden SOD2 loxP Mäuse (Strassburger et al., 2005) mit einer unter dem Einfluss des Langerin (CD207) Promotors stehenden Cre transgenen Maus verpaart (Kaplan et al., 2007). (Nachfolgend werden die Nachkommen, die eine Deletion der SOD2 in LZ tragen als CD207-Cre $SOD2^{-/-}$ Mäuse bezeichnet.) Die SOD loxP Maus steht in Kooperation mit Frau Prof. K. Scharffetter-Kochanek, die Langerin-Cre-Maus in Kooperation mit Herrn Prof. D. Kaplan zur Verfügung (Kaplan et al., 2007).

Das vorliegende CD207-Cre $SOD2^{-/-}$- Modell erlaubt es, die Funktion von LZ nach selektiver Deletion der SOD2 und die Störung des ROS-Gleichgewichts in LZ zu untersuchen.

Die Mäuse wurden in der Tierhaltungsanlage der Universität Ulm artgerecht gehalten und ihr klinischer Zustand täglich überprüft. Ihr genetischer Status wurde durch Genotypisierung mittels PCR festgestellt (Abb. 2).

Alle Tierprotokolle wurden auf Antrag durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt.

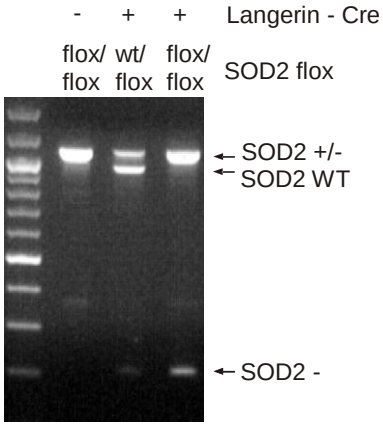


Abb. 2 Langerhanszell Genotyp-Analyse von Nachkommen der heterozygoten Verpaarung von Langerin-Cre- mit SOD2 flox-Mäusen.
Es wurden Langerin-Cre-Mäuse (Kaplan et al., 2007) mit SOD2 flox (Strassburger et al., 2005) Mäusen verpaart. Nach Typisierung wurden von den Nachkommen Epidermalzellsuspensionen hergestellt und anschließend die Langerhanszellen durch magnetische Zellsortierung (MACS) mit Bindungsstellen für MHC-II angereichert. Die DNA wurde aufgereinigt und es erfolgte die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) - Amplifikation mit den Primern: 5‘-gag ggg cat cta gtg gag aa-3‘ und 5‘-gaa agt cac ctc cac aca cag a-3‘. Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese anhand ihrer Größe identifiziert. Die PCR zeigt 3 Banden: SOD2 +/-, normale Mangansuperoxiddismutase / Wildtyp: SOD2-WT und Mangansuperoxiddismutase-Deletion: SOD2-. Bei Heterozygotie ist die SOD2-Bande auf die Hälfte reduziert. (flox = Erkennungssequenz)

2.3 Methoden

2.3.1 Präparation muriner Haut

Die Untersuchungen erfolgen an muriner Haut. Zur Gewinnung dieser Gewebe wurden die Mäuse nach Betäubung zunächst durch CO_2 Narkose getötet und anschließend mit Ethanol desinfiziert. Zur Hautpräparation wurde die Maus rasiert und die restlichen Haare von der Haut mit einem Skalpell abgelöst. Von jeder Maus wurden für die Hautproben Haut und Ohren abgelöst und diese sofort in 50 ml PBS gegeben. Danach wurden etwa ein 1 cm^2 große Stücke präpariert und in eine Petrischale mit Trypsinlösung gegeben.

2.3.2 Differenzierung muriner dendritischer Zellen aus Knochenmark

Die in vitro Differenzierung von murinen Dendritischen Zellen erfolgte aus Knochenmarkstammzellen (Inaba et al., 1992). Zur Gewinnung von Knochenmark wurden die Mäuse nach Betäubung zunächst durch Genickbruch getötet und anschließend mit Ethanol desinfiziert. Femur und Tibia wurden freipräpariert. Nach dem Entfernen des Muskel- und allen anderen Gewebes von Femur und Tibia beider Hinterbeine wurden die Knochen für eine Minute in Ethanol desinfiziert und mit PBS gewaschen. Danach wurden beide Knochenenden mit einer Schere abgetrennt und mithilfe einer Spritze mit PBS ausgewaschen. Die Erythrozytenlyse erfolgte durch Zugabe von ACK-Puffer für 3 Minuten. Zur Differenzierung zu dendritischen Zellen wurde zum DZ-Medium rekombinantes GM-CSF (4 µl/ml) und IL-4 (10 ng/ml) hinzugefügt und die fertigen Zelllösungen in 1 ml Aliquots auf 24Well-Kulturplatten ausplattiert. Den fertigen Kulturen wurde am 3. Tag 50% des Mediums durch frisches Medium und Zytokine ersetzt. Nach zwei weiteren Tagen erfolgte die Ernte lose adhärenter DZ durch Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu wurden 8 ml Zellsuspension in 15 ml Falcon gegeben und mit 2 ml Nycodenz-Lösung (15,5 % (w/v) Nycodenz in

murinem DZ-Medium) unterschichtet. Nach 20 min zentrifugieren bei 600g wurde die weiße Interphase abgenommen, in 10 ml PBS aufgenommen und deren Zahl bestimmt (Strober, 2001).
Von einer Zellsuspension wurden 10 µl in ein Eppendorf-Cup mit 90 µl Trypanblau pipettiert, gut gemischt und 10 µl der Suspension durch Kapillarsog in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht. Vier der äußeren Quadranten wurden im Mikroskop bei 10facher Vergrößerung ausgezählt, wobei sich tote Zellen blau anfärbten, vitale Zellen dagegen hell blieben.
Zur Überprüfung der Reinheit wurden die Zellen mittels FACS analysiert. Für Letzteres erfolgte eine Inkubation der Zellen mit einem biotinylierten Antikörper gegen CD11c und anschließender Inkubation mit Strepdavidin-PE-Cy5 oder einer Einfachfärbung mit CD11c-APC.

2.3.3 Gewinnung muriner T-Zellen

Zur Gewinnung von T-Zellen wurde der getöteten Maus die Milz entnommen und in einem Falcon mit sterilem PBS auf Eis deponiert. Unter der Sterilbank wurde die Milz in eine oberflächenunbehandelte Petrischale mit RPMI1640 überführt und mittels Pinzette und Spritze punktiert und durchspült. Danach wurde die Milz auf ein 40 µm Zellsieb auf einem 50 ml Falcon gelegt und mit dem Stempel einer 10 ml Spritze zermörsert. Der Inhalt der Petrischale wurde durch das Zellsieb gegeben und mit RPMI1640 nachgespült. Nach 10 Minuten Zentrifugieren bei 300g wurden die Erythrozyten durch Resuspension des Pellets in 5 ml ACK-Puffer und 3 minütiger Inkubation lysiert und mit PBS abgestoppt. Die Lösung 10 Minuten bei 300g zentrifugiert und die Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden jeweils 300.000 Milzzellen/50 µL T-Zell Medium aufgenommen und auf die vorbereiteten Wells verteilt.
Zur Herstellung reiner T-Zellen wurde das Pan-T-Zell Isolationskit verwendet und die isolierten Zellen wurden in MACS-Puffer und Biotin-Antikörper-Mix nach Protokoll des Herstellers inkubiert. Anschließend erfolgte die 2. Inkubation mit Anti-Biotin Microbeads und die magnetische Separation. Die Zellen wurden in T-Zell-

Medium aufgenommen und 150.000 T-Zellen/50 µl Medium auf der vorbereiteten Wellplatte verteilt.

2.3.4 Einzelzellsuspension von Langerhanszellen

Unter der Sterilbank wurde die Haut mit dem Skalpell in ein Quadratzentimeter große Stücke geteilt und in einer weiteren Schale mit der dermalen Seite nach unten auf einer Lösung aus 9 ml HBSS und 4 ml 2,5%-iger Trypsinlösung aufschwimmen gelassen und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Nach ca. 12 Stunden wurden 12 ml LZ-Medium im 15 ml Falcon vorgelegt, die Hautstücke in den Deckel der Schale gelegt, die Epidermis abgezogen, in einem Falconröhrchen gesammelt und dieses ca. 3 min geschwenkt. Durch einen 70 µm Cellstrainer wurde die Epidermissuspension abgegossen. Den Falcon durchspülte man noch einmal mit ca. 10 ml LHZ-Medium. Dies wurde ebenfalls durch den Cellstrainer gegeben und dieser nochmals mit 10 ml LZ-Medium gespült. Bei 400g wurde für 5 min zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Das Pellet wurde nun in 10 ml LZ-Medium aufgenommen, um die Zellen zu zählen (modifiziert nach (Koch et al., 2001).
Danach wurden Oberflächenantigene MHC-II und CD86 gefärbt. Im nächsten Schritt wurde die Permeabilisierung mit Cytofix/Cytoperm Kit nach Protokoll des Herstellers durchgeführt, um danach die intrazelluläre Langerinfärbung mit CD207 durchführen zu können.
Anschließend wurde mit der Durchflusszytometrie ausgewertet.

2.3.5 Zellkulturmethode

Sämtliche Zelllinien und primären Zellkulturen wurden in einem Brutschrank in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO_2-Anteil kultiviert.

2.3.6 Immunfluoreszenzfärbung von Langerhanszellen in murinen Ohrhäutchen

Die Ohren der toten Maus wurden an der Basis reseziert, Dermis und Epidermis von der Knorpelschicht getrennt und in 3 ml Dispase-Lösung in einem Well inkubiert.
Danach wurde die Haut 1h bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Epidermis vorsichtig abgezogen, 3x in PBS-T gewaschen und im Cacodylat-Formaldehyd-Fixativ für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem weiteren dreifachen Waschvorgang wurde die Epidermis in einem weiteren Well auf FC-Block schwimmend für 30 Minuten bei Raumtemperatur blockiert.
Im 4. Well wurde der 1. Antikörper (CD207) in PBS-T 1:4000 angesetzt und die Ohrsheets über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3x waschen in PBS-T wurden die Ohrsheets im 2. Antikörper (AlexaFluor 488) 1:400 in PBS-T im 5. Well angesetzt und 1h bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Von hier an wurden alle weiteren Schritte lichtgeschützt durchgeführt.
Nach einem weiteren Waschvorgang wurde DAPI 1 µg/ml im 6. Well angesetzt und die Ohrsheets 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreifachem Waschen wurde auf einen Polysine-Objektträger ein großer Tropfen ddH_2O gelegt, sodass beide Ohrsheets Platz fanden. Die Ohrsheets wurden noch 3x gewaschen, einmal kurz in ddH_2O, dann auf den Tropfen auf dem Objektträger gebracht.
Das überschüssige Wasser wurde mit Zellstoff aufgenommen, sodass die Ohrsheets flach auflagen. Nach 2-3 min Trocknen im Brutschrank wurden 1-2 Tropfen DAKO-Fluorescent-Mounting-Medium aufgetragen, ein Deckglas aufgelegt und vorsichtig angedrückt, um Luftblasen zu entfernen. Bei 488nm wurde mikroskopiert und die Bilder der LZ angefertigt.

2.3.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von Einzelzellen in Lösung, wobei, nach Illumination mittels Lasern, Fotodetektoren simultan Streulichteigenschaften

(als Hinweis auf die relative Zellgröße und -granularität) und mehrere verschiedene Fluoreszenzfarben erfassen können. Die Zellen werden zum Beispiel mit FITC- oder PE gekoppeltem AK inkubiert (4°C, 30 min) und somit angefärbt. Die dadurch entstehenden Signale werden durch Lichtemission von den Fluoreszenzfarbstoffen, die an die Antikörper gekoppelt sind erzeugt, welche an die zu analysierenden Zellepitope binden. Durch die unterschiedlichen Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. FITC bei 530nm, PE bei 585nm) können mehrere Epitope pro Zelle gleichzeitig ermittelt werden. Als dritter Fluoreszenzfarbstoff werden oft Vitalmarker wie 0.1 µg/ml Propiumjodid (Spektrum >650nm) hinzugefügt, um tote Zellen durch angemessene Eingrenzung auszuschließen. Diese Marker können die kompromittierte Zellmembran toter Zellen queren und an DNA oder doppelsträngige RNA binden. Damit wird die Zelle, im Gegensatz zur vitalen Zelle, angefärbt und in der FACS-Analyse als tote Zelle erkannt. 5-10x10^3 brauchbare bzw. lebensfähige Zellen konnten je Probe analysiert, und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) durch CellQuest oder FlowJo Software ermittelt werden (Sack U, 2007).

2.3.8 ELISA

Messung der Expression von murinem IL-12, IL-6, TNFα und IL-10 aus Zellkulturüberständen wurde mit Ready-SET-Go! ELISA-Kits durchgeführt.
Eine 96-Well ELISA-Platte wurde mit 100 µl/Well mit Capture Antikörper in Coating Buffer benetzt. Die Platte wurde versiegelt und über Nacht bei 4°C inkubiert.
Die Wells wurden dann fünf Mal mit 250 µl Waschpuffer gewaschen.
Danach wurde ein Teil fünffach konzentrierter Probenverdünnungslösung (Assay Diluent) mit vier Teilen destilliertem Wasser verdünnt und die Wells mit 200 µl/Well einfach konzentrierter Probenverdünnungslösung geblockt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
Nach einem weiteren Waschschritt wurde der Standard mit einfach konzentriertem Assay Diluent angesetzt und 100 µl/Well in die dafür vorgesehenen Wells gegeben. Die Standardkurve ergab sich aus einer Verdünnungsreihe von sieben

der Reihe nach 1:2 verdünnten Lösungen.
100 µl/Well der Proben wurden hinzugefügt, die Platte versiegelt und wiederum bei Raumtemperatur zwei Stunden inkubiert. Danach wurde wieder ein Waschvorgang durchgeführt.
100 µl/Well Detektionsantikörper wurde mit einfach konzentriertem Assay Diluent angesetzt, die Platte versiegelt und eine Stunde inkubiert.
Nach einem weiteren Waschvorgang werden 100 µl/Well Avidin-HRP (Meerrettichperoxidase), welches an Biotin bindet in einfach konzentriertem Assay Diluent auf der versiegelten Platte für 30 Minuten inkubiert.
Nach siebenfachem Waschen wurden 100 µl/Well Substratlösung, TMB für 15 Minuten inkubiert. Diese dient als Protonendonor für die Reduktion von Hydrogenperoxiden zu Wasser durch Peroxidaseenzyme wie die HRP. Danach wurden 50 µl/Well Stopplösung hinzugefügt. Gemessen wurde die Platte im Mikroplattenleser bei 450nm und die optische Dichte der Proteinmengen nach Abzug des Hintergrundes mit Excel analysiert.

2.3.9 FITC-Dextran Versuch mit und ohne Pyozyanin-Stress

LZ wurden wie oben beschrieben entnommen und gezählt. Danach wurden sie in Langerhanszell-Medium suspendiert, auf 24-Well-Platten ausplattiert und 12 µl Pyozyanin-Lösung hinzugefügt. Zur Kontrolle dienten gleichfalls WT und SOD2 defiziente LZ, welchen ausschließlich das Lösungsmittel Dimethylformamid, in welchem Pyozyanin gelöst wurde, hinzugefügt wurde und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die LZ für 0, 7,5, 30, 60 und 90 Minuten mit FITC-Dextran-Lösung inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und für die FACS-Analyse mit Anti-I-A/I-E MHC-II gefärbt. Danach wurden MHC-II positive Zellen als LZ durch FACS-Analyse eingegrenzt.

2.3.10 Gemischte Lymphozytenreaktion

Die Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) dient als in vitro Modell für die Aktivierung von T Zellen durch antigenpräsentierende LZ/DZ und als Test für die Antigenerkennung durch T-Zellen. Werden aufgereinigte T-Lymphozyten mit antigenpräsentierenden Zellen eines allogenen Mausstammes inkubiert, präsentieren die antigenpräsentierenden Zellen ihre eigenen Antigene und stimulieren die Proliferation alloreaktiver T-Zellen unter anderem durch Ausschütten verschiedener Zytokine (Ahmann et al., 1979; Pure et al., 1988).
Dendritische Zellen besitzen die Fähigkeit, allogene T-Zellen stark zu stimulieren. Mit steigendem Reifegrad nimmt die Potenz der dendritischen Zellen allogene T-Zellen zu aktivieren zu (Steinman and Witmer, 1978). Um den Einfluss der verschiedenen SOD Defizienzen auf die stimulierende Kapazität der DZ und somit deren Reife zu testen, wurden diese mit aufgereinigten T-Zellen eines allogenen BALB/c Mausstammes inkubiert.
Die DZ wurden nach Protokoll präpariert und in murines T-Zell-Medium aufgenommen. Danach wurden 20.000 DZ/50 µl Medium auf eine 96-Well-Rundbodenplatte ausgesät. In den Reaktionswells wurden erst 100 µl Medium vorgelegt, dann die DZ und darauf die T-Zellen (Präparationsprotokoll siehe oben) eingesetzt. In Kontrollwells mit nur einer Zellgruppe wurden 150 µl Medium vorgelegt, und dann die DZ bzw. die T-Zellen eingesetzt.
Als Negativkontrollen wurden jeweils T-Zellen und DZ ohne die jeweilige andere Zellart eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten T-Zellen denen nur Concanavalin A (ConA) zugefügt wurde.
Die T-Zell-Proliferation nach Allostimmulation durch DZ wurde durch $[H]^3$-Thymidin Assay gemessen. Nach 72h Inkubation bei 37° C in einem Zellkulturbrutschrank wurde auf jedes Well 1µCi radioaktives $[H]^3$-Methylthymidin gegeben und für weitere 18-20 h inkubiert das bei der Replikation während der Zellteilung in die DNA der Zellen eingebaut wird. Die Ernte der Zellen erfolgte mit einem 96-Well Cell-Harvester. Anschließend wurden die Zellen auf eine Membran geplottet und in der Mikrowelle 5 min getrocknet. Die Membran wurde mit Szintillationsöl in das Messgerät eingesetzt und die β-Zerfälle in jedem Well 1 Minute lang mittels eines

β-Szintillationszählers gemessen.
Eine weitere Methode zur Messung der T-Zellproliferation in der MLR mit Langerhanszellen und T-Zellen wurde folgendermaßen durchgeführt:
Die DZ wurden nach Protokoll präpariert, quantifiziert und in PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit Anti-CD11b Antikörper gefärbt und zur Bestimmung des LZ-Anteils in der Einzelzellsuspension mittels FACS bestimmt. CD11c, was als Zellmarker für dendritische Zellen gilt, konnte nicht verwendet werden, da das CD11c-Epitop von Trypsin zerstört wird. Danach wurden 10.000 DZ/50 µl Medium berechnet und auf eine 96-Rundboden Wellplatte ausgesät. In den Reaktionswells wurden erst 100 µl Medium vorgelegt, dann die DZ und darauf die T-Zellen (Präparationsprotokoll siehe oben) eingesetzt und CFSE zugegeben. In Kontrollwells mit nur einer Zellgruppe wurden 150 µl Medium vorgelegt, und dann die DZ bzw. die T-Zellen eingesetzt. Wiederum wurden als Negativkontrollen jeweils T-Zellen und DZ ohne die jeweilige andere Zellart eingesetzt und als Positivkontrolle T-Zellen alleine mit Concanavalin A (ConA).
Die Messung der Ergebnisse wurde folgendermaßen durchgeführt:
An Tag 5 erfolgte die Ernte der Zellen in einzelne FACS-Analyse-Röhrchen. Die Zellteilungen wurden anhand der CFSE-Verteilung in den neuen Generationen der T-Zellen gemessen.

2.3.11 Kontakthypersensitivität gegen TNCB

Die Kontakthypersensitivitätsreaktion gegen TNCB wurde nach folgendem Modell durchgeführt (Weiss et al., 1997): Auf die Bauchhaut 6 Wochen alter SOD2 heterozygoter Mäuse und deren Wildtyp Wurfgeschwister wurden an Tag 0 200 ml 7%iges TNCB in Aceton aufgetragen. Als Kontrolle wurden Mäuse gleichen Alters und Geschlechts untersucht, die nur mit 200 ml Aceton behandelt wurden. An Tag 5 wurde den Mäusen 10 µl 1%iges TNCB auf beide Seiten der Ohren aufgetragen. Die Ohrdicke wurde davor und an den Tagen 6 und 7 mit einem technischen Mikrometer bestimmt.

2.3.12 Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM (= Standard error of the means = Standardfehler des arithmetischen Mittels) oder SA (= Standardabweichung) dargestellt. Ein p-Wert ≤ 0,05 wurde als einfaches Signifikanzniveau festgesetzt (* in Abb.). Der Wert p ≤ 0,01 war zweifach (** in Abb.) und p ≤ 0,001 dreifach signifikant (*** in Abb.).

Signifikanzunterschiede zwischen einzelnen Versuchsgruppen wurden mittels ungepaartem oder gepaartem Student t-Test überprüft. Die statistische Berechnung erfolgte mit Microsoft Excel (Version 2003, Microsoft Corporation, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse bei Wildtyp-Mäusen

3.1.1 In menschlicher Haut und bei Mäusen nimmt die Langerhanszellzahl im Alter ab

Seit langem wird darüber diskutiert, ob intraepidermale LZ-Zahlen im Laufe des Alterungsprozesses abnehmen (Sunderkotter et al., 1997). Diese Arbeit zeigt, dass LZ-Zahlen von zwei Jahre alten Mäusen auf ca. 30% der LZ-Zahl der Haut einer zwei Monate alten Maus zurückgehen (Abb. 3 A, B). Entsprechend wurde in sonnengeschützter menschlicher Haut bei gealterten Individuen ein Rückgang der LZ-Zahl ermittelt (Abb. 3 C). Damit werden vorausgegangene Arbeiten bestätigt, die ergaben, dass die LZ-Anzahl in der Haut gealterter Mäuse sowie auch in menschlicher Haut abnimmt (Gilchrest et al., 1982; Sprecher et al., 1990).

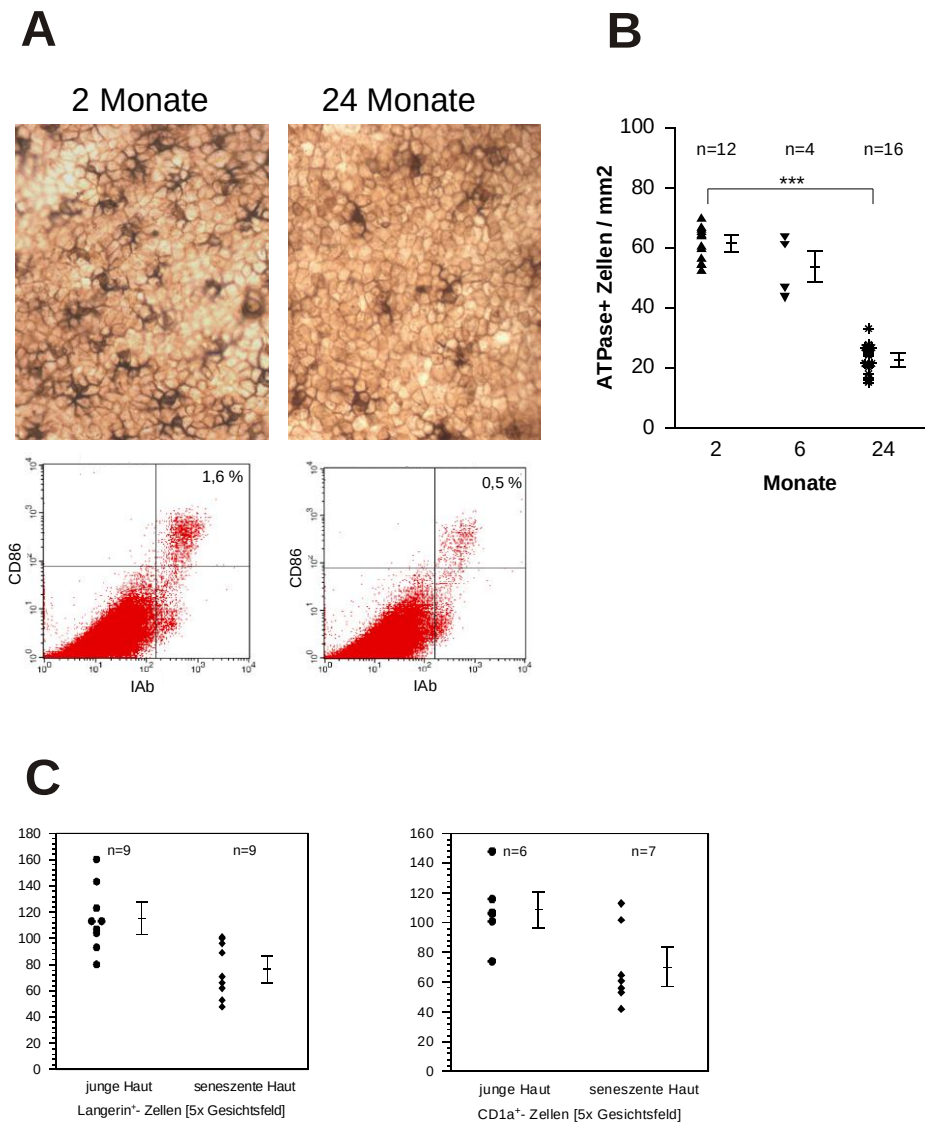


Abb. 3 Die Dichte epidermaler Langerhanszellen (LZ) verringert sich im Alter bei Mäusen und Menschen.
Die Anzahl (n) der LZ wurde bei jungen und gealterten C57Bl/6 Mäusen und sonnengeschützter junger und gealterter menschlicher Haut quantifiziert.
(A) Oberes Feld: Ohrhaut zwei und 24 Monate alter Mäuse wurde mit ATPase gefärbt. Die LZ erscheinen dunkelgrau. Unteres Feld: Einzelzellsuspensionen gefärbt mit antiCD86- und I-Ab-Antikörpern nach durchflusszytometrischer Analyse. Der Prozentanteil von CD86 und I-Ab positiven LZ (rechter oberer Quadrant) wurde ermittelt. **(B)** Die Zahl der LZ in muriner Ohrhaut gefärbt mit Adenosintriphosphatase (ATPase) wurde mit einem optischen Gitter gemessen und mittels Zweistichproben t-Test ausgewertet ***p<0.0005. **(C)** Junge und gealterte sonnengeschützte menschliche Haut wurde mit Anti-CD207 (linkes Feld) oder Anti-CD1a-Antikörpern (rechtes Feld) gefärbt. Die LZ-Anzahl (CD207-positive Zellen) wurde mit einem optischen Gitter ausgewertet, wobei fünf Felder gezählt wurden.
Zweistichproben t-Test, p<0.05.

3.2 Ergebnisse bei SOD2-heterozygot defizienten Mäusen

Die SOD2 wurde als ein Gen beschrieben, das mit der Alterung verknüpft ist (Salmon et al., 2010; Treiber et al., 2011). Im folgenden Abschnitt wurde untersucht, wie eine verminderte Expression der SOD2 die LZ/DZ Funktionen beeinflusst.

3.2.1 Heterozygote SOD2 Defizienz verändert die Expression von Oberflächenmolekülen auf LZ

Die Rolle der SOD2 für den Phänotyp von LZ wurde anhand eines Modells mit SOD2 heterozygoten Mäusen untersucht.
Nachdem bestätigt wurde, dass intraepidermale LZ mit dem Alter abnehmen, war zu klären, was dies funktionell für die Chemokinsekretion und Molekülexpression von LZ bedeutet. Hierzu wurde ein Mausmodell entwickelt, bei welchem die SOD2-Aktivität in allen SOD2-exprimierenden Zellen vermindert ist (Kaplan et al., 2007).
Es wurden Einzelzellsuspensionen epidermaler LZ SOD2 heterozygot defizienter, vier Monate alter Mäuse mit WT Kontrollen verglichen und ihre MHC-II-, CD86- und CD44-Expression durchflusszytometrisch bestimmt. Nach 12 stündiger Kultur als epidermale Einzelzellsuspension, die zur LZ-Aktivierung führt, zeigte sich, dass SOD2 heterozygote LZ zwar leicht CD44 aufregulieren, die Expression von MHC-II und CD86 jedoch tendenziell zurückgeht (Abb. 4).

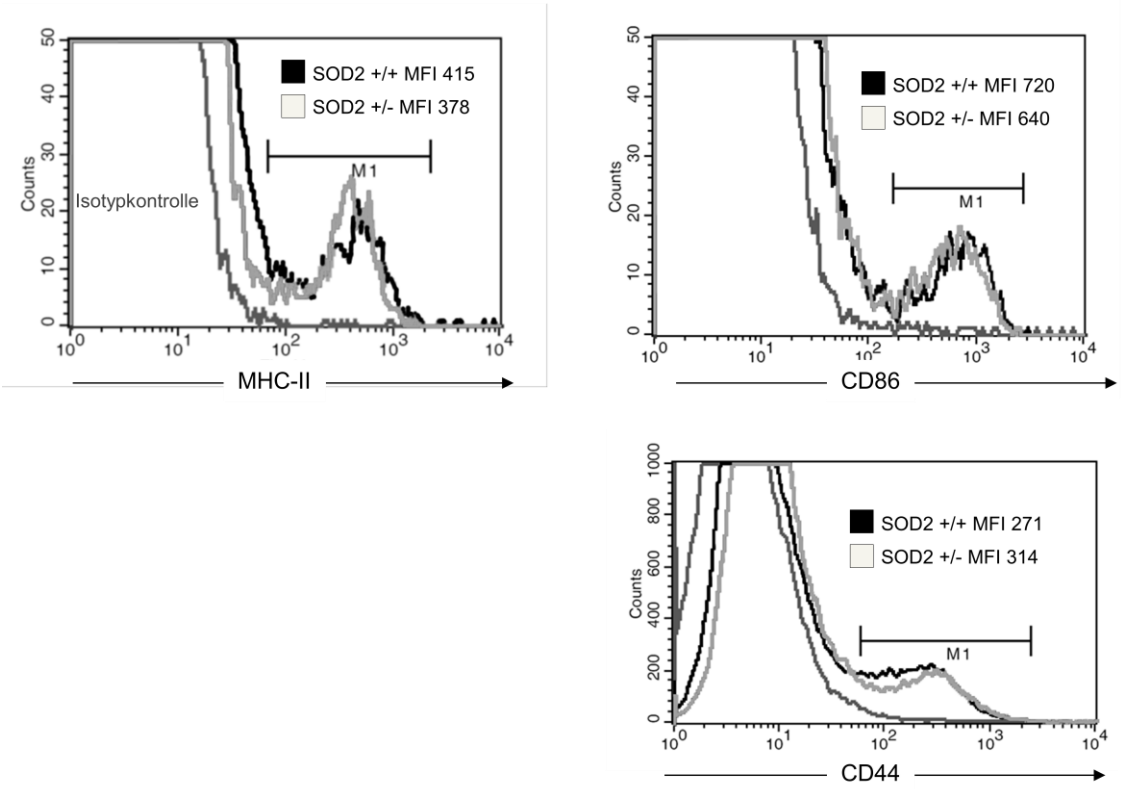


Abb. 4 Verminderte Expression von I-Ab (MHC-II) und CD86 und vermehrte Expression von CD44 auf Langerhanszellen SOD2 heterozygoter Mäuse.
Einzelzellsuspension, die aus der Haut SOD2 heterozygoter (SOD2 +/-) oder WT-Mäusen (SOD2 +/+) gewonnen wurden, wurden für 12h mit GMCSF kultiviert. Nach der Färbung mit Antikörpern für I-Ab und CD44 erfolgte die FACS-Auswertung. Epidermalzellsuspensionen enthielten 2-3% LZ und wurden aufgrund ihrer CD207 Expression eingegrenzt (nicht angezeigt). Positive Zellen (Counts) wurden mit „M1" eingegrenzt und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ausgewertet. Dargestellt ist ein repräsentatives, statistisch signifikantes Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten (T-Test: $p < 0,05$; nicht dargestellt).

3.2.2 Nach Behandlung mit Pyozyanin akkumulieren dendritische Zellen SOD2 heterozygoter Mäuse vermehrt ROS

Für die Alterung eines Individuums werden unter Anderem erhöhte Konzentrationen von ROS im Organismus und der einzelnen Zelle verantwortlich gemacht. Unter physiologischen Bedingungen können ROS zur Aktivierung von LZ/DZ beitragen (Kantengwa et al., 2003). DZ nutzen ihre antioxidativen Fähigkeiten wie die MnSOD zum Selbstschutz und können gleichzeitig T-Zellen vor Inaktivierung und Apoptose bewahren (Thoren et al., 2007). Werden nun DZ in oxidativen Stress versetzt, hier mit Hilfe von unterschiedlichen Pyozyanin-

Konzentrationen, kann man die ROS-Anhäufung und die H_2O_2-Bildung in DZ SOD2 heterozygoter und WT Mäuse messen. Pyozyanin ist ein starker ROS-Erzeuger. Es generiert reaktive Sauerstoffspezies und H_2O_2 durch seine Fähigkeit, intrazelluläre Elektronendonoren, wie NADPH zu reduzieren (Muller, 2002).

Es zeigte sich, dass die SOD2 heterozygoten DZ im Vergleich mit den WT-Kontrollen mehr Superoxidanion, den Ausgangsstoff zur Umsetzung durch die SOD2, anreichern (Abb. 5 A). Außerdem produzierten sie durch Reduktion des Sauerstoffanions gleichzeitig mehr Wasserstoffperoxid und andere Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Abb. 5 B).

Beim späteren Vergleich von WT LZ mit SOD2 defizienten LZ reicherten die WT Zellen nach Behandlung mit Pyozyanin weniger Superoxidanion an, produzierten aber mehr Endprodukt, also H_2O_2 und andere ROS (Abb. 11).

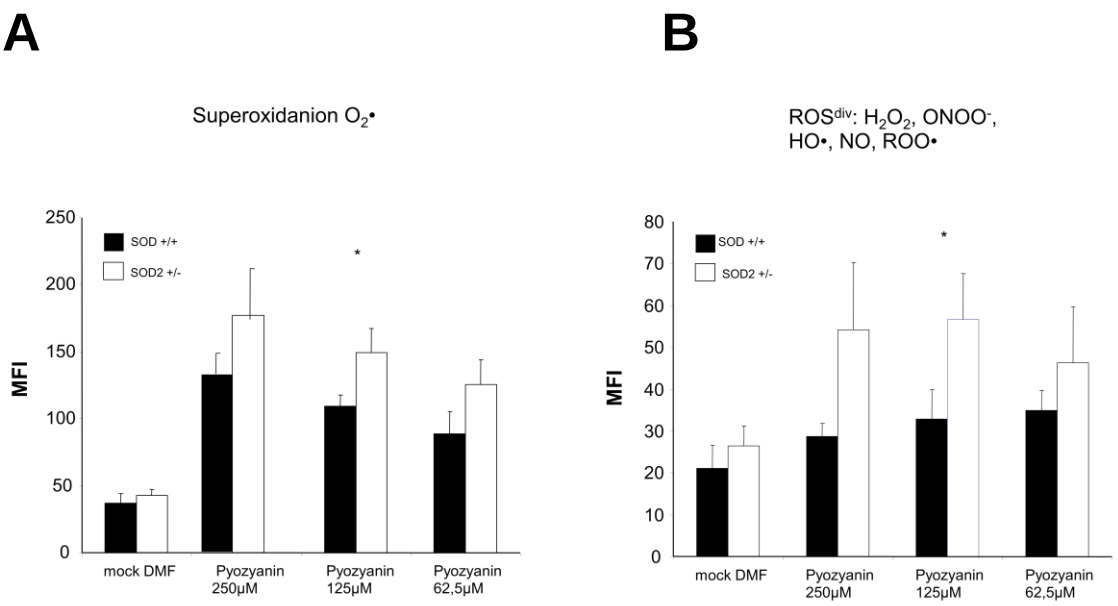


Abb. 5 Nach Behandlung mit Pyozyanin zeigen SOD2 heterozygote dendritische Zellen eine stärkere Anhäufung von Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).

Aus Knochenmark kultivierte DZ, die an Tag 5 geerntet wurden, wurden an Tag 6 für 4h mit Pyozyanin, einem starken ROS-Erzeuger, stimuliert. Die Zellen wurden mit dem kompletten ROS/Superoxid detection kit (Enzo Life Science ENZ-51010) nach Protokoll behandelt und durchflusszytometrisch analysiert und ausgewertet. DZ wurden als CD11c+ Zellen definiert und tote Zellen durch DAPI-Anfärbung ausgeschlossen. Dargestellt ist die Anreicherung des Ausgangsstoffes Superoxidanion **(A)** und die Produktion von Wasserstoffperoxid und anderer reaktiver Sauerstoffspezies **(B)** * t-Test $p<0.05$.

mok DMF = Dimethylformamid; MFI= Mittlere Fluoreszenzintensität; DAPI= 4′,6-Diamidin-2-phenylindol µM = Mikromolar

3.2.3 Dendritische Zellen aus Knochenmark SOD2 heterozygoter Mäuse sind in ihrer Aktivierbarkeit eingeschränkt

Es wurde der Phänotyp der aus Knochenmark generierten DZ SOD2 heterozygoter Mäuse untersucht. Dabei konnten aus SOD2 heterozygotem Knochenmark DZ gewonnen werden, die sowohl eine dem WT vergleichbare Morphologie als auch Expression an MHC-II und kostimulatorischen Molekülen aufwiesen (Daten nicht angezeigt).

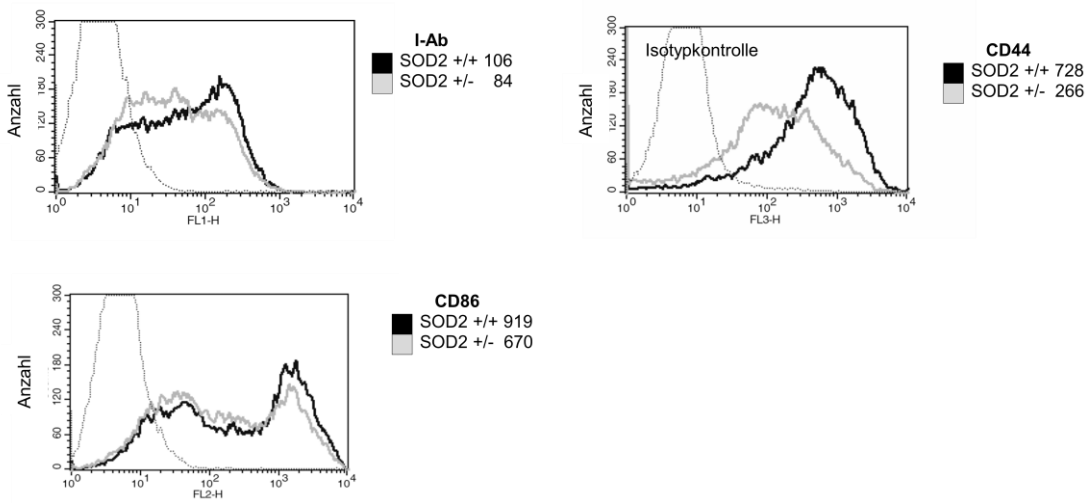
Das Phänomen des „Inflamm-aging“ wird mit erhöhten Serumspiegeln von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6, TNFα und IL-1 in Verbindung gebracht. Dies geht einher mit einer Abschwächung der spezifischen Immunität.

Stimuliert man die DZ SOD2 heterozygoter Tiere mit LPS, sezernieren sie ein ähnliches Zytokinmuster wie ihre WT Kontrollen, allerdings exprimieren sie weniger MHC-II und CD86 (Abb. 6 A). Die Aktivierung SOD2 heterozygoter DZ ist reduziert und die Produktion von TNFα signifikant vermindert (Abb. 6 B).

Erstaunlicherweise stellte sich heraus, dass unreife, unstimulierte SOD2 heterozygote DZ erhöhte Mengen des proinflammatorischen IL-6 und der Chemokine CXCL1 und CXCL2 exprimieren (Abb. 7). CXCL1 wird von Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten und Epithelzellen exprimiert und wirkt als chemischer Lockstoff für Neutrophile (Iida and Grotendorst, 1990).

Im Vergleich dazu wurden epidermale LZ vier Monate alter SOD2 heterozygoter Mäuse mit WT Kontrollen verglichen und auf ihre Expression von MHC-II, CD86 und CD44 hin untersucht. Es ergab sich, dass unter Aktivierung die Expression von I-Ab (MHC-II) und CD86 bei SOD2 heterozygoten LZ weniger stark anstieg, im Gegensatz dazu jedoch die CD44-Expression stärker aufreguliert wurde (Abb. 4).

A



B

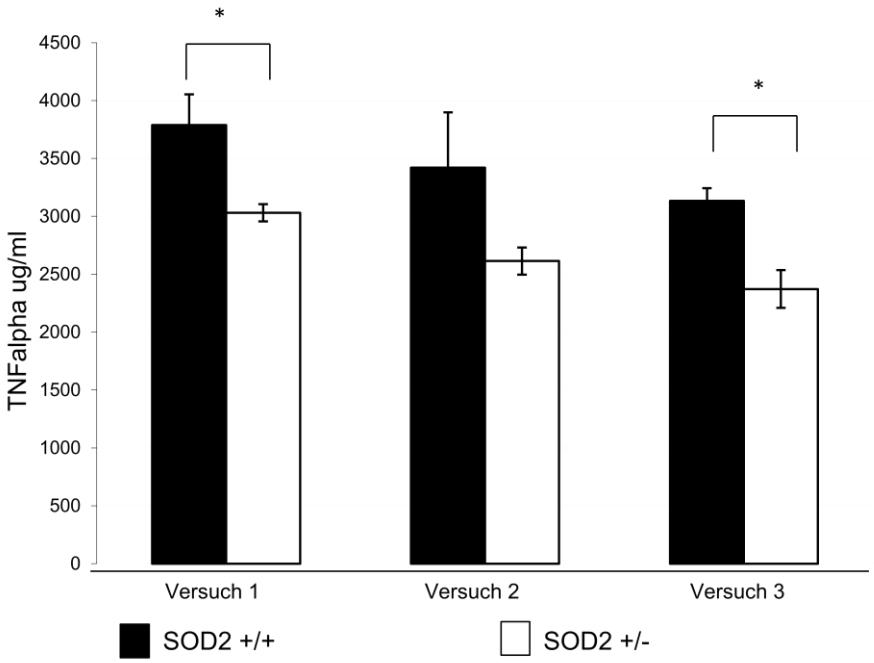


Abb. 6 Verminderte Aktivierung von dendritischen Zellen aus Knochenmark bei Mäusen mit Heterozygotie der Mangansuperoxiddismutase (SOD2).
Aus Knochenmark gewonnene dendritische Zellen wurden an Tag 5 der Kultur für 24h mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte nach Färbung mit Antikörpern gegen I-Ab, CD86 und CD44. **(A)** Dendritische Zellen (DZ) wurden aus Knochenmarkkulturen differenziert. An Tag 5 wurden die Zellen mit LPS stimuliert. Nach 24h wurde ein ELISA gegen Tumornekrosefaktor (TNF) α durchgeführt. Repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten mittels erreichtem Fluoreszenzwert (FL-H). **(B)** TNFα-Sekretion von Wildtyp (WT / SOD2 +/+) und SOD2 heterozygoten (SOD2 +/-) DZ. * t-Test $p<0.05$.

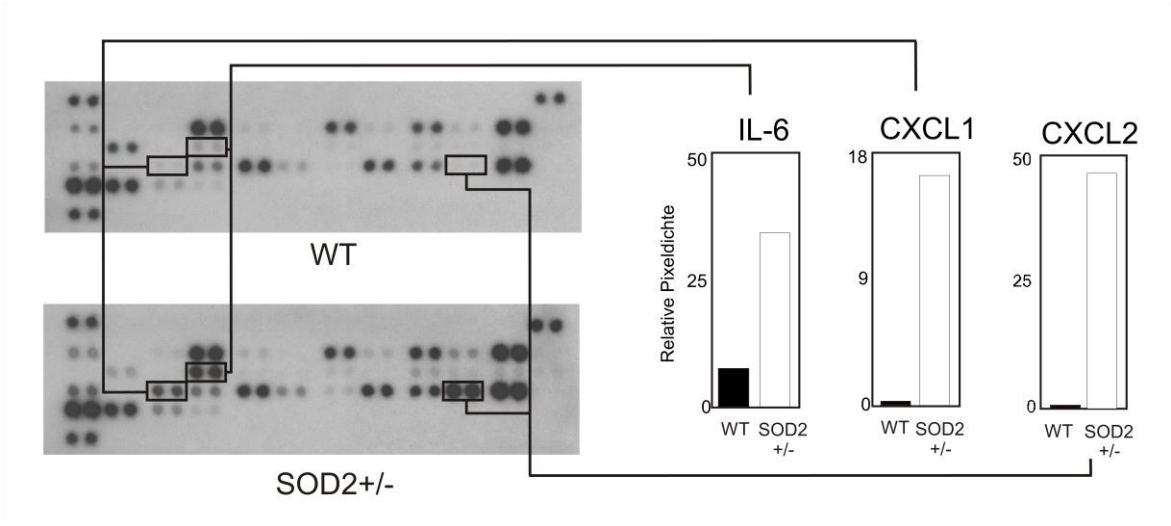


Abb. 7 Dendritische Zellen (DZ) mit Mangansuperoxiddismutasen (SOD2) - Heterozygotie sezernieren erhöhte Mengen IL-6, CXCL1 und CXCL2.
DZ wurden aus Knochenmark SOD2 heterozygoter Mäuse mittels GM-CSF und IL-4 generiert und die Überstände an Tag 5 der Kultur gewonnen und mittels Proteome Profiler Maus Kit analysiert. Die Analyse wurde in Paaren (in einer Reihe nebeneinander) durchgeführt. Die obere Reihe rechts und links außen, sowie die untere Reihe links außen zeigen die Positivkontrollen für die Normierung. Die durchschnittliche Pixeldichte der gescannten Röntgenbilder wurde mit einer Bildverarbeitungssoftware ermittelt. Die relative Pixeldichte wurde berechnet, indem die Intensität für die Kontrollen normiert wurde. Sie wird in der Graphik für die Expression von Zytokinen und Chemokinen dargestellt, die die stärkste Abweichung zwischen Wildtyp (WT) und SOD2 heterozygoten (SOD2 +/-) DZ aufzeigten. Repräsentatives Ergebnis zweier unabhängiger Versuche.

3.2.4 Verminderte antigenpräsentierende Funktion bei der gemischten Lymphozytenreaktion

Um zu bestimmen, ob der zuvor beobachtete veränderte Phänotyp der SOD2 heterozygoten DZ funktionelle Folgen hat, wurden diese DZ genutzt, um T-Zellen unter Einfluss von SEA zu stimulieren. SEA vernetzt direkt spezifische Vbeta Regionen des T-Zell-Rezeptors mit dem MHC-II Molekül der APZ. Bei diesem Versuch hatten die SOD2 heterozygoten DZ im Vergleich zu WT DZ geringere T-Zell stimulatorische Fähigkeit (Abb. 8). Trotzdem proliferierten die T-Zellen SOD2 heterozygoter Mäuse deutlich stärker als die WT T-Zellen (Abb. 8). Durch die Stimulation SOD2 heterozygoter TZ mit SOD2 heterozygoten DZ wurde die T-Zell stimulatorische Eigenschaft der DZ wiederum abgeschwächt, obgleich die SOD2 heterozygoten TZ noch immer stärker proliferierten als die WT Zellen (Abb. 8). Diese Ergebnisse veranschaulichen einen Mangel der antigenpräsentierenden

Funktion der DZ SOD2 heterozygoter Mäuse und gleichzeitige proinflammatorische Proliferation SOD2 heterozygoter T-Zellen. Dies hat Parallelen zum verminderten spezifischen aber proinflammatorischen Zustand eines seneszenten Immunsystems. Dabei besteht ein Ungleichgewicht zwischen entzündungsfördernden Mechanismen, wie T-Zellproliferation ohne Antigenpräsentation, und entzündungshemmenden Mechanismen, was in einen chronisch proinflammatorischen Zustand mündet. Dies führt zu einem Rückgang der Hautimmunfunktion und somit zum „Inflamm-aging“.

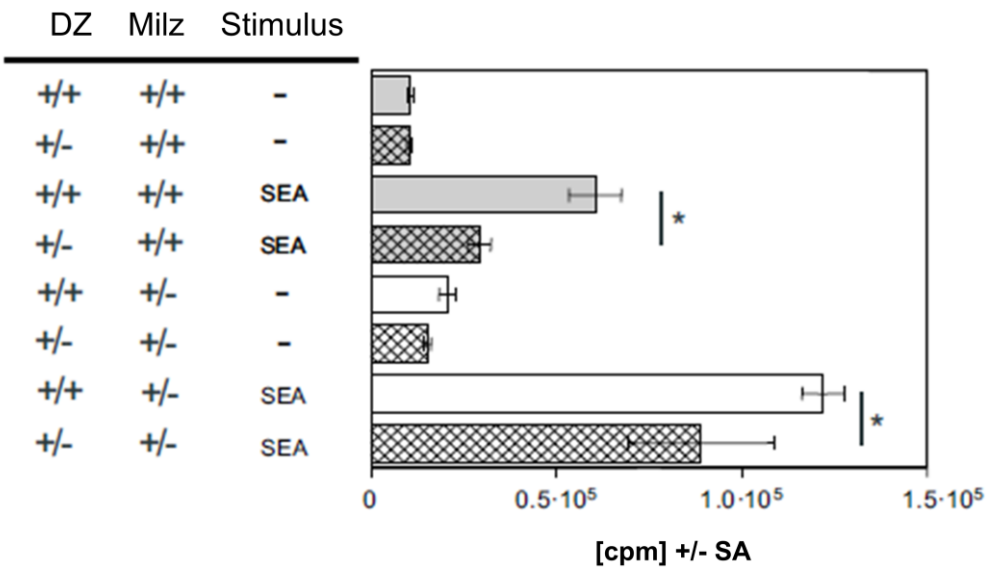


Abb. 8 Abgeschwächte antigenpräsentierende Funktion von SOD2 heterozygoten Dendritischen Zellen und Hyperproliferation von SOD2 heterozygoten T-Zellen.
Für die gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) wurden Dendritische Zellen (DZ) aus dem Knochenmark von Wildtyp und SOD2 heterozygoten Mäusen generiert. Mittels einer [H]^{3}Thymidin Probe mit und ohne das Superantigen Staphylokokken-Enterotoxin A (SEA) wurde die Proliferation von Milzzellen untersucht. Der Versuch wurde mit jeweils vier Mäusen durchgeführt. Die Abbildung zeigt Zählimpulse pro Minute (counts per minute = cpm) mit Standardabweichung (SA); t-Test p *<0.05, p**<0.005

3.2.5 SOD2 heterozygote Mäuse haben eine verstärkte Kontakthypersensitivitätsreaktion gegen TNCB

Im Rahmen des „Inflamm-aging“ kommt es zu einer chronischen Entzündungsreaktion. Genutzt wurde ein Kontaktallergiemodell gegen Trinitrochlorbenzol (TNCB), um Effekte der SOD2 Defizienz bei SOD2 heterozygoten Mäusen auf die Auslösbarkeit und Ausprägung einer Kontaktallergie zu untersuchen. Eine Kontaktallergie ist eine T-Zell vermittelte Immunreaktion vom Spättyp gegen ein Kontaktallergen. Bei den SOD2 heterozygoten Mäusen fand sich eine signifikant verstärkte CHS im Vergleich zu den WT-Mäusen (Abb. 9).

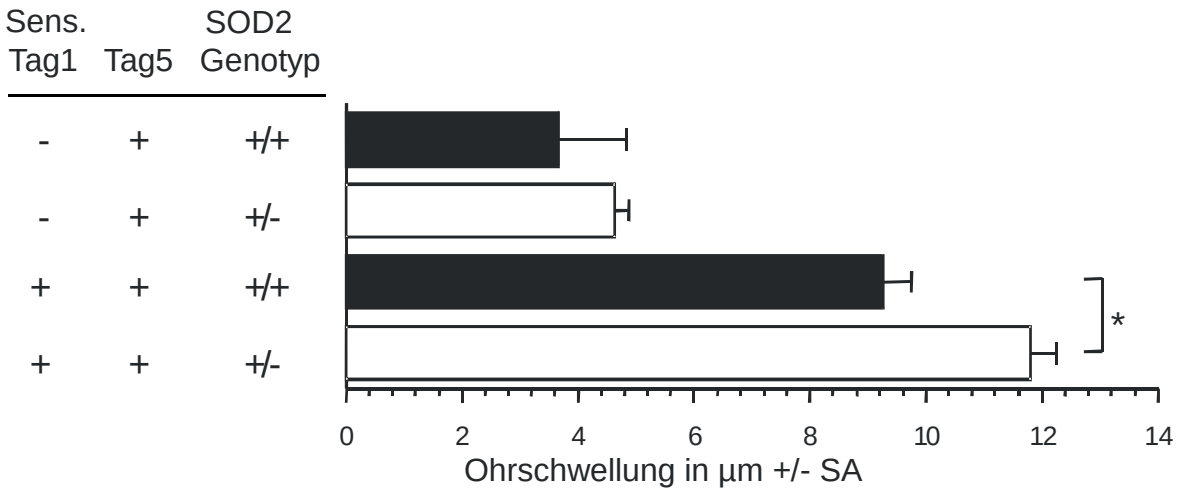


Abb. 9 SOD2 heterozygote Mäuse haben eine verstärkte Ohrschwellung bei Auslösung einer Kontakthypersensibilisierung.
SOD2 heterozygote Mäuse wurden an Tag 1 am Abdomen mit Trinitrochlorbenzol (TNCB) sensibilisiert (sens.). An Tag 5 wurde die Kontakthypersensibilisierung an beiden Ohren durch TNCB ausgelöst und nach 24h die Ohrschwellung bestimmt. Die Abbildung zeigt die durchschnittliche Ohrschwellung bei fünf Mäusen.
* Zweistichproben t-Test $p<0,05$; SA = Standardabweichung

3.3 Ergebnisse bei Mäusen mit selektiver SOD2 Defizienz in Langerhanszellen

Im vorausgegangenen Teil wurden Ergebnisse beschrieben, die mit einem Mausmodell mit heterozygoter Defizienz der SOD2 im gesamten Organismus erhoben wurden. Ein zweites Mausmodell wurde etabliert, in dem die SOD2 allein in den epidermalen Langerhanszellen ausgeschaltet wurde. Dies erlaubt es, die SOD2 Defizienz selektiv für die LZ Funktionen zu untersuchen.
Dafür wurden SOD2 loxP Mäuse (Strassburger et al., 2005) verpaart mit einer unter dem Einfluss des Langerin (CD207) Promotors stehenden Cre transgenen Maus (Kaplan et al., 2007). Dieses Modell erlaubt es, die Funktion von LZ nach selektiver Deletion der SOD2 und die Störung des ROS-Gleichgewichts in LZ zu untersuchen.

3.3.1 Morphologie und Quantität von Langerhanszellen mit SOD2-Defizienz bei 6 Wochen alten Mäusen

In einem ersten Versuch wurden Zahl und Morphologie der LZ bei 6 Wochen alten Mäusen mit SOD2 defizienten LZ (Tab. 2) untersucht. Es zeigte sich hierbei eine leichte Verringerung der LZ-Anzahl in der Epidermis (Abb. 10 A, B, E). Die Dendriten der LZ sind geringer ausgeprägt und die Zellkörper vieler LZ haben eine rundlichere Form als die der WT-Mäuse (Abb. 10 B, D). In der Durchflusszytometrie ergab sich für die Zellen im FSC (forward scatter) und SSC (sideward scatter) eine geringere Größe mit verminderter Granularität (Tab. 2). Eine SOD2 Defizienz führt schon bei jungen Mäusen zu verkleinerten, weniger dendritischen LZ.

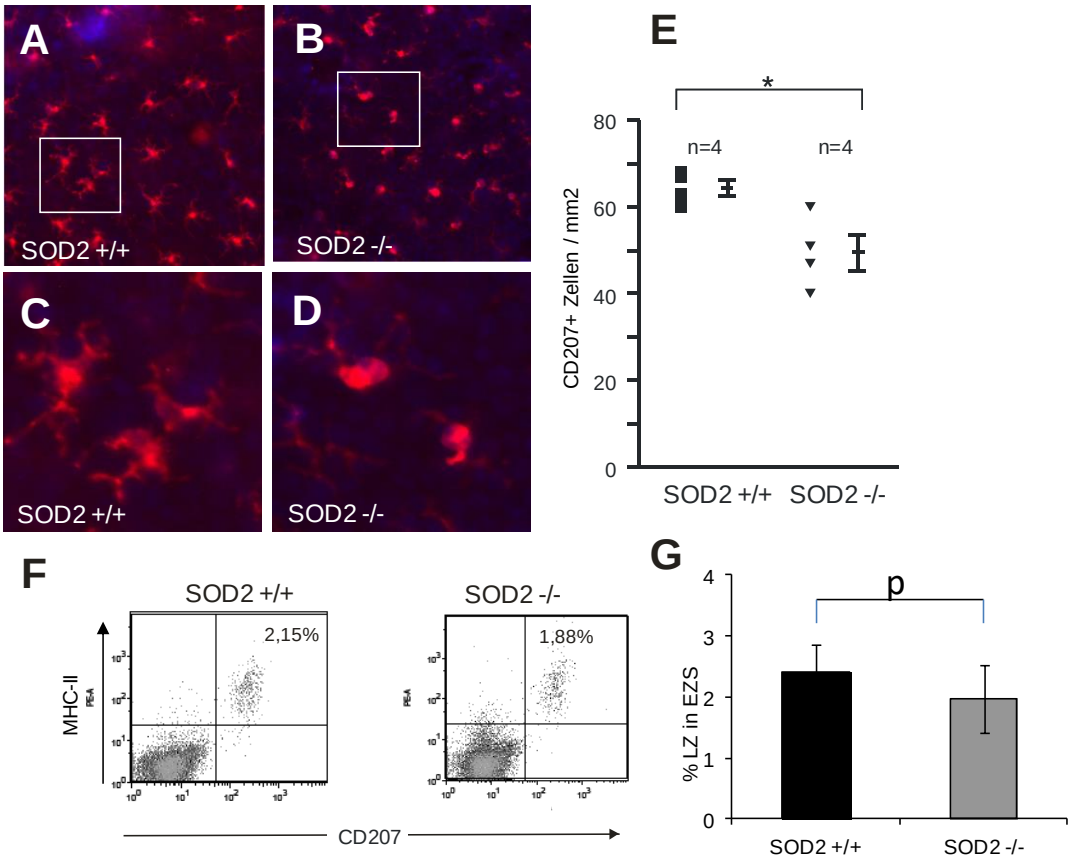


Abb. 10 Langerhanszell-spezifisch SOD2 defiziente Mäuse zeigen im Alter von 6 Wochen morphologisch veränderte und quantitativ verringerte Langerhanszellen.
Ohrhäutchenpräparate von 6 Wochen alten Wildtyp (SOD2 +/+) - und Langerhanszell (LZ) spezifischen SOD2 defizienten (SOD2-/-) Mäusen wurden mit Phycoerythrocin (PE) konjugiertem Antikörper gegen CD207 (rot) und 4',6-Diamino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI; Zellkerne: blau) angefärbt. **(A+C)** Ohrhäutchenpräparat einer Wildtyp-Maus. **(B+D)** Ohrhäutchenpräparat einer LZ spezifischen SOD2 defizienten Maus. In jeder Gruppe wurden Ohren von 4 Mäusen untersucht. Je Ohrhäutchen wurden 5 hochauflösende Felder ausgezählt.
*Differenz statistisch signifikant, t-Test $p<0,05$ ($p=0,018$). **(E)** Anzahl (n) CD207 exprimierender Zellen pro Quadratmillimeter (mm^2) bei Wildtyp- und SOD2 defizienten Mäusen. **(F)** Beispiel von 3 unabhängigen Experimenten, die in **(G)** zusammengefasst dargestellt sind: Epidermalzellsuspensionen von Wildtyp- und LZ spezifischen SOD2 defizienten Mäusen wurden für die Durchflusszytometrie mit Antikörpern gegen CD207 und MHC-II markiert. Rechter oberer Quadrant: Prozent CD207/MHC-II doppelt positiver epidermaler LZ. **(G)** Durchschnittlicher Prozentwert von Langerhanszellen in Einzelzellsuspensionen (EZS) von 3 unabhängigen Experimenten. t-Test p= 0,079 (nicht signifikant)

Tab. 2 SOD2 defiziente Langerhanszellen sind kleiner und haben verminderte Granularität.
Es wurden Epidermalzellsuspensionen von Wildtyp-Mäusen (SOD2 +/+) oder Mäusen mit spezifischer Defizienz (SOD2 -/-)der Mangansuperoxiddismutase (SOD2) in Langerhanszellen aus Rückenhaut hergestellt. FSC Durchschnitt, also die durchschnittliche Größe und SSC Durchschnitt, also die durchschnittliche Granularität wurden aus 3 unabhängig durchgeführten Versuchen durchflusszytometrisch für vitale CD207 positive Zellen bestimmt. t-Test p <0,05 = signifikant
FSC = forward scatter; SSC = sideward scatter; *Standardabweichungen

	FSC	**SSC**
SOD2 +/+	526 (+/- 39)*	213 (+/- 21)*
SOD2 -/-	498 (+/- 33)*	187 (+/- 23)*
Signifikanz (t-Test)	p=0,1(nicht signifikant)	p=0,3(nicht signifikant)

3.3.2 Nach Behandlung mit Pyozyanin häufen SOD2 defiziente Langerhanszellen stärker Superoxidanion an, produzieren aber weniger ROS.

Als spezielle DZ nutzen vermutlich auch LZ ihre antioxidativen Fähigkeiten wie die MnSOD zum Selbstschutz (Thoren et al., 2007). Werden sie mit Hilfe von unterschiedlichen Pyozyanin-Konzentrationen oxidativem Stress ausgesetzt, kann man auch hier die ROS-Anhäufung und die H_2O_2-Bildung messen. Diesmal bei SOD2 defizienten und WT LZ. Hier reicherten die WT-Kontrollen im Vergleich schon von vorneherein weniger Superoxidanion an, produzierten aber gleichzeitig mehr ROS und Wasserstoffperoxid (Abb. 11 A, B). Vergleicht man diese Daten mit den DZ der SOD2 heterozygoten Mäuse stellt man fest, dass hier ein Unterschied besteht: Im Vergleich zu WT-Kontrollen hatten diese sowohl mehr Superoxidanion angehäuft, als auch mehr ROS generiert (Abb. 5).

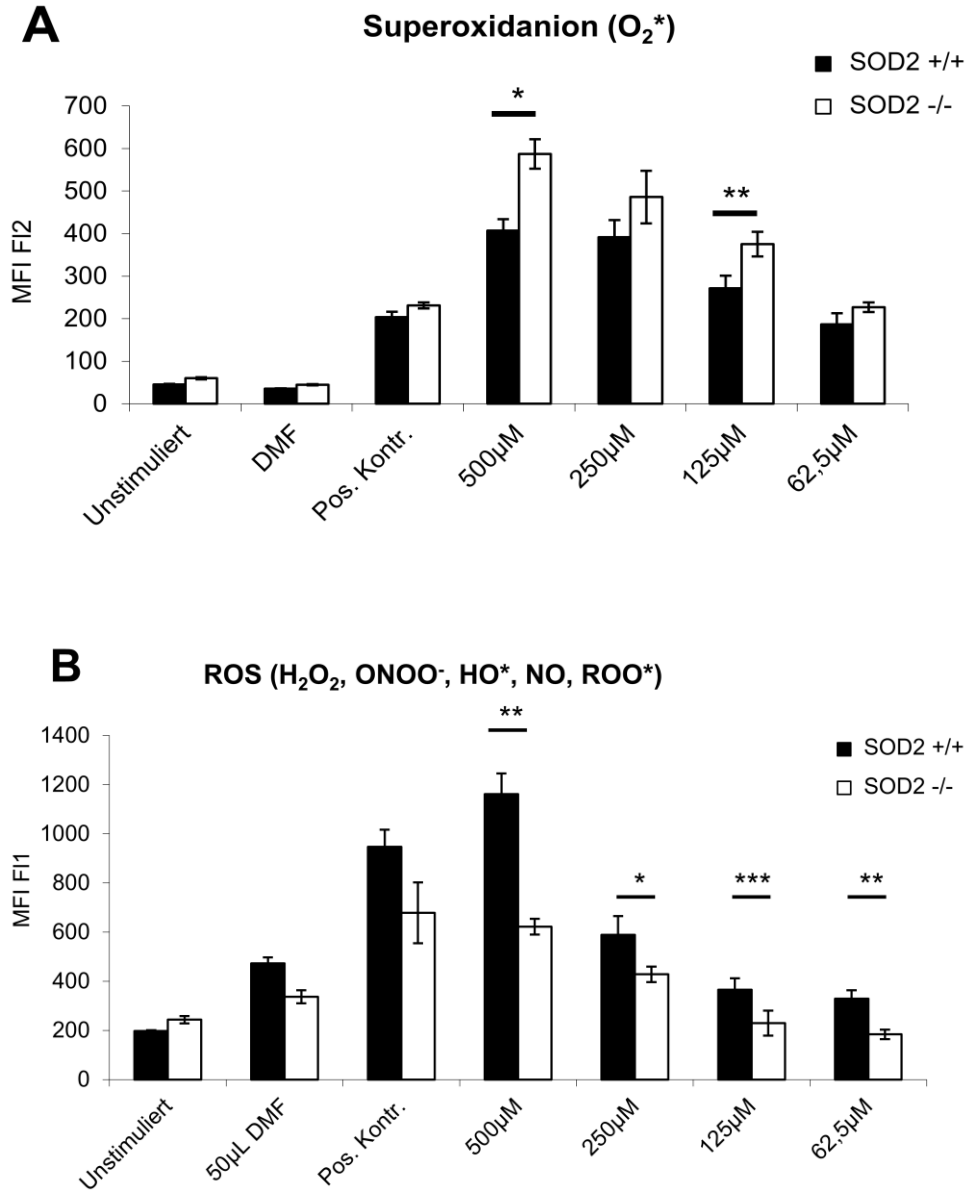


Abb. 11 SOD2 defiziente Langerhanszellen und LZ von Wildtyp - Mäusen akkumulieren höhere Mengen und Superoxidanion aber geringere Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).
Langerhanszellen (LZ) werden wie im Teil Material und Methoden beschrieben generiert und an Tag 1 mit Pyozyanin, einem starken ROS-Erzeuger, für 4h stimuliert. Die Zellen werden mit dem ROS/Superoxid detection kit (Enzo Life Science ENZ-51010) nach Protokoll behandelt und mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert und ausgewertet. LZ wurden als MHC-II positive Zellen gewertet und tote Zellen wurden ausgeschlossen. Pyozyaninkonzentration im Zellmedium, angegeben in µM: Mikromolar. MFI: mittlere Fluoreszenzintensität; Pos. Kontr.: Positivkontrolle; DMF: Dimethylformamid (Lösungsmittel für Pyozyanin).
H_2O_2: Wasserstoffperoxid, $ONOO^-$: Peroxynitrit, HO*: Wasserstoffmonoxid, NO: Stickstoffmonoxid, ROO*: Lipidperoxid; Federbalken: Standardfehler
*t-Test $p<0,05$ = signifikant, $p<0,01$= zweifach signifikant, $p<0,001$ = dreifach signifikant
Signifikanzen SOD +/+ gegen SOD -/- Tiere **(A)**: 500µM: p= 0,03 (signifikant); 250µM: p= 0,23 (nicht signifikant); 125µM: p= 0,002 (signifikant); 62,5µM: p= 0,2 (nicht signifikant)
Signifikanzen **(B)**: 500µM: p= 0,01 (signifikant); 250µM: p= 0,02 (signifikant); 125µM: p= 0,001 (signifikant); 62,5µM: p= 0,004 (signifikant)

3.3.3 Kein signifikanter Unterschied im FITC-Dextran Phagozytose-Versuch bei epidermalen LZ

Um ihre Funktion als äußere Wächter des Hautimmunsystems zu erfüllen, nehmen DZ extrazelluläre Teile als Antigene durch Phagozytose bzw. Endozytose auf, prozessieren sie und präsentieren sie anschließend als Peptide auf ihrer Zelloberfläche.

Beim Versuch mit FITC-Dextran soll festgestellt werden, ob wichtige Funktionen wie Phagozytose durch komplette Ausschaltung der MnSOD in LZ eingeschränkt sind.

Das Prinzip dieses Versuchs beruht darauf, dass Dextran von LZ phagozytiert wird. Daraufhin kann FITC in vitalen Zellen, die FITC-Dextran aufgenommen haben, durchflusszytometrisch dargestellt werden. Es fand sich kein signifikanter Unterschied der FITC-Dextran-Phagozytose zwischen epidermalen LZ von Wildtyp-Mäusen und Mäusen mit SOD2-Defizienz.

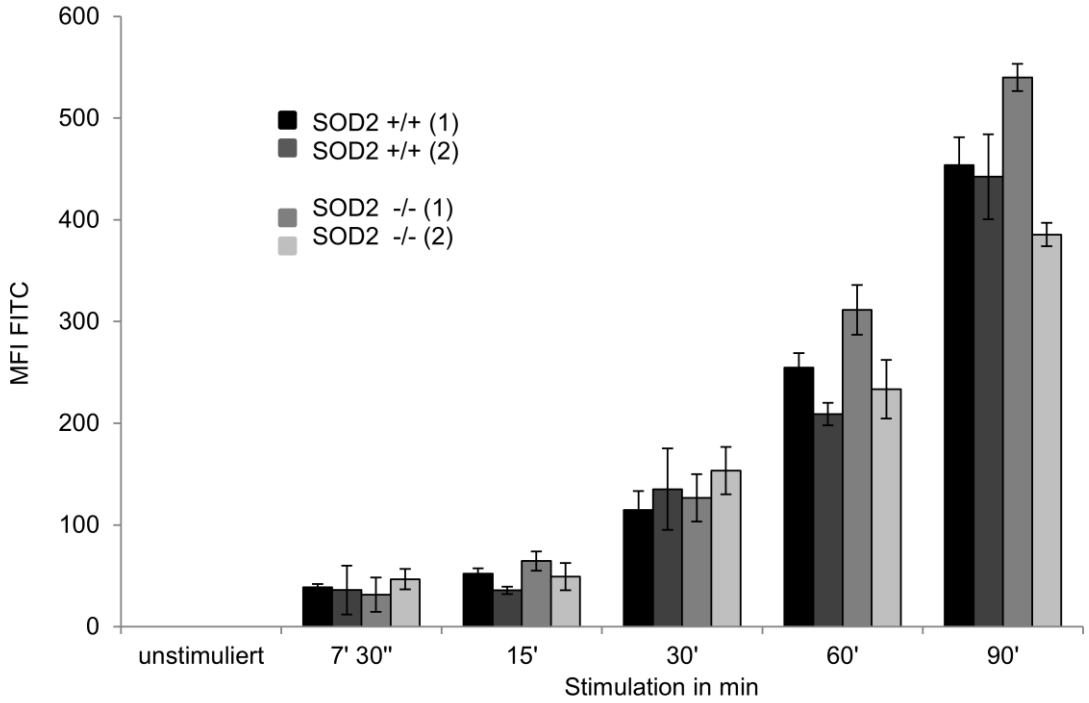


Abb. 12 SOD2 defiziente Langerhanszellen haben keine funktionelle Einschränkung der FITC-Dextran Aufnahme.
Langerhanszellen wurden ausplattiert und mit Pyozyanin-Lösung für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Langerhanszellen für 0, 7,5, 15, 30, 60 und 90 Minuten (min) mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) - Dextran-Lösung inkubiert. Für die durchflusszytometrische Analyse wurde durch MHC-II-Expression eingegrenzt. Bei den eingegrenzten LZ wurde die FITC-Dextran-Aufnahme mittels der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) gemessen. Balkendarstellung mit Standardabweichung.
SOD +/+ : Wildtyp-Langerhanszellen, SOD -/- : SOD2 defiziente Langerhanszellen

3.3.4 Verminderte MHC-II- und CD86-Expression auf SOD2 defizienten LZ

Präsentieren DZ Antigen, exprimieren sie das phagozytierte Antigen über das MHC-II-Molekül an ihrer Oberfläche. Damit die T Zelle aktiviert wird, benötigt sie nicht nur die Bindung von MHC-II an den T-Zell-Rezeptor, sondern auch die Bindung zwischen CD86 der aktivierten DZ an CD28 auf T-Zellen.
Um zu ermessen, inwiefern eine Defizienz der SOD2 Einfluss auf das Immungeschehen hat, wurden die Expression von MHC-II und CD86 auf LZ mit SOD2 Defizienz mit LZ von WT Mäusen verglichen.
Es wurden DZ-Einzelzellsuspensionen angefertigt und für 24 Stunden kultiviert.

Hierbei zeigte sich, dass SOD2 defizienten LZ schwächer MHC-II und CD86 exprimieren als Wildtyp LZ (Abb. 13). Diese verhalten sich also vergleichbar den heterozygoten, aus Knochenmark generierte DZ und heterozygoten epidermalen LZ (Abb. 4).

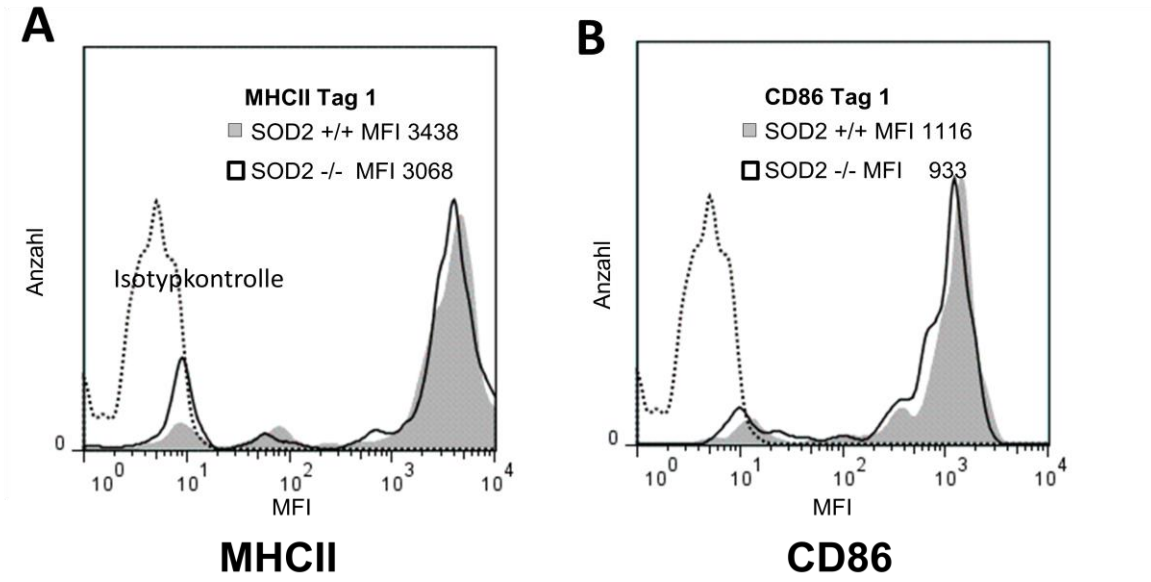


Abb. 13 Verminderte Expression von MHC-II und CD86 nach 24h Kultur auf SOD2 defizienten Langerhanszellen.
Einzelzellsuspension, die aus der Haut von Mäusen mit SOD2 Defizienz (SOD2-/-) in Langerhanszellen (LZ) oder Wildtyp-Mäusen (SOD2+/+) angefertigt wurden, wurden für 24h kultiviert. Nach Färbung mit Antikörpern gegen MHC-II und CD86 erfolgte die durchflusszytometrische Auswertung. Epidermalzellsuspensionen enthielten 2-3% LZ und wurden mittels ihrer CD207 Expression eingegrenzt (nicht gezeigt). Bei CD207 positiven Zellen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von MHC-II und CD86 ausgewertet.

3.3.5 SOD2 defiziente Langerhanszellen haben keine veränderte T-Zell stimulatorische Kapazität in der gemischten Lymphozytenreaktion

SOD2 defiziente LZ regulieren MHC-II nach Aktivierung schwächer auf als ihre WT Kontrollen. Dies könnte ihre antigenpräsentierende Funktion beeinflussen.
Um zu testen, ob SOD2 defiziente LZ T-Zellen schlechter zur Proliferation anregen, wurde eine allogene Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) mit BALB/c

Milzzellen angesetzt.

Mithilfe der MLR konnte gezeigt werden, dass beide Zelltypen, WT und SOD2 defiziente LZ, keinen signifikanten Unterschied in der T-Zell-stimulatorischen Kapazität haben.

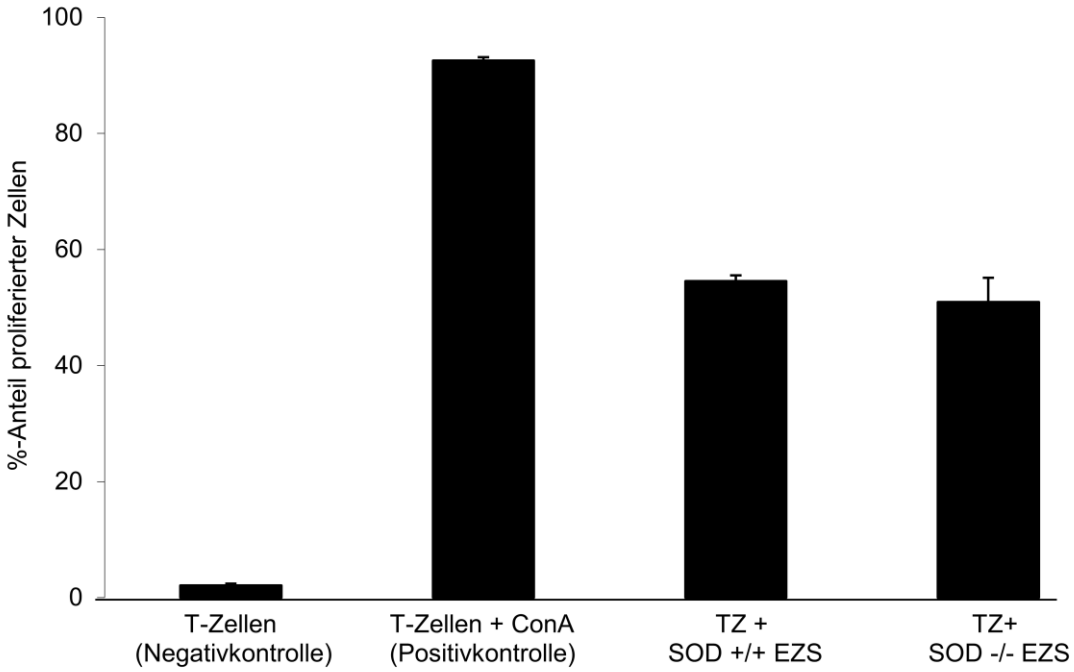


Abb. 14 SOD2 defiziente Langerhanszellen haben keine veränderte T-Zell stimulatorische Kapazität in der gemischten Lymphozytenreaktion (MLR)

Es wurden Einzelzellsuspension (EZS) von SOD2+/+ (=Wildtyp) und SOD2-/- (SOD2-defizienten) Dendritischen Zellen (DZ) hergestellt. Der Langerhanszell-Anteil (LZ) wurde mit Anti-CD11b Antikörper gefärbt und mittels Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt. Die Epidermalzellzahl für die MLR wurde errechnet bezüglich der darin enthaltenen Zahl von LZ und wurde dann mit T-Zellen unter CFSE (Carboxyfluoreszin-Succinimidyl-Ester) in der MLR inkubiert. In den Reaktionswells wurde erst 100 µl Medium vorgelegt, dann die dendritischen Zellen (DZ) und dazu die T-Zellen (TZ) (pro Well 100.000 TZ auf 10.000 DZ) gegeben.

An Tag 5 erfolgte die Bestimmung der T-Zell Proliferation durch FACS-Analyse. Die Zellteilungen wurden anhand der CFSE-Verteilung in den neuen Generationen der TZ gemessen.

ConA = Concanavalin A

3.3.6 Kontakthypersensitivität gegen TNCB

In den vorausgegangenen Versuchen mit SOD2 heterozygoten Mäusen fand sich eine verstärkte CHS-Reaktion (siehe Abb. 9). Kaplan et al. haben in einem Modell

der Deletion von LZ gezeigt, dass es durch die fehlende Funktion von LZ zu einer verstärkten CHS-Reaktion kommt (Kaplan et al., 2005). Das Modell LZ spezifischer SOD2 defizienter Mäuse wurde genutzt, um den Effekt eines selektiv gestörten Redox-Gleichgewichts auf die LZ-Funktion zu erforschen. Nach Standardprotokoll wurde die TNCB induzierte CHS bei Tieren mit selektiver SOD2 Defizienz in LZ mit jener von WT-Tieren durch Messung der Ohrschwellung verglichen (Weiss et al., 1997).

Mäuse mit SOD2 defizienten epidermalen Langerhanszellen zeigten nach 48 Stunden eine signifikant verminderte Ohrschwellung im Vergleich zu ihren WT-Wurfgeschwistern. Vergleicht man nur ältere Mäuse (121-151 Tage alt) ist die Signifikanz noch eindeutiger (Daten nicht angezeigt). Auch bei jüngeren Tieren (85 Tage alt) ist dieser Effekt schon zu beobachten.

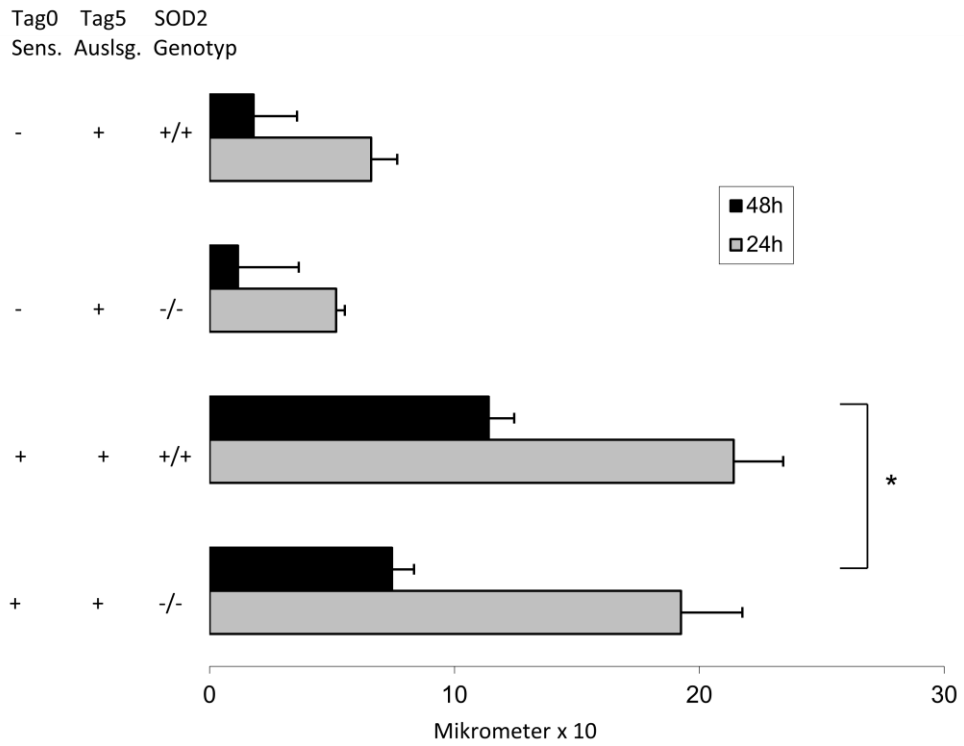


Abb. 15 Kontakthypersensitivität mit TNCB in vivo.
Wildtyp-Mäuse (+/+) und Mäuse mit Mangansuperoxiddismutase (= SOD2) Defizienz (-/-) in Langerhanszellen (LZ) wurden an Tag 0 am Abdomen mit TNCB sensibilisiert (Tag0 Sens. +), die Kontrollmäuse beider Genotypen wurde mit dem Lösungsmittel Aceton sensibilisiert (Tag0 Sens. -). An Tag 5 wurde die Kontakthypersensitivitätsreaktion (CHS) an beiden Ohren durch Trinitro-Chloro-Benzol (TNCB) Applikation ausgelöst (Tag5 Auslsg. +) und nach 24h und 48h die Dicke der Ohren bestimmt. Die Abbildung zeigt die Ohrschwellung bei 5 Mäusen pro Gruppe. 48h nach Auslösung fand sich eine signifikant verminderte Ohrschwellung bei Mäusen mit SOD2 defizienten LZ (* t-Test, $p<0,05$: $p = 0,017$).

4 Diskussion

Chronische Entzündung verbunden mit abnehmender spezifischer Immunität sind Kennzeichen eines alternden Immunsystems (Cannizzo et al., 2011). Doch werden die Einzelheiten, die diesen Zustand herbeiführen, auf molekularer Ebene nur teilweise verstanden. Das System aus dendritischen Zellen der Haut ist essentiell um eine optimale antiinfektiöse Immunität zu garantieren und gleichzeitig vor Autoimmunität zu schützen (Nestle et al., 2009). Das Wissen über die Wirkungsweisen der Alterung verschiedener DZ-Typen der Haut steht noch ganz am Anfang. Es gibt jedoch immer mehr Anzeichen dafür, dass veränderte DZ zum „Inflamm-aging“ beitragen (Agrawal et al., 2007b; Agrawal et al., 2008). Ein aktuelles Forschungsprojekt ist die Untersuchung, welche DZ Untergruppen für die Vorgänge verantwortlich sind, die die Haut schützen (Kaplan et al., 2012).
Die SOD2 wurde als eines der Gene beschrieben, die mit Alterung verknüpft sind (Muller et al., 2007). Diese Arbeit untersucht, wie verminderte Expression der SOD2 die LZ/DZ Funktionen beeinflusst und zum Zustand des „Inflamm-aging“ beitragen kann.

4.1 LZ Reduktion und Toleranz

In einer ersten Versuchsreihe konzentrierten sich die Experimente auf epidermale LZ und es stellte sich heraus, dass die Anzahl dieser Zellen bei zwei Jahre alten Mäusen auf ca. 30% der LZ-Zahl der Haut einer zwei Monate alten Maus abnimmt (Abb. 3). Entsprechend wurde in sonnengeschützter menschlicher Haut bei gealterten Individuen eine Abnahme der LZ-Zahl ermittelt (Abb. 3 C) was sehr frühe Studien über die LZ Biologie bestätigt (Gilchrest et al., 1982; Sprecher et al., 1990). Dies ist eine wichtige Information, da sich die Sichtweise auf die immunologische Bedeutung der LZ zuletzt deutlich geändert hat (Kaplan et al., 2008). Abweichend zur ursprünglichen Annahme, LZ seien die bedeutendsten Zellen, die Antigen-spezifische Immunität induzieren, werden LZ heutzutage als tolerogene Zellen verstanden, die vermutlich für die Etablierung der Selbsttoleranz

unentbehrlich sind. Ein alterndes Immunsystem bei dem eine Verminderung der LZ zu einem verringerten tolerogenen Potential führt, könnte demnach zum Teil die höhere Rate an Autoimmunerkrankungen im Alter erklären und so von direkter klinischer Relevanz sein. Die Ergebnisse legen nahe, dass auch das Hautmilieu eines gealterten Organismus großen Einfluss auf die Quantität epidermaler LZ haben kann (Ogden et al., 2011).

In einer folgenden Versuchsreihe wurde untersucht, wie eine verminderte Expression der SOD2 die LZ/DZ Funktion beeinflusst. Dafür wurden Einzelzellsuspensionen epidermaler LZ SOD2 heterozygot defizienter Mäuse mit WT Kontrollen bezüglich ihrer MHC-II-, CD86- und CD44-Expression durchflusszytometrisch untersucht. Es wurde beobachtet, dass SOD2 heterozygote LZ zwar vermehrt CD44 aufregulieren, die Expression von MHC-II und CD86 jedoch zurückgeht. Dies spricht dafür, dass eine SOD2 Heterozygotie in LZ die Antigenpräsentation negativ beeinflusst und somit die Funktion des Hautimmunsystems bei einem Mangel an MnSOD in LZ eingeschränkt sein könnte.

LZ spezifisch SOD2 defiziente Mäuse im Alter von 6 Wochen zeigten morphologisch veränderte und quantitativ verringerte LZ. Somit kann eine SOD2 Defizienz schon bei jungen Mäusen zu verkleinerten LZ mit weniger Dendriten führen (Abb. 10).

DZ können eine große Anzahl antioxidativer Enzyme exprimieren (Rivollier et al., 2006), unter anderem wird bei DZ Aktivierung die SOD2 verstärkt exprimiert. Nachdem die SOD2 als Lebensspanne verkürzendes Gerontogen beschrieben wurde und ein Defekt mit altersassoziierten Erkrankungen verknüpft ist (Salmon et al., 2010; Treiber et al., 2011), vermutete man, dass eine verminderte SOD2 Expression mit einem alternden Phänotypen bei LZ/DZ verbunden sein könnte. Bei der Untersuchung des LZ-Phänotyps SOD2 heterozygoter Mäuse, stellte sich heraus, dass diese im Alter von vier Monaten morphologisch und quantitativ normale LZ Populationen besitzen.

Es ist interessant zu untersuchen, ob sich ein Rückgang der Quantität und eine weiter veränderte Morphologie der LZ SOD2 heterozygoter Mäuse zeigt, wenn diese Mäuse älter werden.

4.2 Reaktive Sauerstoffspezies und SOD2

Für die Alterung eines Individuums werden unter anderem erhöhte Konzentrationen von ROS im Organismus und der einzelnen Zelle verantwortlich gemacht. Unter physiologischen Bedingungen können ROS zur Aktivierung von LZ/DZ beitragen (Kantengwa et al., 2003). DZ nutzen ihre antioxidativen Fähigkeiten wie die MnSOD zum Selbstschutz und können gleichzeitig Lymphozyten vor Inaktivierung und Apoptose bewahren (Thoren et al., 2007). Unterliegen DZ oxidativem Stress, zum Beispiel künstlich induziert durch Pyozyanin, kann man die ROS-Anhäufung und die H_2O_2-Bildung in SOD2 heterozygoten und WT Mäusen messen (Abb. 5). Pyozyanin ist ein starker ROS-Erzeuger. Es induziert reaktive Sauerstoffspezies und H_2O_2 indem es intrazelluläre Elektronendonoren wie NADPH reduziert (Muller, 2002).

Diese Arbeit zeigt, dass die SOD2 heterozygoten DZ (+/-) im Vergleich zu WT-Kontrollen mehr Superoxidanion, dem Ausgangsstoff für die SOD2, anreichern (Abb. 5 A). Außerdem produzierten sie durch Reduktion des Sauerstoffanions gleichzeitig mehr Wasserstoffperoxid und andere Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Abb. 5 B).

Beim Vergleich von WT LZ mit SOD2 defizienten LZ (-/-) reicherten nach Behandlung mit Pyozyanin wiederum die WT Zellen weniger Superoxidanion an, aber produzierten mehr Endprodukt, also H_2O_2 und andere ROS (Abb. 11).

Die heterozygoten DZ, bei denen SOD2 zwar noch in einfacher Ausführung vorhanden ist, reichern mehr Superoxidanion an. Dieses Mehr an Superoxidanion kann dennoch durch die 50 prozentige Aktivität der SOD2 umgesetzt werden (Abb. 5). SOD2 (-/-) LZ im Vergleich dazu, haben keinerlei SOD2 Aktivität und häufen somit viel Ausgangsstoff, also Superoxidanion an. Zusätzlich können diese Mengen nicht umgesetzt werden zu H_2O_2. Sie entwickeln geringere Mengen Endprodukt (Abb. 11).

Dieses Ergebnis ergänzt Vorarbeiten, die zeigen dass bei SOD2 heterozygoten Mäusen die SOD2 Aktivität um ca. 50% reduziert ist, und dies zum verminderten Abbau von ROS führt (Strassburger et al., 2005). Ein ineffektiver Ausgleich der ROS-Balance wurde als wichtiger Alterungsfaktor beschrieben (Muller et al., 2007;

Peters et al., 2009).

Im Folgenden wurden mögliche funktionelle Konsequenzen dieser Dysbalance im Redoxsystem untersucht. LZ, die aus der Haut SOD2 heterozygoter Mäuse isoliert wurden, exprimieren nach 12 Stunden vermehrt CD44, die Expression von MHC-II und CD86 ist jedoch leicht vermindert (Abb. 4). Dies zeigt, dass ein Mangel an MnSOD einen leichten Einfluss auf die Expression wichtiger Moleküle der Antigenpräsentation hat.

Es können in Anzahl und Morphologie normale DZ von SOD2 heterozygotem Knochenmark hergestellt werden (Abb. 6). Wenn SOD2 heterozygote DZ nach Aktivierung in epidermalen Zellkulturen mit Kontrollen verglichen werden, exprimieren SOD2 heterozygote DZ weniger MHC-II und kostimulatorisches CD86 (Abb. 6 A und B). Vergleichbare Effekte wurden bei DZ gefunden, die mit LPS stimuliert wurden. DZ mit verstärkter proinflammatorischer Zytokinsekretion im Ruhezustand und verminderter Expression von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen ähneln einem Phänotyp, wie er für DZ aus altem Knochenmark gezeigt wurde (Agrawal et al., 2007a; Agrawal et al., 2009).

SOD2 defiziente LZ weisen ähnliche Veränderungen wie intrinsisch gealterte LZ auf; Sie sind weniger dendritisch, insgesamt kleiner und nehmen quantitativ ab.

Andere Arbeiten ergaben, dass Superoxidanionen DZ-Aktivierung bewirken und dass oxidativer Stress deren antigenpräsentierende Funktion sowohl fördern als auch blockieren kann - abhängig vom Zeitpunkt der Antigenerkennung (Kantengwa et al., 2003). Dass SOD2 heterozygote DZ eine verminderte T-Zell stimulierende Funktion besitzen (Abb. 8), passt zum Ergebnis, dass in unserem System eine Anhäufung von ROS die antigenpräsentierende Funktion von DZ verschlechtert (Abb. 8). Eine Erklärung könnte sein, dass dies durch vorgezogene Aktivierung von LZ/DZ zustande kommt, was deren Antigenaufnahme behindert. Vorangegangene Arbeiten von Agrawal (Agrawal et al., 2007a) zeigten bei älteren Individuen eine verminderte Fähigkeit der DZ Antigen zu phagozytieren. Außerdem stellte sich heraus, dass DZ durch die Expression antioxidativer Enzyme, T-Zellen und NK-Zellen beeinflussen, indem sie diese vor Apoptose und Inaktivierung schützen (Thoren et al., 2007). Bisher nimmt man an, dass die verminderte T-Zell stimulierende Funktion der SOD2 heterozygoten DZ, aufgrund

eines verminderten protektiven Effekts der fehlenden SOD2 auf T-Zellen zustande kommen könnte. Dies muss Thema der Forschung in Zukunft sein.

Proinflammatorische Stimuli, die auf DZ wirken, induzieren komplexe Signalkaskaden, in denen ROS eine Rolle spielen (Muller et al., 2007). Ein Ungleichgewicht an ROS aufgrund einer verminderten Beseitigung durch die SOD2 kann somit einen proinflammatorischen Effekt haben. Wir fanden bei SOD2 heterozygoten DZ eine erhöhte IL-6- und Chemokin-Expression (Abb. 7). Besonders die im Serum erhöhten IL-6 Spiegel werden mit einem gealterten und insuffizienten, aber proinflammatorischen Immunsystem in Zusammenhang gebracht (Agrawal et al., 2007a; Agrawal et al., 2008).

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass SOD2 Defizienz bei alternden LZ/DZ das „Inflamm-aging“ durch die Expression proinflammatorischer Zytokine der DZ verstärkt (Peters et al., 2009).

4.3 Dendritische Zellen, ihre Aktivierbarkeit und der Alterungsprozess

Die Datenlage zum Alterungsprozess von LZ/DZ ist widersprüchlich. Einige Versuche ergaben, dass murine und humane DZ in normaler Anzahl aus gealtertem Knochenmark oder peripherem Blut generiert werden können und dass diese DZ weder in der Expression ihres Oberflächenmolekülmusters noch in ihrer antigenpräsentierenden Funktion beeinflusst werden (Lung et al., 2000; Saurwein-Teissl et al., 1998). Demgegenüber demonstrieren Studien von Paula et al. (Paula et al., 2009), dass weniger DZ von gealtertem Knochenmark abstammen, die zwar eine größere Menge an TNFα produzieren, aber schlechter aktivierbar und weniger potent bei der Antigenaufbereitung und –präsentation sind. Agrawal et al. fanden, dass gealterte DZ, welche viel TNFα und IL-6 produzieren, vermindertes Phagozytose- und Migrationspotential besitzen (Agrawal et al., 2007a).

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass eine verminderte ROS Eliminierung aufgrund eines SOD2 Verlusts ein wichtiger Faktor in solch einer altersassoziierten Dysfunktion sein kann, da SOD2 heterozygote DZ gesteigerte Mengen an IL-6 und den Chemokinen CXCL-1 und CXCL-2

produzieren (Abb. 7). Bei diesem Modell war die TNFα-Sekretion bei nicht aktivierten SOD2 heterozygoten DZ nicht verändert. Allerdings sezernierten SOD2 heterozygote DZ nach LPS-Aktivierung weniger TNFα. Außerdem exprimierten diese DZ weniger MHC-II und CD86 nach LPS-Aktivierung (Abb. 13) - entsprechend den weiter oben beschriebenen schon gealterten DZ. In ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen hatten sie geringere T-Zell-stimulatorische Kapazität. Die klinische Relevanz dieser Erkenntnisse wird durch weitere Arbeiten unterstrichen, welche Defizite in der Tumorimmunität durch Mängel bei der DZ-Migration und APC-Funktion muriner gealterter DZ aufwiesen (Grolleau-Julius et al., 2008).

4.4 Phagozytosekapazität von LZ

Beim Versuch mit FITC-Dextran zur Antigen-Aufnahme in DZ soll festgestellt werden, ob wichtige Funktionen wie Phagozytose durch komplette Ausschaltung der MnSOD in LZ eingeschränkt sind.
Es zeigte sich im Vergleich der SOD2 defizienten DZ mit WT DZ kein signifikanter Unterschied. Die SOD2 defizienten DZ wiesen meist eine geringfügig höhere Aufnahme von FITC-Dextran auf (Abb. 12).
Dies spricht dafür, dass MnSOD Defizienz die Phagoyztosekapazität und damit die Antigenaufnahme nicht wesentlich beeinflusst. Vorangegangene Arbeiten von Agrawal zeigten bei humanen DZ älterer Individuen eine verminderte Phagozytosekapazität von FITC-Dextran (Agrawal et al., 2007a). Diese Arbeit untersucht, ob ein MnSOD-Mangel, im Sinne eines Alterungsmodells, ähnliche Effekte auf LZ bei Mäusen hat. Dies konnte nicht gezeigt werden. Möglich ist, dass gealterte humane DZ in dieser Beziehung nicht mit murinen SOD2 defizienten LZ vergleichbar sind.

4.5 Kontakt-Hypersensitivitätsreaktion (CHS) und antigen-präsentierende Funktion bei SOD2 Mangel und SOD2 Defizienz

Ein Merkmal des gealterten humanen Immunsystems ist die verminderte und verspätete Immunantwort (Nestle et al., 2009). Die CHS ist ein etabliertes murines Modell, um die antigenspezifische T-Zell-Antwort in der Haut zu testen (Gu et al., 1989). Die T-Zell-Antwort wurde in diversen Mausalterungsmodellen getestet und es resultierten unterschiedliche Ergebnisse. Gu et al. beschrieben eine abgeschwächte CHS-Antwort gegen TNCB bei gealterten Mäusen (Gu et al., 1989). Eine weitere Studie mit BALB/c Mäusen ergab starke Schwankungen der CHS bei alten Tieren (Choi and Sauder, 1987). Arbeiten von Cumberbatch et al. zeigten unveränderte Antworten bei sechs Monate alten Mäusen (Cumberbatch et al., 2002). Allerdings wurden altersabhängige Funktionsdefekte der LZ entdeckt. Die unterschiedlichen Daten kommen vermutlich durch den Einsatz verschiedener Mausstämme, Altersgruppen und Haptene zustande und sind somit schwer vergleichbar.

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein Mausmodell mit heterozygoter Defizienz der SOD2 in allen SOD2 exprimierenden Zellen untersucht.

Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es bei Auslösung einer CHS bei zwei Monate alten SOD2 heterozygoten Mäusen verglichen mit Wildtyp-Mäusen zu einer signifikant verstärkten Ohrschwellung kommt (Abb. 9). Für die Interpretation dieser Beobachtung sind verschiedene Aspekte wichtig. Einerseits ist dies vermutlich bedingt durch Veränderungen im T-Zell-Kompartiment bei gesamtorganismischer Heterozygotie. Auch lässt dieses Ergebnis vermuten, dass in dem hier beschriebenen Modell die Anreicherung von nicht eliminierten ROS zur Aktivierung proinflammatorischer Signalwege und zu einer Aktivierung der T-Zell-vermittelten Immunität führt. Denkbar wäre aber auch, dass eine Störung des Redox-Equilibriums im Gesamtsystem der DZ hierbei beteiligt ist. Eine Störung der LZ-Funktion, die unter verschiedenen Bedingungen tolerogene Effekte ausüben, würde bei erhaltener Funktion der DZ-Subtypen dabei beispielsweise zum proinflammatorischen Profil beitragen.

Die Anhäufung von ROS im ganzen Organismus vermag einen

proinflammatorischen Zustand hervorzurufen, der eine verstärkte T-Zell-Antwort auslöst (Muller et al., 2007; Peters et al., 2009). Dies wird durch das Resultat unterstützt, dass SOD2 heterozygote T-Zellen stärker als WT T-Zellen proliferieren, wenn sie mit DZ stimuliert werden (Abb. 8). Obwohl SOD2 heterozygote DZ schwächere Antigenpräsentation aufweisen, ist diese immer noch stark genug, um bei heterozygot defizienten T-Zellen eine stärkere Proliferation auszulösen als bei WT T-Zellen (Abb. 8). Die veränderte Funktion in verschiedenen DZ Kompartimenten der Haut mag ebenso an der verstärkten Antigenantwort in vivo beteiligt sein. Im Gegensatz zu myeloiden DZ Subtypen, welche sich in der Dermis befinden, zeigten verschiedene Arbeiten, dass LZ tolerogenes Potential besitzen und somit das Hautimmunsystem vor übermäßiger Immunantwort schützen können (Kaplan et al., 2008). Quantitative und funktionelle Unterschiede verschiedener DZ Kompartimente SOD2 heterozygoter Mäuse können möglicherweise die tolerogenen Funktionen der LZ behindern und somit die T-Zell-Antwort verstärken.

Um festzustellen, wie sich LZ bei Mäusen entwickeln, die eine spezifische Defizienz der SOD2 allein in epidermalen Langerhanszellen besitzen und wie sie auf äußere Einflüsse reagieren, wurde ein Mausmodell etabliert, bei dem die SOD2 selektiv in epidermalen Langerhanszellen ausgeschaltet ist.
Bei Mäusen mit langerhanszellspezifischer SOD2 Defizienz zeigte sich eine verminderte CHS-Antwort gegen TNCB verglichen zu Wildtyp-Mäusen (Abb. 15). Möglicherweise hängt dies damit zusammen, dass ROS nicht im gesamten Organismus akkumuliert, sondern nur in den LZ der Haut. Durch andere vorhandene Schutzmechanismen, die das Redoxumfeld der Zelle stabilisieren, ist diese geschützt vor einer zu starken Immunreaktion. So können zum Beispiel die intrazytoplasmatische Cu/Zn SOD (SOD1) oder die extrazelluläre EC-SOD (SOD3) eine Kontakthypersensitivitätsreaktion supprimieren (Marikovsky et al., 2003; Na et al., 2007). Somit hat eine MnSOD Defizienz einen geringen Einfluss auf die antigenpräsentierende und T-Zell-stimulatorische Funktion in LZ. Dies wird durch das Ergebnis der verminderten Expression von MHC-II und CD86 ergänzt (Abb. 13).

Bisher ist nichts bekannt darüber, ob eine Überexpression der SOD2 Kontaktallergien beeinflusst.
Da eine eingeschränkte SOD2-Funktion eine CHS-Reaktion verstärkt (Abb. 9), ist es genauso gut möglich, dass eine Überexpression einen dämpfenden Effekt auf die CHS-Reaktion besitzt. Diese Ergebnisse lassen erkennen, dass für die ROS vermittelten Funktionen des Hautimmunsystems ein fein abgestimmtes Zusammenspiel zwischen den einzelnen Superoxiddismutasen wichtig zu sein scheint.
Es wird weiterhin daran geforscht, welche Gruppe von DZ der Haut für die zahlreichen Prozesse verantwortlich ist, die die äußerste Schicht des Körpers schützen (Kaplan et al., 2008; Merad et al., 2008; Nestle et al., 2009). Weiterreichende Nachforschungen werden altersassoziierte Veränderungen in den verschiedenen DZ Kompartimenten der Haut prüfen und damit deren feinabgestimmte Auswirkungen ergründen.
Es konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an altersassoziierten antioxidativen Funktionen ein „Inflamm-aging“ des Hautimmunsystems unterstützt.

4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend unterstützt diese Arbeit die Hypothese, dass der Rückgang der altersabhängigen antioxidativen Leistung durch den Mangel an SOD2 den „Inflamm-aging“ Phänotyp eines gealterten Hautimmunsystems durch Effekte innerhalb des LZ/DZ– und des T-Zell-Kompartiments unterstützen kann.

4.6.1 Ausblick und Perspektiven

LZ sind Teil des äußersten immunologischen Schutznetzwerkes der Haut. Unterschiedliche Untersuchungen legen nahe, dass durch den Alterungsprozess die Anzahl und Funktion von LZ nachlässt. Dadurch kommt es zu einer modifizierten Immunitätslage der Haut, die das Auftreten von Hauttumoren,

Infektions- und Autoimmunerkrankungen begünstigt (Cumberbatch et al., 2002; Gilchrest et al., 1982; Neale et al., 1997; Sprecher et al., 1990).

Das Wissen über den im Alterungsprozess stattfindenden Funktionsverlust von LZ und DZ und die Kenntnis der Möglichkeiten, diesen zu beeinflussen, kann neue therapeutische Alternativen eröffnen.

Zum Beispiel könnte man sich die Gabe speziell angepasster Zytokinzusammensetzungen zur Induktion der Vorläuferzellen von DZ oder LZ zur Vermehrung oder eventuell zur Funktionsverbesserung der LZ und DZ vorstellen. Aus peripheren Vorläuferzellen ist es heutzutage möglich, größere DZ-Mengen für therapeutische Zwecke zu generieren (Inaba et al., 1992). Es könnten gezielt spezifische LZ/DZ gezüchtet werden, die sich zum Wiederaufbau des Immunsystems oder zur Impfung gegen Infektionskrankheiten und Tumoren einsetzen ließen, sobald der genaue Prozess der durch Seneszenz bedingten Fehlfunktionen verstanden ist.

Auch zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten ließe sich die Generierung tolerogener LZ/DZ andenken. Die durch ROS induzierten Alterungsschäden der Haut wären gegebenenfalls durch Pharmaka zu beeinflussen, die ROS inaktivieren, beziehungsweise das Redox-Equilibrium normalisieren.

Experimentell entsteht die Möglichkeit, ROS-induzierende Alterung spezifisch in unterschiedlichen myeloiden DZ-Kompartimenten zu erforschen. Das Modell der SOD2 Defizienz könnte zukünftig genutzt werden, um andere DZ-Untergruppen durch die Kopplung an spezifische Gene, wie zum Beispiel Langerin oder CD103 zu untersuchen. Langfristiges Ziel ist es, tiefer in die molekularen Zusammenhänge vorzudringen und die verantwortlichen Signaltransduktionswege zu ergründen.

5 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DZ) haben eine zentrale Funktion beim Schutz der Körperoberfläche durch das Immunsystem der Haut. Die Alterung des Immunsystems steht in Zusammenhang mit chronischer Entzündung. Noch weiß man wenig über den Beitrag dendritischer Zellen zum „Inflamm-aging“

Der Begriff „Inflamm-aging“ steht für ein alterndes Immunsystem mit eingeschränkter spezifischer Abwehr bei gleichzeitiger Zunahme eines chronischen Entzündungszustandes. Vorarbeiten lassen annehmen, dass Langerhanszellen, also epidermale dendritische Zellen, an den komplexen Mechanismen des „Inflamm-aging“ beteiligt sind.

In der Haut koordinieren dendritische Zellen die Immunabwehr und Toleranz. Nach der „Theorie des Alterns durch freie Radikale“ werden erhöhte Konzentrationen an Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als eine Ursache der Alterung betrachtet. Die antioxidative Mangansuperoxiddismutase (SOD2) ist einer der wichtigsten Faktoren der antioxidativen Abwehr. Sie wurde als eines der Gene beschrieben, die mit der Alterung verknüpft werden.

Gealterte Wildtyp-Mäuse wurden hinsichtlich der Langerhanszellzahl (LZ) mit jüngeren Mäusen verglichen. Es zeigte sich, dass es im Rahmen der Immunseneszenz zu einem deutlichen Rückgang der Langerhanszellzahl kommt. Weiterhin wurde untersucht, wie eine verminderte Expression der SOD2 die LZ/DZ Funktionen beeinflusst, wenn die SOD2-Aktivität in allen SOD2-exprimierenden Zellen reduziert ist. Versuche, mit 4 Monate alten SOD2 heterozygoten Mäusen, ergaben, dass ihre Langerhanszellzahl unverändert ist, aktivierte LZ aber eine gering eingeschränkte Expression von MHC-II und CD86 aufweisen. Unreife SOD2 heterozygote, aus Knochenmark generierte DZ produzierten mehr proinflammatorisches IL-6 und die Chemokine CXCL1 und CXCL2.

Durch Inkubation mit Pyozyanin kommt es bei SOD2 heterozygoten DZ zur Zunahme von oxidativem Stress. Folge ist die stärkere Akkumulation von Superoxidanion und größere Mengen an umgesetztem H_2O_2 als bei Wildtyp-DZ.

Wurden SOD2 heterozygote DZ mit LPS stimuliert, war die Expression von MHC-II

und CD86 vermindert. In vivo wurde die Rolle der ROS-Dysbalance in DZ anhand des Kontakthypersensitivitätsmodells (CHS) untersucht. Die CHS war bei SOD2 heterozygoten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verstärkt, obwohl SOD2 heterozygote DZ die T-Zellen von Wildtyp-Tieren schlechter stimuliert. SOD2 heterozygote T-Zellen proliferierten vermehrt, wenn sie mit SOD2 heterozygoten DZ stimuliert wurden. Dies kann die verstärkte Kontakthypersensitivitätsreaktion teilweise erklären.

Weitere Untersuchungen erfolgten mit einem Modell mit selektiver SOD2 Defizienz in LZ.

Hier ergaben sich Unterschiede hinsichtlich Morphologie und Quantität der LZ: Die LZ Zahl in der Epidermis bei Mäusen mit SOD2-Defizienz verringerte sich bei älteren Tieren. Außerdem waren die Dendriten weniger ausgeprägt und die Zellkörper vieler LZ hatten eine rundlichere Form als die der Wildtyp-Tiere.

Bei SOD2 defizienten LZ kam es bei der Inkubation mit Pyozyanin zu einer stärkeren Akkumulation von Superoxidanion bei gleichzeitiger Abnahme von H_2O_2.

Weiterhin bestätigte sich eine eingeschränkte Aufregulation von MHC-II und CD86. Beim in vivo Kontakthypersensitivitätsversuch zeigten Mäuse mit SOD2 defizienten LZ eine abgeschwächte Reaktion.

Zusammenfassend legt diese Arbeit nahe, dass der Rückgang der altersabhängigen antioxidativen Leistung durch einen Mangel an SOD2 den Phänotyp eines gealterten Hautimmunsystems durch proinflammatorische Effekte innerhalb des LZ/DZ– und des T-Zell-Kompartiments unterstützen kann.

Dadurch werden Erkenntnisse über den Einfluss ROS-abhängigen Alterns im Hautimmunsystem eröffnet, die eine Grundlage für neue therapeutische Ansätze darstellen können.

6 Literaturverzeichnis

1 Agrawal, A., Agrawal, S., Cao, J.N., Su, H., Osann, K., Gupta, S., 2007a, Altered innate immune functioning of dendritic cells in elderly humans: a role of phosphoinositide 3-kinase-signaling pathway. J Immunol 178, 6912-6922.

2 Agrawal, A., Agrawal, S., Gupta, S., 2007b, Dendritic cells in human aging. Exp Gerontol 42, 421-426.

3 Agrawal, A., Agrawal, S., Tay, J., Gupta, S., 2008, Biology of dendritic cells in aging. J Clin Immunol 28, 14-20.

4 Agrawal, A., Gupta, S., 2011, Impact of aging on dendritic cell functions in humans. Ageing Res Rev 10, 336-345.

5 Agrawal, A., Sridharan, A., Prakash, S., Agrawal, H., 2012, Dendritic cells and aging: consequences for autoimmunity. Expert Rev Clin Immunol 8, 73-80.

6 Agrawal, A., Tay, J., Ton, S., Agrawal, S., Gupta, S., 2009, Increased reactivity of dendritic cells from aged subjects to self-antigen, the human DNA. J Immunol 182, 1138-1145.

7 Ahmann, G.B., Nadler, P.I., Birnkrant, A., Hodes, R.J., 1979, T cell recognition in the mixed lymphocyte response. I. Non-T, radiation-resistant splenic adherent cells are the predominant stimulators in the murine mixed lymphocyte reaction. J Immunol 123, 903-909.

8 Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., Palucka, K., 2000, Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol 18, 767-811.

9 Cannizzo, E.S., Clement, C.C., Sahu, R., Follo, C., Santambrogio, L., 2011, Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. J Proteomics 74, 2313-2323.

10 Choi, K.L., Sauder, D.N., 1987, Epidermal Langerhans cell density and

contact sensitivity in young and aged BALB/c mice. Mech Ageing Dev 39, 69-79.

11 Chu, C.C., Di Meglio, P., Nestle, F.O., 2011, Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. Semin Immunol 23, 28-41.

12 Cohen, N., Mouly, E., Hamdi, H., Maillot, M.C., Pallardy, M., Godot, V., Capel, F., Balian, A., Naveau, S., Galanaud, P., Lemoine, F.M., Emilie, D., 2006, GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response. Blood 107, 2037-2044.

13 Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Griffiths, C.E., Kimber, I., 2000, Langerhans cell migration. Clin Exp Dermatol 25, 413-418.

14 Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Kimber, I., 2002, Influence of ageing on Langerhans cell migration in mice: identification of a putative deficiency of epidermal interleukin-1beta. Immunology 105, 466-477.

15 Farage, M.A., Miller, K.W., Berardesca, E., Maibach, H.I., 2009, Clinical implications of aging skin: cutaneous disorders in the elderly. Am J Clin Dermatol 10, 73-86.

16 Franceschi, C., Capri, M., Monti, D., Giunta, S., Olivieri, F., Sevini, F., Panourgia, M.P., Invidia, L., Celani, L., Scurti, M., Cevenini, E., Castellani, G.C., Salvioli, S., 2007, Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. Mech Ageing Dev 128, 92-105.

17 Gilchrest, B.A., Murphy, G.F., Soter, N.A., 1982, Effect of chronologic aging and ultraviolet irradiation on Langerhans cells in human epidermis. J Invest Dermatol 79, 85-88.

18 Grewe, M., 2001, Chronological ageing and photoageing of dendritic cells. Clin Exp Dermatol 26, 608-612.

19 Grolleau-Julius, A., Harning, E.K., Abernathy, L.M., Yung, R.L., 2008, Impaired dendritic cell function in aging leads to defective antitumor immunity. Cancer

Res 68, 6341-6349.

20 Gu, S.Q., Sakuma, M., Naito, S., Baba, T., Uyeno, K., 1989, The murine (C3H/He) epidermal Ia+ dendritic cells (Ia+DECs) and Thy-1+ dendritic cells (Thy-1+DECs) in contact hypersensitivity and aging. Acta Derm Venereol 69, 1-5.

21 Harman, D., 2003, The free radical theory of aging. Antioxid Redox Signal 5, 557-561.

22 Hegde, U.P., Chakraborty, N., Kerr, P., Grant-Kels, J.M., 2009, Melanoma in the elderly patient: relevance of the aging immune system. Clin Dermatol 27, 537-544.

23 Hodkinson, C.F., O'Connor, J.M., Alexander, H.D., Bradbury, I., Bonham, M.P., Hannigan, B.M., Gilmore, W.S., Strain, J.J., Wallace, J.M., 2006, Whole blood analysis of phagocytosis, apoptosis, cytokine production, and leukocyte subsets in healthy older men and women: the ZENITH study. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 61, 907-917.

24 Iida, N., Grotendorst, G.R., 1990, Cloning and sequencing of a new gro transcript from activated human monocytes: expression in leukocytes and wound tissue. Mol Cell Biol 10, 5596-5599.

25 Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., Steinman, R.M., 1992, Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J Exp Med 176, 1693-1702.

26 Kantengwa, S., Jornot, L., Devenoges, C., Nicod, L.P., 2003, Superoxide anions induce the maturation of human dendritic cells. Am J Respir Crit Care Med 167, 431-437.

27 Kaplan, D.H., Igyarto, B.Z., Gaspari, A.A., 2012, Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. Nat Rev Immunol 12, 114-124.

28 Kaplan, D.H., Jenison, M.C., Saeland, S., Shlomchik, W.D., Shlomchik, M.J., 2005, Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. Immunity 23, 611-620.

29 Kaplan, D.H., Kissenpfennig, A., Clausen, B.E., 2008, Insights into Langerhans cell function from Langerhans cell ablation models. Eur J Immunol 38, 2369-2376.

30 Kaplan, D.H., Li, M.O., Jenison, M.C., Shlomchik, W.D., Flavell, R.A., Shlomchik, M.J., 2007, Autocrine/paracrine TGFbeta1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. J Exp Med 204, 2545-2552.

31 Kobayashi, Y., 1997, Langerhans' cells produce type IV collagenase (MMP-9) following epicutaneous stimulation with haptens. Immunology 90, 496-501.

32 Koch, F., Kampgen, E., Schuler, G., Romani, N., 2001, Isolation, enrichment, and culture of murine epidermal langerhans cells. Methods Mol Med 64, 43-62.

33 Laupland, K.B., Church, D.L., Mucenski, M., Sutherland, L.R., Davies, H.D., 2003, Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive Staphylococcus aureus infections. J Infect Dis 187, 1452-1459.

34 Lung, T.L., Saurwein-Teissl, M., Parson, W., Schonitzer, D., Grubeck-Loebenstein, B., 2000, Unimpaired dendritic cells can be derived from monocytes in old age and can mobilize residual function in senescent T cells. Vaccine 18, 1606-1612.

35 Marikovsky, M., Ziv, V., Nevo, N., Harris-Cerruti, C., Mahler, O., 2003, Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. J Immunol 170, 2993-3001.

36 Marklund, S.L., 1982, Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. Proc Natl Acad Sci U S A 79, 7634-7638.

37 McCord, J.M., Fridovich, I., 1969, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem 244, 6049-6055.

38 McWilliam, A.S., Napoli, S., Marsh, A.M., Pemper, F.L., Nelson, D.J., Pimm, C.L., Stumbles, P.A., Wells, T.N., Holt, P.G., 1996, Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. J Exp Med 184, 2429-2432.

39 McWilliam, A.S., Nelson, D., Thomas, J.A., Holt, P.G., 1994, Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. J Exp Med 179, 1331-1336.

40 Merad, M., Ginhoux, F., Collin, M., 2008, Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. Nat Rev Immunol 8, 935-947.

41 Miller, R.A., 1996, The aging immune system: primer and prospectus. Science 273, 70-74.

42 Muller, F.L., Liu, Y., Van Remmen, H., 2004, Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. J Biol Chem 279, 49064-49073.

43 Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A., Van Remmen, H., 2007, Trends in oxidative aging theories. Free Radic Biol Med 43, 477-503.

44 Muller, M., 2002, Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. Free Radic Biol Med 33, 1527-1533.

45 Na, K., Kim, K.E., Park, S.T., Kim, T.Y., 2007, EC-SOD suppresses contact hypersensitivity in mouse skin by impairing Langerhans cell migration. J Invest Dermatol 127, 1930-1937.

46 Neale, R., Russell, A., Muller, H.K., Green, A., 1997, Sun exposure, sunscreen and their effects on epidermal Langerhans cells. Photochem Photobiol 66, 260-264.

47 Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.Z., Nickoloff, B.J., 2009, Skin immune sentinels in health and disease. Nat Rev Immunol 9, 679-691.

48 Ogden, S., Dearman, R.J., Kimber, I., Griffiths, C.E., 2011, The effect of ageing on phenotype and function of monocyte-derived Langerhans cells. Br J Dermatol 165, 184-188.

49 Okado-Matsumoto, A., Fridovich, I., 2001, Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. J Biol Chem 276, 38388-38393.

50 Pascual, F.B., McGinley, E.L., Zanardi, L.R., Cortese, M.M., Murphy, T.V., 2003, Tetanus surveillance--United States, 1998--2000. MMWR Surveill Summ 52, 1-8.

51 Paula, C., Motta, A., Schmitz, C., Nunes, C.P., Souza, A.P., Bonorino, C., 2009, Alterations in dendritic cell function in aged mice: potential implications for immunotherapy design. Biogerontology 10, 13-25.

52 Pawelec, G., 2006, Immunity and ageing in man. Exp Gerontol 41, 1239-1242.

53 Pawelec, G., Akbar, A., Caruso, C., Solana, R., Grubeck-Loebenstein, B., Wikby, A., 2005, Human immunosenescence: is it infectious? Immunol Rev 205, 257-268.

54 Pendl, G.G., Robert, C., Steinert, M., Thanos, R., Eytner, R., Borges, E., Wild, M.K., Lowe, J.B., Fuhlbrigge, R.C., Kupper, T.S., Vestweber, D., Grabbe, S., 2002, Immature mouse dendritic cells enter inflamed tissue, a process that requires E- and P-selectin, but not P-selectin glycoprotein ligand 1. Blood 99, 946-956.

55 Peters, T., Weiss, J.M., Sindrilaru, A., Wang, H., Oreshkova, T., Wlaschek, M., Maity, P., Reimann, J., Scharffetter-Kochanek, K., 2009, Reactive oxygen intermediate-induced pathomechanisms contribute to immunosenescence, chronic inflammation and autoimmunity. Mech Ageing Dev 130, 564-587.

56 Pure, E., Inaba, K., Metlay, J., 1988, Lymphokine production by murine T cells in the mixed leukocyte reaction. J Exp Med 168, 795-800.

57 Renkl, A.C., Wussler, J., Ahrens, T., Thoma, K., Kon, S., Uede, T., Martin, S.F., Simon, J.C., Weiss, J.M., 2005, Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th1-polarizing phenotype. Blood 106, 946-955.

58 Rink, L., Cakman, I., Kirchner, H., 1998, Altered cytokine production in the elderly. Mech Ageing Dev 102, 199-209.

59 Rivollier, A., Perrin-Cocon, L., Luche, S., Diemer, H., Strub, J.M., Hanau, D., van Dorsselaer, A., Lotteau, V., Rabourdin-Combe, C., Rabilloud, T., Servet-Delprat, C., 2006, High expression of antioxidant proteins in dendritic cells: possible implications in atherosclerosis. Mol Cell Proteomics 5, 726-736.

60 Romani, N., Holzmann, S., Tripp, C.H., Koch, F., Stoitzner, P., 2003, Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. APMIS 111, 725-740.

61 Sack U, T.A., Rothe G, 2007, Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Karger, Basel, 43 p.

62 Salmon, A.B., Richardson, A., Perez, V.I., 2010, Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? Free Radic Biol Med 48, 642-655.

63 Saurwein-Teissl, M., Schonitzer, D., Grubeck-Loebenstein, B., 1998, Dendritic cell responsiveness to stimulation with influenza vaccine is unimpaired in old age. Exp Gerontol 33, 625-631.

64 Scheurmann, J., Treiber, N., Weber, C., Renkl, A.C., Frenzel, D., Trenz-Buback, F., Ruess, A., Schulz, G., Scharffetter-Kochanek, K., Weiss, J.M., 2013, Mice with heterozygous deficiency of manganese superoxide dismutase (SOD2) have a skin immune system with features of "inflamm-aging". Arch Dermatol Res.

65 Sprecher, E., Becker, Y., Kraal, G., Hall, E., Harrison, D., Shultz, L.D., 1990, Effect of aging on epidermal dendritic cell populations in C57BL/6J mice. J Invest Dermatol 94, 247-253.

66 Steinman, R., Hoffman, L., Pope, M., 1995, Maturation and migration of cutaneous dendritic cells. J Invest Dermatol 105, 2S-7S.

67 Steinman, R.M., 2008, Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science. Immunity 29, 319-324.

68 Steinman, R.M., Hawiger, D., Nussenzweig, M.C., 2003, Tolerogenic dendritic cells. Annu Rev Immunol 21, 685-711.

69 Steinman, R.M., Witmer, M.D., 1978, Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 75, 5132-5136.

70 Strassburger, M., Bloch, W., Sulyok, S., Schuller, J., Keist, A.F., Schmidt, A., Wenk, J., Peters, T., Wlaschek, M., Lenart, J., Krieg, T., Hafner, M., Kumin, A., Werner, S., Muller, W., Scharffetter-Kochanek, K., 2005, Heterozygous deficiency of manganese superoxide dismutase results in severe lipid peroxidation and spontaneous apoptosis in murine myocardium in vivo. Free Radic Biol Med 38, 1458-1470.

71 Streilein, J.W., Grammer, S.F., 1989, In vitro evidence that Langerhans cells can adopt two functionally distinct forms capable of antigen presentation to T lymphocytes. J Immunol 143, 3925-3933.

72 Strober, W., 2001, Monitoring cell growth. Curr Protoc Immunol Appendix 3, Appendix 3A.

73 Sunderkotter, C., Kalden, H., Luger, T.A., 1997, Aging and the skin immune system. Arch Dermatol 133, 1256-1262.

74 Tang, A., Amagai, M., Granger, L.G., Stanley, J.R., Udey, M.C., 1993, Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. Nature 361, 82-85.

75 Thivolet, J., Nicolas, J.F., 1990, Skin ageing and immune competence. Br J Dermatol 122 Suppl 35, 77-81.

76 Thoren, F.B., Betten, A., Romero, A.I., Hellstrand, K., 2007, Cutting edge:

Antioxidative properties of myeloid dendritic cells: protection of T cells and NK cells from oxygen radical-induced inactivation and apoptosis. J Immunol 179, 21-25.

77 Treiber, N., Maity, P., Singh, K., Kohn, M., Keist, A.F., Ferchiu, F., Sante, L., Frese, S., Bloch, W., Kreppel, F., Kochanek, S., Sindrilaru, A., Iben, S., Hogel, J., Ohnmacht, M., Claes, L.E., Ignatius, A., Chung, J.H., Lee, M.J., Kamenisch, Y., Berneburg, M., Nikolaus, T., Braunstein, K., Sperfeld, A.D., Ludolph, A.C., Briviba, K., Wlaschek, M., Florin, L., Angel, P., Scharffetter-Kochanek, K., 2011, Accelerated aging phenotype in mice with conditional deficiency for mitochondrial superoxide dismutase in the connective tissue. Aging Cell 10, 239-254.

78 Van Remmen, H., Ikeno, Y., Hamilton, M., Pahlavani, M., Wolf, N., Thorpe, S.R., Alderson, N.L., Baynes, J.W., Epstein, C.J., Huang, T.T., Nelson, J., Strong, R., Richardson, A., 2003, Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. Physiol Genomics 16, 29-37.

79 Weisiger, R.A., Fridovich, I., 1973, Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. J Biol Chem 248, 4793-4796.

80 Weiskopf, D., Weinberger, B., Grubeck-Loebenstein, B., 2009, The aging of the immune system. Transpl Int 22, 1041-1050.

81 Weiss, J.M., Renkl, A.C., Maier, C.S., Kimmig, M., Liaw, L., Ahrens, T., Kon, S., Maeda, M., Hotta, H., Uede, T., Simon, J.C., 2001, Osteopontin is involved in the initiation of cutaneous contact hypersensitivity by inducing Langerhans and dendritic cell migration to lymph nodes. J Exp Med 194, 1219-1229.

82 Weiss, J.M., Sleeman, J., Renkl, A.C., Dittmar, H., Termeer, C.C., Taxis, S., Howells, N., Hofmann, M., Kohler, G., Schopf, E., Ponta, H., Herrlich, P., Simon, J.C., 1997, An essential role for CD44 variant isoforms in epidermal Langerhans cell and blood dendritic cell function. J Cell Biol 137, 1137-1147.

83 Wispe, J.R., Clark, J.C., Burhans, M.S., Kropp, K.E., Korfhagen, T.R.,

Whitsett, J.A., 1989, Synthesis and processing of the precursor for human mangano-superoxide dismutase. Biochim Biophys Acta 994, 30-36.

84 Zhao, J., Legge, K., Perlman, S., 2011, Age-related increases in PGD(2) expression impair respiratory DC migration, resulting in diminished T cell responses upon respiratory virus infection in mice. J Clin Invest 121, 4921-4930.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben

Mein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Johannes Weiss, der die vorliegende Arbeit nicht nur grundsätzlich ermöglicht hat, sondern die Entwicklung der Arbeit mit motivierenden Gesprächen und konstruktiven Anregungen stets begleitet hat. Die offene Atmosphäre in seiner Gruppe wurde in produktives Arbeiten umgesetzt.
Frau Prof. Dr. Karin Scharffetter-Kochanek möchte ich für die Unterstützung sowie die freundliche Aufnahme in ihre Abteilung danken. Erst diese wissenschaftlichen Rahmenbedingungen machten es mir möglich, die Doktorarbeit in einem anregenden Umfeld anzufertigen.
Frau Prof. Dr. Geibel möchte ich herzlich für ihr Interesse und für die freundliche Bereitschaft danken, diese Arbeit als Zweitgutachterin zu korrigieren.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Weiss und der Experimentellen Dermatologie möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Natalie Scheurmann. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht entstanden! Die Einführung in die Laborarbeit, Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse, anregende Diskussionen und ihre ruhige Art mich in allen Fragen zu unterstützen oder auch einfach das tolle Arbeitsklima, bis hin zur Korrektur der Arbeit - all das hat mir sehr geholfen!
Ebenso möchte ich mich beim gesamten Team der Experimentellen Dermatologie bedanken! Es war eine schöne und lehrreiche Zeit und ich bedanke mich für die Unterstützung.

Danksagung aus Gründen des Datenschutzes gekürzt.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Vorname:	Weber, Helen-Christine

Hochschulausbildung:

2004 – 2011	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
08.2007	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10.11.2011	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
21.11.2011	Approbation als Ärztin
2009-2013	Medizinische Dissertation in der Abteilung für Dermatologie an der Universität Ulm unter Anleitung von Prof. Dr. J. Weiss zum Thema: „Die Rolle der Mangan-Superoxiddismutase für die Funktion dendritischer Zellen im Kontext des Inflammaging“

5. Publikationen

Poster:	Heterozygous Deficiency of Manganese Superoxide Dismutase (SOD2) Display Increased Hypersensitivity (CHS) Response: A Mechanism Possibly Involved in Aging Associated Inflammation (Department of Dermatology and Allergology, University of Ulm)
Paper:	Archives of Dermatological Research: Mice with heterozygous deficiency of manganese superoxide dismutase (SOD2) have a skin immune system with features of “inflamm-aging” (Scheurmann et al., 2013)

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes gekürzt.