

Aus dem Institut für Zell- und Neurobiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Reduktion der posttraumatischen Entzündungsreaktion des
zentralen Nervensystems durch die mastzell-spezifische
Chymase murine Mastzellprotease-4

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Peter Kramer

aus Moskau

Datum der Promotion: 05.12.2014

“Unfortunately, nature seems unaware of our intellectual need for convenience and unity, and very often takes delight in complication and diversity.”

Santiago Ramón y Cajal

The structure and connexions of neurons

Nobel Lecture, December 12, 1906

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Abstract	6
Eidesstattliche Versicherung	7
Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge SM)	9
Druckexemplar der ausgewählten Publikation	11
Lebenslauf	22
Publikationsverzeichnis	24
Danksagung	27

Zusammenfassung

Mast-Zellen (MC) sind im zentralen Nervensystem (ZNS) zahlreicher Vertebraten nachzuweisen und lassen sich hauptsächlich in der Dura mater und den Leptomeningen aber auch intraparenchymal, etwa im Thalamus, finden. In tierexperimentellen Modellen einiger neuroinflammatorischer Prozesse, wie beispielsweise der multiplen Sklerose oder Sekundärschädigungen nach zerebralen Insulten, sind Belege für eine wesentliche Beteiligung von MC an der Exazerbation des Entzündungsverlaufes gefunden worden. Dies führte zu Mutmaßungen über eine potentiell schädigende Rolle von MC in diesen Zusammenhängen mit resultierender Ausdehnung des neuronalen Zelluntergangs durch proinflammatorische Mechanismen. Über ihre möglichen physiologischen Funktionen im ZNS herrscht jedoch nach wie vor weitgehend Unklarheit. In dieser Arbeit konnte erstmals ein gesteigerter Untergang periläsionaler Neurone nach einer mechanischen ZNS-Läsion bei MC-defizienten $\text{Kit}^{\text{W/W-v}}$ Mäusen im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Ferner ließ sich periläsional eine signifikant gesteigerte Entzündungsreaktion mit vermehrtem Nachweis von Mikroglia/Makrophagen sowie eine ausgedehntere T-Zell-Infiltration und reaktive Astroglie bei MC-defizienten Mäusen beobachten. Es wurde zudem eine bedeutsame Steigerung der Proliferation von Mikroglia/Makrophagen und Astrozyten im Läsionsgebiet nachgewiesen. Parallel dazu fanden sich in einem weiteren MC-defizienten Mausstamm ($\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$) vergleichbare Resultate mit gesteigerter Präsenz von Mikroglia/Makrophagen und T-Zellen früh postläsional und einer ausgedehnteren Astroglie nach ZNS-Läsion. In weiteren Experimenten führte die Abwesenheit einer wichtigen MC-spezifischen Protease, der Chymase ‚murine Mastzell-Protease-4‘ (mMCP-4), in mMCP-4^{-/-} ‚knockout‘ Mäusen zu einer signifikant gesteigerten postläsionalen T-Zell-Infiltration und Astroglie. Abschließend führte die Inhibition von mMCP-4 durch lokale Applikation eines Chymase-Inhibitors nach mechanischer ZNS-Läsion zu einer vergleichbar ausgedehnteren Entzündungsreaktion mit erhöhter Zahl nachweisbarer Mikroglia/Makrophagen und gesteigerter Astroglie. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass MC nach einem ZNS-Trauma, im Gegensatz zu Beobachtungen in anderen Modellen von ZNS-Schädigungen, protektive Funktionen durch eine Reduktion der postläsionalen Entzündung ausüben können. Diese antiinflammatorische Modulation des Entzündungsverlaufes scheint dabei zumindest teilweise durch die Protease mMCP-4 vermittelt zu sein.

Diese Dissertation wurde entsprechend der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin vom 03.12.2012 auf Basis einer „peer-reviewed“ Originalpublikation als Erstautor in einer international führenden Fachzeitschrift erstellt.

Abstract

Mast cells (MC) can be detected in the central nervous system (CNS) of many vertebrates where they are mostly located in the dura mater and the leptomeninges, but they are also found within the parenchyma, for example in the thalamus. Data from experimental models of several neuroinflammatory pathologies such as multiple sclerosis or secondary damage after stroke indicate a fundamental role of MC in the exacerbation of the inflammation. Thus, a potentially detrimental role of MC in these processes resulting in excessive neuronal damage by pro-inflammatory mechanisms was speculated. However, knowledge about possible physiological MC functions within the CNS is limited. Here, we show that neurodegeneration after a mechanical CNS lesion is increased in MC-deficient $\text{Kit}^{\text{W/W}^v}$ mice. Furthermore, significantly increased CNS inflammation in terms of increased presence of microglia/macrophages, T-cell infiltration and reactive astrogliosis was found in MC-deficient mice. Also the number of proliferating microglia/macrophages and astrocytes around the lesion site is significantly increased. In parallel, consistent results were found in a different MC-deficient mouse strain ($\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$) which displayed an increased presence of microglia/macrophages and T-cells early after CNS trauma and a significantly more extensive reactive astrogliosis. Further analysis revealed that the lack of an important MC-specific protease, i.e. the chymase 'mouse mast cell protease-4' (mMCP-4), resulted in a substantial increase of T-cell infiltration and astrogliosis after CNS lesion in mMCP-4^{-/-} knockout mice. Finally, after inhibition of mMCP-4 by local injection of a chymase inhibitor after brain trauma, a comparably more extensive inflammation with increased macrophage/microglia numbers and astrogliosis was observed. These data suggest that in contrast to previous findings in other CNS pathologies, MC can exert protective functions after CNS trauma by suppressing exacerbated inflammation. This modulatory effect on the postlesional inflammatory reaction seems to be at least partially mediated by mMCP-4.

This doctoral thesis was elaborated in accordance with the Charité - Universitätsmedizin Berlin's dissertation regulation dated December 3, 2012, based on the publication of an original article as first author in a leading international peer-reviewed professional journal.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Peter Kramer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Reduktion der posttraumatischen Entzündungsreaktion des zentralen Nervensystems durch die mastzell-spezifische Chymase murine Mastzellprotease-4“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation : Hendrix S*, Kramer P*, Pehl D, Warnke K, Boato F, Nelissen S, Lemmens E, Pejler G, Metz M, Siebenhaar F, Maurer M

Mast cells protect from post-traumatic brain inflammation by the mast cell-specific chymase mouse mast cell protease-4.

Faseb J 2013;27(3):920-929.

* These authors contributed equally to this work.

70 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Planung und Durchführung des überwiegenden Teils der Experimente (außer der durchflusszytometrischen Analysen und der Teilerperimente mit dem Kit^{W-sh/W-sh} Mausstamm) sowie Aufbereitung der Gewebe, Etablierung und Durchführung der immunhistochemischen Färbungen, Durchführung der Erhebung und Auswertung der Daten und Durchführung der statistischen Auswertung der entsprechenden Teilerperimente. Erstellen des überwiegenden Teils der Graphiken, Abbildungen und Abbildungslegenden des Manuskriptes. Mitwirkung bei der Manuskriptverfassung, Manuskriptüberarbeitung und Manuskriptkorrektur.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)

FASEB Journal

Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology

ISSN 0892-6638

Impact Factor: 5,704

5-Jahres Impact Factor: 6,222

Eigenfactor® score: 0.07943

Rang des FASEB Journal in der Auflistung von ISI Web of KnowledgeSM sortiert nach Impact Factor in der Kategorie:

Zellbiologie: 41 / 185

Stand: 11.11.2013

Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)

Journals from: subject categories CELL BIOLOGY [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by: **Impact Factor** SORT AGAIN

Journals 41 - 60 (of 185)

Navigation icons: [1] [2] [3] [4] [5] [6] [7] [8] [9] [10]

Page 3 of 10

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data ⁱ						Eigenfactor [®] Metrics ^j	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Score	Article Influence [®] Score
<input checked="" type="checkbox"/>	41	FASEB J	0892-6638	39540	5.704	6.222	1.130	462	8.1	0.07943	2.185
<input type="checkbox"/>	42	CELL MOL LIFE SCI	1420-682X	17974	5.615	6.359	1.072	290	5.6	0.05844	2.284
<input type="checkbox"/>	43	MOL CELL BIOL	0270-7306	67211	5.372	5.745	1.036	415	9.6	0.13267	2.778
<input type="checkbox"/>	44	CELL CYCLE	1538-4101	15668	5.321	4.834	1.081	443	3.8	0.07271	1.724
<input type="checkbox"/>	45	J MOL CELL CARDIOL	0022-2828	11674	5.148	5.034	1.478	232	6.3	0.03067	1.665
<input type="checkbox"/>	46	CELL COMMUN SIGNAL	1478-811X	520	5.093		0.205	39	2.9	0.00289	
<input type="checkbox"/>	47	INT REV CEL MOL BIO	1937-6448	825	4.973	4.944	0.408	49	3.1	0.00537	1.898
<input type="checkbox"/>	48	DIS MODEL MECH	1754-8403	1212	4.959	5.009	0.989	88	2.4	0.00822	2.100
<input type="checkbox"/>	49	CELL MICROBIOL	1462-5814	7588	4.811	5.086	1.312	144	5.3	0.02814	1.842
<input type="checkbox"/>	50	BBA-MOL CELL RES	0167-4889	8853	4.808	4.947	1.039	228	5.4	0.03082	1.854
<input type="checkbox"/>	51	MOL BIOL CELL	1059-1524	31128	4.803	5.429	1.068	414	7.4	0.09953	2.607
<input type="checkbox"/>	52	J CELL MOL MED	1582-1838	7122	4.753	4.651	0.769	286	3.6	0.02877	1.374
<input type="checkbox"/>	53	AGING-US	1945-4589	1835	4.696	4.625	0.829	70	2.4	0.00972	1.449
<input type="checkbox"/>	54	TRAFFIC	1398-9219	6629	4.652	5.076	1.294	136	5.1	0.03076	2.361
<input type="checkbox"/>	55	J LEUKOCYTE BIOL	0741-5400	16040	4.568	4.877	0.985	201	6.9	0.04072	1.725
<input type="checkbox"/>	56	STEM CELL REV REP	1550-8943	956	4.523	4.453	0.474	116	2.1	0.00435	1.239
<input type="checkbox"/>	57	MOL MED	1076-1551	3760	4.469	4.993	0.781	146	5.1	0.01066	1.492
<input type="checkbox"/>	58	STEM CELL RES	1873-5061	757	4.467	4.760	0.923	65	2.6	0.00388	1.522
<input type="checkbox"/>	59	MOL CANCER RES	1541-7786	5607	4.353	4.937	0.786	140	4.4	0.02473	1.781
<input type="checkbox"/>	60	CELL CALCIUM	0143-4160	4915	4.327	3.917	0.858	106	6.8	0.01237	1.341

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Journals 41 - 60 (of 185)

Navigation icons: [1] [2] [3] [4] [5] [6] [7] [8] [9] [10]

Page 3 of 10

Druckexemplar der ausgewählten Publikation

Hendrix S, Kramer P, Pehl D, Warnke K, Boato F, Nelissen S, Lemmens E, Pejler G, Metz M, Siebenhaar F, Maurer M. Mast cells protect from post-traumatic brain inflammation by the mast cell-specific chymase mouse mast cell protease-4. *Faseb J* 2013;27(3):920-929.

DOI:10.1096/fj.12-204800

Die schriftliche Zustimmung des Verlages zur Vervielfältigung der Originalpublikation wurde nur für die Druckversion der Dissertation erteilt.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsverzeichnis

Publikationen

Kramer P., Absi D., Hetzer R., Photiadis J., Berger F., Alexi-Meshkishvili V.

Outcome of surgical correction of congenital supra-ventricular aortic stenosis with two- and three-sinus reconstruction techniques.

Ann Thorac Surg, *in press*

Impact Factor (JCR® 2012): 3,454

Kramer P.*, Ovroutski S.*, Hetzer R., Hübner M., Berger F.

Modified Nikaidoh procedure for the correction of complex forms of transposition of the great arteries with ventricular septal defect and left ventricular outflow tract obstruction - mid-term results.

* These authors contributed equally to this work.

Eur J Cardiothorac Surg, *in press*

Impact Factor (JCR® 2012): 2,674

Nelissen S., Lemmens E., Geurts N., **Kramer P.**, Maurer M., Hendriks J., Hendrix S.

The role of mast cells in neuroinflammation.

Acta Neuropathol 2013 May;125(5):637-650.

Impact Factor (JCR® 2012): 9,734

Hendrix S.*, **Kramer P.***, Pehl D., Warnke K., Boato F., Nelissen S., Lemmens E., Pejler G., Metz M., Siebenhaar F., Maurer M.

Mast cells protect from post-traumatic brain inflammation by the mast cell-specific chymase mouse mast cell protease-4.

Faseb J 2013;27(3):920-929.

* These authors contributed equally to this work.

Impact Factor (JCR® 2012): 5,704

Buchbeiträge

Hendrix S., Rosenberger K., **Kramer P.**

The role of T cells in traumatic injuries of the central nervous system.

In: Ibarra A. (Hrsg.), The Role of Immune Cells in Neurodegenerative Diseases, Research Signpost, Kerala, 2008.

Kongressbeiträge

Kramer P., Ovroutski S., Hübler M., Alexi-Meshkishvili V., Hetzer R., Photiadis J., Berger F.

Strategies for biventricular outflow tract reconstruction in complex forms of transposition of the great arteries (TGA) with ventricular septal defect (VSD) and left ventricular outflow tract obstruction (LVOTO) - mid-term results.

47th Annual Meeting of the Association for European Paediatric Cardiology (AEPC) 2013, London. *Cardiol Young*, 2013. 23(SupplementS1): p. S37.

(Vortrag)

Absi D., **Kramer P.**, Cho M., Hübler M., Alexi-Meshkishvili V., Hetzer R., Berger F., Photiadis J.

Congenital supra-ventricular aortic stenosis: twenty-five years' experience at the Deutsches Herzzentrum Berlin.

47th Annual Meeting of the Association for European Paediatric Cardiology (AEPC) 2013, London. *Cardiol Young*, 2013. 23(SupplementS1): p. S134-135.

(Posterpräsentation)

Kramer P., Ovroutski S., Hetzer R., Berger F., Hübler M.

Management of complex forms of transposition of the great arteries (TGA) with ventricular septal defect (VSD) and left ventricular outflow tract obstruction (LVOTO).

44. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie (DGPK) 2012, Weimar.

(Vortrag)

Kramer P., Weihe N., Lüdecke D., Metz M., Maurer M., Nitsch R., Hendrix S.

The influence of mast cells on the pathophysiology of CNS lesions.

Berlin Brain Days 2007, Berlin.

(Posterpräsentation)

Danksagung

Mein Dank gebührt den zahlreichen unmittelbar und mittelbar beteiligten Familienmitgliedern, Freundinnen und Freunden sowie Kolleginnen und Kollegen, die auf verschiedene Weise zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Hendrix für die hervorragende und ausdauernde Betreuung, Herrn Prof. Nitsch für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit am Institut für Zell- und Neurobiologie des Centrums für Anatomie der Charité, allen aktiven und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts und der ehemaligen Arbeitsgruppe Hendrix für die konstruktive Arbeitsatmosphäre und umfangreiche Unterstützung sowie Herrn Prof. Maurer, Herrn Prof. Metz und Herrn Dr. Siebenhaar der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité für die gute und produktive Zusammenarbeit.

Darüber hinaus bin ich den Fakultätsmitgliedern des GRK 1258/1 der DFG für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg und der damit verbundenen Möglichkeit des anregenden wissenschaftlichen Austausches und der finanziellen Unterstützung zu Dank verpflichtet. Des Weiteren gilt mein Dank der Studentischen Forschungsförderung der Charité für die finanzielle Unterstützung.

Vor allen Dingen aber möchte ich meiner Familie - meinen beiden Söhnen und meiner Frau - von ganzem Herzen danken. Der für die Fertigstellung der Arbeit neben dem ärztlichen Alltag in der Klinik und den Erfordernissen der ärztlichen Weiterbildung notwendigen Zeit mussten zwangsläufig immer wieder Bedürfnisse des Familienlebens geopfert werden. Ihre Nachsicht, Verständnis, Unterstützung und Liebe trugen daher wesentlich zum erfolgreichen Abschluss der Arbeit bei.