

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

DISSERTATION

*Die Rolle von Mastzellen und Mastzellproteasen bei
traumatischen Läsionen des zentralen Nervensystems*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Debora Pehl

aus Berlin

Datum der Promotion: 22.09.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	7
Zusammenfassung	8
Abstract	9
1 Einleitung	10
1.1 Mastzellen	10
1.1.1 Mastzellbiologie	10
1.1.2 Klassifizierung humaner und muriner Mastzellen	13
1.1.3 Mastzellproteasen.....	14
1.1.3.1 Chymasen.....	15
1.1.3.2 Tryptasen.....	16
1.1.3.3 Carboxypeptidase A	17
1.1.4 Mastzelldefizienz: Kit ^W /Kit ^{W-v} -Mausmodell	17
1.1.5 Mastzellproteasedefizienz: mMCP-4 ^{-/-} und Mc-cpa ^{Y356L,E378A} -Mausmodell	19
1.1.6 Mastzellen in physiologischen und pathologischen Prozessen	21
1.2 Das zentrale Nervensystem	24
1.2.1 Allgemeine Einführung	24
1.2.2 Immunprivileg des zentralen Nervensystems.....	25
1.2.3 De- und Regeneration im zentralen Nervensystem	27
1.2.3.1 Die Entorhinale Cortexläsion als Modell traumatischer Hirnschädigung	29
1.2.3.2 Die Hemisektion als Modell traumatischer Rückenmarkschädigung.....	31
1.3 Gesteigerte inflammatorische Reaktion und Neurodegeneration in mastzelldefizienten Mäusen und Mastzellprotease 4-defizienten Mäusen nach ECL	33
1.4 Fragestellungen der Arbeit	34
2 Material und Methoden	35
2.1 Material	35
2.1.1 Chemikalien	35
2.1.2 Serum	36
2.1.3 Antikörper	36
2.1.4 Geräte	37
2.1.5 Zubehör	38
2.1.6 Versuchstiere	39

2.1.7	Lösungen und Puffer	39
2.1.8	Software	40
2.2	Methoden.....	41
2.2.1	Entorhinale Cortexläsion (ECL).....	41
2.2.2	Rückenmarkläsion (SCI)	41
2.2.3	Motorfunktionstests (Basso Maus Skala und Rotarod)	42
2.2.4	Perfusion und Kryofixierung von Gehirn und Rückenmark	42
2.2.5	Mikrowellenbehandlung der Kryoschnitte zur Antigendemaskierung	43
2.2.6	Immunhistochemische Färbungen.....	43
2.2.7	Immunfluoreszenzmikroskopie und Auswertung der Färbungen.....	44
2.2.8	Statistische Auswertung	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Entorhinale Cortexläsion	46
3.1.1	Auswertung immunhistochemischer Färbungen	46
3.2	Rückenmarksläsion	48
3.2.1	Auswertung der Motorfunktionstests	48
3.2.1.1	Basso Maus Skala	48
3.2.1.2	Rotarod.....	49
3.2.2	Auswertung immunhistochemischer Färbungen	50
3.2.2.1	Vergleich der GFAP-Expression 14 Tage nach SCI	50
3.2.2.2	Vergleich der Iba1-Expression 14 Tage nach SCI	52
3.2.2.3	Vergleich der Anzahl CD4 ⁺ T-Lymphozyten 14 Tage nach SCI.....	54
4	Diskussion	57
4.1	Kein Einfluss von Carboxypeptidase A auf das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion nach ECL.....	57
4.2	Verminderte Leistung in Motorfunktionstests bei mastzell- und mMCP-4-defizienten Mäusen nach SCI.....	58
4.3	Regulatorische Rolle von Mastzellen auf die inflammatorische Reaktion im Rückenmark post läsionem.....	61
4.4	Ausblick	65
	Literaturverzeichnis.....	67
	Eidesstattliche Versicherung	89
	Anteilerklärung an der erfolgten Publikationen.....	90
	Lebenslauf.....	91

Publikationsliste	92
Danksagung.....	93

Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
AU	<i>Arbitrary unit</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BMMC	<i>Bone marrow-derived mast cells</i>
BMS	Basso Maus Skala
C3a	<i>Complement component 3a</i>
C5a	<i>Complement component 5a</i>
CA	Cornu ammonis
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
CPI	<i>Carboxypeptidase Inhibitor</i>
CTMC	<i>Connective tissue mast cells</i>
EAE	Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis
EC	Entorhinaler Cortex
ECL	Entorhinale Cortexläsion
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
hTMT	<i>Human transmembrane mast cell tryptase</i>
Iba-1	<i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IML	<i>Inner molecular layer</i>
LTC	Leukotrien C
LTD	Leukotrien D
LTE	Leukotrien E

LPS	Lipopolysaccharid
MC-CPA	Mastzell-Carboxypeptidase A
MC _T	<i>Tryptase-positive mast cells</i>
MC _{TC}	<i>Tryptase- and chymase-positive mast cells</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMC	<i>Mucosal mast cells</i>
mMCP	<i>Murine mast cell protease</i>
MOG	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
mTMT	<i>Murine transmembrane mast cell tryptase</i>
n	Anzahl
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NO	Nitritoxid
OML	<i>Outer molecular layer</i>
PB	<i>Phosphate buffer</i>
PNS	Peripheres Nervensystem
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted</i>
RT	Raumtemperatur
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SCI	<i>Spinal cord injury</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VIP	Vasoaktives intestinales Polypeptid
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1	WBB6F1-Kit ^{W/W^v} - und WBB6F1-Kit ^{+/+} -Maus
Abbildung 1.2	Anatomie der Hippocampusformation bei höheren Säugern
Abbildung 1.3	Schematische Darstellung der Anatomie des Rückenmarks
Abbildung 2.1	Gitternetz zur Auswertung immunhistochemischer Färbungen nach SCI
Abbildung 3.1	Balkendiagramme der Expression von GFAP und Iba1 sowie der Anzahl CD3 ⁺ und CD4 ⁺ Lymphozyten ipsi- und contralateral 14 Tage nach ECL in WT- und CPA ^{Y356L,E378A} -Mäusen
Abbildung 3.2	Repräsentative Bilder der anti-GFAP- und anti-Iba1-gefärbten Gehirnschnitte von WT- und CPA ^{Y356L,E378A} -Mäusen
Abbildung 3.3	Basso Maus Skala Tag zwei bis 13 nach SCI
Abbildung 3.4	Rotarod Tag fünf bzw. sechs bis 13 nach SCI
Abbildung 3.5	Liniendiagramme der GFAP-Expression 14 Tage nach SCI
Abbildung 3.6	Repräsentative Bilder der anti-GFAP-gefärbten Rückenmarkschnitte
Abbildung 3.7	Liniendiagramme der Iba-1-Expression 14 Tage nach SCI
Abbildung 3.8	Repräsentative Bilder der anti-Iba1-gefärbten Rückenmarkschnitte
Abbildung 3.9	Liniendiagramme der Anzahl CD4 ⁺ Lymphozyten 14 Tage nach SCI
Abbildung 3.10	Repräsentative Bilder der anti-CD4-gefärbten Rückenmarkschnitte
Abbildung 4.1	Überlebensrate i.v.-rekonstituierter mastzelldefizienter Mäuse
Tabelle 1.1	Proteasen in unterschiedlichen Mastzellpopulationen
Tabelle 2.1	verwendete Chemikalien mit Bezugsquelle
Tabelle 2.2	verwendetes Serum mit Bezugsquelle
Tabelle 2.3	verwendete Antikörper mit Bezugsquelle
Tabelle 2.4	verwendete Geräte mit Bezugsquelle
Tabelle 2.5	verwendetes Zubehör mit Bezugsquelle
Tabelle 2.6	verwendete Versuchstiere mit Bezugsquelle
Tabelle 2.7	verwendete Lösungen und Puffer und ihre Zusammensetzung
Tabelle 2.8	verwendete Software mit Bezugsquelle

Zusammenfassung

Traumatische Läsionen des zentralen Nervensystems (ZNS) stellen verheerende Erkrankungen dar mit der Gefahr irreversibler Schädigungen von motorischen, sensorischen und autonomen Funktionen. Bislang gibt es keine effektive Therapie für traumatische Verletzungen des Gehirns oder Rückenmarks und durch die Einflüsse glialer Zellen sowie einwandernder Entzündungszellen wird die Regenerationsfähigkeit des ZNS begrenzt. Sie erzeugen ein Milieu, das der Wiederherstellung von neuronalen Strukturen und Myelinscheiden weitgehend entgegenwirkt, zum Beispiel durch die Ausbildung einer Glianarbe. Mastzellen sind multifunktionale Effektorzellen des Immunsystems und insbesondere bekannt für die Rolle, die sie bei Allergien und Anaphylaxie spielen. Im Gegensatz zu anderen hämatopoetischen Zellen kommen sie im gesunden Gehirn und Rückenmark vor. In Modellen von Hirnischämie und Hirnblutungen wurden nachteilige Effekte von Mastzellen gezeigt, aber es gibt neuere Hinweise auf protektive Wirkungen von Mastzellen im Kontext traumatischer Hirnschädigungen. Wir haben in der vorliegenden Studie die Rolle von Mastzellen und zwei der wichtigsten Mastzellproteasen bei verschiedenen Mausmodellen traumatischer ZNS-Schädigung - der entorhinalen Kortexläsion (ECL) und der Sektion des Tractus corticospinalis als Modell der Rückenmarksläsion (SCI) - weiter untersucht. Mäuse mit einer Defizienz für die Mastzell-Carboxypeptidase A (CPA) zeigen, anders als Mastzell-defiziente Mäuse und Mäuse mit Defizienz für die Mastzell-Chymase-4 (mMCP-4) keine gesteigerte Entzündungsreaktion nach ECL. Im Kontext der SCI konnten wir zeigen, dass Mastzellen und insbesondere mMCP-4, jedoch nicht CPA wichtig sind für die Wiedererlangung motorischer Funktionen, gemessen mittels Rotarod und Basso Maus Skala, wenngleich sich dies nur bedingt in der inflammatorischen Reaktion im Gewebe widerspiegelt. Damit stützen unsere Daten die zunehmenden Hinweise auf eine essentielle Rolle von Mastzellen und insbesondere von mMCP-4 bei traumatischen Läsionen des ZNS, während die CPA in diesem Kontext unbedeutend scheint. Eine proinflammatorische Wirkung der Mastzellen scheint die klinischen Resultate zu verbessern. Daraus ergeben sich möglicherweise neue therapeutische Ansätze über eine Beeinflussung der Aktivierung und Degranulation von Mastzellen. Letztlich wird diese Hypothese auch gestützt durch Beobachtungen in Mastzell-defizienten Mäusen, die mit Wildtyp-Mastzellen oder Mastzellen von Mastzellprotease-defizienten Mäusen rekonstituiert wurden, und die insgesamt eine unzureichende Repopulation des ZNS mit Mastzellen zeigen, sowie eine deutlich gesteigerte Mortalität.

Abstract

Traumatic injuries of the central nervous system (CNS) are devastating diseases that hold the danger of irreversible locomotor, sensory, and autonomic dysfunction. To date, there are no effective therapies to treat traumatic brain or spinal cord injuries and the regenerative capacity of the CNS is limited by the influences of glial cells and invading inflammatory cells. They create an environment that largely counteracts the repair of neuronal structures and myelin sheaths, e.g. by the formation of a glial scar. Mast cells are multifunctional effector cells of the immune system, especially known for their role in allergy and anaphylaxis. In contrast to other cells of hematopoietic origin, they are present in the healthy brain and spinal cord. Detrimental effects of mast cells have been shown in models of brain ischemia and hemorrhage, but recent evidence suggests a protective role following traumatic brain injury. In the present study we aimed to further evaluate the role of mast cells and two major mast cell proteases in different mouse models of traumatic CNS injury - the entorhinal cortex injury (ECL) and the section of the corticospinal tract as a model of spinal cord injury (SCI). Mice deficient in mast cell carboxypeptidase A (CPA) do not show an increased inflammatory reaction following ECL, as it has before been observed in mast cell-deficient mice and mice deficient for mast cell chymase-4 (mMCP-4). In the context of SCI, we could demonstrate that mast cells, and especially mMCP-4, but not CPA are pivotal for the recovery of locomotor function measured by rotarod and the Basso mouse scale, although these cells only partially affect the inflammatory reaction in the tissue. Our data supports the increasing evidence of a crucial role of mast cells, and in particular mMCP-4, in traumatic brain injuries, whereas CPA seems to be irrelevant in this context. It hints at a proinflammatory effect of mast cells that has a positive impact on clinical outcome. Influencing the activation and degranulation of mast cells might therefore be a new therapeutic approach. In the end, this hypothesis is supported by our observations in mast cell-deficient mice that were reconstituted with wildtype mast cells or mast cells from different mast cell protease-deficient mouse strains which showed poor repopulation of the CNS and very high mortality rates.

1 Einleitung

Schädigungen des zentralen Nervensystems wie z.B. traumatische Verletzungen des Gehirns oder Rückenmarks, aber auch ischämische und neurodegenerative Prozesse führen zum Untergang axonaler Verbindungen. Konstitutionell ist die Regenerationsfähigkeit des ZNS im Vergleich zum peripheren Nervensystem stark begrenzt und Heilungsprozesse werden durch Interaktionen des Immunsystems mit dem ZNS beeinflusst. Es gibt erste Hinweise darauf, dass Mastzellen für eine nutzbringende Kontrolle und Limitierung inflammatorischer Vorgänge nach mechanischen Traumata des ZNS verantwortlich sind, da mastzelldefiziente Mäuse in diesem Kontext eine gesteigerte Entzündungsreaktion und vermehrte Neurodegeneration zeigen (Hendrix et al. 2013). Dies ist insbesondere unter dem Aspekt der bisher bekannten nachteiligen Funktionen zu betrachten, die Mastzellen in anderen pathologischen Veränderungen des ZNS, wie z.B. der multiplen Sklerose oder ischämischen Infarkten innehaben, sowie der in anderen Geweben zu beobachtenden mastzellvermittelten Steigerung der Entzündungsreaktion (Nelissen et al. 2013, Skaper et al. 2014). Die vorliegende Arbeit setzt sich mit der genaueren Untersuchung der Mastzellwirkung und dabei insbesondere mit der Rolle bestimmter Mastzellproteasen in verschiedenen Läsionsmodellen des ZNS auseinander. Die Erlangung weiterer Kenntnisse zu den zellulären und molekularen Vorgängen nach traumatischen Läsionen des ZNS birgt die Hoffnung auf Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Therapieansätze.

1.1 Mastzellen

1.1.1 Mastzellbiologie

Im Jahre 1863 wurden durch Friedrich von Recklinghausen erstmals die so genannten granulierten Gewebszellen beschrieben, zu denen nach heutigem Wissen auch die Mastzellen gehören (von Recklinghausen 1863). Paul Ehrlich dokumentierte 1878 sehr detailliert Morphologie und histochemische Eigenschaften der Mastzellen sowie ihre Lokalisation im Gewebe und beschrieb zudem erste physiologische und pathophysiologische Funktionen. Aufgrund ihres gemästeten Aussehens nannte er sie Mastzellen (Ehrlich 1877; Ehrlich 1879).

Reife Mastzellen sind in fast jedem Gewebe anzutreffen, am zahlreichsten sind sie jedoch in Organen lokalisiert, die in direktem Kontakt mit der Umwelt stehen, wie der Haut, dem Darm und den Atemwegen. Sie finden sich hier zumeist in unmittelbarer Nähe von Gefäßen und Nervenendigungen, in Atmungs- und gastrointestinalen Organen auch nahe glatter Muskelzellen und schleimbildender Drüsen, sowie in der Haut auch in Nähe von Haarfollikeln

und tragen in bedeutendem Ausmaß zur Entstehung von Entzündungsprozessen im Rahmen allergischer Reaktionen sowie der unspezifischen Immunabwehr von Pathogenen bei (Metcalf et al. 1997; Galli et al. 1992; Galli & Hammel 1994). In Organen wie dem Gehirn, das für Pathogene schwerer zugänglich ist, sind Mastzellen weit weniger zahlreich vorhanden (Theoharides 1990).

Die zu den Leukozyten gehörenden Mastzellen reifen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark heran (Kitamura et al. 1977; Kirshenbaum et al. 1991; Kirshenbaum et al. 1999) und zirkulieren im Blut als unreife Vorläuferzellen, bevor sie in verschiedene Gewebe einwandern, wo sie unter dem Einfluss lokaler Wachstumsfaktoren wie dem Stammzellfaktor (SCF), dem wichtigsten Faktor für das Überleben und die Entwicklung von Mastzellen (Tsai et al. 1991; Galli et al. 1995), aber auch NGF, IL-3, IL-4, IL-9 oder IL-10 ihre terminale Differenzierung in unterschiedliche Phänotypen durchlaufen (Metcalf et al. 1997; Theoharides 1990). Somit bilden Mastzellen keine homogene Zellpopulation, sondern differenzieren in Abhängigkeit vom sie umgebenden Milieu in unterschiedlichen Geweben oder als Antwort auf verschiedene biologische Stimuli in verschiedene Subtypen aus (Enerbäck 1966b; Enerbäck 1966a; Kitamura et al. 1987; Kitamura 1989). Diese auch als Mastzell-Heterogenität bezeichnete Fähigkeit ermöglicht die Entstehung individueller, sich in funktionellen Eigenschaften, Menge und Zusammensetzung an Mediatoren sowie anderen phänotypischen Eigenschaften unterscheidender Subpopulationen. In Abhängigkeit der Bedingungen der jeweiligen physiologischen, immunologischen, inflammatorischen oder anderweitigen biologischen Prozesse zeigen diese Subpopulationen eine große Variabilität im Hinblick auf spezifische Aktivierungsmechanismen als auch ausgeübte Funktionen (Galli et al. 2005).

Mastzellen exprimieren ebenso wie basophile Granulozyten den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI (Kinet 1999; Metcalf et al. 1997). Die Quervernetzung von an FcεRI gebundenen IgE-Molekülen mit den entsprechenden Antigenen führt zur Mastzellaktivierung (Nadler et al. 2000; Turner & Kinet 1999). Die FcεRI-vermittelte immunologische Aktivierung stellt dabei den klassischen Weg der Mastzellaktivierung während entzündlicher Prozesse dar. Auch IgG₁ und Ig-bindende Superantigene können über die entsprechenden Rezeptoren Mastzellen aktivieren. Daneben führt aber auch eine Reihe weiterer, nicht-immunologischer Substanzen und Stimuli zur Aktivierung von Mastzellen. Hierzu gehören unter anderem die Komplementfaktoren C5a und C3a (Schulman 1993; Prodeus et al. 1997), Neuropeptide wie *Substance P*, NGF und CGRP (Williams et al. 1995), Parasiten (Galli & Wershil 1996; Galli 1993), Viren, Bakterien und bakterielle Bestandteile wie LPS (Malaviya & Abraham 1998), Zytokine wie IL-1 und IL-12 sowie chemische und physikalische Reize wie ultraviolettes Licht, Kälte oder Hitze. Nach der

Aktivierung durch einen spezifischen Reiz können Mastzellen eine Bandbreite an potenten biologisch aktiven Mediatoren freisetzen, welche zahlreiche physiologische und pathophysiologische Effekte vermitteln, wozu unter anderem die Modulation von inflammatorischen Prozessen und der Gewebshomöostase sowie Einfluss auf die Blutgerinnung, das Fibrinolyse-, Komplement- und Kininsystem gehören (Krystal-Whittemore et al. 2016). Neben präformiert in den zytoplasmatischen Granula der Mastzellen gespeicherten Mediatoren gibt es auch solche, die erst nach Aktivierung der Zellen synthetisiert werden.

Zu den präformierten Mediatoren gehören Histamin, Zytokine, Proteoglykane (Heparin, Chondroitinsulfat E) und Proteasen (Tryptase, Chymase und Carboxypeptidase A). Daneben kann die Mastzellaktivierung auch zur *de novo* Synthese von Fettsäurederivaten führen. Prostaglandin D₂ sowie die Leukotriene C₄, D₄ und E₄, die Cyclooxygenase- und Lipooxygenase-Metabolite der Arachidonsäure, spielen hier eine besondere Rolle. Des Weiteren können Mastzellen auf spezifische Reize hin bestimmte Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren produzieren, darunter IL-1, IL-3, IL-4, IL-9, TNF- α , IFN- γ , NGF und VEGF (Gordon et al. 1990).

Zu den Funktionen der freigesetzten Substanzen gehören vor allem solche, die als proinflammatorisch bezeichnet werden können, da diese Mediatoren allein oder im Zusammenspiel mit anderen Substanzen und Faktoren inflammatorische Zustände im Rahmen akuter wie chronischer Entzündungen unterhalten können, so zum Beispiel Vasodilatation, Erhöhung der vaskulären Permeabilität und die Rekrutierung und Aktivierung von Granulozyten (Neutrophilen, Eosinophilen und Basophilen), T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Dendritischen Zellen und Monozyten (Galli et al. 2005; Metcalfe et al. 1997; Marshall 2004; Christy & Brown 2007; Metz et al. 2007; Bochner & Lichtenstein 1991; Schwartz & Austen 1984). Aber auch antiinflammatorische und immunsuppressive Eigenschaften gehören nach neueren Erkenntnissen zum Funktionsspektrum einiger sezernierter Mediatoren. Somit kann die Rolle der Mastzellen nicht mehr nur als rein proinflammatorisch angesehen werden. Auf die diversen Funktionen von Mastzellen in physiologischen und pathologischen Prozessen wird im Abschnitt 2.1.6 genauer eingegangen.

1.1.2 Klassifizierung humaner und muriner Mastzellen

Mastzellen können nach ihrer Lokalisation im Gewebe, dem Inhalt ihrer zytoplasmatischen Granula oder ihrer Abhängigkeit von T-Lymphozyten in unterschiedliche Subtypen unterteilt werden (Irani et al. 1986). Humane Mastzellen werden nach dem Proteasegehalt ihrer Granula in zwei Subtypen unterteilt, die als MC_T und MC_{TC} bezeichnet werden (siehe Tabelle 1.1). Die MC_T exprimieren Tryptase als einzige Mastzellprotease und sind hauptsächlich in der Mukosa, zum Beispiel von Lunge und Darm lokalisiert. Im Gegensatz dazu exprimieren die MC_{TC} sowohl Tryptase und Chymase als auch Carboxypeptidase A und sind vor allem in der Haut und intestinalen Submukosa, aber auch im Gehirn und den Meningen zu finden. Die Granula eines von einigen Autoren erwähnten dritten Subtyps, der MC_C, enthalten Chymase und Carboxypeptidase A und zeigen eine unterschiedliche Gewebeverteilung (Noli & Miolo 2001). Anders als die humanen werden die murinen Mastzellen nach ihrer bevorzugten Gewebelokalisation üblicherweise in zwei Subtypen unterteilt, Bindegewebsmastzellen (*connective tissue mast cells* = CTMC) und Mukosamastzellen (*mucosal mast cells* = MMC). Die MMC exprimieren Chymase und sind wie die humanen MC_T bevorzugt in der Lamina propria und gastrointestinalen Mukosa lokalisiert. Die CTMC finden sich wie die humanen MC_{TC} vor allem im Bindegewebe der Haut, im subepithelialen Bindegewebe des Respirations- und Gastrointestinaltraktes sowie im Gehirn und den Meningen. Ihre zytoplasmatischen Granula enthalten die Proteasen Tryptase, Chymase, Carboxypeptidase A und Cathepsin G. Ein wichtiges Merkmal der Mukosamastzellen von Mensch und Maus ist ihre Abhängigkeit von T-Lymphozyten, die sich darin zeigt, dass dieser Mastzellsubtyp in thymusdefizienten Mäusen sowie bei Menschen mit erworbener Immundefizienz fehlt (Ruitenbergh & Elgersma 1976; Irani et al. 1987). Im Hinblick auf die Gewebeverteilung entsprechen murine MMC weitgehend den humanen MC_T sowie murine CTMC weitgehend den humanen MC_{TC}.

Tabelle 1.1: Proteasen in unterschiedlichen Mastzellpopulationen. Modifiziert nach Wenersson S. & Pejler G., Nature Reviews Immunology, 14, 478-494 (2014).

	murine MMC	humane MC _T	murine CTMC	humane MC _{TC}
Chymase	mMCP-1 mMCP-2 mMCP-9		mMCP-4 mMCP-5	Chymase
Tryptase		α-Tryptase β-Tryptase hTMT	mMCP-6 mMCP-7 mTMT	α-Tryptase β-Tryptase hTMT
Cathepsin			Cathepsin G	Cathepsin G
Carboxypeptidase			CPA	CPA

1.1.3 Mastzellproteasen

Proteasen machen mehr als die Hälfte des Granulainhaltes reifer Mastzellen aus. Die spezifischen Expressionsmuster der Mastzellproteasen variieren dabei erheblich zwischen den verschiedenen Spezies ebenso wie zwischen den einzelnen Mastzell-Subklassen. Die Bandbreite der von einer Mastzelle exprimierten Proteasen hängt, wie bereits erwähnt, in großem Ausmaß von den regulatorischen Faktoren ab, denen sie in ihrer aktuellen, aber auch ihrer vorherigen Umgebung ausgesetzt ist bzw. war. Bisher wurden nur wenige mastzell-spezifische Proteasen beim Menschen identifiziert. Zusammen mit Amininen, Histamin und Serotonin werden in den zytoplasmatischen Granula muriner Mastzellen zwölf bekannte Proteasen im Komplex mit verschiedenen Proteoglykanen gespeichert. Die drei großen Gruppen innerhalb der Mastzellproteasen sind Tryptasen, Chymasen und Carboxypeptidase A. Es handelt sich dabei um so genannte neutrale Proteasen, die bei einem neutralen pH-Wert enzymatisch aktiv sind. Tryptasen und Chymasen gehören zu den Serinproteasen, während es sich bei der Carboxypeptidase A um eine zinkabhängige Metalloprotease handelt. Die Bezeichnung der einzelnen Proteasen bezieht sich auf ihre Substratspezifität. So haben Tryptasen eine Trypsin-ähnliche, Chymasen eine Chymotrypsin-ähnliche spezifische Wirksamkeit. Die Carboxypeptidase A verdankt ihren Namen der Tatsache, dass sie Substrate bevorzugt vom C-terminalen Ende her spaltet.

Neben den mastzellspezifischen Proteasen können Mastzellen weitere Proteasen enthalten und freisetzen, so zum Beispiel Matrix-Metalloprotease-9 (Baram et al. 2001), Granzyme oder Cathepsin D, E und G (Dragonetti et al. 2000; Henningsson et al. 2005; Schechter et al. 1990). Sämtliche Mastzellproteasen werden als Zymogene mit einem N-terminalen Signalpeptid synthetisiert, nach dessen Abspaltung und weiterer enzymatischer Aufbereitung der Proenzyme die jeweiligen biologisch aktiven Enzyme entstehen. Dass ausschließlich biologisch aktive Proteasen in den Mastzellgranula gespeichert werden, stellt ein ungewöhnliches Merkmal der Mastzellen dar. Sie benötigen daher neben einem niedrigen pH-Wert innerhalb der Granula, welcher einer Autolyse vorbeugt, sehr wahrscheinlich Schutzmechanismen in Form von Proteaseinhibitoren, die ins Zytosol gelangte Proteasen neutralisieren können. Die Fähigkeit in kurzer Zeit große Mengen aktiver Proteasen freizusetzen scheint jedoch für die normale Funktionsfähigkeit der Mastzellen von erheblicher Bedeutung zu sein (Schwartz et al. 1987). So liegt die Annahme nahe, dass Mastzellproteasen in der initialen Phase einer Antwort auf Pathogene oder andere zur Mastzellaktivierung führender Stimuli eine weitreichende Rolle spielen. Und obwohl die Funktionen von Mastzellproteasen *in vitro* bereits umfassend

untersucht wurden, lieferten nur wenige *in vivo* Experimente Belege für den Ab- oder Umbau bestimmter Substrate durch Mastzellproteasen.

1.1.3.1 Chymasen

Die Chymasen werden nach ihren strukturellen und phylogenetischen Eigenschaften als α - oder β -Chymasen klassifiziert (Chandrasekharan et al. 1996). Beim Menschen existiert nur ein einziges, zur α -Klasse gehöriges Chymasegen (Caughey et al. 1991; Johnson et al. 1986) und wie bereits erwähnt, exprimieren allein MC_{TC} (und evtl. MC_C) die entsprechende Chymase. Im Gegensatz dazu gibt es bei der Maus vier verschiedene β -Chymasen (mMCP-1, mMCP-2, mMCP-4 und mMCP-9) sowie eine α -Chymase (mMCP-5). Dabei zeigen CTMC eine überwiegende Expression von mMCP-4 und -5, MMC exprimieren mMCP-1 und -2, spezifische MMC des Uterus exprimieren mMCP-9 (Chu et al. 1992; Reynolds et al. 1990; Serafin et al. 1990; Hunt et al. 1997).

Bisher wurde eine Vielzahl von Substraten der verschiedenen Mastzellchymasen identifiziert, eines der am besten untersuchten ist das Prohormon Angiotensin I. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass sowohl die humane Chymase als auch mMCP-4 Angiotensin I in das vasoaktive Angiotensin II umwandeln können (Reilly et al. 1982; Caughey et al. 2000). Diese Funktion der Chymasen wurde durch Versuche an mastzelldefizienten Mäusen belegt, welche eine verringerte Fähigkeit zur Angiotensin II-Bildung aufweisen (Li et al. 2004). Andere Chymasen führen zum Abbau von Angiotensin I ohne die Bildung von aktivem Angiotensin II und auch mMCP-4 besitzt die Fähigkeit, Angiotensin I abzubauen. Eine Reihe weiterer Substrate der Mastzellchymasen gehört zu den Komponenten der extrazellulären Matrix bzw. ist am Umbau dieser beteiligt. So zählen z.B. Fibronectin und Vitronectin zu den Substraten der humanen und murinen Chymasen (Vartio et al. 1981; Tchougounova et al. 2003; Tchougounova et al. 2005; Banovac et al. 1993), desgleichen TGF- β 1, Prokollagen, Prokollagenasen und Pro-Matrixmetalloproteasen (Taipale et al. 1995; Kofford et al. 1997; Saarinen et al. 1994; Tchougounova et al. 2005). Die Chymasen scheinen somit unter physiologischen Bedingungen eine wesentliche Funktion in der Regulation der Bindegewebshomöostase inne zu haben. Daneben gehören auch inflammatorische Substanzen und bioaktive Peptide zu den Substraten, deren Level durch Mastzellchymasen reguliert werden können. Für einige Interleukin-Vorstufen, *Substance P*, VIP, Bradykinin und Kallidin konnte eine Aktivierung bzw. Deaktivierung durch Chymasen belegt werden (Mizutani et al. 1991; Omoto et al. 2006; Caughey et al. 1988; Reilly et al. 1985). Durch die Fähigkeit zum Abbau

von Thrombin und Plasmin liegt eine Mitwirkung an der Regulation des Blutgerinnungs-Fibrinolyse-Systems nahe (Pejler & Karlström 1993; Tchougounova & Pejler 2001). Mäuse mit einer selektiven Defizienz für mMCP-4 zeigen, wie auch mastzelldefiziente Mäuse, eine signifikant gesteigerte Morbidität und Mortalität nach intradermaler Injektion des Giftes der Gila-Krustenechse sowie des Giftes zweier Skorpionarten, was dafür spricht, dass mMCP-4 wesentlich zur Fähigkeit der Mastzellen beiträgt, die Resistenz gegenüber diesen Toxinen, wie auch gegenüber VIP, dem strukturell ähnlichen endogenen Peptid, zu erhöhen (Akahoshi et al. 2011).

Da nur eine einzige, zur α -Klasse gehörige Chymase beim Menschen exprimiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass die einzige murine α -Chymase, mMCP-5, deren Pendant darstellt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass mMCP-5 statt Chymotrypsin-ähnlicher Aktivität vielmehr eine Elastase-ähnliche Substratspezifität aufweist (Kunori et al. 2002). Von den bekannten murinen β -Chymasen hat mMCP-4 in Bezug auf die Gewebeverteilung und funktionelle Eigenschaften die größten Gemeinsamkeiten mit der humanen Mastzellchymase und wird somit als deren funktionelles Homolog angesehen (Tchougounova et al. 2003).

1.1.3.2 Tryptasen

Die Tryptasen werden in α - und β -Tryptasen unterteilt. Die humanen MC_T und MC_{TC} exprimieren drei β -Tryptasen, die Isoenzyme β I, β II und β III sowie zwei α -Tryptasen, die Isoenzyme α I und α II (Pallaoro et al. 1999). Die CTMC der Maus exprimieren zwei Tryptasen, mMCP-6 und mMCP-7, die Expression von mMCP-7 ist jedoch Stamm-abhängig. Von den in dieser Arbeit verwendeten C57BL/6-Mäusen wird diese Protease nicht exprimiert (Hunt et al. 1996). Mit der mMCP-11 wurde ein weiteres Trypsin-ähnliches Enzym entdeckt, das jedoch wie auch mMCP-7 zumeist nur in sehr frühen Differenzierungsstadien der Mastzellen exprimiert wird (Wong et al. 2004). Zusätzlich existiert eine als γ -Tryptase bezeichnete transmembranäre Tryptase, die sowohl von Menschen (hTMT mit den Isoenzymen γ I und γ II) als auch von Mäusen (mTMT) exprimiert wird und nach der Degranulation auf der Mastzelloberfläche erscheint (Caughey et al. 2000; Wong et al. 2002). Ihre Funktion ist bislang unbekannt.

Zwischen der Substratspezifität der Tryptasen und Chymasen bestehen einige Gemeinsamkeiten. So ist Fibronectin genauso ein Substrat der Tryptase wie der Chymase (Kaminska et al. 1999). Auch der Abbau von Pro-Matrixmetalloproteasen und des bioaktiven Peptides VIP gehören in das Wirkspektrum beider Proteasen (Lees et al. 1994). Auf eine Rolle

in der Blutgerinnung weist die Fähigkeit zum Abbau von Fibrinogen durch humane Trypsase und mMCP-7 hin (Schwartz et al. 1985; Huang et al. 1997), eine Mitwirkung in inflammatorischen Prozessen zeigt sich in der Aufhebung der chemotaktischen Wirkung von RANTES und Eotaxin auf Neutrophile durch Spaltung dieser Zytokine (Pang et al. 2006).

1.1.3.3 Carboxypeptidase A

Die MC-CPA ist das einzige Enzym der Mastzellen mit Carboxypeptidase-Aktivität. Von reifen murinen CTMC und humanen MC_{TC} wird sie in hohem Maß exprimiert, von MMC und MC_T dagegen nur in sehr geringen Mengen (Gurish et al. 1992; Serafin et al. 1987). Während der Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu reifen Mastzellen ist die MC-CPA eine der ersten exprimierten Mastzellproteasen (Rodewald et al. 1996). Es handelt sich um eine Exopeptidase, die bevorzugt C-terminale aliphatische Aminosäuren abspaltet. Natürliche Substrate der MC-CPA sind bisher nicht bekannt. *In vitro* spaltet aber sowohl humane als auch murine MC-CPA unter anderem das Prohormon Angiotensin I (Schneider et al. 2007; Goldstein et al. 1989; Lundequist et al. 2004) sowie die vasoaktiven Peptide Endothelin-1 und Sarafotoxin 6b (Metsärinne et al. 2002; Metz et al. 2006; Schneider et al. 2007). Darüber hinaus konnte mit Hilfe eines *ex vivo* Modells gezeigt werden, dass MC-CPA in der Lage ist Angiotensin I in Angiotensin II umzuwandeln (Lundequist et al. 2004).

Bei der Mastzelldegranulation wird MC-CPA im Komplex mit Proteoglykanen freigesetzt (Serafin et al. 1987), wobei Heparin ein wichtiger Bestandteil dieses Komplexes ist, da in Mäusen mit einer genetischen Defizienz für sulfatiertes Heparin MC-CPA – ebenso wie mMCP-4, -5 und -6 – fehlt (Forsberg et al. 1999; Humphries et al. 1999). Zugleich scheint die Bildung funktionsfähiger MC-CPA von der mMCP-5-Expression abzuhängen, denn mMCP-5-defiziente Mäuse exprimieren zwar MC-CPA mRNA, jedoch kein entsprechendes Protein (Huang et al. 1998). In gleicher Weise zeigen Mc-cpa^{-/-}-Mäuse ein gleichzeitiges Fehlen von MC-CPA und mMCP-5 trotz normaler Expression von mMCP-5 mRNA (Schneider et al. 2007).

1.1.4 Mastzelldefizienz: Kit^W/Kit^{W-v}-Mausmodell

Bis zur Entwicklung mastzelldefizienter Mausstämme beschränkte sich die Untersuchung der Mastzellfunktionen hauptsächlich auf *in vitro* Studien. Rückschlüsse auf die deutlich komplexeren *in vivo* Prozesse sind davon aber nur in begrenztem Ausmaß möglich. Wie bereits erwähnt ist der c-kit Ligand SCF der wichtigste Wachstums- und Differenzierungsfaktor der Mastzellen und für die normale Entwicklung und Funktion dieser Zellen unabdingbar (Galli et

al. 1992), was durch Versuche von Mekori et al. belegt werden konnte, in denen Mastzellen in Abwesenheit von SCF einen programmierten Zelltod durchliefen (Mekori et al. 1993). Bereits im Blut zirkulierende unreife Vorläuferstufen der Mastzellen exprimieren den c-kit Rezeptor und während andere Zellpopulationen der hämatopoetischen Reihe diesen im Laufe ihrer Differenzierung herunterregulieren, wird er von Mastzellen fortwährend exprimiert (Galli & Hammel 1994; Galli et al. 1994; Iemura et al. 1994). Die Unterbindung der Interaktion des Rezeptors mit seinem Liganden ermöglichte die Generierung mastzelldefizienter Mäuse. Durch Kreuzung der beiden Mausstämme C57BL/6-Kit^{W-v/+} und WB/Re-Kit^{W/+} entstehen zu einem Viertel (WB/ReJxC57BL/6J)F₁-Kit^{W/W-v}- oder auch WBB6F₁-Kit^{W/W-v}-Mäuse (kurz W/W^{-v}), in denen eine Doppelmutation des W/c-kit Locus auf Chromosom 5 zur Expression fehlerhafter c-kit Rezeptoren bzw. deren vollständigem Fehlen führt. Die W-Mutation (W steht für *white spotting*) führt zu einem Allel, das ein c-kit Protein kodiert, welches aufgrund des Fehlens einer transmembranären Domäne nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Die W^{-v}-Mutation (W^{-v} steht für *viable white spotting*) hingegen führt zu einer Punktmutation der Tyrosinkinase-Domäne des Rezeptors, was eine verringerte Aktivität derselben nach sich zieht (Reith et al. 1990). Die betroffenen Tiere zeichnen sich durch ein nahezu vollständiges Fehlen von Mastzellen bei gleichzeitiger Beeinflussung anderer Zellen der hämatopoetischen Zellreihe aus. So zeigen sie eine Anämie, eine weiße Fellfarbe aufgrund des Fehlens von Melanozyten (siehe Abbildung 1.1), Sterilität aufgrund des Fehlens von Keimzellen und eine Depletion der interstitiellen Cajal-Zellen (Kitamura et al. 1978). Die bei der Kreuzung zu 50% entstehenden phänotypisch unauffälligen (WB/ReJxC57BL/6J)F₁-Kit^{+/+}- oder auch WBB6F₁-Kit^{+/+}-Mäuse (kurz +/+) mit schwarzer Fellfarbe haben intakte c-kit Loci und können als mastzellkompetente Wildtyp-Kontrolle verwendet werden. Durch Rekonstitution mit *in vitro* gereiften, genetisch kompatiblen Mastzellen lässt sich die Mastzelldefizienz der W/W^{-v}-Mäuse selektiv wieder aufheben, wobei so genannte „Mastzell *knock-in*“ Mäuse entstehen. Aus dem Knochenmark, fetaler Leber oder embryonalen Stammzellen von Wildtyp-Mäusen oder Mäusen mit spezifischen genetischen Veränderungen gewonnene Mastzellen können dabei intravenös, intraperitoneal oder direkt in ein bestimmtes Gewebe wie zum Beispiel die Haut injiziert werden (Nakano et al. 1985; Tsai et al. 2000). Die Einwanderung und phänotypische Reifung der injizierten Mastzellen erfolgt abhängig vom jeweiligen Gewebe nach unterschiedlichen Zeiträumen (Johnson et al. 1991; Kitamura et al. 1978; Tanzola et al. 2003; Du et al. 1996). Vergleichende Untersuchungen von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen in mastzelldefizienten Mäusen und den entsprechenden Wildtyp- bzw. „Mastzell *knock-in*“ Mäusen ermöglichen eine Beurteilung, in wie weit die zu beobachtenden Unterschiede Folge

eines Fehlens von Mastzellen oder bestimmter Mastzellproteine sind. Jedoch muss dabei bedacht werden, dass Anzahl und Verteilungsmuster sowie phänotypische Eigenschaften der Mastzellen nach einer Rekonstitution in manchen Geweben unter Umständen nicht vollständig mit denen der entsprechenden Donor-Mäuse übereinstimmen (Nakano et al. 1985; Martin et al. 1993; Williams & Galli 2000; Tanzola et al. 2003).

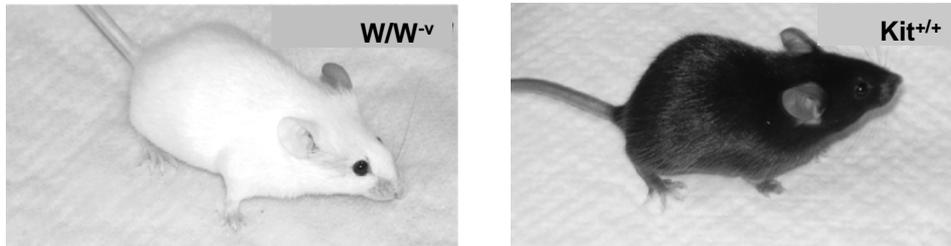


Abbildung 1.1: (A) WBB6F1-Kit^{W/W-v}-Maus, (B) WBB6F1-Kit^{+/+}-Maus (Kitamura et al. 1978).

Bei den ebenfalls mastzelldefizienten C57BL/6-Kit^{W-sh/W-sh}-Mäusen, welche von einigen Autoren als besseres Modell angesehen werden, liegt eine Inversion oberhalb des c-kit Locus vor. Diese Tiere haben insgesamt weniger phänotypische Abnormalitäten als W/W^{-v}-Mäuse; sie sind fertil und nicht anämisch, weisen jedoch eine Neutrophilie auf sowie ebenfalls eine gestörte Pigmentierung der Haut und zeigen ein ängstliches Verhalten, was insbesondere die Vergleichbarkeit mit Kontrolltieren in Verhaltenstest erschweren kann (Grimbaldeston et al. 2005). In neueren Mausmodellen nutzt man Cre-Rekombinase-medierte Zellablation um eine Mastzelldefizienz zu erreichen, so zum Beispiel in Cpa3-Cre- oder Mcpt5-Cre-Mäusen, bei denen gezielt mittels Cre-Rekombinase DNA-Sequenzen im CPA-Gen oder im mMCP5-Promotor entfernt werden (Feyerabend et al. 2011, Scholten et al. 2008).

1.1.5 Mastzellproteasedefizienz: mMCP-4^{-/-} und Mc-cpa^{Y356L,E378A}-Mausmodell

Um die biologischen Funktionen der Mastzellproteasen besser untersuchen und verstehen zu können nutzt man heute unter anderem Mausmodelle, die eine möglichst selektive Defizienz für eine der Mastzellproteasen aufweisen. Die Arbeitsgruppe um E. Tchougounova entwickelte einen solchen Mausstamm mit einer Deletion im Gen für die Mastzellchymase mMCP-4 (Tchougounova et al. 2003). Die Inaktivierung dieser Protease hat keine Unterschiede im Phänotyp oder Verhalten zwischen den betroffenen mMCP-4^{-/-}-Mäusen und ihren heterozygoten Artgenossen bzw. den korrespondierenden Wildtyp-Mäusen C57BL/6J zur Folge. Auch die Anzahl an Mastzellen, ihre Morphologie und die Expression und Speicherung

anderer Mastzellproteasen wird nicht beeinflusst. Die Untersuchung der Mitwirkung von mMCP-4 an der gesamten in den Mastzellen gespeicherten Chymotrypsin-ähnlichen Enzymaktivität in den zwei mastzellreichen Geweben Ohr und Peritoneum zeigte, dass die Ausschaltung von mMCP-4 zur kompletten Aufhebung Chymotrypsin-ähnlicher Enzymaktivität in diesen Geweben führt. Kulturen peritonealer Mastzellen von mMCP-4^{-/-}-Mäusen zeigten im Vergleich mit denen von mMCP-4^{+/+}-Mäusen eine deutlich verminderte Fähigkeit zur Inaktivierung von Thrombin, ebenso wie ein deutlich vermindertes Vermögen zur Verarbeitung endogenen Fibronectins. Damit wurde gezeigt, dass mMCP-4 die Hauptquelle Chymotrypsin-ähnlicher Enzymaktivität in Ohr und Peritoneum darstellt und eine Schlüsselrolle beim Abbau von Thrombin und Fibronectin in peritonealen Mastzellen innehat (Tchougounova et al. 2003). Der mMCP-4^{-/-}-Mausstamm stellt somit ein exzellentes *in vivo* Modell zur Untersuchung der spezifischen Funktionen dieser Mastzellprotease dar.

Bereits vor einigen Jahren gelang der Arbeitsgruppe von H.-R. Rodewald die Entwicklung eines MC-CPA-defizienten Mausstammes mit vollständigem Verlust der Carboxypeptidase A-Aktivität (Feyerabend et al. 2005). Jedoch zeigen diese MC-CPA^{-/-}-Mäuse auch eine Beeinträchtigung anderer Mastzellproteasen; obwohl das Gen für mMCP-5 funktionsfähig ist und mMCP-5 mRNA in normaler Menge exprimiert wird, kommt es nicht zur Expression des entsprechenden Proteins. Gleichzeitig ist in diesen Tieren die mMCP-4-Expression hochreguliert. Die Defizienz für beide Proteasen, MC-CPA und mMCP-5, erschwert somit eine Beurteilung der funktionellen Eigenschaften jeder einzelnen. Mit dem MC-CPA^{Y356L,E378A}-Mausstamm steht nun jedoch auch ein Mausmodell mit einer selektiven Defizienz für funktionsfähige MC-CPA zur Verfügung (Schneider et al. 2007). Anders als MC-CPA^{-/-}-Mäuse exprimieren MC-CPA^{Y356L,E378A}-Mäuse rund 80% der normalen Menge an MC-CPA und zudem mMCP-5, die exprimierte MC-CPA besitzt jedoch aufgrund des Austausches zweier Aminosäuren im MC-CPA-Allel keine Enzymaktivität. Mit Hilfe dieses Mausmodells konnte gezeigt werden, dass MC-CPA die essentielle Mastzellprotease für die inaktivierende Spaltung von Endothelin-1 und Sarafotoxinen ist und MC-CPA^{Y356L,E378A}- wie auch MC-CPA^{-/-}-Mäuse die Fähigkeiten zum Abbau dieser beiden Proteine nicht besitzen (Metsärinne et al. 2002; Metz et al. 2006; Schneider et al. 2007). Phänotypisch und in ihrem Verhalten unterscheiden sich MC-CPA^{Y356L,E378A}-Mäuse nicht von ihren heterozygoten Artgenossen bzw. ihrem korrespondierenden Wildtyp-Mausstamm C57BL/6J.

1.1.6 Mastzellen in physiologischen und pathologischen Prozessen

Eine Beteiligung von Mastzellen konnte bisher für eine ganze Reihe physiologischer und pathologischer Prozesse nachgewiesen werden. Am besten untersucht ist ihre Rolle in der Allergie und Anaphylaxie, bei der die FcεRI-vermittelte Aktivierung zur Mastzelldegranulation und damit zum Teil massiven Freisetzung von Histamin und anderen Mediatoren führt. Neben dieser Funktion in der frühen Phase haben Mastzellen aber auch Aufgaben in der späten und chronischen Phase einer allergischen Reaktion. Durch die Freisetzung von Chemokinen, Zytokinen und anderen Mediatoren nehmen sie hier Einfluss auf die Rekrutierung und Aktivierung inflammatorischer Zellen wie Eosinophiler (De Monchy et al. 1985), Neutrophiler (Koh et al. 1993), Basophiler (Guo et al. 1994), T-Lymphozyten und Makrophagen (Calhoun et al. 1993). Auch an der Pathogenese des Asthmas sind Mastzellen beteiligt, einige Autoren konnten eine Rolle von Trypsasen bei der Entstehung von allergischer Inflammation und Hyperreaktivität der Atemwege nachweisen (Barrios et al. 1998; Berger et al. 1999; Clark et al. 1995). Die neu synthetisierten Mediatoren vermitteln hier noch stärkere Effekte. So wirkt PGD₂ als Bronchokonstriktor und Vasodilatator; LTC₄ wird intrazellulär in seine aktiven Metabolite LTD₄ und LTE₄ umgewandelt, welche beide potente Verstärker des Asthmas sind (Austen 1995).

Mastzellen sind an der Entstehung fibrotischer Prozesse beteiligt. Sie werden im fibrotischen Gewebe verschiedener Erkrankungen wie der Lungenfibrose (Pesci et al. 1993), hepatischer Zirrhose (Armbrust et al. 1997), kardiovaskulärer Erkrankungen (T. Matsumoto et al. 2003), atopischer Dermatitis (Watanabe et al. 2002), Sklerodermie und Keloiden gefunden (Craig et al. 1986). Unterschiedliche Studien zeigen eine mitogene und proliferationssteigernde Wirkung von Chymasen und Trypsasen auf Fibroblasten (Algermissen et al. 1999; Maruichi et al. 2004; Abe et al. 1998; Akers et al. 2000; Gruber et al. 1997; Hartmann et al. 1992; Ruoss et al. 1991). Im Tierversuch konnte die Fibrose durch Chymase-Inhibitoren reduziert werden (Sakaguchi et al. 2004; Takai et al. 2003; Tomimori et al. 2003). Trypsasen können die Kollagensynthese stimulieren und haben zugleich eine mitogene Wirkung auf glatte Muskelzellen und Myozyten (Brown et al. 2002). Daneben wirken Chymasen und Trypsasen auch auf Endothelzellen als Mitogene und fördern das Kapillarwachstum (Blair et al. 1997), wodurch ihnen eine Rolle in der Angiogenese zugeschrieben wird. Durch die Sekretion angiogener Faktoren sind Mastzellen somit auch direkt in die Tumorangio-genese involviert und können Wachstum, Invasion und Metastasierung fördern (Kondo et al. 2006). Diese Annahme wird gestützt durch Versuche an W/W^v-Mäusen, in denen induzierte Tumore eine verminderte Fähigkeit zur Angiogenese und Metastasierung zeigen (Starkey et al. 1988).

In der Pathogenese der Atherosklerose spielen Mastzellen eine bedeutende Rolle. Ebenso wie ACE vermag die Mastzellchymase Angiotensin I in Angiotensin II umzuwandeln, kann jedoch nicht wie dieses durch ACE-Inhibitoren deaktiviert werden. Mastzellen können durch Förderung der Cholesteroleinlagerung die Bildung von Schaumzellen begünstigen und zur Destabilisierung atheromatöser Plaques beitragen (Kovanen 1995).

Ferner haben Mastzellen wichtige Funktionen im Kontext von Autoimmunerkrankungen, unter denen die Multiple Sklerose und das ihr in bestimmten Aspekten entsprechende Tiermodell, die experimentelle autoimmune Encephalomyelitis (EAE), wohl am eingehendsten untersucht sind. Herde entzündlicher Demyelinisierung sind durch die Akkumulation von Mastzellen charakterisiert und in der akuten EAE korreliert der Anteil degranulierter Mastzellen im ZNS mit dem Auftreten klinischer Symptome (Brenner et al. 1994). Zahlreiche Studien stützen die Annahme, dass Mastzellen für die volle Manifestation der Erkrankung von Bedeutung sind (Elieh-Ali-Komi & Cao 2016). Die Inzidenz einer MOG-induzierten EAE in mastzelldefizienten Mäusen ist in Versuchen von Secor et al. signifikant niedriger als in Wildtyp-Kontrollen, ebenso zeigen sich ein verzögerter Erkrankungsbeginn und reduzierter Schweregrad. Durch die Rekonstitution mit $+/+$ BMMC werden die Empfindlichkeit gegenüber MOG und der Krankheitsverlauf auf das Niveau der Wildtyp-Tiere angehoben (Secor et al. 2000). Bennett et al. konnten in neueren Experimenten erstmals zeigen, dass während der EAE BMMC aktiv ins ZNS rekrutiert werden. Überraschenderweise konnten jedoch in der gleichen Studie auch in mastzelldefizienten W/W^v - und W^{sh}/W^{sh} -Mäusen schwere Verläufe der EAE induziert werden. Zwar berichten die Autoren von einem Trend hin zu niedrigeren Schweregraden während Erkrankungsbeginn und -höhepunkt im Vergleich mit Wildtyp-Tieren, letztendlich wurden jedoch in allen Gruppen im weiteren Erkrankungsverlauf die gleichen Schweregrade erreicht (Bennett et al. 2009). Diese Ergebnisse lassen die Rolle von Mastzellen bei der Entstehung der MS bzw. EAE weniger eindeutig erscheinen als bislang angenommen.

Auch in viele physiologische Vorgänge sind Mastzellen involviert. Für eine effiziente Immunabwehr gegen Bakterien, Viren und Parasiten sind Mastzellen unerlässlich (Echtenacher et al. 1996; Malaviya et al. 1996). In einem Modell der bakteriellen Peritonitis zeigten mastzelldefiziente W/W^v -Mäuse eine Mortalität von 80%, während die Erkrankung bei $+/+$ ebenso wie bei mastzellrekonstituierten Tieren nicht letal verlief. In Mastzellen gespeichertes $TNF-\alpha$ konnte als entscheidend für die Neutrophilenrekrutierung und Pathogeneliminierung nachgewiesen werden. Auch in der erworbenen Immunabwehr wird den Mastzellen eine wichtige Rolle zuteil. Sie sind zur Phagozytose befähigt und exprimieren MHC-Moleküle der Klasse I sowie unter bestimmten Umständen auch der Klasse II. Damit gehören sie zu den

Antigen-präsentierenden Zellen und können eine Aktivierung von T-Lymphozyten auslösen (Frandji et al. 1993; Tedla et al. 1998).

Versuche an W/W^v-Mäusen zeigten eine deutliche Beeinträchtigung des Haarwuchszyklus (Maurer et al. 1997) und des Knochenumbaus (Cindik et al. 2000), wodurch die Mitwirkung von Mastzellen am normalen Gewebeumbau verdeutlicht wird. Auch in Wundheilungsprozesse greifen Mastzellen durch die Histamin- und IL-4-vermittelte Steigerung der Einwanderung und Proliferation von Fibroblasten ein (Kupietzky & Levi-Schaffer 1996).

Das Vorhandensein von Mastzellen im gesunden ZNS und die daraus resultierende Wahrscheinlichkeit physiologischer Funktionen in Gehirn und Rückenmark sind seit langer Zeit Diskussionsgegenstand. Entlang von Blutgefäßen gelangen Mastzellvorläufer bereits während der Embryonalentwicklung ins ZNS, wo sie unter lokalen Einflüssen reifen und ausdifferenzieren. Sie sind vorwiegend in Thalamus und Hypothalamus, den Meningen sowie dem Plexus choroideus ansässig und bleiben hier überwiegend mit Blutgefäßen assoziiert (Hendrix et al. 2006). Verschiedene Interaktionen mit Zellen des ZNS lassen eine Funktion als Bindeglied zwischen Immun- und Nervensystem vermuten. So beeinflussen unterschiedliche Faktoren des ZNS Wachstum, Differenzierung und Aktivierungsgrad von Mastzellen. Die Neurotransmitter Noradrenalin und Acetylcholin haben unter bestimmten Bedingungen aktivierende Wirkungen auf Mastzellen und wichtige Neuropeptide, darunter *Substance P*, CGRP, VIP, Neurotensin und Neuropeptid Y, können direkt oder indirekt eine Freisetzung von Mastzellmediatoren hervorrufen, welche wiederum diverse Wirkungen an Neuronen vermitteln können (Johnson & Krenger 1992). Über die Ausschüttung von Histamin, einem wichtigen Neurotransmitter und -modulator, können Mastzellen in die Interaktion von Neuronen eingreifen und die synaptische Übertragungsrate regulieren (Villena et al. 1986). Über die histaminergen Neurone des tuberomamillären Nucleus des Hypothalamus, die in ausgedehnte Hirnareale projizieren, ist Histamin an der Regulation zahlreicher physiologischer Funktionen und Verhaltensweisen beteiligt, wie etwa der Thermoregulation, zirkadianer Rhythmen, neuroendokriner und kardiovaskulärer Funktionen, Lokomotion, Durst- und Hungergefühl sowie Lernen und Gedächtnis (Haas & Panula 2003; Onodera et al. 1994). Über die Beteiligung des Mastzellhistamins am Gesamthistamingehalt des Gehirns gibt es jedoch unterschiedliche Auffassungen. Verschiedene Studien an Mäusen kommen zu mitunter voneinander abweichenden Ergebnissen (Grzanna & Shultz 1982; Hough et al. 1984; Yamatodani et al. 1982), jedoch unterscheiden sich die in den verschiedenen Studien untersuchten Tiere auch in Geschlecht und Alter zum Teil deutlich voneinander, was wiederum die Beobachtung untermauert, dass die Gewebeverteilung der Mastzellen sowie der Mediatorengehalt ihrer

Granula unter anderem alters- und geschlechtsabhängig sind. Die differierenden Ergebnisse der Autoren stellen somit möglicherweise physiologische Unterschiede zwischen Tieren unterschiedlichen Alters und Geschlechts dar (Silver et al. 1996). Die typische perivaskuläre Lokalisation der Mastzellen sowie ihr Gehalt an vasoaktiven Substanzen lassen zudem eine Beteiligung an der Regulation des zerebralen Blutflusses und der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke vermuten. Ferner liefert das überwiegende Vorkommen an Gefäßverzweigungen, den Orten der Angiogenese, einen Hinweis darauf, dass Mastzellen diese beeinflussen oder regulieren können (Khalil et al. 2007).

1.2 Das zentrale Nervensystem

1.2.1 Allgemeine Einführung

Das zentrale Nervensystem umfasst Gehirn und Rückenmark. Neben den Neuronen, deren Aufgaben die Erregungsbildung, -verarbeitung und -weiterleitung sind, besteht das ZNS zu 90% aus Gliazellen. Sie dienen dem Nervensystem als eine Art Bindegewebe zur mechanischen Stabilisierung der Neurone. Daneben sind sie am Auf- und Abbau neuronaler Verbindungen, der synaptischen Erregungsübertragung, dem Stoffaustausch sowie der elektrischen Isolierung und Markscheidenbildung beteiligt. Zudem spielen sie eine Rolle bei De- und Regenerationsvorgängen von Nervenzellen. Zu den Gliazellen gehören Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikrogliazellen und die Ependymzellen, die Ventrikelsystem und Zentralkanal auskleiden und das Epithel des Plexus choroideus bilden. Astrozyten stellen die Mehrzahl der Gliazellen im ZNS. Mit ihren zahlreichen Fortsätzen bilden sie untereinander ein enges Netzwerk aus. Astrozytenfortsätze bedecken auch Synapsen, Ranviersche Schnürringe und nichtmyelinisierte Axone. Des Weiteren induzieren sie in den Endothelien zerebraler Blutgefäße die Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke (Neuhaus et al. 1991). Neben der Ernährung von Neuronen zählt außerdem die Aufrechterhaltung der Ionen- und Transmitterhomöostase zu ihren Aufgaben. Die Fortsätze der Oligodendrozyten bilden die Markscheiden der Axone aus und isolieren diese so elektrisch. Das Vorhandensein von Myelin determiniert zu einem großen Teil die eingeschränkte Regenerationsfähigkeit des ZNS. Neben seiner Funktion in Stabilisierung, Ernährung und Reizweiterleitung ist es einer der größten Inhibitoren axonaler Regeneration (Qiu et al. 2000) und nahezu jede Axonschädigung geht mit der Freisetzung von Myelinbestandteilen einher. Mikrogliazellen scheinen von monozytären Zellen des Blutes abzustammen, die während der embryonalen und frühen postnatalen Phase das Gehirn infiltrieren (Raivich et al. 1999). Unter physiologischen Bedingungen befinden sie sich in einer

stark ramifizierten ruhenden Zustandsform, nach Aktivierung gehen sie in eine hypertrophe amöboide Form mit kurzen Zellausläufern über. Als mobile immunkompetente Zellen überwachen sie die strukturelle Integrität des ZNS. Sie können im aktivierten Zustand Eigenschaften immunkompetenter Makrophagen wie die Fähigkeit zur Phagozytose annehmen und an inflammatorischen Prozessen teilnehmen. Ebenso wie Astrozyten können sie trophische Faktoren wie bFGF, NGF oder Neurotrophin 3 freisetzen, welche die Neuroplastizität beeinflussen (Banati 2002; Hansson & Rönnbäck 2003), sowie Wachstumsfaktoren und Zytokine, die durch Förderung der Remyelinisierung zur Neuroregeneration beitragen können (Diemel et al. 1998; Minghetti & Levi 1998). Da aktivierte amöboide Mikrogliazellen morphologisch nur schwer von aus dem Blutkreislauf eingewanderten Makrophagen zu unterscheiden sind, werden beide Zelltypen mitunter gesamthaft als Mikroglia/Makrophagen bezeichnet.

1.2.2 Immunprivileg des zentralen Nervensystems

Das zentrale Nervensystem zeichnet sich neben einigen anderen Organen wie vordere Augenkammer, Plazenta, Ovar oder Hoden durch einen Zustand verminderter Aktivierbarkeit des spezifischen und unspezifischen Immunsystems, das so genannte Immunprivileg aus (Shirai 1921; Medawar 1948). In diesen nur bedingt regenerationsfähigen Organen kommt es unter anderem durch Blut-Gewebe-Schranken und die Freisetzung antiinflammatorischer Botenstoffe zu einer Unterdrückung von Immunreaktionen, so dass entzündliche Prozesse hier in abgeschwächter Form ablaufen und allogene Transplantate verzögert bzw. gar nicht abgestoßen werden. Ebenso werden im ZNS auch Viren wie das Herpes Zoster Virus toleriert, da deren Eliminierung durch zytotoxische T-Lymphozyten zum Untergang postmitotischer neuronaler Zellen führen würde. In den letzten Jahren wurde jedoch zunehmend deutlich, dass die Interaktionen von Immunsystem und ZNS weit umfangreicher sind als lange angenommen.

Unter physiologischen Bedingungen erschwert die Blut-Hirn-Schranke Immunzellen und Makromolekülen den Zugang ins ZNS, jedoch exprimieren die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke in geringem Ausmaß Adhäsionsmoleküle, die das Einwandern von Leukozyten ermöglichen (Bart et al. 2000). Das Zytokin TGF- β wird im ZNS gebildet und ist in nachweisbaren Konzentrationen in der zerebrospinalen Flüssigkeit vorhanden (Johnson et al. 1992). Es kann die Proliferation von ins ZNS gelangten T-Lymphozyten unterdrücken (Taylor & Streilein 1996) ebenso wie die Expression chemotaktischer Faktoren durch Astrozyten (Weiss & Berman 1998). Weiterhin konnte eine Abnahme der Expression von

Adhäsionsmolekülen und eine deutlich verminderte Migration von Leukozyten über die Blut-Hirn-Schranke durch TGF- β nachgewiesen werden (Fabry et al. 1995). Obwohl anatomisch definierbare lymphatische Organe im ZNS nicht existieren, kommt es doch zu einer lymphatischen Drainage des Gehirns in zervikale Lymphknoten (Cserr & Knopf 1992). Zudem haben peripher injizierte Zytokine wie IFN- γ und TNF- α sowie bakterielles LPS die Fähigkeit, Zellen jenseits der Blut-Hirn-Schranke zu aktivieren (Hickey et al. 1992; Elmquist et al. 1997), obwohl Moleküle dieser Größe die Blut-Hirn-Schranke selbst nicht passieren können. Diese Erkenntnisse werden unter anderem im Mausmodell der EAE genutzt, bei dem die periphere Injektion eines spezifischen Antigens zur Entwicklung einer der Multiplen Sklerose ähnelnden Autoimmunerkrankung des ZNS führt. Aktivierte T-Lymphozyten können in das Hirngewebe eindringen, jedoch ist ihre Anzahl unter physiologischen Bedingungen gering (Hickey 1999). Im Rahmen einer systemischen Immunreaktion ohne direkte Beteiligung des ZNS lässt sich eine erhöhte Anzahl von T-Lymphozyten im Gehirn nachweisen (Hickey & Kimura 1987). Auch entzündliche Prozesse, Infektionen oder Gewebeschädigungen im ZNS führen zu einer gesteigerten Anwesenheit von T-Lymphozyten (Hickey et al. 1991; Qing et al. 2000; Yeager et al. 2000). Die perivaskulären monozytären Zellen des ZNS und meningeale Makrophagen erneuern sich ständig durch Einwanderung aus dem Blut, wobei sie auch unter physiologischen Bedingungen die intakte Blut-Hirn-Schranke passieren können. Ob diese Zellen das ZNS in Richtung lymphatischer Organe wieder verlassen können, ist umstritten.

Nachdem Paul Ehrlich das Vorhandensein von Mastzellen in den Läsionen von Patienten mit multipler Sklerose und Apoplex beschrieb (Ehrlich 1878; Ehrlich 1879), ist heute bekannt, dass Mastzellen auch unter physiologischen Bedingungen im ZNS auftreten. Hier sind sie überwiegend in den Meningen und im Plexus choroideus sowie im Thalamus und Hypothalamus lokalisiert und können sowohl als residente als auch das ZNS patrouillierende Zellen vorkommen (Johnson & Krenger 1992; Silver et al. 1996). Dabei bestehen jedoch zwischen den verschiedenen Spezies ebenso wie zwischen den unterschiedlichen Stämmen einer Spezies teils erhebliche Unterschiede, auch nehmen Faktoren wie Stress oder Geschlechtshormone Einfluss auf die Anzahl der Mastzellen im ZNS (Asarian et al. 2002; Bugajski et al. 1994; Cirulli et al. 1998).

Alle diese Mechanismen verdeutlichen, dass das ZNS trotz seiner immunologischen Sonderstellung in ständiger Interaktion mit dem Immunsystem steht. Das Ausmaß dieser Interaktion ist verglichen mit anderen Organsystemen jedoch deutlich geringer, da die eingeschränkte Regenerationsfähigkeit des postmitotischen neuronalen Gewebes eine erhöhte Toleranz gegenüber potentiell schädigenden Einflüssen erfordert. Das die neuronalen

Strukturen schützende Immunprivileg steht somit den wundheilungs- und regenerationsfördernden Wirkungen inflammatorischer Reaktionen gegenüber.

1.2.3 De- und Regeneration im zentralen Nervensystem

Eine traumatische Läsion des ZNS hat zunächst die direkte Schädigung neuronaler und glialer Zellen sowie axonaler Verbindungen zur Folge. Die Degeneration von Neuronen kennt dabei zwei Formen: In Abhängigkeit der Entfernung einer Axonläsion zum Perikaryon kommt es entweder zum Zelluntergang des Neurons oder, bei distaler Schädigung, zur so genannten Waller-Degeneration mit Untergang der Axonanteile distal der Läsion und Zerfall der Myelinscheide. Neben diesem Primärschaden tritt nach Verletzungen des ZNS auch ein sekundärer Zellschaden auf, dessen Ausmaß den Primärschaden deutlich übertreffen kann. So kommt es neben der Waller-Degeneration oft auch zur retrograden Degeneration axotomierter Neurone und zum Absterben nicht direkt geschädigter Nervenzellen. Die Mechanismen dieser sekundären Schädigung sind noch weitgehend unbekannt, Prozesse wie Ionenimbalance, Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke, Entstehung eines Hirnödems mit Anstieg des intrakraniellen Drucks, Abfall des zerebralen Perfusionsdrucks, Beeinträchtigung des Energiemetabolismus, Freisetzung und Aktivierung zum Teil autodestruktiver Mediatoren und Inflammation zählen aber dazu (Raghupathi et al. 2000; Sahuquillo et al. 2001). Im Gegensatz zum Primärschaden ist der Sekundärschaden nicht irreversibel und damit einer Therapie grundsätzlich zugänglich.

Die nach dem initialen Trauma ablaufende Kaskade von Ereignissen führt zur reaktiven Astroglie, Mikrogliaaktivierung und Entzündungsreaktion. Durch Schädigung der Blut-Hirn-Schranke sind die ersten an der Läsionsstelle eintreffenden Entzündungszellen Neutrophile und Makrohagen aus dem Blutkreislauf; sie können hier innerhalb einer Stunde nach der Schädigung beobachtet werden (Corrigan et al. 2016). Neutrophile wandern in großer Anzahl in das geschädigte Gewebe ein und in einem Mausmodell der Rückenmarksläsion konnte gezeigt werden, dass die frühe Ausschaltung von Neutrophilen durch einen anti-Ly6G/Gr-1 Antikörper das funktionelle und histologische *Outcome* während 28 Tagen nach der Läsion verschlechtert (Stirling et al. 2009). Als möglicher Mechanismus wird die Interaktion von Neutrophilen mit Astrozyten angesehen, welche über eine reaktive Astroglie und die Produktion von Wachstumsfaktoren zur Wiederherstellung der geschädigten Blut-Hirn-Schranke und Ausbildung einer regenerationsfördernden Umgebung führen.

Daneben migrieren Mikrogliazellen aus dem angrenzenden Gewebe in das Läsionsgebiet. *In vitro* konnte auch für aktivierte Mikroglia ein neuroprotektiver Effekt, unter anderem durch Sekretion von BDNF und NGF gezeigt werden (Nagata et al. 1993; Eskes et al. 2002). Die selektive Ablation proliferierender Mikrogliazellen nach ischämischem Insult in Mäusen war mit einem deutlichen Anstieg der Infarktgröße und der Anzahl apoptotischer Neurone assoziiert. Wie eingewanderte Makrophagen können aktivierte Mikrogliazellen Zelldetritus und Myelinbestandteile, die einen wachstumshemmenden Effekt haben, beseitigen. Jedoch werden der Mikroglia gleichzeitig auch durch NO und TNF- α vermittelte neurodegenerative Eigenschaften zugeschrieben (Boje & Arora 1992; Merrill et al. 1993; He et al. 2002; Münch et al. 2003). Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass auch der Glutamat-vermittelte exzitotoxische Zelltod zur Neurotoxizität der Mikrogliazellen beiträgt (Matute et al. 2012).

Aktivierte T-Lymphozyten aus der Blutzirkulation erreichen das Läsionsgebiet mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung. Sie produzieren neurotrophe Faktoren wie BDNF, NGF, PDGF und Neurotrophin 3 (Hohlfeld et al. 2000) und unter bestimmten Bedingungen können autoimmune T-Lymphozyten im ZNS geschädigte Neurone vor sekundärer Schädigung bewahren und somit neuronales Überleben und neuronale Regeneration fördern (Moalem et al. 1999).

Werden die Meningen durch das Trauma mit beschädigt kommt es zur Migration meningealer Zellen, um die freiliegende Oberfläche des ZNS zu bedecken. Aktivierte Astrozyten wandern aus der Umgebung in das geschädigte Gebiet ein. Sie verschließen die geschädigte Blut-Hirn-Schranke und ersetzen zugrunde gegangenes Gewebe. Als bleibende Struktur entsteht so letztendlich eine Glianarbe, die überwiegend aus den dicht miteinander verwobenen Fortsätzen von Astrozyten besteht und nicht nur ein mechanisches Hindernis für auswachsende Axone darstellt. Ziel der Regeneration ist die Wiederherstellung der neuronalen Verbindungen. Dies kann auf mehreren Wegen erreicht werden: Durch Ausbildung von Kollateralen der Axone unverletzter Neurone des gleichen Funktionsgebietes (kollaterales *Sprouting*), durch Wiederauswachsen der Axone verletzter Neurone (reaktives *Sprouting*) oder durch Einwachsen von Fortsätzen funktionell anderer Neurone mit evtl. anschließender Funktionsänderung.

Wie in anderen Organen können die Zellen des angeborenen Immunsystems somit auch im ZNS sowohl neuroprotektive als auch neurotoxische Effekte vermitteln. Unter physiologischen Bedingungen sind die meisten inflammatorischen Moleküle ebenso wie Lymphozyten im ZNS kaum nachweisbar, unter bestimmten Umständen kommt es jedoch zu einem massiven Anstieg von Immunzellen und inflammatorischen Substanzen, der das Potenzial einer dramatischen Schädigung neuronaler Strukturen birgt. Jedoch ist heute auch bekannt, dass ein gewisses Maß

an Entzündungsreaktion für die Remyelinisierung von Axonen notwendig ist, wie auch in anderen Geweben die Inflammation einen Teilaspekt der normalen Wundheilung darstellt. Myelindebris inhibiert oligodendrogliale Vorläuferzellen und die Remyelinisierung von Axonen. In mehreren Modellen der Demyelinisierung konnte gezeigt werden, dass die phagozytische Aktivität von Mikroglia/Makrophagen zum Abbau von Myelinbestandteilen notwendig ist bevor es zur Remyelinisierung kommen kann (Raeji et al. 2016). Das Gleichgewicht der neuroinflammatorischen Reaktion entscheidet hier über das funktionelle *Outcome*.

Zunehmend wird anerkannt, dass Mastzellen bei Läsionen des ZNS eine Funktion als sogenannte *first responder* zukommt - also als Ersthelfern, den Zellen, die als erstes unmittelbar auf die Schädigung reagieren (Dong et al. 2016, Zhang et al. 2016). Histamin und Tryptase, in den Granula gespeicherte Mediatoren, die nach Mastzellaktivierung innerhalb kürzester Zeit freigesetzt werden, können die Aktivierung von Mikrogliazellen und die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren induzieren, was eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Entzündungsreaktion nahelegt (Dong et al. 2016).

1.2.3.1 Die Entorhinale Cortexläsion als Modell traumatischer Hirnschädigung

Der Entorhinale Cortex (EC) ist Teil der Hippocampusformation, zu der weiterhin der Gyrus dentatus, das Subiculum, das Präsubiculum, das Parasubiculum und der Hippocampus proper gehören. Der Hippocampus proper wird weiter unterteilt in die Cornu ammonis Regionen CA1 bis CA4. Über den Tractus perforans projiziert der EC in den Gyrus dentatus, die Cornu ammonis Regionen und das Subiculum (Geddes et al. 1985). Der dreischichtige Gyrus dentatus besteht aus der Molekularschicht, weiter unterteilt in äußere (OML) und innere (IML) Molekularschicht, und der Körnerzellschicht. Der EC hingegen ist wie der übrige Neocortex sechsschichtig aufgebaut, Fasern der Schichten II und III bilden dabei den Tractus perforans. Dieser verläuft zum größten Teil ipsilateral, zu einem kleinen Teil jedoch auch zum kontralateralen Gyrus dentatus. Ihre relativ einfache Zytoarchitektur mit trilaminärer Organisation und schichtenspezifischer Innervation sowie ihre klinische Relevanz durch Beteiligung an Lernvorgängen und Gedächtnisbildung geben der Hippocampusformation in der Erforschung adaptiver Veränderungen des ZNS eine große Bedeutung (Cabalka et al. 1992; Cotman et al. 1990; Frotscher et al. 1997).

Mit der ECL existiert ein gut etabliertes *in vivo* Modell zur Untersuchung postläsionaler De- und Regenerationsprozesse nach traumatischer Schädigung des ZNS (Deller & Frotscher 1997).

Der Tractus perforans, die wichtigste entorhinale Projektion zum Gyrus dentatus, wird dabei stereotaktisch durchtrennt (siehe Abbildung 1.2). Ipsilateral kommt es zur anterograden Degeneration der Axone des Tractus perforans und in der Folge zur Deafferenzierung der OML sowie der CA1- und CA3-Region mit Verlust von 80-90% der synaptischen Verbindungen (Fagan & Gage 1994; Jensen et al. 1994; Matthews et al. 1976; Steward et al. 1990).

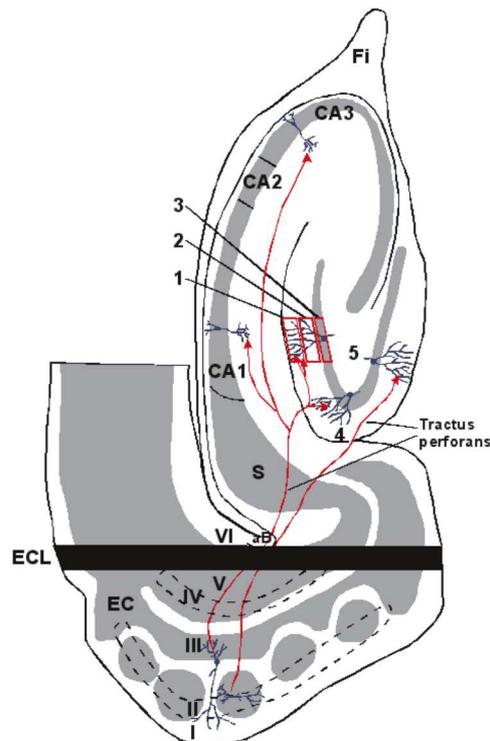


Abbildung 1.2: Anatomie der Hippocampusformation bei höheren Säugern. DG=Gyrus dentatus (1=äußere, Molekularschicht, 2=innere Molekularschicht, 3=Körnerzellschicht, 4=Fissura hippocampi, 5=Hilus), CA1/2/3=Abschnitte des Hippocampus proper, Fi=Fimbria, S=Subikulum, aB=anguläres Bündel, EC=entorhinaler Cortex (I/II/III/IV/V/VI=Schichten des entorhinalen Cortex), ECL=entorhinale Cortexläsion.

Der zeitliche Verlauf der nach einer ECL auftretenden physiologischen und morphologischen Veränderungen ist eingehend untersucht. In den ersten 48 Stunden postläsional kommt es zur Waller-Degeneration und initialen glialen Reaktion. Eine Mikrogliaaktivierung kann bereits innerhalb von 24 Stunden nach Läsion beobachtet werden (Fagan & Gage 1994; Gehrmann et al. 1991), die aktivierten Mikrogliazellen haben durch das Einziehen ihrer Fortsätze ein rundliches Aussehen und entwickeln die Fähigkeit zur amöboiden Fortbewegung, Phagozytose freigewordener Myelinbestandteile und Proliferation (Fagan & Gage 1990). Im Gegensatz dazu ist eine reaktive Astroglie in der äußeren Molekularschicht erst ab Tag drei nach der ECL beschrieben, sie hat ihren Höhepunkt vier bis sieben Tage nach Läsion, ca. drei bis vier Wochen nach Läsion ist sie abgeklungen (Jensen et al. 1994). Aktivierte Astrozyten zeichnen sich durch eine gesteigerte Immunreaktivität für das astrozytenspezifische Intermediärfilament GFAP aus

(Fagan & Gage 1994). In unmittelbarer Nähe zur Läsion werden sie hypertroph, bilden verstärkt dickere Fortsätze aus und vermehren sich durch Zellteilung, wodurch sie die so genannte Glianarbe ausbilden. Auch ihnen wird eine Fähigkeit zur Phagozytose zugeschrieben. Gliale Phagozytose und degenerative Prozesse erreichen ihr Maximum zwei bis acht Tage nach Läsion (Bechmann & Nitsch 1997; Gall et al. 1979). Bei der Aktivierung von Astrozyten nach ECL wird eine IL-1-vermittelte stimulierende Wirkung der Mikrogliazellen vermutet (Fagan & Gage 1990). Die Deafferenzierung der Molekularschicht des Gyrus dentatus führt bereits drei Tage nach Läsion zum so genannten *Sprouting* von Axonkollateralen unversehrter Afferenzen (Jensen et al. 1994), zehn bis 14 Tage postläsional setzt die Synaptogenese ein (Matthews et al. 1976; Scheff & Cotman 1977; Steward et al. 1990). Zwölf bis 30 Tage postläsional sind das axonale Auswachsen und die Formierung neuer Synapsen größtenteils beendet (Lee et al. 1977; Matthews et al. 1976). Die gliale Aktivität kehrt erst nach mehr als 30 Tagen wieder auf ein Normalniveau zurück, die Veränderungen der Dendriten dauern sogar noch länger an (Steward et al. 1993). Mit der Zeit werden fast alle denervierten Neurone der hippocampalen Formation als Resultat des kollateralen *Sproutings* komplett reinnerviert.

1.2.3.2 Die Hemisektion als Modell traumatischer Rückenmarkschädigung

Der Tractus corticospinalis (Pyramidenbahn) nimmt seinen Ursprung größtenteils von der Rinde des Motocortex und zieht durch den Hirnstamm, wo unmittelbar unterhalb der Pyramiden in der Medulla oblongata 70 bis 90% der Fasern auf die Gegenseite kreuzen, welche dann als Tractus corticospinalis lateralis im Seitenstrang des Rückenmarks zu den ihnen zugehörigen α -Motoneuronen verlaufen (siehe Abbildung 1.3). Die übrigen ungekreuzten Fasern ziehen als schmalerer Tractus corticospinalis anterior paramedian im Vorderstrang bis ins zervikale Rückenmark und kreuzen auf segmentaler Ebene zur Gegenseite. Die Pyramidenbahn innerviert vor allem die α -Motoneurone der distalen Extremitätenmuskulatur und hat damit eine wichtige Funktion in der Feinmotorik. Schädigungen des Tractus corticospinalis führen zunächst zu einer schlaffen Parese, wobei vor allem die Feinmotorik betroffen ist. Bei einseitiger Verletzung des Tractus corticospinalis lateralis treten die Symptome ipsilateral, bei beidseitiger Schädigung in beiden Körperhälften auf.

Die molekularen und zellulären Vorgänge nach einer Läsion im Rückenmark (Spinal Cord Injury = SCI) weisen im Vergleich zum Gehirn einige Unterschiede auf (Batchelor et al. 2008, Schnell et al. 1999). So ist die inflammatorische Reaktion im Rückenmark ausgeprägter als im Gehirn. Dies zeigt sich in einer extensiveren Infiltration von Neutrophilen, wobei der zeitliche

Verlauf mit einem *Peak* an Tag eins und einem darauf folgenden schnellen Abfall bis Tag vier nach Läsion in beiden Organen gleich ist. Aktivierte Mikrogliazellen und Makrophagen sind im Gehirn an Tag zwei nach Läsion weitgehend auf den Bereich der Läsion beschränkt, bis Tag vier zeigt sich dann auch eine zunehmende periläsionale Infiltration. Im Rückenmark dagegen ist schon an Tag zwei eine nach periläsional ausgedehnte Infiltration zu sehen, die sich bis Tag vier noch verdoppelt. Damit einhergehend ist auch die reaktive Phagozytose in der spinalen Läsion deutlich ausgeprägter. Die Zahl von infiltrierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten sowie B-Lymphozyten ist im Rückenmark doppelt bis dreifach höher als im Gehirn, dabei beschränkt sich die Infiltration im Gehirn auf die eigentliche Läsionsstelle, während im Rückenmark auch periläsional Lymphozyten zu finden sind. Zudem ist die 24 Stunden nach Läsion nachweisbare reaktive Astroglie mit Steigerung der Immunoreaktivität für GFAP und Verdickung der Fortsätze im Rückenmark deutlich ausgeprägter als im Gehirn, bis Tag zwei nimmt dieser Unterschied noch zu. Der Bereich der reaktiven Astroglie beschränkt sich dabei wie die Lymphozyteninfiltration im Gehirn weitgehend auf die Läsion, im Rückenmark ist er dagegen auf eine weit größere Region ausgedehnt (Batchelor et al. 2008; Schnell et al. 1999). Während die Wiederherstellung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke im Gehirn ca. um Tag zehn nach der Läsion stattfindet, dauert eine erhöhte Permeabilität dieser im Rückenmark mindestens bis Tag 14 an (Schnell et al. 1999).

Traumatische Läsionen des Rückenmarks beim Menschen sind zumeist Kompressionsverletzungen, z.B. im Rahmen von Wirbelsäulenverletzungen, Bandscheibenvorfällen oder Tumorwachstum. Auch in Tierversuchen werden Kompressionsmodelle häufig genutzt, jedoch stellt die Durchtrennung des Tractus corticospinalis durch Hemisektion des Rückenmarkes eine deutlich definiertere Läsion dar. Zudem erlaubt dieses Modell eine Abgrenzung der funktionellen Regeneration durch Wiederauswachsen geschädigter Axone vom kollateralen *Sprouting* verschonter Nervenfasern (Steward et al. 2003).

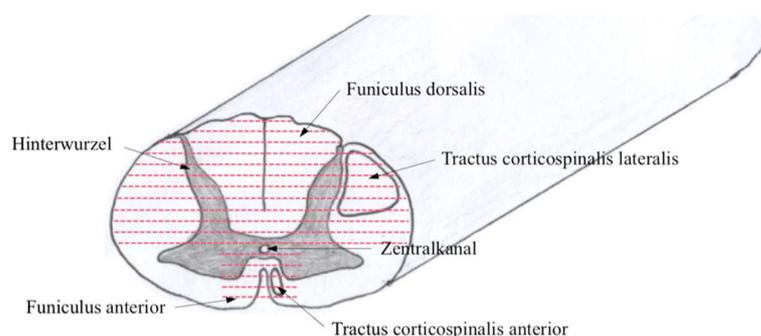


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Anatomie des Rückenmarks. Die rot schraffierte Fläche markiert den Bereich der Läsion bei der Hemisektion.

1.3 Gesteigerte inflammatorische Reaktion und Neurodegeneration in mastzelldefizienten Mäusen und Mastzellprotease 4-defizienten Mäusen nach ECL

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass mastzelldefiziente W/W^v -Mäuse sowie W^{sh}/W^{sh} -Mäuse und auch Mastzellprotease 4-defiziente $mMCP4^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich mit WT-Mäusen nach ECL eine signifikant gesteigerte Entzündungsreaktion zeigen (Hendrix et al. 2013). Dies äußert sich in einer deutlich stärker ausgeprägten Astroglie und einer erhöhten Anzahl $Iba1^+$ Mikrogliazellen/Makrophagen sowie $CD3^+$ und $CD4^+$ T-Lymphozyten im Bereich der Läsion. Während die reaktive Astroglie bei WT-Mäusen auf die eigentliche Läsionsstelle begrenzt ist, zeigt sich bei mastzelldefizienten W/W^v -Mäusen auch im angrenzenden Hirngewebe eine vermehrte GFAP-Expression der reaktiven Astrozyten 14 Tage nach Läsion. In gleicher Weise verhält es sich mit aktivierter Mikroglia/Makrophagen; auch die $Iba1$ -Expression beschränkt sich bei WT-Tieren auf die Läsionsstelle, umfasst bei W/W^v -Mäusen jedoch einen größeren Bereich des EC vier und 14 Tage nach Läsion. Zudem ist die Anzahl degenerierender Neurone, gemessen anhand der Anzahl Fluoro-Jade-B⁺ Zellen, bei W/W^v -Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren signifikant gesteigert. In gleicher Weise findet sich bei W^{sh}/W^{sh} -Mäusen im Bereich der Läsion nach vier und 14 Tagen eine signifikant gesteigerte reaktive Astroglie, zudem sieht man vier Tage nach der Läsion eine signifikant erhöhte Anzahl $Iba1^+$ Mikrogliazellen/Makrophagen und $CD4^+$ T-Zellen. Auch $mMCP4^{-/-}$ -Mäuse lassen 14 Tage nach der Läsion eine signifikant gesteigerte reaktive Astroglie sowie eine signifikant gesteigerte Infiltration von $CD3^+$ T-Lymphozyten im Bereich der Läsionsstelle erkennen.

Die intraläsionale Injektion des Chymase-Inhibitors Chymostatin und des CPA-Inhibitors *Potato Carboxypeptidase Inhibitor* (CPI) führt zu ähnlichen Ergebnissen wie bei mastzelldefizienten Mäusen. Gegenüber der Kontrollgruppe sind die reaktive Astroglie und die Infiltration $CD3^+$ T-Lymphozyten 14 Tage nach Läsion signifikant gesteigert, wobei dieser Effekt nach Injektion des Carboxypeptidase A-Inhibitors noch deutlich stärker ausgeprägt ist als nach Injektion des Chymase-Inhibitors.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Mastzelldefizienz nach traumatischer Läsion des Gehirns mit einer signifikanten Steigerung der Entzündungsreaktion einhergeht. Im Einklang damit führt die Inhibition der Mastzellproteasen Chymase und CPA, in Bezug auf die reaktive Astroglie und Infiltration $CD3^+$ T-Lymphozyten zu einem ähnlichen Ergebnis, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die Effekte von Mastzellen in traumatischen Hirnläsionen im Wesentlichen durch

die Wirkung der Mastzellproteasen vermittelt sind. Daraus ergeben sich die im Folgenden beschriebenen, in dieser Arbeit zu untersuchenden Fragestellungen.

1.4 Fragestellungen der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einfluss von Mastzellen und Mastzellproteasen auf den posttraumatischen Verlauf der Entzündungsreaktion im ZNS. Wie in einer Vorarbeit unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, zeigt sich in mastzelldefizienten Mäusen und Mäusen mit selektiver Defizienz für mMCP4 eine signifikant gesteigerte inflammatorische Reaktion nach traumatischer Hirnläsion. Daher gehen wir davon aus, dass Mastzellen die Entzündung nach traumatischer Läsion durch die Freisetzung von Proteasen, welche proinflammatorische und chemotaktische Faktoren inaktivieren, eingrenzen. Zur Überprüfung dieser These wurden in zwei etablierten *in vivo* Modellen traumatischer ZNS-Läsionen, der ECL und der SCI, die Reaktion von Astroglia und Mikroglia sowie die T-Zellinfiltration in mastzellproteasedefizienten Mäusen und WT-Mäusen miteinander verglichen. Im Modell der SCI wurden zudem mastzelldefiziente und -kompetente Mäuse gegenübergestellt und es wurde die Entwicklung der motorischen Funktion und Koordination nach Läsion bei allen verwendeten Mausstämmen beobachtet. Im folgenden sollen die folgenden Fragestellungen beantwortet werden:

- Zeigen Mäuse mit selektiver Defizienz für die Mastzellprotease CPA nach ECL in der histologischen Untersuchung eine gesteigerte Entzündung im Vergleich mit mastzellkompetenten Mäusen?
- Zeigen mastzelldefiziente Mäuse und Mäuse mit selektiver Defizienz für die Mastzellproteasen mMCP4 und CPA nach SCI in klinischen Tests eine Verschlechterung der motorischen Funktion im Vergleich mit mastzellkompetenten Mäusen?
- Spiegeln sich die evtl. in den klinischen Tests vorhandenen Unterschiede in der histologischen Untersuchung der Entzündung wieder?

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die für diese Arbeit verwendeten Materialien werden im folgenden Abschnitt in tabellarischer Form mit ihrer Bezugsquelle angegeben und die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer wird erläutert.

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2.1: verwendete Chemikalien mit Bezugsquelle

Substanz	Bezugsquelle
2-Methylbutan	Carl Roth, Karlsruhe, D
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
D(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe, D
di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat (Na ₂ HPO ₄ 7 H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glucose-20%	B. Braun, Melsungen, D
Höchst-Kernfarbstoff 33342	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, D
Ketamin-Actavis	Actavis, Langenfeld, D
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, D
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Phenolrot	Carl Roth, Karlsruhe, D
Rimadyl	Pfizer, Berlin, D

Rompun 2%	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, D
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, D
t-Octylphenoxypolyethoxy Ethanol (Triton X-100)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Zitronensäure-Monohydrat (C ₆ H ₈ O H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

2.1.2 Serum

Tabelle 2.2: verwendetes Serum mit Bezugsquelle

Serum	Bezugsquelle
Ziegennormalserum	Linaris, Wertheim, D

2.1.3 Antikörper

Tabelle 2.3: verwendete Antikörper mit Bezugsquelle

Antikörper und eingesetzte Verdünnung	Bezugsquelle
polyklonaler Antikörper Rabbit-anti GFAP (Verdünnung 1:500)	Dako, Glostrup, DK
monoklonaler Antikörper Mouse-anti-GFAP (Verdünnung 1:500)	Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA
monoklonaler Antikörper Rabbit-anti-Iba1 (Verdünnung 1:500 für Rückenmarkschnitte, 1:1000 für Gehirnschnitte)	Wako Chemicals, Richmond VA, USA
monoklonaler Antikörper Rat-anti-human CD3 (Verdünnung 1:200)	AbD Serotec, Oxford, UK
monoklonaler Antikörper Rat-anti-Mouse CD4 (Verdünnung 1:250)	BD Pharmingen
Goat-anti-Rat Alexa Flour 568 (Verdünnung 1:250)	Molecular Probes, Leiden, NL

Goat-anti-Rat Alexa Flour 488 (Verdünnung 1:250)	Molecular Probes, Leiden, NL
Goat-anti-Rabbit Alexa Flour 568 (Verdünnung 1:250)	Molecular Probes, Leiden, NL
Goat-anti-Rabbit Alexa Flour 488 (Verdünnung 1:250)	Molecular Probes, Leiden, NL
Goat-anti-Mouse Alexa Flour 568 (Verdünnung 1:250)	Molecular Probes, Leiden, NL

2.1.4 Geräte

Tabelle 2.4: verwendete Geräte mit Bezugsquelle

Gerät	Bezugsquelle
Bohrer	Proxxon, Niersbach, D
Eppendorfpipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Klammergerät	BD, Heidelberg, D
Kryostat	Reichert-Jung
Magnetrührer und Heizplatte	IKA Labortechnik, Staufen, D
Flourenzenzmikroskop Olympus BX 51 Magnafire	Olympus, Hamburg, D
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg, D
Perfusionspumpe	Ismatec Laboratoriumstechnik, Wertheim-Mondfeld, D
pH-Meter	Mettler Toledo, Giessen, D
Pipettus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Rasierer	Wella AG, Darmstadt, D
Rotarod	Ugo Basile, Comerio VA, I

Rotlichtlampe	Beurer, Ulm, D
Stereotakt	World Precision Instruments, Berlin, D
Waage	Korona Haushaltswaren, Langgöns, D

2.1.5 Zubehör

Tabelle 2.5: verwendetes Zubehör mit Bezugsquelle

Zubehör	Bezugsquelle
Dako Pen	Dako, Hamburg, D
Deckgläschen	Merck, Darmstadt, D
Einfríermedium	Leica Microsystems, Nussloch, D
Shandon Immu-Mount	Thermo Scientific, Pittsburgh PA, USA
Kanülen	B. Braun, Melsungen, D
Klingen	Leica Microsystems, Nussloch, D
Mikroschere	Fine Science Tools, Heidelberg, D
Nahtmaterial	Ethicon, Norderstedt, D
Objektträger Superfrost Plus	R. Langendingen, Emmendingen, D
OP-Besteck	Aesculap, Tuttlingen, D
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Shandon Freezing Spray	Thermo Scientific, Pittsburgh PA, USA
Spritzen	B. Braun, Melsungen, D
Sugi™ Saugtupfer unsteril	Kettenbach, Eschenburg, D
Wundklammern Autoclip	Clay Adams, Sparks MD, USA

2.1.6 Versuchstiere

Tabelle 2.6: verwendete Versuchstiere mit Bezugsquelle

Mausstamm	Bezugsquelle
C57BL/6J	Jackson Laboratories, Boston, MA, USA
mMCP-4 ^{-/-}	Jackson Laboratories, Boston, MA, USA
Mc-cpa ^{Y356L,E378A}	Prof. Dr. Rodewald, Institut für Immunologie der Universitätsklinikum Ulm, D
WBB6F ₁ /J-Kit ^{+/+}	Jackson Laboratories, Boston, MA, USA
WBB6F ₁ /J-Kit ^W /Kit ^{W-v}	Jackson Laboratories, Boston, MA, USA

Alle Tierversuche waren vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt (G067/04 und G0149/09) und wurden unter Einhaltung des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.1.7 Lösungen und Puffer

Tabelle 2.7: verwendete Lösungen und Puffer und ihre Zusammensetzung

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Ketaminlösung	10 ml Ketamin-HCl (50 mg/ml) und 4 ml Rompun (20 mg/ml) in 36 ml Natriumchloridlösung 0,9%
Millipore Typ II Wasser	aus Leitungswasser gewonnen mittels Elix-5 Water Purification System
Natriumchloridlösung 0,9%	0,9% NaCl in Millipore Typ II
Natronlauge zur pH-Wert-Einstellung	1 M Natriumhydroxid in Millipore Typ II
PFA-Lösung zur Perfusion nach ECL	4% Paraformaldehyd in PB
PFA-Lösung zur Perfusion nach SCI	4% Paraformaldehyd und 5% Saccharose in PB

Phosphatpuffer (PB)	0,1 M Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O und 0,1 M NaH ₂ PO ₄ H ₂ O in Millipore Typ II, pH-Wert eingestellt auf 7,4
Rimadyllösung	0,5 ml Rimadyl-Injektionslösung (50 mg/ml) in 24,5 ml PB
Ringerlösung	8,6 g NaCl, 0,3 g KCl, 0,33 g CaCl ₂ , 0,17 g NaHCO ₃ , 2,5 g NaNO ₃ , 50000 I.E. Heparin-Natrium in 1 l Millipore Typ II
Saccharosepuffer	30% D(+)-Saccharose in Millipore Typ II
Salzsäure zur pH-Wert-Einstellung	1 M HCl in Millipore Typ II
Zitratpuffer	<i>Stammlösung A</i> : 0,1 M Zitronensäure in Millipore Typ II; <i>Stammlösung B</i> : 0,1 M Natriumzitrat in Millipore Typ II; 4,5 ml Stammlösung A und 20,5 ml Stammlösung B in 225 ml Millipore Typ II

2.1.8 Software

Tabelle 2.8: verwendete Software mit Bezugsquelle

Programm	Bezugsquelle
Excel	Microsoft Office
ImageJ	National Institute of Health, USA
Metamorph Offline	Molecular Devices, LLC
PASW	PASW Inc.

2.2 Methoden

2.2.1 Entorhinale Cortexläsion (ECL)

Die mechanische Durchtrennung des ipsilateralen Tractus perforans (siehe Abbildung 1.2) erfolgte in einer stereotaktischen Operation. Dazu wurden acht bis zwölf Wochen alte weibliche Mäuse mit einer intraperitoneal verabreichten Ketaminlösung in einer Dosierung von 0,1 ml je 10 g Körpergewicht narkotisiert und nach Rasur des Kopfes in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt. Die Kopfhaut wurde mit einer Schere eröffnet. Nach Lokalisation der Schnittstelle von Bregma- und Lambdanaht wurde links lateral davon mit einem Bohrer ein schmales Loch in die Kalotte gebohrt und das Messer des Stereotakten bei genau definierten Koordinaten (2,0/0,0) vorsichtig bis auf die Schädelbasis eingeführt. Die Hautwunde wurde anschließend mit Wundklammern verschlossen und die Mäuse wurden nach der Operation für zwei Stunden unter einer Rotlichtlampe warm gehalten, um sie während des Aufwachens aus der Narkose vor Unterkühlung zu schützen.

2.2.2 Rückenmarkläsion (SCI)

Zur Durchtrennung des Tractus corticospinalis (siehe Abbildung 1.3) wurden zwölf bis 16 Wochen alte weibliche Mäuse in tiefer intraperitonealer Ketaminnarkose im Bereich des Kopfes und des Rückens rasiert und in Bauchlage auf einer Unterlage fixiert. Zuerst wurde die Haut über der Brustwirbelsäule mit einer Schere eröffnet, dann die darunter liegende dorsale Faszie. Nach Freilegen der Dornfortsätze in Höhe BWK6 bis BWK9 und Abtrennen der paravertebralen Muskeln in diesem Bereich wurden eine partielle Laminektomie des 8. Brustwirbelkörpers und die Eröffnung des Rückenmarkkanals durchgeführt. Mit einer mikrochirurgischen Schere erfolgte dann die beidseitige laterale Sektion bis mindestens zum Zentralkanal mit Durchtrennung des rechten und linken dorsalen Funikulus und der Hinterhörner sowie des Tractus corticospinalis lateralis. Durch einen zusätzlichen medianen Schnitt erfolgte die Durchtrennung des ventralen Funikulus mit dem hier verlaufenden Tractus corticospinalis anterior. Mit einem nicht resorbierbaren Nahtmaterial wurden die autochthonen Muskelzüge zusammengenäht und die Haut über der Brustwirbelsäule mit Wundklammern verschlossen. Die Mäuse erhielten postoperativ 0,1 ml Rimadyl®-Lösung je 10 g Körpergewicht zur Schmerzstillung intraperitoneal sowie 10 ml 20%ige Glukoselösung subkutan. Sie wurden für zwei Stunden bei 37°C und anschließend über Nacht bei 20°C warm gehalten, um sie während des Aufwachens aus der Narkose vor Unterkühlung zu schützen.

Nach korrekt durchgeführter SCI konnten die Tiere eine leichtgradige, maximal für zwei Tage bestehende Schwäche der Hinterbeine mit damit einhergehender Störung des Gangbildes aufweisen, zu Störungen der Blasen- oder Mastdarmfunktion kam es nicht.

2.2.3 Motorfunktionstests (Basso Maus Skala und Rotarod)

Die von Basso et al. entwickelte BMS (Basso et al. 2006) ist eine sensitive und zuverlässige Bewertungsskala zur Beurteilung der Wiederherstellung motorischer Funktionen bei Mäusen nach SCI. Die Mäuse wurden dazu in eine Kiste (Größe 45 x 45 cm, Randhöhe 45 cm, liniierter Boden) gesetzt, in der sie sich frei bewegen konnten. In einem Bewertungszeitraum von vier Minuten wurden die Bewegung der hinteren Fußgelenke, das plantare Aufsetzen der Hinterpfoten, das Laufen, die Koordination, die Positionierung der Hinterpfoten beim Laufen, die Instabilität des Rumpfes und die Haltung des Schwanzes erfasst und mit einem Zahlenwert zwischen 0 und 9 bewertet. Dabei entsprach ein Wert von 9 einer normalen Lokomotion, ein Wert von 0 dagegen einer kompletten Lähmung der Hinterbeine. Rechte und linke Körperseite wurden getrennt voneinander bewertet, als Gesamtergebnis wurde der Mittelwert beider Einzelwerte gebildet.

Zur Untersuchung der motorischen Koordination und Erschöpfung nach SCI kam ein auf Dunham et al. zurückgehendes Rotarod zum Einsatz (Dunham & Miya 1957; Jones & Roberts 1968). Dieses besteht aus einer in fünf Segmente unterteilten Laufstange, die über einen Motor angetrieben wird. Die Tiere wurden auf die Laufstange gesetzt und zunächst bei niedriger Umdrehungsgeschwindigkeit (acht Umdrehungen pro Minute) habituiert. Bei stetig zunehmender Geschwindigkeit wurde dann die Latenz bis zum Herunterfallen der Tiere von der rotierenden Laufstange gemessen wobei durch Auslösung eines Kontaktes ein automatisches Stoppen der Uhr erfolgte. Die maximale Testdauer betrug drei Minuten, so dass das Ergebnis einen Zahlenwert zwischen 0 und 180 Sekunden darstellt.

Die Bewertung der Lokomotion nach der BMS begann am zweiten, der Test auf dem Rotarod am fünften bzw. sechsten Tag nach Läsion. Beide Untersuchungen erfolgten täglich bzw. jeden zweiten Tag, zur gleichen Uhrzeit und in gleicher Reihenfolge.

2.2.4 Perfusion und Kryofixierung von Gehirn und Rückenmark

In tiefer peritonealer Ketaminnarkose wurden die Mäuse an Tag 14 nach der jeweiligen Operation in Rückenlage fixiert, das vordere Mediastinum wurde eröffnet und das Herz freigelegt.

Nach Inzision wurde eine an eine Perfusionspumpe angeschlossene Kanüle in die linke Herzkammer vorgeschoben und fixiert. Eine weitere Inzision im rechten Vorhof diente dazu die Perfusionsflüssigkeit aus dem großen Kreislauf abzuleiten. Bei Tieren nach ECL wurde zuerst mit ca. 50 ml Natriumchloridlösung, bei Tieren nach SCI mit ca. 50 ml Ringerlaktatlösung perfundiert, anschließend mit ca. 50 ml 4%iger Paraformaldehydlösung zur Fixierung des Gewebes. Nach Beendigung der Perfusion erfolgte die Freipräparation und Entnahme der Gehirne bzw. Rückenmarke. Die Gehirne verblieben für ca. vier Stunden in Paraformaldehydlösung und wurden anschließend über Nacht bei 4°C in Saccharosepuffer gelagert. Die Rückenmarke verblieben über Nacht bei 4°C in Paraformaldehydlösung und danach für drei Tage in Saccharosepuffer.

Zur Kryofixierung wurden die Organe in auf Trockeneis gelagertes 2-Methylbutan gegeben und hier bis zur Beendigung des Einfriervorganges belassen. Die Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte bei -80°C.

Am Kryostaten wurden 9 µm dicke Horizontalschnitte der Gehirne und 25 µm dicke Längsschnitte der Rückenmarke angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Gefrierschnitte wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.5 Mikrowellenbehandlung der Kryoschnitte zur Antigendemaskierung

Zur Antigendemaskierung und Sensitivitätssteigerung gegenüber dem Erstantikörper wurde vor der Iba1- und zum Teil auch der GFAP-Färbung der Gehirnschnitte eine Mikrowellenbehandlung durchgeführt. Dazu wurden die für zwei Stunden bei RT getrockneten Schnitte in Citratpuffer in der Mikrowelle bei 600 Watt für zwei mal vier Minuten erhitzt und zum Abkühlen im Puffer belassen. Im Anschluss erfolgte die immunhistochemische Färbung wie nachfolgend beschrieben.

2.2.6 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemische Darstellung der Zellproteine GFAP, Iba1, CD3 und CD4 erfolgte nach dem Trocknen der Kryoschnitte für zwei Stunden bei RT und einer evtl. vorausgehenden Mikrowellenbehandlung. Nach einmaligem Waschen für zehn Minuten in PB wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen durch Inkubation in PB unter Zusatz von 10% Ziegennormalserum für 60 Minuten bei RT blockiert, anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Erstantikörper in den unter 3.1.3 genannten Verdünnungen unter Zusatz von 1% Ziegennormalserum und 5% Triton X-100 über Nacht bei 4°C. Nach drei zehnmütigen

Waschschritten in PB wurden die Gewebeschnitte für 45 bis 60 Minuten bei RT mit einem gegen den jeweiligen Erstantikörper gerichteten Zweitantikörper aus der Ziege inkubiert. Zur Darstellung der Zellkerne erfolgte nach drei weiteren zehnminütigen Waschschritten die Inkubation mit Höchst-Färbelösung in einer Verdünnung von 1:20000 für zwei Minuten. Nach drei fünfminütigen Waschschritten in PB wurden die Schnitte mit Immu-Mount eingedeckelt und bis zur Fotodokumentation unter Lichtabschluss bei 4 °C gelagert.

Im Gegensatz zu den Gehirnschnitten wurden an den Rückenmarkschnitten Doppelfärbungen von Iba1 und GFAP sowie Iba1 und CD4 durchgeführt, da hier insgesamt wesentlich weniger Schnitte zur Verfügung standen. Die Inkubation mit den Erstantikörpern erfolgte dabei gleichzeitig, die Inkubation mit den Zweitantikörpern nacheinander mit drei dazwischen liegenden, jeweils zehnminütigen Waschschritten in PB.

2.2.7 Immunfluoreszenzmikroskopie und Auswertung der Färbungen

Gehirnschnitte:

Die Auswertung der Iba1- und GFAP-gefärbten Gehirnschnitte erfolgte als Intensitäts-messung anhand am Fluorencenzmikroskop angefertigter Bilder des ipsi- und kontralateralen EC in 200-facher Vergrößerung bei gleicher Belichtungszeit. Mit Hilfe des Programms Metamorph Offline wurde dann in einem definierten, die Läsion einschließenden Bereich sowie einem entsprechenden Bereich im kontralateralen EC die fluoreszierende Fläche oberhalb einer bestimmten Lichtintensität als % über dem Schwellenwert gemessen.

Die Auszählung der CD3- und CD4-positiven Zellen erfolgte am Fluorencenzmikroskop unter Durchlicht bei 200- bzw. 400-facher Vergrößerung. Hierbei wurden in einem definierten, das Läsionsareal einschließenden Bereich und in einem entsprechenden Bereich im kontra-lateralen EC alle Zellen mit positiver membranständiger Fluorencenzfärbung und sichtbarer Anfärbung der Zellkerne als positiv gewertet.

Rückenmarkschnitte:

Die Auswertung der Iba1- und GFAP-Expression im Rückenmark erfolgte ebenfalls mit Hilfe des Fluorencenzmikroskops anhand von Bildern der Läsionsstelle in 100-facher Vergrößerung. Mit Hilfe des Computer-Programms ImageJ wurde anhand eines Gitternetzes (siehe Abbildung 2.1) die Intensität der Färbungen in jeweils 100 µm breiten, 800 µm hohen Arealen im Bereich vom 600 µm cranial bis 600 µm caudal des Läsionszentrums gemessen. Sie wird in AU

angegeben. In den gleichen Bereichen erfolgte die Auszählung der CD4-positiven Zellen nach den für die Gehirnschnitte beschriebenen Kriterien.

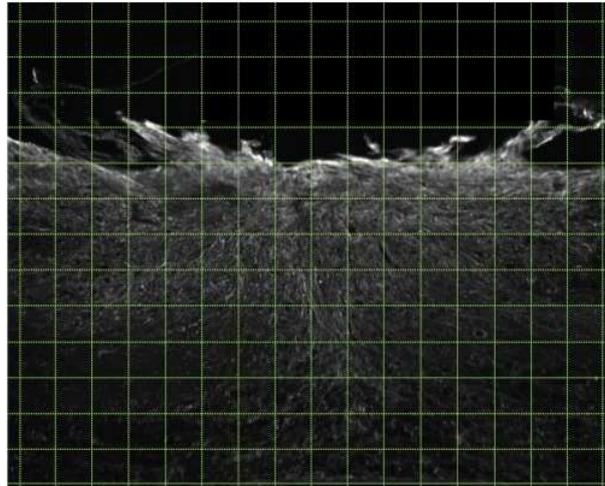


Abbildung 2.1: Gitternetz mit einer Gitterbreite von 100 μm zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen der Rückenmarke nach SCI.

2.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde anhand der Computer-Software PASW Statistics 18.0 durchgeführt. Dazu wurden aus den jeweiligen Datensätzen zunächst Mittelwerte gebildet sowie die Standardabweichungen und Standardfehler der Mittelwerte berechnet. Als Tests zum Vergleich unabhängiger Stichproben kam bei den Immunfluoreszenzfärbungen der U-Test nach Mann und Whitney zum Einsatz, bei den repetitiven Untersuchungen BMS und Rotarod die zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung (ANOVA) mit Anpassung des Konfidenzintervalls nach Bonferroni. Die Nullhypothese ist die Annahme, dass zwischen den Medianen zweier Stichproben kein Unterschied besteht, das Signifikanzniveau wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ festgelegt.

Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte, die Fehlerbalken der Diagramme entsprechen den Standardfehlern.

3 Ergebnisse

3.1 Entorhinale Cortexläsion

3.1.1 Auswertung immunhistochemischer Färbungen

Die reaktive Astroglieose nach ECL wurde anhand der Immunreaktivität für das Intermediärfilament GFAP bestimmt, welches bei Aktivierung der Astrozyten hochreguliert wird. CPA^{Y356L,E378A}-Mäuse weisen im Vergleich mit WT-Mäusen 14 Tage nach ECL eine Steigerung der GFAP-Expression um das 1,5-fache im Bereich der Läsion auf. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant, es zeigt sich aber ein statistischer Trend (p=0,093).

Aktivierte Mikrogliazellen/Makrophagen wurden anhand der Immunreaktivität für Iba1 bestimmt. Dieses spezifisch von Mikrogliazellen und Makrophagen exprimierte Protein wird während ihrer Aktivierung hochreguliert. Im Vergleich mit WT-Mäusen findet sich bei den CPA^{Y356L,E378A}-Mäusen 14 Tage nach ECL eine signifikante Reduktion der Iba1-Expression um das 1,8-fache im Bereich der Läsion (p=0,013).

14 Tage nach ECL sieht man bei CPA^{Y356L,E378A}-Mäusen eine nicht signifikant gesteigerte Invasion von CD3⁺ T-Lymphozyten um das 2,3-fache im Vergleich mit WT-Mäusen und in umgekehrter Weise eine um das 2-fache reduzierte Infiltration von CD4⁺ T-Lymphozyten (ebenfalls nicht signifikant).

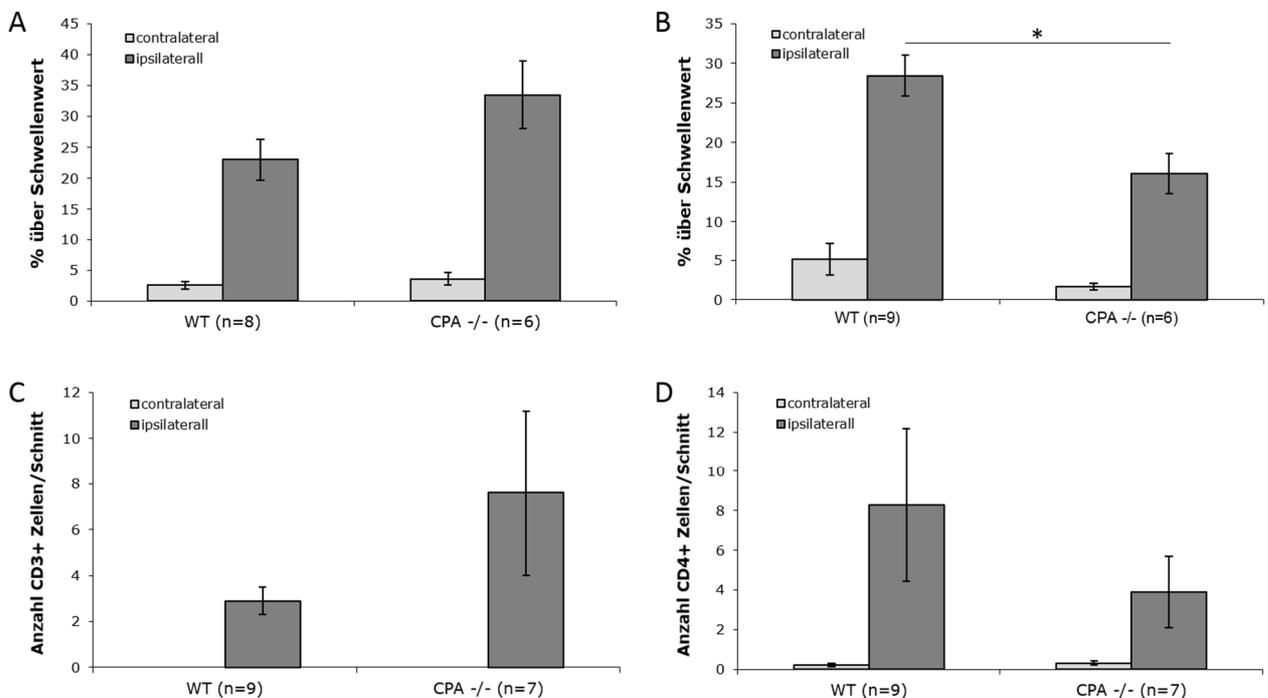


Abbildung 3.1: Balkendiagramme der Expression von GFAP (A) und Iba1 (B) sowie der Anzahl CD3⁺ (C) und CD4⁺ T-Lymphozyten (D) ipsi- und contralateral 14 Tage nach ECL in WT- und CPA^{Y356L,E378A}-Mäusen. * p < 0,05.

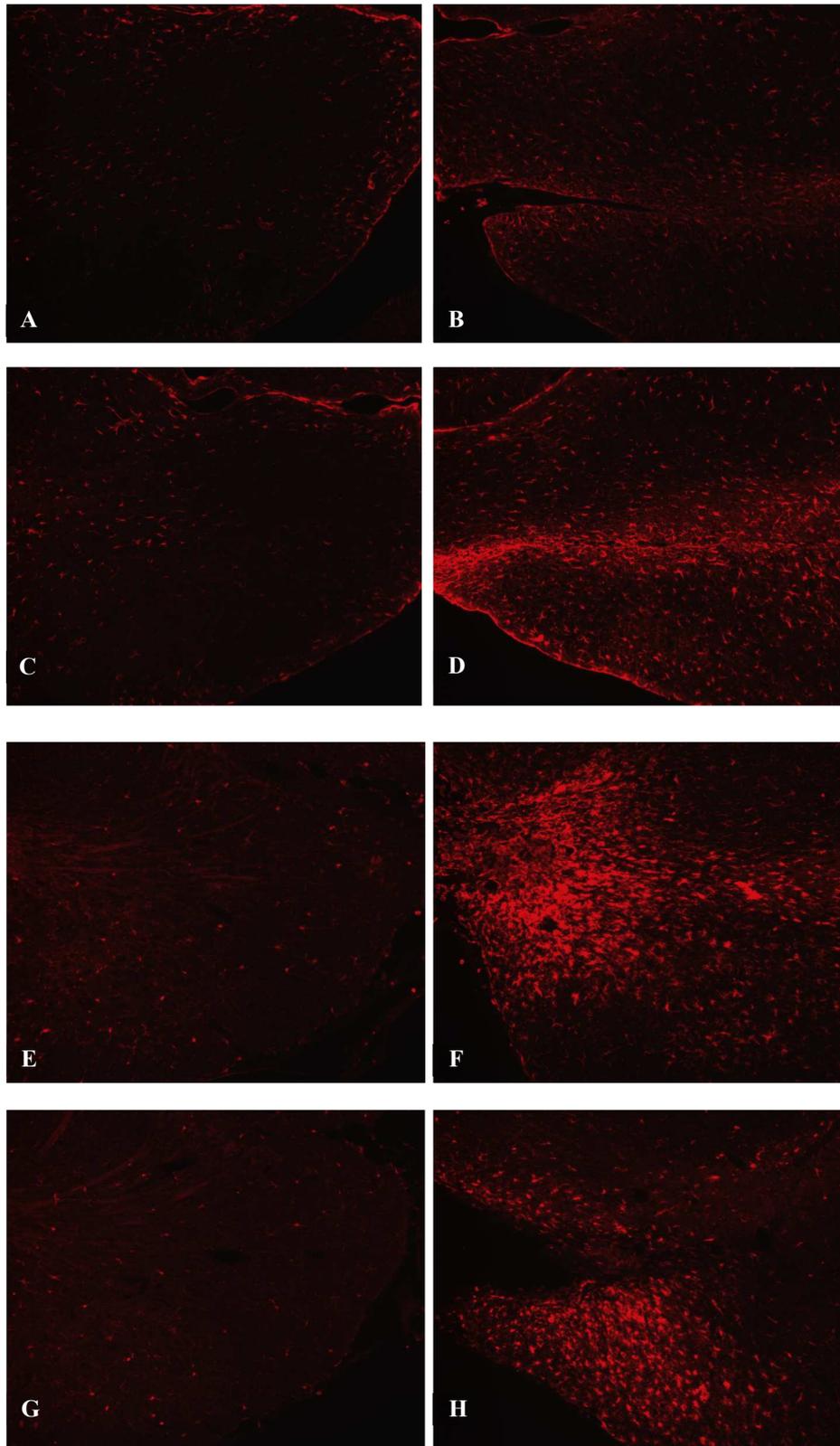


Abbildung 3.2: Repräsentative Bilder der anti-GFAP- (A bis D) und anti-Iba1-gefärbten Gehirnschnitte (E bis H), 200-fache Vergrößerung, dargestellt sind jeweils die Läsionsstelle sowie ein entsprechender Bereich des contralateralen EC. WT contra- (A) und ipsilateral (B), CPA^{Y356L,E378A} contra- (C) und ipsilateral (D); WT contra- (E) und ipsilateral (F), CPA^{Y356L,E378A} contra- (G) und ipsilateral (H).

3.2 Rückenmarksläsion

3.2.1 Auswertung der Motorfunktionstests

3.2.1.1 Basso Maus Skala

Die Beurteilung der Motorfunktion nach der BMS ergab einen signifikanten Unterschied von mehr als einem Bewertungspunkt zwischen +/+ und W/W^v-Mäusen ab Tag vier nach Läsion ($p < 0,05$). Auch der Vergleich der WT- und mMCP-4^{-/-}-Mäuse zeigt einen signifikanten Unterschied von über einem halben Bewertungspunkt ab Tag sechs nach Läsion ($p < 0,05$). Im Gegensatz dazu zeigt sich zwischen WT- und CPA^{Y356L,E378A}-Mäusen kein signifikanter Unterschied, die Kurven beider Gruppen haben einen nahezu identischen Verlauf.

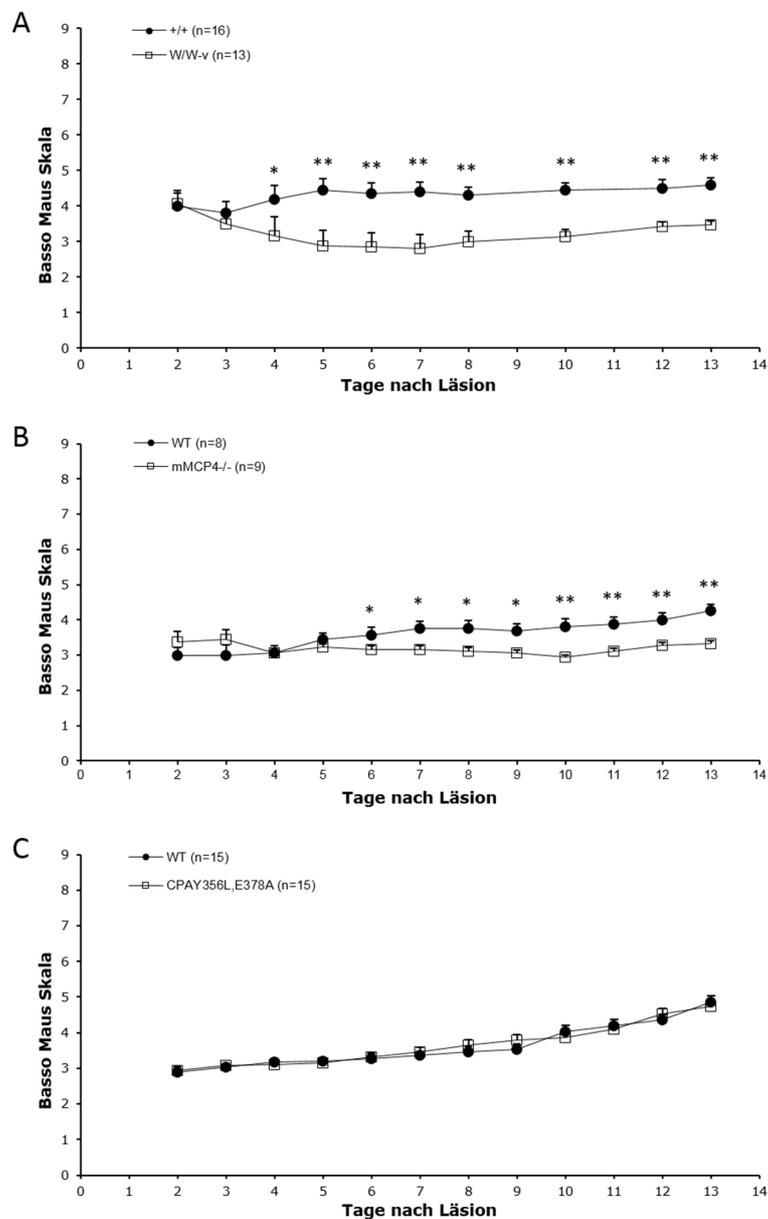


Abbildung 3.3: Basso Maus Skala Tag zwei bis 13 nach SCI. +/+ und W/W^v (A), WT und mMCP-4^{-/-} (B), WT und CPA^{Y356L,E378A} (C). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.2.1.2 Rotarod

Zwischen +/+ und W/W^v-Mäusen zeigt sich auch in der Untersuchung auf dem Rotarod ein signifikanter Unterschied von mehr als 20 Sekunden zwischen beiden Gruppen ab Tag sechs nach Läsion ($p < 0,05$). Die Unterschiede zwischen WT- und mMCP-4^{-/-} sowie WT- und CPA^{Y356L,E378A}-Mäusen sind dagegen nicht signifikant.

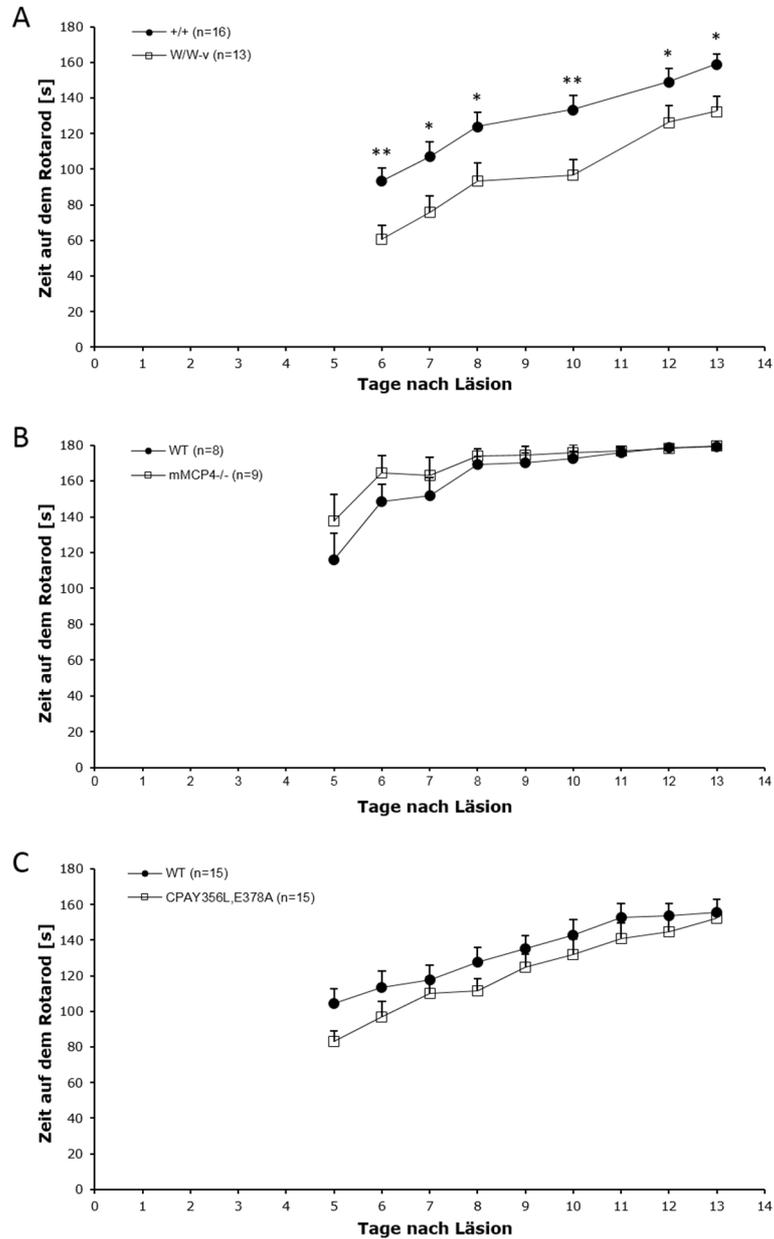


Abbildung 3.4: Rotarod Tag fünf bzw. sechs bis 13 nach SCI. +/+ und W/W^v (A), WT und mMCP-4^{-/-} (B), WT und CPA^{Y356L,E378A} (C). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.2.2 Auswertung immunhistochemischer Färbungen

3.2.2.1 Vergleich der GFAP-Expression 14 Tage nach SCI

Die immunhistochemische Auswertung der reaktiven Astroglieose anhand der Immunreaktivität für GFAP zeigt bei W/W^v-Mäusen im Vergleich mit +/+ -Mäusen 14 Tage nach SCI im Bereich von 100 µm cranial und caudal des Läsionszentrums eine signifikante Steigerung, für die Bereiche 200 µm cranial und caudal des Läsionszentrums zeigt sich ein statistischer Trend (p < 0,1). In den übrigen Gruppen sind im untersuchten Rückenmarkssegment von 600 µm cranial bis 600 µm caudal des Läsionszentrums keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

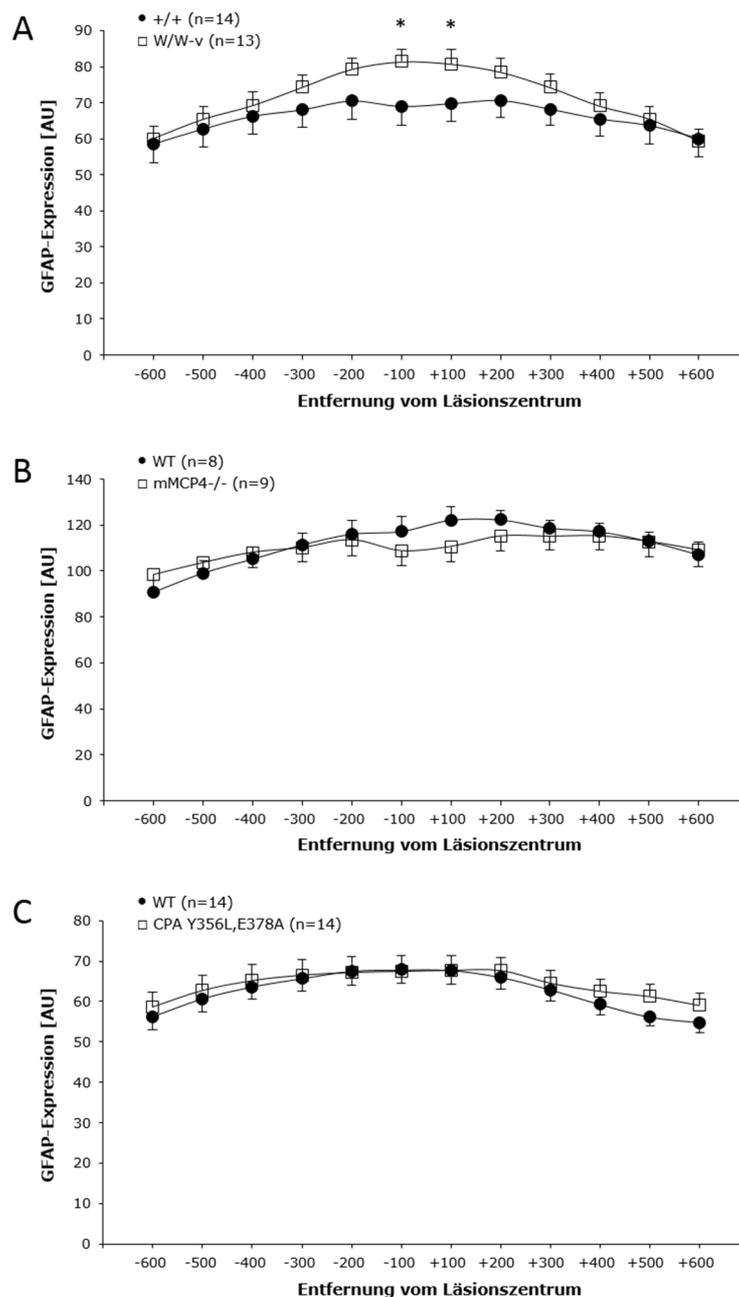


Abbildung 3.5: Liniendiagramme der GFAP-Expression 14 Tage nach SCI. +/+ - und W/W^v-Mäuse (A), WT- und mMCP4^{-/-}-Mäuse (B), WT- und CPA^{Y356L,E378A}-Mäuse (C). * p<0,05.

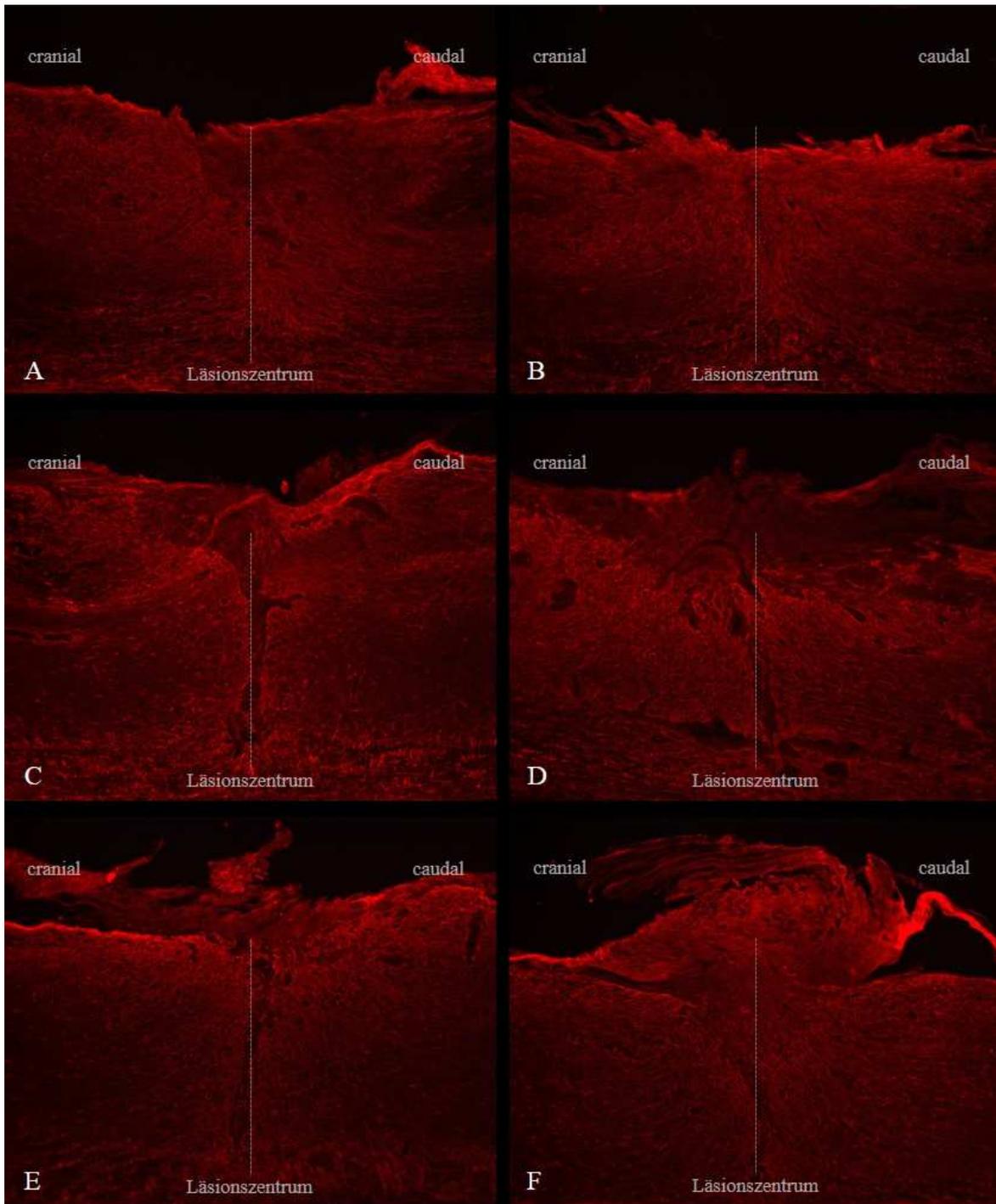


Abbildung 3.6: Repräsentative Bilder der anti-GFAP-gefärbten Rückenmarkschnitte. +/+ (A) und W/W^v-Mäuse (B), WT- (C) und mMCP-4^{-/-}-Mäuse (D), WT- (E) und CPA^{Y356L,E378A}-Mäuse (F).

3.2.2.2 Vergleich der Iba1-Expression 14 Tage nach SCI

Mastzelldefiziente W/W^v -Mäuse weisen im Vergleich mit mastzellkompetenten $+/+$ -Mäusen 14 Tage nach SCI im Bereich von 600 μm cranial bis 600 μm caudal des Läsionszentrums gemessen anhand der Iba1-Expression eine gewisse Steigerung der Anzahl reaktiver Mikrogliazellen/Makrophagen auf, diese ist jedoch nicht signifikant.

Bezüglich der Iba1-Expression zeigen $mMCP4^{-/-}$ und $CPA^{Y356L,E378A}$ -Mäuse im untersuchten Segment keinerlei Unterschiede zu den korrespondierenden WT-Tieren.

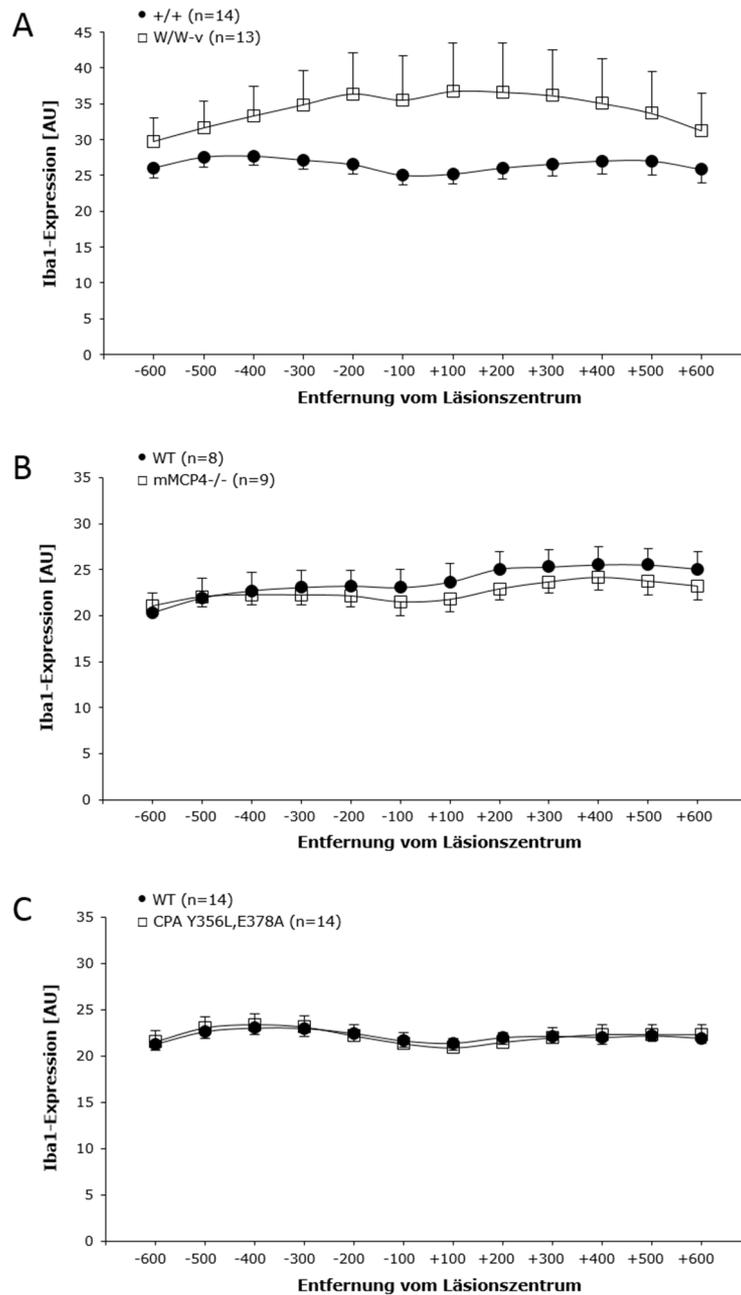


Abbildung 3.7: Liniendiagramme der Iba1-Expression 14 Tage nach SCI. $+/+$ - und W/W^v -Mäuse (A), WT- und $mMCP4^{-/-}$ -Mäuse (B), WT- und $CPA^{Y356L,E378A}$ -Mäuse (C).

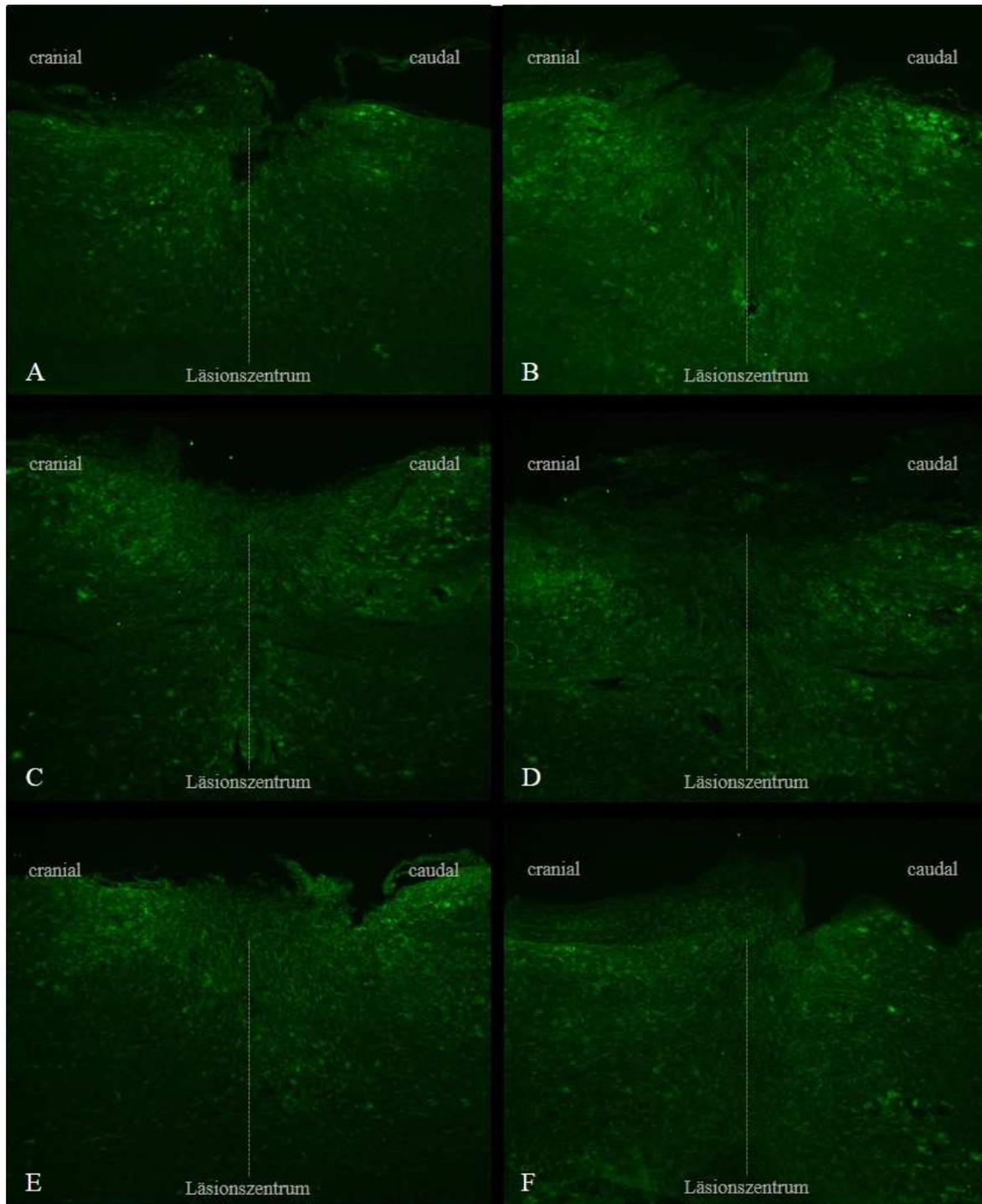


Abbildung 3.8: Repräsentative Bilder der anti-Iba1-gefärbten Rückenmarkschnitte. +/+ (A) und W/W^v-Mäuse (B), WT- (C) und mMCP-4^{-/-}-Mäuse (D), WT- (E) und CPA^{Y356L,E378A}-Mäuse (F).

3.2.2.3 Vergleich der Anzahl CD4⁺ T-Lymphozyten 14 Tage nach SCI

Auch die immunhistochemische Auswertung der CD4⁺ T-Lymphozyten zeigt bei mastzelldefizienten W/W^{-v}-Mäusen im Vergleich mit mastzellkompetenten +/+ -Mäusen sowie auch zwischen mMCP4^{-/-} bzw. CPA^{Y356L,E378A}-Mäusen und den korrespondierenden WT-Tieren 14 Tage nach SCI gewisse Unterschiede, diese erreichen jedoch nicht das statistische Signifikanzniveau.

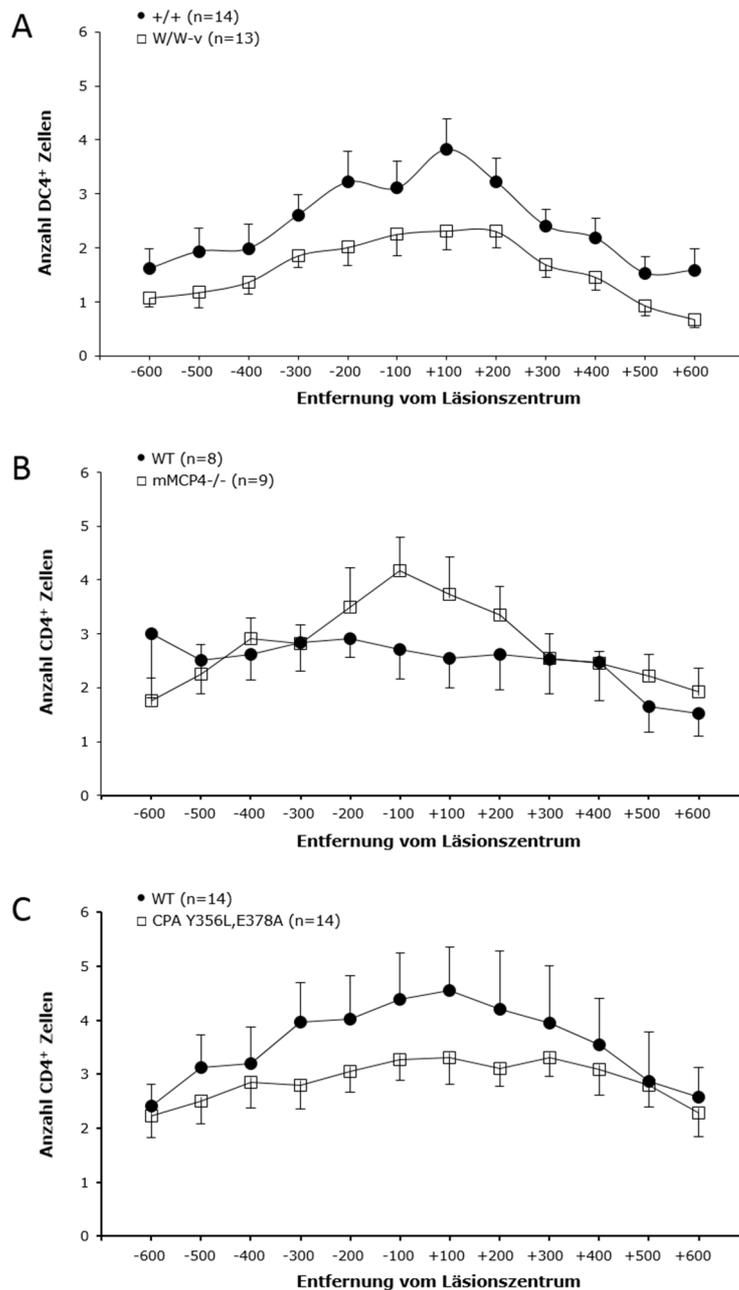


Abbildung 3.9: Liniendiagramme der Anzahl CD4⁺ T-Lymphozyten 14 Tage nach SCI. +/+- und W/W^{-v}-Mäuse (A), WT- und mMCP4^{-/-}-Mäuse (B), WT- und CPA^{Y356L,E378A}-Mäuse (C).



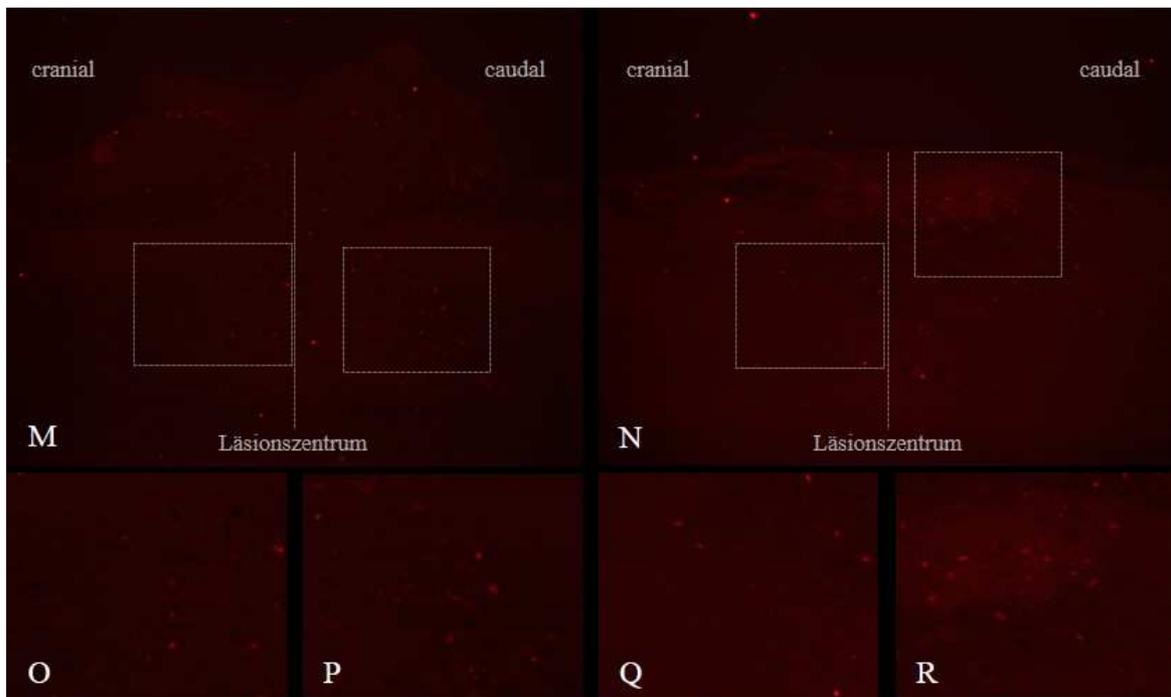


Abbildung 3.10: Repräsentative Bilder der anti-CD4-gefärbten Rückenmarkschnitte. +/- (A) und W/W^v-Mäuse (B), vergrößerte Ausschnitte +/- cranial (C) und caudal (D), W/W^v cranial (E) und caudal (F); WT- (G) und mMCP-4^{-/-}-Mäuse (H), vergrößerte Ausschnitte WT cranial (I) und caudal (J), mMCP-4^{-/-} cranial (K) und caudal (L); WT- (M) und CPA^{Y356L,E378A}-Mäuse (N), vergrößerte Ausschnitte WT cranial (O) und caudal (P), CPA^{Y356L,E378A} cranial (Q) und caudal (R).

4 Diskussion

Im Gegensatz zum peripheren Nervensystem, bei dem die Fähigkeit zur erfolgreichen Regeneration das Resultat einer genau aufeinander abgestimmten Folge pathophysiologischer Prozesse ist, zu denen die Wallersche Degeneration, der phagozytische Abbau von Axon- und Myelinbestandteilen, die Proliferation von Schwann-Zellen, das Auswachsen von Axonen entlang einer glialen Leitschiene und schließlich die Remyelinisierung der Axone durch Schwann-Zellen gehören, ist die funktionelle Wiederherstellung untergegangener Axonverbindungen im ZNS selten. Die initiale Wallersche Degeneration zieht hier eine Kaskade nachteiliger Veränderungen nach sich, die zum neuronalen Zelltod führen kann. Schädigungen des ZNS, z.B. durch Traumata, ziehen daher in der Regel in einem gewissen Umfang bleibende Schäden nach sich.

Die Frage welche Funktionen Mastzellen und die von ihnen freigesetzten Proteasen bei diesen Vorgängen innehaben, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Wir konnten anhand eines Mausmodells zeigen, dass Mastzellen und im Speziellen die Mastzellprotease mMCP-4, jedoch nicht CPA, für die Wiedererlangung motorischer Fähigkeiten nach SCI notwendig sind, auf die histologisch sichtbare Entzündungsreaktion scheinen die von uns untersuchten Mastzellproteasen in diesem Kontext jedoch nur bedingt Einfluss zu nehmen. Eine in Vorarbeiten am Modell der ECL nachgewiesene protektive Wirkung der Mastzellprotease mMCP4 im Sinne einer verminderten inflammatorischen Reaktion konnte hier für die Mastzellprotease CPA nicht gezeigt werden. Bezüglich der Mechanismen der Mastzellwirkung in diesem Zusammenhang bleiben somit weiterhin offene Fragen.

4.1 Kein Einfluss von Carboxypeptidase A auf das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion nach ECL

Die vielgestaltigen Interaktionen zwischen Mastzellen und unterschiedlichen Zellpopulationen des ZNS wurden im Abschnitt 1.1.6 ausführlich dargelegt. Diese umfangreichen Wechselbeziehungen deuten auf eine Rolle der Mastzellen als Bindeglied zwischen Immun- und Nervensystem hin.

Im Gegensatz zu einer lange angenommenen rein nachteiligen Rolle von Mastzellen in pathologischen Prozessen des ZNS, wie sie z.B. in autoimmunen oder ischämischen Erkrankungen deutlich wird, gibt es erste Hinweise darauf, dass Mastzellen die nach mechanischen Traumata des ZNS ablaufenden inflammatorischen Prozesse kontrollieren und begrenzen können. Ergebnisse aus Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass diese

Effekte zumindest teilweise durch die Wirkung von Mastzellproteasen vermittelt sind. Am Modell der ECL konnte in WT-Mäusen nach intraläsionaler Injektion des Chymase-Inhibitors Chymostatin sowie des CPA-Inhibitors CPI jeweils eine signifikante Steigerung der Entzündung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Beobachtungen an mastzelldefizienten Tieren, bei denen es im Vergleich mit WT-Tieren nach ECL zu einer signifikant gesteigerten Entzündung kommt, und machen damit eine Rolle von Mastzellen bzw. den Mastzell-Chymase und CPA in der Eindämmung der Inflammation wahrscheinlich.

In der vorliegenden Arbeit sollten diese Beobachtungen durch ECL-Versuche an Mäusen mit selektiver Defizienz für funktionsfähige CPA, eine der wichtigsten Mastzellproteasen, weiter untermauert werden, wobei hier entsprechend der Arbeitshypothese ein ähnliches Resultat wie in mastzelldefizienten W/W^v -Mäusen bzw. wie nach Injektion des entsprechenden Proteaseinhibitors vermutet wurde.

Überraschenderweise zeigen $CPA^{Y356L,E378A}$ -Mäuse nach ECL jedoch keine gesteigerte Inflammation, sondern im Gegenteil sogar eine niedrigere Immunreaktivität für Iba1, einen Marker für aktivierte Mikrogliazellen, die wichtigsten Effektorzellen des Immunsystems im ZNS. Dies ist besonders vor dem Hintergrund der signifikant gesteigerten reaktiven Astroglieose nach Injektion von CPI in WT-Mäusen interessant, welche die Reaktion nach Chymostatin-Injektion noch deutlich übersteigt. CPI hemmt diverse Metallo-carboxypeptidasen und zudem TGF- α . Daher ist denkbar, dass der beobachtete Effekt nicht (allein) auf die Hemmung der MC-CPA zurückzuführen ist. Ferner muss erwogen werden, dass allein die intrazerebrale Injektion eines Proteaseinhibitors eine nicht unerhebliche, gegenüber der Injektion des Vektors signifikant gesteigerte Entzündungsreaktion hervorruft, wie sie bei der ECL in mastzellproteasedefizienten Mäusen in diesem Ausmaß nicht gemessen werden kann. Und grundsätzlich ist auch zu diskutieren, dass es zusätzlich zur Mastzell- bzw. Mastzellproteasedefizienz weitere genetische Unterschiede zwischen W/W^v - und $CPA^{Y356L,E378A}$ -Mäusen gibt, da die W/W^v -Mäuse im Gegensatz zu den $CPA^{Y356L,E378A}$ -Mäusen keinen reinen C57BL/6J-Hintergrundstamm haben.

4.2 Verminderte Leistung in Motorfunktionstests bei mastzell- und mMCP-4-defizienten Mäusen nach SCI

Im Jahr 2006 entwickelten Basso et al. mit der BMS eine neue Bewertungsskala zur Erfassung und Beurteilung der motorischen Funktion von Mäusen nach SCI. Hierzu wurden die plantare Schrittfolge, Koordination, Pfotenhaltung sowie Rumpf- und Schwanzhaltung untersucht und

unabhängig vom Mausstamm 7 Merkmale des Bewegungsablaufs gesunder Mäuse identifiziert und implementiert (Basso et al. 2006). Mit der BMS steht ein Ersatz für die bis dahin genutzte, für Mäuse aber unzuverlässige Basso-Beattie-Bresnahan-Skala für Ratten zur Verfügung. Basso et al. untersuchten den Verlauf der Lokomotion nach einer Kompressionsverletzung des Rückenmarkes in unterschiedlichen Mausstämmen, unter anderem in C57BL/6J-Mäusen, die wie bereits erwähnt auch der Hintergrundstamm von mMCP4^{-/-}- und CPA^{Y356L,E378A}-Mäusen sind, und aber in den Experimenten dieser Arbeit als Kontrolltiere zu diesen Verwendung fanden. Es wurde dabei eine kontinuierliche Verbesserung von durchschnittlich etwa 0,5 Bewertungspunkten an Tag 1 hin zu etwa 4,7 Bewertungspunkten an Tag 14 nach Läsion beobachtet. Dies entspricht in etwa den von uns bei diesem Mausstamm erhobenen Daten im BMS-Test, mit der Ausnahme, dass bei Basso et al. zu Beginn niedrigere Werte erzielt werden. Während die Mäuse in unseren Experimenten mit einem Anfangswert von etwa 3 Bewertungspunkten an Tag 2 nach Läsion beginnen, wird dieses Ergebnis bei Basso et al. erst nach Tag 5 erreicht. Es wurden jedoch unterschiedliche Läsionsmodelle angewandt, eine Kompressionsverletzung bei Basso et al. und eine Hemisektion in der vorliegenden Arbeit. Da sich gezeigt hat, dass die Ergebnisse des BMS-Tests mit der Schwere der Läsion korrelieren, sprechen die Daten für eine weniger schwere Läsion in unseren Versuchen.

Als Hilfsmittel für die Messung von Balance, Koordination, physischer Kondition und Bewegungsplanung von Mäusen steht mit dem Rotarod eine rotierende Drehstab-Apperatur zur Verfügung, auf der die Tiere sich zu halten versuchen (Dunham & Miya 1957). Ausgehend von unserer Arbeitshypothese erwarteten wir in mastzelldefizienten sowie in mMCP4^{-/-}- und CPA^{Y356L,E378A}-Mäusen signifikant niedrigere Werte im BMS- und Rotarod-Test verglichen mit den jeweiligen Kontrolltieren.

In der Tat zeigen in unseren Experimenten mastzelldefiziente W/W^v-Mäuse nach SCI im Vergleich mit mastzellkompetenten +/+ -Mäusen gemessen anhand von BMS und Rotarod eine signifikant schlechtere motorische Funktion und Koordination. Der Unterschied von über einem Bewertungspunkt auf der BMS ab Tag 4 nach Läsion ist dabei auch im Kontext der zuvor beschriebenen physiologischen Lokomotion der Maus als signifikant zu werten, da ein Zahlenwert von 4 Punkten eine motorische Funktion mit normaler plantarer Schrittabfolge widerspiegelt, während 3 Punkte lediglich dem plantaren Platzieren der Pfote oder Schritten mit Aufsetzen der dorsalen Pfoten entsprechen. In unserem Experiment erreichten +/+ -Mäuse ab Tag 4 nach Läsion durchschnittlich 4,4 und W/W^v-Mäuse durchschnittlich 3,2 Punkte auf der BMS. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen aus ECL-Versuchen, in denen W/W^v-Mäuse 14 Tage nach Läsion eine signifikant gesteigerte Entzündungsreaktion zeigen. Eine

gesteigerte reaktive Astroglie, welche ein mechanisches wie auch chemisches Hindernis für auswachsende Axone darstellt, ist auch in der histologischen Untersuchung der Rückenmarke nach SCI nachweisbar und könnte zur Erklärung des schlechteren Abschneidens dieser Mäuse in den Motorfunktionstests beitragen. Im Abschnitt 4.3 soll darauf genauer eingegangen werden.

Auch zwischen mMCP-4^{-/-}- und WT-Mäusen zeigt sich bei der Beurteilung der motorischen Funktion mittels BMS ein signifikanter Unterschied, jedoch findet sich dieses Ergebnis in den immunhistologisch untersuchten Parametern nur bedingt wieder (siehe Abschnitt 4.3). Der Unterschied zwischen den mMCP4^{-/-}-Mäusen mit durchschnittlich 3,2 Punkten ab Tag 6 nach Läsion und den WT-Mäusen mit durchschnittlich 3,9 Punkten fällt dabei etwas geringer aus, ist aber dennoch signifikant. Bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes erreichten immerhin 6 von 8 WT-Tieren ein Ergebnis von durchschnittlich 4 oder mehr Punkten, während dies bei keiner der mMCP4^{-/-}-Mäuse der Fall war. Im Rotarod-Test ist ein solcher Unterschied nicht zu beobachten; ab Tag 8 nach Läsion ist der Kurvenverlauf beider Gruppen nahezu identisch. Somit scheint die Wiedererlangung der Koordination der mMCP4^{-/-}-Mäuse unabhängig von der eingeschränkten Lokomotion nicht beeinträchtigt zu sein.

CPA^{Y356L,E378A}- und WT-Mäuse weisen nach SCI sowohl im BMS- als auch im Rotarod-Test keine signifikanten Unterschiede auf. Dieses Ergebnis steht weitgehend im Einklang mit den Ergebnissen der immunhistologischen Untersuchungen der Rückenmarke wie auch der Gehirne nach ECL. Ein begünstigender Einfluss der Mastzell-Carboxypeptidase A auf die Regeneration der motorischen Funktion und Koordination nach traumatischer Schädigung des Rückenmarks konnte damit nicht nachgewiesen werden. Mastzellen und im Besonderen die Mastzellchymase mMCP-4 scheinen aber eine derartige Wirkung innezuhaben. Sowohl Mastzelldefizienz als auch mMCP-4-Defizienz haben eine signifikante Einschränkung der Wiedererlangung motorischer Funktionen nach SCI zur Folge. Da diese Einschränkung sich in W/W^v-Mäusen (geringgradig) ausgeprägter darstellt, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass mMCP-4 in diesem Kontext zu einem wesentlichen Anteil, jedoch nicht ausschließlich für diese Wirkung der Mastzellen verantwortlich ist. Auch in einer neueren SCI-Studie der Arbeitsgruppe, in der mastzelldefiziente W^{sh}/W^{sh}-Mäuse mit mastzellkompetenten Mäusen verglichen wurden, konnte bei den W^{sh}/W^{sh}-Mäusen eine signifikant reduzierte Leistung in der BMS beobachtet werden (Nelissen et al. 2014). Auf die Koordination nach SCI wirkt mMCP-4 dagegen nicht in gleichem Maße ein wie auf die Lokomotion. Hier wird die Mastzellwirkung möglicherweise durch andere Mastzellmediatoren vermittelt. Um die genauen Mechanismen dieser Effekte zu

analysieren wurde die Entzündungsreaktion nach SCI immunhistologisch untersucht. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.3 Regulatorische Rolle von Mastzellen auf die inflammatorische Reaktion im Rückenmark *post läsionem*

Die nach einer Verletzung des Rückenmarks ablaufenden neuropathologischen Vorgänge in der Maus zeigen zum Teil grundlegende Unterschiede zu anderen bisher untersuchten Spezies; während es unter anderem bei Ratten - wie auch beim Menschen - zur progressiven Nekrose und Ausbildung flüssigkeitsgefüllter Hohlräume kommt, wird die Läsionsstelle im Rückenmark der Maus stattdessen durch dichtes Bindegewebe mit Nestern von Makrophagen ausgefüllt und die anfangs bestehenden, jedoch wesentlich kleineren zystischen Hohlräume schwinden im postläsionalen Verlauf. Auch die Ausdehnung der Läsion nimmt, vermutlich durch Kontraktion der Bindegewebsfasern, ab dem 7. postläsionalen Tag kontinuierlich ab, wobei sich das proximale und distale Ende der Läsionsstelle einander annähern (Fujiki et al. 1996; Zhang et al. 1996; Inman et al. 2002). Es zeigt sich hier also ein der Wundheilung nicht neuronalen Gewebes wie z.B. der Haut recht ähnlicher Prozess. Aufgrund der Unterschiede zu anderen Spezies stellt sich die äußerst interessante Fragestellung, in wie weit die im murinen Rückenmark entstehende Bindegewebsnarbe ein zelluläres und molekulares Milieu darstellt, welches das Auswachsen geschädigter Axone eher begünstigt, als die für andere Spezies typischen flüssigkeitsgefüllten zystischen Hohlräume.

Inman et al. konnten zudem feststellen, dass die gegenüber Kainat-induziertem exzitotoxischem Zelltod resistenten Mausstämme C57BL/6 und Balb/c acht Wochen nach Quetschung des Rückenmarkes in ihrer Ausdehnung signifikant kleinere Läsionen sowie geringere Kavitationen und sekundäre Degeneration aufweisen als Kainat-empfindliche Stämme (Inman et al. 2002), was die Vermutung bekräftigt, dass die Sensitivität für exzitotoxischen Zelltod eine wichtige Rolle in der Pathogenese der sekundären Degeneration und damit in der Ausbildung der histopathologischen Unterschiede zwischen Mäusen und anderen Spezies spielt.

Da die Wundheilung nach SCI in der Maus mit der Ausbildung einer Bindegewebsmatrix verbunden ist, die Immunzellen wie Makrophagen enthält, scheint hier die Regulation der Entzündungsreaktion wie auch bei Heilungsvorgängen in nicht neuronalen Geweben von entscheidender Bedeutung zu sein. Ebenso scheinen die Unterschiede in der Neuropathologie der SCI von Maus und Ratte das Resultat unterschiedlicher inflammatorischer Prozesse zu sein

(Sroga et al. 2003). Wir haben daher in unseren Versuchen die inflammatorische Reaktion 14 Tage nach Läsion immunhistochemisch untersucht.

In der astrozytären Reaktion nach SCI spiegeln sich die in den Motorfunktionstest zwischen +/+ und mastzelldefizienten W/W^v-Mäusen beobachteten Unterschiede zum Teil wider; im Bereich von 100 µm cranial bis 100 µm caudal des Läsionszentrums zeigt sich als Marker für eine reaktive Astroglie bei W/W^v-Mäusen eine signifikant gesteigerte GFAP-Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren. Für die hieran angrenzenden Bereiche 200 µm cranial und 200 µm caudal des Läsionszentrums ist zumindest ein statistischer Trend nachweisbar, weiter peripher zeigt die GFAP-Expression jedoch keine wesentlichen Unterschiede. Die Aktivierung und Proliferation von Astrozyten nach einer traumatischen Schädigung des ZNS führt zur Ausbildung einer glialen Narbe, welche das Ausprossen von Axonen und damit die Reinnervation hemmt. Das schlechtere Abschneiden der mastzelldefizienten Mäuse in den motorischen Test kann damit gut erklärt werden. Interessant und überraschend sind jedoch die Ergebnisse der weiteren histologischen Analysen; in der Iba1-Expression und der T-Zellinfiltration der Rückenmarke von +/+ und W/W^v-Mäusen zeigen sich zwar gewisse Unterschiede, diese sind jedoch nicht signifikant. Dies mag zum Teil bedingt sein durch die relativ große Streuung der Einzelwerte insbesondere innerhalb der Gruppe der W/W^v-Mäuse. In anderen Modellen zentralnervöser Schädigung konnte eine Förderung der Neuroregeneration und Remyelinisierung durch von aktivierter Mikroglia freigesetzte Wachstumsfaktoren, Prostaglandinen und antiinflammatorischen Zytokinen gezeigt werden, zudem fördert die phagozytische Aktivität der Mikroglia/Makrophagen die Abräumung geschädigter Neurone und Myelinreste zugunsten auswachsender gesunder Axone (Raeji et al. 2016). Auch das Fehlen einer gesteigerten Iba1-Expression als Marker für aktivierte Mikroglia/Makrophagen könnte damit zur Erklärung der verminderten motorischen Leistung der mastzelldefizienten Mäuse nach SCI beitragen. In mastzelldefizienten W^{sh}/W^{sh}-Mäusen zeigte sich drei Wochen nach SCI ebenfalls eine signifikant geringere Leistung auf der BMS einhergehend mit einer signifikant gesteigerten Astroglie, auch hier war jedoch kein signifikanter Unterschied in der Iba1-Expression nachweisbar (Nelissen et al. 2014).

Die in den mMCP4^{-/-}-Mäusen nach SCI ebenfalls anhand der BMS zu beobachtende verminderte motorische Leistung geht nicht mit einer in gleichem Maße gesteigerten Entzündungsreaktion im Gewebe einher; hier lassen sich zwischen beiden Gruppen in der GFAP- und Iba1-Expression sowie der T-Zell-Infiltration keine wesentlichen Unterschiede erkennen. Eine neuere Arbeit der Arbeitsgruppe konnte zudem nachweisen, dass die entzündungseindämmende Wirkung der Mastzellen nach SCI teilweise auch auf die Funktion

der mMCP-6 zurückzuführen ist (Vanganswinkel et al. 2014). Auch Mäuse mit einer spezifischen Defizienz für die Mastzellprotease 6 zeigen nach SCI eine signifikant reduzierte Leistung in der BMS, was durch Effekte von mMCP-6 auf die Narbenbildung und die Größe der Läsion vermittelt ist. Ebenso konnte hier gezeigt werden, dass bestimmte proinflammatorische Cytokine, die von mMCP-4 degradiert werden, kein Substrat der mMCP-6 sind. Dies deutet auf unterschiedliche Wirkungsmechanismen der beiden Mastzellproteasen hin.

In den dieser Arbeit vorausgegangenen ECL-Versuchen war eine signifikant gesteigerte GFAP- und Iba1-Expression in W/W^{-v}- und mMCP4^{-/-}-Mäusen nachweisbar. Dies kann dadurch bedingt sein, dass sich der zeitliche Verlauf der inflammatorischen Reaktion nach SCI von dem nach ECL dahingehend unterscheidet, dass 14 Tage nach SCI die gesteigerte Inflammation im Rückenmark weitestgehend wieder abgeklungen ist, während sie im Gehirn noch länger andauert. Die unterschiedlichen Verläufe der inflammatorischen Reaktion nach Schädigung des Gehirns und des Rückenmarkes wurden in den Abschnitten 1.2.3.1 und 1.2.3.2 eingehend beschrieben. In diesem Kontext wären immunhistochemische Untersuchungen an früheren Zeitpunkten sinnvoll, unter anderem an Tag 6 nach Läsion, da hier die Werte der beiden Gruppen erstmals signifikant voneinander abweichen. Damit könnten eventuell früher im Verlauf der Entzündungsreaktion vorhandene Unterschiede erfasst werden.

Die T-Zellinfiltration ist mit durchschnittlich 29,3 Zellen im analysierten Bereich bei den +/- Mäusen bzw. 19,2 Zellen bei den W/W^{-v}-Mäusen recht gering und entspricht damit den Beobachtungen anderer Autoren, nach deren Beobachtungen das Einwandern einer signifikanten Anzahl von T-Zellen bis Tag 14 nach einer Schädigung des Rückenmarks nicht zu verzeichnen ist (Sroga et al. 2003).

In Einklang mit den nach ECL beobachteten Ergebnissen findet sich auch in den SCI-Versuchen kein Hinweis darauf, dass die Mastzell-Carboxypeptidas A einen Einfluss auf das Ausmaß der entzündlichen Reaktion oder das Wiedererlangen motorischer Fähigkeiten nach einer traumatischen ZNS-Läsion hat. In der histologischen Untersuchung der Rückenmarke zeigen sich hier wie auch in den funktionalen Tests keine Unterschiede zwischen CPA^{Y356L,E378A}-Mäusen und Kontrolltieren. Somit ergeben sich auch im Kontext der traumatischen Rückenmarksläsion keine wesentlichen Hinweise auf eine die entzündliche Reaktion oder das funktionelle *Outcome* positiv beeinflussende Wirkung der MC-CPA.

Ein Versuch zu beweisen, dass die zwischen W/W^{-v}- und +/- Mäusen zu beobachtenden Unterschiede auf die Mastzelldefizienz der W/W^{-v}-Mäuse zurückzuführen sind, ist der Vergleich

mit mastzelldefizienten Tieren, welche mit BMMC rekonstituiert wurden. Liegt den Unterschieden ein reiner Mastzelleffekt zugrunde, verhalten sich W/W^v -Mäuse nach Rekonstitution mit $+/+$ BMMC wie mastzellkompetente $+/+$ -Mäuse. Aus der Literatur ist bekannt, dass die injizierten Mastzellen dabei nicht alle Gewebe gleich schnell besiedeln: Darm, Lunge und Milz sind bereits nach sieben Wochen repopularisiert (Brown et al. 2002); eine erfolgreiche Rekonstitution des Gehirns ist dagegen in einer publizierten Arbeit erst sieben Monate nach Injektion der Mastzellen beschrieben (Johnson et al. 1991), in einer anderen Arbeit zeigte sich dagegen in Lymphknoten, Herz, Gehirn und Rückenmark bei Verwendung grün fluoreszierender Mastzellen auch sieben Monate nach erfolgter Injektion keine Repopulation (Tanzola et al. 2003). Zudem stimmt, wie bereits zuvor erwähnt, die Population der Mastzellen nach Rekonstitution in Anzahl und Morphologie nicht immer vollständig mit jener der entsprechenden WT-Tiere überein. Unsere Versuche zu belegen, dass es sich bei der in den Vorversuchen in W/W^v -Mäusen gezeigten signifikant gesteigerten Entzündungsreaktion nach ECL tatsächlich um einen reinen Mastzelleffekt handelt, scheiterten an der hohen Mortalität der $W/W^v + +/+$ BMMC- und auch der W/W^v -Mäuse von 50 bzw. 60%, zum einen während des 7-monatigen Intervalls zwischen der intravenösen Injektion der Mastzellen und der ECL, insbesondere aber auch nach der durchgeführten Operation, was als Hinweis auf eine nicht erfolgreiche bzw. nicht ausreichende Rekonstitution gedeutet werden kann (siehe Abbildung 4.1). Eine noch ausgeprägtere Mortalität von 83% zeigten mit $mMCP4^{-/-}$ BMMC rekonstituierte W/W^v -Mäuse. In der histologischen Untersuchung FITC-Avidin-gefärbter Gehirn- und Milzschnitte von mit $+/+$ BMMC rekonstituierten W/W^v -Mäusen konnten wir Mastzellen im Milzgewebe nachweisen, nicht jedoch im Gehirn (hier nicht gezeigte Daten). Somit ist wahrscheinlich, dass die aufgezeigten Unterschiede in der inflammatorischen Reaktion von W/W^v - im Vergleich mit $+/+$ -Mäusen auf das Fehlen von Mastzellen zurückzuführen sind; letztendlich kann ein Einfluss der übrigen genetischen Besonderheiten dieser Mäuse aber nicht ausgeschlossen werden.

Zudem muss bedacht werden, dass möglicherweise nicht alle in mastzelldefizienten W/W^v und W^{sh}/W^{sh} -Mäusen zu beobachtenden Phänomene auf das fehlende Vorhandensein von Mastzellen zurückzuführen sind, da es auch mastzellunabhängige kit-Effekte zu geben scheint (Feyerabend et al. 2011). Hier bieten sich die eingangs schon erwähnten Cre-Mäuse als Untersuchungsmodelle an, die jedoch bislang nicht kommerziell erwerblich sind.

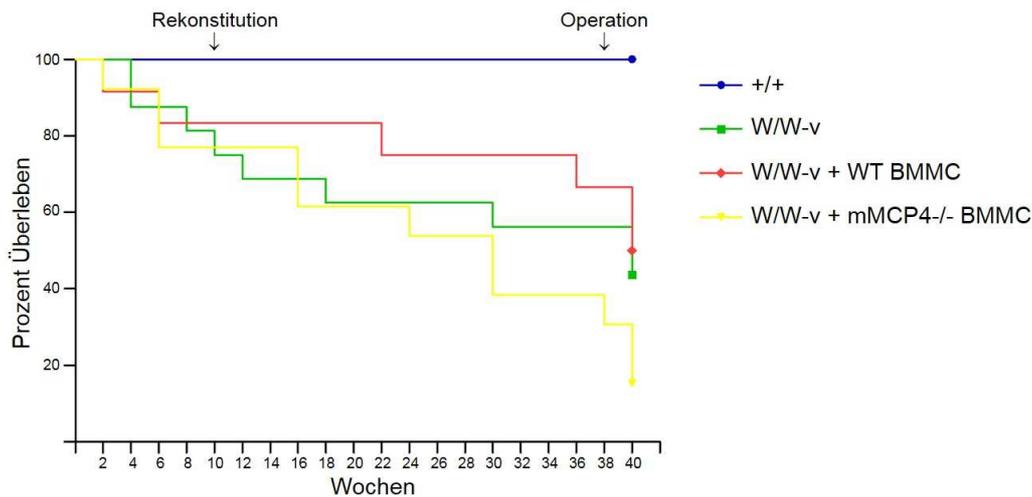


Abbildung 4.1: Überlebensrate i.v.-rekonstituierter mastzelldefizienter Mäuse im Vergleich mit +/+ und W/W^v-Mäusen. Veranschaulicht sind der Zeitpunkt der Rekonstitution im Alter von zehn Wochen sowie der Zeitpunkt der ECL sieben Monate später. Gegenüber mastzellkompetenten +/+ -Mäusen zeigen sowohl mastzelldefiziente W/W^v-Mäuse ($p = 0,002$; Log Rank Test) als auch mit Wildtyp-Mastzellen rekonstituierte W/W^v + WT BMMC- ($p = 0,011$) und mit Mastzellprotease 4-defizienten Mastzellen rekonstituierte W/W^v + mMCP4^{-/-} BMMC-Mäuse ($p < 0,001$) eine signifikant gesteigerte Mortalität.

4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte an *in vivo* Mausmodellen eine wichtige funktionelle Rolle von Mastzellen und insbesondere der Mastzell-Chymase mMCP4 bei der Wiedererlangung der motorischen Funktion nach traumatischer Rückenmarksläsion nachgewiesen werden, die zum Teil auf eine Eindämmung der entzündlichen Reaktion im Gewebe zurückgeführt werden kann. Im Kontext der traumatischen Hirnverletzung wurde ein solcher Effekt für Mastzellen und mMCP4 bereits in Vorarbeiten aufgezeigt; für eine weitere der wichtigsten Mastzellproteasen, die Carboxypeptidase A, ließ sich eine vergleichbare Funktion jedoch in beiden Läsionsmodellen nicht belegen.

Bezüglich der genauen Wirkungsmechanismen können keine abschließenden Aussagen getroffen werden. Um dieser Frage weiter nachzugehen sollten an zusätzlichen, insbesondere früheren Zeitpunkten nach Läsion histologische Untersuchungen erfolgen, um möglicherweise bestehende und an Tag 14 *post läsionem* nicht mehr detektierbare Unterschiede in den Versuchsgruppen aufzeigen zu können. Insbesondere die funktionellen Tests der motorischen Funktion und Koordination nach SCI lassen solche Unterschiede ab etwa Tag 4 bis 6 nach Läsion vermuten. Auch hieraus könnten sich ferner Ansatzpunkte ergeben für weiterführende Analysen auf RNA- und Proteinebene, mittels derer sich pro- oder antiinflammatorische Vorgänge nachweisen ließen, die sich nicht in der histologisch fassbaren Entzündungsreaktion im Gewebe widerspiegeln. In einer neueren Studie der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass mMCP4

Interleukin 6, Interleukin 13 und *monocyte chemoattractant protein 1* spaltet und dadurch womöglich eine protektive Rolle bei der Neuroinflammation hat (Nelissen et al. 2014), im verletzten Gewebe ließen sich hier erhöhte Level dieser Zytokine und Chemokine nachweisen.

Neben einigen zuvor erwähnten neueren Mausmodellen, die eventuell geeigneter sind um Mastzelleffekte zu untersuchen, da sie ausser der Mastzelldefizienz keine weiteren Alterationen aufweisen, könnten auch Mäuse mit selektiver Defizienz für eine der weiteren, hier nicht berücksichtigten Mastzellproteasen zur Aufklärung der Mastzellfunktion beitragen. Für die Mastzell-Tryptase mMCP6 zeigte eine im letzten Jahr veröffentlichte Studie unserer Arbeitsgruppe z.B. eine wesentliche Rolle bei der Wiedererlangung motorischer Fähigkeiten nach SCI auf, die durch einen die Narbenbildung verringernden Abbau von Fibronectin und Kollagen IV bedingt scheint.

Diese Ansätze versprechen weitere Erkenntnisse bezüglich der zellulären und molekularen Vorgänge nach traumatischen Läsionen des ZNS und insbesondere der Mitwirkung von Mastzellen bzw. ihren Proteasen und können damit möglicherweise bei der Entwicklung neuer Therapien von Gehirn- und Rückenmarksverletzungen helfen.

Literaturverzeichnis

- Abe M, Kurosawa M, Ishikawa O, Miyachi Y, Kido H. Mast cell tryptase stimulates both human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 1998, 28(12), 1509-1517.
- Akahoshi M, Song CH, Piliponsky AM, Metz M, Guzzetta A, Abrink M, Schlenner SM, Feyerabend TB, Rodewald HR, Pejler G, Tsai M, Galli SJ. Mast cell chymase reduces the toxicity of Gila monster venom, scorpion venom, and vasoactive intestinal polypeptide in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 2011 Oct;121(10):4180-91.
- Akers IA, Parsons M, Hill MR, Hollenberg MD, Sanjar S, Laurent GJ, McAnulty RJ. Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2000, 278(1), L193-201.
- Algermissen B, Hermes B, Feldmann-Boeddeker I, Bauer F, Henz BM. Mast cell chymase and tryptase during tissue turnover: analysis on in vitro mitogenesis of fibroblasts and keratinocytes and alterations in cutaneous scars. *Experimental Dermatology*, 1999, 8(3), 193-198.
- Armbrust T, Batusic D, Ringe B, Ramadori G. Mast cells distribution in human liver disease and experimental rat liver fibrosis. Indications for mast cell participation in development of liver fibrosis. *Journal of Hepatology*, , 1997 26(5), 1042-1054.
- Asarian L, Yousefzadeh E, Silverman AJ, Silver R. Stimuli from conspecifics influence brain mast cell population in male rats. *Hormones and Behavior*, 2002, 42(1), 1-12.
- Austen KF. The Paul Kallós Memorial Lecture. From slow-reacting substance of anaphylaxis to leukotriene C4 synthase. *International Archives of Allergy and Immunology*, 1995, 107(1-3), 19-24.
- Banati RB. Brain plasticity and microglia: is transsynaptic glial activation in the thalamus after limb denervation linked to cortical plasticity and central sensitisation? *Journal of Physiology, Paris*, 2002, 96(3-4), 289-299.
- Banovac K, Banovac F, Yang J, Koren E. Interaction of osteoblasts with extracellular matrix: effect of mast cell chymase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1993, 203(2), 221-235.
- Baram D, Vaday GG, Salamon P, Drucker I, Hershkoviz R, Mekori YA. Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF-alpha. *Journal*

of Immunology, 2001, 167(7), 4008-4016.

Barrios VE, Middleton SC, Kashem MA, Havill AM, Toombs CF, Wright CD. Tryptase mediates hyperresponsiveness in isolated guinea pig bronchi. *Life Science*, 1998s, 63(26), 2295-2303.

Bart J, Groen HJ, Hendrikse NH, van der Graaf WT, Vaalburg W, de Vries EG. The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation. *Cancer Treatment Reviews*, 2000, 26(6), 449-462.

Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *Journal of Neurotrauma*, 2006, 23(5), 635-659.

Batchelor PE, Tan S, Wills TE, Porritt MJ, Howells DW. Comparison of inflammation in the brain and spinal cord following mechanical injury. *Journal of Neurotrauma*, 2008, 25(10), 1217-1225.

Bechmann I & Nitsch R. Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia*, 1997, 20(2), 145-154.

Bennett JL, Blanchet MR, Zhao L, Zbytniuk L, Antignano F, Gold M, Kubes P, McNagny KM. Bone marrow-derived mast cells accumulate in the central nervous system during inflammation but are dispensable for experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis. *Journal of Immunology*, 2009, 182(9), 5507-5514.

Berger P, Compton SJ, Molimard M, Walls AF, N'Guyen C, Marthan R, Tunon-De-Lara JM. Mast cell tryptase as a mediator of hyperresponsiveness in human isolated bronchi. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 1999, 29(6), 804-812.

Blair RJ, Meng H, Marchese MJ, Ren S, Schwartz LB, Tonnesen MG, Gruber BL. Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. *The Journal of Clinical Investigation*, 1997, 99(11), 2691-2700.

Bochner BS & Lichtenstein LM. Anaphylaxis. *The New England Journal of Medicine*, 1991, 324(25), 1785-1790.

Boje KM & Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Research*, 1992, 587(2), 250-256.

- Brenner T, Soffer D, Shalit M, Levi-Schaffer F. Mast cells in experimental allergic encephalomyelitis: characterization, distribution in the CNS and in vitro activation by myelin basic protein and neuropeptides. *Journal of the Neurological Sciences*, 1994, 122(2), 210-213.
- Brown JK, Jones CA, Rooney LA, Caughey GH, Hall IP. Tryptase's potent mitogenic effects in human airway smooth muscle cells are via nonproteolytic actions. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2002, 282(2), L197-206.
- Brown MA, Tanzola MB & Robbie-Ryan M. Mechanisms underlying mast cell influence on EAE disease course. *Molecular Immunology*, 2002, 38(16-18), 1373-1378.
- Bugajski AJ, Chłap Z, Gadek-Michalska, Bugajski J. Effect of isolation stress on brain mast cells and brain histamine levels in rats. *Agents and Actions*, 1994, 41 Spec No, C75-76.
- Cabalka LM, Hyman BT, Goodlett CR, Ritchie TC, Van Hoesen GW. Alteration in the pattern of nerve terminal protein immunoreactivity in the perforant pathway in Alzheimer's disease and in rats after entorhinal lesions. *Neurobiology of Aging*, 1992, 13(2), 283-291.
- Calhoun WJ, Jarjour NN, Gleich GJ, Stevens CA, Busse WW. Increased airway inflammation with segmental versus aerosol antigen challenge. *The American Review of Respiratory Disease*, 1993, 147(6 Pt 1), 1465-1471.
- Caughey GH, Leidig F, Viro NF, Nadel JA. Substance P and vasoactive intestinal peptide degradation by mast cell tryptase and chymase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1988, 244(1), 133-137.
- Caughey GH, Raymond WW & Wolters PJ. Angiotensin II generation by mast cell alpha- and beta-chymases. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2000, 1480(1-2), 245-257.
- Caughey GH, Zerweck EH & Vanderslice P. Structure, chromosomal assignment, and deduced amino acid sequence of a human gene for mast cell chymase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(20), 12956-12963.
- Christy AL & Brown MA. The multitasking mast cell: positive and negative roles in the progression of autoimmunity. *Journal of Immunology*, 2007, 179(5), 2673-2679.
- Chu W, Johnson DA & Musich PR. Molecular cloning and characterization of mouse mast cell chymases. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1992, 1121(1-2), 83-87.

- Cindik ED, Maurer M, Hannan MK, Müller R, Hayes WC, Hovy L, Kurth AA. Phenotypical characterization of c-kit receptor deficient mouse femora using non-destructive high-resolution imaging techniques and biomechanical testing. *Technology and Health Care: Official Journal of the European Society for Engineering and Medicine*, 2000, 8(5), 267-275.
- Cirulli F, Pistillo L, de Acetis L, Alleva E, Aloe L. Increased number of mast cells in the central nervous system of adult male mice following chronic subordination stress. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1998, 12(2), 123-133.
- Clark JM, Abraham WM, Fishman CE, Forteza R, Ahmed A, Cortes A, Warne RL, Moore WR, Tanaka RD. Tryptase inhibitors block allergen-induced airway and inflammatory responses in allergic sheep. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1995, 152(6 Pt 1), 2076-2083.
- Corrigan F, Mander KA, Leonard AV, Vink R. Neurogenic inflammation after traumatic brain injury and its potentiation of classical inflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 2016, 13(1):264.
- Cotman CW, Geddes JW & Kahle JS. Axon sprouting in the rodent and Alzheimer's disease brain: a reactivation of developmental mechanisms? *Progress in Brain Research*, 1990, 83, 427-434.
- Craig SS, DeBlois G & Schwartz LB. Mast cells in human keloid, small intestine, and lung by an immunoperoxidase technique using a murine monoclonal antibody against tryptase. *The American Journal of Pathology*, 1986y, 124(3), 427-435.
- Cserr HF & Knopf PM. Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunology Today*, 1992, 13(12), 507-512.
- De Monchy JG, Kauffman HF, Venge P, Koëter GH, Jansen HM, Sluiter HJ, De Vries K. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *The American Review of Respiratory Disease*, 1985, 131(3), 373-376.
- Deller T & Frotscher M. Lesion-induced plasticity of central neurons: sprouting of single fibres in the rat hippocampus after unilateral entorhinal cortex lesion. *Progress in Neurobiology*, 1997, 53(6), 687-727.
- Diemel LT, Copelman CA & Cuzner ML. Macrophages in CNS remyelination: friend or foe? *Neurochemical Research*, 1998h, 23(3), 341-347.
- Dong H, Zhang X, Wang Y, Zhou X, Qian Y, Zhang S. Suppression of brain mast cells degranulation

- inhibits microglial activation and central nervous system inflammation. *Molecular Neurobiology*, 2016, [Epub ahead of print].
- Dong H, Zhang X & Qian Y. Mast cells and neuroinflammation. *Medical Science Monitor Basic Research*, 2014, 20, 200-206.
- Douaiher J, Succar J, Lancerotto L, Gurish MF, Orgill DP, Hamilton MJ, Krilis SA, Stevens RL. Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing. *Advances in Immunology*, 2014, 122, 211-252.
- Dragonetti A, Baldassarre M, Castino R, Démoz M, Luini A, Buccione R, Isidoro C. The lysosomal protease cathepsin D is efficiently sorted to and secreted from regulated secretory compartments in the rat basophilic/mast cell line RBL. *Journal of Cell Science* 2000, 113 (Pt 18), 3289-3298.
- Du T, Friend DS, Austen KF, Katz HR. Tissue-dependent differences in the asynchronous appearance of mast cells in normal mice and in congenic mast cell-deficient mice after infusion of normal bone marrow cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 1996, 103(2), 316-321.
- Dunham NW & Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association*, 1957, 46(3), 208-209.
- Echtenacher B, Männel DN & Hültner L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature*, 1996, 381(6577), 75-77.
- Ehrlich P. Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. *Doktorarbeit Universität Leipzig*, 1878.
- Ehrlich P. Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 1877, 13, 263-278.
- Ehrlich P. Beiträge zur Kenntniss der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocythen. *Archiv für Anatomie und Physiologie: Physiologische Abteilung*, 1879, 3, 166-169.
- Elieh-Ali-Komi D, Cao Y. Role of Mast Cells in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 2016 [Epub ahead of print].

- Elmqvist JK, Breder CD, Sherin JE, Scammell TE, Hickey WF, Dewitt D, Saper CB. Intravenous lipopolysaccharide induces cyclooxygenase 2-like immunoreactivity in rat brain perivascular microglia and meningeal macrophages. *The Journal of Comparative Neurology*, 1997, 381(2), 119-129.
- Enerbäck L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 2. Dye-binding and metachromatic properties. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica*, 1966, 66(3), 303-312.
- Enerbäck L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica*, 1966, 66(3), 289-302.
- Eskes C, Honegger P, Juillerat-Jeanneret L, Monnet-Tschudi F. Microglial reaction induced by noncytotoxic methylmercury treatment leads to neuroprotection via interactions with astrocytes and IL-6 release. *Glia*, 2002, 37(1), 43-52.
- Fabry Z, Topham DJ, Fee D, Herlein J, Carlino JA, Hart MN, Sriram S. TGF-beta 2 decreases migration of lymphocytes in vitro and homing of cells into the central nervous system in vivo. *Journal of Immunology*, 1995, 155(1), 325-332.
- Fagan AM & Gage FH. Cholinergic sprouting in the hippocampus: a proposed role for IL-1. *Experimental Neurology*, 1990, 110(1), 105-120.
- Fagan AM & Gage FH. Mechanisms of sprouting in the adult central nervous system: cellular responses in areas of terminal degeneration and reinnervation in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 1994, 58(4), 705-725.
- Feyerabend TB, Hausser H, Tietz A, Blum C, Hellman L, Straus AH, Takahashi HK, Morgan ES, Dvorak AM, Fehling HJ, Rodewald HR. Loss of histochemical identity in mast cells lacking carboxypeptidase A. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(14), 6199-6210.
- Feyerabend TB, Weiser A, Tietz A, Stassen M, Harris N, Kopf M, Radermacher P, Möller P, Benoist C, Mathis D, Fehling HJ, Rodewald HR. Cre-mediated cell ablation contests mast cell contribution in models of antibody- and T cell-mediated autoimmunity. *Immunity*, 2011, 35(5), 832-44.
- Forsberg E, Pejler G, Ringvall M, Lunderius C, Tomasini-Johansson B, Kusche-Gullberg M, Eriksson I, Ledin J, Hellman L, Kjellén L. Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature*, 1999, 400(6746), 773-776.
- Frandji P, Oskéritzian C, Cacaraci F, Lapeyre J, Peronet R, David B, Guillet JG, Mécheri S. Antigen-

- dependent stimulation by bone marrow-derived mast cells of MHC class II-restricted T cell hybridoma. *Journal of Immunology*, 1993, 151(11), 6318-6328.
- Frotscher M, Heimrich B & Deller T. Sprouting in the hippocampus is layer-specific. *Trends in Neurosciences*, 1997, 20(5), 218-223.
- Fujiki M, Zhang Z, Guth L, Steward O. Genetic influences on cellular reactions to spinal cord injury: activation of macrophages/microglia and astrocytes is delayed in mice carrying a mutation (WldS) that causes delayed Wallerian degeneration. *The Journal of Comparative Neurology*, 1996, 371(3), 469-484.
- Gall C, Rose G & Lynch G. Proliferative and migratory activity of glial cells in the partially deafferented hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 1979, 183(3), 539-549.
- Galli SJ. New concepts about the mast cell. *The New England Journal of Medicine*, 1993, 328(4), 257-265.
- Galli SJ & Hammel I. Mast cell and basophil development. *Current Opinion in Hematology*, 1994, 1(1), 33-39.
- Galli SJ, Tsai M, Gordon JR, Geissler EN, Wershil BK. Analyzing mast cell development and function using mice carrying mutations at W/c-kit or Sl/MGF (SCF) loci. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1992, 664, 69-88.
- Galli SJ, Tsai M, Wershil BK, Tam SY, Costa JJ. Regulation of mouse and human mast cell development, survival and function by stem cell factor, the ligand for the c-kit receptor. *International Archives of Allergy and Immunology*, 1995, 107(1-3), 51-53.
- Galli SJ & Wershil BK. The two faces of the mast cell. *Nature*, 1996, 381(6577), 21-22.
- Galli SJ, Zsebo KM & Geissler EN. The kit ligand, stem cell factor. *Advances in Immunology*, 1994, 55, 1-96.
- Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annual Review of Immunology*, 2005, 23, 749-786.
- Galli SJ, Tsai M, Marichal T, Tchougounova E, Reber LL, Pejler G. Approaches for analyzing the roles of mast cells and their proteases in vivo. *Advances in Immunology*, 2015, 126, 45-127.

- Geddes JW, Monaghan DT, Cotman CW, Lott IT, Kim RC, Chui HC. Plasticity of hippocampal circuitry in Alzheimer's disease. *Science*, 1985, 230(4730), 1179-1181.
- Gehrmann J, Schoen SW & Kreutzberg GW. Lesion of the rat entorhinal cortex leads to a rapid microglial reaction in the dentate gyrus. A light and electron microscopical study. *Acta Neuropathologica*, 1991, 82(6), 442-455.
- Goldstein SM, Kaempfer CE, Kealey JT, Wintroub BU. Human mast cell carboxypeptidase. Purification and characterization. *The Journal of Clinical Investigation*, 1989, 83(5), 1630-1636.
- Gordon JR, Burd PR & Galli SJ. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunology Today*, 1990, 11(12), 458-464.
- Grimbaldeston MA, Chen CC, Piliponsky AM, Tsai M, Tam SY, Galli SJ. Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *American Journal of Pathology*, 2005, 167(3), 835-48.
- Gruber BL, Kew RR, Jelaska A, Marchese MJ, Garlick J, Ren S, Schwartz LB, Korn JH. Human mast cells activate fibroblasts: tryptase is a fibrogenic factor stimulating collagen messenger ribonucleic acid synthesis and fibroblast chemotaxis. *Journal of Immunology*, 1997, 158(5), 2310-2317.
- Grzanna R & Shultz LD. The contribution of mast cells to the histamine content of the central nervous system: a regional analysis. *Life Sciences*, 1982, 30(23), 1959-1964.
- Guo CB, Liu MC, Galli SJ, Bochner BS, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Identification of IgE-bearing cells in the late-phase response to antigen in the lung as basophils. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1994, 10(4), 384-390.
- Gurish MF, Ghildyal N, McNeil HP, Austen KF, Gillis S, Stevens RL. Differential expression of secretory granule proteases in mouse mast cells exposed to interleukin 3 and c-kit ligand. *The Journal of Experimental Medicine*, 1992, 175(4), 1003-1012.
- Haas H & Panula P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2003, 4(2), 121-130.
- Hansson E & Rönnbäck L. Glial neuronal signaling in the central nervous system. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2003, 17(3), 341-348.

- Hartmann T, Ruoss SJ, Raymond WW, Seuwen K, Caughey GH. Human tryptase as a potent, cell-specific mitogen: role of signaling pathways in synergistic responses. *The American Journal of Physiology*, 1992, 262(5 Pt 1), L528-534.
- He BP, Wen W & Strong MJ. Activated microglia (BV-2) facilitation of TNF-alpha-mediated motor neuron death in vitro. *Journal of Neuroimmunology*, 2002, 128(1-2), 31-38.
- 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. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2013, 27(3), 920-9.
- Hendrix S, Warnke K, Siebenhaar F, Peters EM, Nitsch R, Maurer M. The majority of brain mast cells in B10.PL mice is present in the hippocampal formation. *Neuroscience Letters*, 2006, 392(3),174-177.
- Henningsson F, Yamamoto K, Saftig P, Reinheckel T, Peters C, Knight SD, Pejler G. A role for cathepsin E in the processing of mast-cell carboxypeptidase A. *Journal of Cell Science*, 2005, 118(Pt 9), 2035-2042.
- Heutinck KM, ten Berge IJ, Hack CE, Hamann J, Rowshani AT. Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Molecular Immunology*, 2010, 47(11-12), 1943-1955.
- Hickey WF. Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Seminars in Immunology*, 1999, 11(2), 125-137.
- Hickey WF, Hsu BL & Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *Journal of Neuroscience Research*, 1991, 28(2), 254-260.
- Hickey WF & Kimura H. Graft-vs.-host disease elicits expression of class I and class II histocompatibility antigens and the presence of scattered T lymphocytes in rat central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84(7), 2082-2086.
- Hickey WF, Vass K & Lassmann H. Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 1992, 51(3), 246-256.
- Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H. The neuroprotective effect of

- inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 2000, 107(2), 161-166.
- Hough LB, Khandelwal JK, Goldschmidt RC, Diomande M, Glick SD. Normal levels of histamine and tele-methylhistamine in mast cell-deficient mouse brain. *Brain Research*, 1984, 292(1), 133-138.
- Huang C, Sali A & Stevens RL. Regulation and function of mast cell proteases in inflammation. *Journal of Clinical Immunology*, 1998, 18(3), 169-183.
- Huang C, Wong GW, Ghildyal N, Gurish MF, Sali A, Matsumoto R, Qiu WT, Stevens RL. The tryptase, mouse mast cell protease 7, exhibits anticoagulant activity in vivo and in vitro due to its ability to degrade fibrinogen in the presence of the diverse array of protease inhibitors in plasma. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(50), 31885-31893.
- Humphries DE, Wong GW, Friend DS, Gurish MF, Qiu WT, Huang C, Sharpe AH, Stevens RL. Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature*, 1999, 400(6746), 769-772.
- Hunt JE, Friend DS, Gurish MF, Feyfant E, Sali A, Huang C, Ghildyal N, Stechschulte S, Austen KF, Stevens RL. Mouse mast cell protease 9, a novel member of the chromosome 14 family of serine proteases that is selectively expressed in uterine mast cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(46), 29158-29166.
- Hunt JE, Stevens RL, Austen KF, Zhang J, Xia Z, Ghildyal N. Natural disruption of the mouse mast cell protease 7 gene in the C57BL/6 mouse. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(5), 2851-2855.
- Iemura A, Tsai M, Ando A, Wershil BK, Galli SJ. The c-kit ligand, stem cell factor, promotes mast cell survival by suppressing apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 1994, 144(2), 321-328.
- Inman D, Guth L & Steward O. Genetic influences on secondary degeneration and wound healing following spinal cord injury in various strains of mice. *The Journal of Comparative Neurology*, 2002, 451(3), 225-235.
- Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986, 83(12), 4464-4468.

- Irani AM, Craig SS, DeBlois G, Elson CO, Schechter NM, Schwartz LB. Deficiency of the tryptase-positive, chymase-negative mast cell type in gastrointestinal mucosa of patients with defective T lymphocyte function. *Journal of Immunology*, 1987, 138(12), 4381-4386.
- Jensen MB, González B, Castellano B, Zimmer J. Microglial and astroglial reactions to anterograde axonal degeneration: a histochemical and immunocytochemical study of the adult rat fascia dentata after entorhinal perforant path lesions. *Experimental Brain Research*, 1994, 98(2), 245-260.
- Jin Y, Silverman AJ & Vanucci SJ. Mast cells are early responders after hypoxia-ischemia in immature rat brain. *Stroke*, 2009, 40(9), 3107-3112.
- Johnson D & Krenger W. Interactions of mast cells with the nervous system--recent advances. *Neurochemical Research*, 1992, 17(9), 939-951.
- Johnson D, Yasui D & Seeldrayers P. An analysis of mast cell frequency in the rodent nervous system: numbers vary between different strains and can be reconstituted in mast cell-deficient mice. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 1991, 50(3), 227-234.
- Johnson LA, Moon KE & Eisenberg M. Purification to homogeneity of the human skin chymotryptic proteinase "chymase". *Analytical Biochemistry*, 1986, 155(2), 358-364.
- Johnson MD, Gold LI & Moses HL. Evidence for transforming growth factor-beta expression in human leptomeningeal cells and transforming growth factor-beta-like activity in human cerebrospinal fluid. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 1992, 67(3), 360-368.
- Jones BJ & Roberts DJ. The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1968, 20(4), 302-304.
- Kaminska R, Helisalmi P, Harvima RJ, Naukkarinen A, Horsmanheimo M, Harvima IT. Focal dermal-epidermal separation and fibronectin cleavage in basement membrane by human mast cell tryptase. *The Journal of Investigative Dermatology*, 1999, 113(4), 567-573.
- Khalil M, Ronda J, Weintraub M, Jain K, Silver R, Silverman AJ. Brain mast cell relationship to neurovasculature during development. *Brain Research*, 2007, 1171, 18-29.
- Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annual Review of Immunology*, 1999, 17, 931-972.

- Kirshenbaum AS, Goff JP, Semere T, Foster B, Scott LM, Metcalfe DD. Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34(+), c-kit(+), and expresses aminopeptidase N (CD13). *Blood*, 1999, 94(7), 2333-2342.
- Kirshenbaum AS, Kessler SW, Goff JP, Metcalfe DD. Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *Journal of Immunology*, 1991, 146(5), 1410-1415.
- Kitamura Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annual Review of Immunology*, 1989, 7, 59-76.
- Kitamura Y, Go S & Hatanaka K. Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood*, 1978, 52(2), 447-452.
- Kitamura Y, Kanakura Y, Sonoda S, Asai H, Nakano T. Mutual phenotypic changes between connective tissue type and mucosal mast cells. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 1987, 82(3-4), 244-248.
- Kitamura Y, Shimada M, Hatanaka K, Miyano Y. Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice. *Nature*, 1977, 268(5619), 442-443.
- Kofford MW, Schwartz LB, Schechter NM, Yager DR, Diegelmann RF, Graham MF. Cleavage of type I procollagen by human mast cell chymase initiates collagen fibril formation and generates a unique carboxyl-terminal propeptide. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(11), 7127-7131.
- Koh YY, Dupuis R, Pollice M, Albertine KH, Fish JE, Peters SP. Neutrophils recruited to the lungs of humans by segmental antigen challenge display a reduced chemotactic response to leukotriene B₄. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1993, 8(5), 493-499.
- Kondo K, Muramatsu M, Okamoto Y, Jin D, Takai S, Tanigawa N, Miyazaki M. Expression of chymase-positive cells in gastric cancer and its correlation with the angiogenesis. *Journal of Surgical Oncology*, 2006, 93(1), 36-42; discussion 42-43.
- Kovanen PT. Role of mast cells in atherosclerosis. *Chemical Immunology*, 1995, 62, 132-170.
- Krystel-Whittemore M, Dileepan KN & Wood JG. Mast cell: a multi-functional master cell. *Frontiers in Immunology*, 2016, 6:620.
- Kunori Y, Koizumi M, Masegi T, Kasai H, Kawabata H, Yamazaki Y, Fukamizu A. Rodent alpha-chymases are elastase-like proteases. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 2002, 269(23),

5921-5930.

Kupietzky A & Levi-Schaffer F. The role of mast cell-derived histamine in the closure of an in vitro wound. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society*, 1996, 45(4), 176-180.

Lee KS, Stanford EJ, Cotman CW, Lynch GS. Ultrastructural evidence for bouton proliferation in the partially deafferented dentate gyrus of the adult rat. *Experimental Brain Research*, 1977, 29(3-4), 475-485.

Lees M, Taylor DJ & Woolley DE. Mast cell proteinases activate precursor forms of collagenase and stromelysin, but not of gelatinases A and B. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 1994, 223(1), 171-177.

Li M, Liu K, Michalicek J, Angus JA, Hunt JE, Dell'Italia LJ, Feneley MP, Graham RM, Husain A. Involvement of chymase-mediated angiotensin II generation in blood pressure regulation. *The Journal of Clinical Investigation*, 2004, 114(1), 112-120.

Lundequist A, Tchougounova E, Abrink M, Pejler G. Cooperation between mast cell carboxypeptidase A and the chymase mouse mast cell protease 4 in the formation and degradation of angiotensin II. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(31), 32339-32344.

Malaviya R & Abraham SN. Clinical implications of mast cell-bacteria interaction. *Journal of Molecular Medicine*, 1998, 76(9), 617-623.

Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature*, 1996, 381(6577), 77-80.

Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nature Reviews. Immunology*, 2004, 4(10), 787-799.

Martin TR, Takeishi T, Katz HR, Austen KF, Drazen JM, Galli SJ. Mast cell activation enhances airway responsiveness to methacholine in the mouse. *The Journal of Clinical Investigation*, 1993, 91(3), 1176-1182.

Maruichi M, Takai S, Sugiyama T, Ueki M, Oku H, Sakaguchi M, Okamoto Y, Muramatsu M, Ikeda T, Miyazaki M. Role of chymase on growth of cultured canine Tenon's capsule fibroblasts and scarring in a canine conjunctival flap model. *Experimental Eye Research*, 2004, 79(1), 111-118.

Matsumoto T, Wada A, Tsutamoto T, Ohnishi M, Isono T, Kinoshita M. Chymase inhibition prevents

- cardiac fibrosis and improves diastolic dysfunction in the progression of heart failure. *Circulation*, 2003, 107(20), 2555-2558.
- Matthews DA, Cotman C & Lynch G. An electron microscopic study of lesion-induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. II. Reappearance of morphologically normal synaptic contacts. *Brain Research*, 1976, 115(1), 23-41.
- Matute C, Alberdi E, Ibarretxe G, Sánchez-Gómez MV. Excitotoxicity in glial cells. *European Journal of Pharmacology*. 2002 Jul 5;447(2-3):239-46.
- Maurer M, Fischer E, Handjiski B, von Stebut E, Algermissen B, Bavandi A, Paus R. Activated skin mast cells are involved in murine hair follicle regression (catagen). *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 1997, 77(4), 319-332.
- Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *British Journal of Experimental Pathology*, 1948, 29(1), 58-69.
- Mekori YA, Oh CK & Metcalfe DD. IL-3-dependent murine mast cells undergo apoptosis on removal of IL-3. Prevention of apoptosis by c-kit ligand. *Journal of Immunology*, 1993, 151(7), 3775-3784.
- Merrill JE, Ignarro LJ, Sherman MP, Melinek J, Lane TE. Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *Journal of Immunology*, 1993, 151(4), 2132-2141.
- Metcalfe DD, Baram D & Mekori YA. Mast cells. *Physiological Reviews*, 1997, 77(4), 1033-1079.
- Metsärinne KP, Vehmaan-Kreula P, Kovanen PT, Saijonmaa O, Baumann M, Wang Y, Nyman T, Fyhrquist FY, Eklund KK. Activated mast cells increase the level of endothelin-1 mRNA in cocultured endothelial cells and degrade the secreted peptide. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2002, 22(2), 268-273.
- Metz M, Grimaldeston MA, Nakae S, Piliponsky AM, Tsai M, Galli SJ. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunological Reviews*, 2007, 217, 304-328.
- Metz M, Piliponsky AM, Chen CC, Lammel V, Abrink M, Pejler G, Tsai M, Galli SJ. Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science*, 2006, 313(5786), 526-530.

- Minghetti L & Levi G. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Progress in Neurobiology*, 1998, 54(1), 99-125.
- Mizutani H, Schechter N, Lazarus G, Black RA, Kupper TS. Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 beta (IL-1 beta) to an active IL-1 species by human mast cell chymase. *The Journal of Experimental Medicine*, 1991, 174(4), 821-825.
- Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nature Medicine*, 1999, 5(1), 49-55.
- Moretti R, Chhor V, Bettati D, Banino E, De Lucia S, Le Charpentier T, Lebon S, Schwendimann L, Pansiot J, Rasika S, Degos V, Titomanlio L, Gressens P, Fleiss B. Contribution of mast cells to injury mechanisms in a mouse model of pediatric traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience Research*, 2016, 94, 1546-1560.
- Münch G, Gasic-Milenkovic J, Dukic-Stefanovic S, Kuhla B, Heinrich K, Riederer P, Huttunen HJ, Founds H, Sajithlal G. Microglial activation induces cell death, inhibits neurite outgrowth and causes neurite retraction of differentiated neuroblastoma cells. *Experimental Brain Research*, 2003, 150(1), 1-8.
- Nadler MJ, Matthews SA, Turner H, Kinet JP. Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor Fc epsilon RI: coupling form to function. *Advances in Immunology*, 2000, 76, 325-355.
- Nagata K, Takei N, Nakajima K, Saito H, Kohsaka S. Microglial conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic rat brain. *Journal of Neuroscience Research*, 1993, 34(3), 357-363.
- Nakano T, Sonoda T, Hayashi C, Yamatodani A, Kanayama Y, Yamamura T, Asai H, Yonezawa T, Kitamura Y, Galli SJ. Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal, and intravenous transfer into genetically mast cell-deficient W/W^v mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 1985, 162(3), 1025-1043.
- Nelissen S, Vanganswinkel T, Geurts N, Geboes L, Lemmens E, Vidal PM, Lemmens S, Willems L, Boato F, Dooley D, Pehl D, Pejler G, Maurer M, Metz M, Hendrix S. Mast cells protect from post-traumatic spinal cord damage in mice by degrading inflammation-associated cytokines via mouse mast cell protease 4. *Neurobiology of Disease*, 2014, 62, 260-72.

- Nelissen S, Lemmens E, Geurts N, Kramer P, Maurer M, Hendriks J, Hendrix S. The role of mast cells in neuroinflammation. *Acta Neuropathologica*, 2013, 125(5), 637-650.
- Neuhaus J, Risau W & Wolburg H. Induction of blood-brain barrier characteristics in bovine brain endothelial cells by rat astroglial cells in transfilter coculture. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1991, 633, 578-580.
- Noli C & Miolo A. The mast cell in wound healing. *Veterinary Dermatology*, 2001, 12(6), 303-313.
- Omoto Y, Tokime K, Yamanaka K, Habe K, Morioka T, Kurokawa I, Tsutsui H, Yamanishi K, Nakanishi K, Mizutani H. Human mast cell chymase cleaves pro-IL-18 and generates a novel and biologically active IL-18 fragment. *Journal of Immunology*, 2006, 177(12), 8315-8319.
- Onodera K, Yamatodani A, Watanabe T, Wada H. Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders. *Progress in Neurobiology*, 1994, 42(6), 685-702.
- Pallaoro M, Fejzo MS, Shayesteh L, Blount JL, Caughey GH. Characterization of genes encoding known and novel human mast cell tryptases on chromosome 16p13.3. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(6), 3355-3362.
- Pang L, Nie M, Corbett L, Sutcliffe A, Knox AJ. Mast cell beta-tryptase selectively cleaves eotaxin and RANTES and abrogates their eosinophil chemotactic activities. *Journal of Immunology*, 2006, 176(6), 3788-3795.
- Pejler G & Karlström A. Thrombin is inactivated by mast cell secretory granule chymase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(16), 11817-11822.
- Pesci A, Bertorelli G, Gabrielli M, Olivieri D. Mast cells in fibrotic lung disorders. *Chest*, 1993, 103(4), 989-996.
- Prodeus AP, Zhou X, Maurer M, Galli SJ, Carroll MC. Impaired mast cell-dependent natural immunity in complement C3-deficient mice. *Nature*, 1997, 390(6656), 172-175.
- Qing Z, Sewell D, Sandor M, Fabry Z. Antigen-specific T cell trafficking into the central nervous system. *Journal of Neuroimmunology*, 2000, 105(2), 169-178.
- Qiu J, Cai D & Filbin MT. Glial inhibition of nerve regeneration in the mature mammalian CNS. *Glia*, 2000, 29(2), 166-174.

- Raghupathi R, Graham DI & McIntosh TK. Apoptosis after traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 2000, 17(10), 927-938.
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 1999, 30(1), 77-105.
- Rawji KS, Mishra MK, Yong VW. Regenerative Capacity of Macrophages for Remyelination. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2016, 4, 47.
- Von Recklinghausen F. Über Eiter- und Bindegewebskörperchen. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie*, 1863, 28, 157-197.
- Reilly CF, Schechter NB & Travis J. Inactivation of bradykinin and kallidin by cathepsin G and mast cell chymase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1985, 127(2), 443-449.
- Reilly CF, Tewksbury DA, Schechter NM, Travis J. Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 1982, 257(15), 8619-8622.
- Reith W, Herrero-Sanchez C, Kobr M, Silacci P, Berte C, Barras E, Fey S, Mach B. MHC class II regulatory factor RFX has a novel DNA-binding domain and a functionally independent dimerization domain. *Genes & Development*, 1990, 4, 1528-1540.
- Reynolds DS, Stevens RL, Lane WS, Carr MH, Austen KF, Serafin WE. Different mouse mast cell populations express various combinations of at least six distinct mast cell serine proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(8), 3230-3234.
- Rodewald HR, Dessing M, Dvorak AM, Galli SJ. Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science*, 1996, 271(5250), 818-822.
- Ruitenbergh EJ & Elgersma A. Absence of intestinal mast cell response in congenitally athymic mice during *Trichinella spiralis* infection. *Nature*, 1976, 264(5583), 258-260.
- Ruoss SJ, Hartmann T & Caughey GH. Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *The Journal of Clinical Investigation*, 1991, 88(2), 493-499.
- Saarinen J, Kalkkinen N, Welgus HG, Kovanen PT. Activation of human interstitial procollagenase

- through direct cleavage of the Leu83-Thr84 bond by mast cell chymase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(27), 18134-18140.
- Sahuquillo J, Poca MA & Amoros S. Current aspects of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury. *Current Pharmaceutical Design*, 2001, 7(15), 1475-1503.
- Sakaguchi M, Takai S, Jin D, Okamoto Y, Muramatsu M, Kim S, Miyazaki M. A specific chymase inhibitor, NK3201, suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *European Journal of Pharmacology*, 2004, 493(1-3), 173-176.
- Schechter NM, Irani AM, Sprows JL, Abernethy J, Wintroub B, Schwartz LB. Identification of a cathepsin G-like proteinase in the MCTC type of human mast cell. *Journal of Immunology*, 1990, 145(8), 2652-2661.
- Scheff SW & Cotman CW. Recovery of spontaneous alternation following lesions of the entorhinal cortex in adult rats: possible correlation to axon sprouting. *Behavioral Biology*, 1977, 21(2), 286-293.
- Schneider LA, Schlenner SM, Feyerabend TB, Wunderlin M, Rodewald HR. Molecular mechanism of mast cell mediated innate defense against endothelin and snake venom sarafotoxin. *The Journal of Experimental Medicine*, 2007, 204(11), 2629-2639.
- Schnell L, Fearn S, Klassen H, Schwab ME, Perry VH. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *The European Journal of Neuroscience*, 1999, 11(10), 3648-3658.
- Scholten J, Hartmann K, Gerbault A, Krieg T, Müller W, Testa G, Roers A. Mast cell-specific Cre/loxP-mediated recombination in vivo. *Transgenic Research*, 2008, 17(2), 307-15.
- Schulman ES. The role of mast cells in inflammatory responses in the lung. *Critical Reviews in Immunology*, 1993, 13(1), 35-70.
- Schwartz LB & Austen KF. Structure and function of the chemical mediators of mast cells. *Progress in Allergy*, 1984, 34, 271-321.
- Schwartz LB, Bradford TR, Littman BH, Wintroub BU. The fibrinolytic activity of purified tryptase from human lung mast cells. *Journal of Immunology*, 1985, 135(4), 2762-2767.
- Schwartz LB, Irani AM, Roller K, Castells MC, Schechter NM. Quantitation of histamine, tryptase, and

- chymase in dispersed human T and TC mast cells. *Journal of Immunology*, 1987, 138(8), 2611-2615.
- Secor VH, Secor WE, Gutekunst CA, Brown MA. Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 2000, 191(5), 813-822.
- Semaan W, Desbiens L, Houde M, Labonté J, Gagnon H, Yamamoto D, Takai S, Laidlaw T, Bkaily G, Schwertani A, Pejler G, Levesque C, Desjardins R, Day R, D'Orléans-Juste P. Chymase inhibitor-sensitive synthesis of endothelin-1 (1-31) by recombinant mouse mast cell protease 4 and human chymase. *Biochemical Pharmacology*, 2015, 94(2), 91-100.
- Serafin WE, Dayton ET, Gravallesse PM, Austen KF, Stevens RL. Carboxypeptidase A in mouse mast cells. Identification, characterization, and use as a differentiation marker. *Journal of Immunology*, 1987, 139(11), 3771-3776.
- Serafin WE, Reynolds DS, Rogelj S, Lane WS, Conder GA, Johnson SS, Austen KF, Stevens RL. Identification and molecular cloning of a novel mouse mucosal mast cell serine protease. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(1), 423-429.
- Silver R, Silverman AJ, Vitković L, Lederhendler II. Mast cells in the brain: evidence and functional significance. *Trends in Neurosciences*, 1996, 19(1), 25-31.
- Skaper SD, Facci L & Giusti P. Mast cells, glia and neuroinflammation: partners in crime? *Immunology*, 2014, 141(3), 314-327.
- Sroga JM, Jones TB, Kigerl KA, McGaughy VM, Popovich PG. Rats and mice exhibit distinct inflammatory reactions after spinal cord injury. *The Journal of Comparative Neurology*, 2003, 462(2), 223-240.
- Starkey JR, Crowle PK & Taubenberger S. Mast-cell-deficient W/W^v mice exhibit a decreased rate of tumor angiogenesis. *International Journal of Cancer*, 1988, 42(1), 48-52.
- Steward O, Kelley MS & Torre ER. The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: temporal relationship between changes in the levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and GFAP mRNA in reactive astrocytes. *Experimental Neurology*, 1993, 124(2), 167-183.
- Steward O, Torre ER, Phillips LL, Trimmer PA. The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: time course of increases in mRNA for glial fibrillary acidic protein. *The Journal of*

Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 1990, 10(7), 2373-2384.

Steward O, Zheng B & Tessier-Lavigne M. False resurrections: distinguishing regenerated from spared axons in the injured central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, 2003, 459(1), 1-8.

Taipale J, Lohi J, Saarinen J, Kovanen PT, Keski-Oja J. Human mast cell chymase and leukocyte elastase release latent transforming growth factor-beta 1 from the extracellular matrix of cultured human epithelial and endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(9), 4689-4696.

Takai S, Jin D, Sakaguchi M, Katayama S, Muramatsu M, Sakaguchi M, Matsumura E, Kim S, Miyazaki M. A novel chymase inhibitor, 4-[1-([bis-(4-methyl-phenyl)-methyl]-carbamoyl)3-(2-ethoxy-benzyl)-4-oxo-azetidine-2-yloxy]-benzoic acid (BCEAB), suppressed cardiac fibrosis in cardiomyopathic hamsters. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2003, 305(1), 17-23.

Tanzola MB, Robbie-Ryan M, Gutekunst CA, Brown MA. Mast cells exert effects outside the central nervous system to influence experimental allergic encephalomyelitis disease course. *Journal of Immunology*, 2003, 171(8), 4385-4391.

Taylor AW & Streilein JW. Inhibition of antigen-stimulated effector T cells by human cerebrospinal fluid. *Neuroimmunomodulation*, 1996, 3(2-3), 112-118.

Tchougounova E & Pejler G. Regulation of extravascular coagulation and fibrinolysis by heparin-dependent mast cell chymase. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2001, 15(14), 2763-2765.

Tchougounova E, Lundequist A, Fajardo I, Winberg JO, Abrink M, Pejler G. A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloprotease-9 and pro-matrix metalloprotease-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(10), 9291-9296.

Tchougounova E, Pejler G & Abrink M. The chymase, mouse mast cell protease 4, constitutes the major chymotrypsin-like activity in peritoneum and ear tissue. A role for mouse mast cell protease 4 in thrombin regulation and fibronectin turnover. *The Journal of Experimental Medicine*, 2003, 198(3), 423-431.

Tedla N, Wang HW, McNeil HP, Di Girolamo N, Hampartzoumian T, Wakefield D, Lloyd A. Regulation of T lymphocyte trafficking into lymph nodes during an immune response by the chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1 alpha and MIP-1 beta. *Journal of Immunology*,

1998, 161(10), 5663-5672.

Theoharides TC. Mast cells: the immune gate to the brain. *Life Sciences*, 1990, 46(9), 607-617.

Tomimori Y, Muto T, Saito K, Tanaka T, Maruoka H, Sumida M, Fukami H, Fukuda Y. Involvement of mast cell chymase in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *European Journal of Pharmacology*, 2003, 478(2-3), 179-185.

Tsai M, Takeishi T, Thompson H, Langley KE, Zsebo KM, Metcalfe DD, Geissler EN, Galli SJ. Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(14), 6382-6386.

Tsai M, Wedemeyer J, Ganiatsas S, Tam SY, Zon LI, Galli SJ. In vivo immunological function of mast cells derived from embryonic stem cells: an approach for the rapid analysis of even embryonic lethal mutations in adult mice in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(16), 9186-9190.

Turner H & Kinet JP. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature*, 1999, 402(6760 Suppl), B24-30.

Vanganswinkel T, Geurts N, Quanten K, Nelissen S, Lemmens S, Geboes L, Dooley D, Vidal PM, Pejler G, Hendrix S. Mast cells promote scar remodeling and functional recovery after spinal cord injury via mouse mast cell protease 6. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2016, 30(5), 2040-57.

Vartio T, Seppä H & Vaheri A. Susceptibility of soluble and matrix fibronectins to degradation by tissue proteinases, mast cell chymase and cathepsin G. *The Journal of Biological Chemistry*, 1981, 256(1), 471-477.

Villena F, Montoya GA, Roa J, Jofré A, Goset C. Mast cells and synaptic transmission in sympathetic ganglia. *Cellular and Molecular Biology*, 1986, 32(3), 253-259.

Watanabe N, Tomimori Y, Saito K, Miura K, Wada A, Tsudzuki M, Fukuda Y. Chymase inhibitor improves dermatitis in NC/Nga mice. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2002, 128(3), 229-234.

Weiss JM & Berman JW. Astrocyte expression of monocyte chemoattractant protein-1 is differentially regulated by transforming growth factor beta. *Journal of Neuroimmunology*, 1998, 91(1-2), 190-

Williams CM & Galli SJ. Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 2000, 192(3), 455-462.

Williams RM, Bienenstock J & Stead RH. Mast cells: the neuroimmune connection. *Chemical Immunology*, 1995, 61, 208-235.

Yamatodani A, Maeyama K, Watanabe T, Wada H, Kitamura Y. Tissue distribution of histamine in a mutant mouse deficient in mast cells: clear evidence for the presence of non-mast-cell histamine. *Biochemical Pharmacology*, 1982, 31(3), 305-309.

Yeager MP, DeLeo JA, Hoopes PJ, Hartov A, Hildebrandt L, Hickey WF. Trauma and inflammation modulate lymphocyte localization in vivo: quantitation of tissue entry and retention using indium-111-labeled lymphocytes. *Critical Care Medicine*, 2000, 28(5), 1477-1482.

Zhang S, Dong H, Zhang X, Li N, Sun J, Qian Y. Cerebral mast cells contribute to postoperative cognitive dysfunction by promoting blood brain barrier disruption. *Behavioural Brain Research*, 2016, 298, 158-166.

Zhang X, Dong H, Li N, Zhang S, Sun J, Zhang S, Qian Y. Activated brain mast cells contribute to postoperative cognitive dysfunction by evoking microglia activation and neuronal apoptosis. *Journal of Neuroinflammation*, 2016, 13(1), 127.

Zhang Z, Fujiki M, Guth L, Steward O. Genetic influences on cellular reactions to spinal cord injury: a wound-healing response present in normal mice is impaired in mice carrying a mutation (WldS) that causes delayed Wallerian degeneration. *The Journal of Comparative Neurology*, 1996, 371(3), 485-495.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Debora Pehl, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle von Mastzellen und Mastzellproteasen bei traumatischen Läsionen des zentralen Nervensystems“ 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.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Berlin, den 23.02.2017

Debora Pehl

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Debora Pehl hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Mast cells protect from post-traumatic brain inflammation by the mast cell-specific chymase mouse mast cell protease-4. Hendrix S, Kramer P, **Pehl D**, Warnke K, Boato F, Nelissen S, Lemmens E, Pejler G, Metz M, Siebenhaar F, Maurer M. FASEB J. 2013 Mar;27(3):920-9.

Beitrag im Einzelnen:

Beteiligung an der histologischen und statistischen Auswertung der ECL-Versuche in +/+ und W/W^v-Mäusen; Beteiligung an der Planung, Durchführung sowie histologischen und statistischen Auswertung der ECL-Versuche in WT und mMCP4^{-/-}-Mäusen; Mitarbeit an der Erstellung des Manuskripts und kritische Durchsicht.

Publikation 2:

Mast cells protect from post-traumatic spinal cord damage in mice by degrading inflammation-associated cytokines via mouse mast cell protease 4. Nelissen S, Vangansewinkel T, Geurts N, Geboes L, Lemmens E, Vidal PM, Lemmens S, Willems L, Boato F, Dooley D, **Pehl D**, Pejler G, Maurer M, Metz M, Hendrix S. Neurobiol Dis. 2014 Feb;62:260-72.

Beitrag im Einzelnen:

Beteiligung an der Planung, Durchführung sowie funktionellen, histologischen und statistischen Auswertung der SCI-Versuche in WT und mMCP4^{-/-}-Mäusen; Mitarbeit an der Erstellung des Manuskripts und kritische Durchsicht.

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

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Differential roles of hypoxia and innate immunity in juvenile and adult dermatomyositis.

Preuße C, Allenbach Y, Hoffmann O, Goebel HH, **Pehl D**, Radke J, Doeser A, Schneider U, Alten RH, Kallinich T, Benveniste O, von Moers A, Schoser B, Schara U, Stenzel W. *Acta Neuropathol Commun.* 2016 Apr 27;4(1):45.

Dermatomyositis With or Without Anti-Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 Antibodies: Common Interferon Signature but Distinct NOS2 Expression.

Allenbach Y, Leroux G, Suárez-Calvet X, Preusse C, Gallardo E, Hervier B, Rigolet A, Hie M, **Pehl D**, Limal N, Hufnagl P, Zerbe N, Meyer A, Aouizerate J, Uzunhan Y, Maissonobe T, Goebel HH, Benveniste O, Stenzel W; French Myositis Network. *Am J Pathol.* 2016 Mar;186(3):691-700.

Deletion of Jun proteins in adult oligodendrocytes does not perturb cell survival, or myelin maintenance in vivo.

Schreiner B, Ingold-Heppner B, **Pehl D**, Locatelli G, Berrit-Schönthaler H, Becher B. *PLoS One.* 2015 Mar 16;10(3):e0120454.

Nuclear actin aggregation is a hallmark of anti-synthetase syndrome-induced dysimmune myopathy.

Stenzel W, Preuße C, Allenbach Y, **Pehl D**, Junckerstorff R, Heppner FL, Nolte K, Aronica E, Kana V, Rushing E, Schneider U, Claeys KG, Benveniste O, Weis J, Goebel HH. *Neurology.* 2015 Mar 31;84(13):1346-54.

Th2-M2 immunity in lesions of muscular sarcoidosis and macrophagic myofasciitis.

Preusse C, Goebel HH, **Pehl D**, Rinnenthal JL, Kley RA, Allenbach Y, Heppner FL, Vorgerd M, Authier FJ, Gherardi R, Stenzel W. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2015 Dec;41(7):952-63.

The lymphoid follicle variant of dermatomyositis.

Radke J, **Pehl D**, Aronica E, Schonenberg-Meinema D, Schneider U, Heppner FL, de Visser M, Goebel HH, Stenzel W. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2014 Jul 28;1(2):e19.

Mast cells protect from post-traumatic spinal cord damage in mice by degrading inflammation-associated cytokines via mouse mast cell protease 4.

Nelissen S, Vanganswinkel T, Geurts N, Geboes L, Lemmens E, Vidal PM, Lemmens S, Willems L, Boato F, Dooley D, **Pehl D**, Pejler G, Maurer M, Metz M, Hendrix S. *Neurobiol Dis.* 2014 Feb;62:260-72.

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

Hendrix S, Kramer P, **Pehl D**, Warnke K, Boato F, Nelissen S, Lemmens E, Pejler G, Metz M, Siebenhaar F, Maurer M. *FASEB J.* 2013 Mar;27(3):920-9.

LGI-1-positive limbic encephalitis: a clinicopathological study.

Schultze-Amberger J, **Pehl D**, Stenzel W. *J Neurol.* 2012 Nov;259(11):2478-80.

Danksagung

Ich danke in erster Linie Herrn Prof. Dr. Sven Hendrix für die Überlassung des Themas, die Hilfestellung bei der Durchführung dieser Arbeit und die konstruktiven Diskussionen sowie Herrn PD Dr. Bernhard Lange-Asschenfeldt für die freundliche Übernahme der Betreuung, die Hilfe bei der Fertigstellung und das kritische Korrekturlesen der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt ferner Doreen Brandl, Mareike Thielke, Julia König, Francesco Boato und Karen Rosenberger, die mit so viel Engagement und Hilfsbereitschaft jederzeit bei allen organisatorischen und praktischen Fragen eine große Unterstützung gewesen sind und damit wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Zudem danke ich allen weiteren Mitgliedern der AG Hendrix und des Institutes für Zell- und Neurobiologie für ihre Hilfe und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. M. Maurer und Herrn Prof. H.-R. Rodewald danke ich für die freundliche Überlassung ihrer Knockout-Mäuse, sowie der AG Maurer für die Hilfestellung bei der Durchführung der Rekonstitutionsexperimente.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für die ständige Unterstützung und Motivation sowie auch allen Kollegen im Institut für Neuropathologie, die mich in zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen inspiriert und motiviert haben.