

Aus dem Institut für zelluläre Neurowissenschaften am Max-Delbrück-
Center für Molekulare Medizin in Berlin-Buch

DISSERTATION

Microglia sense cortical spreading depression via
N-methyl-D-aspartate receptor dependent potassium currents

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor of Philosophy (PhD)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stefan Wendt

aus Buxtehude

Datum der Promotion: 25. Juni 2017

Inhalt

Zusammenfassung	3
Abstract	5
Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge SM)	7
Publikation: Experimental cortical spreading depression induces NMDA receptor dependent potassium currents in microglia	8
Eidesstattliche Versicherung.....	18
Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation.....	19
Lebenslauf	20
Publikationsliste	21
Danksagung	22

Zusammenfassung

Das Gehirn ist eines der komplexesten Organe des menschlichen Körpers, dessen Funktionen bekanntermaßen in verschiedenen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) eingeschränkt sind. Mikrogliazellen nehmen pathologische Veränderungen des ZNS wahr und versuchen die Ausbreitung und das Sterben von Neuronen und den damit verbundenen Funktionsverlust zu verhindern. Hirnerkrankungen sind ein allgegenwärtiges Problem unserer Gesellschaft und deren Existenz impliziert, dass Mikrogliazellen häufig an ihren Aufgaben scheitern. Seit ihrer Entdeckung im 19. Jahrhundert, und der nachfolgenden Beschreibung durch Pío del Río Hortega im Jahre 1919 wurden sie umfassend unter physiologischen und pathologischen Bedingungen studiert. Dennoch gibt es Pathologien in denen die Rolle der Mikroglia bisher weitgehend unbekannt ist. Die kortikale Streudepolarisierung (KSD) ist ein exzitotoxisches Phänomen einer sich selbst ausbreitenden Welle, welche der vorraussichtliche Mechanismus der Migräne-Aura ist. Dieses Phänomen wird ebenfalls mit Schlaganfall und Epilepsie in Verbindung gebracht. Studien berichten, dass Mikrogliazellen nach einer KSD aktiviert werden. Es ist jedoch nicht bekannt, wie die Zellen eine solche depolarisierende Welle initial wahrnehmen. Eines der wichtigsten Merkmale der KSD ist die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration in den betroffenen Hirnarealen. Mikrogliazellen exprimieren verschiedene Kaliumkanäle, mit denen eine Wahrnehmung der neuronalen Depolarisation möglich wäre. Die Anreicherung von extrazellulärem Glutamat ist ein weiteres Merkmal der KSD. Einer der wichtigsten Rezeptoren für die Initiierung und Ausbreitung der depolarisierenden Welle ist der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptor, welcher zur Klasse der ionotropen Glutamatrezeptoren zählt. Im Gegensatz zu den gut erforschten Funktionen von NMDA Rezeptoren in Neuronen ist die Existenz von funktionellen NMDA Rezeptoren in Mikrogliazellen umstritten. Die Expression von verschiedenen Neurotransmitterrezeptoren wurde bereits in Mikrogliazellen nachgewiesen, weshalb es naheliegend erscheint, dass funktionell aktive NMDA Rezeptoren benutzt werden um die KSD von Mikrogliazellen wahrzunehmen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein experimentelles Modell der KSD in akuten Hirnschnitten der Maus verwendet, um herauszufinden ob und wie Mikrogliazellen eine eintreffende depolarisierende Welle wahrnehmen. Die Studie

zeigt, dass NMDA Rezeptor abhängige einwärtsrektifizierende Kaliumströme durch eine KSD in Mikrogliazellen ausgelöst werden. Hierbei konnte kein Nachweis funktioneller NMDA Rezeptoren in Mikrogliazellen erbracht werden.

Die Ergebnisse wurden in der Fachzeitschrift *Journal of Neuroscience* am 8 Juni 2016 (36(23):6165-74) publiziert und der Artikel ist nachfolgend aufgeführt.

Abstract

The brain is one of the most complex organs and its functions are known to be impaired in numerous diseases of the central nervous system (CNS). Microglial cells are the watchmen of the brain, which sense and prevent the spread of pathological impacts on the CNS and, thus, averting neuronal death and loss of function. The very fact that brain diseases are a common problem in modern society shows that microglia often fail in maintaining the physiological functions of the CNS. Since their discovery in the 19th century, and their description by Pío del Río Hortega in 1919, microglia have been extensively studied under healthy and pathological conditions. However, there are pathological events regarding the role of microglial cells which are not well studied yet. Cortical spreading depression (CSD) is an excitotoxic event of a self-propagating depolarizing wave and is believed to be the mechanism of the migraine aura. It is also associated with the early phase of stroke and shares features with epilepsy. There are reports that CSD induces microglia activation, but so far it is not known how these cells sense CSD in the first place. One of the hallmarks of CSD is the elevation of extracellular potassium concentrations in the brain regions of wave propagation. Microglia express potassium channels, which may be used to sense the neuronal depolarization. A second major characteristic is the secretion and accumulation of extracellular glutamate. One of the most important receptor in the induction and spread of associated neuronal depolarization is the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor - an excitatory ionotropic glutamate receptor. Whereas NMDA receptor function is well known in neurons, it is debated and the literature is controversial as to whether microglial cells express NMDA receptors or not. Numerous expressions of different neurotransmitter receptors were shown for microglial cells and a functional expression of NMDA receptors might explain how these cells sense CSD. In the present work, an experimental model of CSD in acute mouse brain slices was employed to study whether and how microglia sense the direct impact of an incoming wave of neuronal depolarization. The study demonstrates that CSD induces NMDA receptor dependent inwardly rectifying potassium currents in microglia. However, no evidence was found for functional expression of NMDA receptors in microglia.

The results were published in the *Journal of Neuroscience*, June 8, 2016 (36(23):6165-74) and the paper is shown below.

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

Letzter Zugriff: 22. Juni 2016

Eigenfactor: 0.35339

Impact factor: 6.78

Rank: 26 von 256 (10.16 %)

Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)

Journals from: **subject categories NEUROSCIENCES** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)
 Sorted by:

Journals 21 - 40 (of 256)

Navigation icons: <<< | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | >>>

Page 2 of 13

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data [Ⓢ]						Eigenfactor [®] Metrics [Ⓢ]	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-Life	Eigenfactor [®] Score	Article Influence [®] Score
<input type="checkbox"/>	21	NEUROPSYCHOPHARMACOL	0893-133X	22869	6.399	7.825	1.794	291	6.7	0.05002	2.647
<input type="checkbox"/>	22	CURR OPIN NEUROBIOL	0959-4388	13090	6.373	6.958	1.671	152	8.5	0.03561	3.510
<input type="checkbox"/>	23	NEUROPSYCHOL REV	1040-7308	2314	6.061	7.594	0.440	25	6.6	0.00478	2.468
<input type="checkbox"/>	24	CEPHALALGIA	0333-1024	7906	6.052	4.363	1.333	132	7.8	0.01180	1.131
<input type="checkbox"/>	25	GLIA	0894-1491	11548	5.997	5.411	1.285	158	7.7	0.02057	1.692
<input checked="" type="checkbox"/>	26	J NEUROSCI	0270-6474	172201	5.924	6.780	1.148	1342	8.5	0.35339	2.785
<input type="checkbox"/>	27	BRAIN BEHAV IMMUN	0889-1591	9464	5.874	6.020	1.462	238	4.9	0.02405	1.795
<input type="checkbox"/>	28	BRAIN STRUCT FUNCT	1863-2653	3534	5.811	6.803	1.307	244	3.0	0.01508	2.514
<input type="checkbox"/>	29	J PSYCHIATR NEUROSCI	1180-4882	2690	5.570	6.207	1.136	44	6.5	0.00551	2.034
<input type="checkbox"/>	30	PAIN	0304-3959	32930	5.557	6.244	1.119	269	>10.0	0.04578	2.019
<input type="checkbox"/>	31	NEUROIMAGE	1053-8119	79475	5.463	6.797	1.160	770	6.7	0.18031	2.325
<input type="checkbox"/>	32	MOL NEUROBIOL	0893-7648	5142	5.397	5.392	1.155	283	3.4	0.01336	1.483
<input type="checkbox"/>	33	BRAIN PATHOL	1015-6305	4403	5.256	4.485	1.026	77	7.5	0.00880	1.550
<input type="checkbox"/>	34	ALZHEIMERS RES THER	1758-9193	1164	5.197	5.126	0.921	76	2.5	0.00538	1.726
<input type="checkbox"/>	35	FRONT MOL NEUROSCI	1662-5099	1592	5.154		0.329	79	3.2	0.00785	
<input type="checkbox"/>	36	NEUROBIOL AGING	0197-4580	19205	5.153	5.193	1.261	429	5.7	0.04583	1.663
<input type="checkbox"/>	37	SOC COGN AFFECT NEUR	1749-5016	4695	5.101	5.532	0.848	210	3.4	0.01840	2.073
<input type="checkbox"/>	38	HUM BRAIN MAPP	1065-9471	17184	4.962	5.638	0.931	378	6.5	0.04047	2.088
<input type="checkbox"/>	39	MOL AUTISM	2040-2392	847	4.961	5.184	0.921	63	2.5	0.00452	1.962
<input type="checkbox"/>	40	NEUROPHARMACOLOGY	0028-3908	17341	4.936	4.709	1.288	365	5.8	0.03944	1.460

Der Artikel "*Experimental Cortical Spreading Depression Induces NMDA Receptor Dependent Potassium Currents in Microglia*" von Stefan Wendt, Emile Wogram, Laura Korvers und Helmut Kettenmann wurde am 8. Juni 2016 in der Fachzeitschrift *Journal of Neuroscience* veröffentlicht.

Unter der Adresse <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4498-15.2016> sowie der **PMID 27277795** kann der Artikel aufgerufen werden.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Stefan Wendt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Microglia sense cortical spreading depression via N-methyl-D-aspartate receptor dependent potassium currents" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation : Stefan Wendt; Emile Wogram; Laura Korvers und Helmut Kettenmann, Experimental cortical spreading depression induces NMDA receptor dependent potassium currents in microglia, The Journal of Neuroscience, J Neurosci. 2016 Jun 8;36(23):6165-74

Beitrag im Einzelnen:

In der vorliegenden Publikation wurden die folgende Anteile nicht von mir persönlich generiert: Die *Calcium imaging* Versuche (dargestellt in *Figure 8 B*) wurden von Laura Korvers durchgeführt (Co-Author) und Niklas Meyer (erwähnt in den *Acknowledgments*) hat 7 von 22 Messungen, der in *Figure 8 A* dargestellten Daten beigetragen. Alle anderen Ergebnisse und die zugrunde liegenden Versuche wurden von mir persönlich durchgeführt und generiert. Ich weise hiermit jedoch darauf hin, dass das zu Grunde liegende Projekt während meiner Zeit als Masterstudent begonnen hat. Entsprechend wurden die folgenden Datensätze während dieser Zeit generiert und sind Bestandteil der Publikation:

Anteilige Daten (22 von 49) der Messreihe *NMDA induced currents in magnesium-free ACSF* (dargestellt in *Figure 3 B*) zusätzlich zu allen Daten der Messreihen *NMDA induced currents in standard ACSF* (dargestellt in *Figure 3 B*) sowie den Daten dargestellt in *Figure 3 C*.

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

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

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

Publikationsliste

Glioma-associated microglia and macrophages/monocytes display distinct electrophysiological properties and do not communicate via gap junctions.

Richter N, **Wendt S**, Georgieva PB, Hambardzumyan D, Nolte C, Kettenmann H.

Neurosci Lett. 2014 Nov 7;583:130-5

Satellite microglia display spontaneous electrical activity uncorrelated with activity of the attached neuron.

Wogram E*, **Wendt S***, Matyash M, Pivneva T, Draguhn A, Kettenmann H.

* Contributed equally to this work

Eur J Neurosci. 2016 Jun;43(11):1523-34

Experimental cortical spreading depression induces NMDA receptor dependent potassium currents in microglia

Wendt S, Wogram E, Korvers LM, Kettenmann H

J Neurosci. 2016 Jun 8;36(23):6165-74

Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Helmut Kettenmann für die Möglichkeit meine Dissertation unter seiner Betreuung durchzuführen danken. Seine Geduld, Expertise und Weitsicht haben diese Arbeit erst möglich gemacht und ich bin außerordentlich dankbar für die schöne Zeit in seinem Labor. Für die Post-Doc Betreuung im Labor möchte ich Dr. Vitali Matyash und Dr. Marcus Semtner danken. Weiterhin möchte ich Emile Wogram, Niklas Meyer, Laura Korvers und allen anderen Kollegen aus dem Institut für zelluläre Neurowissenschaften danken.

Mein Interesse und die Faszination für die Elektrophysiologie wäre nicht zustande gekommen ohne Dr. Roderick Scott, welcher mir am *Institute of Medical Sciences* in Aberdeen die Methode der Patch-Clamp-Technik zum ersten mal gezeigt hat und mich entsprechend geprägt hat.

Ein besonderes Dankeschön gilt meiner langjährigen Freundin Nora Frank, welche mich durch die Zeit des Studiums und der Doktorandenzeit begleitet und mir den Rücken gestärkt hat. Weiterhin möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, welche stets zu mir gehalten hat auf dem Weg zu dieser Dissertation.