

Aus dem Institut
Zelluläre Neurowissenschaften

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch

DISSERTATION

Microglial phagocytosis and purinergic signaling in
Alzheimer's disease

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor of Philosophy (PhD)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Meron Maricos, M.Sc., B.Sc.

aus Pforzheim, Deutschland

Datum der Promotion: 14.09.2018

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Abstract	5
Eidesstaatliche Versicherung	6
Anteilserklärung an der etwaig erfolgten Publikation.....	7
Auszug aus der <i>Journal Summary List</i> (ISI Web of Knowledge)	9
Top-Journal Publikation	
„Changes in phagocytosis and potassium channel activity in microglia of 5xFAD mice indicate alterations in purinergic signaling in a mouse model of Alzheimer's disease”	10
Lebenslauf	27
Komplette Publikationsliste	29
Acknowledgement	30

Zusammenfassung

Mikroglia, die primären Immunzellen des zentralen Nervensystems, interagieren durch vielfache physiologische Funktionen mit Abläufen im gesunden als auch erkrankten Hirnparenchyma. Als zelluläres Bindestück zwischen dem Immunsystem und dem zentralen Nervensystem überwachen Mikroglia mit Hilfe von ramifizierten Fortsätzen ihre Umgebung, um gegebenenfalls schädliche exogene als auch endogene Abfallstoffe, Pathogene oder Zelltrümmer durch Phagozytose zu beseitigen. In der neurodegenerativen Alzheimer-Erkrankung verändern Mikroglia ihre Morphologie von einem ramifizierten zu einem amoeboiden Phänotyp und akkumulieren in der unmittelbaren Nähe von Amyloid-beta-Plaques. Aktuelle Studien zeigen physiologische Veränderungen der Mikroglia im Alzheimer Mausmodell auf, welche sich unter anderem in der Reduzierung ihrer Phagozytoseaktivität manifestiert. Unsere Forschungsergebnisse präsentieren einen Zusammenhang der verminderten Mikroglia-Phagozytoseaktivität im Alzheimer Mausmodell mit einer Störung der purinergen Mikroglia Rezeptor-Signalgebung. Die Messung der Phagozytoseaktivität von Plaque-assoziierten Mikroglia mittels Partikelaufnahme nach purinenger P2Y6-Rezeptor-Aktivierung konnte in jungen 3 bis 4 Monaten alten gesunden Kontrolltieren als auch in 5xFAD-transgenen Alzheimer Tieren, einem Mausmodell der Amyloid-beta-Plaque Ablagerung, stimuliert werden. Diese P2Y6R-vermittelte Potenzierung der Phagozytoseaktivität ist jedoch in Plaque-assoziierten Mikroglia von älteren 9 bis 11 Monaten alten 5xFAD Mäusen deutlich reduziert. Diese Beeinträchtigung der Phagozytoseaktivierung durch die P2Y6-vermittelten purinergen Signalwege ist also nicht angeboren und entwickelt sich erst in späteren Stadien der Amyloidose des 5xFAD Alzheimer Mausmodells. Des Weiteren führten wir elektrophysiologische Messungen durch. Uridindiphosphat (UDP), ein P2Y6-Rezeptor Ligand, der normalerweise Kalium-selektive Membranströme in Mikroglia induziert, hatte hierbei sehr geringe Auswirkungen auf Mikrogliazellen in enger regionaler Assoziation zu Plaques, nicht aber in plaque-freien Bereichen von 5xFAD-Tieren. Die Membraneigenschaften von Plaque-assoziierten Mikroglia waren ebenfalls verändert, und zwar in frühen und späten Stadien der Amyloidose. Unsere Forschungsergebnisse zeigen also sowohl eine Veränderung der Phagozytoseaktivität als auch der elektrophysiologischen Eigenschaften der Plaque-

assoziierten Mikroglia im 5xFAD Alzheimer Mausmodell im Kontext der purinergen Signalgebung auf.

Abstract

Microglia, the primary immune cells of the central nervous system, interact through multiple physiological functions with processes in the healthy as well as diseased brain parenchyma. As a cellular link between the immune system and the central nervous system, microglia monitor their environment by using their ramified processes to eventually eliminate harmful exogenous and endogenous waste, pathogens or cell debris through phagocytosis. In the neurodegenerative Alzheimer's disease, microglia change the activation status from a ramified to an amoeboid-activated phenotype and accumulate around amyloid beta plaques. Recent studies show a physiological change in the microglial functions in the Alzheimer mouse model, which manifests itself in the reduction of microglial phagocytosis. Our research presents a link between diminished microglial phagocytosis activity in an Alzheimer mouse model and disruption of purinergic microglial receptor signaling. The measurement of phagocytosis activity by particle uptake after P2Y6 purinergic receptor activation could be stimulated in young 3- to 4-month old healthy control animals as well as in 5xFAD-transgenic Alzheimer's animals, a mouse model of amyloid-beta-plaque deposition. However, this P2Y6R-mediated potentiation of phagocytic activity is reduced in plaque-associated microglia of older 9 to 11-month-old 5xFAD mice. This impairment of phagocytosis activation by the P2Y6-mediated purinergic signaling pathways is thus not congenital and only develops in later stages of amyloidosis of the 5xFAD Alzheimer mouse model.

Furthermore, we show that uridine diphosphate, a P2Y6 receptor ligand, induces electrophysiological microglia membrane currents that are altered in response and amplitude in microglia in close regional association with plaques, but not in plaque-free regions of 5xFAD animals. These changes were accompanied by changes in membrane properties and potassium channel activity of plaque-associated microglia in early and late stages of amyloidosis. Thus, our research results show both a change in the phagocytic activity and the electrophysiological properties of the plaque-associated microglia of the 5xFAD Alzheimer mouse in the context of purinergic signaling.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Meron Maricos, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Microglial phagocytosis and purinergic signaling in Alzheimer's disease“ als geteilter Erstautor 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 unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an der etwaig erfolgten Publikation

Meron Maricos hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Wendt S, **Maricos M***, Vana N, Meyer N, Guneykaya D, Semtner M, Kettenmann H. Changes in phagocytosis and potassium channel activity in microglia of 5xFAD mice indicate alterations in purinergic signaling in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 58: 41-53, 2017 (Geteilte Erstautorenschaft)

Ich, Meron Maricos, habe das hier zugrunde liegende Forschungsergebnis der Veränderung der Phagozytoseaktivität der Plaque-assoziierten Mikroglia im 5xFAD Alzheimer Mausmodell im Kontext der purinergen Signalgebung im Zuge meiner Promotion wie folgt aufgezeigt (**Microglial phagocytosis and purinergic signaling in Alzheimer's disease**): Die *in situ* Mikroglia Phagozytoseaktivität von transgenen 5xFAD Mäusen und Kontrolltieren aller Alters – und Behandlungsgruppen wurde durch die Präparation von akuten koronalen Maushirnschnitten der jeweiligen Tiere eingeleitet. Hierzu habe ich die aCSF-Lösungen zusammengesetzt (siehe Methods 2.2) und die Hirne per Vibratom geschnitten (siehe Methods 2.7- *In situ* phagocytosis assay). Des Weiteren habe ich alle Hirnschnitte mit fluoreszierenden Microbeads als auch den jeweiligen experimentellen Substanzen (siehe Methods 2.7- *In situ* phagocytosis assay) behandelt, die ich daraufhin immunhistochemisch (siehe Methods 2.7- *In situ* phagocytosis assay) für die konfokale Bildaufnahme der Mikrogliazellen und fluoreszierenden Microbeads (siehe Methods 2.7- *In situ* phagocytosis assay) aufbereitet habe. Die resultierenden Bildstapel wurden anschließend der dreidimensionalen Messungen der Phagozytoseaktivität mit Hilfe des Imaris Computerprogramms unterzogen, die die 3D Oberflächenrekonstruktion der Mikroglia als auch der fluoreszierenden Microbeads ermöglichte (siehe Methods 2.7- *In situ* phagocytosis assay). Anschließend wurde der Phagozytoseindex statistisch per GraphPad Prism analysiert (siehe Methods 2.7- *In situ* phagocytosis assay). Die Resultate als auch die Diskussion der *in situ* Mikroglia Phagozytoseaktivität habe ich zusammen mit Stefan Wendt unter Results 3.1 und 3.5 und Discussion 4 dokumentiert. Außerdem habe ich unter Supplementary Fig. 1 A-C das A β -Plaque Volumen als Prozentsatz des Gesamtstapelvolumens für alle Stapel über alle Bedingungen aller 9-11 Monate transgenen 5 \times FAD Mäuse per Imaris 3D Oberflächenrekonstruktion bestimmt und analysiert, wonach der Student-t-Test statistisch angewendet wurde, um die allgemeine A β -Plaque Dichte zu vergleichen.

Die Korrelationsanalyse zwischen Phagozytosenindex und Plaquevolumenprozentsatz habe ich ebenfalls in allen Konfokalaufnahmen der Kontrollgruppen aller 9- bis 11-monatigen transgenen 5 × FAD × -Mäuse analysiert. Das Supplementary Video des *In situ* phagocytosis assay zur Veranschaulichung des Analyseprozesses wurde von mir erstellt.

Unterschrift des Doktoranden

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2016** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"NEUROSCIENCES"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 258 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE	36,952	28.880	0.071380
2	NATURE NEUROSCIENCE	54,399	17.839	0.160740
3	Annual Review of Neuroscience	13,211	15.630	0.020660
4	TRENDS IN COGNITIVE SCIENCES	23,273	15.402	0.046360
5	BEHAVIORAL AND BRAIN SCIENCES	8,195	14.200	0.010940
6	NEURON	82,253	14.024	0.227070
7	PROGRESS IN NEUROBIOLOGY	12,163	13.217	0.018020
8	MOLECULAR PSYCHIATRY	17,452	13.204	0.049670
9	ACTA NEUROPATHOLOGICA	16,462	12.213	0.037060
10	BIOLOGICAL PSYCHIATRY	41,859	11.412	0.067400
11	TRENDS IN NEUROSCIENCES	19,178	11.124	0.029690
12	JOURNAL OF PINEAL RESEARCH	7,278	10.391	0.008040
13	BRAIN	48,061	10.292	0.077590
14	ANNALS OF NEUROLOGY	34,215	9.890	0.057310
15	FRONTIERS IN NEUROENDOCRINOLOGY	3,516	9.425	0.006600
16	SLEEP MEDICINE REVIEWS	4,980	8.958	0.009730
17	NEUROSCIENCE AND BIOBEHAVIORAL REVIEWS	20,452	8.299	0.047230
18	NEUROSCIENTIST	4,325	7.391	0.009890
19	Molecular Neurodegeneration	2,946	6.780	0.009540
20	CEREBRAL CORTEX	27,496	6.559	0.063240
21	NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	23,920	6.403	0.046670
22	NEUROPSYCHOLOGY REVIEW	2,478	6.352	0.004650
23	GLIA	12,781	6.200	0.021920
24	Alzheimers Research & Therapy	1,699	6.196	0.007180
25	MOLECULAR NEUROBIOLOGY	7,338	6.190	0.017440
26	NEURO SIGNALS	653	6.143	0.000670
27	CURRENT OPINION IN NEUROBIOLOGY	13,188	6.133	0.036730
28	Brain Stimulation	3,905	6.078	0.013020
29	JOURNAL OF NEUROSCIENCE	171,800	5.988	0.319910
30	BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY	10,719	5.964	0.026460
31	NEUROIMAGE	85,630	5.835	0.173210
32	PAIN	35,333	5.445	0.044460
33	NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY	3,413	5.347	0.006400
34	NEURAL NETWORKS	8,741	5.287	0.010250
35	BRAIN PATHOLOGY	4,580	5.272	0.008450
36	JOURNAL OF NEUROTRAUMA	12,787	5.190	0.021640
37	Neurotherapeutics	3,451	5.166	0.008220
38	JOURNAL OF PSYCHIATRY & NEUROSCIENCE	2,759	5.165	0.004970
39	NEUROBIOLOGY OF AGING	20,010	5.117	0.046250

Der Artikel "*Changes in phagocytosis and potassium channel activity in microglia of 5xFAD mice indicate alterations in purinergic signaling in a mouse model of Alzheimer's disease*" von Meron Maricos, Stefan Wendt, Natascha Vana, Niklas Meyer, Dilansu Guneykaya, Marcus Semtner und Helmut Kettenmann wurde am 8. Juni 2017 in der Fachzeitschrift *Neurobiology of Aging* veröffentlicht.

Unter der Adresse <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.05.027> sowie der **PMID: 28697378** kann der Artikel aufgerufen werden.

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

Publikationsliste

Wendt S, **Maricos M** *, Vana N, Meyer N, Guneykaya D, Semtner M, Kettenmann H. (2017) Changes in phagocytosis and potassium channel activity in microglia of 5xFAD mice indicate alterations in purinergic signaling in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 58: 41-53 (Shared First authorship; Journal impact factor 2016: 5,117)

Euskirchen P, Radke J, Schmidt MS, Schulze Heuling E, Kadikowski E, **Maricos M**, Knab F, Grittner U, Zerbe N, Czabanka M, Dieterich C, Miletic H, Mørk S, Koch A, Endres M, Harms C. (2017) Cellular heterogeneity contributes to subtype-specific expression of ZEB1 in human glioblastoma. *PLoS ONE* 12(9): e0185376. (Co-authorship; Journal impact factor 2016: 2.806)

Acknowledgment

Firstly, I would like to thank Prof. Dr. Helmut Kettenmann for giving me the great opportunity of pursuing my PhD in the field of cellular neuroscience. Being a member of the Kettenmann lab exposed me to many great colleagues and collaboration partners of the field, which enabled me to broaden my scientific understanding and horizon throughout my time at the MDC. I would like to express my dearest appreciation to all my past and present fellow lab colleagues, in particular Verena Haage, who has been more than just an amazing support system throughout, and the co-shared-first author Dr. Stefan Wendt, Dr. Marcus Semtner and my fellow co-authors, with whom I shared a great time throughout the publication process of our paper. I would also like to highlight the scientific and personal support from our lab members Regina Piske, Maren Wendt, Nadine Scharek, Michaela Seeger-Zofrakis and Birgit Jarchow, for which I am very grateful for. Thanks to the team of the MDC ALM facility and the NeuroCure PhD stipend funding body that have supported my studies greatly. I would also like to highlight my former supervisors Dr. Francisco Molina-Holgado, Dr. Abi Belai and Dr. Wendy Nobel, who not only ignited my interest in glial research during my BSc and MSc studies, but also tremendously supported my scientific and personal growth during my time in the UK.

To the life-long friendships of my dear friends Giovanni Tracea, Frans Georgies, Fabio Bittighofer, John Teamrat Tecele and Ahmed Khalil, who stood and will always stand by my side at all times. Thanks to all not specifically named individuals that shaped my educational path one way or another at some point in my life contributing to where I stand today. To Sutida Vestewig, whose love and support is a firm pillar of my present and future life ahead. Last but not least I would like to express my greatest and deepest love to my parents Haregu and Zerai Maricos and my siblings Absera and Nahom. I would have never been able to reach the educational level that I was fortunate enough to obtain, if it would not have been for their unconditional love, support and belief in me and my path ahead that enabled me to face and overcome any challenge in life.

Through your love I did and will always strive & thrive against all odds.