



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Development and Application of a Proximity Ligation Assay for the Quantification of Synaptic Density in Mouse Models of Alzheimer's Disease

Autor: Tatjana Mende
Institut / Klinik: Institut für Molekular- und Zellbiologie der Hochschule Mannheim
Doktorvater: Prof. Dr. M. Hafner

Mit zunehmend wachsender und alternder Bevölkerung werden in den kommenden Jahren auch neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer Krankheit zunehmen. Bisher zugelassene Medikamente zur Behandlung von betroffenen Patienten mildern jedoch nur die Symptome, sind jedoch nicht in der Lage die Krankheit zu verhindern oder zu heilen. Die grundlegenden Mechanismen der Erkrankung sind immer noch nicht vollständig geklärt, wobei es Hinweise gibt, dass das Immunsystem eine wesentliche Rolle im Krankheitsverlauf einnimmt. Mikroglia sind die ortsständigen Immunzellen des Gehirns, welche synaptische Kontakte bereits früh im Krankheitsverlauf reduzieren. Dieser Synapsenverlust steht in Verbindung mit der Abnahme kognitiver Funktionen. Daher ist es von großer Bedeutung, den synaptischen Verlust zu untersuchen, da dieser als Frühindikator der Krankheit und auch als verlässlicher Parameter zur Beurteilung der Sicherheit und Wirksamkeit neuer Medikamente dienen könnte.

In dieser Arbeit wurde daher eine robuste und sensitive Methode basierend auf dem Proximity Ligation Assay (PLA) entwickelt, um die synaptische Dichte auf Hirngewebe verschiedener Mausmodelle messen zu können. Hierfür war ein aufeinander abgestimmtes Antikörperpaar erforderlich, welches als Voraussetzung für ein erfolgreiches PLA-Signal in unmittelbarer Nähe zueinander prä- und postsynaptische Strukturen erkennt. Geeignete Paare für generelle als auch glutamaterge synaptische Marker wurden erfolgreich identifiziert und für geeignet befunden. Zudem wurden am PLA Protokoll wichtige Verbesserungen wie der Vergleich von verschiedenen Gewebeprozessierungen durchgeführt, als auch verschiedene Puffer, Probe-Kopplung, Eindeckmedien, Wärmeverteilung während der Hybridisierungsschritte, verschiedene Flüssigkeitsbarrieren und entsprechende Kontrollen getestet, sowie die Einstellungen für Scan- und Bildanalyse etabliert.

Über die Entwicklung eines robusten und zuverlässigen PLA-Protokolls zur Bestimmung der synaptischen Dichte hinaus, wurden synaptische Kontakte in gesunden jungen und adulten C57Bl6/J Mäusen bestimmt, räumlich und zeitlich aufgelöste Veränderungen in großen Hirnarealen in zwei verschieben ($A\beta$ - und Tau-transgenen) Alzheimer Mausmodellen und Veränderungen der synaptischen Dichte nach der Applikation des neurotoxischen Trimethylzinn (TMT) bestimmt. Zu den wichtigsten Erkenntnissen hierbei zählen i) eine höhere Anzahl an synaptischen Kontakten im entorhinalen Cortex in jungen Mäusen im Vergleich zu adulten, ii) eine Reduktion der synaptischen Dichte in unmittelbarer Nähe zu $A\beta$ -Plaques und iii) eine stark verringerte synaptische Dichte in der obersten Kortikalisschicht in 6-Monate alten Tau-transgenen Mäusen und iv) eine dosisabhängige Zunahme der synaptischen Dichte 72 Stunden nach der Applikation von Trimethylzinn.

Diese Beobachtungen stellen wichtige Basisdaten zur räumlichen und zeitlichen Verteilung der synaptischen Dichte in gesunden wie erkrankten Gehirnen dar und bieten insbesondere neue Erkenntnisse hinsichtlich der Verteilung der synaptischen Dichte in den kortikalen Schichten im TG4510 Mausmodell. Darüber hinaus wurden die räumlich und zeitlich aufgelösten Daten der synaptischen Dichte der neurotoxischen Studie, sowie die Daten der synaptischen Dichte in den kortikalen Schichten im Tau-transgenen Mausmodell für eine Poweranalyse verwendet, um die Tierzahl für zukünftige Behandlungsstudien zu berechnen.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit der PLA als neuartiges und wichtiges Werkzeug zur Bestimmung der synaptischen Dichte im Rahmen der Alzheimer Forschung entwickelt. Die wesentlichen Vorteile des PLA ergeben sich durch seine hohe Präzision, Stabilität, Verlässlichkeit, der Möglichkeit große Hirnareale zu analysieren, seiner einfachen Handhabung und der Kosteneffizienz gegenüber vergleichbaren Methoden, um die synaptische Dichte zu bestimmen. Die mit dem PLA generierten

räumlich und zeitlich aufgelösten Daten zur Bestimmung der synaptischen Dichte in gesunden und erkrankten Gehirnen stellen wichtige Basisdatensätze für künftige präklinische Alzheimer Studien dar.