

Medizinische Fakultät
Der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Neuropathologie

**Effekte des Kallikrein-8 Knockdowns auf die Amyloid-Plaque-Pathologie in einem
transgenen Mausmodell der Alzheimer-Krankheit**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Muhammad Raunaq Miah

Aus Bonn

2022

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/76956

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20221027-123608-6

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. med. K. Keyvani
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. D. Hermann

Tag der mündlichen Prüfung: 9. August 2022

Teile dieser Arbeit sind in der folgenden Veröffentlichung enthalten:

Herring, A., Kurapati, N.K., Krebs, S., Grammon, N., Scholz, L.M., Voss, G., **Miah, M.R.**, Budny, V., Mairinger, F., Haase, K., Teuber-Hanselmann, S., Dobersalske, C., Schramm, S., Jöckel, K.-H., Münster, Y. and Keyvani, K. (2021), Genetic knockdown of Klk8 has sex-specific multi-targeted therapeutic effects on Alzheimer's pathology in mice. *NeuroPathol Appl Neurobiol.* 2021 Aug;47(5):611-624

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	7
1.1 Die Alzheimer-Krankheit	7
1.1.1 <i>Definition und Epidemiologie</i>	7
1.1.2 <i>Klinik und Diagnosestellung</i>	7
1.1.3 <i>Ätiologie und Risikofaktoren</i>	9
1.1.4 <i>Therapie und Prävention</i>	11
1.2 Pathophysiologie der Alzheimer-Krankheit	12
1.2.1 <i>Neuropathologie der Alzheimer-Krankheit</i>	12
1.2.2 <i>Die Aβ-Plaque-Pathologie</i>	14
1.3 Die Serinprotease Kallikrein 8 (Klk8)	19
1.3.1 <i>Allgemeines</i>	19
1.3.2 <i>Klk8 und die Alzheimer-Krankheit - Vorarbeiten der Arbeitsgruppe</i>	21
1.4 Ableitung der Fragestellung/ Hypothesenbildung	22
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 Versuchstiere	25
2.1.1 <i>TgCRND8</i>	25
2.1.2 <i>KLK8-Knockout</i>	26
2.1.3 <i>Verpaarung und Generierung der Experimentaltiergeneration</i>	26
2.1.4 <i>Haltungsbedingungen</i>	30
2.1.5 <i>Verhaltensphänotypisierung</i>	30
2.1.6 <i>Probengewinnung</i>	31

2.2 Aβ-Plaque-Quantifizierung	32
2.2.1 <i>Immunhistochemische Anfärbung von Aβ-Plaques</i>	32
2.2.2 <i>Morphometrische Auswertung</i>	34
2.3 Statistik	35
2.4 Behördliche Genehmigung / Richtlinien zum Tierschutz	36
3 ERGEBNISSE.....	37
3.1 <i>Klk8-Knockdown in einem Mausmodell der Alzheimer-Krankheit reduziert insbesondere in den weiblichen Tieren das Gesamtvolumen der diffusen Plaques im Hippocampus und in den Basalganglien transgener Mäuse.....</i>	39
3.2 <i>Klk8-Knockdown in einem Mausmodell der Alzheimer-Krankheit reduziert insbesondere in den weiblichen Tieren die Anzahl diffuser Plaques in den Basalganglien aber nicht im Hippocampus.....</i>	41
3.3 <i>Klk8-Knockdown in einem Mausmodell der Alzheimer-Krankheit reduziert insbesondere in den weiblichen Tieren die durchschnittliche Größe diffuser Plaques im Hippocampus aber nicht in den Basalganglien.....</i>	43
3.4 <i>Klk8-Knockdown in einem Mausmodell der Alzheimer-Krankheit hat keinen Einfluss auf das Gesamtvolumen, die Anzahl und die durchschnittliche Größe der Kern-Plaques im Hippocampus und in den Basalganglien.....</i>	45

4 DISKUSSION	48
4.1 Diskussion der Ergebnisse	50
<i>4.1.1 Pathologische und physiologische Rolle von Aβ</i>	50
<i>4.1.2 Die Zusammenhänge zwischen Klk8 und der Aβ-Pathologie</i>	52
<i>4.1.3 Das klinisches Potenzial von Klk8 in Diagnostik und Therapie der AD</i>	54
4.2 Limitierungen	55
<i>4.2.1 Nutzung transgener Mausmodelle</i>	55
<i>4.2.2 Homologien innerhalb der Familie der Kallikreine</i>	55
4.3 Schlussfolgerung	57
5 ZUSAMMENFASSUNG	59
6 LITERATURVERZEICHNIS	60
7 ANHANG	73
<i>7.1 Abkürzungsverzeichnis</i>	73
<i>7.2 Abbildungsverzeichnis</i>	75
<i>7.3 Tabellenverzeichnis</i>	76
<i>7.4 Chemikalien, Lösungen, Puffer</i>	76
<i>7.5 Geräte und Software</i>	77
8 DANKSAGUNG	78
9 LEBENS LAUF	79

1 EINLEITUNG

1.1 Die Alzheimer-Krankheit

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Dementielle Erkrankungen sind eine der größten Herausforderungen einer alternden Gesellschaft. Sie sind gekennzeichnet durch eine Störung höherer Hirnfunktionen, unter anderem eine Verschlechterung von Gedächtnis, Sprache und Urteilsvermögen und Orientierung zu mehreren Qualitäten. Die Alzheimer-Krankheit (Alzheimer's Disease - AD) ist mit einem Anteil von 60-80% die häufigste Demenz (Bickel, 2020) und neurodegenerative Erkrankung bei Menschen über 65. Beschrieben wurde dieses klinische Syndrom Anfang des 20. Jahrhunderts durch den Psychiater und Neuroanatomen Alois Alzheimer, welcher bei einer 50-jährigen Patientin die für die Erkrankung charakteristische Symptomatik und neuropathologischen Korrelate beschrieb (Alzheimer, 1907). Neuropathologisch ist die Erkrankung unter anderem durch cerebrale Ablagerungen von Amyloid- β , einem proteolytischen Fragment des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP), und hyperphosphorylierten Tau-Protein in Form von sog. Neurofibrillary tangles (NFTs) gekennzeichnet. Weltweit sind aktuell circa 35 Millionen Menschen von der Alzheimer-Krankheit betroffen. Zum aktuellen Zeitpunkt wird die Anzahl der Demenz-Erkrankten in Deutschland auf 1,6 Millionen geschätzt – der Großteil von der Alzheimer-Krankheit betroffen. Jährlich kommen ca. 300.000 Neuerkrankungen hinzu. Aktuell geht man von einem Anstieg der an Demenz-Erkrankten in Deutschland auf bis zu 2,4 bis 2,8 Millionen Betroffenen im Jahre 2060 (Bickel, 2020). Die Alzheimer-Krankheit verursacht enorme Kosten für die Gesundheitssysteme – in Amerika beispielsweise werden die Kosten für das Gesundheitssystem allein im Jahre 2021 auf 355 Milliarden US-Dollar geschätzt (Association, 2021).

1.1.2 Klinik und Diagnosestellung

Die Alzheimer-Krankheit lässt sich in mehrere Stadien gliedern: Präklinisch und symptomfrei, milde Symptomatik im Rahmen einer MCI (Mild Cognitive Impairment) und abschließend in das Stadium der Demenz. Die klinische Manifestation und die damit verbundene Diagnosestellung erfolgt zurzeit noch in einem zumeist bereits fortgeschrittenen biologischen Stadium der Erkrankung.

Das präklinische und symptomfreie Stadium ist definiert durch definitive laborchemische oder neuroradiologische Evidenz bei fehlender kognitiver Beeinträchtigung – hier kommt es bereits vor Symptombeginn zum allmählichen Anstieg von Biomarkern wie A β (1-42) und Tau im cerebrospinalen Liquor (CSF) und neuradiologischen Markern im Sinne einer Positivität im Amyloid-PET-CT oder MRT und FDG-PET-CT (Hanseeuw et al., 2019). Hierauf folgt das Prodromalstadium der MCI, in welchem es am häufigsten zur klinischen Erstvorstellung des Patienten kommt. Im Prodromalstadium haben die Patienten zumeist bereits manifeste Gedächtnisstörungen, die vor allem das Neugedächtnis und Kurzzeitgedächtnis betreffen - zumeist begleitet von Einschränkungen in der Bewältigung anspruchsvoller Aufgaben des Alltags. In den mittleren bis späten Stadien der Krankheit folgen weiterer Abbau in den Exekutivfunktionen, Sprachverarmung und Störungen der visuell-räumlichen Verarbeitung. Im Endstadium kommt es letztlich zum vollständigen Verlust der meisten kognitiven Fähigkeiten, beispielsweise im Bereich von Sprachfunktion, Verhalten, Sehen, Orientierung, Selbstständigkeit und Motorik stark einschränkt (McKhann et al., 2011) – die Patienten sind dadurch auf eine durchgehende pflegerische Betreuung angewiesen. Die Patienten haben eine retrograde Amnesie, besonders für das Altgedächtnis, sind oft desorientiert zur Situation und Person, neigen zu semantischen Paraphasien und weisen beträchtliche Einschränkungen im Bereich der visuell-räumlichen Verarbeitung auf. Sehr belastend für die Familie oder pflegende Personen sind die hinzukommende neuropsychiatrische und neurovegetative Symptomatik, im Sinne eines Auftretens von Wahn, totaler Apathie, Inkontinenz, Störungen der zirkadianen Rhythmik und depressiven Symptomen.

Durch die fortschreitende Behinderung und dem Ausfall der körperlichen Funktionen, versterben die meisten Patienten innerhalb von 5-12 Jahren nach Einsetzen der ersten Symptome, zumeist an Infektionserkrankungen wie Pneumonien (Vermunt et al., 2019). Die NIA-AA (National Institute on Aging and Alzheimers Association) empfiehlt seit 2012 (Hyman et al., 2012) zur Diagnosestellung der Alzheimer-Krankheit unter anderem die Messung der A β -Plaques-Pathologie mittels Thal-Stadium und die Messung der Ausbreitung der Tau-Pathologie mittels Quantifizierung des NFT-Stadium nach Braak. Diese Kriterien erkennen an, dass die Alzheimer-Pathologie auch bereits ohne klinische Manifestation auftreten kann. Im Rahmen einer erst kürzlich stattgefundenen Revision dieser Diagnosekriterien wird die Alzheimer-Krankheit im Rahmen eines

wissenschaftlichen Frameworks nunmehr biologisch über ein spezifisches neuropathologisches Profil definiert (Jack et al., 2018). Durch die erneuerten Diagnose-Kriterien werden die klassischen Methoden, wie die Bestimmung von A β (1-42) oder der A β (1-42)/ A β (1-40) - Ratio im CSF, durch den Einsatz neuerer Techniken wie Amyloid-PET, Tau-PET und FDG-PET in Verdachtsfällen ergänzt. So kann die Diagnose, kombiniert mit biologischen Biomarkern (im Blutplasma und Liquor) und neuroradiologischen Biomarkern, antemortem mit guter Sicherheit gestellt werden. Neben der bildgebenden und laborchemischen Diagnostik werden gemäß der gültigen S3-Leitlinie (Deuschl et al., 2016). in Deutschland zur Diagnosestellung, neben Anamnese und körperlicher Untersuchung bei Verdacht auf eine Alzheimer-Krankheit, eine ausführliche neuropsychologische Untersuchung und Dopplersonografie der hirnersorgenden GefäÙe empfohlen. Diese breite Aufstellung ermöglicht eine ausführliche Diagnostik und unter anderem den Ausschluss sekundärer potenziell reversibler Demenzursachen.

1.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren

Trotz extensiver Forschung bleibt die genaue Ätiologie der Alzheimer-Krankheit bis zum heutigen Tag ungeklärt. Das 65. Lebensjahr wird zur Differenzierung zwischen einem frühen (EOAD – Early Onset Alzheimers Disease) und späten (LOAD – Late Onset Alzheimers Disease) Auftreten der Alzheimer-Krankheit herangezogen. Mit einem Anteil von 90-99% verzeichnet die LOAD die meisten Fälle. Diese sind hauptsächlich sporadischer oder familiär-genetischer Genese sind. Die EOAD ist zumeist mit einer familiären bzw. genetischen Vorbelastung durch hoch-penetrante und autosomal-dominant vererbte Mutationen von Genen, codierend für die Proteine APP auf Chromosom 21 und Präsenilin 1 und 2 (PSEN1 und PSEN2), welche auf Chromosom 14 und 1 liegen, vergesellschaftet (Nardini et al., 2021). Interessanterweise erkranken Patienten mit einer Trisomie des Chromosoms 21 bereits im dritten bis vierten Lebensjahrzehnt an der Alzheimer-Krankheit.

Ebenso sind Mutationen der Gene von Proteinen, die in die Prozessierung von APP involviert sind wie PSEN1 und PSEN2, mit der familiären Variante der Alzheimer-Krankheit (fAD) assoziiert sind (Cacace et al., 2016) – die fAD macht jedoch nur ca. 1% aller Erkrankungsfälle aus.

Allgemein wird bei den Risikofaktoren für die Alzheimer-Krankheit zwischen modifizierbaren und nicht-modifizierbaren Risikofaktoren unterschieden.

Es gibt klaren Anhalt für das Vorhandensein von modifizierbaren Risikofaktoren, wie reduzierte körperliche Aktivität, Rauchen und niedriger Bildungsstand und kognitive Reserve (Livingston et al., 2020). Auch das Bestehen kardiovaskulärer Vorerkrankungen wie Arteriosklerose, Bluthochdruck, Diabetes und Übergewicht steigert das Risiko für eine Alzheimer-Krankheit (Serrano-Pozo and Growdon, 2019)

Zu den nicht-modifizierbaren Risikofaktoren zählen vor allem ein hohes Alter, das weibliche Geschlecht und Mutationen (DeTure and Dickson, 2019). Größter biologischer Risikofaktor für das Auftreten der Krankheit ist das Alter. Die Prävalenz der Erkrankung bei über 65-jährigen Personen beträgt 10%, wohingegen bei Individuen älter als 80 Jahre die Prävalenz bei ca. 40% liegt (DeTure and Dickson, 2019). Der wichtigste genetische Risikofaktor für die Alzheimer-Krankheit ist das Vorhandensein eines $\epsilon 4$ -Allels auf dem Chromosom 19, welches das Apolipoproteins E (APOE) codiert (Liu et al., 2013). APOE spielt eine wichtige Rolle beim Cholesterol- und Lipid-Transport. Homozygote oder heterozygote Träger des $\epsilon 4$ -Allels haben, verglichen mit den Trägern des protektiven $\epsilon 3$ -Allels, ein 2- bis 19-fach erhöhtes Lebenszeitrisiko an der Alzheimer-Krankheit zu erkranken (Liu et al., 2013). Neben dem APOE-Gen auf Chromosom 19 konnten in den letzten Jahren durch genom-weite Assoziations-Studien weitere Gene und SNPs (Single Nucleotid Polymorphisms) auf dem gleichem Chromosom, beispielsweise ABCA7, CD33 und TOMM40 entdeckt werden, welche mit einem gesteigerten Risiko für die Alzheimer-Krankheit assoziiert werden (Bao et al., 2016). Hier geht man davon aus, dass es neben den genannten „klassischen“ genetischen Risikofaktoren auch viele weitere Risiko-Gene für die Alzheimer-Krankheit gibt (Karch and Goate, 2015), welche somit eine Erklärung für die vielen Krankheitsfälle idiopathischer und sporadischer Genese bieten könnten.

1.1.4 Therapie und Prävention

Aktuell in Deutschland zugelassene medikamentöse Therapiemöglichkeiten beschränken sich auf Wirkstoffe wie Acetylcholinesterase-Inhibitoren, zum Ausgleich des cholinergen Defizits wie Donezipil und Rivastigmin. Außerdem besteht die Möglichkeit zur Anwendung glutamaterger Antagonisten wie Memantin. Ebenso werden mehrere Medikamente zur Therapie von Begleitsymptomen (z.B. Depression) eingesetzt (Deuschl et al., 2016).

Eine kausale Therapie der Alzheimer-Krankheit bestand bis vor kurzem überhaupt nicht. Letztendlich können durch die aktuell zugelassenen Therapiemöglichkeiten nur ein Teil der Beschwerden gelindert werden. Zahlreiche Medikamentenstudien zur Findung eines geeigneten krankheitsmodifizierenden Wirkstoffes scheiterten. Trotz milliardenschwerer Investitionen konnte mehrere Jahrzehnte kein Durchbruch in der Findung eines krankheitsmodifizierenden Wirkstoffes am Menschen gemacht werden.

Durch die amerikanische Arzneimittelbehörde FDA (Federal Drug Administration) wurde erst kürzlich im Jahre 2021 der anti-amyloidogenen Antikörper Adacunumab zugelassen, welcher auch in den Phase III-Studien signifikante Reduktionen der A β -Pathologie (A β in Amyloid-PET) und Tau-Pathologie (p-tau in CSF und NFTs im Tau-PET) erzielte. In einer der beiden Phase-III-Studien konnte auch der Endpunkt der Verbesserung der Kognition erreicht werden (Cummings et al., 2021a).

Auf Basis der Erkenntnis, dass AD-Veränderungen oder Biomarker-Veränderungen im Gehirn auch bereits ohne klinisch-manifeste Symptome bereits mehrere Jahrzehnte vor dem Symptombeginn nachweisbar sind, wurden Studien mit einem präventiven Design initiiert um das Auftretens von Downstream-Elementen wie Neurodegeneration und Synapsenverlust durch eine Gabe von krankheitsmodifizierenden Wirkstoffen in präklinischen Stadien überhaupt erst zu verhindern (Bateman et al., 2017).

Wie unter 1.1.3 beschrieben, existieren viele modifizierbare Risikofaktoren für die Alzheimer-Krankheit, deren suffizientes Management eine wichtige Rolle beim Aufhalten der Progression der Erkrankung spielt. Vor allem Interventionen im Bereich Lebensstil, wie Implementation von vermehrter körperlicher Aktivität, Reduktion von Tabak- und Alkoholkonsum und eine mediterrane Diät reduzieren nachgewiesenermaßen allesamt die Amyloid-Belastung und reduzieren die Progression des Verlusts kognitiver Fähigkeiten (Livingston et al., 2020). Das Angehen dieser modifizierbaren

Risikofaktoren zeigte in Präventionsstudien, dass auf diese Weise die Inzidenz von Demenzerkrankungen um bis zu 35% reduziert werden konnte. Eine Reduktion mehrere Faktoren reduzierte dieses Risiko umso mehr (Livingston et al., 2020). Selbst die Einleitung von körperlicher Aktivität in einem sehr hohen Alter, zeigt signifikante positive Effekte auf die Pathologie der Alzheimer-Krankheit (Herring et al., 2016b).

1.2 Pathophysiologie der Alzheimer-Krankheit

1.2.1 Neuropathologie der Alzheimer-Krankheit

Die beiden wichtigsten charakteristischen neuropathologischen Diagnosekriterien der Alzheimer-Krankheit (AD) sind zum einen die extraneuronale Akkumulation von diffusen und neuritischen Amyloid-Plaques, die sich aus Fibrillen von Amyloid- β ($A\beta$)-Peptid zusammensetzen. Die $A\beta$ -Plaque-Pathologie wird im folgenden Kapitel ausführlicher behandelt.

Zum anderen ist die AD gekennzeichnet durch das Auftreten intraneuronaler Ansammlungen von so genannten neurofibrillären Tangles (NFTs), welche sich aus hyperphosphorylierten und fehlgefalteten Protein Tau (p-tau) zusammensetzen. NFTs beinhalten p-Tau in Form von paarigen, doppelhelixartig gewundenen β -Faltblatt-Strukturen, sog. paarigen helikalen Filamenten (Paired helical fragments, PHF) (Serrano-Pozo et al., 2011). Normales, nicht-phosphoryliertes Tau-Protein hat die Aufgabe an axonale Mikrotubuli zu binden und diese zu stabilisieren. Die Hyperphosphorylierung von Tau schränkt diese Fähigkeit ein und führt zu Integritätsverlust der Mikrotubuli. Folge hiervon sind Defekte im axoplasmatischen Fluss und neuronaler Konnektivität (Mandelkow and Mandelkow, 2012). Aggregiertes und hyperphosphoryliertes Tau (p-Tau) lässt sich beispielsweise innerhalb dystropher Neuriten, welche $A\beta$ -Plaques umgeben, nachweisen.

Neben Plaque- und Tau-Pathologie finden sich im Neuropil weitere begleitende pathologische Veränderungen und Umgebungsreaktionen, wie dystrophe Neuriten, Astrogliose und eine Mikroglia-Aktivierung. Insgesamt führen die pathologischen Veränderungen zu Neuronen- und Synapsenverlust und einer damit einhergehenden makroskopischen Hirnatrophie in Form einer Erweiterung der Liquorräume und Vergrößerung der Rindenfurchung und einer Atrophie von Temporallappen und

Hippocampus (DeTure and Dickson, 2019; Serrano-Pozo et al., 2011). Bemerkenswerterweise lassen sich alle pathologischen Korrelate nicht nur bei an Demenz-Erkrankten Individuen nachweisen, sondern auch in nicht-dementen Individuen. A β -Plaques beispielsweise lassen auch bei nicht von Demenz betroffenen Patienten feststellen, aber hauptsächlich erst in einem höheren Alter (Price et al., 1991).

Die Formation der A β -Plaques geht mit einer Reihe von Umgebungsreaktionen einher. So zeigen Dendriten von umgebenden Pyramiden-Neuronen, die in der unmittelbaren Peripherie der Plaques liegen, reaktive und degenerative Veränderungen, was den Kern-Plaques auch den Beinamen „neuritische Kern-Plaques“ gibt. Außerdem wird vor allem in den frühen Phasen der Plaque-Biogenese eine mikrogliale Entzündungsreaktion durch die Aggregation im Extrazellulärraum ausgelöst. Es besteht eine starke Assoziation zwischen aktivierter Mikroglia und in Fibrillen organisierten A β . Als Mikroglia werden die im Gehirn residenten Phagozyten bezeichnet. Die dichte Anlagerung von Mikroglia scheint eine Kompaktierung der A β -Plaques zu fördern. Proinflammatorische Zytokine im Rahmen der mikroglialen Antwort verursachen funktionale und strukturelle Veränderungen, welche letztendlich zur Neurodegeneration führen (Serrano-Pozo *et al.*, 2011).

1.2.2 Die A β -Plaque-Pathologie

1984 wurde durch George Glenner und Caine Wong erstmalig die Sequenz des Proteins Amyloid- β (A β) nachgewiesen. 1985 gelang der Nachweis von A β in den Plaque-Strukturen (Glenner and Wong, 1984). Weitergehende Forschungen konnten aufzeigen, dass A β seinen Ursprung in der amyloidogenen Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) hat. Hiernach wurde die sog. Amyloid-Hypothese postuliert, welcher zufolge die Aggregation von A β in Form von Plaques und ein Ungleichgewicht von A β -Produktion und Clearance das Entstehen der Alzheimer-Krankheit erklärt (Selkoe, 1989).

APP ist ein ubiquitär vorkommendes transmembranäres Protein und wird vornehmlich durch Sekretasen gespalten bzw. prozessiert. Die vorwiegend in Neuronen und Astrozyten vorkommende Isoform von APP hat eine Länge von 695- 770 Aminosäuren und wird codiert von einem Gen auf dem Chromosom 21 (Wilkins and Swerdlow, 2017). Die Prozessierung des transmembranären APP erfolgt an der Zelloberfläche. Man unterscheidet zwischen der nicht-amyloidogenen und amyloidogenen Prozessierung von APP (Wilkins and Swerdlow, 2017). Bei dem nicht-amyloidogenen Signalweg wird APP membranah zunächst durch die α -Sekretase und nachfolgend durch die γ -Sekretase prozessiert. Beim ersten Schritt entstehen als Spaltprodukte das lösliche sAPP α und das α -C-terminale Fragment (CTF α). CTF α wird im zweiten Schritt durch die γ -Sekretase in p3/p83 und die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) gespalten. Auf der anderen Seite wird im Signalweg der amyloidogenen Prozessierung das APP membranfern am N-terminalen Ende der A β -Sequenz durch die β -Sekretase (beta-site APP cleaving enzyme 1, BACE1), anstelle der α -Sekretase, gespalten. Bei diesem ersten Schritt wird die extrazelluläre und lösliche Domäne sAPP β abgespalten. In der Membran verbleibt das APP-Fragment C99/ β -C-terminales Fragment (β -CTF), welches hiernach ebenfalls durch die γ -Sekretase intramembranär prozessiert wird. Nach Abspaltung der intrazellulären Domäne AICD, welche als Transkriptionsfaktor wirkt, entstehen hierbei A β -Proteine verschiedener Kettenlänge, unter anderem A β (1-40), A β (1-42), A β (1-43) und A β (1-38). Interessant ist hier der molekulare Aufbau der γ -Sekretase: Diese setzt sich aus 4 Untereinheiten zusammen: Präseniline (PSN1 und PSN2), Nicastrin, APH1 (anterior pharynx detective), und PEN2 (presenilin enhancer 2) (Wilkins and Swerdlow, 2017).

Interessanterweise bilden die unter 1.1.3 angesprochenen Proteine PSEN1 und PSEN2 das katalytische Zentrum der hier beschriebenen γ -Sekretase (Zhang et al., 2014). Mit der EOAD assoziierte PSEN-Mutationen haben damit eine direkte Verbindung zur APP-Prozessierung (siehe 1.1.3). Die beschriebene Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.

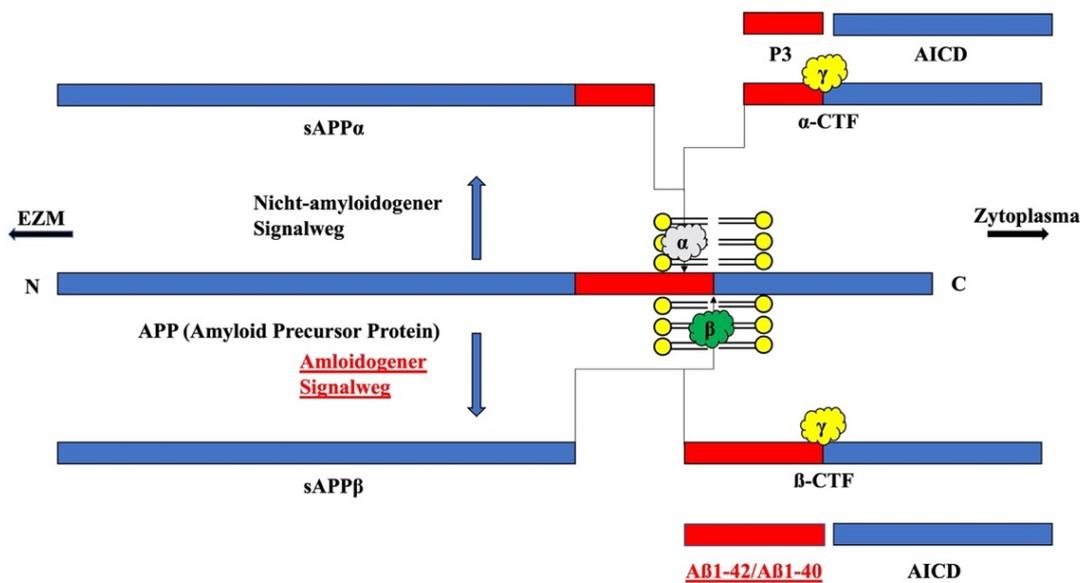


Abbildung 1: Amyloidogene und nicht amyloidogene Prozessierung des Amyloid-Vorläufer Proteins APP. Dargestellt ist die nicht-amyloidogene Prozessierung von APP durch die α -Sekretase nachfolgend durch die γ -Sekretase, wobei die Endprodukte p3 und AICD entstehen. Auf der anderen Seite wird im Rahmen des amyloidogenen Signalweges APP membrannah durch die β -Sekretase gespalten und hiernach durch die γ -Sekretase – hierbei entstehen neben dem AICD $A\beta$ -Proteine, hauptsächlich $A\beta$ 1-42 und $A\beta$ -40. Die Symbole α β γ stellen jeweils die zugehörige Sekretase dar. Modifiziert nach Takahashi et al. (2017); (Thinakaran and Koo, 2008)

Die in den Extrazellulärraum sezernierten $A\beta$ -Proteine sind fibrillogen und sehr aggregationsaffin, allen voran die längeren und hydrophoberen Moleküle $A\beta$ (1-40) und $A\beta$ (1-42) (Burdick et al., 1992).

$A\beta$ (1-42) scheint hier das toxischere Molekül zu sein und aggregiert schneller – folglich wird eine höhere Ratio von $A\beta$ (1-42)/ $A\beta$ (1-40) mit einem erhöhten Risiko für die Alzheimer-Krankheit assoziiert (Jarrett et al., 1993). $A\beta$ -Peptide sind 4 kDA lange Peptide, die zunächst in Form von Monomeren vorliegen und sich Studien zufolge in einem noch nicht abschließend geklärten, mehrschrittigen Vorgang der E nukleation zu Dimeren oder $A\beta$ -Oligomeren zusammenlagern, die sich zu Protofibrillen und

letztendlich im Rahmen eines nukleations-abhängigen Schrittes zu langen A β -Fibrillen zusammenlagern. Amyloid-Fibrillen sind fibrilläre Polypeptide, die aus einer cross- β -Struktur bestehen (Serrano-Pozo *et al.*, 2011) und sich beispielsweise durch Kongorot und Bielchovsky-Silber-Färbung und Thioflavin S anfärben lassen (Sipe and Cohen, 2000). A β -Spezies können beispielsweise in Form von Plaques im Rahmen der A β -Plaque-Pathologie oder in Form von perivaskulären Gefäßablagerungen im Rahmen der Cerebralen Amyloid-Angiopathie (CAA) oder auch in löslicher Form (Dimere oder Multimere) vorliegen.

Ergebnisse einiger Studien konnten nachweisen, dass A β -Oligomere deutlich toxischer sind als die A β -Plaques – so konnten durch Applikation von A β -Oligomeren im Tiermodell Einschränkungen in synaptischer Plastizität und Gedächtnisbildung (Shankar *et al.*, 2008) induziert werden. Man vermutet hier auch, dass Plaques als Reservoir für A β dienen könnten, aus welchem A β -Oligomere diffundieren können und so Ihre Toxizität entwickeln, oder eine protektive Wirkung über das Aggregieren toxischer A β -Spezies hat (Selkoe and Hardy, 2016).

Extrazelluläre A β -Plaques zeigen heterogenen Morphologien und lassen sich in mehrere existierende Modellen unterteilen. Basierend auf dem phasischen Auftreten der verschiedenen Plaque-Spezies wird postuliert, dass Plaques primär als diffuse Plaques bestehen, sich dann zu Kern-Plaques mit Umgebungsreaktion weiterentwickeln, und letzten Endes zu ausgebrannten Plaques weiterentwickeln (Wisniewski *et al.*, 1989).

In dieser Arbeit wird im Weiteren nur zwischen diffusen Plaques und neuritischen Kern-Plaques differenziert. Diffuse Plaques sind lockere, amorphe Amyloid-Ablagerungen von A β -Oligomeren und A β -Protofibrillen mit unscharfen Konturen, die sich gegen Kongo-Rot positiv färben und negativ gegen Thioflavin-S (siehe auch Abb. 2). Mit zunehmender Fibrillation zeigen Plaques in ihrer Entwicklung eine zunehmende kompakte Morphologie und Kontur und enthalten im Kern zunehmend β -Faltblatt-Strukturen von A β (Ikeda *et al.*, 1990). Neuritische Kern-Plaques hingegen setzen sich unter anderem aus dichten, radiär ausstrahlenden und dicht gepackten Ansammlungen von A β zusammen. Der kongophile Kern lässt sich gut mit der Bielchovsky-Silber-Färbung, der Kongorotfärbung und Thioflavin S anfärben (Rajamohamedsait and Sigurdsson, 2012). Klassische A β Kern-Plaques haben einen kondensierten Kern (Core), der sich zu großen

Teilen aus A β -Amyloid-Fibrillen und anderen Molekülen, wie lysosomalen Proteasen und Chaperone oder Hitzeschock-Proteinen (Friedrich et al., 2010) zusammensetzt.

Der äußere Bereich wird als Corona bezeichnet – diese beinhaltet zumeist A β in Form von deutlich weniger Fibrillen als im Kern (siehe auch Abb. 2). Kern-Plaques sind deutlich häufiger mit einer Umgebungsreaktion in Form von dystropher Neuriten, Synapsenverlust und reaktiver Mikroglie assoziiert als diffuse Plaques (Serrano-Pozo et al., 2011).

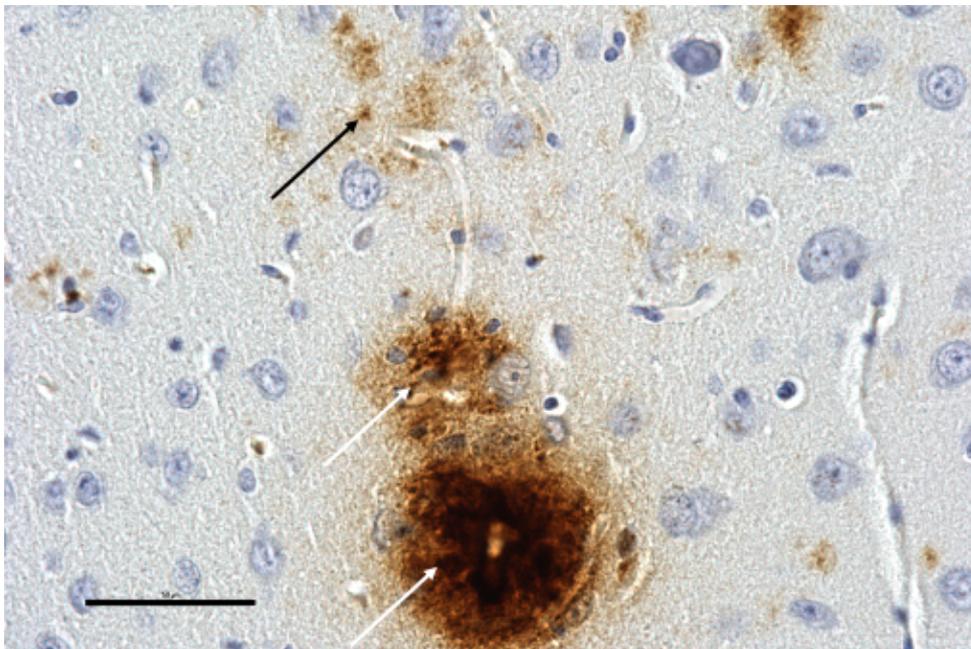


Abbildung 2: Repräsentative lichtmikroskopische Darstellung der zerebralen A β -Plaque-Pathologie in Form von diffusen Plaques (schwarze Pfeile) und Kern-Plaques (weiße Pfeile) nach immunhistochemischer Anfärbung gegen A β im TgCRND8-Mausmodell. 400-fache Vergrößerung. Schwarzer Messbalken am unteren linken Rand entspricht einer Länge von 50 μ m

Nach gängigen Ausbreitungsstadien, wie dem Thal-Stadien (Thal et al., 2002) treten A β -Plaques zunächst im Neocortex, dann im Allocortex, welcher Hippocampus und Amygdala einschließt, auf. Hiernach erreicht die Pathologie in späteren Stadien die Basalganglien und das Diencephalon. In späten Stadien findet man ebenfalls einen subkortikalen Befall von Mittelhirn, medulla oblongata, Pons und Cerebellum (Thal et al., 2002) (siehe auch Abb. 3). Daneben bestehen auch andere etablierte Staging-Systeme, wie dem Stadium nach Braak (Braak and Braak, 1991). Es gibt Anhalt dafür, dass die A β -Ablagerungen anterograd in Regionen abwandern, die neuronale Projektionen von Regionen erhalten, die schon bereits betroffen sind. (Serrano-Pozo et al., 2011; Thal et al., 2002).

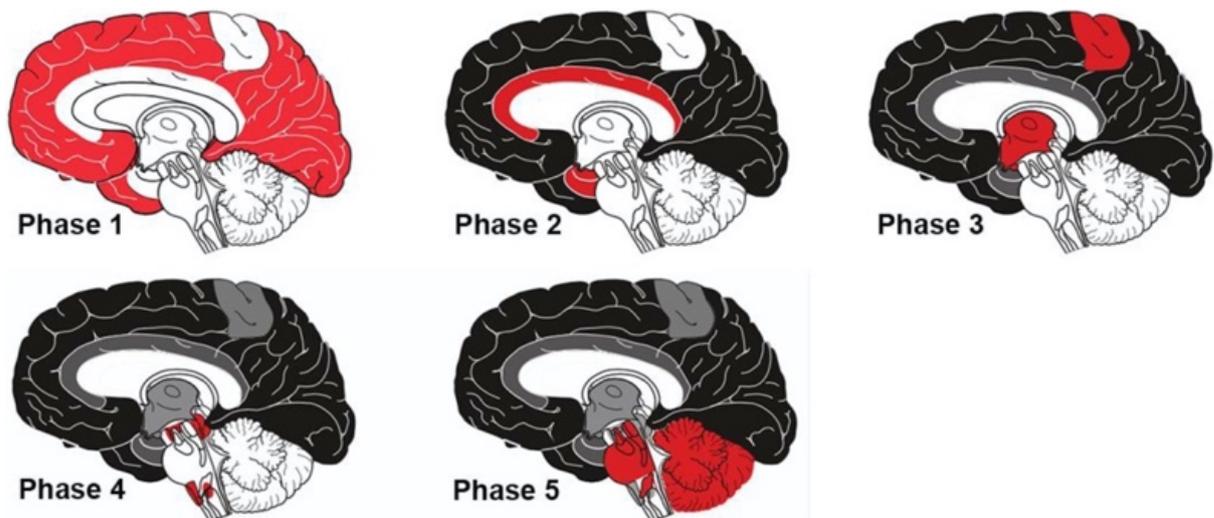


Abbildung 3: Darstellung der Ausbreitung der A β -Plaques-Pathologie nach den Thal-Stadien 1-5 1. Isocortex 2. Allocortex (entorhinaler Cortex/Hippocampus) 3. Basalganglien, Diencephalon 4. Mittelhirn, medulla oblongata 5. Pons und Cerebellum.. Übernommen aus (Walker, 2020)

1.3 Die Serinprotease Kallikrein-8

1.3.1 Allgemeines (Definition)

Kallikrein-8 (*Klk8*) auch Neuropsin genannt, ist eine Serin-Protease mit limitierter Substrat-Spezifität. Sie gehört zur Familie der Kallikreine. Codiert werden die Kallikrein-Proteasen vom größten proteatischen Gencluster des menschlichen Genoms. Serinproteasen werden in ihrer Aktivität durch Substrate wie Zymogene, Serpine, und Makroglobuline moduliert (Prassas et al., 2015). Die mRNA von *Klk8* wird in vielen Organen und vor allem in Phasen der Organogenese exprimiert. Neben Funktionen auf neuronaler Ebene scheint *Klk8* beim Erwachsenen eine wichtige Rolle in der Wundheilung der Epidermis zu spielen (Lu et al., 2009). Entdeckt wurde *Klk8* erstmalig im Jahre 1995 (Chen et al., 1995). Der Nachweis auf cerebraler Ebene erfolgte 1998 (Shimizu et al., 1998). Hier wird *Klk8* vor allem in den CA1-CA3 Arealen des Hippocampus und in der Amygdala exprimiert (Chen et al., 1995; Prassas et al., 2015), also in Arealen, die assoziiert sind mit Lernen, Gedächtnis und neuronaler Plastizität.

Klk8 wird im Extrazellulärraum durch neuronale Aktivität von der inaktiven in die aktive Form umgewandelt. In aktiver Form erfolgt durch Spaltung verschiedener Substrate eine wichtige Rolle in den Bereichen Gedächtnisbildung, Lernen, Angst- und Stressverarbeitung (Attwood et al., 2011). Im Bereich der Synapsen spaltet *Klk8* unter anderem die Substrate L1CAM (cell adhesion molecule L1), NRG1 (Neuregulin-1), FN (Fibronectin), den ErbB4-Rezeptor und die Tyrosin-Kinase EphB2 (Prassas et al., 2015). So scheint *Klk8* über Spaltung des EphB2-Rezeptors und die darauffolgende Interaktion mit dem NMDA-Rezeptor auch die neuronale Plastizität von Amygdala und Arealen im Hippocampus zu regulieren.

Beispielsweise konnten für L1CAM wichtige Effekte auf Prozesse der neuronalen Plastizität nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass aktiviertes *Klk8* im Hippocampus die Proteolyse von L1CAM steigert (Matsumoto-Miyai et al., 2003). Es fördert außerdem auch das Neuriten-Wachstum durch Erhöhung der Expression des Mikrotubuli assoziierten Protein 2 (MAP2c). Dieses ist wichtig, um die Mikrotubuli miteinander zu stabilisieren und um die dendritische Plastizität zu gewährleisten. (Poplawski et al., 2012). Ebenso mehren sich in Studien Hinweise auf eine potenzielle Rolle von *Klk8* für die Synapsenbildung und die neuronale Plastizität im alternden Gehirn, über die *Klk8*-abhängige Spaltung von L1CAM und Aktivierung von MAP2c

(Konar et al., 2018; Konar and Thakur, 2015). So erfordern beispielsweise die LTP (Langzeitpotenzierung)- und Synapsenbildung zwingend die Anwesenheit von aktivierten *Klk8*. Eine Erhöhung der extrazellulären Calcium-Konzentration während eines LTP aktiviert *Klk8* (Kishi et al., 2006). *Klk8* spaltet nach Aktivierung L1CAM, was LTPs intensiviert. (Matsumoto-Miyai et al., 2003). So konnten Studien aufzeigen, dass ein Knockout von *Klk8* die Bildung von LTPs beeinträchtigt (Tamura et al., 2006) – und geben so klare Hinweise für die wichtige Rolle von *Klk8* in der Gedächtnisbildung durch den Einfluss auf die LTPs.

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen konnten zudem Hinweise für eine mögliche Involvierung von *Klk8* in die Pathomechanismen von neurologisch-psychiatrischen Erkrankungen wie Epilepsie (Momota et al., 1998), Depressionen (Chang et al., 2016) und Multiple Sklerose (Terayama et al., 2005), aber auch Parkinson und Schizophrenie (Tamura et al., 2012) aufweisen. Hier konnten, durch eine Hemmung oder Knockdown von *Klk8*, in einzelnen Untersuchungen positive Effekte auf die Symptomausprägung von Epilepsie und Depressionen erzielt werden (Momota et al., 1998). Die genauen Mechanismen zur Beteiligung von *Klk8* sind das Objekt weiterer Studien. Auch mehren sich Hinweise für eine Verbindung zum Krankheitsbild der Schizophrenie– so ist *Klk8* in die Verstoffwechslung von NRG1 und dessen Rezeptor-Kinase ErbB4, einem wichtigen Molekül im Pathomechanismus dieser Krankheit, eingebunden. Diese Substrate spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Aktivität von Pyramidenneuronen in Hippocampus und Frontalcortex. *Klk8* spaltet in der Nähe von Synapsen NRG1, was über eine Aktivierung von ErbB4 Rezeptoren, zu einer gestörten GABA-ergen inhibitorischen Transmission und zur übersteigerten postsynaptischen Erregung führt (Tamura et al., 2012).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die physiologischen Aufgaben von *Klk8* auf molekularer, verhaltensbezogener und struktureller Ebene bei Angst, Kognition und vor allem im Rahmen der Neuroplastizität gut untersucht sind – bezüglich der Rolle von *Klk8* in pathologischen Prozessen liegen nur sporadische Befunde vor. Die genaue Rolle von *Klk8* hierbei ist Gegenstand weitergehender Untersuchungen.

1.3.2 KLK8 und die Alzheimer-Krankheit - Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Schon im Jahre 2001 stellten Shimizu-Okabe et al. (2001) fest, dass *Klk8* in Gehirnen einer kleinen Stichprobe von Alzheimer-Patienten hochreguliert ist. Außerdem ist auch bereits länger bekannt, dass Substrate von *Klk8* (siehe 1.3.1), wie L1CAM (Djogo et al., 2013), EphB2 (Cisse et al., 2011), Fibronectin (Monning et al., 1995) und NRG1 (Xu et al., 2016a) Verbindungen zum Pathomechanismus der Alzheimer-Krankheit aufweisen - doch gab es vor ersten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe keine tiefergehenden Untersuchungen zur klaren Rolle von *Klk8* im Pathomechanismus der Alzheimer-Krankheit.

Basierend auf den Ergebnissen, die eine Imbalance von *Klk8* und EphB2 in den Gehirnen von AD-Patienten nachweisen konnten – also einer Hochregulation von *Klk8* (Shimizu-Okabe et al., 2001) und einer Senkung von EphB2 (Qu et al., 2013) – initiierte unsere Arbeitsgruppe eine Studie mit der Zielsetzung, über eine Hemmung von *Klk8* die *Klk8*/EphB2-Imbalance aufzuheben und so eine Reduktion der AD-Pathologie zu erzielen. Hierzu erfolgte eine temporäre intraventrikuläre Applikation eines *Klk8*-Antikörpers für den Zeitraum von 4 Wochen.

So konnten durch diesen Ansatz, auf der Ebene eines transgenen Mausmodells, mehrere therapeutische Effekte auf primäre und sekundäre Dysfunktionen der Alzheimer-Krankheit auf molekularer und verhaltensbezogene Ebene erzielt werden – beispielsweise wurde eine Reduktion der amyloidogenen Prozessierung von *hAPP*, eine verbesserte Clearance von A β entlang der Blut-Hirn-Schranke (BBB), eine Reduktion der A β - und Tau-Pathologie, eine verbesserte Autophagie auf neuronaler Ebene, einer Verbesserung der Neuroplastizität und Gedächtnis und Reduktion von Angstverhalten nachweisen. Hierbei stellte man zudem, im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollen (murin und human), per se erhöhte Spiegel von *Klk8* in transgenen Mäusen zum Zeitpunkt P30 und in den Gehirnen humaner AD-Patienten in frühen Krankheitsstadien (CERAD A/Braak I-II – siehe auch Kapitel 1.2.3), bereits vor dem Auftreten jeglicher Amyloid-Ablagerung, fest (Herring et al., 2016a).

Zusammenfassend konnte unsere Arbeitsgruppe in mehreren Arbeiten eine Steigerung aller genannten Substrate von *Klk8*, nach kurzfristiger oder langfristiger *Klk8*-Depletion, erzielen (Herring et al., 2021; Herring et al., 2016a).

Ebenso ließen sich in weiteren Studien unserer Arbeitsgruppe erhöhte Spiegel von *Klks8* bei weiblichen Tieren im Vergleich zu männlichen Versuchstieren unabhängig vom Vorhandensein einer Alzheimer-Pathologie nachweisen. Dieser Effekt ließ sich, sowohl in vitro als auch in vivo, in einem murinen Mausmodell nachweisen (Keyvani et al., 2018). Ebenso konnte unsere Arbeitsgruppe in weiteren Untersuchungen höhere *Klks8*-Spiegel in Blut (2,5x) und Liquor (1,5x) bei MCI-Patienten als bei Alzheimer-Erkrankten nachweisen. Dies spricht dafür, dass *Klks8* ein Biomarker im präklinischen oder klinischen Stadium der AD sein könnte, da *Klks8* im CSF als Biomarker im Vergleich zu etablierten diagnostischen Parametern eine gleichwertige diagnostische Genauigkeit aufweisen konnte. Interessanterweise zeigte *Klks8* im CSF als Biomarker zur Diagnostik des Prodromalstadiums der MCI (siehe 1.1.2) eine überlegene diagnostische Genauigkeit im Vergleich zum etablierten Biomarker A β (1-42) im CSF (Teuber-Hanselmann et al., 2020). Interessanterweise befindet sich das Gen für *Klks8* auch auf dem Chromosom 19 (Bao et al., 2016), genauer in der chromosomalen Region 19q28, in welcher viele andere mit der Alzheimer-Krankheit assoziierten Gene lokalisiert sind (siehe auch 1.1.2).

1.4 Fragestellung und Hypothesenbildung

Die Forschung der letzten Jahrzehnte im Rahmen der Findung eines geeigneten therapeutischen Targets für die Alzheimer-Krankheit fokussierte sich vor allem auf Proteine, die Bestandteile der amyloidogenen Prozessierung von APP sind, wie APP selbst oder beteiligte Sekretasen und deren Bestandteile, wie BACE1 und PSEN1 und PSEN2 (siehe auch 1.1.3).

Die hierzu untersuchten Wirkstoffe konnten in Medikamentenstudien zu großen Teilen keine Evidenz im Sinne des Endpunktes einer Reduktion des Verlusts der kognitiven Fähigkeiten aufweisen (Cummings et al., 2021b).

Nun mehren sich Hinweise dafür, dass das Target um APP und die an der Prozessierung beteiligten Sekretasen zu spät in Angriff genommen wird und auch andere Targets in Betracht gezogen werden sollten. Es ist mittlerweile Konsens, dass die Veränderungen der Alzheimer-Krankheit bereits Jahrzehnte vor Eintreten der Symptomatik einsetzen und auch andere (Jack et al., 2018). Dies legt nahe, dass anhand geeigneter Biomarker bereits in einem sehr frühen präklinischen Stadium der Krankheit geeignete therapeutische Targets in Angriff genommen werden sollten (Selkoe and Hardy, 2016).

Hier stellt unsere Arbeitsgruppe erstmalig *Klk8* als potenzielles therapeutisches Target und Biomarker für die Alzheimer-Krankheit vor. Erhöhte *Klk8*-Spiegel beispielsweise lassen sogar noch vor Auftreten von β -Amyloid-Ablagerungen in Form von Plaques nachweisen (Herring *et al.*, 2016a).

Basierend auf den Vorerkenntnissen ging es im Rahmen der vorliegenden Arbeit nun darum, den Effekt einer permanenten Reduktion von *mKlk8* auf die Amyloid-Plaques-Pathologie zu untersuchen.

Bereits eine kurzfristige Hemmung von *Klk8* durch eine 4-wöchige intraventrikuläre Applikation eines Antikörpers gegen *Klk8* konnte das Gesamtvolumen und die durchschnittliche Größe (jedoch nicht die totale Anzahl) der diffusen Plaques in den Basalganglien senken, wohingegen im Bereich des Frontalkortex keine Änderungen in der Plaquebelastungen festzustellen war. Eine Reduktion der Core-Plaques-Belastung konnte weder im Areal der Basalganglien noch im Frontalcortex erzielt werden.

Dies lässt vermuten, dass *Klk8* vor allem in den frühen Schritten der Amyloid-Kaskade eine Rolle spielt (Herring *et al.*, 2016a).

Im Rahmen einer größer angelegten *Proof-of-concept*-Studie der Arbeitsgruppe, welche nun in einem weiteren Schritt die therapeutischen Effekte eines permanenten, genetisch-vermittelten *mKlk8*-Knockdowns auf verschiedene Aspekte der Alzheimer-Pathologie untersucht (Herring *et al.*, 2021), beschäftigt sich diese Arbeit mit den Effekten des *mKlk8*-Knockdowns speziell auf die Amyloid-Plaques-Pathologie.

Hierbei werden nun, durch Verpaarung von TgCRND8-Mäusen und *Klk8*-Knockout-Mäusen, transgene oder wildtypische Mäuse mit oder ohne einem Knockdown von murinen *Klk8* (*mKlk8*) gewonnen. In den Gehirnen dieser Mäuse sollen in den Arealen Hippocampus und Basalganglien die Belastung durch diffuse Plaques und Kern-Plaques in Bezug auf Gesamtvolumen, durchschnittliche Größe und Gesamtanzahl hin quantifiziert werden. Das Areal des Neocortex wurde durch andere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe ausgewertet. Durch die Auswahl dieser Areale wird mit dem Hippocampus ein Areal untersucht, welches sehr früh von der Alzheimer-Plaques-Pathologie befallen wird und sehr wichtig für Gedächtnis- und Lern-Prozesse ist (Dudai and Morris, 2013). Das Areal der Basalganglien ist kein typischer Ort der Plaques-Pathologie und wird der klassischen Stadieneinteilung der A β -Pathologie nach meist erst in einem sehr späten Stadium befallen (Thal *et al.*, 2002) (siehe hierzu auch Abbildung 3). So soll untersucht

werden ob, eine längerfristige *mKlk8*-Reduktion auch zu einer stärkeren Reduktion der A β -Pathologie führt. Ebenso soll untersucht werden, ob sich dieser Effekt geschlechterspezifisch nachweisen lässt.

Arbeitshypothese: Eine langfristige genetisch bedingte Reduktion von *mKlk8* reduziert die Amyloid-Plaque-Belastung stärker als eine kurzfristige Hemmung von 4 Wochen

Fragestellung:

- Im Allgemeinen: Lässt sich der anti-amyloidogene Effekt einer kurzfristigen *mKlk8*-Reduktion von 4 Wochen durch eine langfristige genetisch bedingte Reduktion von *mKlk8* reproduzieren oder sogar verstärken?
- Im Speziellen: Welche, ggf. geschlechterspezifischen, Effekte lassen sich durch eine permanenten genetischen Knockdown von *mKlk8* auf Volumen, Größe und Anzahl von diffusen Plaques und Kern-Plaques in den Arealen Hippocampus und Basalganglien erzielen?

2 TIERE, MATERIAL UND METHODEN

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden verblindet generiert. Bis zum Zeitpunkt der Auswertung waren dem datenerhebenden Untersucher weder der Genotyp noch das Geschlecht der Versuchstiere bekannt.

Die im folgenden beschriebenen Arbeitsschritte, also 2.1.2 (Verpaarung), 2.1.3 (Tierhaltung), 2.1.4 (Verhaltensphänotypisierung) und 2.1.5 (Probengewinnung) erfolgten als Vorarbeiten durch andere Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter am Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Essens und stellen in diesem Sinne keinen praktischen Bestandteil, jedoch Basis der hier vorliegenden Arbeit dar. Die Arbeitsschritte 2.2.1 (Immunhistochemie), 2.2.2 (Morphometrische Auswertung) und 2.3 (Statistik) wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit selbstständig durchgeführt.

2.1 Versuchstiere

2.1.1 TgCRND8

Transgene (Tg) CRND8 - (*Center for Research in Neurodegenerative Diseases*) Mäuse exprimieren beinahe ausschließlich neuronal das humane Amyloid-Vorläuferprotein 695 (*hAPP* 695) mit einer Doppelmutation (*Swedish*; KM670/671 NL + *Indiana*; V717F) unter Regulation des syrischen Hamster PrP Gen-Promoters. Diese Mutationen begünstigen die amyloidogene Prozessierung des *hAPP* durch die β - und γ -Sekretasen in die Peptide A β 40 oder A β 42. Das TgCRND8-Tiermodell basiert auf einem hybriden C57BL/6-C3H/HeJ-Hintergrundstamm. Dieser Hintergrundstamm ist die nicht-transgene Kontrolle für das TgCRND8-Modell.

Mäuse dieses Tiermodells zeigen ab 90 postnatalen Tagen (P90) im *Morris Water Maze Test* deutliche Verzögerungen im Erwerb von räumlichen Informationen und Orientierungsvermögen im Vergleich zu nicht transgenen Mäusen und spätestens ab P90 extrazelluläre Ablagerungen von A β , den so genannten A β -Plaques (Chishti et al., 2001). Tiere dieses Modells weisen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen einen zerebralen mRNA und Proteinüberschuss an murinem Kallikrein 8 (*mKlk8*) bereits ab dem Zeitpunkt P30 auf (Herring et al., 2016a). Weibliche TgCRND8-Mäuse zeigen im Vergleich zu den

männlichen Mäusen eine deutlich ausgeprägtere Alzheimer-ähnliche Pathologie und erhöhte *mKlk8*-Protein-Spiegel bereits vor dem Auftreten der ersten Plaques (Keyvani *et al.*, 2018).

Ab dem Zeitpunkt P90 lassen sich Thioflavin S-positive A β -Ablagerungen nachweisen, zum Zeitpunkt P150 bereits Kern-Plaques, welche sowohl mit Kongo-Rot als auch mit Thioflavin-S gefärbt werden können. In der Penumbra der Kern-Plaques lassen sich neben dystrophen Neuriten auch eine Mikro- und Astrogliose nachweisen. Die aufgeführten Änderungen verstärken sich mit voranschreitendem Alter (Chishti *et al.*, 2001; Vorhees and Williams, 2006).

2.1.2 KLK8-Knockout

Zur Generierung von Mäusen mit einem heterozygoten Knockdown (KLK-KD; *mKlk8*^{+/-}) für *mKlk8* wurden *mKlk8*-Knockout-Mäuse (KLK8-KO; *mKlk8*^{-/-}) eingesetzt, die vom RIKEN Bio Resource Center (B6.129P2-KLK8<tm1Shio> Stamm) erworben wurden. Diese Mäuse weisen einen homozygoten Knockout für murines *Klk8* (*mKlk8*^{-/-}) auf dem C57B/6J Hintergrund-Stamm auf. Mäuse dieses Modells sind normal lebensfähig (Davies *et al.*, 2001). Mäuse dieses Modells weisen leichte synaptische und neuronale Abnormitäten im Hippocampus auf. Diese zeigen sich in Form von vergrößerten Pyramidenzellkörper, vermehrt auftretenden Parvalbumin-positiven Zellen und einer reduzierten Dichte von asymmetrischen Synapsen (Tamura *et al.*, 2006; Yoshida, 2010).

2.1.3 Verpaarung und Generierung der Experimentaltiergeneration

Zur Generierung von Mäusen mit einem Knockdown für *mKlk8* (*mKlk8*-KD), also einem heterozygoten Genotyp für *mKlk8* (*mKlk8*^{+/-}), wurden *mKlk8*-KO-Mäuse (*mKlk8*^{-/-}) mit C3H/HeJ-Mäusen verpaart, die wildtypisch für *mKlk8* sind (*mKlk8*^{+/+}). Die resultierenden Tiere (*mKlk8*^{+/-}) haben eine um 50% reduzierte Expression von *mKlk8* im Vergleich zu wildtypischen Tieren und zudem den gleichen hybriden Hintergrundstamm C57BL/6-C3H/HeJ wie das TgCRND8-Mausmodell. Mäuse der intermediären

Generation waren normal lebensfähig und wiesen, verglichen mit der Elterngeneration, keine weiteren Pathologien auf.

Zur Generierung der Experimentaltiergeneration wurden weibliche nicht-transgene Mäuse mit einem Knockdown für *mKlk8*, also dem Genotyp *hAPP*^{-/-}; *mKlk8*^{+/-}, mit männlichen TgCRND8-Mäusen ohne *mKlk8*-Knockdown, welche den Genotyp *hAPP*^{+/-}; *mKlk8*^{+/+} ausweisen, verpaart. Durch diese Verpaarung entstanden die Mäuse der Experimentaltiergeneration, welche folgende Genotypen aufwiesen:

- (*hAPP*^{+/-}; *mKlk8*^{+/-}) Diese Mäuse sind hemizygot transgen für *hAPP*, zeigen also eine Alzheimer-ähnliche Pathologie (siehe 2.1.1), und exprimieren 50% weniger *mKlk8* als TgCRND8-Mäuse
- (*hAPP*^{+/-}; *mKlk8*^{+/+}) TgCRND8-Mäuse, für *hAPP* hemizygot, die eine Alzheimer-ähnliche Pathologie und erhöhte zerebrale mRNA- und Protein-Spiegel von *mKlk8* im Vergleich zu wildtypischen Mäusen aufweisen (Herring *et al.*, 2016a)
- (*hAPP*^{-/-}; *mKlk8*^{+/-}) Nicht transgen für *hAPP* und heterozygot für *mKlk8*, Tiere die 50% weniger *mKlk8* als Wildtyp (WT)-Mäuse exprimieren
- (*hAPP*^{-/-}; *mKlk8*^{+/+}) Nicht transgen und homozygot für *mKlk8*. Folglich Tiere, die *mKlk8* auf physiologischen Wildtyp-Level exprimieren (Wildtyp-Tiere)

Das Verpaarungsschema ist in Abbildung 4 dargestellt. Die Experimentaltiergeneration war wie die Intermediär-Generation normal lebensfähig und zeigte auch im Vergleich zu den Gründerstämmen keine weiteren Pathologien.

Die Charakterisierung des spezifischen *mKlk8*-Genotyps und des Geschlechts erfolgte bei allen Generationen zum Zeitpunkt P30 durch konventionelle PCR. Zur Unterscheidung der drei möglichen *mKlk8*-Genotypen (*mKlk8*^{-/-}, *mKlk8*^{+/-} und *mKlk8*^{+/+}) wurden drei spezifische Primer verwendet. Zur Geschlechterdifferenzierung wurde die Präsenz der *sex determining region Y (mSry)* ebenfalls über konventionelle PCR nachgewiesen.

Tiere, die heterozygot für *mKlk8* (*mKlk8*^{+/-}) waren, zeigten sowohl in der Intermediär- als auch in der Experimentaltier-Generation im Vergleich zu Tieren, die homozygot für

mKlk8 (*mKlk8*^{+/+}) waren, eine Halbierung der zerebralen Expression von murinem *Klk8*. Der Effekt des Knockdowns wurde durch quantitative real-time PCR nachgewiesen.

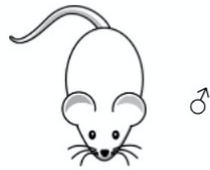
Insgesamt wurden in der Studie 8 Gruppen unterschieden, die sich aus den 4 oben genannten Genotypen der Experimentaltiergeneration und dem weiblichen und dem männlichen Geschlecht zusammensetzten. Von diesen 8 Gruppen wurden in der vorliegenden Doktorarbeit nur die 4 Gruppen (insgesamt 49 Tiere) untersucht, die hemizygot transgen für die Mutation von *hAPP* waren (*hAPP*^{+/-}). Die genaue Anzahl der Tiere jeder beschriebenen Gruppe ist in Tabelle 1 beschrieben.

	Weiblich	Männlich
<i>mKlk8</i> ^{+/-} <i>hAPP</i> ^{+/-}	12	11
<i>mKlk8</i> ^{+/+} <i>hAPP</i> ^{+/-}	12	14

Tabelle 1: Anzahl der Tiere pro Gruppe

**Generierung eines
KLK8-Knockdowns**

Gründerstamm 1



KLK8-KO
(*hAPP*^{-/-};
mKlk8^{-/-})

X

♀



C3H/HeJ
(*hAPP*^{-/-};
mKlk8^{+/+})

**Generierung der
Experimentaltiergeneration**



Gründerstamm 2



KLK8-KD
(*hAPP*^{-/-};
mKlk8^{+/-})

♀

X

♂



TgCRND8
(*hAPP*^{+/-};
mKlk8^{+/+})

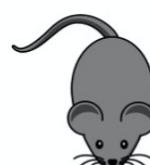
Experimentaltiergeneration



♂/♀
(*hAPP*^{+/-};
mKlk8^{+/+})



♂/♀
(*hAPP*^{+/-};
mKlk8^{+/-})



♂/♀
(*hAPP*^{-/-};
mKlk8^{+/+})



♂/♀
(*hAPP*^{-/-};
mKlk8^{+/-})

Abbildung 4: Verpaarungen zur Generierung der Experimentaltiergeneration (hier kennzeichnet der blaue Stern die Mäuse, die transgen für *hAPP* (*hAPP*^{+/-}) sind; die verschiedenen Farben der Mäuse kennzeichnen den jeweiligen Genotyp für *mKlk8*: weiß: Träger eines homozygoten Knockouts für *mKlk8* (*mKlk8*^{-/-}); hellgrau: Träger eines heterozygoten Knockdowns für *mKlk8* (*mKlk8*^{+/-}); dunkelgrau: wildtypische Expression von *mKlk8* (*mKlk8*^{+/+}); *mKlk8*-KO-Mäuse und TgCRND8-Mäuse (beide fett markiert) stellen hier die beiden Gründerstämme dar).

2.1.4 Haltungsbedingungen

Die Mäuse aller Generationen wurden im Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen gezüchtet und gehalten. Die Mäuse wurden bis zum Zeitpunkt P30 zusammen mit den Muttertieren gehalten. Nach Erreichen von P30 erfolgte die weitere Haltung ohne Muttertier bis zum Zeitpunkt P207 nach getrennten Geschlechtern in 3-4er Gruppen. Alle Mäuse wurden in Polykarbonatkäfigen des Typs Makrolon III (37,5 x 21,5 x 15 cm) gehalten. Die Darreichung von Futter und Wasser erfolgte *ad libitum*. Bezüglich der Umgebungsbedingungen wurden Raumtemperatur (22 +/- 2°C), Luftfeuchtigkeit (45 +/- 10%) und ein zwölfstündiger Hell-Dunkel-Rhythmus der Beleuchtung während der gesamten Lebenszeit konstant gehalten.

Um einen Bias-Effekt des elterlichen Genotyps auf den Phänotyp der Tiere der Experimentaltiergeneration zu minimieren, wurde jeweils die gleiche Anzahl von männlichen und weiblichen Versuchstieren eines Genotyps und Wurfs den jeweiligen Versuchsgruppen zugeordnet.

2.1.5 Verhaltensphänotypisierung

Die Mäuse der Experimentaltier-Generation wurden im fortgeschrittenen Stadium der Alzheimer-ähnlichen Pathologie zwischen den Zeitpunkten P214 und P216 verhaltensphänotypisiert. Hiervor wurden die Tiere jeweils für einen Zeitraum von mindestens einer Woche in einem invertierten Tag- und Nacht-Rhythmus habituiert.

Die Untersuchung auf Ängstlichkeitsverhalten erfolgte zum Zeitpunkt P214 im *Elevated Plus Maze-Test* (Young et al., 2008). An P215 wurden die Tiere im *Open-Field-Test* auf exploratives Verhalten und generelle Aktivität hin untersucht (Kilic et al., 2010). Die Leistung des Objektwiedererkennungsgedächtnisses wurden im *Novel Object Test* an P216 ermittelt (Herring et al., 2021).

2.1.6 Probengewinnung

Im Alter von P226 wurden die Mäuse durch Inhalation eines Gemisches von O₂ und CO₂ (1,8 l/min) betäubt. Hierbei wurde schrittweise der CO₂-Gehalt gesteigert, was die Tiere in einen tiefsedierten Zustand versetzte. In diesem Zustand wurden die Tiere abschließend durch Inhalation von purem Kohlenstoffdioxid getötet und hiernach sofort dekapitiert. Hierauf erfolgte die Entnahme der Gehirne, welche nach Befeuchtung mit NaCl am Interhemisphärenspalt (fissura longitudinalis cerebri) median mit dem Skalpell in 2 Hemisphären getrennt wurden.

Von einer Hemisphäre wurden einzelne Gehirnareale wie Cortex oder Basalganglien getrennt isoliert und im Anschluss in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert. Aus diesen Arealen wurden in weiteren Schritten RNA, DNA und Proteine extrahiert.

Zur weiteren immunhistochemischen Verarbeitung und histomorphologischen Analyse wurde die jeweils andere intakte Hemisphäre für 24 Stunden in 4%-igem Formaldehyd (Roti-Histofix 41, PO87.4 Roth, Karlsruhe) fixiert. Nach einer Dehydrierung und Einbettung in Paraffin folgte die Aufbereitung in zehn 10 µm dicke koronare Schnitte mittels Schlittenmikrotom.

Die Schnitte wurden vor den Färbungsschritten zunächst auf Objektträger aufgezogen und hiernach schrittweise bei verschiedenen Temperaturen in einem Brutschrank mit verstellbarer Temperatur getrocknet (1 Stunde bei 60°C; 2 Tage bei 40°C; 1 Tag bei 50°C).

2.2 A β -Plaque-Quantifizierung

2.2.1 Immunhistochemische Färbung von A β -Plaques

Es folgten nun immunhistochemische Schritte, um A β -Plaques indirekt über Antikörper zu detektieren und optisch sichtbar zu machen. Hierzu wurden Bestandteile des ZytoChem Plus HRP Polymer Kits (Zytomed-Systems GmbH, Berlin, Deutschland) verwendet.

Von der linken Hemisphäre wurden pro Versuchstier 10 Schnitte mit einer Schnittdicke von 10 μm im Schnitt-Abstand von je 100 μm angefärbt. Die Färbungen erfolgten mithilfe eines Färbeautomaten (TechMate Instruments, Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland).

Zunächst wurden die in Paraffin eingebetteten Schnitte durch Behandlung mit einer absteigenden Ethanol-Reihe [3 x für jeweils 10 min in Xylol; 2 x für jeweils 2 min in Ethanol (100%); 2 x für jeweils 2 Minuten in Ethanol (96%); 1x für 2 Minuten in Ethanol (70%)] entparaffiniert und abschließend mit destilliertem Wasser rehydriert und hiernach für 3 Minuten mit 100%-iger Ameisensäure bei Raumtemperatur behandelt, um eine Antigendemaskierung zu gewährleisten. Hiernach erfolgten zunächst 2 Wachschriffe mit destilliertem Wasser für jeweils 5 Minuten. Potenzielle Aktivität von endogenen Peroxidasen im Gewebe wurde durch eine 5-minütige Inkubation mit einer 3%-igen Wasserstoffperoxid-Lösung (H_2O_2 ; S2023, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) bei Raumtemperatur verhindert. Nach dieser, und allen folgenden Inkubationen im Färbeprozess, erfolgte immer ein doppelter Waschschriff mit Waschpuffer (WL583C2500, DCS, Hamburg, Deutschland) für jeweils 5 Minuten.

Diesem Schritt schloss sich eine zehnmünütige Inkubation mit einem auf Proteinen basierenden Blockierungs-Reagenz (BlockingSolution, Reagent 1, ZytoChem Plus HRP Polymer Kit, POLHRP-100, Zytomed-Systems GmbH, Berlin, Deutschland) an, um Hintergrundfärbungen durch unspezifische Bindungen der hier benutzen Antikörper zu vermeiden, gefolgt von einer 30 minütigen Inkubation mit dem Primärantikörper anti-A β -Amyloid (6F/3D, A β -Amyloid Primär-AK, M0872, Maus, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland, 1:100), welcher sich spezifisch gegen die Aminosäurereste 8-17 des A β -Peptides richtet. Vor Gabe des Sekundär-Antikörpers,

welcher an den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet, erfolgte eine Behandlung mit einem weiteren Blockierungsreagenz (PostBlock, Reagent 2, ZytoChem Plus HRP Polymer Kit, POLHRP-100, Zytomed-Systems GmbH, Berlin, Deutschland) für 20 Minuten. Nach einem erneuten Waschschrift folgte eine 30-minütige Inkubation mit dem HRP (*horse-radish peroxidase*) -Polymer (HRP-Polymer, Reagent 3, ZytoChem Plus HRP Polymer Kit, POLHRP-100, Zytomed-Systems GmbH, Berlin, Deutschland), welches sich aus Sekundärantikörper und einer gekoppelten Peroxidase zusammensetzt. Nach Abwaschen des überschüssigen HRP-Polymers erfolgte die zweimalige Behandlung mit DAB (Diaminobenzidin) - Chromogen (K5001, DAKO Deutschland, GmbH, Hamburg, Deutschland) für einen Zeitraum von jeweils 5 Minuten. Hierbei katalysiert die im HRP-Polymer enthaltene *horse radish peroxidase* bei Bindung an den Primärantikörper eine Reaktion des DAB – Chromogens, welches sich hiernach als dunkelbraunes Farbpräzipitat am Ort des Zielantigens darstellt und lichtmikroskopisch analysiert werden kann. Zur Gegenfärbung des Gewebes wurden die Schnitte mit Hämatoxylin (S2020, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland, 1:25), einem Farbstoff der Zellkerne sichtbar macht, für einen Zeitraum von 5 Minuten inkubiert. Schließlich wurde der Schnitt mit einer ansteigenden Ethanol-Reihe [1 x für 2 Minuten in Ethanol (70%); 2 x für jeweils 2 Minuten ein Ethanol (96%); 2 x für jeweils 2 Minuten mit Ethanol (100%); 3 x für jeweils 10 Minuten in Xylol)] und danach mit dem Eindeckmedium Vitro-Clud® (R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland) behandelt, so dass der jeweilige Schnitt mittels eines Deckglases konserviert und der weiteren stereologischen Auswertung zugeführt werden konnte.

2.2.2 Morphometrische Auswertung

Die morphometrische beziehungsweise stereologische Quantifizierung der A β -Plaque-Belastung erfolgte in den Arealen Basalganglien und Hippocampus mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Nikon Eclipse 80i9, Niko, Tokio, Japan), einer Kamera (3/4“ chip, 36-bit color, DV-20, MicroBright-Field, Williston, USA) und der Stereo Investigator Software (Version 11, MicrobrightField, Wilston, VT, USA) bei konstanten Licht und Filterbedingungen.

Zunächst wurde mittels der Software individuell die Kontur der Basalganglien oder des Hippocampus in 20-facher Vergrößerung nachgezeichnet und somit der jeweilige Untersuchungsbereich markiert (siehe Abbildung 5).

Bei der stereologischen Untersuchung der A β -Plaque-Belastung wurde zwischen diffusen Plaques und Kern-Plaques differenziert.

Es erfolgte die getrennte Erfassung des Volumenanteils (%) der diffusen und Kern-Plaques im Area-Fraktion-Fraktionator-Modus der Stereo Investigator Software. Die Quantifizierung der jeweiligen Plaque-Anzahl erfolgte im Fraktionator-Programm der Stereo Investigator Software. Die Plaque-Quantifizierung wurde bei 200-facher Vergrößerung durchgeführt. Aus dem Plaque-Volumenanteil (% des gesamten Gehirnvolumens) und der Plaque-Anzahl (n pro mm²) wurde die durchschnittliche Plaque-Größe (μm^2) errechnet. Sowohl Fraktionator- als auch Area-Fraktionator-Modus liefen bei einem konstanten Zählrahmen von 250 x 250 μm bei einer Rastergröße von 375 x 375 μm . Die bei der Untersuchung ermittelten Level der Plaque-Belastungen wurden in Verhältnis zu dem Gesamt-Volumen des untersuchten Gehirnareals gesetzt.

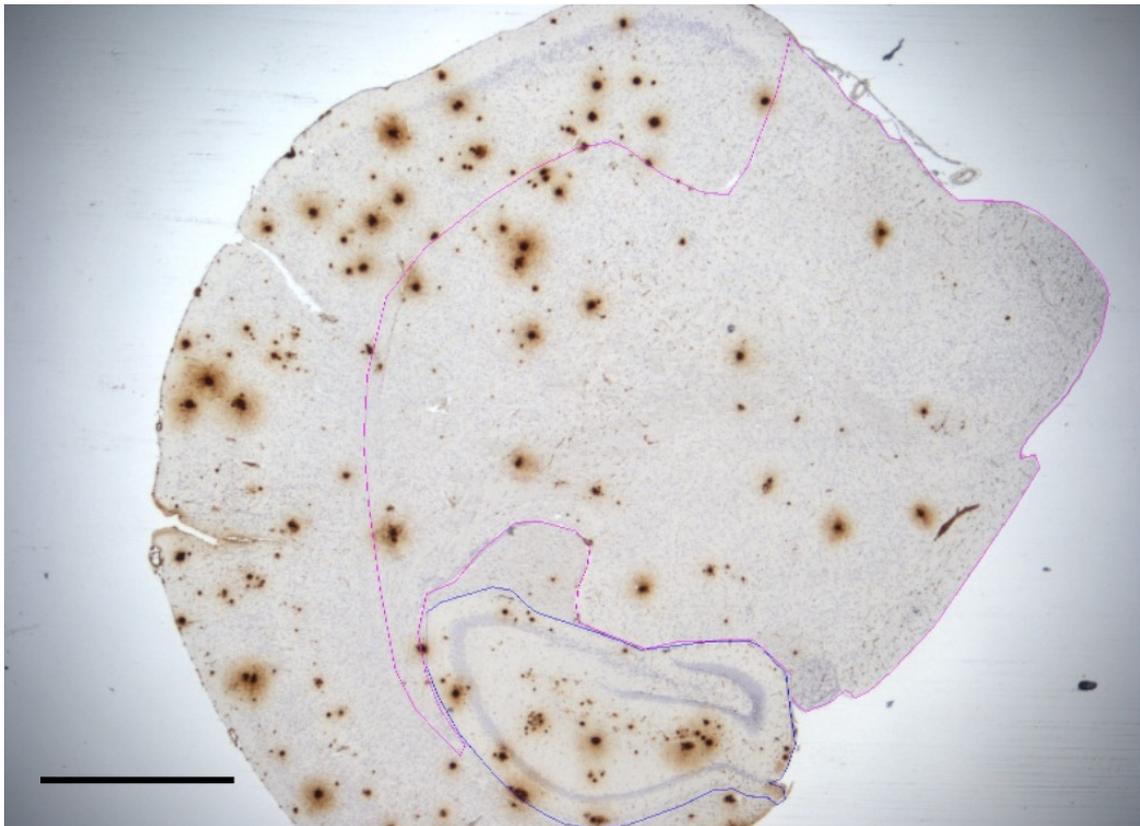


Abbildung 5: Lichtmikroskopische Darstellung eines exemplarischen Präparats mit Markierung der in dieser Arbeit untersuchten Gehirnareale. Eingezeichnet sind in blau das Areal des Hippocampus und in pink das Areal der Basalganglien. Ausgespart ist hier das Areal des Neocortex. Lichtmikroskopische Darstellung in 20-facher-Vergrößerung. Schwarzer Messbalken am unteren linken Rand entspricht einer Länge von 1mm.

2.3 Statistik

Die erhobenen Daten dieser Arbeit werden in Form des Mittelwertes mit dem Standardfehler (SEM, standard error of the mean) angegeben. Die Normalverteilung der erhobenen Datensätze wurde mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests und des Q-Q-Plot-Tests (Quantil-Quantil-Diagramm) untersucht. Zur Überprüfung der Varianzhomogenität wurde der Levene-Test eingesetzt. Bei Normalverteilung erfolgte die Analyse der Mittelwerte von 2 Gruppen mithilfe des Student's t-test, bei Analyse der Mittelwerte von 4 Gruppen durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) mit anschließender post-hoc Analyse mittels LSD-Test. Als Zwischensubjektfaktoren

wurden hier der *mKlk8*-Genotyp (*mKlk8*^{+/+} vs. *mKlk8*^{+/-}) und das Geschlecht (männlich vs. weiblich) festgesetzt. Bei nicht parametrischen Datensätzen wurde der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen wurde bei $p < 0,05$ (*) anerkannt, hochsignifikant bei $p < 0,01$ (**), und höchstsignifikant bei $p < 0,001$ (***). Ein Trend (T) wurde bei $0,1 > p \geq 0,05$ festgelegt. Alle statistischen Tests wurden mit der Software SPSS 22 (IBM Company, New York, USA) durchgeführt.

2.4 Behördliche Genehmigung / Richtlinien zum Tierschutz

Zur Durchführung von Zucht, Haltung, Tötung und Organentnahme lag eine Bewilligung seitens des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) des Landes Nordrhein-Westfalen vor (AZ 84-02.04.2014.A488). Ebenso wurden internationale Standards für Tierhaltung gemäß der Tierschutzrichtlinien der Europäischen Union (2010/63/EU) und der ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) – Richtlinien, eingehalte

3 ERGEBNISSE

In dieser Dissertationsschrift wurden die Effekte einer genetisch-vermittelten permanenten Reduktion von Kallikrein-8 auf die Amyloid-Plaque-Pathologie im fortgeschrittenen Stadium der Alzheimer-ähnlichen Pathologie (P226) in einem transgenen Mausmodell der Alzheimer-Krankheit untersucht.

In der stereologischen Auswertung wurden für beide Geschlechter jeweils das Volumen, die Anzahl und die Größe von diffuser Plaques und neuritischen Kern-Plaques im Hippocampus und in den Basalganglien quantifiziert.

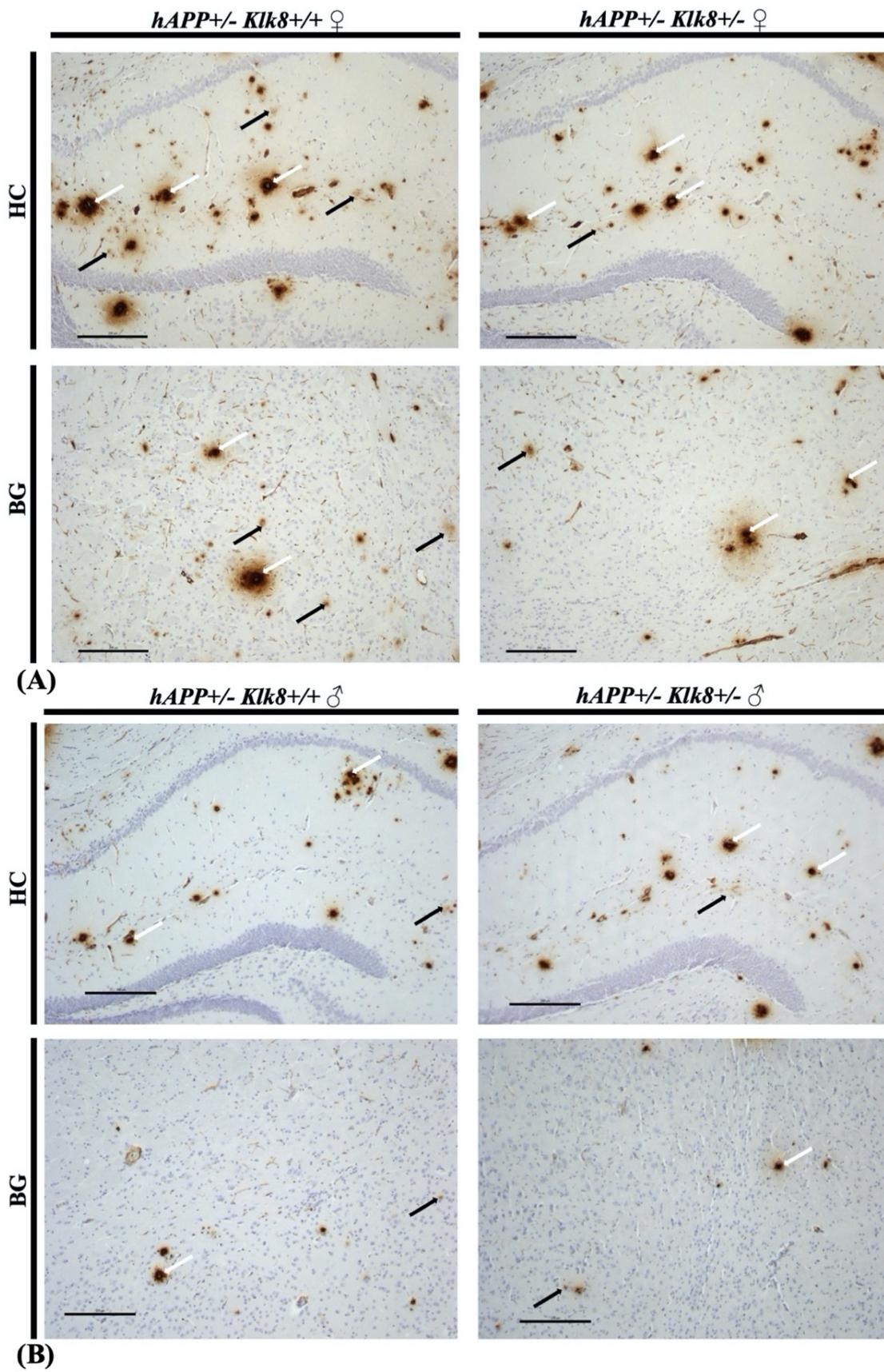


Abbildung 6: Repräsentative lichtmikroskopische Darstellungen von A β -Plaques im Hippocampus und Basalganglien von transgenen Tieren [weiblich (A); männlich (B)] ohne (*hAPP*^{+/-}; *mKlk8*^{+/+}; ♀ und ♂) und mit (*hAPP*^{+/-}; *mKlk8*^{+/-}; ♀ und ♂) *mKlk8*-Knockdown nach immunhistochemischer Anfärbung gegen A β in 100-facher Vergrößerung mit Markierung von Kern-Plaques (weiße Pfeile) und diffusen Plaques (schwarze Pfeile). HC: Hippocampus, BG: Basalganglien. Schwarze Messbalken am unteren linken Rand entsprechen jeweils einer Länge von 200 μ m. Die zugehörige Abbildung ist auf der vorherigen Seite zu finden.

3.1 *Klk8*-Knockdown in einem Mausmodell der Alzheimer-Krankheit reduziert insbesondere in den weiblichen Tieren das Gesamtvolumen der diffusen Plaques im Hippocampus und in den Basalganglien transgener Mäuse

Durch immunhistochemische Anfärbung mit nachfolgender stereologischer Quantifizierung der Plaque-Belastung konnte diese Arbeit nachweisen, dass bei transgenen Mäusen in einem fortgeschrittenen Stadium der Alzheimer-ähnlichen Pathologie ein genetisch-induzierter *mKlk8*-Knockdown eine Verminderung des totalen Volumens diffuser Plaques sowohl im Hippocampus als auch in den Basalganglien verursachte.

Bezüglich der Volumina (%) diffuser Plaques ließ sich eine Reduktion sowohl im Hippocampus (-23%; p: 0,042; *mKlk8*^{+/+}: 0,165 \pm 0,014, *mKlk8*^{+/-}: 0,127 \pm 0,013) als auch in den Basalganglien (-26%; p: 0,029; *mKlk8*^{+/+}: 0,03 \pm 0,003, *mKlk8*^{+/-}: 0,022 \pm 0,002) in Folge des *mKlk8*-Knockdowns feststellen (siehe Abbildungen 6 und 7A).

In der geschlechtergetrennten Analyse ließ sich feststellen, dass transgene weibliche Tiere mit einem Knockdown für *mKlk8* deutlich geringere Werte für das Volumen diffuser Plaques im Vergleich zu weiblichen transgenen Tieren ohne einen Knockdown von *mKlk8* im Areal des Hippocampus (-30%; p: 0,012; ♀ *mKlk8*^{+/+}: 0,211 \pm 0,018, ♀ *mKlk8*^{+/-}: 0,147 \pm 0,021) und den Basalganglien (-30%; p: 0,042; ♀ *mKlk8*^{+/+}: 0,035 \pm 0,004, ♀ *mKlk8*^{+/-}: 0,024 \pm 0,003) aufweisen (siehe Abbildungen 6 und 7B).

Selbiger Effekt ließ sich nicht bei den männlichen Tieren reproduzieren. So ließ sich durch einen *mKlk8*-Knockdown keine signifikante Reduktion des Volumens diffuser Plaques sowohl im Hippocampus (p > 0,1; ♂ *mKlk8*^{+/+}: 0,125 \pm 0,013, ♂ *mKlk8*^{+/-}:

0,105 ± 0,011); als auch in den Basalganglien ($p > 0,1$; ♂ *mKlk8*^{+/+}: 0,026 ± 0,004, ♂ *mKlk8*^{+/-}: 0,019 ± 0,002) der männlichen Tiere erzielen (siehe Abbildungen 6 und 7B).

Zusätzlich ließ sich in dieser geschlechtergetrennten Analyse beim Vergleich zwischen transgenen weiblichen und männlichen Tieren ohne einen Knockdown für *mKlk8* feststellen, dass die männlichen Tiere im Areal des Hippocampus hochsignifikant niedrigere Werte für das Volumen diffuser Plaques aufweisen (-41%; $p: 0,002$; ♀ *mKlk8*^{+/+}: 0,211 ± 0,018, ♂ *mKlk8*^{+/+}: 0,125 ± 0,013; vgl. Abbildungen 6 und 7B). Dieser Befund bestätigt Ergebnisse einer früheren Publikation unserer Arbeitsgruppe (Keyvani *et al.*, 2018).

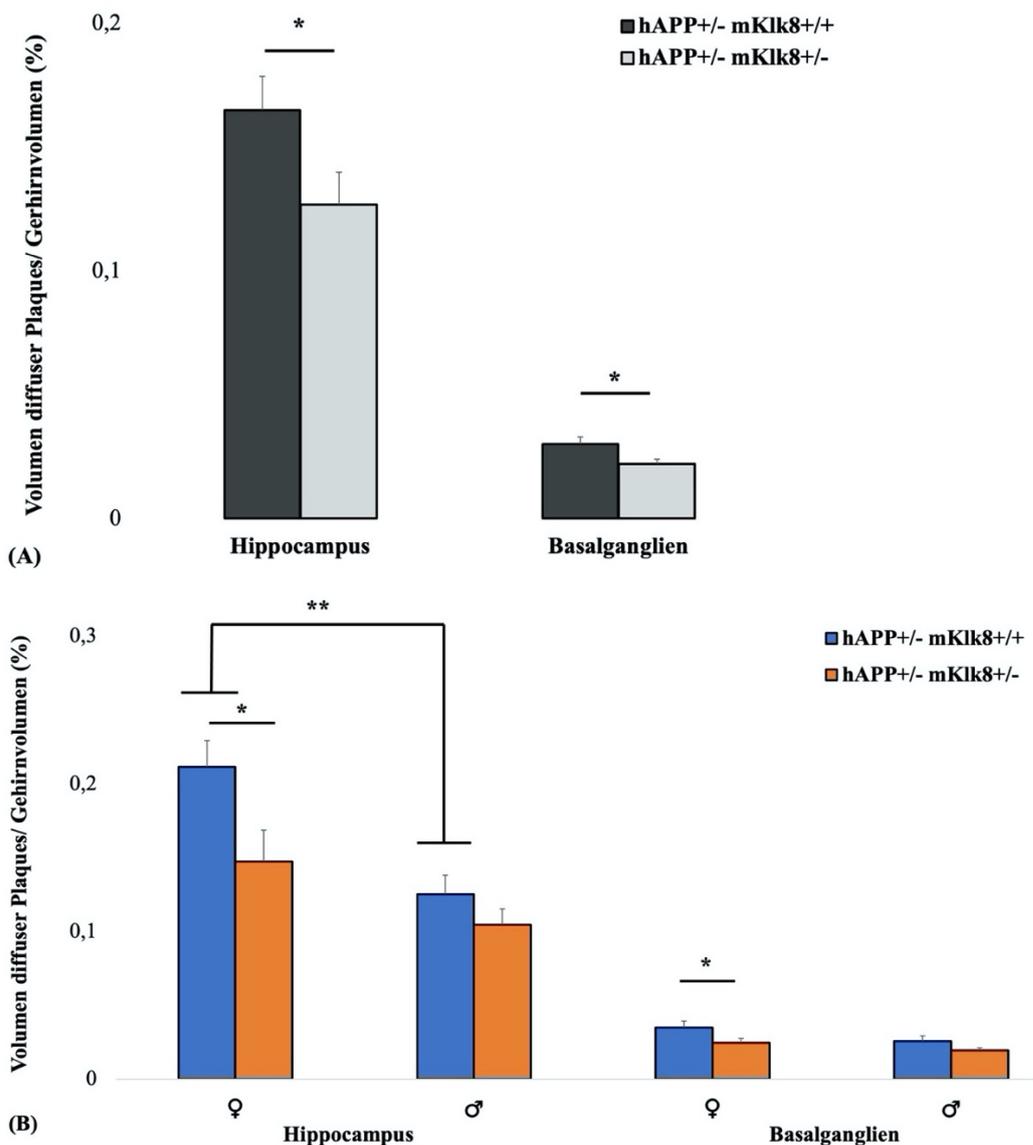


Abbildung 7: *Stereologische Quantifizierung des prozentualen Volumen-Anteils der diffusen Plaques in Hippocampus und Basalganglien bei transgenen weiblichen (♀) und männlichen (♂) Mäusen (hAPP+/-) mit (mKlk8+/-) oder ohne (mKlk8+/+) mKlk8-Knockdown. (A) Eine permanente mKlk8-Reduktion führt in einem transgenen Mausmodell zu einer Reduktion der Aβ-Pathologie durch Reduktion des Volumens diffuser Plaques in Hippocampus und Basalganglien. $p < 0,05 = *$ (Statistik mittels Mann-Whitney-U-Test für das Areal des Hippocampus und Student's t-Test für das Areal der Basalganglien). (B) Eine signifikante Reduktion des Volumen-Anteils diffuser Plaques lässt sich auch geschlechterspezifisch bei den weiblichen Tieren mit mKlk8-Knockdown im Vergleich zu weiblichen Tieren ohne mKlk8-Knockdown feststellen, jedoch nicht bei den männlichen transgenen Tieren. $p < 0,05 = *$ (Statistik mittels Mann-Whitney-U-Test für das Areal des Hippocampus; Statistik mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) mit anschließender post-hoc Analyse mittels LSD-Test für das Areal der Basalganglien). In der geschlechtergetrennten Analyse der Tiere ohne einen Knockdown von mKlk8 zeigen die weiblichen Tiere im Areal des Hippocampus hochsignifikant niedrigere Werte für den prozentualen Volumen-Anteil diffuser Plaques als die männlichen Tiere. $p < 0,01 = **$ (Statistik mittels Mann-Whitney-U-Test). Dargestellt werden die Mittelwerte \pm SEM (hAPP+/- mKlk8+/- $n=23$ [♀ $n=12$, ♂=11], hAPP+/- mKlk8+/+ $n=26$ [♀ $n=12$, ♂=14]). Die zugehörige Abbildung ist auf der vorherigen Seite zu finden.*

3.3 Klk8-Knockdown in einem Mausmodell der Alzheimer-Krankheit reduziert insbesondere in den weiblichen Tieren die Anzahl diffuser Plaques in den Basalganglien aber nicht im Hippocampus

In den Basalganglien transgener Tiere ließ sich tendenziell eine Reduktion der Anzahl diffuser Plaques (n/mm²) in Folge des mKlk8-Knockdowns feststellen (-21%, $p: 0,063$; mKlk8+/+: $1,442 \pm 0,121$, mKlk8+/-: $1,135 \pm 0,098$; siehe Abbildungen 6 und 8A). Einen Effekt des mKlk8-Knockdowns auf die Anzahl der diffusen Plaques ließ sich im Areal des Hippocampus nicht nachweisen ($p > 0,1$; mKlk8+/+: $7,358 \pm 0,556$, mKlk8+/-: $6,732 \pm 0,741$; siehe Abbildungen 4 und 6A).

Wie bei der Betrachtung der Volumina zeigte sich auch bei der Anzahl diffuser Plaques auf der Ebene einer geschlechtergetrennten Analyse, dass die weiblichen Tiere mit einem mKlk8-Knockdown signifikant niedrigere Werte für die Anzahl der diffusen Plaques in den Basalganglien zeigen als die weiblichen transgenen Tiere ohne einen Knockdown (-26%; $p: 0,04$; ♀ mKlk8+/+: $1,749 \pm 0,156$, ♀ mKlk8+/-: $1,299 \pm 0,147$; siehe Abbildung 6A und 8B). Eine signifikante Änderung der Anzahl diffuser Plaques in den

Basalganglien ließ sich bei den männlichen Tieren nicht feststellen ($p > 0,1$; ♂ $mKlk8^{+/+}$: $1,179 \pm 0,148$ ♂ $mKlk8^{+/-}$: $0,955 \pm 0,102$; vgl. Abbildungen 6B und 8B).

Zusätzlich ließ sich in dieser geschlechtergetrennten Analyse beim Vergleich zwischen transgenen weiblichen und männlichen Tieren ohne einen $mKlk8$ -Knockdown feststellen, dass die männlichen Tiere im Areal der Basalganglien hochsignifikant niedrigere Werte für die Anzahl diffuser Plaques aufweisen ($-32,6\%$; $p: 0,008$; ♀ $mKlk8^{+/+}$: $1,749 \pm 0,156$, ♂ $mKlk8^{+/+}$: $1,179 \pm 0,148$; siehe Abbildungen 6 und 8B).

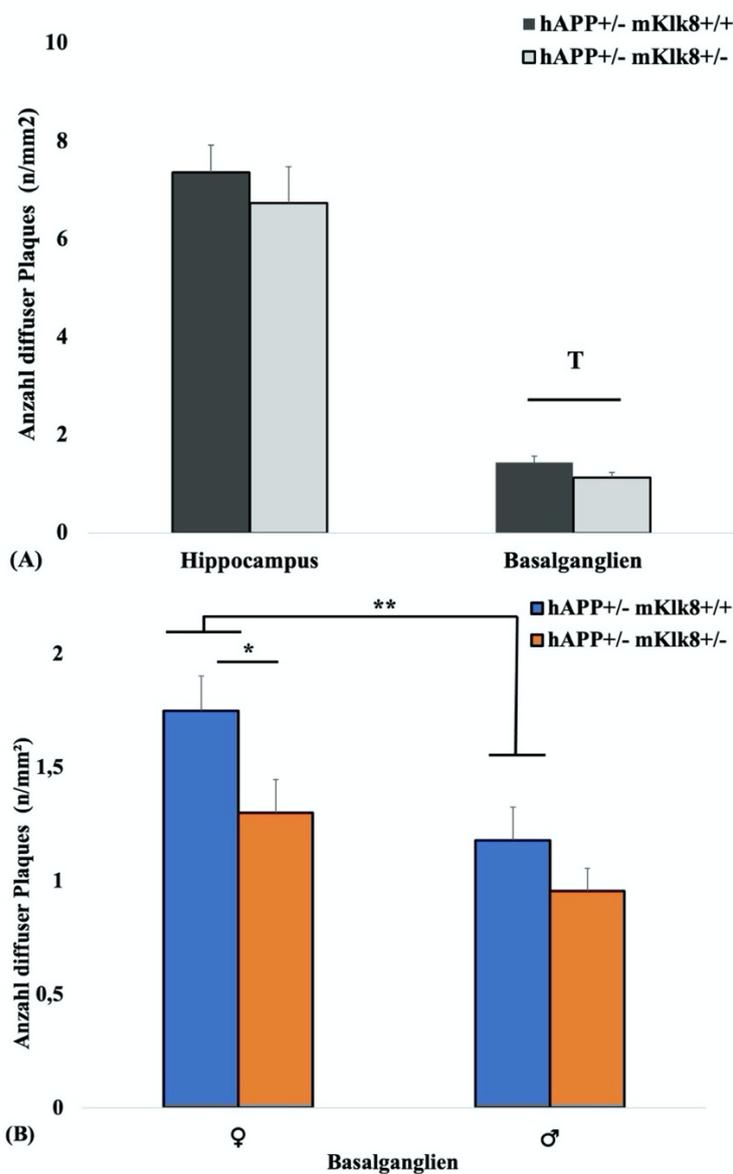


Abbildung 8: Stereologische Quantifizierung der Anzahl der diffusen Plaques in Hippocampus und Basalganglien bei transgenen weiblichen (♀) und männlichen (♂)

Mäusen (*hAPP*^{+/-}) mit (*mKlk8*^{+/-}) oder ohne (*mKlk8*^{+/+}) *mKlk8*-Knockdown. **(A)** Eine permanente *mKlk8*-Reduktion führt in einem transgenen Mausmodell tendenziell zu einer Reduktion der A β -Pathologie durch Reduktion der Anzahl der diffusen Plaques im Areal der Basalganglien, nicht jedoch im Hippocampus. $p > 0,05 = T$ (Statistik mittels Mann-Whitney-U-Test für das Areal des Hippocampus und des Student's t-Test für das Areal der Basalganglien). **(B)** In den Basalganglien zeigt sich in der geschlechterspezifischen Betrachtung der transgenen Tiere mit oder ohne *mKlk8*-Knockdown eine signifikante Reduktion der Anzahl der diffusen Plaques bei weiblichen Tieren mit einem Knockdown von *mKlk8*, jedoch nicht bei den männlichen Tieren. $p < 0,05 = *$ (Statistik mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) mit anschließender post-hoc Analyse mittels LSD-Test). In der geschlechtergetrennten Analyse der Tiere ohne einen Knockdown von *mKlk8* zeigen die weiblichen Tiere im Areal der Basalganglien hochsignifikant niedrigere Werte für den prozentualen Volumen-Anteil diffuser Plaques als die männlichen Tiere. $p < 0,01 = **$ (Statistik mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) mit anschließender post-hoc Analyse mittels LSD-Test). Dargestellt werden die Mittelwerte \pm SEM (*hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/-} $n=23$ [♀ $n=12$, ♂ $=11$], *hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/+} $n=26$ [♀ $n=12$, ♂ $=14$]). Die zugehörige Abbildung ist auf der vorherigen Seite zu finden.

3.4 *Klk8*-Knockdown in einem Mausmodell der Alzheimer-Krankheit reduziert insbesondere in den weiblichen Tieren die durchschnittliche Größe diffuser Plaques im Hippocampus aber nicht in den Basalganglien

Bei der Analyse der durchschnittlichen Größe diffuser Plaques (μm^2), konnte man eine Reduktion im Areal des Hippocampus bei transgenen Mäusen mit einem *mKlk8*-Knockdown im Vergleich zu transgenen Tieren ohne einen *mKlk8*-Knockdown feststellen (-21%; $p: 0,022$; *mKlk8*^{+/+}: $236,622 \pm 10,036$, *mKlk8*^{+/-}: $185,931 \pm 15,423$) Eine signifikante Reduktion der totalen Größe der diffusen Plaques im Areal der Basalganglien konnte man nicht nachweisen. ($p > 0,1$; *mKlk8*^{+/+}: $208,15 \pm 16,915$, *mKlk8*^{+/-}: $204,09 \pm 11,451$) (siehe Abbildungen 6 und 9A).

Wie auch bei der Untersuchung der beiden vorigen Parameter, ließ sich bei der geschlechtergetrennten Analyse in weiblichen Tieren eine signifikante Reduktion der Größe der diffusen Plaques nach *mKlk8*-Knockdown im Hippocampus feststellen (-23,3%; $p: 0,044$; ♀ *mKlk8*^{+/+}: $239,696 \pm 18,599$, ♀ *mKlk8*^{+/-}: $183,761 \pm 23,468$) nicht jedoch in männlichen transgenen Tieren ($p > 0,1$; ♂ *mKlk8*^{+/+}: $223,796 \pm 10,270$, ♂ *mKlk8*^{+/-}: $188,297 \pm 19,584$) (vgl. Abbildungen 6 und 9B).

Im Gegensatz zu den Parametern Volumen-Anteil und Anzahl diffuser Plaques, lässt sich beim Parameter Größe diffuser Plaques im Hippocampus kein signifikanter Unterschied in der geschlechtergetrennten Analyse zwischen weiblichen und männlichen Tieren ohne Knockdown von mKlk8 nachweisen ($p: > 0,1$, ♀ $mKlk8^{+/+}$: $239,696 \pm 18,6$, ♂ $mKlk8^{+/+}$: $223,796 \pm 10,270$) (vgl. Abbildung 9B).

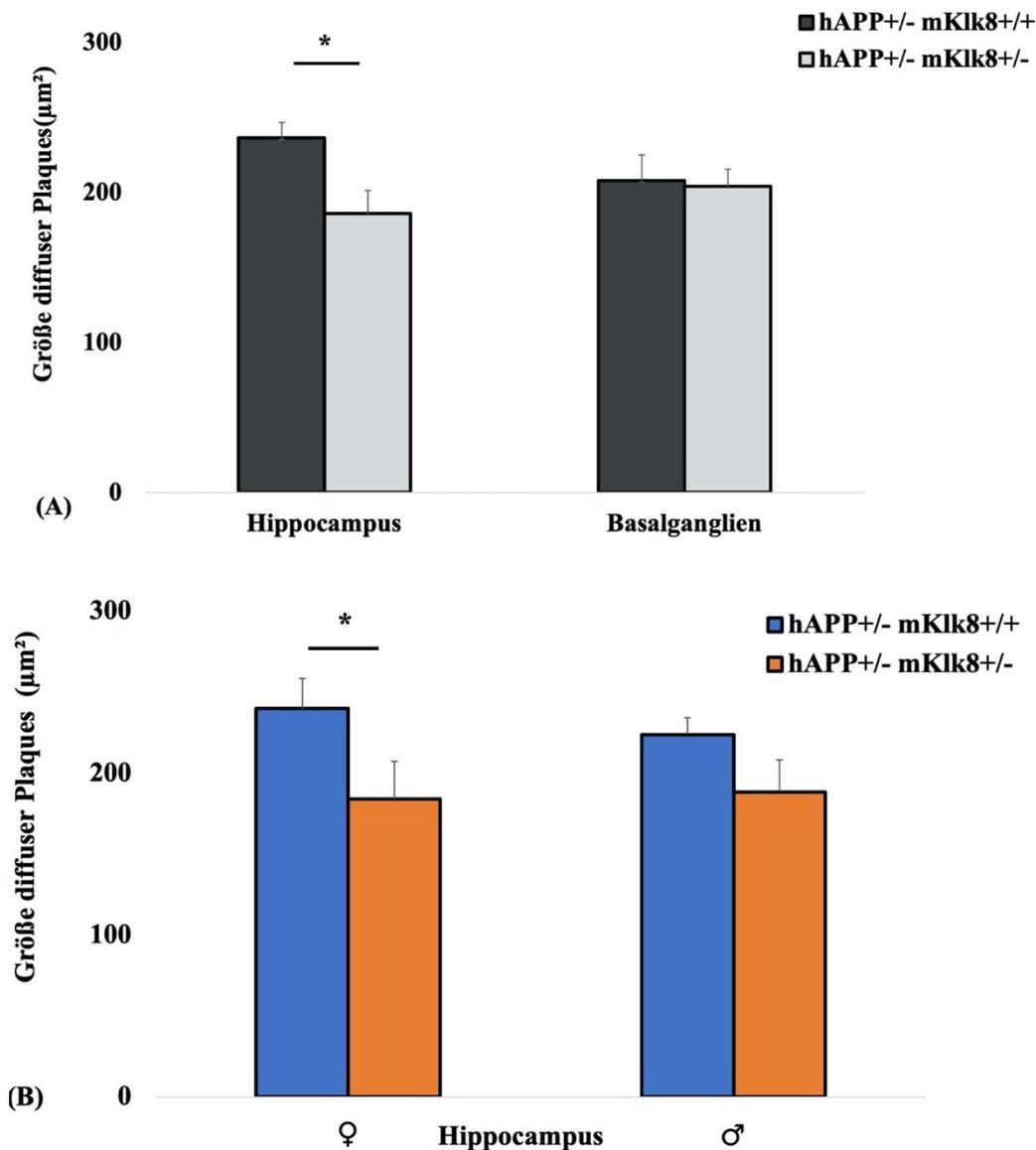


Abbildung 9: Stereologische Quantifizierung der Gesamtgröße der diffusen Plaques in Hippocampus und Basalganglien bei transgenen weiblichen (♀) und männlichen (♂) Mäusen ($hAPP^{+/-}$) mit ($mKlk8^{+/-}$) oder ohne ($mKlk8^{+/+}$) $mKlk8$ -Knockdown. (A) Eine permanente $mKlk8$ -Reduktion führt in einem transgenen Mausmodell zu einer Reduktion der $A\beta$ -Pathologie durch Reduktion der Größe der diffusen Plaques im Areal des Hippocampus, nicht jedoch in den Basalganglien. $p < 0,05 = *$ (Statistik mittels Student's

t-Test für beide untersuchte Areale). **(B)** Diese signifikante Abnahme der totalen Größe der diffusen Plaques im Hippocampus bei Tieren mit *mKlk8*-Knockdown lässt sich auch im geschlechterspezifischen Vergleich in weiblichen Tieren, nicht jedoch in männlichen Tieren nachweisen. $p < 0,05 = *$ (Statistik mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) mit anschließender post-hoc Analyse mittels LSD-Test). Dargestellt werden die Mittelwerte \pm SEM (*hAPP* \pm *mKlk8* \pm $n=23$ [♀ $n=12$, $\text{♂}=11$], *hAPP* \pm *mKlk8* \pm $n=26$ [♀ $n=12$, $\text{♂}=14$]).

3.5 *Klk8*-Knockdown in einem Mausmodell der Alzheimer-Krankheit hat keinen Einfluss auf das Gesamtvolumen, die Anzahl und die durchschnittliche Größe der Kern-Plaques im Hippocampus und in den Basalganglien

Bei der Betrachtung der Belastung durch neuritische Kern-Plaques konnte kein Effekt eines *mKlk8*-Knockdowns auf das Plaque-Volumen ($p: > 0,1$; *mKlk8* \pm $n=23$: $1,639 \pm 0,125$, *mKlk8* \pm $n=26$: $1,655 \pm 0,153$; vgl. Abbildungen 6 und 10A), die Plaque-Anzahl ($p: > 0,1$; *mKlk8* \pm $n=23$: $30,519 \pm 1,549$, *mKlk8* \pm $n=26$: $30,465 \pm 1,603$; vgl. Abbildungen 6 und 10B) oder die Plaque-Größe ($p: > 0,1$; *mKlk8* \pm $n=23$: $538,825 \pm 25,356$, *mKlk8* \pm $n=26$: $524,403 \pm 25,507$; vgl. Abbildungen 4 und 8C) im Areal des Hippocampus festgestellt werden.

Auch ließen sich keine Unterschiede in Folge des *mKlk8*-Knockdowns auf das Volumen ($p: > 0,1$; *mKlk8* \pm $n=23$: $0,71 \pm 0,053$, *mKlk8* \pm $n=26$: $0,63 \pm 0,041$; vgl. Abbildungen 6 und 10A), die Anzahl ($p: > 0,1$; *mKlk8* \pm $n=23$: $11,978 \pm 0,611$, *mKlk8* \pm $n=26$: $11,068 \pm 0,525$; vgl. Abbildungen 6 und 10B) und Größe ($p: > 0,1$; *mKlk8* \pm $n=23$: $585,556 \pm 25,169$, *mKlk8* \pm $n=26$: $570,199 \pm 21,814$; vgl. Abbildungen 6 und 10C) der Kern-Plaques im Areal der Basalganglien feststellen.

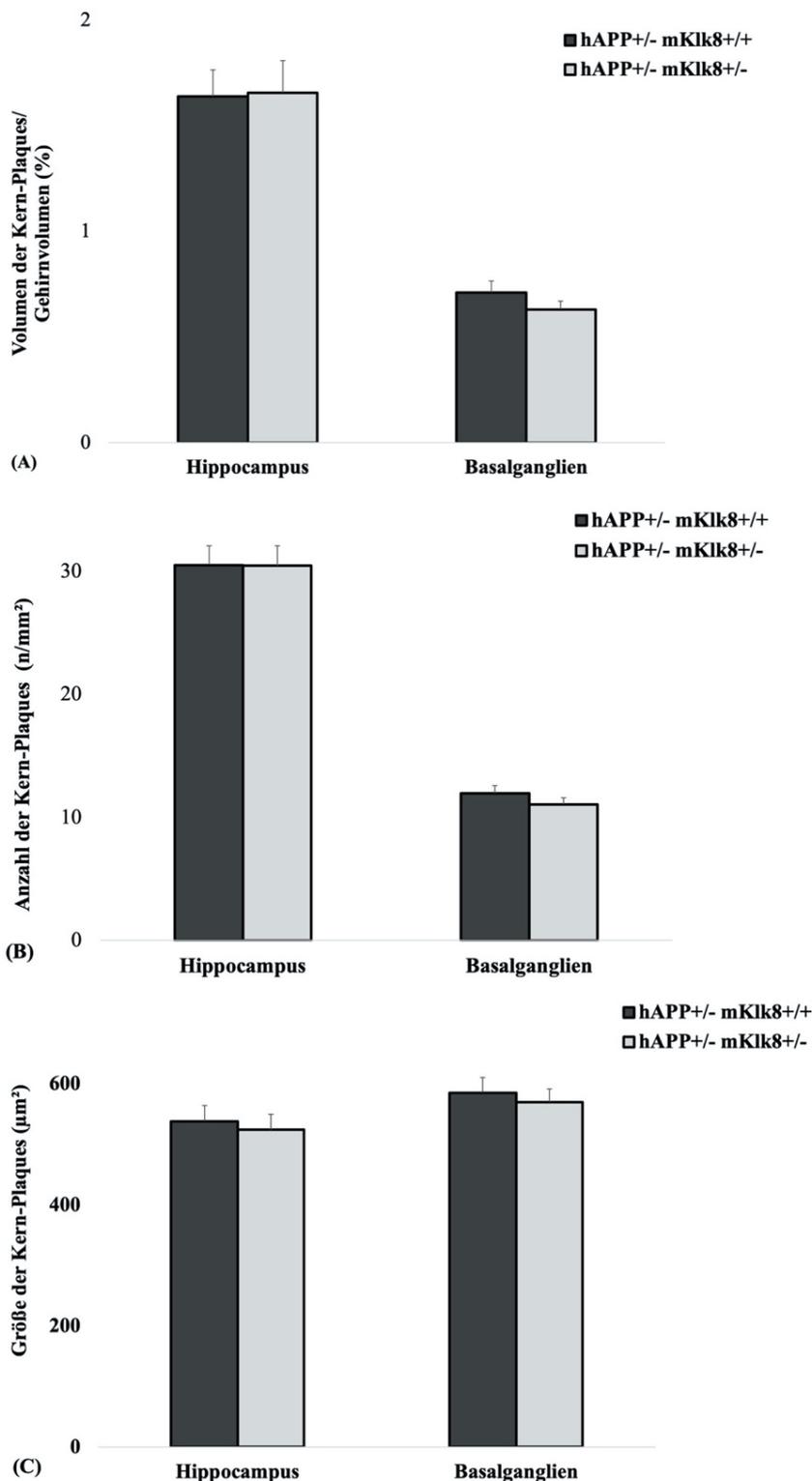


Abbildung 10: Stereologische Quantifizierung des prozentualen Volumenanteils, der Plaque-Anzahl und der Gesamtgröße von Kern-Plaques im Hippocampus und Basalganglien von transgenen weiblichen (♀) und männlichen (♂) Mäusen (hAPP+/-) mit (mKlk8+/-) oder ohne (mKlk8+/+) mKlk8-Knockdown. (A - C) Eine permanente

mKlk8-Reduktion hat in einem transgenen AD-Mausmodell keinen Effekt auf Volumen-Anteil (A), Anzahl (B) und Größe (C) von neuritischen Kern-Plaques des Hippocampus und der Basalganglien. $p > 0,1$ (Volumen: Statistik mittels Student's t-Test für das Areal des Hippocampus und Mann-Whitney-U-Test für das Areal der Basalganglien; Anzahl: Statistik mittels Student's t-Test für beide untersuchte Areale); Größe: Statistik mittels Mann-Whitney-U-Test für das Areal des Hippocampus und Student's t-Test für das Areal der Basalganglien. Dargestellt werden die Mittelwerte +/- SEM (hAPP+/- mKlk8+/- n=23 [♀ n=12, ♂=11], hAPP+/- mKlk8+/+ n=26 [♀ n=12, ♂=14]).

4 DISKUSSION

Ein genetischer Knockdown von *mKlk8* im TgCRND8-Mausmodell bewirkt eine geschlechtsspezifische Reduktion der Amyloid-Plaques-Pathologie in den Arealen Hippocampus und Basalganglien. Hierbei konnte ein Effekt auf Parameter der diffusen Plaques erzielt werden, wohingegen sich die Parameter der Kern-Plaques in den untersuchten Arealen unverändert zeigte. Eine Reduktion des durchschnittlichen Volumens diffuser Plaques konnte in Hippocampus und Basalganglien erzielt. Nicht so eindeutig zeigte sich dieser Effekt bei den Parametern Gesamtanzahl und durchschnittliche Größe. Die totale Anzahl diffuser Plaques war reduziert in den Basalganglien, jedoch nicht im Hippocampus, wohingegen die Größe diffuser Plaques im Hippocampus, jedoch nicht in den Basalganglien reduziert wurde.

Männliche transgene Tiere ohne Knockdown haben per se eine deutlich niedrigere Belastung durch diffuse Plaques in allen Parametern, verglichen mit den weiblichen Tieren ohne Knockdown von *mKlk8*. Beim geschlechtsspezifischen Vergleich der weiblichen transgenen Tiere mit Knockdown und ohne Knockdown von *mKlk8* manifestiert sich dieser antiamyloidogene Effekt in einem signifikanten Unterschied in den getesteten Parametern – bei den männlichen Tieren lässt sich selbiger Effekt nicht reproduzieren. Flankierende Ergebnisse aus unserem Labor zeigen außerdem Effekte auf die Plaques-Pathologie in Amygdala und Frontalcortex – hier konnte im gleichen Versuchsaufbau eine Reduktion der Kern-Plaques in der Amygdala aufgezeigt werden. Außerdem zeigte sich eine positive Korrelation zwischen neokortikaler *mKlk8*-Expression und den Werten für diffuse und neuritische Kern-Plaques im Frontalcortex. Ebenso konnte ein Shift der *hAPP*-Prozessierung von amyloidogen zu nicht-amyloidogenen Prozessierung und eine Reduktion der Tau-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Davon abgesehen konnten zahlreiche weitere positive bzw. therapeutische Effekte eines *mKlk8*-Knockdowns nachgewiesen werden. Transgene Mäuse zeigten nach *mKlk8*-Knockdown, reduzierte Angst und verbessertes Objekterkennungsvermögen, eine Verbesserung der hippocampalen Neurogenese und strukturellen Neuroplastizität und eine Hemmung der neurovaskulären Dysfunktion (Herring et al., 2021). Auf diese Weise konnten viele der Ergebnisse aus der Vorarbeit (Herring et al., 2016a) reproduziert oder sogar in stärkerer Ausprägung nachgewiesen werden.

Einhergehend mit der Tatsache, dass ,durch einen heterozygoten Knockdown von *mKlk8*, weniger diffuse Plaques anfallen, könnte es sein, dass die Reduktion von *Klk8* die Menge an produzierten Amyloid- β ebenso reduziert. Konnten beispielsweise durch eine kurzfristige Hemmung von *mKlk8*, bezüglich der Amyloid-Plaques-Pathologie, nur die diffusen Plaques im Areal der Basalganglien reduziert werden (Herring et al., 2016), so konnte durch eine permanente *mKlk8*-Reduktion auch eine Reduktion der Belastung durch diffuse Plaques in allen untersuchten Arealen (Basalganglien und Hippocampus) aufgezeigt werden. Eine Reduktion der neuritischen Kern-Plaques ließ sich weiterhin nicht feststellen. Durch den permanenten heterozygoten Knockdown von *Klk8* lässt sich ein stärkerer anti-amyloidogener Effekt als durch kurzfristige Reduktion von *Klk8* erzielen. Angesichts der Tatsache, dass die Kern-Plaques bei einer permanenten Hemmung nicht beeinflusst wurden, war der Effekt nicht so stark wie erwartet.

Durch einen langfristigen, von Geburt an bestehenden Keimbahn-knockdown (E0 – P226) von *mKlk8*, konnten noch stärkere anti-amyloidogene Effekte als bei einer kurzfristigen 4-wöchigen Hemmung (P150 – P185) erzielt werden. Die hier vorliegenden Ergebnisse konnten noch einmal die Ergebnisse der Vorarbeiten (Keyvani et al., 2018) bestätigen, dass Weibchen unabhängig eines Treatments höhere Belastungen durch die A β -Plaques-Pathologie aufweisen. Dies unterstreicht eine potenzielle Rolle von Östrogen als „upstream-mover“ von *Klk8* und dem Risiko an der Alzheimer-Krankheit zu erkranken (Keyvani et al., 2018). In diesem Sinne lassen sich alle unter 1.4 postulierten Fragestellungen positiv beantworten, was uns in der Annahme über *Klk8* als interessantes Target für die Entwicklung krankheitsmodifizierender Therapien für die AD bestärkt.

4.1 Diskussion der Ergebnisse

4.1.1 Die pathologische und physiologische Rolle von A β

Wie unter 1.2 beschrieben, stellen A β -Plaques das Hauptmerkmal der Pathophysiologie der Alzheimer-Krankheit bzw. ihrer Diagnose dar. Die negativen Effekte der Plaques sind offensichtlich: Nachgewiesenermaßen stören diese neuronale Prozesse, sind synaptotoxisch und setzen A β -Oligomere frei. Durch lokale Mikrogliose wird ein entzündliches Umfeld erzeugt (Serrano-Pozo et al., 2011). Seit geraumer Zeit mehren sich die Hinweise dafür, dass A β -Oligomere noch toxischere Wirkung haben als die Plaque-Pathologie (Shankar *et al.*, 2008). Plaques können sich in manchen Mausmodellen der Alzheimer-Krankheit sehr schnell formieren und bleiben dann zumeist stabil in Ihrer Morphologie. Unklar bleibt allerdings, warum manche Ablagerungen in der Form von diffusen Plaques verbleiben und manche sich zu hoch fibrillären und dichten Plaqueformen aggregieren.

Allgemein korreliert die Plaque-Pathologie nur in geringem Maße mit der klinischen Demenz oder Alzheimer-Demenz. Studien zeigen, dass viele ältere Individuen Plaques aufweisen können, ohne klinische Symptome zu haben, was impliziert, dass Plaques eine normale Erscheinung des Alters sein könnten (Davis et al., 1999). Kohortenstudien mit einer Immunisierung gegen A β (1-42) konnten zwar eine deutliche Reduktion der Plaquebelastung aufweisen, jedoch waren keine Verbesserungen in der Kognition zu beobachten (Nicoll et al., 2019). Die Hemmung von *Klk8* im präklinischen Stadium hingegen scheint, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, antiamyloidogene Effekte auf die Plaque-Pathologie und die kognitive Symptomatik der Alzheimer-Erkrankung zu haben und diese teils reversibel zu beeinflussen. Das lässt die Vermutung zu, dass bei bereits klinisch eingetretener Erkrankung andere Pathologika wie mikrogliale Aktivierung oder Tau-Pathologie das Fortschreiten der Demenz mehr unterstützen als die Plaque-Pathologie.

Viele Bemühungen wurden unternommen, die Aggregation von A β und Tau zu verhindern, die Produktion zu hemmen oder Clearance dieser Moleküle zu verbessern (Long and Holtzman, 2019) - Studien mit diesen Ziel hatten in den meisten Fällen wenig Erfolg oder erzielten gar gegensätzliche Effekte (siehe auch 1.1.5).

A β und Tau lassen sich evolutionär bei allen Tieren und sogar bei Pflanzen nachweisen. Es besteht eine lange evolutionäre Persistenz, was eine zumindest teilweise

physiologische Funktion sehr wahrscheinlich erscheinen lässt (Tharp and Sarkar, 2013). Mehrere Studien lieferten Evidenz, welche die These einer physiologischen Funktion von A β weiter bestärkt. Angenommene physiologische Funktionen von A β sind beispielsweise die Versiegelung von Lecks in der BBB (Brothers et al., 2018), antimikrobielle Funktion (Gosztyla et al., 2018) und Tumorsuppression.

In anderen wissenschaftlichen Arbeiten wird A β Funktionen in Bereichen nachgesagt, wo auch *Klk8* eine wichtige Rolle spielt (siehe hierzu 1.3.1). So vermutet man auch für A β wichtige Funktionen in der Regulation von Übererregung, Neurogenese und Zelldifferenzierung Generation von LTPs, Lernen und Gedächtnis (López-Toledano and Shelanski, 2004). Hierfür sprechen ebenso die vielseitigen negativen Effekte, die durch einen Knockdown von Tau oder A β hervorgerufen werden können (Long and Holtzman, 2019).

4.1.2 Zusammenhänge zwischen *Klk8* und der Amyloid-Pathologie

Abgesehen von den durch unsere Arbeitsgruppe nachgewiesenen Effekte einer *Klk8*-Reduktion auf die Amyloid-Pathologie, weist die Literatur nur wenig Evidenz für eine direkte Verbindung zwischen *Klk8* und der AD auf (siehe 1.3.1). Es gibt jedoch Hinweise auf indirekte Verbindungen zwischen *Klk8* und der AD-Pathophysiologie über verschiedenen Signalwege. Im Folgenden wird dargestellt, über welche Signalwege einige Substrate von *Klk8* in die Pathophysiologie der AD eingebunden zu sein scheint: EphB2 und RELN sind bei der AD (beim Menschen im präklinischen AD-Stadium und im transgenen Mausmodell) reduziert (Herring et al., 2012; Simón et al., 2009). Eine Hochregulation eines dieser beiden Substrate verbessert signifikant die kognitive Performance in transgenen Mäusen. Das Fehlen von EphB2 hingegen beeinträchtigt die Bildung von LTPs im Hippocampus. Eine Hochregulation der EphB2-Expression konnte diese Effekte reversibel beeinflussen. A β -Oligomere binden an EphB2 und triggern dessen Degradation in das Proteasom (Cisse *et al.*, 2011).

Reelin, ein Glykoprotein in der EZM ist ebenso ein protektiver Faktor im Kontext der AD und ist in der Lage die Progression der Fibrillation aufzuhalten (Pujadas et al., 2014).

L1CAM hat anti-aggregatorische Eigenschaften und reduziert die A β -Plaques Belastung im AD-Mausmodell (Djogo *et al.*, 2013). L1CAM wird außerdem nicht nur durch *Klk8*, sondern unter physiologischen Bedingungen auch durch BACE1 oder auch β -Sekretase gespalten, welche involviert ist in die amyloidogene Prozessierung, bei welcher das A β entsteht (Zhou et al., 2012). Spatio-temporales Expressionsmuster von *Klk8* korreliert positiv mit L1CAM Spaltung und der Expression von MAP2c in gesunden Gehirnen. Ebenso wird *Klk8* im Alter zunehmend regional unterschiedlich produziert (Konar and Thakur, 2015). Es wird angenommen, dass *Klk8* einen Schlüssel-Regulator von Neuronenmorphologie und Gedächtnis über den MAP2c-Signalweg darstellen könnte (Konar *et al.*, 2018).

Das *Klk8*-Substrat Fibronectin fördert die Sekretion von APP, bzw. die Integration von APP in die Zellmembran und subsequente A β -Biogenese (Monning *et al.*, 1995). Fibronectin-Spiegel sind gesenkt bei der MCI, also vor dem konkreten Auftreten der AD (Muenchhoff et al., 2015).

NRG1 schützt Neurone vor Apoptose und behindert kognitive Defizite und Neuropathologie im Mausmodell. NRGs, also Neureguline binden und aktivieren Rezeptor-Tyrosinkinasen. Studien postulieren hier eine neuroprotektive Wirkung von NRG1 über den Signalweg des ErbB4-Rezeptors im Kontext der Alzheimer-Erkrankung (Woo et al., 2012). Eine direkte Verbesserung der kognitiven Defizite und der neuropathologischen Merkmale der AD über die exogene Administration von NRG1 konnte ebenso im Tiermodell nachgewiesen werden (Xu et al., 2016b).

Der Fakt, dass *Klk8* noch vor dem Auftreten jeglicher Pathologie in den betroffenen Hirnabschnitten hochreguliert ist, lässt plausibel erscheinen, dass die Depletion von *Klk8* keine rein symptomatische Intervention ist, sondern die Probleme der AD an der Wurzel angreift, in dem es in die Pathophysiologie der AD interferiert. Diese Theorie wird vor allem dadurch unterstützt, dass durch eine Hemmung von *Klk8*, die Pathologie der AD, wie in dieser Arbeit nachgewiesen, klar reduziert wird.

Hinzu kommt, dass die von *Klk8* verstoffwechselten Substrate oder Interaktionspartner an denen *Klk8* beteiligt ist, also EphB2, L1CAM, FN und PEBP1, alle fähig sind, protektiv gegen A β und Tau-Pathologie zu wirken. *Klk8* scheint eine dosisabhängige Wirkung zu besitzen. Dies ist beispielweise im Kontext der Langzeitpotenzierung (LTP) ersichtlich. Wo auf der einen Seite hohe Konzentrationen an A β die Langzeitpotenzierung stören (Walsh et al., 2002), mehren sich Hinweise, dass geringe Konzentrationen eventuell notwendig für die Initiation dieser sind (Puzzo et al., 2011). Dies bestärkt in Zusammenlegung mit unseren bisherigen Ergebnissen die These, dass auch für *Klk8* scheinbar ein gewisser therapeutischer Raum besteht, in welchem eine potenzielle krankheitsmodifizierende Therapie ansetzen könnte.

4.1.3 Das klinisches Potenzial von *Klk8* in Diagnostik und Therapie der AD

In den beiden Untersuchungen der beiden Arbeitsgruppen mit kurzfristiger oder langfristiger *Klk8*-Reduktion über Antikörper-Applikation oder genetisch vermittelten Knockdown, zeigten die Mäuse in der Untersuchung nur wenig bis keine negativen oder unerwünschten Effekte (Herring *et al.*, 2021; Herring *et al.*, 2016a). Dies spricht für eine potenzielle gute Verträglichkeit einer *Klk8*-Reduktion in eventuell folgenden Medikamentenstudien der Phase I. Zwar erreichen nur die wenigsten Wirkstoffe zur Krankheitsmodifizierung der AD die Phase III (Cummings *et al.*, 2021b), trotzdem sprechen die hier aufgezeigten Parallelen zwischen *Klk8* und AD in den Signalwegen, in Zusammenschau mit unseren Ergebnissen, für eine gute Ausgangsbasis für solch eine Studie. Wie unter 1.3.1 gezeigt, mehren sich die Hinweise für eine Involvierung von *Klk8* auch in andere neurologisch-psychiatrische Erkrankungen nebst der AD. Flankierende Ergebnisse aus Arbeiten von Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe zeigen therapeutische Effekte eines *mKlk8*-Knockdowns auf Neuroplastizität und Angstverhalten (Herring *et al.*, 2021) – Bereiche, welche auch im Rahmen vieler anderer neurologisch-psychiatrischen Erkrankungen dysreguliert oder gestört sind.

Die Erforschung eines möglichen therapeutischen Bereiches mit guter Verträglichkeit könnte somit nicht nur der Therapie der AD, sondern auch in der Therapie vieler anderer Erkrankungen in diesem Gebiet mit eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten, einen ganz neuen Weg aufzeigen. Nicht nur in der Therapie, sondern auch in der Diagnostik, scheinen, in Zusammenschau mit Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, viele Perspektiven für *Klk8* zu bestehen. Wie aufgezeigt, mehren sich die Hinweise dafür, dass sowohl für *Klk8* als auch für A β physiologische und pathologische Effekte bestehen. In Zusammenschau mit den aufgezeigten Parallelen und unseren Ergebnissen, erscheint es plausibel zu statuieren, dass für *Klk8* und A β ein jeweils gesundes Maß bzw. „sweet spot“ zu bestehen scheint. Dieses geeignete Fenster gilt es in weiteren Studien genauer zu definieren, um eine bessere Ausgangsbasis für eine potenzielle Medikamentenstudie zu schaffen.

4.2 Limitierungen

4.2.1 Transgene Tiermodelle

Kritisch bleibt zu beurteilen, inwiefern Erkenntnisse aus einem transgenen Mausmodell Relevanz für die Wirkung von *Klk8* im gesunden oder kranken Menschen bedeutet.

Mehrere Studien konnten aufweisen, dass nicht alle pathologischen Merkmale der AD in transgenen Mausmodellen abgebildet werden. So tritt die Pathologie der Alzheimer-Krankheit bei Maus und Mensch typischerweise in verschiedenen Reihenfolgen auf (Balducci and Forloni, 2011) und die Plaque-Pathologie in verschiedener Ausprägung auf (Kokjohn and Roher, 2009). Zwar sind transgene Mausemodelle der AD gut geeignet zur Darstellung der Amyloid-Pathologie, jedoch nicht zur Darstellung von anderen Pathologika, wie Tau-Pathologie oder Hirnatrophie. Trotzdem spielen diese Modelle eine herausragende Rolle in der Grundlagenforschung zur Findung eines geeigneten krankheitsmodifizierenden Wirkstoffes. Es gibt Bestrebungen verschiedener Arbeitsgruppen zur Etablierung weitergehender Alzheimer-Tiermodelle in Primaten (Li et al., 2019). Hier zeigt sich die große Herausforderung der Translation der präklinisch erzielten Ergebnissen aus transgenen Tiermodellen auf den Menschen.

4.2.2 Homologien innerhalb der Familie der Kallikreine

Es mehren sich Hinweise, dass bei der Untersuchung der therapeutischen oder pathologischen Effekte von Kallikreine im Rahmen der AD, eine gewisse Kreuzreaktivität verschiedener Kallikreine untereinander bestehen könnte. Zum einen bestehen große Homologien zwischen verschiedenen Kallikreinen (Koumandou and Scorilas, 2013), zum anderen scheinen auch andere Kallikreine in die Pathomechanismen der Alzheimer-Krankheit eingebunden zu sein (Diamandis et al., 2004). So konnten reduzierte *Klk6* Konzentrationen in den Gehirnen von AD-Patienten nachgewiesen werden (Zarghooni et al., 2002). *Klk7* ist in den Gehirnen von AD-Patienten reduziert, eine Hemmung induziert eine starke Zunahme der A β -Plaques-Pathologie (Kidana et al., 2018). Auf in-vitro Ebene konnte auch ein Clearance-Mechanismus von *Klk7* nachgewiesen werden, welcher in der Lage ist A β zu spalten und so die amyloidogene Toxizität zu reduzieren (Shropshire et al., 2014). Auch eine Involvierung des Kallikrein-Kininogen-Systems in die Pathomechanismen der AD konnte nachgewiesen werden (Yamamoto-Imoto et al., 2018). Doch bleibt wiederum zu unterstreichen, dass es vor allem *Klk8* ist, welches in bis zu 11,5-facher höherer Konzentration als bei Gesunden, in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten exprimiert wird (Herring et al., 2016a; Shimizu-Okabe et al., 2001).

4.3 Schlussfolgerung

Die Indizien für eine indirekte Einbindung von *Klk8* in die Alzheimer-Pathophysiologie mehren sich immer weiter und dazu konnte diese Arbeit beitragen. Der Fakt, dass *Klk8* noch vor dem Auftreten jeglicher Pathologie in den betroffenen Hirnabschnitten von Alzheimer-Patienten hochreguliert ist, und sich durch die Depletion von *Klk8* eine Reduktion der Amyloid-Pathologie erzielen lässt, lässt plausibel erscheinen, dass die Depletion von *Klk8* keine bloß symptomatische Intervention wie bisher zugelassene Therapiemöglichkeiten (siehe 1.1.4) ist, sondern die Probleme der AD an der Wurzel angreift, in dem es in die mit der AD assoziierten Signalwege interferiert.

Hierbei weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ebendies, in Form einer signifikanten Reduktion der Plaque-Belastung nach *Klk8*-Knockdown, nach.

Wie klar aufgezeigt, zeigt sich bei den Substraten oder Interaktionspartnern von *Klk8*, also EphB2, L1CAM, FN, dass diese, wenn nicht durch *Klk8* gespalten, alle protektiv gegen A β und Tau-Pathologie zu wirken scheinen.

Es konnte im Rahmen der Publikation ein eindeutiger Shift der Prozessierung in Richtung nicht-amyloidogene Prozessierung von *hAPP* festgestellt werden, so dass die Hypothese, dass eine Depletion von *Klk8* die Menge an Amyloid- β reduziert, plausibel erscheint. Außerdem mehrt sich die Evidenz für die Hypothese, dass sowohl *Klk8* als auch A β in niedrigen Konzentrationen physiologische Funktionen zu erfüllen scheinen - wohingegen ein Zustand der Hochregulation bzw. das Vorliegen von höheren Konzentrationen negative „Downstream“-Effekte mit sich zu bringen scheint.

Es zeigt sich, dass sowohl ein Überschuss an *Klk8* als auch ein zu wenig an *Klk8*, sei es durch Mangel, Depletion durch Antikörper oder Knockdown, negative Auswirkungen mit sich bringen kann. Jedoch waren die negativen Reaktionen auf eine *Klk8*-Depletion in den wildtypischen, nicht transgenen Mäusen in den Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe überschaubar.

Die Ergebnisse zusammengenommen, sprechen für eine gute Ausgangsbasis einer potenziellen Phase-I-Medikamenten-Studie beim Menschen. Hier gilt es in weiteren Studien, das genaue Dosispektrum bzw. therapeutisches Fenster von *Klk8* zu evaluieren. Wie unter 4.2.1 aufgezeigt, bringen mehrere Autoren das Argument an, dass vor allem bei Forschung in transgenen Mausmodellen der AD nicht klar ist, ob ein Überschuss an APP zu einer Erhöhung von *Klk8* bedingt, oder umgekehrt. Auch dies

bleibt weiter zu erforschen. Es bleibt abzuwarten, ob sich die Effizienz von *Klk8* als in-vivo-Biomarker der AD in weiteren Studien bewährt, um diese Frage abschließend zu beantworten. Die aufgezeigten Parallelen, die sich bei den physiologischen Funktionen von *Klk8* und der AD zeigen, lassen eine Verknüpfung zwischen *Klk8* und neurodegenerativen Erkrankungen wie AD sehr wahrscheinlich erscheinen.

Sollte sich, durch eine permanente Depletion von *Klk8*, in weiteren translationalen Studien wiederholt ein „anti-Alzheimer“ Effekt nachweisen, so wäre eine Applikation des Antikörpers bei Risikopatienten mit erhöhten, exzessiven *Klk8*-Spiegeln und einer SKB oder MCI durchaus sinnvoll, um in dieser Weise einer Verschlechterung oder Aggravierung entgegenzuwirken. Hierzu ist eine Erforschung der Effekte einer *Klk8*-Depletion in weiteren Studien, sowohl im Maus- als auch in Primaten-Modellen oder am Menschen notwendig – erste Studien hierzu legen bereits vor.

In einer vergleichenden Verlaufsmessung von etablierten Biomarkern lassen sich erhöhte Spiegel von *Klk8* bereits vor dem gemeinhin als ersten Parameter mit Erhöhung, dem Amyloid-PET, feststellen. In dieser Hinsicht scheint es sinnvoll, die Performance von *Klk8* als Biomarker und therapeutisches Target der Alzheimer-Erkrankung weiter zu evaluieren.

Angesichts der Tatsache, dass Plaques der klinischen Symptomatik weit vorausgehen (siehe 1.1.3), wird immer offensichtlicher, dass eine Therapie bzw. Prävention deutlich früher als erst zu Symptombeginn erfolgen muss (Selkoe, 2020). Es besteht in diesem Sinne ein hoher Bedarf an effizienten, bereits sehr früh validen und kosteneffizienten Biomarkern für die Alzheimer-Krankheit. Im Sinne der Krankheitsprävention wäre es sinnvoll, auffällige Patienten mit entsprechenden Risikofaktoren, positiver Familienanamnese oder Down-Syndrom bereits im Vorfeld zu klassifizieren und auf Biomarker der AD-Erkrankung hin zu screenen.

Es bleibt zu beachten, dass das Gefüge der Extrazellulärmatrix, in welchem *Klk8* und das Kallikrein-Kininogen-System allgemein aktiv sind, ist durch starke Wechselwirkungen auf mehrere Systeme gekennzeichnet ist, dessen Mechanismen es in weiteren Studien zu erforschen gilt. Ebenso steht fest, dass die Verbindung zwischen Amyloid- β und *Klk8* nur eine von vielen Variablen in der Pathophysiologie der AD

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Serinprotease Kallikrein 8 (*Klk8*) ist in Gehirnen von transgenen Mäusen, die das humane Amyloidvorläufer-Protein (*hAPP*^{+/-}) überexprimieren, und Alzheimer-Patienten überexprimiert. Eine 4-wöchige intraventrikuläre Applikation eines Antikörpers gegen *Klk8* in einem moderaten Stadium der Krankheit [Postnataler Tag (P) 150 – P185] bewirkt im transgenen Mausmodell multiple therapeutische Effekte auf mehrere pathologische Aspekte der Alzheimer-Erkrankung (AD).

Im Rahmen einer *Proof-of-concept*-Studie untersucht die vorliegende Arbeit die geschlechterspezifischen Effekte eines von Geburt an bestehenden, genetischen *Klk8*-Knockdowns (*Klk8*-KD) - speziell auf die Amyloid-Plaques-Pathologie.

Hierbei wurden, durch Verpaarung von transgenen Mäusen des *Center for Research in Neurodegenerative Diseases* (*hAPP*^{+/-}) und *Klk8*-Knockout-Mäusen (*mKlk8*^{-/-}), transgene Mäuse mit Knockdown (*hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/-} n=23 [♀ n=12, ♂ n=11]) und ohne Knockdown (*hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/+} n=26 [♀ n=12, ♂=14]) von murinen *Klk8* (*mKlk8*) gewonnen. In den Gehirnen dieser Mäuse wurde, nach immunhistochemischer Anfärbung gegen Amyloid-β (Aβ), die Areale Hippocampus und Basalganglien auf eine Belastung durch diffuse Plaques und Kern-Plaques stereologisch mittels lichtmikroskopischer Darstellung quantifiziert.

Durch einen langfristigen, von Geburt an bestehenden Keimbahn-knockdown (E0 – P226) von *mKlk8* in einem transgenen Mausmodell (*hAPP*^{+/-}), konnten in Hippocampus und Basalganglien transgener weiblicher Mäuse noch stärkere anti-amyloidogene Effekte auf die Belastung durch diffuse Plaques, als bei einer kurzfristigen 4-wöchigen Hemmung (P150 – P185), erzielt werden. Selbiger Effekt ließ sich bei transgenen männlichen Mäusen nicht erzielen. Ein Effekt auf die Belastung durch Kern-Plaques wurde in den untersuchten Arealen nicht nachgewiesen.

In Zusammenschau mit multiplen anderen therapeutischen Effekten einer permanenten Reduktion einer Überexpression von *Klk8* auf die AD-Pathologie, unterstreicht diese Arbeit das Potenzial von *Klk8* in der Diagnostik und Therapie der AD.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin 64, 8.
- 2) Attwood, B.K., Bourgeois, J.M., Patel, S., Mucha, M., Schiavon, E., Skrzypiec, A.E., Young, K.W., Shiosaka, S., Korostynski, M., Piechota, M., Przewlocki, R., Pawlak, R. (2011). Neuropilin cleaves EphB2 in the amygdala to control anxiety. Nature 473, 372-375.
- 3) Balducci, C., and Forloni, G. (2011). APP transgenic mice: their use and limitations. Neuromolecular Med 13, 117-137.
- 4) Bao, J., Wang, X.J., and Mao, Z.F. (2016). Associations Between Genetic Variants in 19p13 and 19q13 Regions and Susceptibility to Alzheimer Disease: A Meta-Analysis. Med Sci Monit 22, 234-243.
- 5) Bateman, R.J., Benzinger, T.L., Berry, S., Clifford, D.B., Duggan, C., Fagan, A.M., Fanning, K., Farlow, M.R., Hassenstab, J., McDade, E.M., Mills, S., Paumier, K., Quintana, M., Salloway, S., Santacruz, A., Schneider, L., Wang, G., Xiong, C. (2017). The DIAN-TU Next Generation Alzheimer's prevention trial: Adaptive design and disease progression model. Alzheimers Dement 13, 8-19.
- 6) Bickel, H. (2020). Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen. Online Publikation; https://www.deutschealzheimer.de/fileadmin/Alz/pdf/factsheets/infoblatt1_haeufigkeit_demenzerkrankungen_dalzg.pdf.
- 7) Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol 82, 239-259.
- 8) Brothers, H.M., Gosztyla, M.L., and Robinson, S.R. (2018). The Physiological Roles of Amyloid- β Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease. Front Aging Neurosci 10, 118-118.

- 9) Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer, M., Henschen, A., Yates, J., Cotman, C., and Glabe, C. (1992). Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem* 267, 546-554.
- 10) Cacace, R., Slegers, K., and Van Broeckhoven, C. (2016). Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement* 12, 733-748.
- 11) Chang, S., Bok, P., Sun, C.-P., Edwards, A., and Huang, G.-J. (2016). Neuropilin Inactivation Has Protective Effects against Depressive-Like Behaviours and Memory Impairment Induced by Chronic Stress. *PLoS Genet* 12; Online Publikation: e1006356-e1006356. 10.1371/journal.pgen.1006356.
- 12) Chen, Z.L., Yoshida, S., Kato, K., Momota, Y., Suzuki, J., Tanaka, T., Ito, J., Nishino, H., Aimoto, S., Kiyama, H. (1995). Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus. *J Neurosci* 15, 5088-5097.
- 13) Chishti, M.A., Yang, D.S., Janus, C., Phinney, A.L., Horne, P., Pearson, J., Strome, R., Zuker, N., Loukides, J., French, J., Turner, S., Lozza, G., Grilli, G., Kunicki, S., Morissette, C., Paquette, J., Gervais, F., Bergeron, C., Fraser, P., Carlson, G., Hyslop, P., Westaway, D. (2001). Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem* 276, 21562-21570.
- 14) Cisse, M., Halabisky, B., Harris, J., Devidze, N., Dubal, D.B., Sun, B., Orr, A., Lotz, G., Kim, D.H., Hamto, P. (2011). Reversing EphB2 depletion rescues cognitive functions in Alzheimer model. *Nature* 469, 47-52.
- 15) Cummings, J., Aisen, P., Lemere, C., Atri, A., Sabbagh, M., and Salloway, S. (2021a). Aducanumab produced a clinically meaningful benefit in association with amyloid lowering. *Alzheimers Res Ther* 13, 98-98.

- 16) Cummings, J., Lee, G., Zhong, K., Fonseca, J., and Taghva, K. (2021b). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2021. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 7, e12179. Online-Publikation; <https://doi.org/10.1002/trc2.12179>.
- 17) Davies, B., Kearns, I.R., Ure, J., Davies, C.H., and Lathe, R. (2001). Loss of hippocampal serine protease BSP1/neuropsin predisposes to global seizure activity. *J Neurosci* 21, 6993-7000.
- 18) Davis, D., Schmitt, F., Wekstein, D., and Markesbery, W. (1999). Alzheimer neuropathologic alterations in aged cognitively normal subjects. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 376-388.
- 19) DeTure, M.A., and Dickson, D.W. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 14, 32-32.
- 20) Deuschl, G., Maier, W., Jessen, F. Spottke, A. (2016). S3-Leitlinie "Demenzen" Deutsche Gesellschaft für Neurologie, AWMF-Register Nr. 038-013; Online-Publikation: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/038-0131_S3-Demenzen-2016-07.pdf
- 21) Diamandis, E.P., Scorilas, A., Kishi, T., Blennow, K., Luo, L.Y., Soosaipillai, A., Rademaker, A.W., and Sjogren, M. (2004). Altered kallikrein 7 and 10 concentrations in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Clin Biochem* 37, 230-237.
- 22) Djogo, N., Jakovcevski, I., Muller, C., Lee, H.J., Xu, J.C., Jakovcevski, M., Kugler, S., Loers, G., and Schachner, M. (2013). Adhesion molecule L1 binds to amyloid beta and reduces Alzheimer's disease pathology in mice. *Neurobiol Dis* 56. 104-115.
- 23) Dudai, Y., and Morris, R.G. (2013). Memorable trends. *Neuron* 80, 742-750.

- 24) Friedrich, R.P., Tepper, K., Ronicke, R., Soom, M., Westermann, M., Reymann, K., Kaether, C., and Fandrich, M. (2010). Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of Abeta pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1942-1947.
- 25) Glenner, G.G., and Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120, 885-890.
- 26) Gosztyla, M.L., Brothers, H.M., and Robinson, S.R. (2018). Alzheimer's Amyloid- β is an Antimicrobial Peptide: A Review of the Evidence. *J Alzheimers Dis* 62, 1495-1506.
- 27) Hanseeuw, B.J., Betensky, R.A., Jacobs, H.I.L., Schultz, A.P., Sepulcre, J., Becker, J.A., Cosio, D.M.O., Farrell, M., Quiroz, Y.T., Mormino, E.C. (2019). Association of Amyloid and Tau With Cognition in Preclinical Alzheimer Disease: A Longitudinal Study. *JAMA Neurol* 76, 915-924.
- 28) Herring, A., Donath, A., Steiner, K.M., Widera, M.P., Hamzehian, S., Kanakis, D., Kölbl, K., ElAli, A., Hermann, D.M., Paulus, W., and Keyvani, K. (2012). Reelin Depletion is an Early Phenomenon of Alzheimer's Pathology. *Journal of Alzheimer's Disease* 30, 963-979.
- 29) Herring, A., Kurapati, N.K., Krebs, S., Grammon, N., Scholz, L.M., Voss, G., Miah, M.R., Budny, V., Mairinger, F., Haase, K., Teuber-Hanselmann, S., Dobbersalke, C., Schramm, S., Jöckel, K., Münster, Y., Keyvani, K. (2021). Genetic knockdown of Klk8 has sex-specific multi-targeted therapeutic effects on Alzheimer's pathology in mice. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 47, 611-624.
- 30) Herring, A., Munster, Y., Akkaya, T., Moghaddam, S., Deinsberger, K., Meyer, J., Zahel, J., Sanchez-Mendoza, E., Wang, Y., Hermann, D.M., Arzberger, T., Teuber-

- Hanselmann, S., Keyvani, K. (2016a). Kallikrein-8 inhibition attenuates Alzheimer's disease pathology in mice. *Alzheimers Dement* 12, 1273-1287.
- 31) Herring, A., Münster, Y., Metzdorf, J., Bolczek, B., Krüssel, S., Krieter, D., Yavuz, I., Karim, F., Roggendorf, C., Stang, A., Wang, Y., Hermann, D.M., Teuber-Hanselmann, S., Keyvani K. (2016b). Late running is not too late against Alzheimer's pathology. *Neurobiology of Disease* 94, 44-54. Online-Publikation; <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.06.003>.
- 32) Hyman, B.T., Phelps, C.H., Beach, T.G., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Carrillo, M.C., Dickson, D.W., Duyckaerts, C., Frosch, M.P., Masliah, E. (2012). National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 8, 1-13.
- 33) Ikeda, S., Yanagisawa, N., Allsop, D., and Glenner, G.G. (1990). Early senile plaques in Alzheimer's disease demonstrated by histochemistry, immunocytochemistry, and electron microscopy. *Hum Pathol* 21, 1221-1226.
- 34) Jack, C.R., Jr., Bennett, D.A., Blennow, K., Carrillo, M.C., Dunn, B., Haeberlein, S.B., Holtzman, D.M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 14, 535-562.
- 35) Jarrett, J.T., Berger, E.P., and Lansbury, P.T., Jr. (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32, 4693-4697.
- 36) Karch, C.M., and Goate, A.M. (2015). Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry* 77, 43-51.

- 37) Keyvani, K., Munster, Y., Kurapati, N.K., Rubach, S., Schonborn, A., Kocakavuk, E., Karout, M., Hammesfahr, P., Wang, Y.C., Hermann, D.M., Teuber-Hanselmann, S., Herring, A. (2018). Higher levels of kallikrein-8 in female brain may increase the risk for Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 28, 947-964.
- 38) Khachaturian, Z., Khachturian, A. (2021). 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 17, 327-406.
- 39) Kidana, K., Tatebe, T., Ito, K., Hara, N., Kakita, A., Saito, T., Takatori, S., Ouchi, Y., Ikeuchi, T., Makino, M., Saido, T., Akishita, M., Iwatsubo, T. Hori, Y., Tomita, T. (2018). Loss of kallikrein-related peptidase 7 exacerbates amyloid pathology in Alzheimer's disease model mice. *EMBO molecular medicine* 10, Online-Publikation; e8184. 10.15252/emmm.201708184.
- 40) Kilic, E., ElAli, A., Kilic, Ü., Guo, Z., Ugur, M., Uslu, U., Bassetti, C.L., Schwab, M.E., and Hermann, D.M. (2010). Role of Nogo-A in Neuronal Survival in the Reperfused Ischemic Brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 30, 969-984.
- 41) Kishi, T., Cloutier, S.M., Kündig, C., Deperthes, D., and Diamandis, E.P. (2006). Activation and enzymatic characterization of recombinant human kallikrein 8. 387, 723-731.
- 42) Kokjohn, T.A., and Roher, A.E. (2009). Amyloid precursor protein transgenic mouse models and Alzheimer's disease: understanding the paradigms, limitations, and contributions. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 5, 340-347.
- 43) Konar, A., Kumar, A., Maloney, B., Lahiri, D.K., and Thakur, M.K. (2018). A serine protease KLK8 emerges as a regulator of regulators in memory: Microtubule

- protein dependent neuronal morphology and PKA-CREB signaling. *Sci Rep* **8**, 9928.
- 44) Konar, A., and Thakur, M.K. (2015). Neuropsin Expression Correlates with Dendritic Marker MAP2c Level in Different Brain Regions of Aging Mice. *Mol Neurobiol* **51**, 1130-1138.
- 45) Koumandou, V.L., and Scorilas, A. (2013). Evolution of the plasma and tissue kallikreins, and their alternative splicing isoforms. *PLoS One* **8**, Online-Publikation; e68074. 10.1371/journal.pone.0068074.
- 46) Li, H.-W., Zhang, L., and Qin, C. (2019). Current state of research on non-human primate models of Alzheimer's disease. *Animal Model Exp Med* **2**, 227-238.
- 47) Liu, C.C., Liu, C.C., Kanekiyo, T., Xu, H., and Bu, G. (2013). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol* **9**, 106-118.
- 48) Livingston, G., Huntley, J., Sommerlad, A., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Brayne, C., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Teri, L., Mukadam, N. (2020). Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the *Lancet* Commission. *The Lancet* **396**, 413-446.
- 49) Long, J.M., and Holtzman, D.M. (2019). Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* **179**, 312-339.
- 50) López-Toledano, M.A., and Shelanski, M.L. (2004). Neurogenic effect of beta-amyloid peptide in the development of neural stem cells. *J Neurosci* **24**, 5439-5444.
- 51) Lu, Z.-x., Huang, Q., and Su, B. (2009). Functional characterization of the human-specific (type II) form of kallikrein 8, a gene involved in learning and memory. *Cell Research* **19**, 259-267.

- 52) Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2012). Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, Online-Publikation; a006247. 10.1101/cshperspect.a006247.
- 53) Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Yamasaki, H., Tamura, H., Nakamura, Y., and Shiosaka, S. (2003). NMDA-dependent proteolysis of presynaptic adhesion molecule L1 in the hippocampus by neuropsin. *J Neurosci* 23, 7727-7736.
- 54) McKhann, G.M., Knopman, D.S., Chertkow, H., Hyman, B.T., Jack, C.R., Jr., Kawas, C.H., Klunk, W.E., Koroshetz, W.J., Manly, J.J., Mayeux, R., Mohs, R., Morris, J.C., Rossor, M., Scheltens, P., Carrillo, M., Thies, B., Weintraub, S., Phelps, C. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dementia* 7, 263-269.
- 55) Momota, Y., Yoshida, S., Ito, J., Shibata, M., Kato, K., Sakurai, K., Matsumoto, K., and Shiosaka, S. (1998). Blockade of neuropsin, a serine protease, ameliorates kindling epilepsy. *Eur J Neurosci* 10, 760-764.
- 56) Monning, U., Sandbrink, R., Weidemann, A., Banati, R.B., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1995). Extracellular matrix influences the biogenesis of amyloid precursor protein in microglial cells. *J Biol Chem* 270, 7104-7110.
- 57) Muenchhoff, J., Poljak, A., Song, F., Raftery, M., Brodaty, H., Duncan, M., McEvoy, M., Attia, J., Schofield, P.W., and Sachdev, P.S. (2015). Plasma protein profiling of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease across two independent cohorts. *J Alzheimers Dis* 43, 1355-1373.
- 58) Nardini, E., Hogan, R., Flamier, A., and Bernier, G. (2021). Alzheimer's disease: a tale of two diseases? *Neural Regeneration Research* 16, 1958-1964.

- 59) Nicoll, J.A.R., Buckland, G.R., Harrison, C.H., Page, A., Harris, S., Love, S., Neal, J.W., Holmes, C., and Boche, D. (2019). Persistent neuropathological effects 14 years following amyloid- β immunization in Alzheimer's disease. *Brain* 142, 2113-2126.
- 60) Poplawski, G.H., Tranziska, A.K., Leshchyn's'ka, I., Meier, I.D., Streichert, T., Sytnyk, V., and Schachner, M. (2012). L1CAM increases MAP2 expression via the MAPK pathway to promote neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 50, 169-178.
- 61) Prassas, I., Eissa, A., Poda, G., and Diamandis, E.P. (2015). Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. *Nat Rev Drug Discov* 14, 183-202.
- 62) Price, J.L., Davis, P.B., Morris, J.C., and White, D.L. (1991). The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 12, 295-312. Online-Publikation; [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(91\)90006-6](https://doi.org/10.1016/0197-4580(91)90006-6).
- 63) Pujadas, L., Rossi, D., Andrés, R., Teixeira, C.M., Serra-Vidal, B., Parcerisas, A., Maldonado, R., Giralt, E., Carulla, N., and Soriano, E. (2014). Reelin delays amyloid-beta fibril formation and rescues cognitive deficits in a model of Alzheimer's disease. *Nature Communications* 5, 3443.
- 64) Puzzo, D., Privitera, L., Fa, M., Staniszewski, A., Hashimoto, G., Aziz, F., Sakurai, M., Ribe, E.M., Troy, C.M., Mercken, M., Jung, S., Palmeri, A., Arancio, O. (2011). Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Annals of neurology* 69, 819-830.
- 65) Qu, M., Jiang, J., Liu, X.P., Tian, Q., Chen, L.M., Yin, G., Liu, D., Wang, J.Z., and Zhu, L.Q. (2013). Reduction and the intracellular translocation of EphB2 in Tg2576 mice and the effects of β -amyloid. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39, 612-622.

- 66) Rajamohamedsait, H.B., and Sigurdsson, E.M. (2012). Histological staining of amyloid and pre-amyloid peptides and proteins in mouse tissue. *Methods Mol Biol* 849, 411-424.
- 67) Selkoe, D.J. (1989). Amyloid beta protein precursor and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Cell* 58, 611-612.
- 68) Selkoe, D.J., and Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8, 595-608.
- 69) Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., and Hyman, B.T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1, Online-Publikation; a006189. 10.1101/cshperspect.a006189.
- 70) Serrano-Pozo, A., and Growdon, J.H. (2019). Is Alzheimer's Disease Risk Modifiable? *J Alzheimers Dis* 67, 795-819.
- 71) Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., Regan, C., Walsh, D., Sabatini, B., Selkoe, D.J. (2008). Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine* 14, 837-842.
- 72) Shimizu, C., Yoshida, S., Shibata, M., Kato, K., Momota, Y., Matsumoto, K., Shiosaka, T., Midorikawa, R., Kamachi, T., Kawabe, A., and Shiosaka, S. (1998). Characterization of recombinant and brain neuropsin, a plasticity-related serine protease. *J Biol Chem* 273, 11189-11196.
- 73) Shimizu-Okabe, C., Yousef, G.M., Diamandis, E.P., Yoshida, S., Shiosaka, S., and Fahnstock, M. (2001). Expression of the kallikrein gene family in normal and Alzheimer's disease brain. *Neuroreport* 12, 2747-2751.

- 74) Shropshire, T.D., Reifert, J., Rajagopalan, S., Baker, D., Feinstein, S.C., and Daugherty, P.S. (2014). Amyloid β peptide cleavage by kallikrein 7 attenuates fibril growth and rescues neurons from A β -mediated toxicity in vitro. *Biol Chem* 395, 109-118.
- 75) Simón, A.M., de Maturana, R.L., Ricobaraza, A., Escribano, L., Schiapparelli, L., Cuadrado-Tejedor, M., Pérez-Mediavilla, A., Avila, J., Del Río, J., and Frechilla, D. (2009). Early changes in hippocampal Eph receptors precede the onset of memory decline in mouse models of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 17, 773-786.
- 76) Sipe, J.D., and Cohen, A.S. (2000). Review: History of the Amyloid Fibril. *Journal of Structural Biology* 130, 88-98.
- 77) Takahashi, R.H., Nagao, T., and Gouras, G.K. (2017). Plaque formation and the intraneuronal accumulation of beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Pathol Int* 67, 185-193.
- 78) Tamura, H., Ishikawa, Y., Hino, N., Maeda, M., Yoshida, S., Kaku, S., and Shiosaka, S. (2006). Neuropsin is essential for early processes of memory acquisition and Schaffer collateral long-term potentiation in adult mouse hippocampus in vivo. *J Physiol* 570, 541-551.
- 79) Tamura, H., Kawata, M., Hamaguchi, S., Ishikawa, Y., and Shiosaka, S. (2012). Processing of neuregulin-1 by neuropsin regulates GABAergic neuron to control neural plasticity of the mouse hippocampus. *J Neurosci* 32, 12657-12672.
- 80) Terayama, R., Bando, Y., Yamada, M., and Yoshida, S. (2005). Involvement of neuropsin in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 52, 108-118.
- 81) Teuber-Hanselmann, S., Rekowski, J., Vogelgsang, J., von Arnim, C., Reetz, K., Stang, A., Jockel, K.H., Wiltfang, J., Esselmann, H., Otto, M., Tumani, H.,

- Herring, A., Keyvani, K. (2020). CSF and blood Kallikrein-8: a promising early biomarker for Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 91, 40-48.
- 82) Thal, D.R., Rub, U., Orantes, M., and Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58, 1791-1800.
- 83) Tharp, W.G., and Sarkar, I.N. (2013). Origins of amyloid- β . *BMC Genomics* 14, 290.
- 84) Thinakaran, G., and Koo, E.H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *The Journal of biological chemistry* 283, 29615-29619.
- 85) Vermunt, L., Sikkes, S.A.M., van den Hout, A., Handels, R., Bos, I., van der Flier, W.M., Kern, S., Ousset, P.J., Maruff, P., Skoog, I., Verhey, F., Levi, Y., Tsolaki, M. (2019). Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimers Dement* 15, 888-898.
- 86) Vorhees, C.V., and Williams, M.T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 1, 848-858.
- 87) Walker, L.C. (2020). A β Plaques. *Free Neuropathol* 1, 31. Online-Publikation; 10.17879/freeneuropathology-2020-3025.
- 88) Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535-539.
- 89) Wilkins, H.M., and Swerdlow, R.H. (2017). Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain Res Bull* 133, 71-79.

- 90) Wisniewski, H.M., Bancher, C., Barcikowska, M., Wen, G.Y., and Currie, J. (1989). Spectrum of morphological appearance of amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 78, 337-347.
- 91) Woo, R.S., Lee, J.H., Kim, H.S., Baek, C.H., Song, D.Y., Suh, Y.H., and Baik, T.K. (2012). Neuregulin-1 protects against neurotoxicities induced by Swedish amyloid precursor protein via the ErbB4 receptor. *Neuroscience* 202, 413-423.
- 92) Xu, J., de Winter, F., Farrokhi, C., Rockenstein, E., Mante, M., Adame, A., Cook, J., Jin, X., Masliah, E., and Lee, K.-F. (2016). Neuregulin 1 improves cognitive deficits and neuropathology in an Alzheimer's disease model. *Scientific reports* 6, 31692-31692.
- 93) Yamamoto-Imoto, H., Zamolodchikov, D., Chen, Z.-L., Bourne, S.L., Rizvi, S., Singh, P., Norris, E.H., Weis-Garcia, F., and Strickland, S. (2018). A novel detection method of cleaved plasma high-molecular-weight kininogen reveals its correlation with Alzheimer's pathology and cognitive impairment. *Alzheimers Dement (Amst)* 10, 480-489.
- 94) Yoshida, S. (2010). Klk8, a multifunctional protease in the brain and skin: analysis of knockout mice. *Biol Chem* 391, 375-380.
- 95) Young, E.J., Lipina, T., Tam, E., Mandel, A., Clapcote, S.J., Bechar, A.R., Chambers, J., Mount, H.T.J., Fletcher, P.J., Roder, J.C., and Osborne, L.R. (2008). Reduced fear and aggression and altered serotonin metabolism in Gtf2ird1-targeted mice. *Genes Brain Behav* 7, 224-234.
- 96) Zarghooni, M., Soosaipillai, A., Grass, L., Scorilas, A., Mirazimi, N., and Diamandis, E.P. (2002). Decreased concentration of human kallikrein 6 in brain extracts of Alzheimer's disease patients. *Clin Biochem* 35, 225-231.
- 97) Zhang, X., Li, Y., Xu, H., and Zhang, Y.-W. (2014). The γ -secretase complex: from structure to function. *Front Cell Neurosci* 8, 427-427.

- 98) Zhou, L., Barão, S., Laga, M., Bockstael, K., Borgers, M., Gijssen, H., Annaert, W., Moechars, D., Mercken, M., Gevaert, K., and De Strooper, B. (2012). The neural cell adhesion molecules L1 and CHL1 are cleaved by BACE1 protease in vivo. *J Biol Chem* 287, 25927-25940.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A β	Beta-Amyloid
AD.....	Alzheimer's disease
AICD.....	Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain
ANOVA.....	Analysis of Variance
APH-1.....	Anterior Phalanx Defective 1
APOE.....	Apolipoprotein E
APP.....	Amyloid Precursor Protein – Amyloid-Vorläufer-Protein
ARRIVE.....	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
BACE1.....	β -site of APP Cleaving Enzyme / β -Sekretase
BBB.....	Blood Brain Barrier – Blut-Hirn-Schranke
BG.....	Basalganglien
CA1.....	Hippocampale CA1-Region
CA3.....	Hippocampale CA3-Region
CAA.....	Cerebrale Amyloidangiopathie
CERAD.....	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSF.....	Cerebrospinal Fluid – Cerebrospinaler Liquor
CTF α	α -C-terminales Fragment
CTF β	β -C-terminales Fragment
DAB.....	Diaminobezidin
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
EOAD.....	Early Onset Alzheimer's Disease
EphB2.....	Ephrin-Typ-B-Rezeptor Typ 2
ErbB4.....	Rezeptor-Tyrosin-Kinase erbB-4
EZM.....	Extrazellulärmatrix
FEOAD.....	Familial Early Onset Alzheimers Disease
fAD.....	Familial Alzheimer's Disease
FDA.....	Federal Drug Association – Amerikanische Arzneimittelbehörde
FDG.....	Fluordesoxyglucose
FKBP5.....	FK506 Binding Protein 5
FN.....	Fibronectin
GABA.....	γ -Aminobuttersäure
H ₂ O.....	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
h.....	Stunden
hAPP.....	Human Amyloid Precursor Protein
HC.....	Hippocampus
HRP.....	Horse Radish Peroxidase
Klk6.....	Kallikrein-6
Klk7.....	Kallikrein-7
Klk8.....	Kallikrein-8 (neuropsin)
KLK8-KD.....	Kallikrein-8-Knockdown
KLK8-KO.....	Kallikrein-8-Knockout
L1CAM.....	L1 Cell Adhesion Molecule

LANUV.....	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LOAD.....	Late Onset Alzheimers Disease
LSD-Test.....	Least significant difference test
LTP.....	Langzeitpotenzierung
MAP2c.....	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2c
Min.....	Minuten
MCI.....	Mild Cognitive Impairment
mRNA.....	Messenger Ribonucleic Acid
mKlk8.....	Murines Kallikrein-8
mKlk8-KO.....	Murines Kallikrein-8-Knockout
MRT.....	Magnetresonanztomographie
<i>mSry</i>	Sex Determining Region Y
NaCl.....	Natriumchlorid
NMDA.....	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat
NRG1.....	Neuregulin-1
NIA-AA.....	National Institute on Aging and Alzheimers Association
NFTs.....	Neurofibrillary Tangles
O ₂	Sauerstoff
OFT.....	Open Field Test
p.....	Signifikanzwert
P.....	Postnataler Tag
PCR.....	Polymerase Chain Reaction
PET.....	Positronen-Emissions-Tomographie
PEBP1.....	Phosphatidylethanolamin-bindendes Protein 1
PEN2.....	Presenilin Enhancer 2
PSEN1.....	Presenilin 1
PSEN2.....	Presenilin 2
RELN.....	Reelin
rtPCR.....	Real-Time Polymerase Chain Reaction
RNA.....	Ribonucleic Acid
sAPP α	Soluble Amyloid Precursor Protein α
sAPP β	Soluble Amyloid Precursor Protein β
SEM.....	Standard Error of Mean
SKB.....	Subjektive Kognitive Beeinträchtigung
SNPs.....	Single Nucleotide Polymorphisms
TG.....	Transgen
TgCRND8.....	Transgene Center For Research In Neurodegenerative Diseases
WT.....	Wildtyp
ZNS.....	Zentrales Nervensystem

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Amyloidogene und nicht amyloidogene Prozessierung des Amyloid-Vorläufer Proteins APP

Abbildung 2: Repräsentative lichtmikroskopische Darstellung der zerebralen A β -Plaque-Pathologie

Abbildung 3: Darstellung der Ausbreitung der A β -Plaque-Pathologie nach den Thal-
Stadien

Abbildung 4: Verpaarungen zur Generierung der Experimentaltiergeneration

Abbildung 5: Lichtmikroskopische Darstellung eines exemplarischen Präparats mit Markierung der in dieser Arbeit untersuchten Gehirnareale.

Abbildung 6: Repräsentative lichtmikroskopische Darstellungen von A β -Plaques im Hippocampus und Basalganglien von transgenen Tieren

Abbildung 7: Stereologische Quantifizierung des prozentualen Volumen-Anteils der diffusen Plaques in Hippocampus und Basalganglien bei transgenen weiblichen (♀) und männlichen (♂) Mäusen ($hAPP^{+/-}$) mit ($mKlk8^{+/-}$) oder ohne ($mKlk8^{+/+}$) einem $mKlk8$ -Knockdown.

Abbildung 8: Stereologische Quantifizierung der totalen Anzahl der diffusen Plaques in Hippocampus und Basalganglien bei transgenen weiblichen (♀) und männlichen (♂) Mäusen ($hAPP^{+/-}$) mit ($mKlk8^{+/-}$) oder ohne ($mKlk8^{+/+}$) einem $mKlk8$ -Knockdown.

Abbildung 9: Stereologische Quantifizierung der Gesamtgröße der diffusen Plaques in Hippocampus und Basalganglien bei transgenen weiblichen (♀) und männlichen (♂) Mäusen ($hAPP^{+/-}$) mit ($mKlk8^{+/-}$) oder ohne ($mKlk8^{+/+}$) $mKlk8$ -Knockdown.

Abbildung 10: Stereologische Quantifizierung des prozentualen Volumenanteils, der totalen Plaque-Anzahl und der Gesamtgröße von Kern-Plaques im Hippocampus und Basalganglien von transgenen weiblichen (♀) und männlichen (♂) Mäusen (hAPP+/-) mit (*mKlk8*+/-) oder ohne (*mKlk8*+/+) einem *mKlk8*-Knockdown.

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe

7.4 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Chemikalien & Kits	Bezeichnung/Artikelnummer & Hersteller
ZytoChem Plus HRP Polymer Kits	Zytomed-Systems GmbH, Berlin, Deutschland
H ₂ O ₂ (3%)	S2023, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Waschpuffer	WL583C2500, DCS, Hamburg, Deutschland
BlockingSolution, Reagent 1	ZytoChem Plus HRP Polymer Kit, POLHRP-100, Zytomed-Systems GmbH, Berlin, Deutschland
6F/3D, A β -Amyloid Primär-AK	M0872, Maus, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland, 1:100)
PostBlock, Reagent 2, ZytoChem Plus HRP Polymer Kit	POLHRP-100, Zytomed-Systems GmbH, Berlin, Deutschland
HRP-Polymer, Reagent 3, ZytoChem Plus HRP Polymer Kit	POLHRP-100, Zytomed-Systems GmbH, Berlin, Deutschland
DAB (Diaminobenzidin) - Chromogen	K5001, DAKO Deutschland, GmbH, Hamburg, Deutschland

Hämatoxylin	S2020, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland, 1:25
Eindeckmedium Vitro-Clud®	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland

7.5 Geräte und Software

Bezeichnung	Gerät / Software	Hersteller
Färbeautomat	Dako Cytomation	TechMate Instruments, , Hamburg, Deutschland
Kamera	3/4“ chip, 36-bit color, DV-20	MicroBright-Field, Williston, USA
Lichtmikroskop	Nikon Eclipse 80i9	Nikon, Tokio, Japan
Stereo Investigator Software	Version 11	MicrobrightField, Wilston, VT, USA
Statistik-Software	SPSS 22	IBM Company, New York, USA

8 DANKSAGUNG

Mein herzlichster Dank geht an Frau Prof. Dr. Keyvani für das Überlassen des Themas und Ihre fachkundigen und engagierte Betreuung.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Arne Herring für die intensive und herzliche Betreuung über den gesamten Prozess der Labor- und Schreibphase.

Ganz herzlicher Dank gebührt ebenfalls Frau Nicole Macha und Frau Michaela Knoll, die mir mit viel Geduld und Engagement die Methoden im Labor nahebrachten.

Ein persönlicher Dank gilt meinen Freunden. Danke an Rustam und Dennis für die tatkräftige Begleitung in Büro und Oase. Danke an Salz ! Vor allem an Robin für das Korrekturlesen und seine scharfsinnige Präsenz.

9 TABELLARISCHER LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.