

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Neuropathologie

Die heterozygote Deletion von Kallikrein-8 verbessert die strukturelle Neuroplastizität
im transgenen CRND8 Mausmodell der Alzheimer-Krankheit

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

Vorgelegt von
Sofia Krebs
aus Duisburg
2022

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
D U I S B U R G
E S S E N

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/77061

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20230330-135134-4

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter/in: Frau Univ.-Prof. Dr. med. K. Keyvani
2. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. med. St. Klebe

Tag der mündlichen Prüfung: 22. September 2022

Anteilig ist diese Arbeit in folgender Veröffentlichung enthalten:

Herring, A., Kurapati, N.K., **Krebs, S.**, Grammon, N., Scholz, L.M., Voss, G., Miah, M.R., Budny, V., Mairinger, F., and Haase, K., et al. (2021). Genetic knockdown of Klk8 has sex-specific multi-targeted therapeutic effects on Alzheimer's pathology in mice. *Neuropathology and applied neurobiology* 47 (5), 611-624. DOI: [10.1111/nan.12687](https://doi.org/10.1111/nan.12687)

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG	6
1.1 Alzheimer-Krankheit.....	6
1.1.1 Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung.....	6
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren.....	6
1.1.3 Pathophysiologie und klinisches Bild.....	8
1.1.4 Diagnostik und Therapie.....	9
1.2 Neuroplastizität.....	11
1.2.1 Definition.....	11
1.2.2 Marker der strukturellen Neuroplastizität: SYP, GAP43, ARC.....	11
1.2.3 Hippokampale Neurogenese.....	12
1.2.4 Gestörte Neuroplastizität in der Alzheimer-Krankheit.....	13
1.3 Kallikrein-8.....	15
1.3.1 Physiologische Funktion.....	15
1.3.2 KLK8-Substrate: EPHB2, L1CAM, Fibronectin.....	15
1.3.3 Relevanz in der Alzheimer-Pathologie.....	16
1.4 Kallikrein-8 als Zielmolekül für die Therapie der Alzheimer-Krankheit.....	18
2 FRAGESTELLUNGEN	19
3 METHODEN.....	20
3.1 Mausmodelle und Tierhaltung	20
3.1.1 Gründerstämme.....	20
3.1.2 Intermediärgeneration.....	21
3.1.3 Experimentalgeneration.....	21
3.2 Verhaltensphänotypisierung.....	22
3.3 Probengewinnung.....	22
3.4 Extraktion von RNA, DNA und Protein	24
3.5 Proteinanalyse.....	25
3.5.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry	25
3.5.2 Probenvorbereitung.....	25
3.5.3 Fluoreszenz-Gelelektrophorese	25
3.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	26
3.5.5 Western Blot	26
3.5.6 Chemilumineszenz-basierte Proteindetektion.....	26

3.6	Immunhistologische Färbung DCX-positiver neuronaler Vorläuferzellen	27
3.7	Stereologische Quantifizierung DCX-positiver neuronaler Vorläuferzellen.....	28
3.8	Statistik.....	29
4	ERGEBNISSE	30
4.1	Kallikrein-8 <i>knock-down</i> steigert die zerebrale Konzentration der Plastizitäts-assoziierten KLK8-Substrate	30
4.1.1	Zunahme der zerebralen EPHB2-FL Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen.....	30
4.1.2	Zunahme der zerebralen L1CAM-FL Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen.....	31
4.1.3	Zunahme der zerebralen FN-FL Level durch KLK8-Suppression in weiblichen, nicht aber in männlichen transgenen Mäusen	32
4.2	Kallikrein-8 <i>knock-down</i> steigert die zerebrale Konzentration struktureller Plastizitätsmoleküle	34
4.2.1	Zunahme der zerebralen SYP Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen	34
4.2.2	Zunahme der zerebralen GAP43 Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen	35
4.2.3	Zunahme der zerebralen ARC Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen	37
4.3	Kallikrein-8 <i>knock-down</i> fördert die hippokampale Neurogenese in transgenen Mäusen	38
5	DISKUSSION	40
6	ZUSAMMENFASSUNG	48
7	SUMMARY	49
8	LITERATURVERZEICHNIS	50
9	ANHANG	62
9.1	Abbildungsverzeichnis	62
9.2	Tabellenverzeichnis.....	63
9.3	Abkürzungen.....	64
9.4	Materialien.....	65
10	DANKSAGUNG	71
11	LEBENS LAUF	72

1 EINLEITUNG

1.1 Alzheimer-Krankheit

1.1.1 Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung

Die Alzheimer-Krankheit (*Alzheimer's disease*, AD) ist die Hauptursache für Demenz und eine der großen Herausforderung im Gesundheitswesen des 21. Jahrhunderts (Scheltens et al., 2016). Aktuell geht man von 1,6 Millionen Demenzkranken in Deutschland (Bickel, 2020) und 57,4 Millionen Demenzkranken weltweit (Nichols et al., 2022) aus. Aufgrund der steigenden Lebenserwartung, die mit einem erhöhtem Erkrankungsrisiko verbunden ist, und der weltweit wachsenden Bevölkerung wird sich die Zahl der Betroffenen nach Vorhersagen 2050 in Deutschland auf 2,8 Millionen (Bickel, 2020) und weltweit auf 152,8 Millionen (Nichols et al., 2022) erhöhen. Frauen sind häufiger von einer Demenzerkrankung betroffen (Snyder et al., 2016). Es wird ein Anstieg jährlicher Gesamtzahlungen für Gesundheitsversorgung, Langzeitpflege und Hospizpflege für Menschen mit Alzheimer oder anderen Demenzerkrankungen von 958 Milliarden US-Dollar im Jahr 2018 auf 9,12 Billionen US-Dollar im Jahr 2050 weltweit (Jia et al., 2018) vorhergesagt.

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Den stärksten Risikofaktor für die ab dem 65. Lebensjahr auftretende späte Form der Alzheimer-Krankheit (*Late onset alzheimer's disease*, LOAD) stellt das steigende Lebensalter dar (Freel et al., 2018). Setzt die Alzheimer-Krankheit vor dem 65. Lebensjahr ein, wird sie als frühe Form (*Early onset alzheimer's disease*, EOAD) bezeichnet (Rossor et al., 2010). Der Anteil der EOAD an Alzheimer erkrankten Menschen beträgt ca. 5 % (Zhu et al., 2015). Eine Unterform der EOAD, die autosomal dominant-vererbte familiäre Alzheimer-Krankheit, wird durch Mutationen im Gen des Amyloid-Vorläuferproteins (*APP*), in dem Präsenilin-1-Gen (*PSEN1*) und dem Präsenilin-2-Gen (*PSEN2*) verursacht (Lanoiselée et al., 2017; Loy et al., 2014). Die Gegenwart einer weiteren Kopie des Chromosoms 21, das für *APP* codiert, gilt als Risikofaktor für die Entwicklung der EOAD bei Menschen, die eine Trisomie 21 aufweisen (Rossor et al., 2010).

Nicht nur die EOAD, sondern auch die LOAD, wird mit genetischen Varianten assoziiert, welche das Alzheimer-Erkrankungsrisiko beeinflussen: Eine Metaanalyse genomweiter Assoziationsstudien identifizierte mehrere Genloci, die mit einem erhöhten Risiko an einer LOAD verbunden waren (Kunkle et al., 2019). Polygene Risikowerte (*Polygenic risk scores*, PRS), die mehrere Gene mit erhöhtem Alzheimer-Erkrankungsrisiko zusammenfassen, konnten die Entwicklung einer AD bei Menschen mit leichter kognitiver Beeinträchtigung (*mild cognitive impairment*, MCI), welche zerebrale Amyloid-Ablagerungen aufwies, voraussagen (Leonenko et al., 2019). Die Ausprägung des Apolipoprotein E Typ-4 Allels (APOE-ε4) steigert das Erkrankungsrisiko an der LOAD (Corder et al., 1993) und ist mit pathologischer zerebraler Amyloidakkumulation bei an MCI erkrankten Menschen assoziiert (Leonenko et al., 2019). Weitere wichtige Risikofaktoren für die Entwicklung einer LOAD sind das fortgeschrittene Lebensalter (Querfurth and LaFerla, 2010) und die familiäre Belastung, wie z.B. eine AD-Diagnose bei Verwandten ersten Grades (Loy et al., 2014).

Zwei Drittel der an Alzheimer erkrankten Menschen sind Frauen (Snyder et al., 2016). Mögliche Gründe für die geschlechtsunterschiedlichen AD-Prävalenzen sind soziokulturelle Faktoren, wie Bildung, Beruf und Lebensstil sowie die Lebenserwartung und hormonelle Einflüsse, wie z.B. die neuroprotektive Wirkung von Androgenen in der AD (Keyvani et al., 2018; Snyder et al., 2016).

Es ist möglich das Erkrankungsrisiko für die LOAD, insbesondere durch die Einhaltung eines gesunden Lebensstils bezogen auf Ernährung, körperliche Aktivität und kognitives Training und über die Kontrolle kardiovaskulärer Risikofaktoren, wie arterielle Hypertonie, Adipositas, Diabetes mellitus Typ II und Nikotinabusus, zu senken (Querfurth and LaFerla, 2010; Scheltens et al., 2016).

1.1.3 Pathophysiologie und klinisches Bild

Das im zentralen Nervensystem exprimierte Amyloid-Vorläuferprotein (*Amyloid precursor protein*, APP) kann über einen nicht-amyloidogenen Weg (durch die α - und γ -Sekretase) und über einen amyloidogenen Weg (durch die β - und γ -Sekretase) prozessiert werden (Querfurth and LaFerla, 2010). Im Falle einer Alzheimer-Erkrankung überwiegt der amyloidogene Weg, bei dem Beta-Amyloid (A β) entsteht und extraneuronal als A β -Plaques akkumuliert (Querfurth and LaFerla, 2010). Diese Plaques besitzen neurotoxische Eigenschaften und sind mit Synapsenverlusten und kognitiven Einbußen assoziiert (Querfurth and LaFerla, 2010). Sie stellen das Hauptmerkmal für die Diagnostik der AD nach den CERAD- (*Consortium to establish a registry for alzheimer's disease*) Kriterien dar (Mirra et al., 1993).

Im Rahmen der Alzheimer-Krankheit kommt es zur intraneuronalen Aggregation von hyperphosphorylierten und fehlgefalteten Tau-Proteinen, die sog. neurofibrilläre *Tangles* (NFTs) ausbilden (Santacruz et al., 2005). NFTs stehen im Verdacht neuronalen Zelluntergang und kognitive Defizite zu verursachen (Santacruz et al., 2005). Die Intensität und Verteilung der NFTs im Gehirn von AD-Betroffenen werden als neuropathologische Kriterien für die Einteilung der AD in die Braak-Stadien verwendet (Braak and Braak, 1991).

Die pathologische Akkumulation von A β wird durch eine mangelhafte zerebrale Bereinigung, die sog. *Clearance*, verstärkt. In der AD sind unterschiedliche Mechanismen der A β -*Clearance* gestört: Ein eingeschränkter Transfer von A β -Peptiden über die Bluthirnschranke durch aktive Ein- und Auswärtstransportproteine oder eine mangelnde Integrität der Bluthirnschranke führen zu einer Akkumulation von A β im zerebralen interstitiellen Raum und in den zerebralen Gefäßwänden (Zlokovic, 2011). Das glymphatische System ermöglicht die Bereinigung des zerebralen interstitiellen Raums von Abfallstoffen wie z.B. A β (Tarasoff-Conway et al., 2015). Eine verminderte perivaskuläre und glymphatische A β -*Clearance* kann zu einer zerebralen Amyloid-Angiopathie führen (Zlokovic, 2011). Mikroglia, die Immunzellen des zentralen Nervensystems (ZNS), werden durch A β -Plaques aktiviert (Tarasoff-Conway et al., 2015). Die Aktivierung der Mikroglia induziert die Phagozytose von A β aus dem zerebralen interstitiellen Raum und bewirkt eine Sekretion von

proinflammatorischen Mediatoren wie z.B. Tumornekrosefaktor α und reaktiven Sauerstoffspezies in den Extrazellularraum (Tarasoff-Conway et al., 2015). Die chronische Entzündungsreaktion und ein proinflammatorisches Umgebungsmilieu führen zur Dysfunktion der Mikroglia und einer Schädigung der benachbarten Neurone sowie zu einer verminderten A β -Clearance in späteren Stadien der AD (Krabbe et al., 2013). Im Zuge der Alzheimer-Pathologie führt eine Imbalance exzitatorischer glutamaterger und inhibitorischer cholinergischer Neurone zur Dysfunktion neuronaler Netzwerke (Busche et al., 2012; Verret et al., 2012). Während sich die Menge nikotinerger Rezeptoren an cholinergen Synapsen reduziert, werden glutamaterge NMDA-Rezeptoren überaktiviert (Busche et al., 2012).

Bei dem Syndrom der leichten kognitiven Beeinträchtigung (*mild cognitive impairment*, MCI) weisen Betroffene Gedächtnis- und Denkstörungen bei minimal eingeschränkter Alltagskompetenz auf (Petersen et al., 2018). MCI wird als Prodromalsymptom der Alzheimer-Krankheit anerkannt, wenn Biomarker auf das Vorhandensein von Amyloid und Neurodegeneration hinweisen (Scheltens et al., 2016). Bei Manifestation der Alzheimer-Krankheit ist den Betroffenen die selbstständige Bewältigung des Alltags nicht mehr möglich. Das klinische Bild der Erkrankung ist vielfältig: Neben Defiziten des Gedächtnisses und der Orientierung können die Abnahme der Motivation, Adynamie und Depressivität ebenso auftreten wie Hyperaktivität, Wahn und Halluzinationen. Final kann es zu Störungen des Schlaf-/ Wachrhythmus und zur Harn- und Stuhlinkontinenz kommen (Scheltens et al., 2016).

1.1.4 Diagnostik und Therapie

Für die klinische Praxis wurden bisher drei Biomarker im Liquor (*Cerebrospinal fluid*, CSF) etabliert: Die 42-Aminosäuren-Form von A β (A β 42), Gesamt-Tau (*total* Tau, T-Tau) und phosphoryliertes Tau (P-Tau). A β 42 ist im Fall der AD aufgrund kortikaler Amyloid-Ablagerung in geringen Konzentrationen, T-Tau hingegen aufgrund kortikaler Verluste und P-Tau aufgrund der Bildung von neurofibrillären *Tangles* (NFTs) in hohen Konzentrationen im CSF nachweisbar (Olsson et al., 2016). Durch die Messung der CSF-Konzentrationen der drei Kernbiomarker können AD-bedingte milde kognitive Beeinträchtigungen und die AD sicher von gesunden Kontrollen unterschieden werden (Olsson et al., 2016).

Mithilfe der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) kann der zerebrale Glukosemetabolismus und die kortikale Amyloid-Belastung sowohl visualisiert als auch gemessen werden. Bei an Alzheimer erkrankten Personen kommt es zu temporo-parietal betontem Hypometabolismus als Zeichen synaptischer Dysfunktion (Scheltens et al., 2016). Eine negative Amyloid-PET schließt eine Alzheimer-Erkrankung als Ursache für milde kognitive Beeinträchtigung mit hoher Sicherheit aus (Scheltens et al., 2016). Postmortal kann die Alzheimer-Krankheit zum einen mittels neuropathologischem Nachweis von neuritischen Plaques in die CERAD-Klassifikation (Mirra et al., 1993) und zum anderen per Nachweis von NFTs in die Braak-Stadien (Braak and Braak, 1991) eingeteilt und diagnostisch gesichert werden.

Zur medikamentösen Behandlung der AD werden die Acetylcholinesterase-Inhibitoren Donezepil, Rivastigmin und Galantamin sowie der NMDA-Antagonist Memantin eingesetzt (Scheltens et al., 2016), die allesamt nur einen marginalen und passageren Effekt aufweisen.

A β und Tau werden als Schlüsselmoleküle in der Alzheimer-Pathologie angesehen. Zahlreiche klinische Studien, die A β und Tau als therapeutisches Zielmolekül verwendeten, mussten aufgrund fehlender Wirksamkeitsnachweise oder gravierender Nebenwirkungen eingestellt werden (Gauthier et al., 2016; Honig et al., 2018).

Unterdessen wurde der humane monoklonale Antikörper Aducanumab, der A β bindet, in den USA unter dem Handelsnamen AduhelmTM zugelassen. Aducanumab reduziert bei an Alzheimer erkrankten Personen im frühen Stadium zerebrale A β -Plaques (Sevigny et al., 2016). Eine Verlangsamung der kognitiven Degeneration von Alzheimer-Betroffenen konnte in großen Phase-3-Studien (EMERGE-Studie NCT02484547) initial nicht nachgewiesen werden. Nach Auswertung weiterer Daten verkündete der Hersteller, dass unter Verabreichung höherer Dosen von Aducanumab eine signifikante Verlangsamung des Krankheitsverlaufs erreicht wurde. Die Zulassung der *US-Food and Drug Administration* (FDA) erfolgte unter der Auflage, dass eine weitere Studie durch den Hersteller Biogen durchgeführt werden muss, um den Nutzen von Aducanumab zu belegen.

Es gilt neue Zielmoleküle zu identifizieren, die die Diagnostik der AD vereinfachen und dringend benötigte therapeutische Erfolge erzielen.

1.2 Neuroplastizität

1.2.1 Definition

Neuronale Netzwerke, geformt aus Verknüpfungen zwischen ca. 100 Milliarden zerebralen Neuronen, sind essenziell für physiologische Gehirnfunktionen wie Lernen und Gedächtnis, Emotion, Verhalten und Sensomotorik (D'Amelio and Rossini, 2012). Die Plastizität dieser Netzwerke, d.h. ihre Fähigkeit zur stetigen Reorganisation und Umwandlung angepasst an innere und äußere Einflüsse, wird strukturell u.a. durch axonales Wachstum, dendritische Modifikation und hippokampale Neurogenese realisiert (D'Amelio and Rossini, 2012). Neuroplastizität ist die Grundlage für die zerebrale Informationsverarbeitung und die Voraussetzung für kognitive Funktion sowie im Fall pathologischer Störungen der Auslöser neurologischer Erkrankungen (Pascual-Leone et al., 2005).

1.2.2 Marker der strukturellen Neuroplastizität: SYP, GAP43, ARC

Das Protein Synaptophysin (SYP) wird an präsynaptischen Nervenendigungen exprimiert und dient als Marker für die Dichte neuronaler Synapsen (Calhoun et al., 1996). Durch die Interaktion mit Synaptobrevin vermittelt es über die Fusion synaptischer Vesikel die Ausschüttung von Neurotransmittern (Edelmann et al., 1995).

Growth associated protein 43 (GAP43) ist ein präsynaptisches Protein, das verstärkt während der neuronalen Entwicklung und Synaptogenese exprimiert wird und im Hippokampus und Neokortex des adulten Gehirns vorhanden ist (La Monte et al., 1989). GAP43 ist über die Initiierung von axonalem Wachstum an synaptischer Plastizität und an Lern- und Gedächtnisfunktionen beteiligt (Allegra Mascaro et al., 2013; Routtenberg et al., 2000).

Das zur Familie der *immediate early genes* gehörende *Activity-regulated cytoskeleton-associated protein* (ARC) wird durch neuronale Stimulation vermehrt transkribiert und exprimiert (Shepherd and Bear, 2011). Der Transport von ARC *messenger ribonucleic acid* (mRNA) findet an Synapsen zwischen Nervenzellen via Exovesikeln statt und ist eine Voraussetzung für die intakte Funktion synaptischer Plastizität (Ashley et al., 2018).

1.2.3 Hippokampale Neurogenese

Im adulten Gehirn von Säugern findet die Neubildung von Nervenzellen ausschließlich im *Gyrus dentatus* des Hippokampus statt (Kempermann et al., 2004; Moreno-Jiménez et al., 2019). Ein Markerprotein für die hippocampale Neurogenese ist Doublecortin (DCX): Als Mikrotubuli-assoziiertes Protein ist DCX an der Migration von Neuroblasten beteiligt (Moreno-Jiménez et al., 2019) und wird zeitweise von neuronalen Vorläuferzellen in der ZNS-Entwicklung und im Stadium 3-5 der adulten hippocampalen Neurogenese von nicht-differenzierten, mitotischen neuronalen Vorläuferzellen des Typs 2b/3 und neuronal differenzierenden, postmitotischen Vorläuferzellen mit Neuritenfortsätzen exprimiert (s. Abbildung 1) (Kempermann et al., 2004).

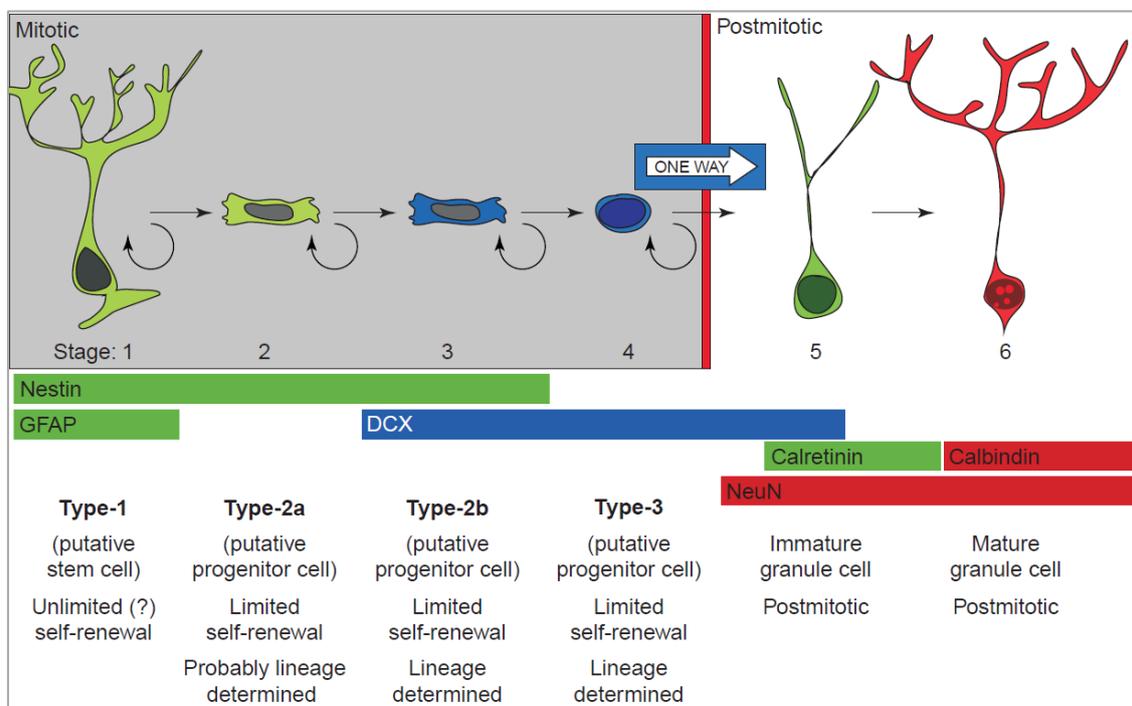


Abbildung 1 Die 6 Entwicklungsstadien der adulten hippocampalen Neurogenese (Kempermann et al., 2004). Sie werden durch die Zellmorphologie, die Proliferationsfähigkeit und die Expression der Marker Nestin, *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP), Doublecortin (DCX), Calretinin, Calbindin und *Neuronal nuclear protein* (NeuN) charakterisiert.

1.2.4 Gestörte Neuroplastizität in der Alzheimer-Krankheit

Beeinträchtigungen der synaptischen Integrität bis hin zum Untergang von Synapsen spielen bereits im frühen Stadium der Alzheimer-Krankheit eine entscheidende Rolle und korrelieren mit krankheitstypischen kognitiven Defiziten (Selkoe, 2002). Die Funktion inhibitorischer cholinergischer Neurone nimmt mit Fortschreiten der Alzheimer-Erkrankung ab, während die Aktivität exzitatorischer glutamaterger Neurone im AD-Mausmodell zunimmt (Busche et al., 2012; Verret et al., 2012). Die verminderte Funktion inhibitorischer Neurone in transgenen AD-Mäusen führt zu Abnormalitäten oszillatorischer Rhythmen, der unterbrochenen Synchronität neuronaler Netzwerke und Beeinträchtigungen des Gedächtnisses (Verret et al., 2012). Die bei der Elektroenzephalografie (EEG) gemessenen elektrischen Potenziale der langsamen Wellen des Neocortex, Hippokampus und Thalamus, welche während der non-REM-Schlafphase auftreten und als entscheidend für die Konsolidierung von Gedächtnisinhalten gelten, sind im AD-Mausmodell pathologisch beeinträchtigt (Busche et al., 2015).

Lösliche A β -Oligomere führen zu einer Hyperaktivität hippocampaler Neurone im Alzheimer-Mausmodell, noch bevor es zur Bildung von A β -Plaques kommt (Busche et al., 2012). A β interagiert mit cholinergen Rezeptoren und stört deren Funktionen (Querfurth and LaFerla, 2010). A β -Plaques wirken neurotoxisch und reduzieren die synaptische Plastizität: Sie führen zum Verlust von Synapsen und beeinflussen die Transmission von Einzelimpulsen sowie die Vorgänge der Langzeitpotenzierung zur Gedächtniskonsolidierung negativ (Querfurth and LaFerla, 2010; Selkoe, 2002).

Tau ist als Zytoskelett-assoziiertes Protein essenziell für die Aufrechterhaltung des anterograden und retrograden axonalen Transports, der für die Kommunikation zwischen Neuronen unabdingbar ist. Wenn Tau desintegriert, kommt dieser Transport zum Erliegen (Kent et al., 2020). Im transgenen Mausmodell, das vermehrt Tau exprimiert, führen fehlgefaltete, hyperphosphorylierte, intraneuronale akkumulierte Tau-Proteine zum Verlust von Neuronen, zu zerebraler Atrophie und zu kognitiven Defiziten wie Gedächtniseinbußen (Santacruz et al., 2005). Die Suppression von Tau im selben Mausmodell stoppt den Neuronenverlust und stellt die Gedächtnisfunktionen wieder her (Santacruz et al., 2005).

SYP ist als Marker für synaptische Dichte im Frontalkortex von AD-Betroffenen bereits im frühen Krankheitsverlauf im Vergleich zu gesunden Kontrollen stark reduziert (Masliah et al., 2001). Diese Reduktion der zerebralen SYP-Menge nimmt mit Fortschreiten der Krankheit zu (Masliah et al., 2001).

Auf der einen Seite ist die Proteinmenge von GAP43 im Frontalkortex von Alzheimer-kranken Menschen im fortgeschrittenen Krankheitsstadium im Vergleich zu gesunden Kontrollen reduziert (Masliah et al., 2001). Auf der anderen Seite sind erhöhte GAP43 Level im CSF von Menschen mit AD beschrieben (Sandelius et al., 2019). Gesteigerte GAP43 Level, zu Beginn der Alzheimer-Erkrankung, lassen sich durch eine vermehrte Expression bei axonaler Schädigung erklären (Allegra Mascaro et al., 2013) – möglicherweise um die Konnektivität neuronaler Netzwerke aufrechtzuerhalten und um den stattfindenden Funktionsverlust von Synapsen in der Alzheimer-Erkrankung zu kompensieren.

Bestimmte Varianten des ARC Gens sind mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für die Alzheimer-Krankheit assoziiert (Bi et al., 2018). Im AD-Mausmodell ist die Stimulus-abhängige Expression von ARC im Kortex in der Nähe von A β -Plaques im Vergleich zu Wiltyp-Mäusen gestört (Rudinskiy et al., 2012): Die ARC Expression ist in *hAPP*-transgenen Mäusen in hippokampalen und kortikalen Neuronen im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrolltieren reduziert (Palop et al., 2005).

Die Neubildung von Nervenzellen ist im *Gyrus dentatus* von Menschen mit Alzheimer-Krankheit beeinträchtigt: Es kommt zur verringerten Anzahl und zu verminderter Reife neuronaler DCX-positiver Vorläuferzellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Moreno-Jiménez et al., 2019).

1.3 Kallikrein-8

1.3.1 Physiologische Funktion

Die extrazelluläre Serinprotease Kallikrein-8 (KLK8, alias: Neuropsin) ist eine von 15 Gewebs-Kallikreinen, die u.a. in Haut, Nervensystem, Pankreas, Brust, Prostata und Niere exprimiert werden (Masurier et al., 2018). Die Gewebs-Kallikreine besitzen hohe strukturelle Homogenität, unterscheiden sich jedoch in ihrer Expression und proteolytischen Aktivität (Masurier et al., 2018). KLK8 imponiert im zentralen Nervensystem als dosis-abhängiger Modulator der Neuroplastizität und des Gedächtnisses (Konar et al., 2018; Tamura et al., 2006). Eine gestörte physiologische Funktion von KLK8 ist im Zusammenhang mit Epilepsie (Momota et al., 1998), multipler Sklerose (Terayama et al., 2005) und Depression (Chang et al., 2016) beschrieben worden.

1.3.2 KLK8-Substrate: EPHB2, L1CAM, Fibronectin

Als Protease spaltet KLK8 die im Nervensystem weit verbreiteten Substrate Neuregulin 1 (NRG1) (Tamura et al., 2012), *Neuronal cell adhesion molecule L1* (L1CAM) (Matsumoto-Miyai et al., 2003), Fibronectin (FN) (Shimizu et al., 1998) und Ephrinrezeptor B2 (EPHB2) (Attwood et al., 2011).

EPHB2 spielt eine entscheidende Rolle in synaptischen Funktionen wie der Regulation der synaptischen Plastizität, der Steigerung der Motilität dendritischer Fortsätze und der Förderung von axonalem Wachstum und Regeneration (Wilkinson, 2001). Die Spaltung von EPHB2 durch KLK8 in der Amygdala löst vermehrte Ängstlichkeit im Mausmodell aus (Attwood et al., 2011). Das präsynaptisch lokalisierte L1CAM vermittelt die Vernetzung von GABAergen Interneuronen mit exzitatorischen pyramidalen Neuronen des Neocortex und ist somit essenziell für die Formation neuronaler Netzwerke (Tai et al., 2019). Das ubiquitär vorkommende Fibronectin ist als Komponente der Extrazellulärmatrix (EZM) relevant für die Adhäsion, die Migration, das Wachstum und die Differenzierung von Zellen (Singh et al., 2010).

1.3.3 Relevanz in der Alzheimer-Pathologie

Die Protease KLK8 spielt im Feld der Alzheimer-Forschung noch eine eher unbekanntere Rolle. Unsere Arbeitsgruppe konnte eine relevante Bedeutung von KLK8 in der Alzheimer-Pathogenese aufzeigen:

Pathologisch erhöhte Level von KLK8 mRNA und Protein wurden in verschiedenen Regionen von transgenen Mäusen mit Alzheimer-ähnlicher Pathologie (Herring et al., 2016), in von AD betroffenen menschlichen Gehirnen (Herring et al., 2016; Shimizu-Okabe et al., 2001) sowie in Blut und in CSF von Personen vor Eintritt klinischer Symptome der AD (Teuber-Hanselmann et al., 2019) detektiert. Zerebrale KLK8 Level waren, unabhängig von der AD-Pathologie, in Frauen und weiblichen Mäusen im Gegensatz zum männlichen Geschlecht erhöht (Keyvani et al., 2018).

Auch die Substrate von KLK8 scheinen in die Pathologie der AD involviert zu sein: Die EPHB2-Menge ist im späten Krankheitsverlauf im Hippokampus von AD-Betroffenen reduziert (Herring et al., 2016). Vorherige Arbeiten demonstrierten, dass die Ligandenmedierte Stimulation von EPHB2 die Tau-Hyperphosphorylierung in Tau-transgenen Mäusen abschwächt (Jiang et al., 2015). L1CAM bindet A β -Peptide und reduziert die A β -Plaque-Belastung in transgenen AD-Mäusen (Djogo et al., 2013; Konar et al., 2018). L1CAM wird nicht nur von KLK8, sondern auch vom *Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1* (BACE1) gespalten, das APP spaltet und notwendig für die A β -Produktion ist (Zhou et al., 2012). Fibronectin fördert die Sekretion von APP nach extrazellulär und behindert die APP-Integration in Plasmamembranen und die anschließende A β -Bildung in Mikroglia-Zellkulturen (Mönnig et al., 1995). Reduzierte FN Plasmalevel sind mit der klinischen Diagnose der Alzheimer-Krankheit und fortgeschrittener Atrophie des linken und rechten Hippokampus assoziiert (Sattlecker et al., 2014).

Außerdem konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass sich KLK8 potenziell als diagnostischer Biomarker in CSF und Blut von AD- und MCI-Betroffenen eignet: CSF-KLK8 und Blut-KLK8 schnitten in ihrer diagnostischen Leistung identisch bei AD und besser bei MCI ab im Vergleich zu den etablierten Kernmarkern A β 42, T-Tau und P-Tau (Teuber-Hanselmann et al., 2019).

Unsere Arbeitsgruppe erreichte durch eine transiente, vierwöchige Antikörpervermittelte Inhibition von pathologisch erhöhtem KLK8 in transgenen CRND8 Mäusen eine Abschwächung zahlreicher pathologischer Eigenschaften der Alzheimer-Krankheit: Die A β -Pathologie, die Tau-Hyperphosphorylierung, die neurovaskuläre Dysfunktion, die Störung der mikroglialen A β -Phagozytose, die Defizite der strukturellen Neuroplastizität, die verringerte Anzahl neuronaler Vorläuferzellen im Hippokampus, die Ängstlichkeit und mnestiche Störungen wurden abgemildert (Herring et al., 2016; Münster et al., 2020). Interessanterweise bewirkte die KLK8-Inhibition in wildtypischen Mäusen ohne pathologische KLK8-Überexpression nahezu keine (positiven oder negativen) Effekte (Herring et al., 2016; Münster et al., 2020).

Die sehr frühe und multifokale KLK8-Überexpression (bei an Alzheimer erkrankten Mäusen vor Ausprägung der A β -Pathologie und bei an Alzheimer erkrankten Menschen im Stadium CERAD A, Braak I-II (Herring et al., 2016)) weist darauf hin, dass KLK8 eine initiale und kausale Rolle in einer Kaskade von Ereignissen spielen könnte, die zur Ausprägung der Alzheimer-Krankheit führen. Eine nur vierwöchige Inhibition von KLK8 in einem moderaten Krankheitsstadium brachte beachtliche therapeutische Effekte in transgenen Mäusen hervor. Dieses Ergebnis erlaubt es unserer Arbeitsgruppe die Hypothese aufzustellen, dass KLK8 ein neues therapeutisches Ziel für die Alzheimer-Krankheit darstellen könnte.

1.4 Kallikrein-8 als Zielmolekül für die Therapie der Alzheimer-Krankheit

Im Rahmen eines neuen Projektes sollte diese Hypothese nun mit einem neuen Ansatz verifiziert werden.

Unser neuer Ansatz bestand in einer genetisch vermittelten permanenten und langfristigen KLK8-Reduktion. Umgesetzt wurde dies durch die heterozygote Deletion von murinem Kallikrein-8 (*mKlk8*), um die potenziell unspezifische Interaktion des anti-KLK8-Antikörpers und den kurzen Zeitraum der KLK8-Inhibition des Vorgänger-Projektes (Herring et al., 2016) zu umgehen. Dazu kreuzten wir Kallikrein-8 *knock-down*-Mäuse [*mKlk8*^{+/-}] mit transgenen Mäusen, die humanes Amyloid-Vorläuferprotein überexprimierten [*hAPP*^{+/-}]. Verschiedene Aspekte der Alzheimer-Pathologie wurden in weiblichen und männlichen Nachkommen mit und ohne Alzheimer-ähnlicher Pathologie [*hAPP*^{+/-}] oder [*hAPP*^{-/-}] sowie mit und ohne *mKlk8 knock-down* [*mKlk8*^{+/-} oder *mKlk8*^{+/+}] detailliert erforscht, um die Ergebnisse, die durch die transiente KLK8-Inhibition durch unsere Arbeitsgruppe erzielt wurden, mittels hochspezifischer und permanenter KLK8-Suppression zu verifizieren.

Im Rahmen dieses Projektes wurden die Effekte eines *mKlk8 knock-downs* auf unterschiedliche Aspekte der Krankheit, namentlich auf die A β -Pathologie, die Tau-Hyperphosphorylierung, die neurovaskuläre Dysfunktion, die kortikale und hippocampale Autophagie, die mikrogliale Belastbarkeit und A β -Phagozytose, die strukturelle Neuroplastizität, die hippocampale Neurogenese, die Ängstlichkeit und das Wiedererkennungsgedächtnis, untersucht. Der Fokus meiner Doktorarbeit lag auf struktureller Neuroplastizität.

2 FRAGESTELLUNGEN

Ziel meines Forschungsprojektes war es, die Auswirkungen einer genetisch vermittelten permanenten KLK8-Reduktion in weiblichen und männlichen transgenen CRND8 Mäusen und nicht-transgenen Kontrolltieren auf die strukturelle Neuroplastizität zu untersuchen. Diese Arbeit widmet sich der Beantwortung folgender Fragen:

Wie wirkt ein *mKlk8 knock-down* auf

- 1) die zerebralen Level der Plastizitäts-assoziierten KLK8-Substrate EPHB2-FL, L1CAM-FL und FN-FL?
- 2) auf die zerebralen Level struktureller Plastizitätsmoleküle SYP, GAP43 und ARC?
- 3) die hippocampale Neurogenese?

3 METHODEN

In diesem Kapitel werden die der Arbeit zugrunde liegenden Methoden und Versuchsabläufe beschrieben. Die dafür genutzten Materialien werden im Anhang tabellarisch aufgeführt.

Die Arbeitsschritte 3.1 bis 3.4, 3.5.1, 3.5.3 und 3.6 wurden von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe durchgeführt und sind kein praktischer Bestandteil jedoch Basis der vorliegenden Arbeit. Die Arbeitsschritte Probenvorbereitung (3.5.2), SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.5.4), Western Blot (3.5.5), Chemilumineszenz-basierte Proteindetektion und die densitometrischen Analysen (3.5.6), stereologische Quantifizierung Doublecortin-positiver neuronaler Vorläuferzellen (3.7) und Statistik (3.8) wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit eigenständig durchgeführt. Alle Daten wurden verblindet erhoben.

3.1 Mausmodelle und Tierhaltung

Um den Einfluss einer permanenten KLK8-Reduktion auf die Alzheimer-Pathologie in einem Mausmodell zu untersuchen, wurden nachfolgend beschriebene Gründerstämme ausgewählt und zur Intermediärgeneration verpaart, um eine Experimentalgeneration zu erzeugen.

3.1.1 Gründerstämme

Der transgene CRND8-Mausstamm der Gründergeneration trägt hemizygot eine Doppelmutation des humanen Amyloid-Vorläuferprotein-695-Transgens [*hAPP*^{+/-}] in Form der „Swedish“ und „Indiana“ Mutation [KM670/671NL & V717F] unter der Kontrolle des Hamster Prion-Protein-Promoters (Chishti et al., 2001) auf einem C57BL/6-C3H/HeJ-Hybrid-Hintergrundstamm (Tanz Center for Research in Neurodegenerative Diseases, Toronto, Kanada). Ab dem 30. Tag postnatal (P30) kommt es in transgenen CRND8-Mäusen zu einem zerebralen Überschuss an KLK8 (Herring et al., 2016), gefolgt von stereotypischem Verhalten der Tiere ab P60 (Ambrée et al., 2006). Zerebrale A β -Plaquetbildung und kognitive Defizite setzen ab P90 ein (Chishti et al., 2001).

Als Gründergeneration dienten außerdem Kallikrein-8 *knock-out*-Mäuse (homozygoter *knock-out* für murines *Klk8* [*mKlk8*^{-/-}]) auf dem Hintergrundstamm C57BL/6J (B6.129P2-KLK8<tm1Shio>, RIKEN BioResource Research Center, Tsukuba, Japan). Sie sind lebensfähig und fertil (Davies et al., 2001). Sie zeigen milde hippokampale, synaptische und neuronale Veränderungen, wie beispielsweise eine verminderte Dichte asymmetrischer Synapsen, eine gesteigerte Anzahl Parvalbumin-produzierender Zellen und vergrößerte Pyramidalzellsoma (Hirata et al., 2001). Außerdem wurden Beeinträchtigungen in der hippokampalen Langzeitpotenzierung (LTP) sowie in Hippokampus-assoziierten Gedächtnisleistungen beschrieben (Tamura et al., 2006).

3.1.2 Intermediärgeneration

Die *mKlk8 knock-out*-Mäuse wurden mit C3H/HeJ-Mäusen (wildtypisch für *mKlk8* [*mKlk8*^{+/+}]) verpaart, sodass als Ergebnis *mKlk8 knock-down*-Mäuse entstanden, die heterozygot für *mKlk8* [*mKlk8*^{+/-}] sind und den C57BL/6-C3H/HeJ-Hybrid-Hintergrund (übereinstimmend zu transgenen CRDN8-Mäusen) besitzen.

3.1.3 Experimentalgeneration

Um die KLK8-Konzentration in transgenen CRND8-Mäusen permanent zu senken, wurden weibliche *mKlk8 knock-down*-Mäuse (nicht transgen für *hAPP* und heterozygot für *mKlk8* [*hAPP*^{-/-}; *mKlk8*^{+/-}]) mit männlichen transgenen CRND8-Mäusen verpaart (zeigen eine AD-ähnliche Pathologie und einen zerebralen Überschuss an KLK8 [*hAPP*^{+/-}; *mKlk8*^{+/+}]), sodass die folgenden vier Genotypen entstanden:

- 1) Transgene Mäuse mit Alzheimer-ähnlicher Pathologie, die erhöhte Kallikrein-8 Level im Gehirn aufweisen [*hAPP*^{+/-}; *mKlk8*^{+/+}] (Herring et al., 2016).
- 2) Transgene Mäuse mit heterozygoter Deletion von Kallikrein-8 (*mKlk8 knock-down*), die 50 % weniger KLK8 produzieren als transgene CRDN8-Mäuse [*hAPP*^{+/-}; *mKlk8*^{+/-}].
- 3) Wildtyp-Mäuse ohne *hAPP*-Transgen (und demnach ohne Alzheimer-ähnliche Pathologie) und ohne *mKlk8 knock-down* [*hAPP*^{-/-}; *mKlk8*^{+/+}].
- 4) Nicht-transgene Mäuse mit heterozygoter Deletion von *mKlk8*, die 50 % weniger KLK8 produzieren als Wildtyp-Mäuse [*hAPP*^{-/-}; *mKlk8*^{+/-}].

Mäuse aller Generationen, aller Genotypen und beider Geschlechter lebten in Standardhaltung (SH) in Makrolon Typ III-Käfigen zusammen mit den Muttertieren bis zum 30. Lebenstag (frühe Jugendzeit, bevor die A β -Pathologie beginnt). Ab P30 bis P207 wurden die Mäuse getrenntgeschlechtlich in Dreier- bis Vierer-Gruppen in SH gehalten. Für die Generierung der Intermediär- und Experimentalgenerationen wurden je ein weibliches und ein männliches Tier gemeinsam pro Käfig gehalten. Die Versuchsgruppen wurden zufällig und zu gleichen Anteilen aus den Nachkommen der Zuchtpaare zusammengesetzt, um eine Effektverzerrung durch den elterlichen Genotyp auf den Phänotyp der Experimentalgeneration zu verhindern.

An P30 erfolgte für die Mäuse aller Generationen die Genotypisierung durch konventionelle PCR für *hAPP*, *mKlk8* (die Benutzung drei verschiedener Primer erlaubte die Unterscheidung zwischen *mKlk8*^{-/-}, *mKlk8*^{+/-} und *mKlk8*^{+/+}) und zur Verifizierung des Geschlechts für die murine *sex determining region*^o*Y* (*mSry*).

Sowohl die Intermediärgeneration als auch die Experimentalgeneration waren lebensfähig und wiesen im Vergleich zu den Gründerstämmen keine zusätzlichen Pathologien auf. Den Tieren aller Generationen standen zu jeder Zeit Futter und Wasser zur freien Verfügung.

3.2 Verhaltensphänotypisierung

Zur Untersuchung des Phänotyps der Tiere der Experimentalgeneration wurden mehrere Verhaltenstests zwischen P210 und P234 durchgeführt. Dazu mussten die Tiere eine Woche vor Testbeginn an einen invertierten Tag-Nacht-Rhythmus angepasst werden. Mittels *Elevated-Plus-Maze* (Young et al., 2008) konnte die Ängstlichkeit der Tiere analysiert werden. Der *Open-Field-Test* (Kilic et al., 2010) diente der Untersuchung des allgemeinen Explorationsverhaltens der Tiere. Zur Prüfung des Objekt-Wiedererkennungsgedächtnisses diente der *Novel-Object-Test*.

3.3 Probengewinnung

Zwecks Entnahme von Hirngewebe und anschließender Herstellung der Proben wurden die Mäuse der Experimentalgeneration einen Tag nach Abschluss der Verhaltensphänotypisierung (P226 \pm 0,77) mit einem Kohlendioxid-Sauerstoff-Gemisch anästhesiert und anschließend mit reinem Kohlendioxid bei einer Flussrate von 1,8 l/min

getötet. Zur Entnahme und Präparation des Gehirns wurden die Tiere dekapitiert. Aus der rechten Hemisphäre erfolgte die Isolation von Neokortex und Hippokampus. Der Neokortex wurde zur Extraktion von RNA, *Deoxyribonucleic acid* (DNA) und Proteinen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Hippokampus wurde zur nachfolgenden stereologischen Quantifizierung der Dendritenverzweigung und *Spine*-Dichte in einer Golgi-Cox Lösung imprägniert. Die linke Hemisphäre wurde in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und zugeschnitten. Sie wurde zur immunhistologischen Färbung und stereologischen Auswertung verwendet. Tabelle 1 stellt die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe der Experimentalgeneration dar:

Gruppe	Geschlecht	<i>hAPP</i> - Transgen	<i>mKlk8</i> <i>knock-down</i>	Anzahl Tiere
1	♀	<i>hAPP</i> ^{+/-}	<i>mKlk8</i> ^{+/+}	12
2	♀	<i>hAPP</i> ^{+/-}	<i>mKlk8</i> ^{+/-}	12
3	♂	<i>hAPP</i> ^{+/-}	<i>mKlk8</i> ^{+/+}	12
4	♂	<i>hAPP</i> ^{+/-}	<i>mKlk8</i> ^{+/-}	11
5	♀	<i>hAPP</i> ^{-/-}	<i>mKlk8</i> ^{+/+}	10
6	♀	<i>hAPP</i> ^{-/-}	<i>mKlk8</i> ^{+/-}	12
7	♂	<i>hAPP</i> ^{-/-}	<i>mKlk8</i> ^{+/+}	13
8	♂	<i>hAPP</i> ^{-/-}	<i>mKlk8</i> ^{+/-}	12
Gesamt	-	-	-	94

Tabelle 1 Anzahl der untersuchten Tiere der Experimentalgeneration für Western Blot-Analysen und Doublecortin-Stereologie

Die Tierzucht, die Verhaltensphänotypisierung und die Gehirnentnahme erfolgten im Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen.

Die Genehmigung für die Züchtung, Verhaltensphänotypisierung und Dekapitation der Mäuse mit anschließender Probenentnahme wurde durch das Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz NRW entsprechend der EU-Richtlinien 2010/63/EU erteilt (AZ 84-02.04.2014.A488).

3.4 Extraktion von RNA, DNA und Protein

Der rechtshemisphärische Neokortex der Experimentalgeneration diente der Extraktion von RNA, DNA und Proteinen. Das zuvor bei -80 °C gekühlte Gewebe wurde unter Zugabe von $800\text{ }\mu\text{l}$ Trizol-Reagenz im Mikrodismembrator zur Homogenisierung für 2 Minuten bei 2.500 rpm zertrümmert. Die Proben wurden im Reaktionsgefäß mit $800\text{ }\mu\text{l}$ Trizol-Reagenz für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von $200\text{ }\mu\text{l}$ Chloroform, 15-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm erfolgte die Phasentrennung der Proben in eine obere wässrige Phase (RNA), eine mittlere trübe Phase (DNA) und eine untere organische Phase (Proteine). Die obere Phase wurde in $500\text{ }\mu\text{l}$ Trizol-Reagenz überführt, anschließend mit $100\text{ }\mu\text{l}$ Chloroform inkubiert und für 15 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Die Fällung der RNA erfolgte durch die Inkubation der oberen Phase mit $800\text{ }\mu\text{l}$ Isopropanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur und einer 60-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm . Das so entstandene RNA-Pellet wurde durch zweimaliges Versetzen mit $80\text{ }\%$ Ethanol in Diethylcarbonat (DEPC)- H_2O und anschließender Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm für 5 Minuten gereinigt. Der Überstand wurde jeweils verworfen und das Pellet getrocknet. Zur Konservierung wurde das Pellet in DEPC- H_2O gelöst und bei -80 °C gelagert. Die verbliebenen mittleren und unteren organischen Phasen wurden zur DNA-Isolation mit $480\text{ }\mu\text{l}$ $100\text{ }\%$ Ethanol inkubiert und für 5 Minuten bei 4 °C und 5.000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde zur Proteinextraktion abgezogen und zu gleichen Teilen in zwei neue Reaktionsgefäße überführt. Das verbliebene DNA-Pellet wurde bei -20 °C zwischengelagert und anschließend bei -80 °C konserviert. Der Überstand aus der DNA-Isolation wurde mit $2,4\text{ ml}$ Isopropanol für 10 Minuten inkubiert und für 10 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Proteinpellet wurde dreimalig mit $3,2\text{ ml}$ $0,3\text{M}$ Guandinhydrochlorid-Lösung in $95\text{ }\%$ Ethanol für 20 Minuten inkubiert, 5 Minuten bei 4 °C und 10.000 rpm zentrifugiert und vom Überstand getrennt. Darauf folgte die Zugabe von $1,6\text{ ml}$ $100\text{ }\%$ Ethanol und eine 5-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 rpm . Das Proteinpellet wurde zerkleinert und bei 40 °C getrocknet. Die Lösung der Proteine erfolgte durch Zugabe eines Proteaseinhibitorcocktails (1:1.000), Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) (1:100) und $800\text{ }\mu\text{l}$ Aqua dest. mit $1\text{ }\%$ SDS. Die Proben wurden bei 40 °C geschüttelt und mehrmalig beschallt. Zur Konservierung wurden sie bei -80 °C gelagert.

3.5 Proteinanalyse

3.5.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration in den zuvor extrahierten Proben erfolgte mithilfe der Lowry-Methode (Lowry et al., 1951) unter Verwendung des *DC™* Protein Assay Kits II. Die photometrische Messung wurde bei 750 nm im Multiskan™ FC durchgeführt.

3.5.2 Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung auf die Gelelektrophorese wurden die Proteine von -80 °C auf 40 °C aufgetaut. Die benötigten Proteinmengen wurden mit Standard-Lysepuffer und 5x Sodiumdodecylsulfat (SDS)-2-Mercaptoethanol-Auftragspuffer (s. Tabelle 6) versetzt. Die fertigen Proben wurden 5 Minuten bei 95 °C auf dem Thermomixer denaturiert, 5 Minuten bei 4 °C gekühlt und zuletzt 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Die Proteinmenge je angesetzter Probe betrug zur Bestimmung von nicht-fragmentiertem *full-length* [FL] EPHB2 (EPHB2-FL), GAP43 und SYP je $20\text{ }\mu\text{g}$, zur Bestimmung von ARC und L1CAM-FL je $30\text{ }\mu\text{g}$ und zur Bestimmung von FN-FL $50\text{ }\mu\text{g}$, jeweils in einem Volumen von $25\text{ }\mu\text{l}$. Es wurde die zerebrale Expression der genannten Proteine in 94 Tieren der Experimentalgeneration bestimmt (s. Tabelle 1).

3.5.3 Fluoreszenz-Gelelektrophorese

Um die gesamte aufgetragene Proteinmenge der Proben zu bestimmen, wurde die Fluoreszenz-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde das TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit verwendet, mit welchem Trenngele und Sammelgele nach Vorgabe (s. Tabelle 6) hergestellt wurden. Nach dem Auftrag der Proben, jeweils $10\text{ }\mu\text{g}$ in einem Auftragsvolumen von $25\text{ }\mu\text{l}$, erfolgte die Elektrophorese. Anschließend wurden die Gele mithilfe des UV-Lichts der Kamera des ChemiDoc XRS+ Systems für 5 Minuten aktiviert. Die dabei entstandene Fluoreszenz wurde durch die Kamera des ChemiDoc XRS+ Systems im Modus UV-Transillumination aufgenommen. Die Signalstärken der Proteine wurden über die Image Lab™ Software (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) analysiert.

3.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente der Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld. Hierfür wurden die vorbereiteten Proben auf die zuvor hergestellten Acrylamidgele (bestehend aus Trenn- und Sammelgelen, s. Tabelle 6) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte mit einer Spannung von 120 Volt bis die Lauffront das Ende eines Gels erreichte.

3.5.5 Western Blot

Zum Transfer der Proteine von den Trenngelen auf die Trägermembranen wurde das Western Blot-Verfahren angewandt. Dazu wurden die Trenngele nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Blot-Puffer geschwenkt und zwischen Schwämme, Filter und Membranen zum Blotting-Sandwich zusammengesetzt. Bei einer Blotting-Zeit von 70 Minuten und einem Stromfluss von 0,25 Ampere wurden die in den Trenngelen befindlichen Proteine auf die anliegenden Membranen bei 4 °C übertragen. Anschließend wurden die Membranen in 1x *tris buffered saline with tween* (TST) gewaschen und zum Nachweis des Proteintransfers in 1x Ponceau S gefärbt. Nach der Entfärbung mit 1x TST wurden die Membranen mit 5 % Magermilchpulver (MMP) in 1x TST für 30 Minuten blockiert. Der Primärantikörper wurde mit 5 % MMP in 1x TST verdünnt auf die Membranen gegeben (s. Tabelle 2) und inkubiert bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag erfolgte nach zweimaligem Waschen und einer 30-minütigen Blockierung mit MMP die Inkubation mit *horseradish*-Peroxidase (HRP)-konjugiertem Sekundärantikörper (verdünnt in MMP, s. Tabelle 3) für 60 Minuten. Nach mehreren Waschschritten wurde die Chemilumineszenz-basierte Proteindetektion durchgeführt.

3.5.6 Chemilumineszenz-basierte Proteindetektion

Die Bestimmung der unter 3.5.2 genannten Proteine in den aus dem Neokortex isolierten Totalproteinproben der Tiere der Experimentalgeneration (s. Tabelle 1) erfolgte Chemilumineszenz-basiert unter Verwendung des Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagent-Kits für EPHB2-FL, FN-FL und L1CAM-FL sowie unter Verwendung des Immobilon Western HRP Substrat-Kits für ARC, GAP43 und SYP. Zur Vorbereitung der Bildgenerierung wurden die Expositionszeit, der Zoom und die Fokussierung der Kamera des ChemiDoc XRS+ Systems mithilfe der

Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) eingestellt. Die zuvor mit HRP-konjugiertem Sekundärantikörper inkubierten Membranen wurden für 1 Minute mit dem *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Kit benetzt. Dieses enthielt Luminol-Substrat und Peroxid-Reagenz. Das Luminol-Substrat wurde abhängig von der vorliegenden Peroxidase-Menge unter Freisetzung von Chemilumineszenz oxidiert. Die Kamera des ChemiDoc XRS+ Systems erfasste die Chemilumineszenz-Signale. Mithilfe der Image Lab™ Software wurden die detektierten Signalstärken analysiert, indem die Bandendicke densitometrisch in Zahlenwerte umgerechnet wurde. Durch die Ergebnisse der Fluoreszenz-Gelelektrophorese konnten die Zahlenwerte auf die Menge der aus dem Neokortex isolierten Totalproteine normiert werden. Die Chemilumineszenz-Signal-Intensität wurde hintergrundkorrigiert. Jede Probe wurde mindestens im Duplikat quantifiziert. Bei Abweichungen der Duplikat-Messungen von mehr als 10 % erfolgte eine dritte Bestimmung.

3.6 Immunhistologische Färbung DCX-positiver neuronaler Vorläuferzellen

Die immunhistologische Färbung ermöglichte die stereologische Analyse DCX-positiver neuronaler Vorläuferzellen. Die linke Hemisphäre der Mäuse der Experimentalgeneration wurde zur Vorbereitung auf die immunhistologische Färbung in koronare, 10 µm dicke Präparate geschnitten und auf Objektträgern fixiert. Zur Entparaffinierung und Anreicherung mit Wasser wurden sie mit Xylol, 100 % Ethanol, 96 % Ethanol, 70 % Ethanol und Aqua dest. behandelt. Die Schnitte wurden in 95 °C vorgewärmtem Citratpuffer (s. Tabelle 6) für 20 Minuten inkubiert. Hier erfolgte die *heat-induced epitope retrieval* (HIER)-Reaktion zur Verbesserung der Epitop-Verfügbarkeit. Nach 20-minütiger Abkühlung wurden die Objektträger in Aqua dest. gewaschen und anschließend mit Zellstoff abgetrocknet. Vor und nach einer 5-minütigen Behandlung mit 3 % H₂O₂ (*peroxidase blocking solution*) wurden die Objektträger in 1x Waschpuffer gegeben. Anschließend erfolgte die Präblockierung für 10 Minuten. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Objektträger in einer Färbekammer positioniert. Der primäre DCX-Antikörper wurde mit *antibody diluent* verdünnt (s. Tabelle 4), auf die Schnitte gegeben und inkubiert bei 4 °C über Nacht. Nach einem Waschschrift am nächsten Tag wurden die Schnitte 20 Minuten lang blockiert und gewaschen. Die 30-minütige Zugabe

des HRP-Polymers, gefolgt von der Applikation des Diaminobenzidins (DAB), führte zur Färbung DCX-positiver neuronaler Vorläuferzellen. Die Reagenzien für die Prä- und Postblockierung sowie das HRP-Polymer stammten aus dem ZytoChem Plus HRP Polymer System-Kit. Nach einem Waschschrift erfolgte eine Kerngegenfärbung mit in Aqua dest. 1:25 verdünntem Hämatoxylin. Zur Entwässerung und Konservierung wurden die Schnitte in umgekehrter Reihenfolge wie oben beschrieben mit Aqua dest., 70 %-, 96 %-, 100 %-Ethanol und Xylol behandelt. Durch das Eindeckmittel Cytoseal XYL wurden Deckgläser auf den Objektträgern fixiert. Zur Vorbereitung auf die stereologische Quantifizierung DCX-positiver Zellen wurden die Objektträger verblindet.

3.7 Stereologische Quantifizierung DCX-positiver neuronaler Vorläuferzellen

Die stereologische Quantifizierung DCX-positiver neuronaler Vorläuferzellen im Hippokampus der linken Hemisphäre der Tiere der Experimentalgeneration (s. Tabelle 1) erfolgte am Lichtmikroskop, das über eine Digitalkamera mit der Software Stereo Investigator 11 (MicroBrightField Bioscience, Williston, USA) verbunden war. Zunächst wurden die Objektträger in einer 20-fachen Vergrößerung mit einer Belichtungszeit von 15 ms unter dem Mikroskop positioniert. Die Kontur des Hippokampus wurde in der Stereo Investigator Software eingezeichnet, um die Größe des untersuchten Areal zu registrieren. Das Mikroskop wurde in die 200-fache Vergrößerung mit einer Belichtungszeit von 30 ms und geöffnetem Kondensator eingestellt. In der Software wurden die Größe des Zählrahmens und des Rasters mit 300x300 µm definiert. Es wurden zwei Populationen DCX-positiver neuronaler Vorläuferzellen innerhalb des *Gyrus dentatus* des Hippokampus quantifiziert: 1) Nicht-differenzierte, mitotische Typ 2b/3-Zellen ohne Neuritenfortsätze im Stadium 3-4 der hippocampalen Neurogenese und 2) neuronal differenzierende, postmitotische Vorläuferzellen mit Neuritenfortsätzen im Stadium 5 der hippocampalen Neurogenese (Kempermann et al., 2004). Die Ergebnisse wurden als Anzahl DCX-positiver mitotischer, nicht-differenzierter Typ 2b/3-Zellen bzw. DCX-positiver neuronal differenzierender Vorläuferzellen in Relation zur untersuchten Arealgröße (n/mm^2) angegeben. Pro Tier wurden sechs Hippokampus-Schnitte analysiert. Der Abstand zwischen den Schnitten betrug 100 µm.

3.8 Statistik

Die erhobenen Daten wurden zur Auswertung und Signifikanzanalyse statistischen Tests unterzogen. Dazu wurde die Software IBM® SPSS Statistics® 22 verwendet. Zur Überprüfung der Normalverteilung der Daten wurden der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest durchgeführt und Q-Q-Diagramme erstellt. Der Mittelwertvergleich mehrerer Gruppen der normalverteilten Daten der Proteinlevel von EPHB2-FL, FN-FL, GAP43 und ARC sowie der Anzahl DCX-positiver neuronaler Vorläuferzellen erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Transgen-Status ($hAPP^{+/-}$ vs. $hAPP^{-/-}$) und dem $mKlk8$ -Genotyp ($mKlk8^{+/+}$ vs. $mKlk8^{+/-}$) als Zwischensubjektfaktoren. Durch den *least significant difference* (LSD)-*post hoc*-Test wurde ermittelt, ob signifikante Unterschiede der abhängigen Variable in den vier Gruppen (transgene Mäuse mit Alzheimer-ähnlicher Pathologie, die erhöhte Kallikrein-8 Level [$hAPP^{+/-}; mKlk8^{+/+}$] sowie 50 % weniger KLK8 im Gehirn aufweisen [$hAPP^{+/-}; mKlk8^{+/-}$] und nicht-transgene Mäuse ohne $hAPP$ -Transgen mit [$hAPP^{-/-}; mKlk8^{+/-}$] und ohne $mKlk8$ knock-down [$hAPP^{-/-}; mKlk8^{+/+}$], s. Tabelle 1) existieren (s. Abbildungen 2A, 4A-1, 6A, 7A und 8C). Zuvor erfolgte die logarithmische Transformation der Daten der DCX-positiven neuronalen Vorläuferzellen, um eine Normalverteilung zu generieren. Der Student's T-Test mit Bonferroni-Korrektur wurde zur genaueren Analyse der geschlechtsspezifischen Unterschiede der FN-FL Level herangezogen (s. Abbildung 4A-2). Zum Mittelwertvergleich der nicht-normalverteilten Daten der Proteinlevel von L1CAM-FL und SYP wurden der Kruskal-Wallis-Test und der Mann-Whitney-U-Test angewandt (s. Abbildungen 3A und 5A).

4 ERGEBNISSE

4.1 Kallikrein-8 *knock-down* steigert die zerebrale Konzentration der Plastizitäts-assoziierten KLK8-Substrate

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss eines *mKlk8 knock-downs* auf die zerebrale Proteinmenge der Plastizitäts-assoziierten KLK8-Substrate Ephrinrezeptor B2 (in der nicht fragmentierten *full-length* [FL] Form, EPHB2-FL), *Neuronal cell adhesion molecule L1* (L1CAM-FL) und Fibronectin (FN-FL) in transgenen und nicht-transgenen Mäusen zu untersuchen. Die EPHB2-FL- und L1CAM-FL-Level der weiblichen und männlichen Mäuse wiesen keine signifikanten Unterschiede auf, sodass diese Ergebnisse geschlechtsunabhängig dargestellt werden.

4.1.1 Zunahme der zerebralen EPHB2-FL Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen

Die Expression von EPHB2-FL war in transgenen Tieren *per se* geringer ausgeprägt als in nicht-transgenen Tieren (− 22 %, P = 0.0014) (s. Abbildung 2A+B). Infolge des *mKlk8 knock-downs* wiesen transgene CRND8-Mäuse eine Steigerung der EPHB2-FL Level auf (+ 26 %, P = 0.0038) (s. Abbildung 2A+B). In transgenen Tieren glichen sich somit die EPHB2-FL Level durch *mKlk8 knock-down* denen der nicht-transgenen (wild-typischen) Tiere an (s. Abbildung 2A+B). In wildtypischen Tieren bewirkte ein *mKlk8 knock-down* hingegen eine Reduktion der EPHB2-FL Level (− 19 %, P = 0.0066) (s. Abbildung 2A+B).

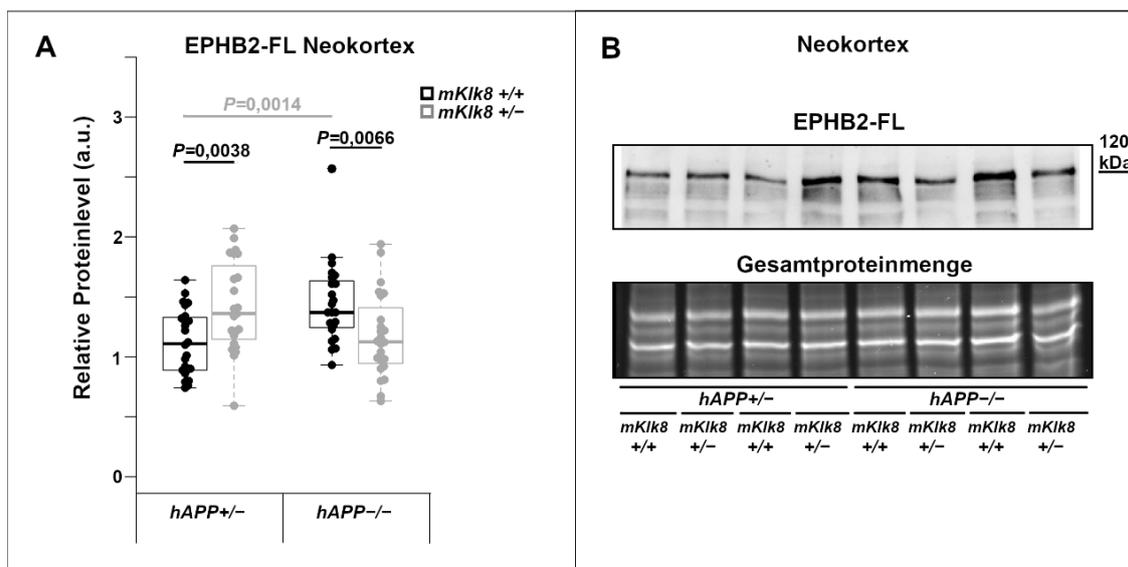


Abbildung 2 Zunahme der zerebralen EPHB2-FL Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen. Modifiziert nach (Herring et al., 2021).

(A) Boxplot-Darstellung der durch Western Blotting quantifizierten neokortikalen EPHB2-FL Level in transgenen (*hAPP*+/-) und nicht-transgenen (*hAPP*-/-) Mäusen ohne *mKlk8*-Reduktion (*mKlk8*+/+, schwarz dargestellt) und mit *mKlk8* knock-down (*mKlk8*+/-, grau dargestellt). Die Boxplots zeigen das obere und untere Quartil an. Die Linie in den Boxplots repräsentiert den Median. Die Länge der *Whisker* beträgt das 1,5-fache des Interquartilsabstands. Die Statistik erfolgte mittels ANOVA und LSD-*post hoc*-Test. Schwarze P-Werte stellen den Vergleich von Tieren ohne *mKlk8* knock-down (*mKlk8*+/+) und mit *mKlk8* knock-down (*mKlk8*+/-) dar. Graue P-Werte zeigen Unterschiede zwischen transgenen (*hAPP*+/-) und nicht-transgenen (*hAPP*-/-) Tieren.

(B) Repräsentative Western Blot-Abbildung des Kallikrein-8-Substrats EPHB2-FL aus dem Neokortex von transgenen (*hAPP*+/-) und nicht-transgenen (*hAPP*-/-) Mäusen ohne *mKlk8*-Reduktion (*mKlk8*+/+) und mit *mKlk8* knock-down (*mKlk8*+/-). Die Proteinlevel des Substrats wurden gegen die Gesamtproteinmenge, bestimmt durch Fluoreszenz-Elektrophorese, normiert.

Legende: *hAPP*+/- *mKlk8*+/+: n=24 Tiere; *hAPP*+/- *mKlk8*+/-: n=23 Tiere; *hAPP*-/- *mKlk8*+/+: n=23 Tiere; *hAPP*-/- *mKlk8*+/-: n=24 Tiere. a.u. = arbitrary units (relative Einheiten).

4.1.2 Zunahme der zerebralen L1CAM-FL Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen

Transgene Tiere (ohne *mKlk8* knock-down) wiesen prinzipiell niedrigere Proteinlevel von nicht-fragmentiertem (*full length*) L1CAM auf als nicht-transgene Tiere (- 21 %, $P = 0.0073$) (s. Abbildung 3A+B). Transgene CRND8-Mäuse zeigten infolge des *mKlk8* knock-downs eine gesteigerte L1CAM-FL-Menge (+ 26 %, $P = 0.0028$) (s. Abbildung 3A+B). Auf die wildtypischen Tiere hatte die KLK8-Suppression keinen Effekt (s. Abbildung 3A+B).

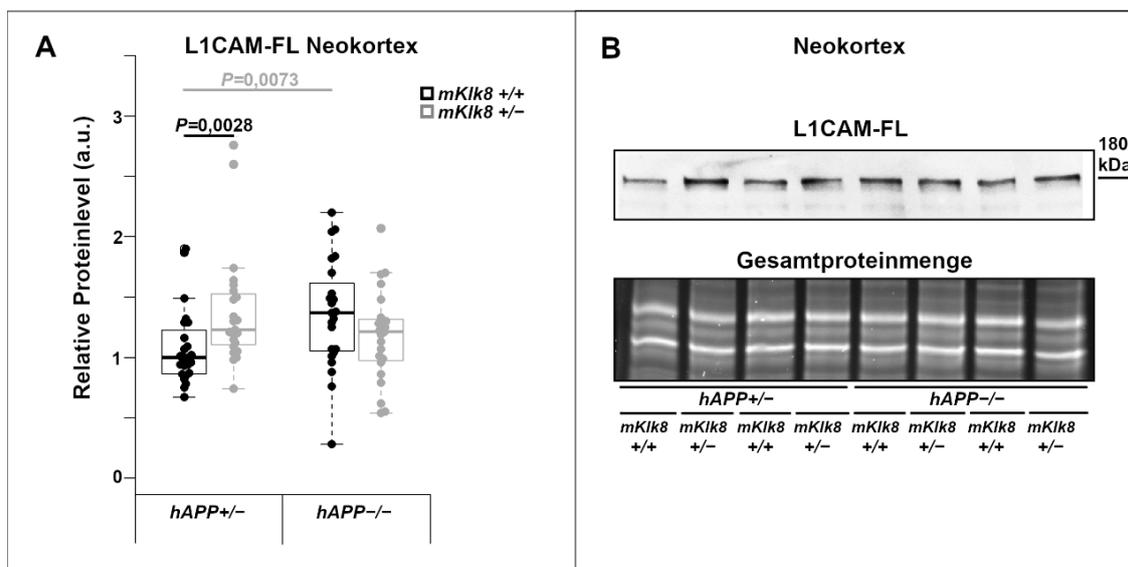


Abbildung 3 Zunahme der zerebralen L1CAM-FL Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen. Modifiziert nach (Herring et al., 2021). Legende siehe Abbildungsbeschriftung 2.

(A) Boxplot-Darstellung der durch Western Blotting quantifizierten neokortikalen L1CAM-FL Level in transgenen (*hAPP*+/-) und nicht-transgenen (*hAPP*-/-) Mäusen ohne *mKlk8*-Reduktion (*mKlk8*+/+, schwarz dargestellt) und mit *mKlk8* knock-down (*mKlk8*+/-, grau dargestellt). Die Boxplots zeigen das obere und untere Quartil an. Die Linie in den Boxplots repräsentiert den Median. Die Länge der *Whisker* beträgt das 1,5-fache des Interquartilsabstands. Die Statistik erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test. Schwarze P-Werte stellen den Vergleich von Tieren ohne *mKlk8* knock-down (*mKlk8*+/+) und mit *mKlk8* knock-down (*mKlk8*+/-) dar. Graue P-Werte zeigen Unterschiede zwischen transgenen (*hAPP*+/-) und nicht-transgenen (*hAPP*-/-) Tieren.

(B) Repräsentative Western Blot-Abbildung des Kallikrein-8-Substrats L1CAM-FL aus dem Neokortex von transgenen (*hAPP*+/-) und nicht-transgenen (*hAPP*-/-) Mäusen ohne *mKlk8*-Reduktion (*mKlk8*+/+) und mit *mKlk8* knock-down (*mKlk8*+/-). Die Proteinlevel des Substrats wurden gegen die Gesamtproteinmenge, bestimmt durch Fluoreszenz-Elektrophorese, normiert.

4.1.3 Zunahme der zerebralen FN-FL Level durch KLK8-Suppression in weiblichen, nicht aber in männlichen transgenen Mäusen

Der neokortikale Spiegel an nicht-fragmentiertem (*full length*) Fibronectin war in transgenen CRND8-Mäusen (ohne *mKlk8* knock-down) im Vergleich zu nicht-transgenen Mäusen *per se* vermindert (- 21 %, $P = 0.0168$) (s. Abbildung 4A-1+B). Transgene Mäuse zeigten gesteigerte FN-FL Level durch KLK8-Suppression (+ 22 %, $P = 0.0484$) (s. Abbildung 4A-1+B). Sie erreichten FN-FL Level, die in gesunden, nicht-transgenen Mäusen ohne *mKlk8* knock-down vorhanden sind (s. Abbildung 4A-1+B). Ein *mKlk8* knock-down beeinflusste hingegen das Expressionslevel von FN-FL in nicht-transgenen Tieren (s. Abbildung 4A-1+B) nicht. Interessanterweise beschränkte sich der positive Effekt des *mKlk8* knock-downs bezüglich der Expressionslevel von FN-FL nur auf die weiblichen transgenen

CRND8-Mäuse (+ 50 %, $P = 0.0033$) (s. Abbildung 4A-2). Prinzipiell besaßen transgene Männchen (ohne *mKlk8 knock-down*) höhere FN-FL-Mengen als ihre weiblichen transgenen Artgenossen (+ 32 %, $P = 0.0127$) (s. Abbildung 4A-2).

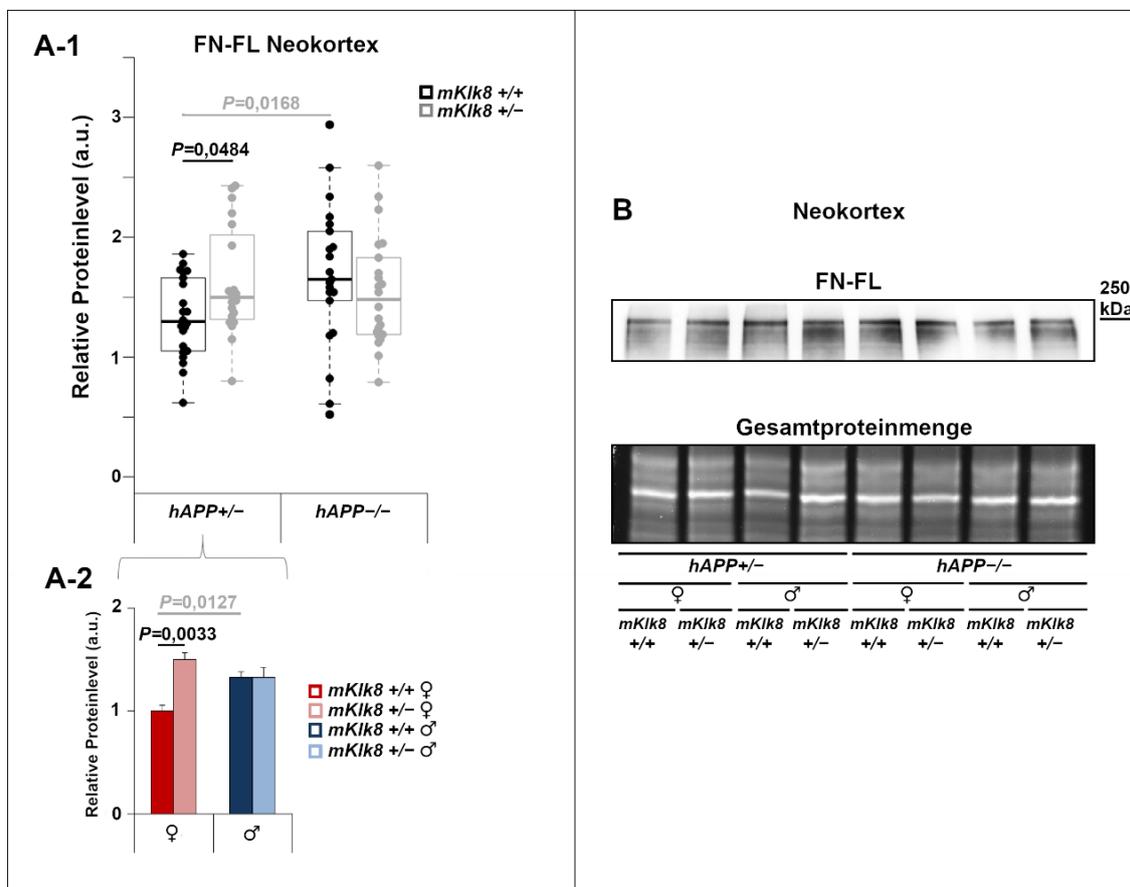


Abbildung 4 Zunahme der zerebralen FN-FL Level durch KLK8-Suppression in weiblichen, nicht aber in männlichen transgenen Mäusen. Modifiziert nach (Herring et al., 2021).

(A-1) Boxplot-Darstellung der durch Western Blotting quantifizierten neokortikalen FN-FL Level in transgenen (*hAPP*^{+/-}) und nicht-transgenen (*hAPP*^{-/-}) Mäusen ohne *mKlk8*-Reduktion (*mKlk8*^{+/+}, schwarz dargestellt) und mit *mKlk8 knock-down* (*mKlk8*^{+/-}, grau dargestellt). Die Boxplots zeigen das obere und untere Quartil an. Die Linie in den Boxplots repräsentiert den Median. Die Länge der *Whisker* beträgt das 1,5-fache des Interquartilsabstands. Die Statistik erfolgte mittels ANOVA und LSD-*post hoc*-Test.

(A-2) Hervorhebung der Geschlechterunterschiede der durch Western Blotting quantifizierten neokortikalen FN-FL-Proteinmenge zwischen weiblichen (♀) und männlichen (♂) transgenen Mäusen (*hAPP*^{+/-}) im Balkendiagramm. Die Statistik erfolgte mittels Student's T-Test und Bonferroni-*post hoc*-Test. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler. Schwarze P-Werte stellen den Vergleich von Tieren ohne *mKlk8 knock-down* (*mKlk8*^{+/+}) und mit *mKlk8 knock-down* (*mKlk8*^{+/-}) dar. Graue P-Werte zeigen Unterschiede zwischen transgenen (*hAPP*^{+/-}) und nicht-transgenen (*hAPP*^{-/-}) sowie zwischen weiblichen (♀) und männlichen (♂) Tieren.

(B) Repräsentative Western Blot-Abbildung des Kallikrein-8-Substrats FN-FL aus dem Neokortex von weiblichen (♀) und männlichen (♂) transgenen (*hAPP*^{+/-}) und nicht-transgenen (*hAPP*^{-/-}) Mäusen ohne *mKlk8*-Reduktion (*mKlk8*^{+/+}) und mit *mKlk8 knock-down* (*mKlk8*^{+/-}). Die Proteinlevel des Substrats wurde gegen die Gesamtproteinmenge normiert.

Legende: ♀ *hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/+}: n=12 Tiere; ♀ *hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/-}: n=12 Tiere; ♂ *hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/+}: n=12 Tiere; ♂ *hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/-}: n=11 Tiere; ♀ *hAPP*^{-/-} *mKlk8*^{+/+}: n=10 Tiere; ♀ *hAPP*^{-/-} *mKlk8*^{+/-}: n=12 Tiere; ♂ *hAPP*^{-/-} *mKlk8*^{+/+}: n=13 Tiere; ♂ *hAPP*^{-/-} *mKlk8*^{+/-}: n=12 Tiere. a.u. = arbitrary units (relative Einheiten).

4.2 Kallikrein-8 *knock-down* steigert die zerebrale Konzentration struktureller Plastizitätsmoleküle

In dieser Arbeit wurde der Effekt eines *mKlk8 knock-downs* auf die zerebralen Proteinmengen der strukturellen Plastizitätsmoleküle Synaptophysin (SYP), *Growth associated protein 43* (GAP43) und *Activity-regulated cytoskeleton-associated protein* (ARC) in transgenen und nicht-transgenen Tieren bestimmt. Es erfolgte eine geschlechtsunabhängige Darstellung der Ergebnisse der SYP, GAP43 und ARC Level, da keine signifikanten Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Mäusen bestanden.

4.2.1 Zunahme der zerebralen SYP Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen

Transgene Tiere wiesen *per se* weniger neokortikales SYP als nicht-transgene Tiere auf (– 11 %, P = 0.0036) (s. Abbildung 5A+B). Die KLK8-Suppression steigerte die SYP Level in transgenen CRND8-Mäusen (+ 10 %, P = 0.0083) (s. Abbildung 5A+B). Die Expression von SYP in nicht-transgenen Tieren wurde durch eine KLK8-Suppression nicht signifikant verändert (s. Abbildung 5A+B).

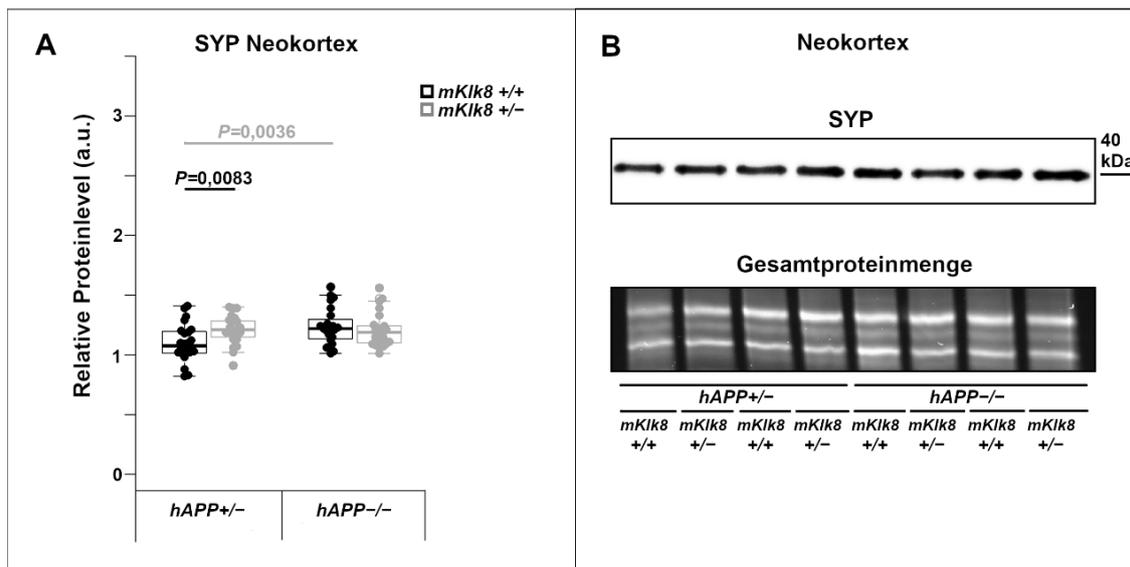


Abbildung 5 Zunahme der zerebralen SYP Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen. Modifiziert nach (Herring et al., 2021). Legende siehe Abbildungsbeschriftung 2.

(A) Boxplot-Darstellung der durch Western Blotting quantifizierten neokortikalen SYP Level in transgenen (*hAPP*+/-) und nicht-transgenen (*hAPP*-/-) Mäusen ohne *mKlk8*-Reduktion (*mKlk8*+/+, schwarz dargestellt) und mit *mKlk8* knock-down (*mKlk8*+/-, grau dargestellt). Die Boxplots zeigen das obere und untere Quartil an. Die Linie in den Boxplots repräsentiert den Median. Die Länge der *Whisker* beträgt das 1,5-fache des Interquartilsabstands. Die Statistik erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test. Schwarze P-Werte stellen den Vergleich von Tieren ohne *mKlk8* knock-down (*mKlk8*+/+) und mit *mKlk8* knock-down (*mKlk8*+/-) dar. Graue P-Werte zeigen Unterschiede zwischen transgenen (*hAPP*+/-) und nicht-transgenen (*hAPP*-/-) Tieren.

(B) Repräsentative Western Blot-Abbildung des strukturellen Plastizitätsmoleküls SYP aus dem Neokortex von transgenen (*hAPP*+/-) und nicht-transgenen (*hAPP*-/-) Mäusen ohne *mKlk8*-Reduktion (*mKlk8*+/+) und mit *mKlk8* knock-down (*mKlk8*+/-). Die Proteinlevel des Substrats wurden gegen die Gesamtproteinmenge, bestimmt durch Fluoreszenz-Elektrophorese, normiert.

4.2.2 Zunahme der zerebralen GAP43 Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen

Die Konzentration von GAP43 war in transgenen Tieren im Vergleich zu nicht-transgenen Tieren *per se* vermindert (-24% , $P = 2.65e^{-7}$) (s. Abbildung 6A+B). Eine KLK8-Suppression führte tendenziell zur Zunahme der GAP43 Level in transgenen Tieren ($+10\%$, $P = 0.0661$) (s. Abbildung 6A+B). In nicht-transgenen Tieren kam es zu keiner relevanten Änderung der GAP43-Konzentration unter KLK8-Suppression (s. Abbildung 6A+B).

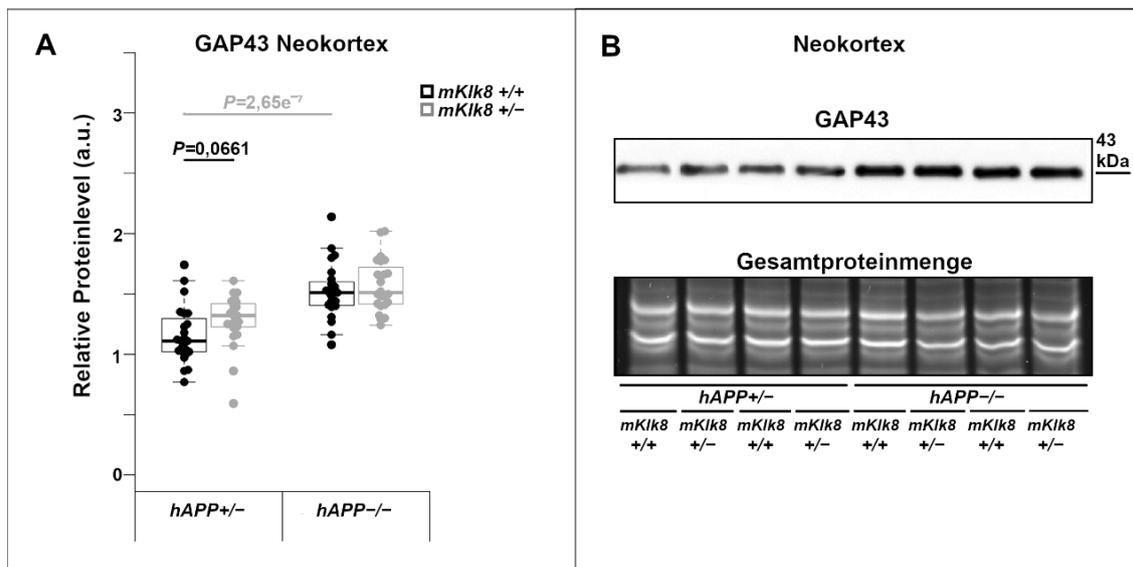


Abbildung 6 Zunahme der zerebralen GAP43 Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen. Modifiziert nach (Herring et al., 2021). Legende siehe Abbildungsbeschriftung 2.

(A) Boxplot-Darstellung der durch Western Blotting quantifizierten neokortikalen GAP43 Level in transgenen (*hAPP*^{+/-}) und nicht-transgenen (*hAPP*^{-/-}) Mäusen ohne *mKlk8*-Reduktion (*mKlk8*^{+/+}, schwarz dargestellt) und mit *mKlk8* knock-down (*mKlk8*^{+/-}, grau dargestellt). Die Boxplots zeigen das obere und untere Quartil an. Die Linie in den Boxplots repräsentiert den Median. Die Länge der *Whisker* beträgt das 1,5-fache des Interquartilsabstands. Die Statistik erfolgte mittels ANOVA und LSD-*post hoc*-Test. Schwarze P-Werte stellen den Vergleich von Tieren ohne *mKlk8* knock-down (*mKlk8*^{+/+}) und mit *mKlk8* knock-down (*mKlk8*^{+/-}) dar. Graue P-Werte zeigen Unterschiede zwischen transgenen (*hAPP*^{+/-}) und nicht-transgenen (*hAPP*^{-/-}) Tieren.

(B) Repräsentative Western Blot-Abbildung des strukturellen Plastizitätsmoleküls GAP43 aus dem Neokortex von transgenen (*hAPP*^{+/-}) und nicht-transgenen (*hAPP*^{-/-}) Mäusen ohne *mKlk8*-Reduktion (*mKlk8*^{+/+}) und mit *mKlk8* knock-down (*mKlk8*^{+/-}). Die Proteinlevel des Substrats wurden gegen die Gesamtproteinmenge, bestimmt durch Fluoreszenz-Elektrophorese, normiert.

4.2.3 Zunahme der zerebralen ARC Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen

Transgene Tiere besaßen eine geringere ARC-Menge als nicht-transgene Tiere (-18% , $P = 0.0408$) (s. Abbildung 7A+B). Infolge des *mKlk8 knock-downs* nahm die Expression von ARC in transgenen CRND8-Mäusen zu ($+28\%$, $P = 0.0092$), sodass die ARC-Konzentration auf das Niveau in gesunden, nicht-transgenen Tieren (ohne *mKlk8 knock-down*) anstieg (s. Abbildung 7A+B). In nicht-transgenen Mäusen blieb das ARC Level durch den *mKlk8 knock-down* unbeeinflusst (s. Abbildung 7A+B).

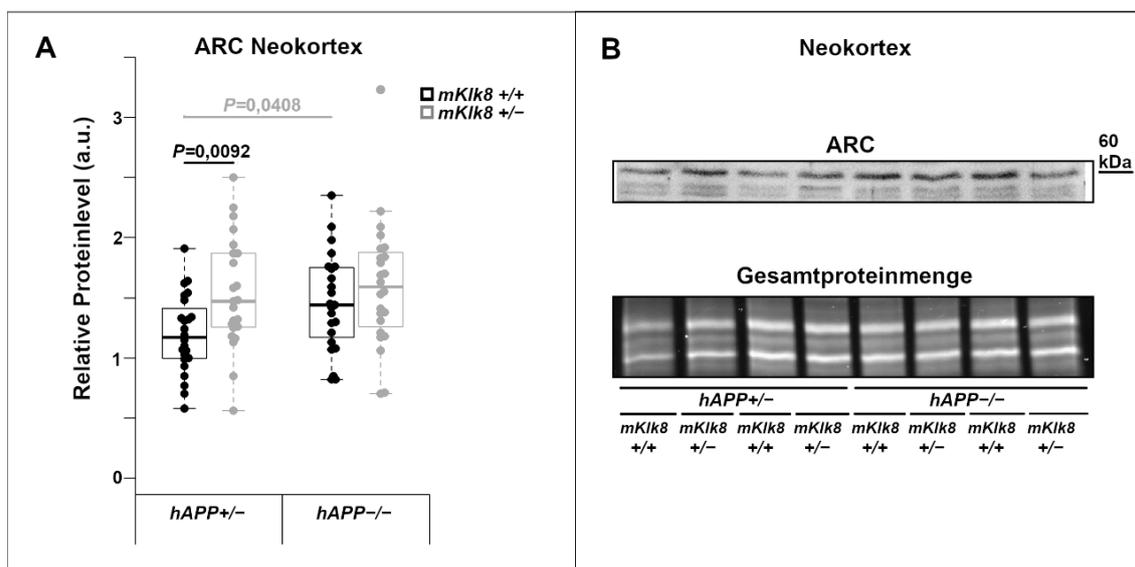


Abbildung 7 Zunahme der zerebralen ARC Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen. Modifiziert nach (Herring et al., 2021). Legende siehe Abbildungsbeschriftung 2.

(A) Boxplot-Darstellung der durch Western Blotting quantifizierten neokortikalen ARC Level in transgenen (*hAPP+/-*) und nicht-transgenen (*hAPP-/-*) Mäusen ohne *mKlk8*-Reduktion (*mKlk8+/+*, schwarz dargestellt) und mit *mKlk8 knock-down* (*mKlk8+/-*, grau dargestellt). Die Boxplots zeigen das obere und untere Quartil an. Die Linie in den Boxplots repräsentiert den Median. Die Länge der *Whisker* beträgt das 1,5-fache des Interquartilsabstands. Die Statistik erfolgte mittels ANOVA und *LSD-post hoc*-Test. Schwarze P-Werte stellen den Vergleich von Tieren ohne *mKlk8 knock-down* (*mKlk8+/+*) und mit *mKlk8 knock-down* (*mKlk8+/-*) dar. Graue P-Werte zeigen Unterschiede zwischen transgenen (*hAPP+/-*) und nicht-transgenen (*hAPP-/-*) Tieren.

(B) Repräsentative Western Blot-Abbildung des strukturellen Plastizitätsmoleküls ARC aus dem Neokortex von transgenen (*hAPP+/-*) und nicht-transgenen (*hAPP-/-*) Mäusen ohne *mKlk8*-Reduktion (*mKlk8+/+*) und mit *mKlk8 knock-down* (*mKlk8+/-*). Die Proteinlevel des Substrats wurden gegen die Gesamtproteinmenge, bestimmt durch Fluoreszenz-Elektrophorese, normiert.

4.3 Kallikrein-8 *knock-down* fördert die hippocampale Neurogenese in transgenen Mäusen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt des *mKlk8 knock-downs* auf die hippocampale Neurogenese in transgenen CRND8-Tieren und nicht-transgenen Kontroll-Mäusen zu untersuchen. Dazu wurden Schnittpräparate angefertigt, in denen Doublecortin (DCX)-positive neuronale Vorläuferzellen (s. Abbildung 8A+B) im Hippokampus angefärbt wurden. In der stereologischen Auswertung wurden zwei verschiedene DCX-positive Zelltypen quantifiziert: Nicht-differenzierte, mitotische Typ 2b/3-Zellen im Stadium 3-4 der hippocampalen Neurogenese und neuronal differenzierende, postmitotische Vorläuferzellen im Stadium 5 der hippocampalen Neurogenese, die dendritische Ausläufer bilden (Kempermann et al., 2004) (s. Abbildung 1 und Abbildung 8B).

Es erfolgte eine geschlechtsunabhängige Darstellung der Ergebnisse, da keine signifikanten Unterschiede der hippocampalen Neurogenese der weiblichen und männlichen Mäuse bestanden.

Prinzipiell zeigte sich in transgenen Mäusen sowohl eine Reduktion der Typ 2b/3-Zellzahl (- 18 %, $P = 0.0408$) (s. Abbildung 8A+C) als auch der neuronal differenzierenden Vorläuferzellen im Vergleich zu nicht-transgenen Mäusen (- 27 %, $P = 0.0070$) (s. Abbildung 8A+C). Eine KLK8-Suppression führte in transgenen Mäusen zu einer gesteigerten Anzahl an nicht differenzierten, mitotischen Zellen des Typs 2b/3 (+ 28 %, $P = 0.0301$) (s. Abbildung 8A+C) und neuronal differenzierenden Vorläuferzellen (+ 43 %, $P = 0.0106$) (s. Abbildung 8A+C). Bei Letzteren stieg die Zellzahl in transgenen Tieren durch *mKlk8 knock-down* auf das Niveau wie in gesunden, nicht-transgenen Tieren an (s. Abbildung 8A+C). In nicht-transgenen Tieren hatte eine KLK8-Suppression weder Einfluss auf die hippocampale Anzahl an nicht-differenzierten, mitotischen Zellen des Typs 2b/3 noch auf die Anzahl DCX-positiver, neuronal differenzierender Vorläuferzellen (s. Abbildung 8A+C).

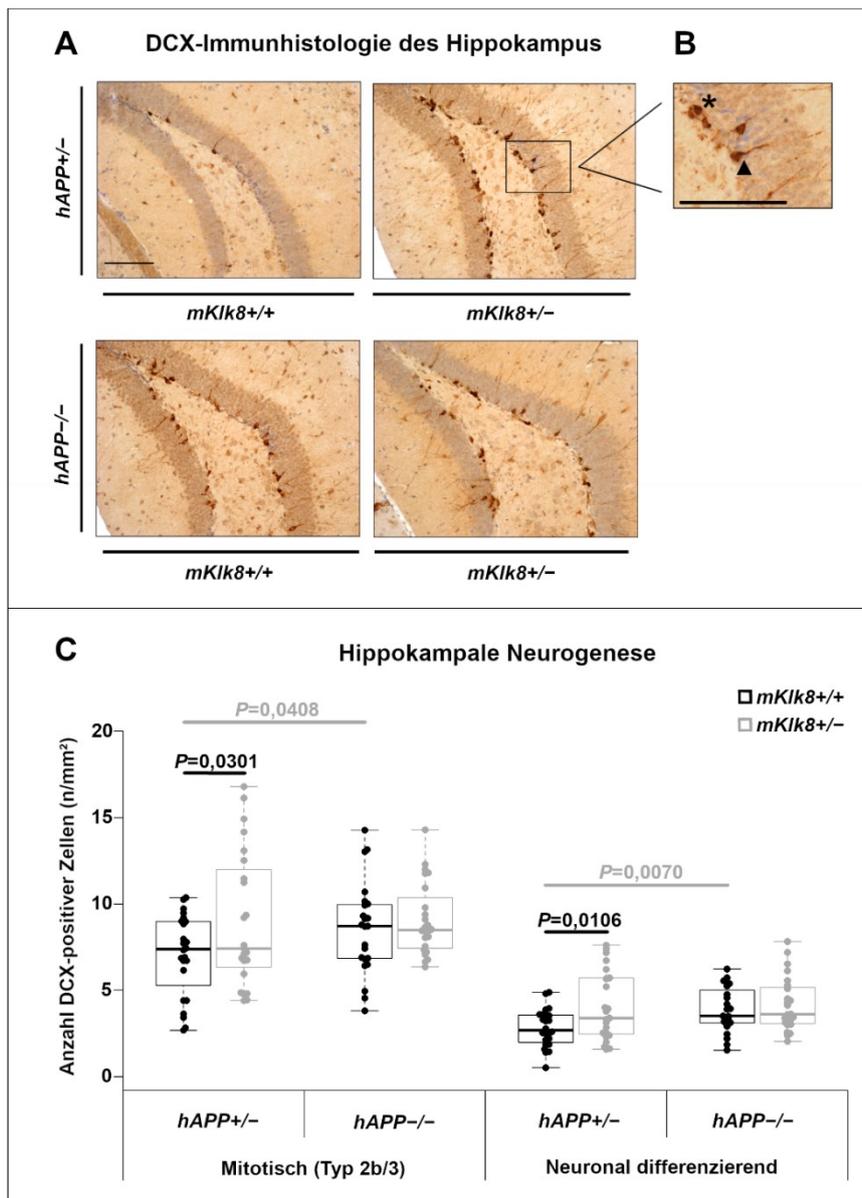


Abbildung 8 Kallikrein-8 knock-down fördert die hippocampale Neurogenese in transgenen Mäusen. Modifiziert nach (Herring et al., 2021). Legende siehe Abbildungsbeschriftung 2.

(A) Immunhistologische Färbung DCX-positiver neuronaler Vorläuferzellen im Hippokampus transgener (*hAPP*^{+/-}) und nicht-transgener (*hAPP*^{-/-}) Mäuse ohne *mKlk8*-Reduktion (*mKlk8*^{+/+}) und mit *mKlk8* knock-down (*mKlk8*^{+/-}), Messskala 100µm.

(B) Vergrößerte Darstellung nicht-differenzierter, mitotischer Typ 2b/3-Zellen (*) und neuronal differenzierender Vorläuferzellen (▲), Messskala 100µm.

(C) Boxplot-Darstellung der Ergebnisse der stereologischen Quantifizierung DCX-positiver nicht-differenzierter, mitotischer Typ 2b/3-Zellen und neuronal differenzierender Vorläuferzellen des Hippokampus transgener (*hAPP*^{+/-}) und nicht-transgener (*hAPP*^{-/-}) Mäuse ohne *mKlk8*-Reduktion (*mKlk8*^{+/+}, schwarz dargestellt) und mit *mKlk8* knock-down (*mKlk8*^{+/-}, grau dargestellt). Angegeben werden die Anzahl DCX-positiver Zellen in Relation zur untersuchten Arealgröße (n/mm²). Die Boxplots zeigen das obere und untere Quartil an. Die Linie der Boxplots repräsentiert den Median. Die Länge der *Whisker* beträgt das 1,5-fache des Interquartilsabstands. Die erhobenen Daten wurden logarithmisch transformiert. Die Statistik erfolgte mittels ANOVA und LSD-*post hoc*-Test. Schwarze P-Werte stellen den Vergleich von Tieren ohne *mKlk8* knock-down (*mKlk8*^{+/+}) und mit *mKlk8* knock-down (*mKlk8*^{+/-}) dar. Graue P-Werte zeigen Unterschiede zwischen transgenen (*hAPP*^{+/-}) und nicht-transgenen (*hAPP*^{-/-}) Tieren.

5 DISKUSSION

Neuroplastizität beschreibt die Anpassungsfähigkeit von Neuronen an innere und äußere Einflüsse, z.B. durch die Ausbildung oder die Rückbildung von Synapsen. Die in diesem Projekt untersuchten KLK8-Substrate EPHB2-FL, L1CAM-FL, FN-FL und die Proteine SYP, GAP43, ARC vermitteln diese Plastizität auf zellulärer Ebene.

Die Quantifizierung ihrer neokortikalen Expressionslevel ermöglichte es uns, die strukturelle Neuroplastizität in TgCRND8 Mäusen (P226) mit vs. ohne *mKlk8 knock-down* (weiblich n=24, männlich n=23) zu vergleichen. Als Kontrolle dienten die nicht-transgenen Mäuse des Hintergrundstamms ebenfalls mit oder ohne *mKlk8 knock-down* (weiblich n=22, männlich n=25). Die Effekte des *mKlk8 knock-downs* auf die hippocampale Neurogenese wurden über die Quantifizierung der neuronalen Vorläuferzellen im Hippokampus erfasst.

In dieser Arbeit wurde demonstriert, dass die TgCRND8 Mäuse mit Alzheimer-Pathologie im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern eine deutliche Reduktion in allen oben genannten Parametern aufwiesen. Dieser Unterschied konnte durch *mKlk8 knock-down* teilweise bis auf wildtypisches Niveau normalisiert werden, während der *mKlk8 knock-down* auf die nicht transgenen Tieren nur einen geringen Einfluss hatte.

Bei Betrachtung dieser beachtlichen positiven Effekte des *mKlk8 knock-downs* sollte eruiert werden, welche Rolle KLK8 in der Alzheimer-Pathologie spielt. Tatsächlich sind zerebrale KLK8 Level in Alzheimer-transgenen Mäusen noch vor Ausprägung der charakteristischen A β -Ablagerungen gesteigert (Herring et al., 2016). Dieser Befund wurde in Alzheimer-kranken Personen bestätigt: Noch vor Beginn klinischer Symptome waren zerebrale KLK8 mRNA und Proteinlevel bei Alzheimer-Erkrankten in Blut und CSF erhöht (Teuber-Hanselmann et al., 2019). Daher erscheint eine kausale Bedeutung für KLK8 in der Alzheimer-Pathologie wahrscheinlich.

Diese Hypothese wird von der Tatsache unterstützt, dass unsere Arbeitsgruppe therapeutische Wirkungen einer transienten KLK8-Inhibition mittels Antikörper detektierte (Herring et al., 2016). Diese therapeutischen Wirkungen konnten nun auch im aktuellen *mKlk8 knock-down*-Projekt bestätigt werden: Der *mKlk8 knock-down* verbesserte ebenso wie der pharmakologische Ansatz die strukturelle Neuroplastizität,

reduzierte Angstzustände, verbesserte das Objekterkennungsgedächtnis, wirkte der A β -Pathologie und der Tau-Phosphorylierung entgegen, milderte die neurovaskuläre Dysfunktion, induzierte die kortikale und hippocampale Autophagie und förderte sowohl die mikrogliale Widerstandskraft als auch die A β -Phagozytose in transgenen Mäusen (Herring et al., 2021).

Trotz gemeinsamer positiver Ergebnisse sind die Vorgehensweisen beider Ansätze grundverschieden. Die Antikörper-vermittelte KLK8-Inhibition erfolgte nur vorübergehend über einen Zeitraum von vier Wochen, während infolge des genetischen *knock-downs* KLK8 bereits pränatal und dauerhaft um 50 % reduziert war.

So ist es nachvollziehbar, dass sich die Effekte beider Ansätze auf transgene Tiere in manchen Punkten unterscheiden: Die hippocampalen Proteinlevel der Plastizitäts-assoziierten KLK8-Substrate L1CAM und FN blieben infolge der Antikörper-vermittelten Inhibition von KLK8 unbeeinflusst (Münster et al., 2020), wohingegen die neokortikalen Proteinlevel von L1CAM und FN infolge des *mKlk8 knock-downs* anstiegen (Herring et al., 2021). Unter permanenter KLK8-Reduktion waren, nicht nur wie unter transienter Inhibition, die Proteinlevel der strukturellen Plastizitätsmoleküle SYP und GAP43 erhöht (frontal und hippocampal in (Herring et al., 2016)), sondern zusätzlich auch die Proteinlevel von ARC (neokortikal in (Herring et al., 2021)). Die Neuroplastizität verbesserte sich daher in transgenen Tieren unter permanenter KLK8-Reduktion stärker als unter transienter KLK8-Reduktion.

Ein Blick auf die hippocampale Neurogenese bestätigt diesen Trend: Es kam sowohl aufgrund der transienten als auch aufgrund der permanenten KLK8-Reduktion zu einer erhöhten Anzahl an nicht differenzierten, mitotischen Zellen des Typs 2b/3 im Stadium 3-4 der hippocampalen Neurogenese (Herring et al., 2021; Münster et al., 2020). Allerdings führte der *mKlk8 knock-down* darüber hinaus zu einer gesteigerten Anzahl neuronal differenzierender, postmitotischer Vorläuferzellen im Stadium 5 der hippocampalen Neurogenese (Herring et al., 2021). Daher ist die hippocampale Neurogenese transgener Tiere offensichtlich durch eine kurzfristige KLK8-Reduktion nicht nachhaltig beeinflussbar.

Einen stärkeren positiven Effekt als die transiente KLK8-Inhibition hatte der *mKlk8 knock-down* auf die zerebrale Gefäßversorgung: Während infolge der Antikörper-vermittelten Inhibition von KLK8 proangiogenetische Effekte auf die

zerebrale Gefäßdichte ausblieben (Herring et al., 2016), nahm die hippocampale Gefäßdichte infolge des *mKlk8 knock-downs* zu (Herring et al., 2021).

Entgegen dieser Tendenz führte die transiente KLK8-Inhibition über die Aktivierung von Signalwegen zur vermehrten Dephosphorylierung von Tau im Frontalkortex (Herring et al., 2016), wohingegen die genetisch vermittelte KLK8-Reduktion auf die Dephosphorylierung von Tau im entorhinalen Kortex keine Wirkung zeigte (Herring et al., 2021).

Als Folge des *mKlk8 knock-downs* sind die KLK8 Level in allen exprimierenden Organen und in allen Stadien der Entwicklung reduziert. Insbesondere perinatal und in frühen Stadien der Entwicklung sind physiologische KLK8 Level essenziell für die gesunde Entwicklung des Organismus. Dennoch hatte der genetische *mKlk8 knock-down* selbst auf nicht-transgene Tiere kaum negative Effekte: Lediglich die Proteinlevel von EPHB2, *multidrug-resistance protein 1* (MDR1) und Beclin-1 beider Geschlechter und die Dichte dendritischer Dornfortsätze männlicher Tiere waren reduziert (Herring et al., 2021). Weitere Effekte blieben aus, obwohl die KLK8 Level in wildtypischen im Gegensatz zu den transgenen Tieren nicht pathologisch erhöht waren. Was verhindert die Entstehung negativer Effekte der permanenten KLK8-Reduktion auf gesunde Tiere?

Eine Pufferzone im Bereich niedriger KLK8 Level wäre eine plausible Erklärung. So wird die Wirksamkeit von KLK8 auf die Entwicklung des Organismus auch bei niedrigen KLK8 Leveln nicht negativ beeinflusst.

Eine andere Erklärung findet sich bei Betrachtung der Kallikrein-Familie: Es existieren 15 Gewebs-Kallikreine, die überlappende, synergistische und opponierende Funktionen aufweisen (Masurier et al., 2018). Redundante Eigenschaften der Kallikreine könnten negative Effekte durch niedrige KLK8 Level verhindern. Zusammengefasst ergibt dies ein breites therapeutisches Fenster für ein potenzielles zukünftiges KLK8-inhibierendes Medikament.

Die permanente, genetisch vermittelte KLK8-Reduktion bewirkte beachtliche therapeutische Effekte auf viele Eigenschaften der Alzheimer-Krankheit: Neben der Abschwächung der A β - und Tau-Pathologie kam es in transgenen CRND8 Mäusen zusätzlich zur Minderung der neurovaskulären Dysfunktion,

zur Steigerung der A β -Phagozytose durch Mikroglia, zur verminderten Ängstlichkeit, zum verbesserten Objektwiedererkennungsgedächtnis und letztendlich zur verbesserten Neuroplastizität und Neurogenese (Herring et al., 2021). Durch welche biochemischen Vorgänge diese therapeutischen Effekte erzielt wurden, ist noch nicht vollständig geklärt. Eine mögliche Erklärung für die Abschwächung der A β -Pathologie ist die vorwiegende Prozessierung von APP über den nicht-amyloiden Weg aufgrund des *mKlk8 knock-downs*, sodass weniger A β entsteht (Herring et al., 2021).

Zudem stiegen die Proteinlevel von *Low-density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) und MDR1 unter permanenter KLK8-Reduktion (Herring et al., 2021). Sie sind Efflux-Transporter, die den Ausstrom von zerebralem A β über die Bluthirnschranke vermitteln. Steigt ihre Konzentration, verbessert sich die A β -Clearance, d.h. die Beseitigung von zerebralem A β wird forciert (Zlokovic, 2011).

Auch eine gesteigerte Autophagie, gemessen an der Zunahme der Marker *autophagy protein 5* (ATG5) und Beclin-1, und eine gesteigerte mikrogliale A β -Phagozytose, gemessen an der Zunahme der Marker *secreted phosphoprotein 1* (SPP1) und *triggering receptor expressed on myeloid cells 2* (TREM2), mildern die zerebrale A β -Plaquelastung (Herring et al., 2021).

Wie zuvor beschrieben, stiegen die Proteinlevel der KLK8-Substrate in transgenen Mäusen infolge des *mKlk8 knock-downs* an. Die Wiederherstellung der physiologischen Konzentrationen könnte entscheidend für die beobachteten positiven Effekte auf die AD-Pathologie sein, denn das KLK8-Substrat L1CAM reduziert die A β -Plaquelastung in transgenen AD-Mäusen (Djogo et al., 2013; Konar et al., 2018) und das KLK8-Substrat Fibronectin fördert die APP-Sekretion, behindert die APP-Integration in Plasmamembranen und vermindert so die A β -Biogenese (Mönnig et al., 1995).

Auch die KLK8/EPHB2-Signalkaskade ist möglicherweise für zahlreiche positive Effekte der permanenten KLK8-Reduktion auf die Alzheimer-Pathologie verantwortlich. Unsere Arbeitsgruppe demonstrierte in einem *in vitro*-Experiment mit primären Mikroglia- und Astrogliazellen, entnommen von neonatalen transgenen CRND8 und Wildtyp-Mäusen, dass EPHB2 eine wichtige Rolle in der Autophagie und in der mikroglialen A β -Phagozytose spielt: Die Autophagie, gemessen an der Zunahme der Marker ATG5, Beclin-1 und Syntaxin 17 (STX17), und die

mikrogliale A β -Phagozytose, gemessen an der Zunahme von intraglialem A β 42, waren infolge der Antikörper-vermittelten KLK8-Inhibition verbessert (Herring et al., 2016). Unter simultaner Inkubation der Gliazellen mit anti-KLK8- und anti-EPHB2-Antikörper wurden diese positiven Effekte aufgehoben und glichen dem Niveau der unbehandelten Gliazellen (Herring et al., 2016).

Außerdem ist bekannt, dass EPHB2 in Vorgänge der synaptischen Plastizität (Wilkinson, 2001), der Ängstlichkeit (Attwood et al., 2011) und Tau-Phosphorylierung (Jiang et al., 2015) involviert ist – Aspekte der Alzheimer-Pathologie, die sich durch KLK8-Reduktion mit resultierender Steigerung der EPHB2-Level in TgCRND8-Mäusen beachtlich verbesserten (Herring et al., 2016; Herring et al., 2021).

Warum besitzen Frauen eine höhere AD-Prävalenz (Snyder et al., 2016) und warum sind weibliche transgene Mäuse von vielen Eigenschaften der AD-Pathologie stärker betroffen (Keyvani et al., 2018; Nebel et al., 2018)?

Neben den allgemein gültigen Ursachen der erhöhten Lebenserwartung gegenüber Männern und divergenten soziokulturellen Umständen sollte Kallikrein-8 als beeinflussender Faktor ernsthaft in Betracht gezogen werden. Es wurden pathologisch erhöhte KLK8 Proteinlevel nicht nur in weiblichen Alzheimer-transgenen Mäusen, sondern auch in Alzheimer-Patientinnen und sogar in gesunden Frauen im Vergleich zu ihren männlichen *Counterparts* festgestellt (Keyvani et al., 2018). Als möglichen Trigger für die beobachtete KLK8-Überexpression identifizierte unsere Arbeitsgruppe in einem *in vitro*-Experiment Estrogen (Keyvani et al., 2018).

Außerdem beobachteten wir in unserem aktuellen Forschungsprojekt, dass weibliche transgene Mäuse stärker von dem *mKlk8 knock-down* profitierten als ihre männlichen Artgenossen, denn im Vergleich wiesen sie erhöhte FN Proteinlevel, erhöhte LRP1 Proteinlevel, eine erhöhte Dichte dendritischer Fortsätze und erniedrigte Proteinlevel des *Receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE) auf (Herring et al., 2021).

Dennoch war der Großteil der in meiner Arbeit beschriebenen Effekte geschlechterunabhängig. Die strukturelle Neuroplastizität und hippokampale Neurogenese wurden mit Ausnahme der Proteinlevel des KLK8-Substrats Fibronectin gleichwertig in weiblichen und männlichen transgenen Mäusen infolge des *mKlk8 knock-downs* verbessert.

Die Relevanz von Kallikrein-8 in der Alzheimer-Pathologie ist bereits deutlich geworden. Wie kann KLK8 nun sowohl für die Diagnostik (*-nostisch*) als auch für die Therapie (*-thera*) von Alzheimer-Erkrankten als *theranostisches* Molekül konstruktiv eingesetzt werden?

Die Hoffnung ist, dass durch die frühzeitige Erkennung von pathologisch erhöhtem KLK8 Menschen identifiziert werden könnten, die von einer frühen KLK8-Reduktion profitieren. Diesen kann im Anschluss an die Diagnostik eine spezifische Therapie zur KLK8-Reduktion angeboten werden. Durch die Stratifizierung der Betroffenen wird die hochspezifische Therapie zielgenau zu Person und Krankheitsstadium angewandt.

Diese sog. personalisierte Medizin oder Präzisionsmedizin ist in der klinischen Onkologie bereits etabliert. Durch genetische Tests werden spezielle Mutationen erkannt und darauf abgestimmte Medikamente verabreicht (Dugger et al., 2018). Die Therapie erreicht das Patientenkollektiv, das am meisten davon profitiert. So konnten besseres Ansprechen und längeres progressionsfreies Überleben im Vergleich zu konventionellen Chemotherapeutika bei niedrigem Nebenwirkungsprofil und guter Verträglichkeit für die Betroffenen erzielt werden (Dugger et al., 2018).

Eine Herausforderung der Präzisionsmedizin stellt die heterogene Pathophysiologie der Erkrankungen, wie auch bei der Alzheimer-Krankheit vorkommend, dar. Doch die aktuellen Fortschritte in der Biotechnologie und der Datenverarbeitung und das tiefere Verständnis der molekularen Mechanismen der Erkrankungen beschleunigen die Expansion der Präzisionsmedizin und treiben die Entwicklung neuer Therapiemoleküle, zu denen auch KLK8 zählen könnte, voran.

Doch wie könnte die therapeutische KLK8-Suppression praktisch vollzogen werden?

Der im aktuellen Projekt angewandte genetische Ansatz mittels *mKlk8 knock-down* eignet sich nicht zur Therapie beim Menschen, denn dabei werden die KLK8 Proteinlevel bereits pränatal und permanent reduziert.

Zur Reduktion von pathologisch erhöhtem KLK8 bei Alzheimer-Erkrankten kommen neben konventionellen monoklonalen Antikörpern leichtere *Nanobodies* in Betracht, die auf dem Wirkungsprinzip der Antikörper-Antigen-Bindung beruhen. Auch vorstellbar sind Aptamere als kurze, einzelsträngige Nukleinsäure-Oligomere, die ihr Zielmolekül spezifisch binden, und *anti-sense* Oligonukleotide,

die als einzelsträngige Nukleinsäure ihre komplementäre Zielsequenz in der RNA eines Proteins binden und so dessen Bildung verhindern.

Es gilt die idealen molekularbiologischen Techniken zur therapeutischen KLK8-Reduktion für Alzheimer-Betroffene zu identifizieren. Hierbei müssen die Toxizität, Pharmakokinetik und biochemische Stabilität der ausgewählten Moleküle evaluiert werden. Außerdem steht die Ermittlung von Zeitpunkt und Umfang der therapeutischen KLK8-Reduktion aus.

Die Ergebnisse aus den Tierversuchen des aktuellen Projektes sind, wie bei allen tierexperimentellen Daten, nicht eins zu eins auf Alzheimer-Betroffene übertragbar. Der Erforschung des *mKlk8 knock-down*-Effekts diene unserer Arbeitsgruppe das transgene CRND8-Mausmodell. Als Träger des mutierten *hAPP*-Gens simuliert es die familiäre Form der AD. Allerdings sind von der familiären Form weniger als 5 % betroffen (Zhu et al., 2015), d.h. dieses Tiermodell repräsentiert nur einen kleinen Teil der an Alzheimer erkrankten Menschen.

Es ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, abzuschätzen, inwieweit KLK8 als Biomarker und therapeutisches Zielmolekül erfolgreich sein wird. Doch unsere Untersuchungen der transgenen CRND8 Mäuse mit genetischem *mKlk8 knock-down* haben wertvolle grundlegende Zusammenhänge zwischen der Alzheimer-Krankheit und Kallikrein-8 offenbart und mehr Verständnis für multiple Vorgänge und Einflussfaktoren auf die Alzheimer-Pathologie bewirkt.

Weitere Tierversuche und darauf aufbauende klinische Studien sind notwendig, um eine Translation der Erkenntnisse dieser Grundlagenforschung in den klinischen Alltag zu realisieren, von denen Alzheimer-Betroffene direkt profitieren können.

Die Dringlichkeit zur erfolgreichen Behandlung der Alzheimer-Betroffenen, die einen Großteil der weltweit 57,4 Millionen Menschen, die an Demenz erkrankt sind, ausmachen (Nichols et al., 2022), ist bei jährlichen Kosten in Höhe von ca. 958 Milliarden US-Dollar 2018 (Jia et al., 2018) hoch – die Anzahl der Betroffenen und die Höhe der Kosten sind tendenziell steigend. Trotz der immensen sozioökonomischen Herausforderung ist die genaue Pathophysiologie der Erkrankung

aufgrund ihrer Komplexität bis heute noch nicht vollständig entschlüsselt. Als sicher gilt die Notwendigkeit des frühen Therapiebeginns im Verlauf der AD, damit die Neurodegeneration verhindert und das Fortschreiten der Erkrankung gestoppt werden können.

Dieses Forschungsprojekt ist ein kleiner Beitrag zur Entschlüsselung der Pathophysiologie der AD mit dem Ziel der Entwicklung suffizienter Biomarker und Therapiemoleküle. Wir konnten hierbei zeigen, dass die strukturelle Neuroplastizität und die hippokampale Neurogenese als wichtige Faktoren der Alzheimer-Pathologie besonders von der KLK8-Suppression profitieren. Somit haben wir KLK8 als vielversprechendes, neues Molekül im Kontext der Alzheimer-Krankheit identifiziert. Die Überführung von KLK8 aus dem Forschungslabor in die klinische Anwendung sollte forciert vorangetrieben werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Protease Kallikrein-8 (KLK8) ist ein wichtiger Modulator der strukturellen Neuroplastizität, welche in frühem Stadium der Alzheimer-Krankheit gestört ist. Unsere Arbeitsgruppe detektierte pathologisch erhöhte zerebrale KLK8-Spiegel in an Alzheimer erkrankten Mäusen und Menschen.

In diesem Forschungsprojekt wurden KLK8 *knock-down*-Mäuse [*mKlk8+/-*] mit transgenen Mäusen gekreuzt, die humanes Amyloid-Vorläuferprotein überexprimierten [*hAPP+/-*], um die Neuroplastizität der Nachkommen (n=94) mit und ohne Alzheimer-Pathologie sowie mit und ohne *mKlk8 knock-down* zu untersuchen. Die zerebralen Proteinlevel der Plastizitäts-assoziierten KLK8-Substrate Ephrinrezeptor B2 (EPHB2), *Neuronal cell adhesion molecule 1* (L1CAM) und Fibronectin (FN) sowie der strukturellen Plastizitätsmoleküle Synaptophysin (SYP), *Growth associated protein 43* (GAP43) und *Activity-regulated cytoskeleton-associated protein* (ARC) wurden mittels Western Blot analysiert. Die hippokampale Anzahl neuronaler Vorläuferzellen wurde stereologisch in beiden Geschlechtern bestimmt.

Transgene Mäuse mit Alzheimer-Pathologie wiesen im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern eine deutliche Reduktion der strukturellen Neuroplastizität auf. Dieses Defizit konnte durch *mKlk8 knock-down* teilweise bis auf wildtypisches Niveau ausgeglichen werden, während der *mKlk8 knock-down* auf die nicht transgenen Tiere ohne Alzheimer-Pathologie kaum einen Einfluss hatte. Infolge des *mKlk8 knock-downs* wiesen transgene Alzheimer-Mäuse beider Geschlechter gesteigerte zerebrale Proteinlevel von EPHB2, L1CAM, Fibronectin (nur Weibchen), SYP, GAP43 und ARC auf. Auch die hippokampale Anzahl an nicht differenzierten, mitotischen Zellen und neuronal differenzierenden Vorläuferzellen nahm infolge der KLK8-Suppression in transgenen Alzheimer-Mäusen beider Geschlechter zu.

Die strukturelle Neuroplastizität profitiert als eine der wichtigsten Charakteristika der Alzheimer-Pathologie stark von der Senkung pathologisch erhöhter KLK8 Spiegel, sodass KLK8 als neuer, vielversprechender Akteur in der Alzheimer-Medizin hervortritt.

7 SUMMARY

Kallikrein-8 (KLK8) plays a key role in structural neuronal plasticity, which is severely altered in early stages of alzheimer's disease. Our lab discovered pathologically elevated levels of KLK8 in patient's and mice's brain that suffered from alzheimer's disease.

We crossbred KLK8 *knock-down* mice [*mKlk8*^{+/-}] with transgenic mice overexpressing human amyloid-precursor-protein [*hAPP*^{+/-}] to analyze next generation's neuronal plasticity by detecting cerebral protein levels of plasticity markers through western blotting and by stereological counting of hippocampal neuronal precursor cells.

Structural neuronal plasticity was severely reduced in transgenic mice with alzheimer's pathology compared to wildtype littermates. This gap was closed by *mKlk8 knock-down* while healthy non-transgenics were nearly unaffected by *mKlk8 knock-down*.

We detected elevated Ephrinreceptor B2 (EPHB2), Neuronal cell adhesion molecule L1 (L1CAM), Fibronectin (FN, only females), Synaptophysin (SYP), Growth associated protein 43 (GAP43) und Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC) levels in transgenic mice's neocortices of both sexes due to KLK8 reduction. Accordingly hippocampal neurogenesis of transgenic mice was enhanced by *mKlk8 knock-down* according to higher numbers of neuronal precursor cells.

Genetic reduction of pathologically elevated KLK8 rescued the structural neuronal plasticity in transgenic mice with alzheimer's pathology, thus making KLK8 a promising new player in alzheimer's disease.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Allegra Mascaró, A.L., Cesare, P., Sacconi, L., Grasselli, G., Mandolesi, G., Maco, B., Knott, G.W., Huang, L., Paola, V. de, Strata, P., and Pavone, F.S. (2013). In vivo single branch axotomy induces GAP-43-dependent sprouting and synaptic remodeling in cerebellar cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 10824-10829.
2. Ambrée, O., Touma, C., Görtz, N., Keyvani, K., Paulus, W., Palme, R., and Sachser, N. (2006). Activity changes and marked stereotypic behavior precede Abeta pathology in TgCRND8 Alzheimer mice. *Neurobiology of Aging* *27*, 955-964.
3. Ashley, J., Cordy, B., Lucia, D., Fradkin, L.G., Budnik, V., and Thomson, T. (2018). Retrovirus-like Gag Protein Arc1 Binds RNA and Traffics across Synaptic Boutons. *Cell* *172*, 262-274.e11.
4. Attwood, B.K., Bourgognon, J.-M., Patel, S., Mucha, M., Schiavon, E., Skrzypiec, A.E., Young, K.W., Shiosaka, S., Korostynski, M., Piechota, M., Przewlocki, R., and Pawlak, R. (2011). Neuropsin cleaves EphB2 in the amygdala to control anxiety. *Nature* *473*, 372-375.
5. Bi, R., Kong, L.-L., Xu, M., Li, G.-D., Zhang, D.-F., Li, T., Fang, Y., Zhang, C., Zhang, B., and Yao, Y.-G. (2018). The Arc Gene Confers Genetic Susceptibility to Alzheimer's Disease in Han Chinese. *Molecular neurobiology* *55*, 1217-1226.
6. Bickel, H. 2020: Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen. Online-Publikation; https://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/infoblatt1_haeufigkeit_demenzerkrankungen_dalzg.pdf; 14.02.2022.
7. Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica* *82*, 239-259.
8. Busche, M.A., Chen, X., Henning, H.A., Reichwald, J., Staufenbiel, M., Sakmann, B., and Konnerth, A. (2012). Critical role of soluble amyloid- β for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 8740-8745.
9. Busche, M.A., Kekuš, M., Adelsberger, H., Noda, T., Förstl, H., Nelken, I., and Konnerth, A. (2015). Rescue of long-range circuit dysfunction in Alzheimer's disease models. *Nature neuroscience* *18*, 1623-1630.

10. Calhoun, M.E., Jucker, M., Martin, L.J., Thinakaran, G., Price, D.L., and Mouton, P.R. (1996). Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *Journal of neurocytology* 25, 821-828.
11. Chang, S., Bok, P., Sun, C.-P., Edwards, A., and Huang, G.-J. (2016). Neuropsin Inactivation Has Protective Effects against Depressive-Like Behaviours and Memory Impairment Induced by Chronic Stress. *PLoS genetics* 12, e1006356.
12. 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, M., Kunicki, S., Morissette, C., Paquette, J., Gervais, F., Bergeron, C., Fraser, P.E., Carlson, G.A., George-Hyslop, P.S., and Westaway, D. (2001). Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *The Journal of biological chemistry* 276, 21562-21570.
13. Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science (New York, N.Y.)* 261, 921-923.
14. D'Amelio, M., and Rossini, P.M. (2012). Brain excitability and connectivity of neuronal assemblies in Alzheimer's disease: from animal models to human findings. *Progress in neurobiology* 99, 42-60.
15. 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.
16. Djogo, N., Jakovcevski, I., Müller, C., Lee, H.J., Xu, J.-C., Jakovcevski, M., Kügler, S., Loers, G., and Schachner, M. (2013). Adhesion molecule L1 binds to amyloid beta and reduces Alzheimer's disease pathology in mice. *Neurobiology of disease* 56, 104-115.
17. Dugger, S.A., Platt, A., and Goldstein, D.B. (2018). Drug development in the era of precision medicine. *Nature reviews. Drug discovery* 17, 183-196.
18. Edelman, L., Hanson, P.I., Chapman, E.R., and Jahn, R. (1995). Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *The EMBO Journal* 14, 224-231.

19. Freel, S., Seeher, K., Chowdhary, N., Sivananthan, S. and Pot, A.M. 2018: Towards a dementia plan: a WHO guide. Online-Publikation; <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272642/9789241514132-eng.pdf?ua=1>; 14.02.2022.
20. Gauthier, S., Feldman, H.H., Schneider, L.S., Wilcock, G.K., Frisoni, G.B., Hardlund, J.H., Moebius, H.J., Bentham, P., Kook, K.A., Wischik, D.J., Schelter, B.O., Davis, C.S., Staff, R.T., Bracoud, L., Shamsi, K., Storey, J.M.D., Harrington, C.R., and Wischik, C.M. (2016). Efficacy and safety of tau-aggregation inhibitor therapy in patients with mild or moderate Alzheimer's disease: a randomised, controlled, double-blind, parallel-arm, phase 3 trial. *The Lancet* 388, 2873-2884.
21. 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. *Neuropathology and applied neurobiology* 47 (5), 611-624.
22. Herring, A., Münster, Y., Akkaya, T., Moghaddam, S., Deinsberger, K., Meyer, J., Zahel, J., Sanchez-Mendoza, E., Wang, Y., Hermann, D.M., Arzberger, T., Teuber-Hanselmann, S., and Keyvani, K. (2016). Kallikrein-8 inhibition attenuates Alzheimer's disease pathology in mice. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 12, 1273-1287.
23. Hirata, A., Yoshida, S., Inoue, N., Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Taniguchi, M., Matsuyama, T., Kato, K., Iizasa, H., Kataoka, Y., Yoshida, N., and Shiosaka, S. (2001). Abnormalities of synapses and neurons in the hippocampus of neuropsin-deficient mice. *Molecular and cellular neurosciences* 17, 600-610.
24. Honig, L.S., Vellas, B., Woodward, M., Boada, M., Bullock, R., Borrie, M., Hager, K., Andreasen, N., Scarpini, E., Liu-Seifert, H., Case, M., Dean, R.A., Hake, A., Sundell, K., Poole Hoffmann, V., Carlson, C., Khanna, R., Mintun, M., DeMattos, R., Selzler, K.J., and Siemers, E. (2018). Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease. *The New England journal of medicine* 378, 321-330.
25. Jia, J., Wei, C., Chen, S., Li, F., Tang, Y., Qin, W., Zhao, L., Jin, H., Xu, H., Wang, F., Zhou, A., Zuo, X., Wu, L., Han, Y., Han, Y., Huang, L., Wang, Q., Li, D., Chu, C., Shi, L., Gong, M., Du, Y., Zhang, J., Zhang, J., Zhou, C., Lv, J., Lv, Y., Xie, H.,

- Ji, Y., Li, F., Yu, E., Luo, B., Wang, Y., Yang, S., Qu, Q., Guo, Q., Liang, F., Zhang, J., Tan, L., Shen, L., Zhang, K., Zhang, J., Peng, D., Tang, M., Lv, P., Fang, B., Chu, L., Jia, L., and Gauthier, S. (2018). The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 14, 483-491.
26. Jiang, J., Wang, Z.-H., Qu, M., Di Gao, Liu, X.-P., Zhu, L.-Q., and Wang, J.-Z. (2015). Stimulation of EphB2 attenuates tau phosphorylation through PI3K/Akt-mediated inactivation of glycogen synthase kinase-3 β . *Scientific reports* 5, 11765.
27. Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., and Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in neurosciences* 27, 447-452.
28. Kent, S.A., Spires-Jones, T.L., and Durrant, C.S. (2020). The physiological roles of tau and A β : implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. *Acta Neuropathol* 140, 417-447.
29. Keyvani, K., Münster, Y., Kurapati, N.K., Rubach, S., Schönborn, A., Kocakavuk, E., Karout, M., Hammesfahr, P., Wang, Y.-C., Hermann, D.M., Teuber-Hanselmann, S., and Herring, A. (2018). Higher levels of kallikrein-8 in female brain may increase the risk for Alzheimer's disease. *Brain pathology* 28, 947-964.
30. Kilic, E., ElAli, A., Kilic, U., 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 and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30, 969-984.
31. 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. *Scientific reports* 8, 9928.
32. Krabbe, G., Halle, A., Matyash, V., Rinnenthal, J.L., Eom, G.D., Bernhardt, U., Miller, K.R., Prokop, S., Kettenmann, H., and Heppner, F.L. (2013). Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology. *PloS one* 8, e60921.

33. Kunkle, B.W., Grenier-Boley, B., Sims, R., Bis, J.C., Damotte, V., Naj, A.C., Boland, A., Vronskaya, M., van der Lee, S.J., Amlie-Wolf, A., Bellenguez, C., Frizatti, A., Chouraki, V., Martin, E.R., Slegers, K., Badarinarayan, N., Jakobsdottir, J., Hamilton-Nelson, K.L., Moreno-Grau, S., Olaso, R., Raybould, R., Chen, Y., Kuzma, A.B., Hiltunen, M., Morgan, T., Ahmad, S., Vardarajan, B.N., Epelbaum, J., Hoffmann, P., Boada, M., Beecham, G.W., Garnier, J.-G., Harold, D., Fitzpatrick, A.L., Valladares, O., Moutet, M.-L., Gerrish, A., Smith, A.V., Qu, L., Bacq, D., Denning, N., Jian, X., Zhao, Y., Del Zompo, M., Fox, N.C., Choi, S.-H., Mateo, I., Hughes, J.T., Adams, H.H., Malamon, J., Sanchez-Garcia, F., Patel, Y., Brody, J.A., Dombroski, B.A., Naranjo, M.C.D., Daniilidou, M., Eiriksdottir, G., Mukherjee, S., Wallon, D., Uphill, J., Aspelund, T., Cantwell, L.B., Garzia, F., Galimberti, D., Hofer, E., Butkiewicz, M., Fin, B., Scarpini, E., Sarnowski, C., Bush, W.S., Meslage, S., Kornhuber, J., White, C.C., Song, Y., Barber, R.C., Engelborghs, S., Sordon, S., Voijnovic, D., Adams, P.M., Vandenberghe, R., Mayhaus, M., Cupples, L.A., Albert, M.S., Deyn, P.P. de, Gu, W., Himali, J.J., Beekly, D., Squassina, A., Hartmann, A.M., Orellana, A., Blacker, D., Rodriguez-Rodriguez, E., Lovestone, S., Garcia, M.E., Doody, R.S., Munoz-Fernandez, C., Sussams, R., Lin, H., Fairchild, T.J., Benito, Y.A., Holmes, C., Karamujić-Čomić, H., Frosch, M.P., Thonberg, H., Maier, W., Roshchupkin, G., Ghetti, B., Giedraitis, V., Kawalia, A., Li, S., Huebinger, R.M., Kilander, L., Moebus, S., Hernández, I., Kamboh, M.I., Brundin, R., Turton, J., Yang, Q., Katz, M.J., Concari, L., Lord, J., Beiser, A.S., Keene, C.D., Helisalmi, S., Kloszewska, I., Kukull, W.A., Koivisto, A.M., Lynch, A., Tarraga, L., Larson, E.B., Haapasalo, A., Lawlor, B., Mosley, T.H., Lipton, R.B., Solfrizzi, V., Gill, M., Longstreth, W.T., Montine, T.J., Frisardi, V., Diez-Fairen, M., Rivadeneira, F., Petersen, R.C., Deramecourt, V., Alvarez, I., Salani, F., Ciaramella, A., Boerwinkle, E., Reiman, E.M., Fievet, N., Rotter, J.I., Reisch, J.S., Hanon, O., Cupidi, C., Andre Uitterlinden, A.G., Royall, D.R., Dufouil, C., Maletta, R.G., Rojas, I. de, Sano, M., Brice, A., Cecchetti, R., George-Hyslop, P.S., Ritchie, K., Tsolaki, M., Tsuang, D.W., Dubois, B., Craig, D., Wu, C.-K., Soininen, H., Avramidou, D., Albin, R.L., Fratiglioni, L., Germanou, A., Apostolova, L.G., Keller, L., Koutroumani, M., Arnold, S.E., Panza, F., Gkatzima, O., Asthana, S., Hannequin, D., Whitehead, P., Atwood, C.S., Caffarra, P., Hampel, H., Quintela, I., Carracedo,

Á., Lannfelt, L., Rubinsztein, D.C., Barnes, L.L., Pasquier, F., Frölich, L., Barral, S., McGuinness, B., Beach, T.G., Johnston, J.A., Becker, J.T., Passmore, P., Bigio, E.H., Schott, J.M., Bird, T.D., Warren, J.D., Boeve, B.F., Lupton, M.K., Bowen, J.D., Proitsi, P., Boxer, A., Powell, J.F., Burke, J.R., Kauwe, J.S.K., Burns, J.M., Mancuso, M., Buxbaum, J.D., Bonuccelli, U., Cairns, N.J., McQuillin, A., Cao, C., Livingston, G., Carlson, C.S., Bass, N.J., Carlsson, C.M., Hardy, J., Carney, R.M., Bras, J., Carrasquillo, M.M., Guerreiro, R., Allen, M., Chui, H.C., Fisher, E., Masullo, C., Crocco, E.A., DeCarli, C., Bisceglia, G., Dick, M., Li Ma, Duara, R., Graff-Radford, N.R., Evans, D.A., Hodges, A., Faber, K.M., Scherer, M., Fallon, K.B., Riemenschneider, M., Fardo, D.W., Heun, R., Farlow, M.R., Kölsch, H., Ferris, S., Leber, M., Foroud, T.M., Heuser, I., Galasko, D.R., Giegling, I., Gearing, M., Hüll, M., Geschwind, D.H., Gilbert, J.R., Morris, J., Green, R.C., Mayo, K., Growdon, J.H., Feulner, T., Hamilton, R.L., Harrell, L.E., Dricchel, D., Honig, L.S., Cushion, T.D., Huentelman, M.J., Hollingworth, P., Hulette, C.M., Hyman, B.T., Marshall, R., Jarvik, G.P., Meggy, A., Abner, E., Menzies, G.E., Jin, L.-W., Leonenko, G., Real, L.M., Jun, G.R., Baldwin, C.T., Grozeva, D., Karydas, A., Russo, G., Kaye, J.A., Kim, R., Jessen, F., Kowall, N.W., Vellas, B., Kramer, J.H., Vardy, E., LaFerla, F.M., Jöckel, K.-H., Lah, J.J., Dichgans, M., Leverenz, J.B., Mann, D., Levey, A.I., Pickering-Brown, S., Lieberman, A.P., Klopp, N., Lunetta, K.L., Wichmann, H.-E., Lyketsos, C.G., Morgan, K., Marson, D.C., Brown, K., Martiniuk, F., Medway, C., Mash, D.C., Nöthen, M.M., Masliah, E., Hooper, N.M., McCormick, W.C., Daniele, A., McCurry, S.M., Bayer, A., McDavid, A.N., Gallacher, J., McKee, A.C., van den Bussche, H., Mesulam, M., Brayne, C., Miller, B.L., Riedel-Heller, S., Miller, C.A., Miller, J.W., Al-Chalabi, A., Morris, J.C., Shaw, C.E., Myers, A.J., Wiltfang, J., O'Bryant, S., Olichney, J.M., Alvarez, V., Parisi, J.E., Singleton, A.B., Paulson, H.L., Collinge, J., Perry, W.R., Mead, S., Peskind, E., Cribbs, D.H., Rossor, M., Pierce, A., Ryan, N.S., Poon, W.W., Nacmias, B., Potter, H., Sorbi, S., Quinn, J.F., Sacchinelli, E., Raj, A., Spalletta, G., Raskind, M., Caltagirone, C., Bossù, P., Orfei, M.D., Reisberg, B., Clarke, R., Reitz, C., Smith, A.D., Ringman, J.M., Warden, D., Roberson, E.D., Wilcock, G., Rogaeva, E., Bruni, A.C., Rosen, H.J., Gallo, M., Rosenberg, R.N., Ben-Shlomo, Y., Sager, M.A., Mecocci, P., Saykin, A.J., Pastor, P., Cuccaro, M.L., Vance, J.M., Schneider, J.A.,

- Schneider, L.S., Slifer, S., Seeley, W.W., Smith, A.G., Sonnen, J.A., Spina, S., Stern, R.A., Swerdlow, R.H., Tang, M., Tanzi, R.E., Trojanowski, J.Q., Troncoso, J.C., van Deerlin, V.M., van Eldik, L.J., Vinters, H.V., Vonsattel, J.P., Weintraub, S., Welsh-Bohmer, K.A., Wilhelmsen, K.C., Williamson, J., Wingo, T.S., Woltjer, R.L., Wright, C.B., Yu, C.-E., Yu, L., Saba, Y., Pilotto, A., Bullido, M.J., Peters, O., Crane, P.K., Bennett, D., Bosco, P., Coto, E., Boccardi, V., Jager, P.L. de, Lleo, A., Warner, N., Lopez, O.L., Ingelsson, M., Deloukas, P., Cruchaga, C., Graff, C., Gwilliam, R., Fornage, M., Goate, A.M., Sanchez-Juan, P., Kehoe, P.G., Amin, N., Ertekin-Taner, N., Berr, C., Debette, S., Love, S., Launer, L.J., Younkin, S.G., Dartigues, J.-F., Corcoran, C., Ikram, M.A., Dickson, D.W., Nicolas, G., Campion, D., Tschanz, J., Schmidt, H., Hakonarson, H., Clarimon, J., Munger, R., Schmidt, R., Farrer, L.A., van Broeckhoven, C., C O'Donovan, M., DeStefano, A.L., Jones, L., Haines, J.L., Deleuze, J.-F., Owen, M.J., Gudnason, V., Mayeux, R., Escott-Price, V., Psaty, B.M., Ramirez, A., Wang, L.-S., Ruiz, A., van Duijn, C.M., Holmans, P.A., Seshadri, S., Williams, J., Amouyel, P., Schellenberg, G.D., Lambert, J.-C., and Pericak-Vance, M.A. (2019). Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. *Nature genetics* *51*, 414-430.
34. La Monte, S.M. de, Federoff, H.J., Ng, S.-C., Grabczyk, E., and Fishman, M.C. (1989). GAP-43 gene expression during development: persistence in a distinctive set of neurons in the mature central nervous system. *Brain research. Developmental brain research* *46*, 161-168.
35. Lanoiselée, H.-M., Nicolas, G., Wallon, D., Rovelet-Lecrux, A., Lacour, M., Rousseau, S., Richard, A.-C., Pasquier, F., Rollin-Sillaire, A., Martinaud, O., Quillard-Muraine, M., La Sayette, V. de, Boutoleau-Bretonniere, C., Etcharry-Bouyx, F., Chauviré, V., Sarazin, M., Le Ber, I., Epelbaum, S., Jonveaux, T., Rouaud, O., Ceccaldi, M., Félician, O., Godefroy, O., Formaglio, M., Croisile, B., Auriacombe, S., Chamard, L., Vincent, J.-L., Sauvée, M., Marelli-Tosi, C., Gabelle, A., Ozsancak, C., Pariente, J., Paquet, C., Hannequin, D., and Campion, D. (2017). APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS medicine* *14*, e1002270.

36. Leonenko, G., Shoai, M., Bellou, E., Sims, R., Williams, J., Hardy, J., and Escott-Price, V. (2019). Genetic risk for alzheimer disease is distinct from genetic risk for amyloid deposition. *Annals of neurology* 86, 427-435.
37. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Of Biological Chemistry*, 265-275.
38. Loy, C.T., Schofield, P.R., Turner, A.M., and Kwok, J.B.J. (2014). Genetics of dementia. *The Lancet* 383, 828-840.
39. Masliah, E., Mallory, M., Alford, M., DeTeresa, R., Hansen, L.A., McKeel, D.W., and Morris, J.C. (2001). Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* 56, 127-129.
40. Masurier, N., Arama, D.P., El Amri, C., and Lisowski, V. (2018). Inhibitors of kallikrein-related peptidases: An overview. *Medicinal research reviews* 38, 655-683.
41. 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.
42. Mirra, S.S., Hart, M.N., and Terry, R.D. (1993). Making the diagnosis of Alzheimer's disease. A primer for practicing pathologists. *Archives of pathology & laboratory medicine* 117, 132-144.
43. 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. *The European journal of neuroscience* 10, 760-764.
44. Mönnig, U., Sandbrink, R., and Weidemann, A. (1995). Extracellular Matrix Influences the Biogenesis of Amyloid Precursor Protein in Microglial Cells. *The Journal of biological chemistry* 270, 7104-7110.
45. Moreno-Jiménez, E.P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarrá, N., Ávila, J., and Llorens-Martín, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nature medicine* 25, 554-560.
46. Münster, Y., Keyvani, K., and Herring, A. (2020). Inhibition of excessive kallikrein-8 improves neuroplasticity in Alzheimer's disease mouse model. *Experimental neurology* 324, 113115.

47. Nebel, R.A., Aggarwal, N.T., Barnes, L.L., Gallagher, A., Goldstein, J.M., Kantarci, K., Mallampalli, M.P., Mormino, E.C., Scott, L., Yu, W.H., Maki, P.M., and Mielke, M.M. (2018). Understanding the impact of sex and gender in Alzheimer's disease: A call to action. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 14, 1171-1183.
48. Nichols, E., Steinmetz, J.D. and GBD 2019 Dementia Forecasting Collaborators 2022: Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. Online-Publikation; [https://www.thelancet.com/journals/lanpub/article/PIIS2468-2667\(21\)00249-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanpub/article/PIIS2468-2667(21)00249-8/fulltext); 16.01.2022.
49. Olsson, B., Lautner, R., Andreasson, U., Öhrfelt, A., Portelius, E., Bjerke, M., Hölttä, M., Rosén, C., Olsson, C., Strobel, G., Wu, E., Dakin, K., Petzold, M., Blennow, K., and Zetterberg, H. (2016). CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Neurology* 15, 673-684.
50. Palop, J.J., Chin, J., Bien-Ly, N., Massaro, C., Yeung, B.Z., Yu, G.-Q., and Mucke, L. (2005). Vulnerability of dentate granule cells to disruption of arc expression in human amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neurosci.* 25, 9686-9693.
51. Pascual-Leone, A., Amedi, A., Fregni, F., and Merabet, L.B. (2005). The plastic human brain cortex. *Annual review of neuroscience* 28, 377-401.
52. Petersen, R.C., Lopez, O., Armstrong, M.J., Getchius, T.S.D., Ganguli, M., Gloss, D., Gronseth, G.S., Marson, D., Pringsheim, T., Day, G.S., Sager, M., Stevens, J., and Rae-Grant, A. (2018). Practice guideline update summary: Mild cognitive impairment: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 90, 126-135.
53. Querfurth, H.W., and LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* 362, 329-344.
54. Rossor, M.N., Fox, N.C., Mummery, C.J., Schott, J.M., and Warren, J.D. (2010). The diagnosis of young-onset dementia. *The Lancet Neurology* 9, 793-806.
55. Routtenberg, A., Cantalops, I., Zaffuto, S., Serrano, P., and Namgung, U. (2000). Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *97*, 7657-7662.
56. Rudinskiy, N., Hawkes, J.M., Betensky, R.A., Eguchi, M., Yamaguchi, S., Spires-Jones, T.L., and Hyman, B.T. (2012). Orchestrated experience-driven Arc responses are disrupted in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature neuroscience* *15*, 1422-1429.
57. Sandelius, Å., Portelius, E., Källén, Å., Zetterberg, H., Rot, U., Olsson, B., Toledo, J.B., Shaw, L.M., Lee, V.M.Y., Irwin, D.J., Grossman, M., Weintraub, D., Chen-Plotkin, A., Wolk, D.A., McCluskey, L., Elman, L., Kostanjevecki, V., Vandijck, M., McBride, J., Trojanowski, J.Q., and Blennow, K. (2019). Elevated CSF GAP-43 is Alzheimer's disease specific and associated with tau and amyloid pathology. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* *15*, 55-64.
58. Santacruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., DeTure, M., Ramsden, M., McGowan, E., Forster, C., Yue, M., Orne, J., Janus, C., Mariash, A., Kuskowski, M., Hyman, B., Hutton, M., and Ashe, K.H. (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science (New York, N.Y.)* *309*, 476-481.
59. Sattlecker, M., Kiddle, S.J., Newhouse, S., Proitsi, P., Nelson, S., Williams, S., Johnston, C., Killick, R., Simmons, A., Westman, E., Hodges, A., Soininen, H., Kłoszewska, I., Mecocci, P., Tsolaki, M., Vellas, B., Lovestone, S., and Dobson, R.J.B. (2014). Alzheimer's disease biomarker discovery using SOMAscan multiplexed protein technology. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* *10*, 724-734.
60. Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M.M.B., Strooper, B. de, Frisoni, G.B., Salloway, S., and van der Flier, W.M. (2016). Alzheimer's disease. *The Lancet* *388*, 505-517.
61. Selkoe, D.J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science (New York, N.Y.)* *298*, 789-791.
62. Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P.H., Williams, L., Maier, M., Dunstan, R., Salloway, S., Chen, T., Ling, Y., O'Gorman, J., Qian, F., Arastu, M., Li, M., Chollate, S., Brennan, M.S., Quintero-Monzon, O., Scannevin, R.H., Arnold, H.M., Engber, T., Rhodes, K., Ferrero, J., Hang, Y., Mikulskis, A., Grimm, J., Hock, C.,

- Nitsch, R.M., and Sandrock, A. (2016). The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature* 537, 50-56.
63. Shepherd, J.D., and Bear, M.F. (2011). New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nature neuroscience* 14, 279-284.
64. 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.
65. 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.
66. Singh, P., Carraher, C., and Schwarzbauer, J.E. (2010). Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annual review of cell and developmental biology* 26, 397-419.
67. Snyder, H.M., Asthana, S., Bain, L., Brinton, R., Craft, S., Dubal, D.B., Espeland, M.A., Gatz, M., Mielke, M.M., Raber, J., Rapp, P.R., Yaffe, K., and Carrillo, M.C. (2016). Sex biology contributions to vulnerability to Alzheimer's disease: A think tank convened by the Women's Alzheimer's Research Initiative. *Alzheimer's & Dementia* 12, 1186-1196.
68. Tai, Y., Gallo, N.B., Wang, M., Yu, J.-R., and van Aelst, L. (2019). Axo-axonic Innervation of Neocortical Pyramidal Neurons by GABAergic Chandelier Cells Requires AnkyrinG-Associated L1CAM. *Neuron* 102, 358-372.
69. 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. *The Journal of physiology* 570, 541-551.
70. 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. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 12657-12672.
71. Tarasoff-Conway, J.M., Carare, R.O., Osorio, R.S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., Axel, L., Rusinek, H., Nicholson, C., Zlokovic, B.V., Frangione, B., Blennow, K., Ménard, J., Zetterberg, H., Wisniewski, T., and Leon, M.J. de (2015).

- Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nature reviews. Neurology* 11, 457-470.
72. Terayama, R., Bando, Y., Yamada, M., and Yoshida, S. (2005). Involvement of neuropilin in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 52, 108-118.
73. Teuber-Hanselmann, S., Rekowski, J., Vogelgsang, J., Arnim, C. von, Reetz, K., Stang, A., Jöckel, K.-H., Wiltfang, J., Esselmann, H., Otto, M., Tumani, H., Herring, A., and Keyvani, K. (2019). CSF and blood Kallikrein-8: a promising early biomarker for Alzheimer's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 0, 1-9.
74. Verret, L., Mann, E.O., Hang, G.B., Barth, A.M.I., Cobos, I., Ho, K., Devidze, N., Masliah, E., Kreitzer, A.C., Mody, I., Mucke, L., and Palop, J.J. (2012). Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell* 149, 708-721.
75. Wilkinson, D.G. (2001). Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nature reviews. Neuroscience* 2, 155-164.
76. Young, E.J., Lipina, T., Tam, E., Mandel, A., Clapcote, S.J., Bechard, 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, and behavior* 7, 224-234.
77. Zhou, L., Barão, S., Laga, M., Bockstael, K., Borgers, M., Gijzen, H., Annaert, W., Moechars, D., Mercken, M., Gevaert, K., and Strooper, B. de (2012). The neural cell adhesion molecules L1 and CHL1 are cleaved by BACE1 protease in vivo. *J. Biol. Chem.* 287, 33719.
78. Zhu, X.-C., Tan, L., Wang, H.-F., Jiang, T., Cao, L., Wang, C., Wang, J., Tan, C.-C., Meng, X.-F., and Yu, J.-T. (2015). Rate of early onset Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Translational Medicine* 3, 38.
79. Zlokovic, B.V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nature reviews. Neuroscience* 12, 723-738.

9 ANHANG

9.1 Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abbildung 1	Die 6 Entwicklungsstadien der adulten hippokampalen Neurogenese (Kempermann et al., 2004)	12
Abbildung 2	Zunahme der zerebralen EPHB2-FL Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen	31
Abbildung 3	Zunahme der zerebralen L1CAM-FL Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen	32
Abbildung 4	Zunahme der zerebralen FN-FL Level durch KLK8-Suppression in weiblichen, nicht aber in männlichen transgenen Mäusen	33
Abbildung 5	Zunahme der zerebralen SYP Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen	35
Abbildung 6	Zunahme der zerebralen GAP43 Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen	36
Abbildung 7	Zunahme der zerebralen ARC Level durch KLK8-Suppression in transgenen Mäusen	37
Abbildung 8	Kallikrein-8 <i>knock-down</i> fördert die hippokampale Neurogenese in transgenen Mäusen	39

9.2 Tabellenverzeichnis

		Seite
Tabelle 1	Anzahl der untersuchten Tiere der Experimentalgeneration für Western Blot-Analysen und Doublecortin-Stereologie	23
Tabelle 2	Eingesetzte Primärantikörper im Western Blot	65
Tabelle 3	Eingesetzte Sekundärantikörper im Western Blot	65
Tabelle 4	Eingesetzter Primärantikörper zur immunhistologischen Färbung	66
Tabelle 5	Geräte	66
Tabelle 6	Lösungen und Puffer	68
Tabelle 7	Chemikalien	70
Tabelle 8	Kits	70

9.3 Abkürzungen

A β	Beta-Amyloid
AD	<i>Alzheimer's Disease</i>
APOE- ϵ 4	Apolipoprotein E Typ-4
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
ARC	<i>Activity-regulated cytoskeleton-associated protein</i>
ATG5	<i>Autophagy protein 5</i>
BACE1	<i>Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1</i>
CERAD	<i>Consortium to establish a registry for alzheimer's disease</i>
CSF	<i>Cerebrospinal fluid</i>
DCX	<i>Doublecortin</i>
EOAD	<i>Early onset alzheimer's disease</i>
EPHB2	Ephrinrezeptor B2
FL	<i>Full length</i> (nicht fragmentiert)
FN	Fibronectin
GAP43	<i>Growth associated protein 43</i>
KLK8	Kallikrein-8
L1CAM	<i>Neuronal cell adhesion molecule L1</i>
LOAD	<i>Late onset alzheimer's disease</i>
LRP1	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
MCI	<i>Mild cognitive impairment</i>
MRD1	<i>Multidrug-resistance protein 1</i>
NFT	Neurofibrilläre Tangles
NRG1	Neuregulin 1
PRS	<i>Polygenic risk scores</i>
PSEN1	Präsenilin-1
PSEN2	Präsenilin-2
RAGE	<i>Receptor for advanced glycation endproducts</i>
SSP1	<i>Secreted phosphoprotein 1</i>
STX17	Syntaxin 17
SYP	Synaptophysin
TREM2	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>

9.4 Materialien

Primär-Antikörper	Typ	Verdünnung	Hersteller, Katalognummer
Anti-ARC	rabbit-IgG	1:500	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA; sc-15325
Anti-EPHB2	goat-IgG	1:200	R&D Systems Inc., Minneapolis; USA; AF467
Anti-Fibronectin	rabbit-IgG	1:1.000	Abcam plc, Cambridge, UK; ab2413
Anti-GAP43	rabbit-IgG	1:4.000	GeneTex Inc., Irvine, USA; GTX11136
Anti-L1CAM	mouse-IgG	1:500	Abcam plc, Cambridge, UK; ab24345
Anti-SYP	mouse-IgG	1:10.000	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark; M7315

Tabelle 2 Eingesetzte Primärantikörper im Western Blot

Sekundär-Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Hersteller, Katalognummer
Anti-goat/sheep IgG	HRP-konjugiert	1:5.000 ⁽¹⁾	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA; A9452
Anti-mouse IgG	HRP-konjugiert	1:5.000 ⁽²⁾ 1:10.000 ⁽³⁾	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA; A3682
Anti-rabbit IgG	HRP-konjugiert	1:5.000 ⁽⁴⁾ 1:10.000 ⁽⁵⁾ 1:15.000 ⁽⁶⁾	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Cambridgeshire, UK; 111-035- 003

Tabelle 3 Eingesetzte Sekundärantikörper im Western Blot. Die Verdünnungsangaben beziehen sich auf die Konzentration des Sekundärantikörpers nach Verwendung des Primärantikörpers von (1) EPHB2, (2) SYP, (3) L1CAM, (4) Fibronectin, (5) GAP43, (6) ARC.

Primär-Antikörper	Typ	Verdünnung	Hersteller, Katalognummer
Anti-Doublecortin	mouse-IgG	1:50 ⁽¹⁾	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA; sc-271390

Tabelle 4 Eingesetzter Primärantikörper zur immunhistologischen Färbung

Geräte	Hersteller
ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Farbdigitalkamera, 3/4' chip, 36 bit color, DV-20	MicroBrightField Bioscience, Williston, USA
Multiskan™ FC Mikrotiterplatten-Photometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Nikon Eclipse 80i Mikroskop	Nikon Corporation, Tokyo, Japan

Tabelle 5 Geräte

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
10% APS	<u>Für 50 ml Ansatz:</u> 5 g Ammoniumperoxodisulfat mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen
Blot-Puffer	<u>Für 2 L Ansatz:</u> 6,06 g Tris, 28,8 g Glycin, 400 ml Methanol mit Aqua dest. auf 2 L auffüllen
Citratpuffer pH 6	<u>Für 1 L Ansatz:</u> 18 ml 0,1M Citronensäure, 82 ml 0,1M Natriumcitrat auf pH 6 einstellen und mit Aqua dest. auf 1 L auffüllen
DEPC-H ₂ O	500 µl DEPC in 500 ml Aqua dest. verrühren
Fluoreszenz-Trenngel 10%	3 ml FastCast™ Resolver A, 10% 3 ml TGX Stain-Free™ FastCast™ Resolver B 45 µl 10% APS 4,5 µl TEMED
Fluoreszenz-Sammelgel 4%	1 ml FastCast™ Stacker A, 10%

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
	1 ml TGX Stain-Free™ FastCast™ Stacker B 15 µl 10% APS 3 µl TEMED
0,3M Guanidin-HCl- 95%-Ethanol-Lösung	<u>Für 500 ml Ansatz:</u> 14,33 g Guanidin-HCl, 25 ml DEPC-H ₂ O, 475 ml Ethanol 100%
Lower Tris pH 8,8	<u>Für 500 ml Ansatz:</u> 90,855 g Tris, 2 g SDS auf pH 8,8 mit HCl 37%. einstellen und mit Aqua dest. auf 1 L auffüllen
5% MMP in 1x TST	<u>Für 500 ml Ansatz:</u> 25 g Skim Milk Powder (MMP) mit 1x TST auf 500ml auffüllen
10x Ponceau S	<u>Ansatz für 500 ml:</u> 2,5 g Ponceau S, 5 ml Essigsäure, 492,5 ml Aqua dest.
5x SDS-2-Mercaptoethanol- Auftragspuffer	4 ml Aqua dest., 1 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,8 ml Glycerol, 1,6 ml 10% SDS, 0,4 ml 2-Mercaptoethanol, 0,4 ml Bromphenolblau (1% Stock)
10x SDS-Laufpuffer	<u>Für 2 L Ansatz:</u> 288 g Glycin, 78 g Tris, 38 g SDS mit Aqua dest. auf 2 L auffüllen
SDS-Polyacrylamid-Trenngel 10%	2330 ml Acrylamid 1750 ml Lower Tris 2920 ml Aqua dest. 50 µl 10% APS 10 µl TEMED
SDS-Polyacrylamid- Sammelgel 4%	415 ml Acrylamid 625 ml Upper Tris 1460 ml Aqua dest. 20 µl 10% APS 5 µl TEMED

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Standard-Lysepuffer	<u>Für 100 ml Ansatz:</u> 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 2% Igepal, 1% Natriumdesoxycholat, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen
1M Tris/HCl pH 6,7/7,6	<u>Für 500 ml Ansatz:</u> 60,57 g Tris mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen und pH-Wert auf 6,7 oder 7,6 mit HCl 37% einstellen
10x TST-Puffer	<u>Für 1 L Ansatz:</u> 100 ml 1M Tris/HCl pH 7,6, 300 ml 5M NaCl, 5 g Tween 20 mit Aqua dest. auf 1 L auffüllen
Upper Tris pH 6,8	<u>Für 500 ml Ansatz:</u> 30,28 g Tris, 2 g SDS, pH mit HCl 37%. auf 6,8 einstellen und mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen

Tabelle 6 Lösungen und Puffer

Chemikalie	Hersteller
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Antibody-Diluent	Zytomed Systems GmbH, Berlin
Aqua B. Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Bromphenolblau Na-Salz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Cytoseal™ XYL	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Dako REAL™ Hematoxylin	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark

Chemikalie	Hersteller
Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
DEPC	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
EGTA	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Ethanol 100 %	Honeywell International Inc.; Morristown, USA
Essigsäure ROTIPURAN® 100%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycerol zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin PUFFERAN®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Guanidin Hydrochlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
20x IHC-Waschpuffer	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG, Hamburg
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Methanol, J.T.Baker®	Avantor, Radnor, USA
Natriumdesoxycholat, BioXtra	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Phenylmethansulfonyl Fluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA Katalognummer P7626
Ponceau S	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA Katalognummer P8340
Roti®-C/I (Chloroform)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Chemikalie	Hersteller
Salzsäure rauchend 37% ROTIPURAN®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SDS, ultra pure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Skim Milk Powder (MMP)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
TEMED	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
TRIS PUFFERAN®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TRIzol™ Reagent, Invitrogen™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Tabelle 7 Chemikalien

Kit	Hersteller
Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
DC™ Protein Assay Kit II	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Immobilon Western HRP Substrat	Merck KGaA, Darmstadt
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 10%	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
ZytoChem Plus HRP Polymer System	Zytomed Systems GmbH, Berlin

Tabelle 8 Kits

10 DANKSAGUNG

Ich bedanke mich aufrichtig bei Frau Prof. Dr. med. Kathy Keyvani für die exzellente Betreuung und spannende fachliche Auseinandersetzung.

Herrn Dr. rer. nat. Arne Herring danke ich für die Konzeption und Entwicklung des Forschungsprojektes sowie für die Unterstützung bei der Erzielung der Ergebnisse.

Frau Michaela Knoll und Frau Nicole Macha danke ich herzlich für eine optimale Einarbeitung und für helfenden Rat zu jeder Zeit während der praktischen Arbeit im Labor und am Mikroskop. Die Mausezucht, Proteinextraktion und immunologische Färbung der zerebralen Gewebeschnitte ermöglichten erst die Durchführung meiner experimentellen Arbeit.

Zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre motivierende Unterstützung über den gesamten Zeitraum des Promotionsstudiums.

11 LEBENSLAUF

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