

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Neuropathologie

Progression der Amyloid- und Kallikrein-8-Pathologie in männlichen und weiblichen transgenen Mäusen: Geschlechtsunterschiede in frühen Stadien der Alzheimer-Pathologie

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

Vorgelegt von  
Mohamed Karout  
aus Moers  
2022

# DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN

*Offen im Denken*

ub | universitäts  
bibliothek

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

**DOI:** 10.17185/duepublico/78309

**URN:** urn:nbn:de:hbz:465-20230425-123625-9



Dieses Werk kann unter einer Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0 Lizenz (CC BY-NC-ND 4.0) genutzt werden.

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

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Januar 2023

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit sind zum größten Teil in der unten aufgeführten Publikation mitenthalten:

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., Herring, A. (2018): Higher levels of kallikrein-8 in female brain may increase the risk for Alzheimer's disease. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 28, 947-964.

# INHALTSVERZEICHNIS

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | EINLEITUNG.....                            | 8  |
| 1.1   | Alzheimer-Krankheit .....                  | 8  |
| 1.1.1 | Epidemiologie .....                        | 8  |
| 1.1.2 | Pathophysiologie .....                     | 9  |
| 1.1.3 | Ätiologie .....                            | 10 |
| 1.1.4 | Krankheitsverlauf.....                     | 11 |
| 1.2   | Geschlechterunterschiede .....             | 12 |
| 1.3   | KLK8 und die Alzheimer-Krankheit .....     | 13 |
| 1.4   | Fragestellungen.....                       | 15 |
| 2     | MATERIAL UND METHODEN .....                | 16 |
| 2.1   | Tierhaltung und Züchtung.....              | 16 |
| 2.1.1 | Genotyp der Versuchstiere .....            | 16 |
| 2.1.2 | Zeitpunkte und Haltungsbedingungen .....   | 17 |
| 2.1.3 | Verhaltensphänotypisierung.....            | 17 |
| 2.2   | Gewebeentnahme.....                        | 18 |
| 2.3   | Extraktion von DNA, RNA und Proteinen..... | 18 |
| 2.3.1 | Homogenisierung der Proben .....           | 18 |
| 2.3.2 | Phasentrennung .....                       | 19 |
| 2.3.3 | RNA-Extraktion.....                        | 19 |
| 2.3.4 | DNA-Extraktion .....                       | 20 |
| 2.3.5 | Proteinextraktion .....                    | 20 |
| 2.4   | Quantitative Protein-Analyse.....          | 21 |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.4.1    | Proteinbestimmung nach Lowry .....  | 21        |
| 2.4.2    | Probenvorbereitung .....  | 22        |
| 2.4.3    | Fluoreszenz-Gelelektrophorese.....  | 24        |
| 2.4.4    | SDS-PAGE.....   | 26        |
| 2.4.4.1  | Gelherstellung .....  | 27        |
| 2.4.5    | Elektrophorese.....   | 28        |
| 2.4.6    | Western-Blot .....  | 29        |
| 2.4.7    | Immunologische Proteindetektion .....   | 30        |
| 2.5      | A $\beta$ -Plaque-Quantifizierung .....   | 32        |
| 2.5.1    | Immunhistochemie .....  | 32        |
| 2.5.2    | Morphometrische Auswertung .....  | 33        |
| 2.5.3    | Statistik .....   | 34        |
| <b>3</b> | <b>ERGEBNISSE.....</b>  | <b>35</b> |
| 3.1      | Einfluss des Geschlechts und Genotyps auf neokortikale KLK8-Proteinlevel in frühen Stadien der Alzheimer-Pathologie .....                   | 35        |
| 3.1.1    | Keine Geschlechts- oder Genotyp-assoziierte Unterschiede im KLK8-Proteinlevel am dritten postnatalen Tag (P3) .....                         | 35        |
| 3.1.2    | Erhöhung des KLK8-Proteinlevel bei transgenen Mäusen in der frühen juvenilen Phase (P30) unabhängig vom Geschlecht .....                    | 35        |
| 3.1.3    | Erhöhte KLK8-Proteinlevel in transgenen Weibchen im Vergleich zu Männchen zum Zeitpunkt des Ausbruchs der A $\beta$ -Pathologie (P90) ..... | 36        |
| 3.2      | Einfluss des Geschlechts und des Genotyps auf neokortikale EPHB2-Proteinlevel in frühen Stadien der Alzheimer-ähnlichen Pathologie .....    | 38        |
| 3.2.1    | Verminderte EPHB2-Proteinlevel in transgenen Mäusen am dritten postnatalen Tag (P3) .....   | 38        |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.2.2 | Keine Geschlechts- oder Genotyp-assoziierte Unterschiede im EPHB2-Proteinlevel in der frühen juvenilen Phase (P30).....                         | 38 |
| 3.2.3 | Kein Geschlechts- oder Genotyp-assoziierten Unterschiede im EPHB2-Proteinlevel zum Zeitpunkt des Ausbruchs der A $\beta$ -Pathologie (P90)..... | 39 |
| 3.3   | Keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der A $\beta$ -Plaque-Belastung zum Zeitpunkt des Ausbruchs der A $\beta$ -Pathologie (P90).....  | 41 |
| <br>  |   |    |
| 4     | DISKUSSION .....  | 44 |
| 4.1   | KLK8 und geschlechtsspezifische Unterschiede in einem frühen Stadium der AD-Pathologie.....   | 44 |
| 4.2   | KLK8 und das Potential als Biomarker in der Alzheimer-Diagnostik .....  | 47 |
| 4.3   | Therapieausblick- KLK8 als neuer Angriffspunkt .....  | 48 |
| 4.4   | Notwendigkeit einer geschlechterdifferenzierten Forschung .....   | 49 |
| <br>  |   |    |
| 5     | ZUSAMMENFASSUNG.....  | 50 |
| <br>  |   |    |
| 6     | LITERATURVERZEICHNIS.....   | 51 |
| <br>  |   |    |
| 7     | ANHANG.....   | 62 |
| 7.1   | Abbildungsverzeichnis.....  | 62 |
| 7.2   | Tabellenverzeichnis .....   | 62 |
| <br>  |   |    |
| 8     | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....  | 63 |
| <br>  |   |    |
| 9     | DANKSAGUNG .....  | 65 |

10 LEBENSLAUF..... 66

# 1 *Einleitung*

## 1.1 Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Erkrankung (*Alzheimer's disease*, AD) ist eine neurodegenerative Erkrankung mit progredientem Verlauf und wird klinisch gekennzeichnet durch einen schleichenden Gedächtnisverlust und Alltagsinkompetenz. Jedoch kann ein breites Spektrum von weiteren Symptomen vorliegen, wie u.a. Halluzinationen, Apraxien, Depressionen und Schlafstörungen. Als Erkrankung des höheren Lebensalters nimmt Alzheimer im Zuge des demographischen Wandels an Bedeutung zu und stellt eines der wichtigsten Herausforderungen des 21. Jahrhunderts in der Medizin dar (Alzheimer's, 2013).

### 1.1.1 Epidemiologie

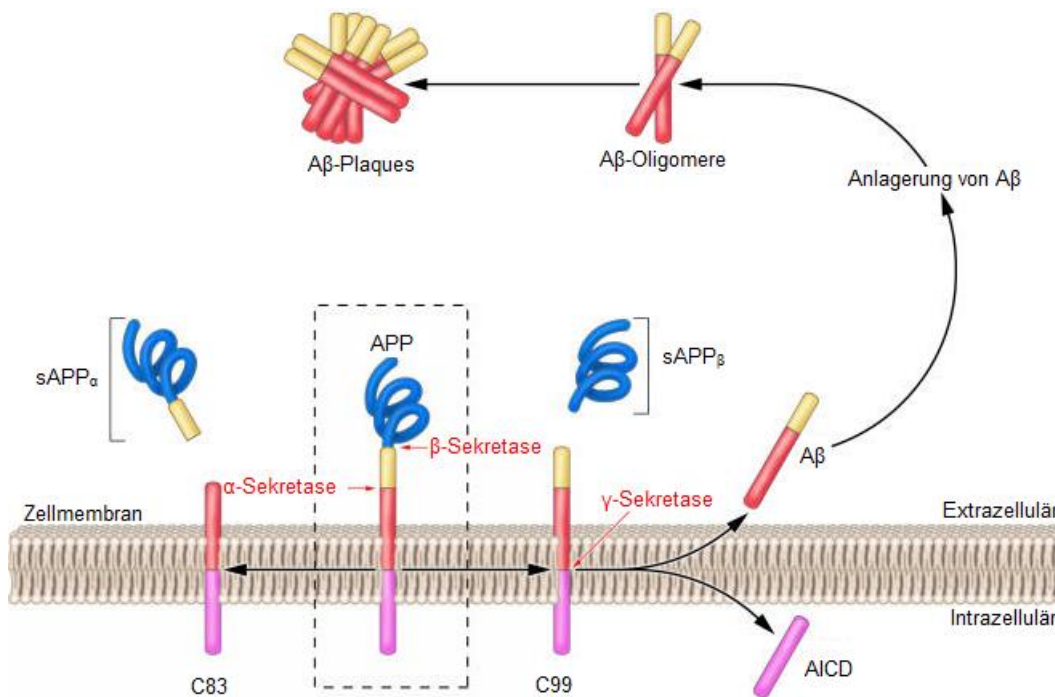
Alzheimer bedingt 60-80% aller dementiellen Erkrankungen (Alzheimer's, 2013). Die Prävalenz weltweit liegt bei >60-Jährigen zwischen 5 und 7% (Prince et al., 2013). Dabei sind Frauen im Vergleich zu den Männern von der Erkrankung doppelt so häufig betroffen. Auch wenn Frauen eine erhöhte Lebenserwartung vorweisen, so konnte diese Begründung den großen Unterschied in der Prävalenz nicht erklären (Viña & Lloret, 2010). Zudem weisen sie eine stärkere Progressionsrate der Symptome bei Vorliegen einer leichten kognitiven Störung („*Mild cognitive impairment*“, MCI) auf, obwohl Männer eine höhere Prävalenz der MCI vorweisen (Lin et al., 2015; Petersen et al., 2010). Des Weiteren leiden Frauen klinisch an schwereren kognitiven Einschränkungen im Vergleich zu den Männern (Irvine et al., 2012; Mielke et al., 2014). Hinzu kommt, dass die Mortalitätsrate von Alzheimer bei Männern höher liegt und die Todesursache meist direkte Folge der Erkrankung ist, wohingegen Frauen indirekt durch Einschränkungen im Alltag und mangelnder Versorgung versterben (Lapane et al., 2001).



### 1.1.2 Pathophysiologie

Die  $\beta$ -Amyloid ( $A\beta$ )-Pathologie ist ein fester Bestandteil der Alzheimer-Erkrankung. Sie wird durch  $A\beta$ -Peptide gekennzeichnet, die proteolytisch aus dem transmembranen Amyloid-Vorläuferprotein (Amyloid precursor protein, APP) hervorgehen. APP besitzt verschiedene Isoformen, wobei die Isoform mit 695 Aminosäuren hauptsächlich in Neuronen gebildet wird (Selkoe & Hardy, 2016). Dessen Prozessierung findet mittels Spaltung der  $A\beta$ -Domäne des APP zu  $A\beta$ -40 und  $A\beta$ -42 durch verschiedene Sekretasen ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen) statt und anschließend werden die Fragmente in die Extrazellulärmatrix freigesetzt (Lichtenthaler et al., 2011). Dort akkumulieren  $A\beta$ -Monomere und bilden zunächst diffuse und schließlich feste Plaques. Die hydrophoben und neurotoxischen Eigenschaften des  $A\beta$ -42 sind dabei stärker ausgeprägt als bei  $A\beta$ -40. Als kleinste toxische Einheit fördern die  $A\beta$ -Dimere unter anderem die Tau-Pathologie (Haass & Selkoe, 2007; Jin et al., 2011; Selkoe, 2001).

Die Tau-Pathologie ist eine weitere wichtige Komponente der Alzheimer-Pathologie. Sie wird durch intrazelluläre, hyperphosphorylierte, fibrilläre Strukturen (*neurofibrillary tangles*) charakterisiert, die sich aus helikal zusammengesetzten Tau-Proteinen (*paired helical filaments*, PHF), einem Mikrotubuli-assoziiertem Protein (*microtubuli associated Protein*, MAP), zusammensetzen (Kosik et al., 1986), deren Folge eine neuronale Degeneration beinhaltet (Jin et al., 2011). Die Tau-Pathologie kann als Folge der  $A\beta$ -Pathologie gesehen werden, da eine Caspase-vermittelte Proteolyse  $A\beta$ -induziert ist und die Bildung der „neurofibrillary tangles“ fördert (Lewis et al., 2001). Zudem kann sie aber auch im Rahmen weiterer neurologischer Erkrankungen und als Alterungsprozess unabhängig von der  $A\beta$ -Pathologie auftreten (Lowe et al., 2018). Die Verteilungsmuster des Tau-Proteins sind dabei abhängig von der Ätiologie der Erkrankung und somit sehr divers (Lowe et al., 2018).



**Abb. 1:** Darstellung der Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins und der Plaquebildung. Modifiziert nach: Gandy (2005).

### 1.1.3 Ätiologie

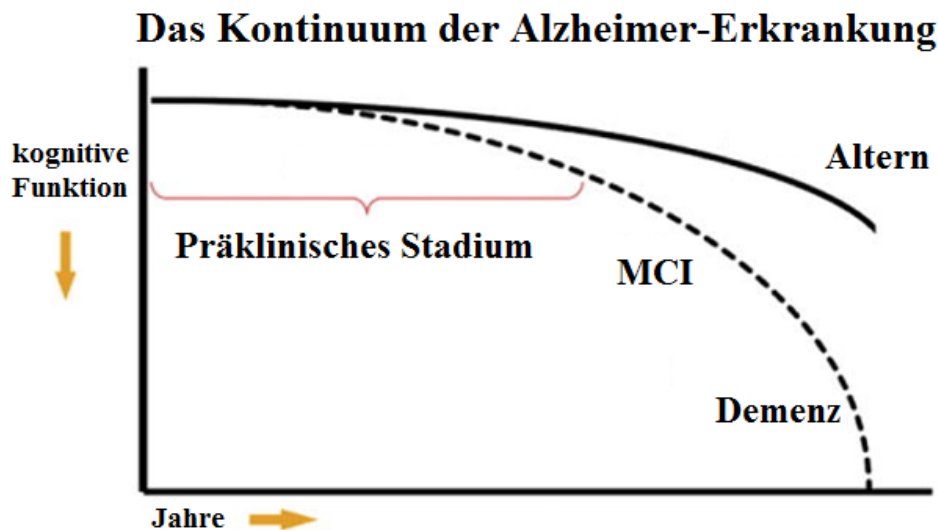
Alzheimer wird ätiologisch in eine sporadische und familiäre Form unterteilt, dabei nimmt die familiäre Form (FAD) weniger als 3% aller AD-Fälle ein (Sassi et al., 2014). Die familiäre Form, unter anderem auch früh einsetzende AD („*early-onset*“ AD, EOAD) genannt, wird durch das Auftreten der Erkrankung vor dem 65. Lebensjahr definiert. Sie ist durch genetische Mutationen gekennzeichnet, die nur zu einem geringen Anteil von ca. 13% aus autosomal-dominanten Varianten der EOAD (ADEOAD) bestehen (Campion et al., 1999). Mit ca. 90% sind diverse autosomal-rezessive Mutationen führend. Bei der autosomal-dominanten Variante hingegen liegen Mutationen des APP oder am häufigsten der in der Prozessierung des APP beteiligten Proteine Presenilin 1 und 2 vor, die u.a. eine verstärkte Aβ-42 Bildung zur Folge haben (Citron et al., 1997; Jonsson et al., 2012). Trotz der monogenetischen Ursachen des EOAD unterscheiden sie sich histopathologisch, bezüglich der Aβ-42 Konzentration, nicht von der sporadischen Form (Scheuner et al., 1996).

Die sporadische, spät einsetzende AD („*late-onset*“ AD, LOAD) ist gekennzeichnet durch einen Beginn nach dem 65. Lebensjahr und im Gegensatz zur familiären Form stehen multifaktorielle Ursachen im Vordergrund (Wingo, 2012). Zu diesen Risikofaktoren gehören unter anderem genetische Faktoren, das Alter und modifizierbare Risikofaktoren, die möglicherweise ein Drittel der AD bedingen, wie Nikotinkonsum, mangelnde körperliche Aktivität, Diabetes mellitus und Adipositas (Norton et al., 2014). Der größte Risikofaktor der sporadischen Form ist jedoch das Apolipoprotein E (APOE)-4-Allel (Coon et al., 2007). Im Gegensatz dazu besitzt das APOE-2-Allel protektive Eigenschaften, wie beispielsweise eine geringere Hippocampus-Atrophierate (Chiang et al., 2010; Strittmatter & Roses, 1995).

#### **1.1.4 Krankheitsverlauf**

Der manifesten Erkrankung gehen ein präklinisches Stadium und eine leichte kognitive Störung voraus. Das präklinische Stadium tritt Jahre bis Jahrzehnte vor der Manifestation der AD auf. Kennzeichnend sind die fehlenden Symptome bei beginnenden pathologischen Veränderungen. Die zugrunde liegende Bildung von Plaques ist dabei ein langsam verlaufender Progress, der Jahrzehnte vor Beginn der Symptome einsetzt (Gordon et al., 2018). Dies geht mit den Veränderungen der Biomarker einher, die ebenfalls Dekaden vor Beginn der AD, auch schon in der Altersklasse von 45-54 Jahren, auf eine A $\beta$ -Pathologie und Tau-Pathologie hindeuten (Sutphen et al., 2015).

Die MCI ist eine Zwischenstufe auf dem Weg zur Manifestation und ist entgegen früheren Annahmen sehr heterogen in der Symptomatik und Ätiologie. Die Beeinträchtigungen der kognitiven Funktion werden entweder vom Erkrankten persönlich wahrgenommen oder durch Beobachtungen festgestellt. Dementsprechend beträgt die Prävalenz nach der ausgeweiteten Definition ca. 18,3% (Petersen et al., 2014).



**Abb. 2:** kontinuierlicher Krankheitsverlauf der Alzheimer-Erkrankung. Modifiziert nach: Lichtenthaler et al. (2011).

## 1.2 Geschlechterunterschiede

Geschlechterunterschiede spielen eine bedeutende Rolle in der Entstehung und Progression der Alzheimer-Erkrankung. Die Ursachen sind multifaktoriell und reichen von pathologischen sowie biologischen Unterschieden bis hin zu sozialen Differenzen, wie etwa in der Bildung und dem Beruf (Mielke et al., 2014).

Zu den pathologischen Differenzen gehören beispielsweise ein global im gesamten Gehirn erhöhtes Vorkommen des hyperphosphorylierten Taus bei Frauen, das zudem stärker mit dem klinischen Erscheinungsbild der Alzheimer-Erkrankung korreliert (Barnes et al., 2005; Oveisgharan et al., 2018). Auch dessen Verteilungsmuster unterscheidet sich im Geschlecht. Während bei Männern der Hypothalamus eher durch die Tau-Pathologie gekennzeichnet war, so war die Tau-Pathologie bei Frauen eher im Nucleus basalis von Meynert präsent (Swaab et al., 2001). Die Differenzen fanden sich nicht nur in humanen Proben, sondern auch im Mausmodell. Nämlich zeigten transgene weibliche Mäuse eine verringerte kognitive Leistung in Verhaltenstests, die vor allem in Stresssituationen zum Tragen kam (Clinton et al., 2007; Fertan et al., 2019). Zudem ließ sich pathophysiologisch eine erhöhte A $\beta$ -Last nachweisen (Schmid et al., 2019).

Verschiedene Faktoren, unter anderem genetische und hormonelle Faktoren, scheinen Einfluss auf die Geschlechterunterschiede einzunehmen, jedoch ist bis dato keine Ursache für diese Unterschiede bekannt.

Der größte genetische Risikofaktor der LOAD APOE-4 erhöht in einer stärkeren Ausprägung beim weiblichen Geschlecht die Progressionswahrscheinlichkeit, an AD zu erkranken, wobei die Ursache möglicherweise auf die Tau-Pathologie zurückzuführen ist (Altmann et al., 2014; Barnes et al., 2005). Hinzu kommt eine verstärkte Atrophie des Hippocampus bei weiblichen APOE-4-Allel-Trägerinnen im Vergleich zur männlichen Gruppe unter noch kognitiv gesunden Probanden (Shen et al., 2019). Das APOE-2-Allel scheint wiederum gegenüber dem männlichen Geschlecht, nicht jedoch gegenüber dem weiblichen Geschlecht eine protektive Wirkung zu haben (Altmann et al., 2014). Zu den hormonellen Einflüssen gehört mit großer Wahrscheinlichkeit Östrogen, das mit dem Alter postmenopausal abnimmt. Nämlich nimmt das Hormon eine schützende Funktion ein, in dem es die mitochondriale Funktion und somit die Neuronen in Stresssituationen unterstützt und die A $\beta$ -induzierte Apoptose im Hippocampus hemmt (Pike, 1999). Auch konnte gezeigt werden, dass bei der Entwicklung des Gehirns Androgene eine bedeutende Rolle spielen. Während bei erhöhten Östrogenkonzentrationen der Hippocampus an Volumen gewann, so vergrößerte sich bei erhöhtem Testosteron die Amygdala (Neufang et al., 2009). Die geschlechtsspezifische Entwicklung des Gehirns ist möglicherweise Ursache für eine früh bestehende Anfälligkeit für die Alzheimer-Erkrankung bei Frauen (Pike, 2017). Über welchen Mechanismus jedoch die Androgene Einfluss auf die Alzheimer-Erkrankung ausüben, ist sehr umstritten und nicht eindeutig belegt. Die vielfältigen Unterschiede im Geschlecht mit Bezug zu Alzheimer sind noch Gegenstand der Forschung und bedürfen vieler weiterer Studien.

### **1.3 KLK8 und die Alzheimer-Krankheit**

Kallikrein 8 (KLK8), auch Neuropsin genannt, ist eine Serin-Protease, die Substrate proteolytisch spaltet, dessen Funktion die Regulation der neuronalen Plastizität über multiple Wege beinhaltet (Konar et al., 2018; Poplawski et al., 2012; Tamura et al., 2012). Zudem ist sie Teil der Kallikrein-Familie, bestehend aus 15 Proteasen.

Zunächst liegt KLK8 in seiner inaktiven Vorstufe in der Extrazellulärmatrix und wird schließlich durch Proteolyse in seine aktive Form überführt. Erst vor kurzem wurde der Zusammenhang zwischen KLK8 und AD nachgewiesen, nämlich zeigten die betroffenen Areale eine erhöhte KLK8-Expression und das schon zu sehr frühen Zeitpunkten (Herring et al., 2016). Zuvor lagen kaum Studien zur Überexpression von KLK8 bei der AD vor, die zudem nur bei vereinzelt Patienten nachgewiesen wurde (Shimizu-Okabe et al., 2001).

Ein wichtiger Signalweg ist u.a. die Prozessierung vom Ephrin Typ-B Rezeptor 2 (EPHB2) durch KLK8. EPHB2 findet sich ebenfalls vor allem im Hippocampus und in der Amygdala (Attwood et al., 2011). Zu seinen physiologischen Funktionen gehören u.a. die Synaptogenese und die Bildung von Axonen (Kayser et al., 2008; Srivastava et al., 2013). In AD-Gehirnen konnte zudem eine verringerte EPHB2-Konzentration im Mausmodell nachgewiesen werden (Herring et al., 2016). Auch wenn keine direkte Beeinflussung der A $\beta$ -Peptide durch KLK8 bekannt ist, so ist Fibronectin, ein Substrat von KLK8, direkt beteiligt, indem es die Bildung von A $\beta$  hemmt (Mönning et al., 1995; Shimizu et al., 1998). Dementsprechend ist die Fibronectinkonzentration in AD-Gehirnen erniedrigt (Muenchhoff et al., 2015). Die Beeinflussung von Fibronectin durch KLK8 ist eine mögliche Begründung für die A $\beta$ -fördernde Wirkung von KLK8 (Herring et al., 2016).

Die Überexpression von KLK8 schon zu sehr frühen Zeitpunkten, noch vor Bildung der A $\beta$ -Plaques, könnte für eine kausale Rolle von KLK8 zur Entstehung der AD sprechen und eignet sich somit zur Untersuchung der Geschlechterunterschiede.

## 1.4 Fragestellungen

Die Doktorarbeit befasst sich mit Geschlechterunterschieden in frühen Krankheitsstadien im TgCRND8-Mausmodell, bei der die in 1.3 beschriebenen, für die Alzheimerpathologie bedeutenden Proteine KLK8 und EPHB2 und die A $\beta$ -Plaque-Belastung betrachtet werden. Dabei gliedert sie sich in das größere Projekt „Higher levels of kallikrein-8 in female brain may increase the risk for Alzheimer's disease“ ein, das die Geschlechter in frühen und späten Stadien auf die KLK8-Expression hin untersucht und sich mit der Frage beschäftigt, ob die Differenzen in der KLK8-Expression eine kausale Rolle in den Geschlechterunterschieden von AD einnehmen (Keyvani et al., 2018). Die Dissertation befasst sich dabei konkret mit den folgenden Fragen:

- Liegt ein Geschlechterunterschied zum Zeitpunkt P90 hinsichtlich der A $\beta$ -Plaque Belastung in den drei Hirnarealen Neokortex, Hippocampus und Basalganglien vor?
- Liegt ein Geschlechterunterschied in der Expression von KLK8 zu den Zeitpunkten P3, P30 oder P90 im Neokortex vor?
- Liegt ein Geschlechterunterschied in der Expression von EPHB2 zu den Zeitpunkten P3, P30 oder P90 im Neokortex vor?

## **2 Material und Methoden**

*Die Zucht, Haltung, Verhaltenstestung, Tötung und Gewebeentnahme (s. Schritt 2.1 und 2.2) sowie die histologische Anfertigung von Gehirnschnitten und ihre anschließende immunhistochemische Färbung (s. Schritt 2.5.1) sind die Basis, aber nicht praktischer Bestandteil der Dissertation. Diese Arbeiten wurden von anderen Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums in Essen durchgeführt. Hingegen wurden die Extraktion von DNA, RNA und Protein (Schritt 2.3), die quantitative Proteinanalyse mittels Fluoreszenz-Elektrophorese und Western Blotting (Schritt 2.4) sowie die morphometrische Quantifizierung der A $\beta$ -Plaques (Schritt 2.5.2) eigenhändig von mir durchgeführt.*

Die praktische Arbeit der Dissertation fand verblindet statt, d.h. bis zur Analyse der Daten war weder der Genotyp noch das Geschlecht der individuellen Versuchstiere dem Experimentator bekannt. Die Proteinquantifizierungen wurden stets in Duplikaten oder (bei mehr als 10% Abweichung) in Triplikaten durchgeführt.

### **2.1 Tierhaltung und Züchtung**

#### **2.1.1 Genotyp der Versuchstiere**

Um pathologische Veränderungen, die der Alzheimer-Erkrankung ähneln, in den Versuchstieren zu erfassen, wurden weibliche und männliche transgene (TG) CRND8-Mäuse (*Center for Research in Neurodegenerative Diseases*) verwendet, die als hemizygote Träger durch eine Überexpression des doppelt-mutierten humanen Amyloid-Vorläuferproteins 695 (hAPP 695, Amyloid precursor protein 695) gekennzeichnet sind. Die Überexpression des Transgens kommt durch die „Swedish“- (KM670/671NL) und „Indiana“-Mutationen (V717F) zustande, die von einem Prion Protein Promotor (PrP) des syrischen Goldhamsters kontrolliert wird. Als Vergleichsgruppe wurden Wildtyp-Mäuse (Wt) des hybriden Hintergrundstamms C57BL/6-C3H/HeJ verwendet.

TgCRND8-Mäuse zeigen verschiedene Alzheimer-ähnliche Pathologien zu einem frühen Zeitpunkt. Bereits nach 3 Monaten (P90) sind die ersten Thioflavin-S



positiven A $\beta$ -Ablagerungen v.a. im frontalen Kortex erkennbar, die mit kognitiven Defiziten einhergehen. Erst im weiteren Verlauf sind Häufungen der Plaques auch in den anderen Hirnregionen erkennbar. Die amyloiden Ablagerungen sind in diesem Modell hirnspezifisch und können nicht in anderen Organen erfasst werden (Chishti et al., 2001). Des Weiteren weisen die mit den Plaques assoziierten Mikroglia im Vergleich zu den weiter entfernt liegenden Mikroglia stark ausgeprägte morphologische Veränderungen auf (Plescher et al., 2018). Auch Hyperphosphorylierungen des Tau-Proteins können v.a. im Neokortex, allerdings erst im Alter von P90, nachgewiesen werden (Bellucci et al., 2007).

### **2.1.2 Zeitpunkte und Haltungsbedingungen**

Sowohl transgene als auch Wildtyp-Mäuse beider Geschlechter wurden unter Standardbedingungen in Käfigen vom Makrolon-Typ III (37,5 cm x 21,5 cm x 15 cm) bis zum dritten postnatalen Tag (P3) oder dem 30. Tag (P30, frühe juvenile Phase) mit den Muttertieren zusammengehalten. Zu den Standardbedingungen zählt eine konstante Raumtemperatur (RT) von  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , eine Luftfeuchtigkeit von  $45\% \pm 10\%$  und ein Licht- und Dunkelrhythmus von 12 h. Weitere Mäuse wurden ab P30 von den Muttertieren abgesetzt und in Dreier- oder Vierergruppen bis zu den vorgesehenen Zeitpunkten P90, P180 und P360 geschlechtergetrennt gehalten. Pro Wurf wurde die gleiche Zahl an männlichen und weiblichen transgenen und wildtypischen Nachkommen auf die verschiedenen Gruppen aufgeteilt, um den Einfluss des parentalen Genotyps auf den Phänotyp der Experimentaltiere zu minimieren. Für die folgenden Untersuchungen dieser Dissertation wurden Tiere des Alters P3, P30 (beide Zeitpunkte vor Ausbruch der A $\beta$ -Pathologie) und P90 (Zeitpunkt des Ausbruchs der A $\beta$ -Pathologie) untersucht.

### **2.1.3 Verhaltensphänotypisierung**

Mäuse im Alter von 12 Monaten wurden im Rahmen einer Verhaltensphänotypisierung zwei unterschiedlichen Verhaltenstests unterzogen. Einerseits erfolgte der Barnes-Maze-Test, in dem das räumliche Lernverhalten der Versuchstiere geprüft wurde (Sunyer et al., 2007). Andererseits wurde der Open-

Field-Test zur Untersuchung der generellen Aktivität und des Angst- und Erkundungsverhaltens der Mäuse angewendet (Kilic et al., 2010).

## **2.2 Gewebeentnahme**

Um das Gehirn auf die spezifischen pathologischen Veränderungen hin zu untersuchen, war eine Sedierung der Mäuse nach Erreichen des entsprechenden Alters durch sequentielle Einleitung einer Sauerstoff-Kohlenstoffdioxid-Mischung notwendig, um sie schließlich mit einer hohen Konzentration von Kohlenstoffdioxiden zu töten. Anschließend wurde nach Dekapitation der Mäuse das Gehirn durch einen Schnitt in Sagittalebene median zwischen den beiden Hemisphären unterteilt. Der rechten Hemisphäre wurden Neokortex, Hippocampus und Basalganglien entnommen und homogenisiert, um daraus die DNA, RNA und Proteine zu extrahieren. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde nur der Neokortex analysiert. Die linke Hemisphäre (exklusive des Frontalpol) wurde mit 4% Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und für die nachfolgende Immunhistochemie in 10µm dicke koronale Schnitte unterteilt. Der linke Frontalpol ( $\pm 4$  bis  $+1,5$ cm Bregma) wurde für die Neuronen-Visualisierung mit einer Golgi-Cox-Lösung (#PK401, FD NeuroTechnologies) imprägniert.

Die Zucht, die Verhaltensphänotypisierung als auch die Gewebeentnahme wurden durch das Landesamt für Natur, Umweltschutz und Verbraucherschutz (LANUV) NRW genehmigt (AZ 84-02.04.2014.A488).

## **2.3 Extraktion von DNA, RNA und Proteinen**

### **2.3.1 Homogenisierung der Proben**

Für die sequenzielle Isolation der DNA, RNA und Proteine wurden die neokortikalen Gewebeproben der rechten Hirnhälfte mit Hilfe des Trizol® Reagenz (#15596018, Invitrogen™) homogenisiert. Das dafür benötigte Schüttelgefäß des Mikrodismembrators S (Sartorius AG) wurde zunächst mit RNAaseZap (RNAaseZap®Solution, #AM9780, Ambion™) gereinigt und in flüssigem Stickstoff gekühlt. Das Trizol® Reagenz (800µl) wurde in das Schüttelgefäß pipettiert und mit

der Gewebeprobe versetzt. Daraufhin wurde die Gewebeprobe unter Zuhilfenahme des Mikrodismembrators S bei 2500 Umdrehungen pro Minute (rpm, *revolutions per minute*) für 2 Minuten (min) homogenisiert. Schließlich wurde die homogenisierte Probe in ein RNase-freies Reaktionsgefäß pipettiert, mit weiteren 800µl des Trizol® Reagenz versetzt und für 5 min auf Eis gelegt.

### 2.3.2 Phasentrennung

Zur Phasentrennung wurde die Probe nach Zugabe von 200µl Chloroform (#X984.1, Roth GmbH) durchmischt und für 2 min bei RT inkubiert. Darauffolgend wurde eine Zentrifugation mit 15.000 rpm für 15 Minuten bei 4°C durchgeführt, bei der sich die drei folgenden Phasen bildeten:

- obere, anorganische Phase (klar): RNA-haltig
- mittlere, organische Phase (trüb): DNA-haltig
- untere, organische Phase (rötlich): Proteinhaltig

### 2.3.3 RNA-Extraktion

Die obere RNA-haltige Phase wurde mit RNase-freien Pipettenspitzen in ein neues Gefäß überführt und nach Durchmischung mit 800µl Isopropanol (#603-117-00-0, Millipore Corporation) für 10 Minuten bei RT inkubiert. Alle Schritte bis zur RNA-Extraktion erfolgten mit RNase-freien Pipettenspitzen und alle Gegenstände wurden mit RNaseZap gereinigt, um einer RNA-Degradation vorzubeugen. Nach Zentrifugation für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C entstand ein RNA-Pellet, das mit 1ml 80% Ethanol (in Diethylpyrocarbonat (DEPC, #AM9906, Ambion™) -H<sub>2</sub>O) gereinigt und ein weiteres Mal für 5 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert wurde. Anschließend folgten eine erneute Reinigung und Zentrifugation. Zuletzt wurde das Pellet getrocknet, in 20µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und für zukünftige Arbeiten bei -80°C aufbewahrt.

### 2.3.4 DNA-Extraktion

Die DNA und Proteine wurden mit 480µl 100% Ethanol (#603-002-00-5, Honeywell) vermischt, für 2 Minuten bei RT inkubiert und für 5 Minuten bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Daraufhin wurde der proteinhaltige Überstand für die Proteinextraktion in neue Reaktionsgefäße überführt, wodurch das verbliebene DNA-Pellet zunächst bei -20°C zwischengelagert und schließlich für zukünftige Arbeiten bei -80°C aufbewahrt werden konnte.

### 2.3.5 Proteinextraktion

Der bei der DNA-Extraktion verbliebene Protein-Überstand wurde nach Zugabe von 2,4ml Isopropanol für 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Als Folge dessen entstand ein Proteinpellet, welches unter Zuhilfenahme einer 0,3M Guanidinhydrochlorid-Lösung (s. Tabelle 1) 3-malig mit je einer anschließenden Inkubation (für 20 min bei RT) und Zentrifugation (für 5 min bei 10.000 rpm und 4°C) gewaschen wurde. Daraufhin wurde das Pellet mit 1,6ml 100% Ethanol gereinigt und erneut zentrifugiert. Zuletzt wurde das Pellet getrocknet, zerkleinert und unter Verwendung von 800µl 1% Natriumdodecylsulfat (1% SDS, *sodiumdodecylsulfate*, #2326.2, Roth GmbH, gelöst in Aqua dest. (Aqua destillata)) bei 40°C und mehrfachem Schallen durch ein Ultraschallgerät gelöst. Die Aufbewahrung der gelösten Proteine erfolgte bei -80°C.

Tabelle 1: Materialien für die Extraktion

| Materialien                          | Zusammensetzung                       | Produkt                  | Firma                |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|----------------------|
| Trizol® Reagenz                      |                                       | #15596018                | Invitrogen™          |
| RNaseZap® Solution                   |                                       | #AM9780                  | Ambion™              |
| Chloroform                           |                                       | #X984.1                  | Roth GmbH            |
| Isopropanol                          |                                       | #109634                  | Merck-Millipore      |
| 80% Ethanol in DEPC-H <sub>2</sub> O | 100% Ethanol<br>DEPC-H <sub>2</sub> O | #603-002-00-5<br>#AM9906 | Honeywell<br>Ambion™ |

|                                     |  |               |           |
|-------------------------------------|--|---------------|-----------|
| 100% Ethanol                        |  | #603-002-00-5 | Honeywell |
| Guanidinhydrochloridlösung (100 ml) | 2,866 g Guanidin-HCL (0,3 M)<br>95 ml 100% Ethanol mit Aqua dest. auf 100 ml | #0035.2       | Roth GmbH |
| 1% Natriumdeodecylsulfat (1% SDS)   |  | #2326.2       | Roth GmbH |

## 2.4 Quantitative Protein-Analyse

Die beiden zu untersuchenden Proteine Kallikrein-8 (KLK8) und Ephrin Typ-B Rezeptor 2 (EPHB2) wurden nach dem Western-Blot-Verfahren im Neokortex zu den verschiedenen Zeitpunkten P3, P30 und P90 quantifiziert. Nach Überprüfung des gleichmäßigen Probenauftrags durch die Fluoreszenz-Gelelektrophorese wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proben auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Blotting), auf der die Proteinbanden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern markiert und ausgewertet wurden (Burnette, 1981; Laemmli, 1970).

### 2.4.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry ist eine kolorimetrische Methode, die der Biuret-Reaktion ähnelt (Lowry et al., 1951). Dabei wird in zwei Schritten ein blauer Farbumschlag erzielt, der mit der Proteinkonzentration korreliert und photometrisch bestimmt werden kann. Im ersten Schritt wird in einer alkalischen Lösung nach Gabe von zweiwertigen Kupfer-Ionen ein Kupfer-Protein-Komplex gebildet, dem im darauffolgenden Schritt ein Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagenz (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz) hinzugegeben wird. Die daraus resultierende Reaktion des Reagenzes mit dem zweiwertigen Kupfer zu  $\text{Cu}^+$  führt in Korrelation zur Proteinmenge zu einer intensiven blauen Verfärbung. Das entstandene Produkt

Molybdänblau kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 750nm bestimmt werden.

Zu Beginn wurde eine Verdünnungsreihe der Proben mit 1% SDS nach folgendem Schema vorbereitet:

- V0: 5µl Probe
- V5: 4µl Probe + 16µl 1% SDS= 20µl
- V10: 2µl Probe + 18µl 1% SDS= 20µl
- V20: 1µl Probe + 19µl 1% SDS= 20µl
- V50: 1µl Probe + 49µl 1% SDS= 50µl
- Eichprobe: 1%SDS Puffer

Die Verdünnungsreihe, die BSA (bovines Serumalbumin, *bovine serum albumin*)-Verdünnungen (#5000007, Protein Standard II, Bio Rad) und die Eichprobe wurden zu je 5µl und im Triplikat auf die Mikrotiterplatte (Nunc<sup>TM</sup>MicroWell<sup>TM</sup> 96-Well Platte, Thermo Fisher Scientific) pipettiert. Anschließend wurde den Proben ein Reagenzprodukt (25µl) aus den Reagenzien A und S und das Reagenz B (200µl) (s. Tabelle 2) hinzugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Die entstandene Blaufärbung ermöglichte unter Verwendung des Multiscan FC Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) eine photometrische Messung der verdünnten Proben bei einer Wellenlänge von 750nm. Die Intensität des blauen Farbumschlages korrelierte dabei mit der Proteinkonzentration.

#### **2.4.2 Probenvorbereitung**

Für die weiteren Untersuchungen war eine einheitliche Proteinmenge in einem vorgegebenen Volumen notwendig. Nach der Lowry-Konzentrationsbestimmung wurden unter Verwendung von 5x SDS Auftragspuffer und zum Auffüllen des Volumens SDS-Lysepuffer (s. Tabelle 2) die Proben so modifiziert, dass jede Probe 20µg Protein pro 25µl Lösung beinhaltete. Außerdem wurde eine gemeinsame dreistufige Verdünnungsreihe V1-V3 aller Proben des gleichen Zeitpunktes mittels 5x SDS-Auftragspuffer und SDS-Lysepuffer analog zum vorherigen Schritt vorbereitet. Die Konzentrationen der Verdünnungsreihe entsprachen dabei:

- V1= 40µg/25µl

- V2= 20µg/25µl
- V3= 10µg/25µl

Im letzten Schritt wurden die Proben samt der Verdünnungsreihe für je 5 min bei 95°C denaturiert, bei 4°C im Kühlschrank gekühlt und schließlich mit 2.000 rpm bei RT zentrifugiert. Bis zur Durchführung der weiteren Untersuchungen wurden die Proben bei -20°C zwischengelagert.

Tabelle 2: In der Lowry-Bestimmung und für die Probenvorbereitung verwendete Lösungen

| Lösungen                        | Zusammensetzung   | Produkt  | Firma  |
|---------------------------------|---|--|--|
| BSA-Protein-standard            |   | #5000007,<br>Protein Assay<br>Standard II                      | BioRad   |
| Reagenz A                       |   | #5000113,<br>Protein Assay<br>Reagent A                        | BioRad   |
| Reagenz B                       |   | #5000114,<br>Protein Assay<br>Reagent B                        | BioRad   |
| Reagenz S                       |   | #5000115,<br>Protein Assay<br>Reagent S                        | BioRad   |
| 5 x SDS-Auftragspuffer (8,2 ml) | 1 ml TRIS (0,5 M)<br>HCL-Zugabe bis pH 6,8<br>0,8 ml Glycerin<br>1,6 ml 10% SDS<br>0,4 ml β-Mercapto-Ethanol<br>0,4 ml Bromphenolblau (1% Stock)<br>4 ml Aqua dest. | #4855.4<br>#4625.1<br>#3908.3<br>#2326.2<br>#4227.3<br>#A512.1 | Roth GmbH<br>Roth GmbH<br>Roth GmbH<br>Roth GmbH<br>Roth GmbH<br>Roth GmbH |
| Standard-Lysepuffer (100 ml)    | 10 ml TRIS (10 mM)<br>HCL-Zugabe bis pH 8.03<br>3 ml NaCl (150 mM)  | #4855.4<br>#4625.1<br>#3957.2                                  | Roth GmbH<br>Roth GmbH<br>Roth GmbH  |

|  |                           |             |               |
|--|---------------------------|-------------|---------------|
|  | 2% Igepal                 | #I7771-24ML | Sigma-Aldrich |
|  | 1% Na- Desoxycholat       | #30970-25G  | Corporation   |
|  | 0,2 ml EDTA (1 mM)        | #8043.2     | Sigma-Aldrich |
|  | 1 ml EGTA73 (1 mM)        | #E3889-10G  | Corporation   |
|  | mit Aqua dest. auf 100 ml |             | Roth GmbH     |
|  |                           |             | Sigma-Aldrich |
|  |                           |             | Corporation   |

### 2.4.3 Fluoreszenz-Gelelektrophorese

Die mit Hilfe des TGX (Tris-GlycineeXtended) Stain-Free™FastCast™Acrylamide Kit (BioRad) durchgeführte Fluoreszenz-Gelelektrophorese diente der Validierung des Gesamtproteingehaltes der Proben, welcher zuvor mittels der Proteinbestimmung nach Lowry ermittelt wurde. Im Gegensatz zu den Herstellerangaben wurde eine 1,5x höhere Menge an Tetramethylethyldiamin (TEMED, #161-0800, BioRad) und 10% Ammonium-peroxodisulfat (APS, #9178.1, Roth GmbH) zur schnelleren Polymerisation der Gele verwendet. Diese Prozedur, bei der die jeweilige Probe nach der Elektrophorese sofort auf seine Fluoreszenz hin untersucht wird, erweist sich im Vergleich zur herkömmlichen Normierung durch Housekeeping-Proteine (z.B. GAPDH oder Aktin) als schneller und präziser (Colella et al., 2012; Gürtler et al., 2013).

Die Fluoreszenz-Gele setzten sich aus einem 10% Trenngel (unten) und einem 4% Sammelgel (oben) zusammen. Das Trenngel wurde nach der Herstellung (s. Tabelle 3) in eine Spalte zwischen zwei vertikal fixierten, abgedichteten Glasplatten (Mini Protean®Spacer Plates with 1.0 mm Integrated Spacers& Mini Protean® Short Plates, BioRad) unter Vermeidung von Luftblasen gegossen. Für die Herstellung des 10% Trenngels wurden zunächst in einem Becherglas je 3ml der Resolver A und B (TGX Fastcast Acrylamide Kit 10%, #161-0173, BioRad) hinein pipettiert und anschließend 10% APS und TEMED unter fortlaufender Mischung durch einen vom Magnetrührer angetriebenen Rührfisch hinzuaddiert.

Unmittelbar darauf wurden zur Herstellung des 4% Sammelgels je 1ml der Stacker A und B (TGX Fastcast Acrylamide Kit 10%, #161-0173, BioRad) in einem



separaten Becherglas angesetzt und ebenfalls unter fortlaufender Mischung mit 10% APS und TEMED ergänzt.

Tabelle 3: Herstellung der Gele mittels des TGX Stain-Free™FastCast™ Acrylamide Kits für die Fluoreszenz-Gelelektrophorese

| <b>10% Trenngel</b> | <b>4% Sammelgel</b> |
|---------------------|---------------------|
| 3 ml Resolver A     | 1 ml Stacker A      |
| 3 ml Resolver B     | 1 ml Stacker B      |
| 45 µl 10% APS       | 15 µl 10% APS       |
| 45 µl TEMED         | 3 µl TEMED          |

Im direkten Anschluss wurde das 4% Sammelgel vorsichtig auf das noch nicht verfestigte Trenngel bis zum oberen Rand der Glasplatten gegossen, ohne dabei Aufwirbelungen, die zu Vermischungen der beiden Gele führen könnten, zu verursachen. Daraufhin wurde ein Kamm aus 10 Zinken vorsichtig in das Sammelgel eingesetzt. Die Gele wurden schließlich auf eine waagerechte Plattform aufgestellt und konnten nach 30-minütiger Polymerisation entweder sofort genutzt werden oder mit Aqua dest. befeuchteten Tüchern umhüllt, in einer Tüte eingeschweißt und bei 4°C bis zum darauffolgenden Tag zwischengelagert werden.

Im nächsten Schritt wurde der mit 10 Zinken versehene Kamm vorsichtig herausgezogen, sodass Geltaschen an Stelle der Zinken im Sammelgel zurückblieben. Anschließend wurden die Gele in die Elektrophorese-Kammer eingebaut und mit SDS-Laufpuffer (s. Tabelle 4) aufgefüllt. Die Geltaschen wurden stets im Duplikat und mit je 25µl der Proben und der Verdünnungsreihe V1-V3 beladen. Dabei belegte die Verdünnungsreihe die ersten drei Geltaschen. Alle weiteren Schritte der Elektrophorese entsprachen der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (s. Schritt 2.4.4).

Tabelle 4: In der Fluoreszenz-Gelelektrophorese und der SDS-PAGE verwendete Lösungen

| Lösung             | Zusammensetzung | Produkt | Firma     |
|--------------------|-----------------|---------|-----------|
| 10x SDS-Laufpuffer | 144 g Glycin    | #3908.3 | Roth GmbH |

|                        |   |                               |                                     |
|------------------------|---|-------------------------------|-------------------------------------|
| (1 Liter)              | 39 g TRIS<br>19 g SDS<br>mit Aqua dest. auf 1 Liter                                     | #4855.3<br>#2326.2            | Roth GmbH<br>Roth GmbH              |
| 10% APS                |   | #9178.1                       | Roth GmbH                           |
| TEMED                  |   | #161-0800                     | BioRad                              |
| Acrylamid/Bisacrylamid |   | #3029.1                       | Roth GmbH                           |
| LowerTris (500 ml)     | 90,855 g TRIS (1,5 M)<br>HCL-Zugabe bis pH 8,8<br>0,4% SDS<br>mit Aqua dest. auf 500 ml | #4855.4<br>#4625.1<br>#2326.2 | Roth GmbH<br>Roth GmbH<br>Roth GmbH |
| UpperTris (500 ml)     | 30,28 g TRIS (0,5 M)<br>HCL-Zugabe bis pH 6,8<br>0,4% SDS<br>mit Aqua dest. auf 500 ml  | #4855.4<br>#4625.1<br>#2326.2 | Roth GmbH<br>Roth GmbH<br>Roth GmbH |

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in SDS-Laufpuffer getränkt und blasenfrei auf die Glasplatte der ChemiDoc-Kamera (ChemiDoc XRS+ System, BioRad) gelegt. Anschließend folgte die 5-minütige Aktivierung der Gele mit UV-Strahlen. Für die Generierung der zu analysierenden Bilder der Fluoreszenzgele wurden in Abhängigkeit von der Probe die Iris, Expositionszeit und Anzahl der Aufnahmen mit Hilfe der QuantityOne 1-D Analysis Software (BioRad) eingestellt. Die nun auf den Bildern vorhandenen Proteinbanden konnten schließlich durch die Image Lab 2.0 Software (BioRad) auf die Intensität ihrer Fluoreszenz hin untersucht werden.

#### 2.4.4 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist ein analytisches, elektrophoretisches Verfahren zur Trennung von Proteinen nach deren molekularen Masse in einem elektrisch geladenen Feld, die vom Schweizer Biologen Ulrich Laemmli entwickelt wurde (Laemmli, 1970). Das Detergenz SDS ist ein anionisches Tensid, welches pro Gramm Protein mit einem konstanten Wert von 1,4 Gramm bindet (zwei Aminosäuren pro SDS-Molekül), sodass die gebundenen Proteine eine negative

Ladung aufweisen und somit die Eigenladung der Proteine zu vernachlässigen ist (Pitt-Rivers & Impiombato, 1968). Die negativen Ladungen führen zu einer Abstoßung der einzelnen Proteine, wodurch in Kombination mit einer Denaturierung die Entfaltung der Proteine hervorgerufen wird. Dies bewirkt eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Kettenlänge unter Verwendung eines als Sieb fungierenden Polyacrylamidgels, innerhalb der die kleineren Proteine im Vergleich zu den großen Proteinen mit einer höheren Geschwindigkeit durch die Poren wandern.

#### 2.4.4.1 Gelherstellung

Für die Gelelektrophorese mussten zunächst die Gele, bestehend aus einem Sammelgel (4%) und einem Trenngel (10%), hergestellt werden (s. Tabelle 5). Dafür wurde unter kontinuierlicher Durchmischung das Trenngel vorbereitet und in den Spalt zwischen zwei abgedichteten, durch ein Gestell fixierten Glasplatten gegossen. Daraufhin wurde im Gegensatz zu den Fluoreszenzgele das Trenngel mit wenigen Tropfen Isopropanol (#109634, Merck-Millipore) überzogen, um die Oberfläche blasenfrei zu halten und Sauerstoffradikale abzufangen. Nach 25-minütiger Polymerisation des Trenngels wurde dem Gel mit Hilfe eines Filterpapiers vorsichtig das Isopropanol entzogen. Im nächsten Schritt wurde ebenfalls unter kontinuierlicher Durchmischung das Sammelgel vorbereitet und blasenfrei über das abgehärtete Trenngel bis zum oberen Rand der Glasplatten gegossen. Ein aus 10 Zinken bestehender Kamm wurde vorsichtig zwischen den Glasplatten in das Sammelgel eingelegt. Nach 30-minütiger Polymerisation konnten die Gele entweder sofort für die Gelelektrophorese genutzt werden oder mit Aqua dest. befeuchteten Tüchern umwickelt, in einer Tüte eingeschweißt und bei 4°C bis zum darauffolgenden Tag zwischengelagert werden.

Tabelle 5: Herstellung der Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE

| 10% Trenngel                  | 4% Sammelgel                 |
|-------------------------------|------------------------------|
| 2330µl Acrylamid/Bisacrylamid | 415µl Acrylamid/Bisacrylamid |
| 1750µl Lower-Tris             | 625µl Upper-Tris             |
| 2920µl Aqua dest.             | 1460µl Aqua dest.            |
| 50µl 10% APS                  | 20µl 10% APS                 |
| 5µl TEMED                     | 10µl TEMED                   |

Die diskontinuierliche SDS-PAGE hat die Eigenschaft, dass das Sammelgel im Vergleich zum Trenngel unterschiedliche Porengrößen und einen neutralen pH-Wert aufweist. Das Sammelgel beinhaltet Glycin, das bei einem neutralen pH eine zwitterionische Form einnimmt und die positiven Ladungen im basischen Milieu überwiegend verliert. Im Sammelgel werden die Glycinat-Ionen durch ihre positiven Ladungen abgebremst und wandern hinter den Proteinen, auf Grund dessen sie als „trailing ions“ („folgende Ionen“) bezeichnet werden. Die kleinen anionischen Chlorid-Ionen werden hingegen als „leading ions“ („führende Ionen“) bezeichnet, da sie vor den Proteinen wandern. Der pH-Gradient zwischen Sammelgel (neutraler pH) und Trenngel (basischer pH) führt zu einem sog. Stapelungseffekt an der Grenze, da das Glycin aus seiner zwitterionischen Form in eine anionische Form übergeht, die Proteine überholt und selbst zum führenden Ion wird. Dadurch kommt die Verschmälerung der Banden zustande (Davis, 1964).

#### **2.4.5 Elektrophorese**

Zuerst wurden vorsichtig die Käbme entfernt, ohne Schäden an den Geltaschen zu verursachen. Je nach Anzahl wurde bei zwei Gelen eine Phoresekammer mit langen Elektroden verwendet oder bei 4 Gelen eine zusätzliche Phoresekammer mit kurzen Kontakten hinzugeschaltet. Anschließend wurden die Phoresekammern mit SDS-Laufpuffer (s. Tabelle 4) bis zum Anschlag und die Tanks, in denen sich die Phoresekammern befanden, bis zum Eichstrich gefüllt.

Die Geltaschen wurden unter Zuhilfenahme einer Hamilton-Pipette stets im Duplikat und nach folgendem Schema bestückt: Zunächst wurden 5µl des Proteinmarkers (*Prestained proteinladder* (11-245 kDa), #P7712S, New England Biolabs), gefolgt von 25µl der Verdünnungsreihe V1 (40µg), V2 (20µg) bis V3 (10µg Protein) und schließlich je 25µl der Proben (20µg Protein) in die Geltaschen pipettiert. Der eingesetzte Marker bestand aus Proteinen mit bekannter Masse, wodurch die Abschätzung der molekularen Masse der zu untersuchenden Proteine ermöglicht wurde.

Nach einer Laufzeit von ca. 70 min bei einer konstanten Spannung von 120V wurde der Laufpuffer verworfen, die Glasplatten getrennt und das Sammelgel vorsichtig in einen dafür vorgesehenen Extraeimer unter einem Abzug entsorgt. Die tatsächliche Laufzeit hing von der Wanderung des anionischen Farbstoffes Bromphenolblau ab, der auf Grund seiner geringen molekularen Masse schneller durch das Trenngel wanderte als die zu untersuchenden Proteine und somit die Laufmittelfront bildete. Die Gelelektrophorese wurde kurz vor dem vollständigen Durchlauf dieses Farbstoffes beendet.

#### **2.4.6 Western-Blot**

Um die im vorherigen Schritt aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Protran Nitrocellulose Membrane Filters, Whatman, Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$ , VWR International GmbH) zu übertragen (Proteintransfer, Blotting), wurde die gängige Western-Blot-Methode nach Burnette (Burnette, 1981) verwendet. Die Übertragung der Proteine verlief dabei elektrophoretisch, d.h. durch Wanderung der Proteine zur Anode in einem angelegten elektrischen Feld.

Zunächst wurden die mit Protein beladenen Gele für 15 min bei RT in Blotpuffer (s. Tabelle 7 im Anhang) inkubiert. In der Zeit wurde die Blotting-Apparatur (2-Gel Tetra and Blotting Module, #1660827edu, BioRad) vorbereitet und die für das Blotting notwendigen Filter, Schwämme und Nitrozellulosemembran in Blotpuffer äquilibriert. Nach dem Einbau der Gele in die Blotting-Apparatur wurde die Blotting-Kammer mit 4°C gekühltem Blotpuffer aufgefüllt und an die Stromquelle angeschlossen. Die negativ geladenen Proteine wanderten für 60 min bei 4°C über ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld mit einer konstanten Stromstärke von 0,25A (2,5mA/cm<sup>2</sup> bei einer 10cm x 10cm Membran) und einer entsprechenden Spannung von 120V in Richtung Anode und wurden dementsprechend auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Dabei bleibt das Trennungsmuster der SDS-PAGE erhalten.

Die nun auf der Nitrozellulosemembran vorhandenen Proteine wurden für 5 min auf einem Kreisschüttler in 1x TRIS/HCl-Sodium-Tween (1x TST) gewaschen und mit

Ponceau S (#P3504-10G/ Sigma- Aldrich Corporation), einem roten Azofarbstoff, reversibel angefärbt, um eine Kontrolle der erfolgreichen Durchführung des Western-Blots zu ermöglichen. Bei einem gelungenen Ergebnis wurden die Proteine unter Verwendung von 1x TST wieder entfärbt.

#### **2.4.7 Immunologische Proteindetektion**

Um die Proteine detektieren zu können, wurden deren Epitope durch spezifische Antikörper gebunden. Die verwendeten Antikörper waren Immunkonjugate, bestehend aus einem primären Antikörper, an dessen Fc-Region ein Sekundärantikörper binden kann, der Träger eines Reporterenzymes ist. Vorteil der Immunkonjugate ist eine Signalverstärkung durch die polyklonalen Eigenschaften des Sekundärantikörpers. Dieser kann an mehreren Epitopen der Fc-Region des Primärantikörpers binden und dort seine Reporterenzyme ansiedeln, sodass eine Signalverstärkung eintritt. Das Reporterenzym Meerrettich-Peroxidase (*horseradishperoxidase*, HRP) oxidiert das hinzugegebene Substrat Luminol (Chemolumineszenz-Reaktion), dessen Chemolumineszenz (elektromagnetische Strahlung) anschließend detektiert werden kann.

Zu Beginn wurde die Membran mit 5% Magermilchpulver (MMP, #70166-500G, Sigma-Aldrich Corporation) in einer TST-Lösung (5% MMP-TST-Lösung, s. Tabelle 6) für 30 Minuten in RT blockiert, um unspezifischen Antikörper-bindungen entgegenzuwirken, sodass anschließend die entsprechenden, in 5% MMP-TST-Lösung verdünnten Primärantikörper in der vorgegebenen Verdünnung (s. Tabelle 7) hinzugegeben und über Nacht (ca. 12 h) bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert werden konnten. Dabei wurde stets ein Mindestvolumen von 4ml pro Membran eingehalten. Nach der Inkubation erfolgte zweimalig eine 10-minütige Reinigung mit TST, um anschließend die Membran erneut mit 5% MMP-TST-Lösung für 45 min (EPHB2) bzw. 60 min (KLK8) zu blockieren. Daraufhin wurden die mit HRP gekoppelten Sekundärantikörper in der vorgegebenen Verdünnung (s. Tabelle 7) der Membran hinzugegeben und für 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran je nach Antikörper 3-malig (EPHB2) bzw. 4-malig (KLK8) mit TST für 10 min unter ständigem Schütteln gereinigt.

Der Membran wurde schließlich die Lösungen des ECL-Kit (Amersham ECL Plus™ WesternBlottingDetectionReagents, #RPN2235, GE Healthcare) hinzugegeben und für eine Minute inkubiert. Um die durch eine vom Reporterenzym HRP katalysierte Oxidation des Luminols freigewordene Lumineszenz zu detektieren, wurde eine CCD-Kamera des ChemiDoc XRS Dokumentationssystems (BioRad) verwendet. Mit Hilfe der QuantityOne 1-D Analysis Software (BioRad) wurden in Abhängigkeit von der Probe die Iris, Expositionszeit und Anzahl der Aufnahmen variiert und die Bilder erstellt, in denen schließlich mit Hilfe der Image Lab 2.0 Software (BioRad) die Signalstärke der freigewordenen Lumineszenz der Banden berechnet wurde. Zur Normierung der errechneten Werte wurden die Ergebnisse der Fluoreszenz-Gele hinzugezogen.

Tabelle 6: Im Westernblot und in der Immundetektion verwendete Lösungen

| Lösung  | Zusammensetzung  | Produkt         | Firma                          |
|---|--|-----------------|--------------------------------|
| Blotpuffer (1 Liter)  | 3,03 g TRIS  | #4855.3         | Roth GmbH                      |
|   | HCl-Zugabe bis pH 8,3  | #3908           | Roth GmbH                      |
|   | 14,4 g Glycin  | #3908.3         | Roth GmbH                      |
|   | 200 ml Methanol<br>mit Aqua dest. auf 1 l                        | #67-56-1        | J. T. Baker                    |
| 10x TST (1 Liter)   | 100 ml TRIS (1 M)  | #4855.4         | Roth GmbH                      |
|   | HCL-Zugabe bis pH 7,6  | #4625.1         | Roth GmbH                      |
|   | 300 ml NaCl (5 M)  | #3957.2         | Roth GmbH                      |
|   | 5 g Tween 20<br>mit Aqua dest. auf 1 l                           | #9127.2         | Roth GmbH                      |
| Ponceau S (100 ml)<br>(Arbeitslösung mit<br>1:10 in Aqua dest.<br>verdünnt) | 0,5 g Ponceau S<br>1 ml Eisessig<br>mit Aqua dest. auf 100<br>ml | #P3504-10G      | Sigma-Aldrich<br>Corporation   |
| 5% MMP-TST-<br>Lösung (500 ml)  | 25 g MMP<br>mit 1x TST auf 500 ml                                | #70166-<br>500G | Sigma-Aldrich<br>Corporation   |
| ECL-Kit   |  | #RPN2235        | GE Healthcare<br>Life sciences |

Tabelle 7: Für die Immundetektion verwendete Antikörper

|             | <b><u>Primärantikörper</u></b>   |                           |
|-------------|----------------------------------|---------------------------|
|             | <b>Anti-KLK8</b>                 | <b>Anti-EPHB2</b>         |
| Bezeichnung | ABIN759116                       | AF467                     |
| Herkunft    | rabbit (Kaninchen)               | goat (Ziege)              |
| Firma       | Antibodies-online                | R&D systems               |
| Verdünnung  | 1:500                            | 1:500                     |
|             | <b><u>Sekundärantikörper</u></b> |                           |
|             | <b>Anti-rabbit-HRP</b>           | <b>Anti-goat-HRP</b>      |
| Produkt     | A2074                            | A9452                     |
| Herkunft    | Anti-rabbit                      | Anti-goat                 |
| Firma       | Sigma-Aldrich Corporation        | Sigma-Aldrich Corporation |
| Verdünnung: | 1:20.000                         | 1:20.000                  |

## 2.5 A $\beta$ -Plaque-Quantifizierung

### 2.5.1 Immunhistochemie

Für die Quantifizierung der A $\beta$ -Plaques in den drei Hirnarealen (Neokortex, Hippocampus und Basalganglien) wurden pro Maus und pro Färbung mit dem TechMate Instrument (DakoCytomation) 10 Schnitte mit je einem Abstand von 100 $\mu$ m voneinander und einer Schnittdicke von je 10 $\mu$ m aus der linken Hemisphäre der Gehirne immunhistochemisch angefärbt.

Hierbei wurden die Schnitte mit dem spezifischen Primärantikörper 6F/3D ( $\beta$ -Amyloid Primär-AK, #M0872, Maus, DAKO Deutschland GmbH, 1:150) und dem dazugehörigen, an einer Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper gegen Maus-Immunglobuline (Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, #K5001, DAKO Deutschland GmbH) inkubiert (s. Tabelle 8). Der an den Bindungsstellen der Primärantikörper entstandene, braune Niederschlag wurde für die Quantifizierung der A $\beta$ -Plaques genutzt (s. Schritt 2.5.2).



**Tabelle 8: In der Immunhistochemie verwendete Lösungen**

| Lösung   | Produkt  | Firma                 |
|--|--|-----------------------|
| 100% Ameisensäure  | #100264  | Merck-Millipore       |
| 3%Wasserstoffperoxid<br>(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | #S2023   | DAKO Deutschland GmbH |
| Blockierungslösung                                       | #POLHRP-100<br>Blocking Solution, Reagent<br>1 | Zytomed-Systems GmbH  |
| Verstärkungsreagenz                                      | #POLHRP-100<br>Post Block, Reagent 2           | Zytomed-Systems GmbH  |
| HRP-Polymer  | #POLHRP-100<br>HRP-Polymer, Reagent 3          | Zytomed-Systems GmbH  |
| DAB  | #K5001   | DAKO Deutschland GmbH |
| Hämatoxylin 1: 25  | #S2020   | DAKO Deutschland GmbH |
| Eindeckmedium auf<br>Xylolbasis                          | #04-0001                                       | R. Langenbrinck GmbH  |

### 2.5.2 Morphometrische Auswertung

Die im Vorfeld immunhistochemisch vorbereiteten Schnitte der linken Hemisphäre wurden quantitativ-stereologisch auf Volumenanteil, Anzahl und Größe der A $\beta$ -Plaques in den drei Hirnarealen Neokortex, Hippocampus und Basalganglien unter einem Lichtmikroskop untersucht.

Mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Nikon Eclipse 80i, Nikon) und einer Farbdigitalkamera (3/4" chip, 36-bit color, DV-20, MicroBright-Field) wurden die Schnitte in Echtzeit auf dem Computer abgebildet und unter Verwendung der Stereo Investigator 11 Software (MicroBright-Field) quantifiziert. Zu Beginn wurden die verschiedenen Hirnareale der jeweiligen Proben markiert, um sie anschließend in 200x Vergrößerung mit einem Zählrahmen (300 $\mu$ m x 300 $\mu$ m) und einem Raster (425 $\mu$ m x 425  $\mu$ m) zu versehen und auf das Plaque-Volumen hin zu untersuchen. Dafür wurde der *AreaFractionFractionator* (AFF) verwendet, dessen Ergebnisse als der mit Plaque bedeckten Fläche in Relation zu der gesamten Fläche des Hirnareals

angegeben wurde. Mit Hilfe des *Fractionator* (F) wurden unter denselben lichtmikroskopischen und stereologischen Bedingungen (Zählrahmen und Raster) die Anzahl der Plaques errechnet, die im Verhältnis zur Arealgröße (mm<sup>2</sup>) aufgeführt wurde. Zudem wurden die Plaques in diffuse und dichte (core) Varianten unterteilt, wobei die dichte Variante morphologisch durch dunklere, scharf begrenzte Plaques im Lichtmikroskop erkennbar war. Die durchschnittliche Plaque-Größe wurde mathematisch berechnet, indem die Gesamtsumme der Plaque-positiven Flächen eines Tieres durch die Gesamtzahl aller Plaques eines Tieres dividiert wurde. Sowohl bei der Berechnung des Plaque-Flächenanteils als auch bei der Bestimmung der Plaque-Anzahl wurden 50% der Hirnareale in zufällig bestimmten Rastern untersucht und so die Plaque-Belastung auf die gesamte Hirnarealfläche hochgerechnet.

### **2.5.3 Statistik**

Für die statistische Auswertung der Daten wurde die Software SPSS 22 (Version 22, IBM Corporation) verwendet. Die Normalverteilung der Daten erfolgte durch das Quantil-Quantil-Diagramm (Quantile-Quantile-Plot, Q-Q-Plot) und den Kolmogorov-Smirnov-Test, in denen kontrolliert wird, ob die Wahrscheinlichkeitsverteilungen zweier Proben übereinstimmen. Dabei wurde die Signifikanz der Varianzhomogenität (Homoskedastizität) mit Hilfe des Levene-Tests überprüft. Während für den Vergleich zweier Gruppen untereinander der studentische T-Test oder bei nicht annähernd normaler Verteilung der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet wurde, kam für den Vergleich mehrerer Gruppen eine *Analysis of Variance* (ANOVA) in Betracht. Sowohl Genotyp als auch Geschlecht wurden als Zwischensubjektfaktoren betrachtet. Die Bonferroni-Methode wurde für das Beheben der Alphafehler-Kumulierung verwendet. Als Signifikant wurden Gruppenunterschiede von  $p < 0.05$  (\*) festgelegt. Die Angabe der Daten erfolgte als Mittelwert unter Einbeziehung der Stichprobenfehler (SEM, *standarderrorofthemean*).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss des Geschlechts und Genotyps auf neokortikale KLK8-Proteinlevel in frühen Stadien der Alzheimer-Pathologie

Zu den Zeitpunkten P3 (perinatal), P30 (frühe juvenile Phase) und P90 (Ausbruch der A $\beta$ -Pathologie) wurden die neokortikalen KLK8-Proteinlevel durch das Western-Blot-Verfahren und anschließender Normierung durch die Fluoreszenz-Gelelektrophorese sowohl in weiblichen (♀) und männlichen (♂) transgenen (TG) als auch wildtypischen (WT) Mäusen quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 aufgeführt.

##### 3.1.1 Keine Geschlechts- oder Genotyp-assoziierte Unterschiede im KLK8-Proteinlevel am dritten postnatalen Tag (P3)

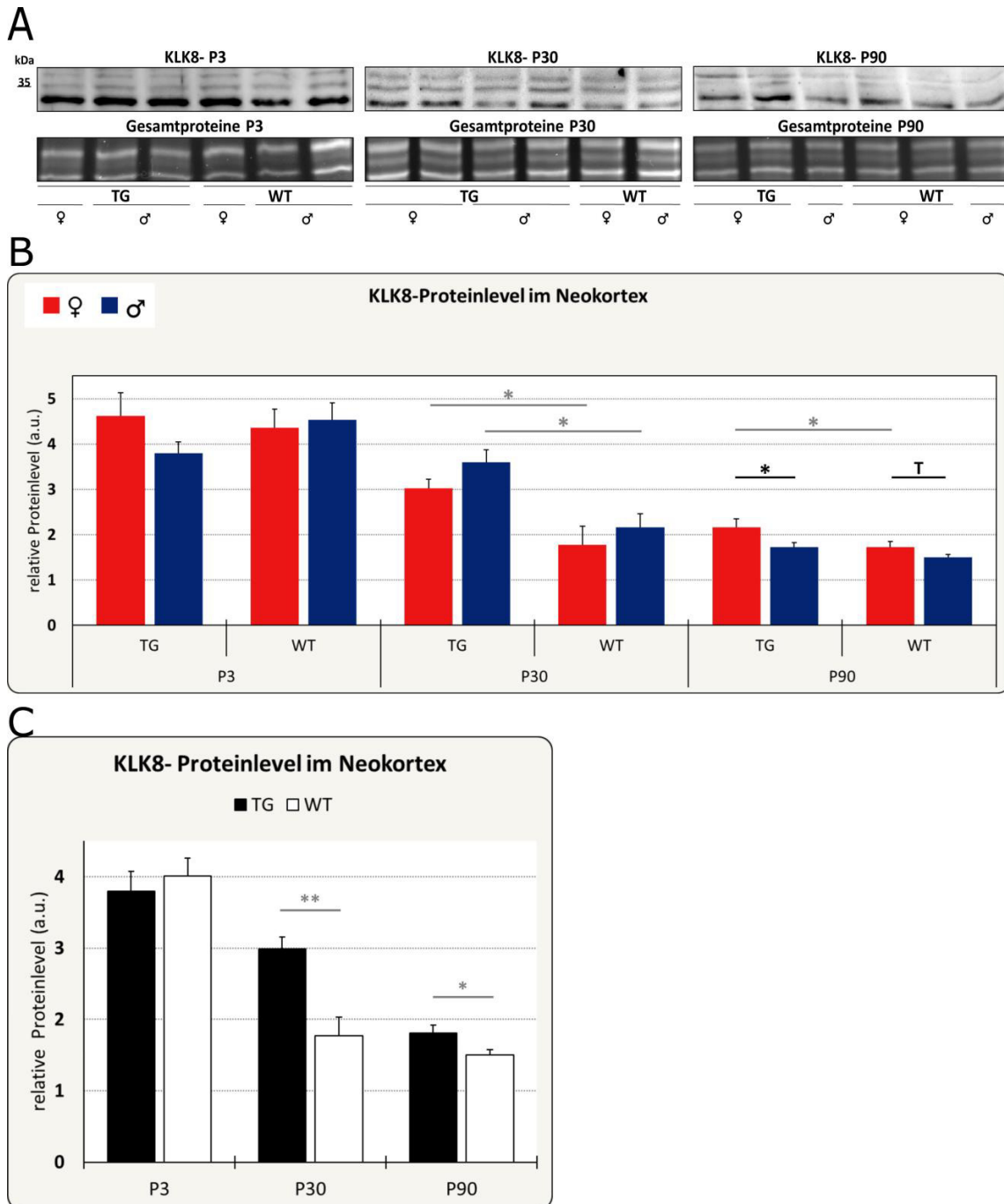
Zum Zeitpunkt P3 waren im Neokortex keine signifikanten Unterschiede in der KLK8-Proteinexpression hinsichtlich der Geschlechter (TG ♀ vs. TG ♂:  $p=0,194$ ; WT ♀ vs. WT ♂:  $p=0,774$ ) und Genotypen (TG vs. WT:  $p=0,465$ ) zu erkennen (Abb. 3A-C).

##### 3.1.2 Erhöhung des KLK8-Proteinlevel bei transgenen Mäusen in der frühen juvenilen Phase (P30) unabhängig vom Geschlecht

Auch in der juvenilen Phase vor Ausbruch der A $\beta$ -Pathologie (P30) konnten keine Geschlechterunterschiede beobachtet werden (TG ♀ vs. TG ♂:  $p=0,168$ ; WT ♀ vs. WT ♂:  $p=0,491$ ). Jedoch zeigten sich beim Vergleich beider Genotypen eine signifikante Erhöhung der KLK8-Proteinlevel in transgenen Tieren (TG vs. WT:  $p=0,001$ , +69%). Die Erhöhung war sowohl unter isolierter Betrachtung des weiblichen als auch des männlichen Geschlechtes erkennbar (TG ♀ vs. WT ♀:  $p=0,011$ ; +71%; TG ♂ vs. WT ♂:  $p=0,012$ , + 66%) (Abb. 3A-C). Gesteigerte KLK8-Proteinlevel in transgenen Gehirnen bereits vor Ausbruch der A $\beta$ -Pathologie bestätigte eine vorangegangene Studie der Arbeitsgruppe (Herring et al., 2016).

### **3.1.3 Erhöhte KLK8-Proteinlevel in transgenen Weibchen im Vergleich zu Männchen zum Zeitpunkt des Ausbruchs der A $\beta$ -Pathologie (P90)**

Zum Zeitpunkt P90 konnte bei weiblichen im Vergleich zu männlichen transgenen Versuchstieren eine geschlechtsspezifische Erhöhung der KLK8-Proteinlevel ermittelt werden (TG ♀ vs. TG ♂:  $p=0,025$ , +25%). Jedoch war beim Vergleich beider Geschlechter in Wildtypen lediglich eine Tendenz zu beobachten (WT ♀ vs. WT ♂:  $p=0,062$ , +15%). Zusätzlich wurde eine Erhöhung der KLK8-Proteinlevel bei transgenen Mäusen gegenüber den Wildtyp-Mäusen erfasst (TG vs. WT:  $p=0,017$ , +20%). Unter genauerer Betrachtung war eine signifikante Erhöhung jedoch nur bei den weiblichen Mäusen zu erkennen (TG ♀ vs. WT ♀:  $p=0,026$ , +25%), während beim männlichen Geschlecht kein relevanter Unterschied eruiert war (TG ♂ vs. WT ♂:  $p=0,238$ ) (Abb. 3A-C).



**Abb. 3: Erhöhte neokortikale KLK8-Proteinlevel in transgenen Weibchen zum Zeitpunkt des Ausbruchs der A $\beta$ -Pathologie.** **A.** Repräsentative Western-Blot-Darstellung des KLK8-Proteins (35kDa) im Neokortex zu den Zeitpunkten P3, P30 und P90. **B.** Neokortikale KLK8-Proteinlevel von transgenen (TG) und Wildtyp (WT)-Mäusen des weiblichen (♀) und männlichen (♂) Geschlechts zum dritten postnatalen Tag (P3), zur frühen juvenilen Phase (P30) und zum Beginn der Alzheimer-ähnlichen Pathologie (P90). **C.** Neokortikale KLK8-Proteinlevel von TG und WT-Mäusen beider Geschlechter gepoolt vom Zeitpunkt P3 bis P90. T = 0,1 > p  $\geq$  0,05; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01 (Zweifaktorielle ANOVA und Bonferroni post-hoc-Test für multiple Gruppenvergleiche (B); Studentischer T-Test und Bonferroni-Korrektur für Vergleiche zweier Gruppen (C)). P3: n=6 je Gruppe; P30: TG ♀: n=8, TG ♂: n=6, WT: n=4 je Geschlecht; P90: n=9 je Gruppe. Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM aufgeführt. a.u. = arbiträre Einheiten (*arbitrary units*). Kennzeichnung der geschlechtsspezifischen Unterschiede durch schwarze Farbe und der Genotyp-spezifischen Unterschiede durch graue Farbe. Modifiziert nach: Keyvani et al. (2018).

### **3.2 Einfluss des Geschlechts und des Genotyps auf neokortikale EPHB2-Proteinlevel in frühen Stadien der Alzheimer-ähnlichen Pathologie**

Die neokortikalen Proteinlevel des KLK8-Substrats EPHB2 wurden ebenfalls in weiblichen (♀) und männlichen (♂), transgenen (TG) und Wildtyp-Mäusen (WT) zu den Zeitpunkten P3, P30 und P90 quantitativ ausgewertet. Die Auswertungen sind in der Abbildung 4 aufgeführt.

#### **3.2.1 Verminderte EPHB2-Proteinlevel in transgenen Mäusen am dritten postnatalen Tag (P3)**

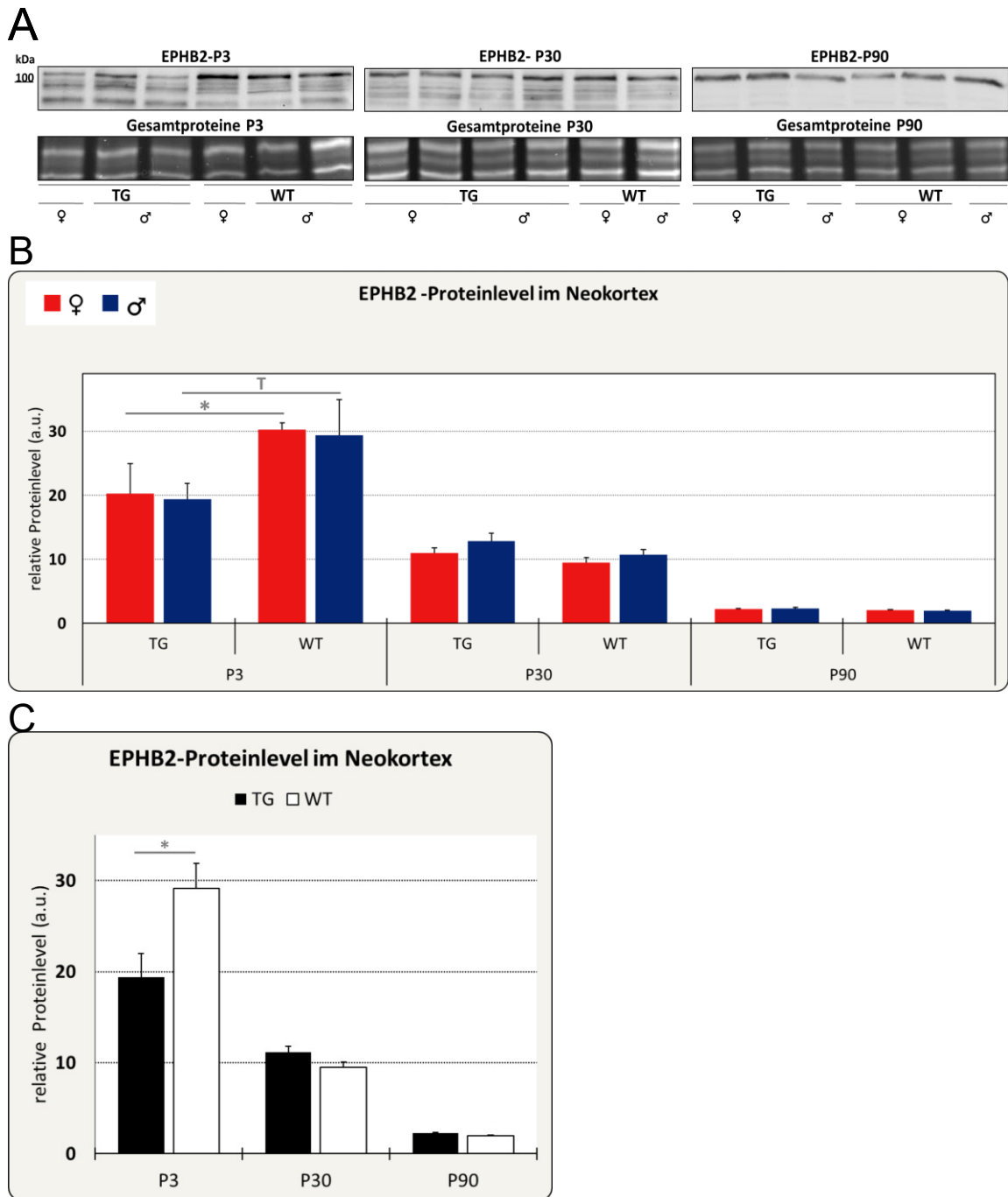
Weibliche Mäuse zeigten im Vergleich zu männlichen Mäusen am dritten postnatalen Tag (P3) keine signifikante Veränderung bezüglich der neokortikalen EPHB2-Expression (TG ♀ vs. TG ♂:  $p=0,44$ ; WT ♀ vs. WT ♂:  $p=0,44$ ). Jedoch konnte bei transgenen Mäusen unabhängig vom Geschlecht eine Verminderung der EPHB2-Proteinlevel gegenüber den Wildtyp-Mäusen ermittelt werden (TG vs. WT:  $p=0,02$ , -34%), wobei sich die Minderung bei den männlichen Versuchstieren nur als Trend äußerte. (TG ♀ vs. WT ♀:  $p=0,04$ , -33%; TG ♂ vs. WT ♂:  $p=0,08$ , -34%) (Abb. 4A-C).

#### **3.2.2 Keine Geschlechts- oder Genotyp-assoziierte Unterschiede im EPHB2-Proteinlevel in der frühen juvenilen Phase (P30)**

In der frühen juvenilen Phase (P30) war zwischen den Geschlechtern weder in transgenen noch in wildtypischen Mäusen signifikante Unterschiede bezüglich der neokortikalen EPHB2-Proteinlevel feststellbar (TG ♀ vs. TG ♂:  $p=0,23$ ; WT ♀ vs. WT ♂:  $p=0,404$ ). Ebenso beeinflusste der Genotyp die EPHB2-Expression zu diesem Zeitpunkt nicht (TG vs. WT:  $p=0,142$ ), auch nicht bei isolierter Betrachtung des jeweiligen Geschlechtes (TG ♀ vs. WT ♀:  $p=0,312$ ; TG ♂ vs. WT ♂:  $p=0,25$ ) (Abb. 4A-C).

### **3.2.3 Kein Geschlechts- oder Genotyp-assoziierten Unterschiede im EPHB2-Proteinlevel zum Zeitpunkt des Ausbruchs der A $\beta$ -Pathologie (P90)**

Zum Zeitpunkt P90 waren weder Unterschiede der EPHB2-Proteinlevel zwischen den Geschlechtern in transgenen bzw. in Wildtyp-Mäusen festzustellen (TG ♀ vs. TG ♂:  $p=0,524$ ; WT ♀ vs. WT ♂:  $p=0,615$ ), noch konnte eine bedeutende Erhöhung der EPHB2-Proteinlevel in transgenen Tieren beobachtet werden (TG ♀ vs. WT ♀:  $p=0,349$ ; TG ♂ vs. WT ♂:  $p=0,067$ ) (Abb. 4A-C).



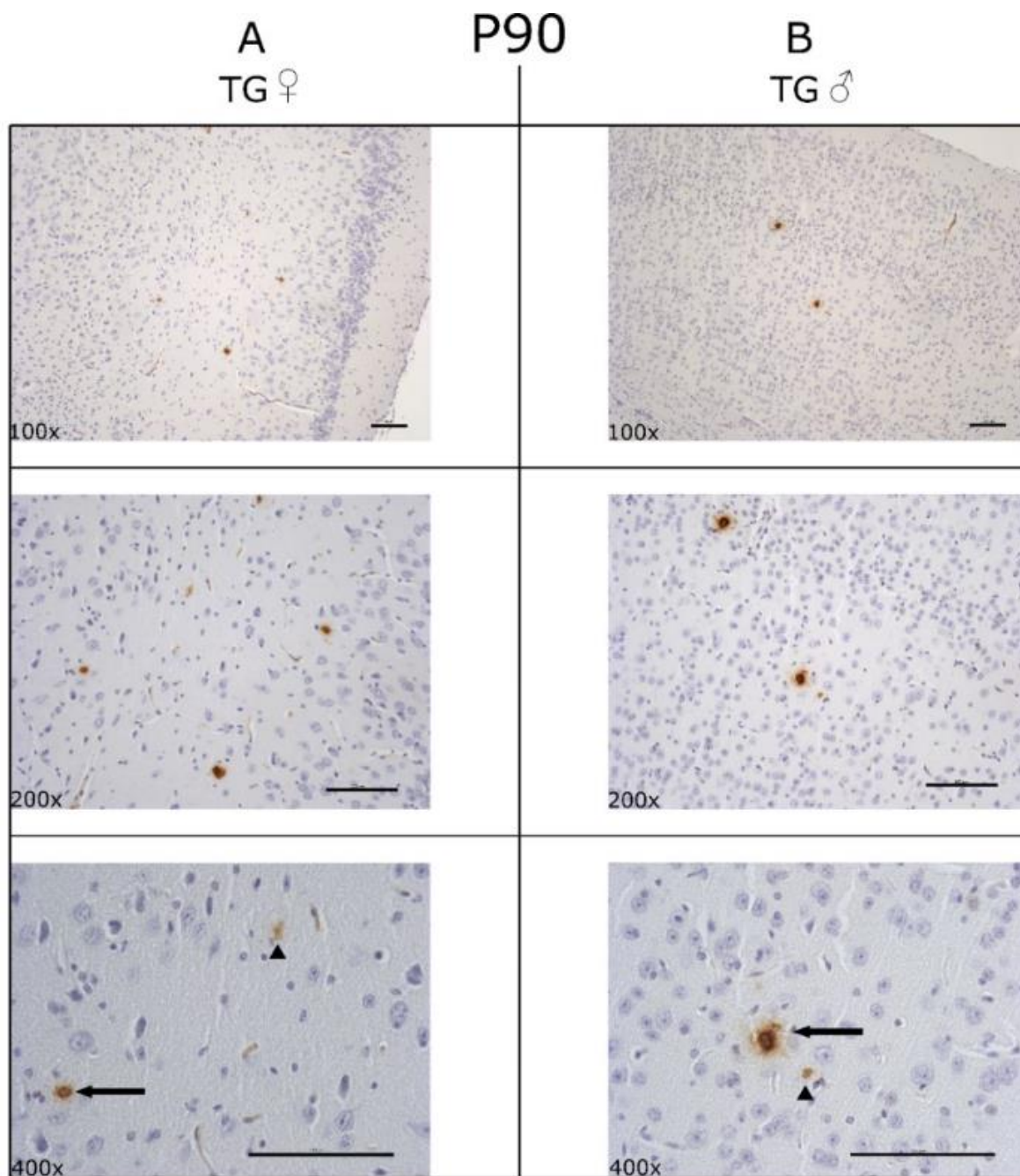
**Abb. 4:** Die neokortikalen EPHB2-Proteinlevel werden bis zum Ausbruch der Alzheimer-ähnlichen Pathologie nicht durch das Geschlecht, aber durch den Genotyp bestimmt. **A.** Repräsentative Western-Blot-Darstellung des EPHB2-Proteins (100kDa) im Neokortex zu den Zeitpunkten P3, P30 und P90. **B.** Neokortikale EPHB2-Proteinlevel von transgenen (TG) und Wildtyp (WT)-Mäusen des weiblichen (♀) und männlichen (♂) Geschlechts zum dritten postnatalen Tag (P3), zur frühen juvenilen Phase (P30) und zum Ausbruch der A $\beta$ -Pathologie (P90). **C.** Neokortikale EPHB2-Proteinlevel von TG und WT-Mäusen beider Geschlechter gepoolt vom Zeitpunkt P3 bis P90. T = 0,1 > p  $\geq$  0,05; \* = p < 0,05 (Zweifaktorielle ANOVA und Bonferroni post-hoc-Test für multiple Gruppenvergleiche (**B**); Studentischer T-Test und Bonferroni-Korrektur für Vergleiche zweier Gruppen (**C**)). P3: n=6 je Gruppe; P30: TG ♀: n=8, TG ♂: n=6, WT: n=4 je Geschlecht; P90: n=9 je Gruppe. Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM aufgeführt. a.u. = arbiträre Einheiten (*arbitrary units*). Kennzeichnung der Genotyp-spezifischen Unterschiede durch graue Farbe. Modifiziert nach: Keyvani et al. (2018).



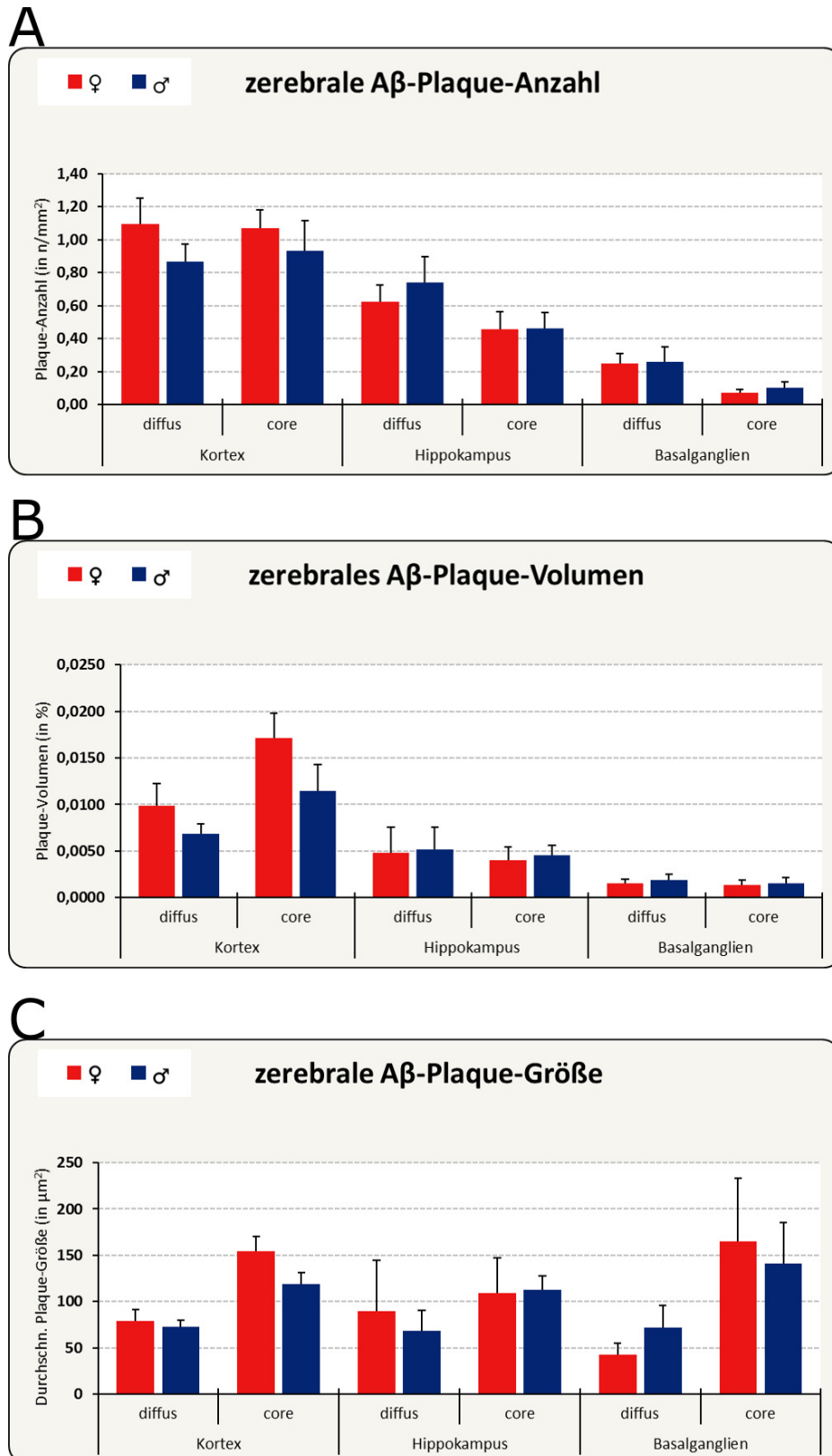
### **3.3 Keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der A $\beta$ -Plaque-Belastung zum Zeitpunkt des Ausbruchs der A $\beta$ -Pathologie (P90)**

Zum Zeitpunkt P90 (Ausbruch der A $\beta$ -Pathologie) wurden in transgenen weiblichen und männlichen Mäusen die diffuse und Kern-A $\beta$ -Plaque-Belastung hinsichtlich der Plaque-Zahl, des Plaque-Volumen und der Plaque-Größe in den drei verschiedenen Hirnarealen Neokortex, Hippocampus und Basalganglien untersucht (Abb. 5, 6).

Im direkten Vergleich beider Geschlechter war sowohl bei Betrachtung der Kern-Plaques, als auch bei Betrachtung der diffusen Plaques keine signifikante Erhöhung der Plaque-Belastung in den drei Hirnregionen Neokortex (core: Plaque-Anzahl:  $p=0,553$ ; Plaque-Volumen:  $p= 0,162$ ; Plaque-Größe:  $p=0,115$ ; diffus: Plaque-Anzahl:  $p=0,291$ ; Plaque-Volumen:  $p=0,352$ , Plaque-Größe:  $p=0,707$ ), Hippocampus (core: Plaque-Anzahl:  $p=0,969$ ; Plaque-Volumen:  $p= 0,779$ ; Plaque-Größe:  $p=0,941$ ; diffus: Plaque-Anzahl:  $p= 0,559$ ; Plaque-Volumen:  $p= 0,930$ ; Plaque-Größe:  $p=0,767$ ) und Basalganglien (core: Plaque- Anzahl:  $p= 0,470$ ; Plaque-Volumen:  $p= 0,949$ ; Plaque-Größe:  $p=0,793$ ; diffus: Plaque-Anzahl:  $p= 0,939$ ; Plaque-Volumen:  $p= 0,602$ ; Plaque-Größe:  $p= 0,318$ ) feststellbar (Abb. 6A-C).



**Abb. 5:** repräsentative Veranschaulichung der A $\beta$ -Plaque-Belastung in transgenen weiblichen und männlichen Mäusen zu Beginn der A $\beta$ -Plaque-Pathologie. Immunhistochemische Färbung der A $\beta$ -Plaques im Neokortex in weiblichen (♀) (A) und männlichen (♂) (B) transgenen (TG) Mäusen zum Zeitpunkt des Ausbruchs der A $\beta$ -Plaque-Pathologie (P90). Maßstabsbalken entspricht 100 $\mu$ m. In absteigender Reihenfolge werden die A $\beta$ -Plaques in 100x (oben), 200x (Mitte) und 400x (unten) Vergrößerung dargestellt. Durch eine Pfeilspitze (▲) sind diffuse Plaques und durch einen Pfeil (◄) core-Plaques gekennzeichnet.



**Abb. 6:** Keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der zerebralen A $\beta$ -Plaque-Belastung zu Beginn der A $\beta$ -Plaque-Pathologie (P90). Stereologische Quantifizierung der Plaque-Anzahl (A), des Plaque-Volumens (B) und der durchschnittlichen Plaque-Größe (C) in den Hirnarealen Neocortex, Hippocampus und Basalganglien. TG ♀: n=9; TG ♂: n=8. Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM aufgeführt. Modifiziert nach: Keyvani et al. (2018).

## 4 Diskussion

### 4.1 KLK8 und geschlechtsspezifische Unterschiede in einem frühen Stadium der AD-Pathologie

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass erhöhte KLK8-Proteinlevel sehr früh, schon während sich die ersten Plaques bilden, vermehrt in Gehirnen der weiblichen Mäuse im Vergleich zu den Männlichen festzustellen waren, und dass obwohl zu dem Zeitpunkt keine geschlechtsspezifischen Veränderungen der Plaque-Belastung und der EPHB2-Proteinlevel zu erkennen war. Auch zeigte sich zum Zeitpunkt P30 eine KLK8-Erhöhung noch vor Beginn der Plaquebildung (P30) in den transgenen Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Zum Zeitpunkt P3 waren hingegen keine Veränderungen der KLK8-Proteinlevel im Geschlecht oder Genotyp erkennbar. Die EPHB2-Proteinlevel in transgenen Mäusen waren ebenfalls reduziert, jedoch erst zu den fortgeschrittenen Zeitpunkten P210 und P360 nach Auftreten der Alzheimer-ähnlichen Pathologie (Herring et al., 2016). Zu den frühen Zeitpunkten P3, P30 und P90 waren hingegen bis auf eine Minderung der EPHB2-Proteinlevel in transgenen Mäusen zum Zeitpunkt P3 keine weiteren Differenzen im Genotyp oder Geschlecht festzustellen.

Ergänzt werden die Untersuchungen dieser Doktorarbeit von Ergebnissen weiterer Subprojekte dieser Studie (Keyvani et al., 2018), in der eine zunehmende KLK8-Erhöhung sowie eine erkennbar verstärkte geschlechtsspezifische A $\beta$ -Plaque-Belastung erst ab dem moderaten Stadium der Erkrankung P180 bei transgenen Weibchen auftrat. Simultan hierzu konnte bei den weiblichen transgenen Mäusen im Vergleich zu den männlichen Tieren eine verringerte Gefäßverzweigungsdichte als Hinweis für eine neurovaskuläre Dysfunktion sowie eine verringerte Dichte der den Plaques nahegelegenen Mikroglia im Rahmen der Neuroinflammation festgestellt werden. Diese Veränderungen nahmen im fortgeschrittenen Stadium zu und wurden zudem von einer verringerten kognitiven Leistung im räumlichen Denken sowie einer verringerten strukturellen Neuroplastizität bei Weibchen begleitet (Keyvani et al., 2018). Die in transgenen Weibchen ausgeprägteren Befunde traten im Gegensatz zu der KLK8-Proteinlevelerhöhung erst drei Monate nach Beginn der Alzheimer-Erkrankung (P180) auf. Zudem wurden humane Proben

sowie nicht an der AD erkrankte Wildtyp-Mäuse auf Unterschiede in den KLK8-Proteinlevel hin untersucht und hierbei war ebenfalls eine Erhöhung der KLK8-Proteinlevel beim weiblichen Geschlecht im fortgeschrittenen Alter erkennbar (Keyvani et al., 2018). Die Ergebnisse deuten auf eine grundsätzliche Vulnerabilität des weiblichen Geschlechtes im fortgeschrittenen Alter für neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer-Erkrankung hin (Keyvani et al., 2018).

Auch fand sich mit dem erstmaligen Befund, dass Östrogen und nicht Dihydrotestosteron die KLK8-Produktion in neuronalen mikroglialen Zelllinien erhöht, eine mögliche Erklärung für die geschlechtsspezifische Erhöhung von KLK8 (Keyvani et al., 2018). Die erhöhte Östrogen-Konzentration von der Pubertät bis hin zur Menopause könnte somit eine mögliche Ursache für die Anfälligkeit der Frauen gegenüber Alzheimer darstellen (Keyvani et al., 2018). Bekräftigt wird diese Annahme durch die oben genannten Ergebnisse unseres Labors, dass auch weibliche, nicht von der AD betroffene Wildtyp-Mäuse sowie weibliche, gesunde Probanden im Vergleich zu Ihren männlichen Counterparts erhöhte KLK8-Level im Hirngewebe aufweisen (Keyvani et al., 2018).

Zuvor konnte schon gezeigt werden, dass KLK8 möglicherweise eine zentrale Rolle in der Pathologie einnimmt, da eine kurzfristige Anti-KLK8-Therapie zur Milderung der oben genannten Pathologien sowohl in transgenen als auch in Wildtyp-Mäusen führte (Herring et al., 2016).

Die frühe geschlechtsspezifische KLK8-Erhöhung in Mäusen und humanen Proben sowie die möglicherweise zentrale Rolle von KLK8 in der Pathologie der AD deutet auf das diagnostische und therapeutische Potential von KLK8 hin, wie in den folgenden Kapiteln 4.2 und 4.3 näher erörtert wird.

### **Hormone und Geschlechtsspezifität in der Alzheimer-Erkrankung:**

Die Idee, dass Östrogen möglicherweise Einfluss auf das Erkrankungsrisiko der AD habe und somit von therapeutischer Relevanz sei, wurde im Rahmen verschiedener Studien, die beispielhaft unten aufgeführt werden, näher untersucht. Die Meinungen hierzu sind vielfältig.

Einerseits konnte beispielsweise retrospektiv bei Frauen > 60J. eine erhöhtes Erkrankungsrisiko für die Alzheimer-Erkrankung bei langjähriger Einnahme von Östrogen nachgewiesen werden (Espeland et al., 2004; Savolainen-Peltonen et al.,

2019). Andererseits finden sich Studien, die protektive Eigenschaften einer möglichen Östrogensubstitution gegenüber dem Auftreten der AD beschreiben (Gleason et al., 2015; Pike et al., 2009). Die unterschiedlichen Schlussfolgerungen könnten zwar Folge verschiedener Einflussfaktoren wie die Dauer der Substitution, dem Patientenalter sowie die Konzentration von Östrogen sein, jedoch sind die Studien bezüglich der protektiven Eigenschaften sehr heterogen und nur bedingt miteinander zu vergleichen (Osmanovic-Barilar & Salkovic-Petrisi, 2016; Zandi et al., 2002).

Betrachtet man hingegen das Androgen Dihydrotestosteron, so ist ein präventiver Einfluss auf die AD denkbar. Einerseits scheint ein erniedrigter Testosteronspiegel mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einherzugehen. Nämlich wurden AD-Patienten retrospektiv auf Testosteron untersucht und wiesen hierbei eine verringerte Konzentration auf (Moffat et al., 2004). Zudem konnte bei Patienten mit Prostata-Karzinomen im Rahmen einer antihormonellen Therapie ein erhöhtes Erkrankungsrisiko nachgewiesen werden (Nead et al., 2017).

Im Umkehrschluss könnten erhöhte Testosteronspiegel mit einem erniedrigten Erkrankungsrisiko einhergehen (Gouras et al., 2000; Rosario et al., 2011). Auch wurden genmanipulierten, Amyloid exprimierenden Zelllinien von Ratten Testosteron zugeführt. Hiernach zeigte sich eine verringerte A $\beta$ -Peptid-Sekretion (Gouras et al., 2000). Zudem waren auch erniedrigte Inflammationsparameter (IL-1 $\beta$ , TNF-alpha und CRP) im Blut nach Substitution von Testosteron festzustellen (Heneka et al., 2015; Kalinchenko et al., 2010).

Die Befunde ließen sich mit der fehlenden Stimulation von KLK8 durch Testosteron sowie einer Mikroglia-vermittelten Reduktion von A $\beta$ -Peptiden schon bei geringen Testosteronkonzentrationen erklären (Keyvani et al., 2018).

Andererseits sind Studien zu einer Substitutionstherapie mit Testosteron in Bezug zur AD bisher nicht durchgeführt worden. Die oben genannten, protektiven Eigenschaften einer möglichen Substitution beziehen sich auf Beobachtungsstudien, sodass zurzeit auf Grund der fehlenden Datenlage keine hormonelle Therapie mit Testosteron erwägt werden kann.

## 4.2 KLK8 und das Potential als Biomarker in der Alzheimer-Diagnostik

Die KLK8-Proteinerhöhung in transgenen Mäusen noch vor Eintritt der ersten Pathologien (P30) deutet auf das Potential von KLK8 hin, als Biomarker in der Alzheimer-Diagnostik zu fungieren. Die bisher etablierten Marker A $\beta$ -42, total-Tau und phosphoryliertes Tau eignen sich zwar zur Diagnostik der AD, jedoch ist die Datenlage vor allem in der frühen Phase zur Unterscheidung der MCI- und AD-Patienten unzureichend (Sutphen et al., 2015). Diese Unterscheidung wäre jedoch für potenzielle Therapien in Zukunft entscheidend (Weller & Budson, 2018). Auch sind für die Bestimmungen der etablierten Marker Liquorpunktionen notwendig. Diese könnten jedoch bei regelmäßiger Durchführung, zum Beispiel im Rahmen von Verlaufskontrollen, Biomarker-Level verfälschen (Li et al., 2012).

Erstmalig wurde in einer kleinen präliminären Studie die Möglichkeit einer Früherkennung entsprechend der bisherigen Biomarker auch durch KLK8 festgestellt. Zudem waren im Gegensatz zu den etablierten Markern erhöhte KLK8-Proteinlevel bei MCI-Patienten im Vergleich zu AD-Patienten zu beobachten, sodass eine Differenzierung zwischen der MCI und der AD mit Hilfe von KLK8 denkbar ist, wenn sich die Daten in weiteren, größer angelegten Studien in Zukunft bestätigen ließen (Teuber-Hanselmann et al., 2019). Auf Grund der frühen geschlechtsspezifischen KLK8-Erhöhung könnte die Früherkennung mittels KLK8 dann für Frauen besonders geeignet sein.

Darüber hinaus waren bei MCI-Patienten Unterschiede in den KLK8-Proteinlevel nicht nur im Liquor, sondern auch im Blutserum zu beobachten (Teuber-Hanselmann et al., 2019). Damit ließen sich möglicherweise Früherkennungen weniger invasiv und somit klinisch tauglicher gestalten.

Die Studie präsentiert erste Hinweise, dass KLK8 ein geeigneter Biomarker für Früherkennungen und Verlaufskontrollen der AD sein könne. Dies könne für spätere potenzielle Therapien von wesentlicher Bedeutung sein, da diese Jahrzehnte vor Einsetzen der AD greifen müssten (Weller & Budson, 2018).

### 4.3 Therapieausblick- KLK8 als neuer Angriffspunkt

Zum jetzigen Stand sind keine Krankheit-modifizierenden Therapien zu Alzheimer bekannt. Die bisherigen zugelassenen medikamentösen Therapieoptionen wie Donezepil und Memantin wirken nur symptomatisch (S3-Leitlinie). In der Forschung wurden verschiedene Ansatzpunkte getestet, die jedoch nur auf eine Komponente der Pathologie abzielen. Beispielsweise ergab die Phase III-Studie zu Aducanumab (Antikörper gegen A $\beta$ -Plaques) keine eindeutigen Ergebnisse und weitere Forschung diesbezüglich ist notwendig (Knopman et al., 2021; Schneider, 2020). Zwar wurde das Medikament von der „Food and Drug administration“, der Arzneimittelbehörde in den USA, in einem Schnellverfahren zugelassen, jedoch besteht viel Kontroverse zur Wirkung und zum Zulassungsverfahren des Medikaments (Barenholtz Levy, 2021; Knopman et al., 2021). Zuvor scheiterten schon andere Antikörper gegen A $\beta$ -Bestandteile in frühen klinischen Phasen (Salloway et al., 2014). Auch war die antiinflammatorische Therapie mittels NSAIDs wirkungslos (Heneka et al., 2015).

Tierexperimentelle Daten weisen darauf hin, dass eine kurzfristige Anti-KLK8-Therapie unterschiedliche Komponenten der Alzheimerpathologie inhibieren, sei es die Bildung der A $\beta$ -Plaques oder die Neuroinflammation (Herring et al., 2016). Zur Evaluation einer längerfristigen Inhibition von KLK8 wurden zudem nach genetischem Knockdown von KLK8 im Mausmodell die Folgen untersucht. Hierbei konnte bei transgenen Mäusen ähnlich einer kurzfristigen Inhibition eine signifikante Reduktion der A $\beta$ -Pathologie sowie eine Besserung der Neuroplastizität nachgewiesen werden. Zudem waren bei Wildtyp-Mäusen trotz der möglichen Gefahr einer verringerten KLK8-Expression keine relevanten Nebenwirkungen aufgetreten, das wiederum auf eine für die klinische Anwendung angemessene therapeutische Breite für zukünftige Therapien hinweist (Herring et al., 2021). Im Zusammenhang mit den Ergebnissen, dass pathologische KLK8-Überexpression noch vor allen anderen Pathologien auftritt und eventuell als Frühmarker geeignet ist, kann eine Anti-KLK8-Therapie vielversprechend sein.

Die Therapie der AD wird letztlich multimodal sein und an verschiedenen Komponenten der Pathologie gleichzeitig ansetzen müssen und das zum frühestmöglichen Zeitpunkt bei MCI-Patienten, um zumindest eine Hemmung der Progression der Erkrankung zu erreichen (Weller & Budson, 2018).



#### **4.4 Notwendigkeit einer geschlechterdifferenzierten Forschung**

Trotz der Bedeutung des Geschlechtes bei den Risikofaktoren der AD sowie bei der Prävalenz der MCI und ihrer Progressionsrate zur AD findet das Geschlecht keinen Einfluss auf die derzeitigen Diagnosekriterien der AD. Beispielsweise haben Frauen ein besseres Wortgedächtnis, das für die Diagnose der AD herangezogen wird und zur Folge haben könnte, dass frühe Symptome bei Frauen maskiert werden (Nebel et al., 2018). Die Geschlechterdifferenz lässt sich jedoch nicht ausschließlich auf hormonelle Einflüsse reduzieren, denn auch Differenzen in der Entwicklung und Organisation der Gehirne sind vorhanden (Pike, 2017).

Die Notwendigkeit einer Forschung, die auf Differenzen im Geschlecht achtet, könnte für die Entwicklung von Therapeutika gegen die AD große Fortschritte bedeuten. Zu viele Studien beziehen sich nur auf das männliche Geschlecht, obwohl des häufigeren physiologische Mechanismen durch Forschungen entdeckt wurden, die mit Untersuchungen der Geschlechterdifferenz begannen (McCarthy et al., 2012). Das Geschlecht soll als essenzieller Teil in der AD-Pathologie mehr Aufmerksamkeit in der Forschung finden, das käme auch beiden Geschlechtern zu Gute (Mielke et al., 2018; Nebel et al., 2018; Pike, 2017). KLK8, das Potential als Biomarker und als Target für zukünftige Therapien besitzt, weist Geschlechterdifferenzen auf und untermauert nochmals dieses Argument.

## 5 Zusammenfassung

Die pathologischen Alterationen bei der Alzheimer-Erkrankung beginnen schon weit vor dem Einsetzen der ersten Symptome. Das weibliche Geschlecht gilt als wesentlicher Risikofaktor, dafür zu Grunde liegende Mechanismen sind bis dato jedoch nicht geklärt. In vorangehenden Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Kallikrein-8 (KLK8) möglicherweise eine essenzielle Rolle in der Pathogenese spielt. Daraus stellt sich die Frage, ob KLK8 als möglicherweise maßgebender Faktor die Geschlechtsspezifität in frühen Stadien der Erkrankung bedingt.

Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurden zu den postnatalen Tagen (P) 3, 30 und 90 in Gehirnen von transgenen und Wildtyp-Mäuse die KLK8- und Ephrin Typ-B Rezeptor 2 (EPHB2)-Proteinlevel auf Geschlechterunterschiede und Genotyp der Mäuse hin untersucht und miteinander verglichen. Zudem wurde die  $\beta$ -Amyloid-Plaque-Belastung zum Zeitpunkt des Auftretens erster Plaques in beiden Geschlechtern morphologisch mittels Immunhistochemie quantifiziert.

Zum Zeitpunkt P90 war eine Erhöhung der KLK8-Proteinlevel in transgenen Weibchen im Vergleich zu männlichen transgenen Mäusen erkennbar. Jedoch war eine unabhängig vom Geschlecht beobachtete KLK8-Proteinlevelerhöhung bei transgenen Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen bereits ab dem Zeitpunkt P30 festzustellen. Hingegen traten bei Gegenüberstellung der weiblichen und männlichen Wildtyp-Mäuse keine Unterschiede auf. Zum Zeitpunkt P3 waren zudem eine Minderung der EPHB2-Proteinlevel in transgenen Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen zu beobachten. Ansonsten waren keine weiteren Verminderungen der EPHB2-Proteinlevel im Geschlecht sowohl in transgenen als auch in Wildtyp-Mäusen zu den Zeitpunkten P3, P30 und P90 erkennbar. Bei Betrachtung der Plaque-Belastung zum Zeitpunkt P90 in transgenen Tieren waren keine Unterschiede im Geschlecht festzustellen. Ergänzend hierzu waren sowohl in gesunden Wildtyp-Mäusen als auch in humanen Proben eine Erhöhung der KLK8-Proteinlevel im weiblichen Geschlecht zu beobachten.

Die Ergebnisse weisen auf eine bedeutende Rolle von KLK8 in der Pathogenese hin und zeigen, dass eine erhöhte KLK8-Expression im weiblichen Geschlecht ein Risikofaktor für das Auftreten der Alzheimer-Erkrankung ist.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Altmann, A., Tian, L., Henderson, V. W., Greicius, M. D., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, I. (2014): Sex modifies the APOE-related risk of developing Alzheimer disease. *Annals of Neurology* 75, 563-573.
2. Alzheimer's, A. (2013): 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 9, 208-245.
3. Attwood, B. K., Bourgoignon, J.-M., Patel, S., Mucha, M., Schiavon, E., Skrzypiec, A. E., Young, K. W., Shiosaka, S., Korostynski, M., Piechota, M., Przewlocki, R., Pawlak, R. (2011): Neuropsin cleaves EphB2 in the amygdala to control anxiety. *Nature* 473, 372-375.
4. Barenholtz Levy, H. (2021): Accelerated Approval of Aducanumab: Where Do We Stand Now? *Annals of Pharmacotherapy*, 10600280211050405.
5. Barnes, L. L., Wilson, R. S., Bienias, J. L., Schneider, J. A., Evans, D. A., Bennett, D. A. (2005): Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology. *Archives of General Psychiatry* 62, 685-691.
6. Bellucci, A., Rosi, M. C., Grossi, C., Fiorentini, A., Luccarini, I., Casamenti, F. (2007): Abnormal processing of tau in the brain of aged TgCRND8 mice. *Neurobiology of Disease* 27, 328-338.
7. Burnette, W. N. (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* 112, 195-203.
8. Champion, D., Dumanchin, C., Hannequin, D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., Thomas-Anterion, C., Michon, A., Martin, C., Charbonnier, F., Raux, G., Camuzat, A., Penet, C., Mesnage, V., Martinez, M., Clerget-Darpoux, F., Brice, A., Frebourg, T. (1999): Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *American Journal of Human Genetics* 65, 664-670.
9. Chiang, G. C., Insel, P. S., Tosun, D., Schuff, N., Truran-Sacrey, D., Raptentsetsang, S. T., Jack, C. R., Aisen, P. S., Petersen, R. C., Weiner, M. W., Alzheimer's Disease Neuroimaging, I. (2010): Hippocampal atrophy rates

- and CSF biomarkers in elderly APOE2 normal subjects. *Neurology* 75, 1976-1981.
10. 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., 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.
  11. Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George Hyslop, P., Selkoe, D. J. (1997): Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nature Medicine* 3, 67-72.
  12. Clinton, L. K., Billings, L. M., Green, K. N., Caccamo, A., Ngo, J., Oddo, S., McGaugh, J. L., LaFerla, F. M. (2007): Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiology of Disease* 28, 76-82.
  13. Colella, A. D., Chegenii, N., Tea, M. N., Gibbins, I. L., Williams, K. A., Chataway, T. K. (2012): Comparison of Stain-Free gels with traditional immunoblot loading control methodology. *Analytical Biochemistry* 430, 108-110.
  14. Coon, K. D., Myers, A. J., Craig, D. W., Webster, J. A., Pearson, J. V., Lince, D. H., Zismann, V. L., Beach, T. G., Leung, D., Bryden, L., Halperin, R. F., Marlowe, L., Kaleem, M., Walker, D. G., Ravid, R., Heward, C. B., Rogers, J., Papassotiropoulos, A., Reiman, E. M., Hardy, J., Stephan, D. A. (2007): A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *The Journal of Clinical Psychiatry* 68, 613-618.
  15. Davis, B. J. (1964): DISC ELECTROPHORESIS. II. METHOD AND APPLICATION TO HUMAN SERUM PROTEINS. *Annals of the New York Academy of Sciences* 121, 404-427.

16. Espeland, M. A., Rapp, S. R., Shumaker, S. A., Brunner, R., Manson, J. E., Sherwin, B. B., Hsia, J., Margolis, K. L., Hogan, P. E., Wallace, R., Dailey, M., Freeman, R., Hays, J., Women's Health Initiative Memory, S. (2004): Conjugated equine estrogens and global cognitive function in postmenopausal women: Women's Health Initiative Memory Study. *JAMA* 291, 2959-2968.
17. Fertan, E., Wong, A. A., Vienneau, N. A., Brown, R. E. (2019): Age and sex differences in motivation and spatial working memory in 3xTg-AD mice in the Hebb-Williams maze. *Behavioural Brain Research* 370, 111937.
18. Gandy, S. (2005): The role of cerebral amyloid  $\beta$  accumulation in common forms of Alzheimer disease. *Journal of Clinical Investigation* 115, 1121-1129.
19. Gleason, C. E., Dowling, N. M., Wharton, W., Manson, J. E., Miller, V. M., Atwood, C. S., Brinton, E. A., Cedars, M. I., Lobo, R. A., Merriam, G. R., Neal-Perry, G., Santoro, N. F., Taylor, H. S., Black, D. M., Budoff, M. J., Hodis, H. N., Naftolin, F., Harman, S. M., Asthana, S. (2015): Effects of Hormone Therapy on Cognition and Mood in Recently Postmenopausal Women: Findings from the Randomized, Controlled KEEPS-Cognitive and Affective Study. *PLoS medicine* 12, e1001833;-discussion e1001833.
20. Gordon, B. A., Blazey, T. M., Su, Y., Hari-Raj, A., Dincer, A., Flores, S., Christensen, J., McDade, E., Wang, G., Xiong, C., Cairns, N. J., Hassenstab, J., Marcus, D. S., Fagan, A. M., Jack, C. R., Hornbeck, R. C., Paumier, K. L., Ances, B. M., Berman, S. B., Brickman, A. M., Cash, D. M., Chhatwal, J. P., Correia, S., Förster, S., Fox, N. C., Graff-Radford, N. R., la Fougère, C., Levin, J., Masters, C. L., Rossor, M. N., Salloway, S., Saykin, A. J., Schofield, P. R., Thompson, P. M., Weiner, M. M., Holtzman, D. M., Raichle, M. E., Morris, J. C., Bateman, R. J., Benzinger, T. L. S. (2018): Spatial patterns of neuroimaging biomarker change in individuals from families with autosomal dominant Alzheimer's disease: a longitudinal study. *The Lancet. Neurology* 17, 241-250.
21. Gouras, G. K., Xu, H., Gross, R. S., Greenfield, J. P., Hai, B., Wang, R., Greengard, P. (2000): Testosterone reduces neuronal secretion of Alzheimer's beta-amyloid peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1202-1205.

22. Gürtler, A., Kunz, N., Gomolka, M., Hornhardt, S., Friedl, A. A., McDonald, K., Kohn, J. E., Posch, A. (2013): Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Analytical Biochemistry* 433, 105-111.
23. Haass, C., Selkoe, D. J. (2007): Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8, 101-112.
24. Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G. C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M. L., Perry, V. H., Holmes, C., Bazan, N. G., Brooks, D. J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C. A., Breitner, J. C., Cole, G. M., Golenbock, D. T., Kummer, M. P. (2015): Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet. Neurology* 14, 388-405.
25. 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., Jockel, K. H., Munster, Y., Keyvani, K. (2021): Genetic knockdown of Klk8 has sex-specific multi-targeted therapeutic effects on Alzheimer's pathology in mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* 47, 611-624.
26. 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., 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.
27. Irvine, K., Laws, K. R., Gale, T. M., Kondel, T. K. (2012): Greater cognitive deterioration in women than men with Alzheimer's disease: a meta analysis. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 34, 989-998.
28. Jin, M., Shepardson, N., Yang, T., Chen, G., Walsh, D., Selkoe, D. J. (2011): Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 5819-5824.

29. Jonsson, T., Atwal, J. K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P. V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., Hoyte, K., Gustafson, A., Liu, Y., Lu, Y., Bhangale, T., Graham, R. R., Huttenlocher, J., Bjornsdottir, G., Andreassen, O. A., Jönsson, E. G., Palotie, A., Behrens, T. W., Magnusson, O. T., Kong, A., Thorsteinsdottir, U., Watts, R. J., Stefansson, K. (2012): A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488, 96-99.
30. Kalinchenko, S. Y., Tishova, Y. A., Mskhalaya, G. J., Gooren, L. J. G., Giltay, E. J., Saad, F. (2010): Effects of testosterone supplementation on markers of the metabolic syndrome and inflammation in hypogonadal men with the metabolic syndrome: the double-blinded placebo-controlled Moscow study. *Clinical Endocrinology* 73, 602-612.
31. Kayser, M. S., Nolt, M. J., Dalva, M. B. (2008): EphB receptors couple dendritic filopodia motility to synapse formation. *Neuron* 59, 56-69.
32. 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., Herring, A. (2018): Higher levels of kallikrein-8 in female brain may increase the risk for Alzheimer's disease. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 28, 947-964.
33. Kilic, E., ElAli, A., Kilic, U., Guo, Z., Ugur, M., Uslu, U., Bassetti, C. L., Schwab, M. E., 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.
34. Knopman, D. S., Jones, D. T., Greicius, M. D. (2021): Failure to demonstrate efficacy of aducanumab: An analysis of the EMERGE and ENGAGE trials as reported by Biogen, December 2019. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 17, 696-701.
35. Konar, A., Kumar, A., Maloney, B., Lahiri, D. K., 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.
36. Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

37. Lapane, K. L., Gambassi, G., Landi, F., Sgadari, A., Mor, V., Bernabei, R. (2001): Gender differences in predictors of mortality in nursing home residents with AD. *Neurology* 56, 650-654.
38. Lewis, J., Dickson, D. W., Lin, W. L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S. H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., Eckman, C., Hardy, J., Hutton, M., McGowan, E. (2001): Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science (New York, N.Y.)* 293, 1487-1491.
39. Li, J., Llano, D. A., Ellis, T., LeBlond, D., Bhathena, A., Jhee, S. S., Ereshefsky, L., Lenz, R., Waring, J. F. (2012): Effect of human cerebrospinal fluid sampling frequency on amyloid- $\beta$  levels. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 8, 295-303.
40. Lichtenthaler, S. F., Haass, C., Steiner, H. (2011): Regulated intramembrane proteolysis--lessons from amyloid precursor protein processing. *Journal of Neurochemistry* 117, 779-796.
41. Lin, K. A., Choudhury, K. R., Rathakrishnan, B. G., Marks, D. M., Petrella, J. R., Doraiswamy, P. M., Alzheimer's Disease Neuroimaging, I. (2015): Marked gender differences in progression of mild cognitive impairment over 8 years. *Alzheimer's & Dementia (New York, N. Y.)* 1, 103-110.
42. Lowe, V. J., Wiste, H. J., Senjem, M. L., Weigand, S. D., Therneau, T. M., Boeve, B. F., Josephs, K. A., Fang, P., Pandey, M. K., Murray, M. E., Kantarci, K., Jones, D. T., Vemuri, P., Graff-Radford, J., Schwarz, C. G., Machulda, M. M., Mielke, M. M., Roberts, R. O., Knopman, D. S., Petersen, R. C., Jack, C. R. (2018): Widespread brain tau and its association with ageing, Braak stage and Alzheimer's dementia. *Brain: A Journal of Neurology* 141, 271-287.
43. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
44. McCarthy, M. M., Arnold, A. P., Ball, G. F., Blaustein, J. D., De Vries, G. J. (2012): Sex Differences in the Brain: The Not So Inconvenient Truth. *The Journal of Neuroscience* 32, 2241-2247.
45. Mielke, M. M., Ferretti, M. T., Iulita, M. F., Hayden, K., Khachaturian, A. S. (2018): Sex and gender in Alzheimer's disease – Does it matter? *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 14, 1101-1103.



46. Mielke, M. M., Vemuri, P., Rocca, W. A. (2014): Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: assessing sex and gender differences. *Clinical Epidemiology* 6, 37-48.
47. Moffat, S. D., Zonderman, A. B., Metter, E. J., Kawas, C., Blackman, M. R., Harman, S. M., Resnick, S. M. (2004): Free testosterone and risk for Alzheimer disease in older men. *Neurology* 62, 188-193.
48. Mönning, U., Sandbrink, R., Weidemann, A., Banati, R. B., Masters, C. L., Beyreuther, K. (1995): Extracellular matrix influences the biogenesis of amyloid precursor protein in microglial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 7104-7110.
49. Muenchhoff, J., Poljak, A., Song, F., Raftery, M., Brodaty, H., Duncan, M., McEvoy, M., Attia, J., Schofield, P. W., Sachdev, P. S. (2015): Plasma protein profiling of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease across two independent cohorts. *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 43, 1355-1373.
50. Nead, K. T., Gaskin, G., Chester, C., Swisher-McClure, S., Leeper, N. J., Shah, N. H. (2017): Association Between Androgen Deprivation Therapy and Risk of Dementia. *JAMA oncology* 3, 49-55.
51. 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., 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.
52. Neufang, S., Specht, K., Hausmann, M., Güntürkün, O., Herpertz-Dahlmann, B., Fink, G. R., Konrad, K. (2009): Sex differences and the impact of steroid hormones on the developing human brain. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 19, 464-473.
53. Norton, S., Matthews, F. E., Barnes, D. E., Yaffe, K., Brayne, C. (2014): Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *The Lancet. Neurology* 13, 788-794.
54. Osmanovic-Barilar, J., Salkovic-Petrisi, M. (2016): Evaluating the Role of Hormone Therapy in Postmenopausal Women with Alzheimer's Disease. *Drugs & Aging* 33, 787-808.

55. Oveisgharan, S., Arvanitakis, Z., Yu, L., Farfel, J., Schneider, J. A., Bennett, D. A. (2018): Sex differences in Alzheimer's disease and common neuropathologies of aging. *Acta Neuropathologica* 136, 887-900.
56. Petersen, R. C., Caracciolo, B., Brayne, C., Gauthier, S., Jelic, V., Fratiglioni, L. (2014): Mild cognitive impairment: a concept in evolution. *Journal of Internal Medicine* 275, 214-228.
57. Petersen, R. C., Roberts, R. O., Knopman, D. S., Geda, Y. E., Cha, R. H., Pankratz, V. S., Boeve, B. F., Tangalos, E. G., Ivnik, R. J., Rocca, W. A. (2010): Prevalence of mild cognitive impairment is higher in men. The Mayo Clinic Study of Aging. *Neurology* 75, 889-897.
58. Pike, C. J. (1999): Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 72, 1552-1563.
59. Pike, C. J. (2017): Sex and the development of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research* 95, 671-680.
60. Pike, C. J., Carroll, J. C., Rosario, E. R., Barron, A. M. (2009): Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroendocrinology* 30, 239-258.
61. Pitt-Rivers, R., Impiombato, F. S. A. (1968): The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. *Biochemical Journal* 109, 825-830.
62. Plescher, M., Seifert, G., Hansen, J. N., Bedner, P., Steinhäuser, C., Halle, A. (2018): Plaque-dependent morphological and electrophysiological heterogeneity of microglia in an Alzheimer's disease mouse model. *Glia* 66, 1464-1480.
63. Poplawski, G. H. D., Tranziska, A.-K., Leshchyn'ska, I., Meier, I. D., Streichert, T., Sytnyk, V., Schachner, M. (2012): L1CAM increases MAP2 expression via the MAPK pathway to promote neurite outgrowth. *Molecular and Cellular Neurosciences* 50, 169-178.
64. Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., Ferri, C. P. (2013): The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 9, 63-75.e62.

65. Rosario, E. R., Chang, L., Head, E. H., Stanczyk, F. Z., Pike, C. J. (2011): Brain levels of sex steroid hormones in men and women during normal aging and in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 32, 604-613.
66. Salloway, S., Sperling, R., Fox, N. C., Blennow, K., Klunk, W., Raskind, M., Sabbagh, M., Honig, L. S., Porsteinsson, A. P., Ferris, S., Reichert, M., Ketter, N., Nejadnik, B., Guenzler, V., Miloslavsky, M., Wang, D., Lu, Y., Lull, J., Tudor, I. C., Liu, E., Grundman, M., Yuen, E., Black, R., Brashear, H. R., Bapineuzumab, Clinical Trial, I. (2014): Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine* 370, 322-333.
67. Sassi, C., Guerreiro, R., Gibbs, R., Ding, J., Lupton, M. K., Troakes, C., Lunnon, K., Al-Sarraj, S., Brown, K. S., Medway, C., Lord, J., Turton, J., Mann, D., Snowden, J., Neary, D., Harris, J., Bras, J., Consortium, A., Morgan, K., Powell, J. F., Singleton, A., Hardy, J. (2014): Exome sequencing identifies 2 novel presenilin 1 mutations (p.L166V and p.S230R) in British early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 35, 2422.e2413-2416.
68. Savolainen-Peltonen, H., Rahkola-Soisalo, P., Hoti, F., Vattulainen, P., Gissler, M., Ylikorkala, O., Mikkola, T. S. (2019): Use of postmenopausal hormone therapy and risk of Alzheimer's disease in Finland: nationwide case-control study. *BMJ (Clinical research ed.)* 364, l665.
69. Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D., Younkin, S. (1996): Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Medicine* 2, 864-870.
70. Schmid, S., Rammes, G., Blobner, M., Kellermann, K., Bratke, S., Fendl, D., Kaichuan, Z., Schneider, G., Jungwirth, B. (2019): Cognitive decline in Tg2576 mice shows sex-specific differences and correlates with cerebral amyloid-beta. *Behavioural Brain Research* 359, 408-417.
71. Schneider, L. (2020): A resurrection of aducanumab for Alzheimer's disease. *The Lancet. Neurology* 19, 111-112.

72. Selkoe, D. J. (2001): Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews* 81, 741-766.
73. Selkoe, D. J., Hardy, J. (2016): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO molecular medicine* 8, 595-608.
74. Shen, S., Zhou, W., Chen, X., Zhang, J., for Alzheimer's Disease Neuroimaging, I. (2019): Sex differences in the association of APOE  $\epsilon$ 4 genotype with longitudinal hippocampal atrophy in cognitively normal older people. *European Journal of Neurology*
75. Shimizu-Okabe, C., Yousef, G. M., Diamandis, E. P., Yoshida, S., Shiosaka, S., Fahnestock, M. (2001): Expression of the kallikrein gene family in normal and Alzheimer's disease brain. *Neuroreport* 12, 2747-2751.
76. Shimizu, C., Yoshida, S., Shibata, M., Kato, K., Momota, Y., Matsumoto, K., Shiosaka, T., Midorikawa, R., Kamachi, T., Kawabe, A., Shiosaka, S. (1998): Characterization of recombinant and brain neuropsin, a plasticity-related serine protease. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 11189-11196.
77. Srivastava, N., Robichaux, M. A., Chenaux, G., Henkemeyer, M., Cowan, C. W. (2013): EphB2 receptor forward signaling controls cortical growth cone collapse via Nck and Pak. *Molecular and Cellular Neurosciences* 52, 106-116.
78. Strittmatter, W. J., Roses, A. D. (1995): Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 4725-4727.
79. Sunyer, B., Patil, S. S., Hoeger, H., Lubec, G. (2007, 2007). *Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice*.
80. Sutphen, C. L., Jasielc, M. S., Shah, A. R., Macy, E. M., Xiong, C., Vlassenko, A. G., Benzinger, T. L. S., Stoops, E. E. J., Vanderstichele, H. M. J., Brix, B., Darby, H. D., Vandijck, M. L. J., Ladenson, J. H., Morris, J. C., Holtzman, D. M., Fagan, A. M. (2015): Longitudinal Cerebrospinal Fluid Biomarker Changes in Preclinical Alzheimer Disease During Middle Age. *JAMA neurology* 72, 1029-1042.
81. Swaab, D. F., Chung, W. C., Kruijver, F. P., Hofman, M. A., Ishunina, T. A. (2001): Structural and functional sex differences in the human hypothalamus. *Hormones and Behavior* 40, 93-98.

82. Tamura, H., Kawata, M., Hamaguchi, S., Ishikawa, Y., 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.
83. Teuber-Hanselmann, S., Rekowski, J., Vogelgsang, J., Arnim, C. v., Reetz, K., Stang, A., Jöckel, K.-H., Wiltfang, J., Esselmann, H., Otto, M., Tumani, H., Herring, A., Keyvani, K. (2019): CSF and blood Kallikrein-8: a promising early biomarker for Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, jnnp-2019-321073.
84. Viña, J., Lloret, A. (2010): Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 20 Suppl 2, S527-533.
85. Weller, J., Budson, A. (2018): Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research* 7
86. Wingo, T. S. (2012): Autosomal recessive causes likely in early-onset Alzheimer disease. *Archives of Neurology* 69, 59-64.
87. Zandi, P. P., Carlson, M. C., Plassman, B. L., Welsh-Bohmer, K. A., Mayer, L. S., Steffens, D. C., Breitner, J. C. S., Cache County Memory Study, I. (2002): Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study. *JAMA* 288, 2123-2129.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Darstellung der Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins und der Plaquebildung.....   | 10 |
| Abbildung 2: kontinuierlicher Krankheitsverlauf der Alzheimer-Erkrankung. ....  | 12 |
| Abbildung 3: Erhöhte neokortikale KLK8-Proteinlevel in transgenen Weibchen zum Zeitpunkt des Ausbruchs der A $\beta$ -Pathologie.....   | 37 |
| Abbildung 4: Die neokortikalen EPHB2-Proteinlevel werden bis zum Ausbruch der Alzheimer-ähnlichen Pathologie nicht durch das Geschlecht, aber durch den Genotyp bestimmt..... | 40 |
| Abbildung 5: repräsentative Veranschaulichung der A $\beta$ -Plaque-Belastung in transgenen weiblichen und männlichen Mäusen zu Beginn der A $\beta$ -Plaque-Pathologie.....  | 42 |
| Abbildung 6: Keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der zerebralen A $\beta$ -Plaque-Belastung zu Beginn der A $\beta$ -Plaque-Pathologie (P90).....                   | 43 |

### 7.2 Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: Materialien für die Extraktion.....  | 20 |
| Tabelle 2: In der Lowry-Bestimmung und für die Probenvorbereitung verwendete Lösungen.....  | 23 |
| Tabelle 3: Herstellung der Gele mittels des TGX Stain-Free <sup>TM</sup> FastCast <sup>TM</sup> Acrylamide Kits für die Fluoreszenz-Gelelektrophorese ..... | 25 |
| Tabelle 4: In der Fluoreszenz-Gelelektrophorese und der SDS-PAGE verwendete Lösungen.....   | 25 |
| Tabelle 5: Herstellung der Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE.....  | 27 |
| Tabelle 6: Im Westernblot und in der Immundetektion verwendete Lösungen.....  | 31 |
| Tabelle 7: Für die Immundetektion verwendete Antikörper .....   | 32 |
| Tabelle 8: In der Immunhistochemie verwendete Lösungen .....  | 33 |

## 8 Abkürzungsverzeichnis

|            |   |
|------------|---|
| AD         | <i>Alzheimer's disease</i> , Alzheimer-Erkrankung                                 |
| ADEOAD     | autosomal-dominanten Varianten der EOAD   |
| AFF        | <i>AreaFractionFractionator</i>   |
| ANOVA      | <i>Analysis of Variance</i>   |
| Aqua dest. | Aqua destillata   |
| APOE       | Apolipoprotein E  |
| APP        | Amyloid precursor protein, Amyloid-Vorläuferprotein                               |
| APS        | Ammonium-peroxodisulfat   |
| A $\beta$  | Beta-Amyloid  |
| BSA        | <i>bovine serum albumin</i> , bovines Serumalbumin                                |
| CRND       | <i>Center for Research in Neurodegenerative Diseases</i>                          |
| DEPC       | Diethylpyrocarbonat   |
| EOAD       | „ <i>early-onset</i> “ AD, früh einsetzende AD                                    |
| EPHB2      | Ephrin Typ-B Rezeptor 2   |
| F          | <i>Fractionator</i>   |
| hAPP 695   | <i>human Amyloid precursor protein 695</i> , humanes Amyloid-Vorläuferprotein 695 |
| HRP        | <i>Horseradishperoxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase                             |
| KLK8       | Kallikrein 8  |
| LANUV      | Landesamt für Natur, Umweltschutz und Verbraucherschutz                           |
| LOAD       | „ <i>late-onset</i> “ AD, spät einsetzende AD                                     |
| MAP        | <i>microtubuli associated protein</i> , Mikrotubuli-assoziiertes Protein          |
| MCI        | <i>Mild cognitive impairment</i> , leichte kognitive Störung                      |
| MMP        | Magermilchpulver  |
| P          | postnataler Tag   |
| PHF        | paired helical filaments, helikal zusammengesetzte Tau-Proteine                   |
| PrP        | Prion Protein Promotor  |
| rpm        | <i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute                            |
| RT         | Raumtemperatur  |
| SDS        | <i>Sodiumdodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat                                |
| SDS-PAGE   | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese  |

|             |  |
|-------------|--|
| SEM         | <i>Standarderrorofthemean</i> , Stichprobenfehler des Mittelwertes |
| TEMED       | Tetramethylethyldiamin   |
| TG          | transgen   |
| TGX         | Tris-GlycineeXtended   |
| TST         | TRIS/HCl-Sodium-Tween  |
| WT          | Wildtyp  |
| $\beta$ -E2 | beta-Estradiol   |



## 9 *Danksagung*

Zuallererst gilt mein Dank Prof. Dr. Keyvani für die großartige Unterstützung, Geduld und das stetige Engagement verbunden mit fachlicher und menschlicher Kompetenz. Sie haben mir erst die Promotion durch die exzellente Betreuung möglich gemacht.

Auch bedanke ich mich bei Dr. Arne Herring für die großartige Einarbeitung mit der stetigen Bemühung, alle Fragen zu beantworten.

Zudem gilt mein Dank dem gesamten Team in der Neuropathologie für die tolle Arbeitsatmosphäre und die Betreuung während der experimentellen Arbeit.

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie und meiner Frau, die mir stets zur Seite standen und immer für mich da waren.

## *10 Lebenslauf*

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