

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Neuropathologie

**Effekte eines Kallikrein-8-*Knockdowns* auf die mikrogliale Neuroprotektion und
Zytotoxizität in einem transgenen Mausmodell der Alzheimer-Krankheit**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Gerrit Voß

aus Goch

2023

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/81301

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20231212-075916-9

Alle Rechte vorbehalten.

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

Tag der mündlichen Prüfung: 14. November 2023

Anteilig ist diese Arbeit in folgender Veröffentlichung enthalten:

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

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG.....	8
1.1 Epidemiologie der Alzheimer-Krankheit und Bedeutung für die Gesellschaft..	8
1.2 Formen und Ätiologie der Alzheimer-Krankheit.....	8
1.3 Verlauf, Diagnostik und Therapie der Alzheimer-Krankheit	9
1.4 Pathophysiologie und Neuropathologie.....	11
1.4.1 A β -Pathologie	11
1.4.2 Tau-Pathologie.....	12
1.5 Mikroglia	13
1.5.1 Mikroglia und ihre Funktion.....	13
1.5.2 Janusköpfige Funktion der Mikroglia in der Alzheimerkrankheit.....	13
1.6 <i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2</i> (TREM2)	15
1.6.1 TREM2 – Vorkommen und physiologische Funktion.....	15
1.6.2 TREM2 in der Alzheimer-Krankheit.....	15
1.7 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α).....	17
1.7.1 TNF- α – Vorkommen und physiologische Funktion.....	17
1.7.2 TNF- α in der Alzheimer-Krankheit	18
1.8 Kallikrein-8	19
1.8.1 Vorkommen und physiologische Funktion.....	19
1.8.2 Bedeutung in der Alzheimer-Krankheit.....	19
1.8.3 Kallikrein-8 als Biomarker	20

1.8.4	Kallikrein-8 als therapeutisches Zielmolekül	21
2	FRAGESTELLUNGEN.....	23
3	MATERIAL UND METHODEN	24
3.1	Allgemeines	24
3.2	Versuchstiere und Probengewinnung	24
3.2.1	F0 Gründerstämme	24
3.2.2	F1 Zwischengeneration.....	25
3.2.3	F2 Experimentalmausgeneration	25
3.2.4	Tierhaltung.....	26
3.3	Verhaltensphänotypisierung	27
3.4	Gewebeaufbereitung	27
3.4.1	RNA-Isolierung	27
3.4.2	DNA-Isolierung	28
3.4.3	Proteinextraktion.....	28
3.5	Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry	29
3.6	Probenvorbereitung.....	30
3.7	Fluoreszenzgelelektrophorese.....	30
3.8	Western Blotting	31
3.8.1	Probenvorbereitung.....	32
3.8.2	Gelelektrophorese	32
3.8.3	Blotting und Proteindetektion.....	33
3.8.4	ECL-Reaktion und Bildgenerierung	34

3.8.5	Membranstripping und Nachweis von TNF- α	35
3.9	Immunhistochemie.....	35
3.9.1	AIF1-Färbung	36
3.9.2	A β -Färbung.....	37
3.10	Stereologische Quantifizierung der Mikroglia um die A β -Plaques	38
3.11	Statistik.....	38
4	ERGEBNISSE.....	46
4.1	Auswirkungen des <i>mKlk8-Knockdowns</i> auf die mikrogliale Dichte um A β -Plaques.....	46
4.1.1	Der <i>mKlk8-Knockdown</i> führt zu einer signifikanten Erhöhung der Plaque-assoziierten Mikroglia in den Basalganglien	46
4.1.2	Der <i>mKlk8-Knockdown</i> führt zu einer signifikanten Erhöhung der Plaque-assoziierten Mikroglia im Hippokampus	48
4.1.3	Der <i>mKlk8-Knockdown</i> hat keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl der Plaque-assoziierten Mikroglia im Neokortex.....	50
4.2	Der <i>mKlk8-Knockdown</i> erhöht TREM2 im Neokortex transgener Mäuse	52
4.3	Der <i>mKlk8-Knockdown</i> hat keinen Einfluss auf die TNF- α Expression im Neokortex.....	54
5	DISKUSSION	55
5.1	Der <i>mKlk8-Knockdown</i> verbessert die Alzheimer-assoziierte mikrogliale Dysfunktion	55
5.2	Funktion und Zusammenspiel der untersuchten Proteine.....	56
5.3	Einordnung meiner Ergebnisse in den Gesamtkontext der Alzheimer-Krankheit	58

5.4	Mögliche Mechanismen der <i>Knockdown</i> -vermittelten Effekte	60
5.5	Geschlechterspezifische Unterschiede der KLK8-Proteinspiegel in der Alzheimer-Krankheit	61
5.6	Weitere Effekte einer <i>Knockdown</i> -vermittelten <i>mKlk8</i> -Reduktion	62
5.7	Grenzen dieser Arbeit und dieses Mausmodells	64
5.8	Kallikrein-8 als Chance in der Therapie der Alzheimer-Krankheit.....	65
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	68
7	SUMMARY	69
8	LITERATURVERZEICHNIS	70
9	SUPPLEMENTÄRE DATEN	78
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	78
9.2	Tabellenverzeichnis	78
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	79
11	DANKSAGUNG.....	81
12	LEBENS LAUF	82

1 EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie der Alzheimer-Krankheit und Bedeutung für die Gesellschaft

Die Alzheimer-Krankheit (Englisch: *Alzheimer's Disease*, AD) ist die häufigste Form der Demenz und für 60-80% aller Demenzerkrankungen weltweit verantwortlich (2021 Alzheimer's disease facts and figures, 2021). Schätzungen zur Folge gab es 2019 über 50 Millionen Menschen, die an Demenz erkrankt waren. Zudem fällt dabei auf, dass Frauen wesentlich häufiger betroffen sind als Männer (Kisa et al., 2022). Beispielsweise machen Frauen in den USA rund 2/3 der Betroffenen aus (Rajan et al., 2021). Da die Bevölkerung immer älter wird, nimmt auch die Anzahl an Demenzerkrankungen weltweit zu. Es wird davon ausgegangen, dass die Anzahl der Demenz-Erkrankten bis zum Jahr 2050 auf 131 Millionen steigen wird (Kisa et al., 2022). Damit steigen auch die Kosten für die Versorgung der Betroffenen. Schätzungen zur Folge sind die Versorgungskosten dabei im Jahr 2018 zum ersten Mal auf über 1 Billionen USD angestiegen (Wimo et al., 2017). Aufgrund der immer älter werdenden Bevölkerung und der damit verbundenen Zunahme von Erkrankten stellt die AD eine der größten medizinischen Herausforderungen unserer Zeit dar.

1.2 Formen und Ätiologie der Alzheimer-Krankheit

Bei der AD wird eine Unterscheidung anhand des Manifestationszeitpunktes sowie des familiären Auftretens vorgenommen. Tritt die Erkrankung vor dem 65. Lebensjahr auf, spricht man von einer früh-aufretenden AD (*Early-Onset-Alzheimer's-Disease*, EOAD), wenn sie nach dem 65. Lebensjahr auftritt, spricht man von einer spät-aufretenden-AD (*Late-Onset-Alzheimer's-Disease*, LOAD) (Reitz and Mayeux, 2014). Weiterhin wird zwischen familiären, autosomal-dominant vererbten, und sporadisch auftretenden Formen unterschieden. Die autosomal-dominanten Formen der AD zeichnen sich durch Mutationen in den Genen des humanen Amyloid-Vorläuferproteins (*hAPP*) oder in den für die γ -Sekretase codierenden Presenilin-1-Gens (*PSEN1*) und Presenilin-2-Gens (*PSEN2*) aus. Diese Mutationen führen schon früh zu einer Überproduktion von überwiegend längeren Beta-Amyloid-Spezies (A β) (Cacace et al., 2016). Die autosomal-

dominanten Formen zeigen einen schwereren Verlauf und beginnen früher, teilweise schon ab dem 30. Lebensjahr, machen jedoch nur einen sehr geringen Anteil von circa 1% aller Alzheimer-Fälle aus (Bekris et al., 2010). Die sporadische Form der AD tritt vor allem nach dem 65. Lebensjahr (LOAD) auf und ist mit einem Anteil von 95% für die meisten Fälle der AD verantwortlich (Reitz and Mayeux, 2014).

Während man bei autosomal-dominant vererbten AD-Formen spezielle Mutationen gefunden hat, geht man bei der sporadischen Form von einem multifaktoriellen Geschehen aus. Eine besondere Stellung nehmen dabei die kompromittierten *Clearance*-Mechanismen ein. Dabei spielen neben der neurovaskulären Einheit auch die Mikroglia und deren Phagozytosemechanismen eine besonders wichtige Rolle (Sarlus and Heneka, 2017). Zudem hervorzuheben ist das Apolipoprotein E ϵ 4-Allel (APOE), das als häufigster genetischer Risikofaktor für die Entwicklung einer sporadischen AD eine besondere Stellung einnimmt. Ein ϵ 4-Allel erhöht das AD-Risiko um das 3-fache, während homozygote Träger des ϵ 4-Allels ein bis zu 12-fach erhöhtes Risiko aufweisen. Das APOE ϵ 2-Allel scheint hingegen protektiv gegen die Entwicklung der AD zu wirken (Holtzman et al., 2012). Darüber hinaus senken modifizierbare Faktoren wie: ein höherer Bildungsgrad, vermehrte physische und kognitive Aktivität, aber auch eine gesunde Ernährung das Risiko für die Entwicklung der AD (Livingston et al., 2020).

1.3 Verlauf, Diagnostik und Therapie der Alzheimer-Krankheit

Der Verlauf der AD ist progredient. Eine Heilung oder Medikamente, die den Verlauf der AD modifizieren, sind ebenfalls nicht vorhanden. Es ist mittlerweile bekannt, dass die pathologischen Veränderungen im Gehirn schon mehr als 15 Jahre vor dem Einsetzen erster Symptome nachweisbar sind (Villemagne et al., 2013).

Die AD lässt sich in 3 Stadien einteilen, wobei der Progress starke individuelle Unterschiede aufweist. Im präklinischen Stadium der AD bestehen noch keine Symptome. Die pathologischen Veränderungen, wie zum Beispiel die Amyloidablagerung sind mittels spezieller Bildgebung jedoch schon nachweisbar. Das zweite Stadium, die milde kognitive Einschränkung (*mild-cognitive-impairment*, MCI), stellt ein Prodromalstadium der AD dar, bei dem sowohl klinische Symptome als auch Veränderungen der Alzheimer-typischen Biomarker vorliegen. Die klinischen Symptome

sind jedoch noch mild ausgeprägt und führen noch nicht zu Einschränkungen im täglichen Leben. Das dritte Stadium ist die AD selbst, bei der die klinischen Symptome zu Einschränkungen im Alltag führen und zudem typische Veränderungen der Biomarker vorliegen (2021 Alzheimer's disease facts and figures, 2021). Neben den etablierten Biomarkern im Liquor wie dem erniedrigten A β ₄₂ und dem erhöhten Tau (gesamt: T-Tau und phosphoryliert: P-Tau), stehen mittlerweile auch bildgebende Verfahren zur Verfügung. Dabei sprechen der Nachweis eines parietotemporalen Hypometabolismus mittels Fluorodeoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET) oder der Nachweis von Amyloidablagerungen mittels Amyloid-PET für das Vorliegen einer AD (McKhann et al., 2011). Auch wenn die oben genannten Biomarker die Diagnosesicherheit erhöhen können, stellt die neuropathologische Untersuchung post mortem auch heute noch den Goldstandard in der Diagnosesicherung der Alzheimer-Krankheit dar (Jack et al., 2018).

Wie bereits erwähnt sind bis heute noch keine Therapien für die AD vorhanden. Für Aufsehen sorgte der am 7. Juni 2021 von der *Food and Drug Administration* (FDA) in den USA zugelassene umstrittene Antikörper Aducanumab, der sich gegen A β richtet. Aducanumab führt zu einer Reduktion der A β -Plaques und soll somit das Fortschreiten der AD verhindern (Cavazzoni, 2021). Die Zulassung von Aducanumab wird jedoch stark kritisiert, da die Wirksamkeit nicht nachgewiesen werden konnte und sich lediglich in der Gruppe, die die höchste Dosis erhielt, überhaupt Effekte zeigten. In diesen Studien wurde jedoch auch eine erhöhte Anzahl schwerwiegender Nebenwirkungen in Form von Hirnödemen beobachtet, sodass auch hier eine strenge Nutzen-Risiko-Abwägung stattfinden muss (Mullard, 2021).

1.4 Pathophysiologie und Neuropathologie

Das Vorhandensein von A β -Plaques und Neurofibrillären Bündeln (*Neurofibrillary Tangles*, NFTs) aus hyperphosphoryliertem Tau ist pathognomonisch für die AD. Im Folgenden werden diese beiden Hauptmerkmale näher erläutert.

1.4.1 A β -Pathologie

Nach der Amyloid-Hypothese ist das Auftreten von A β -Plaques das entscheidende Ereignis für die Entwicklung der AD (Selkoe and Hardy, 2016). Das A β -Peptid entsteht aus APP, einem Klasse-1-Transmembranprotein. Dieses kann auf zwei Wegen, die miteinander konkurrieren, verarbeitet werden. Bei dem amyloidogenen Verarbeitungsweg wird APP im ersten Schritt von der β -Sekretase, auch *Beta-Site Of Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1* (BACE1) genannt, und anschließend von der γ -Sekretase geschnitten; dadurch entstehen unterschiedlich lange A β -Peptide, von denen A β_{40} (~90%) und A β_{42} (~10%) den Großteil ausmachen (Kent et al., 2020; Zhang et al., 2011). Beim nicht-amyloidogenen Verarbeitungsweg wird APP im ersten Schritt von der α -Sekretase und anschließend von der γ -Sekretase geschnitten. Die Schnittstelle der α -Sekretase liegt dabei innerhalb der Aminosäuresequenz des A β -Peptids, sodass auf diesem Weg kein A β entstehen kann. Das dabei entstehende Endprodukt sAPP α wirkt im Gegensatz zu A β neuroprotektiv und scheint gleichzeitig die Gedächtnisbildung zu verbessern (Habib et al., 2017).

Für die AD entscheidend sind die A β_{42} -Peptide, da diese hydrophober sind und somit ein größeres amyloidogenes Potential aufweisen (Thal et al., 2015). Die sezernierten A β_{42} -Monomere bilden zunächst die stark synaptotoxischen Oligomere und anschließend die typischen unlöslichen A β -Plaques. Dabei wird zwischen diffusen Plaques und dichten, sogenannten *core*-Plaques, unterschieden. Die *core*-Plaques bestehen aus dicht gepacktem A β , sie lassen sich mit Hilfe von Kongorot oder Thioflavin-S anfärben und stellen die klassischen AD-definierenden Plaques dar. Sie zeigen eine starke Umgebungsreaktion mit aktivierten Mikroglia, dystrophen Nervenfortsätzen und Synapsenverlust. Die diffusen Plaques lassen sich hingegen nicht mit Kongorot oder Thioflavin-S anfärben und zeigen zudem keine Umgebungsreaktion mit Mikroglia. (Serrano-Pozo et al., 2011). Es wird davon ausgegangen, dass sich zunächst diffuse

Plaques bilden, die sich im weiteren Verlauf zu dichten *core*-Plaques entwickeln (Röhr et al., 2020). Darüber hinaus entstehen die Plaques nicht gleichzeitig in den verschiedenen Hirnregionen. Sie lassen sich zunächst lediglich im Neokortex nachweisen. Anschließend zeigen sich A β -Plaques im Hippocampus und schließlich auch in den Basalganglien sowie im Kleinhirn (Thal et al., 2002). Die *core*-Plaques scheinen die entscheidende Rolle in der AD zu spielen, da sie von den toxischen A β ₄₂ Oligomeren umgeben sind. Diese führen zum Synapsenverlust, stören die Langzeitpotenzierung und fördern die Langzeitdepression von Synapsen. Die toxischen Oligomere werden zudem für die Entstehung der Tau-Pathologie verantwortlich gemacht (Selkoe and Hardy, 2016).

1.4.2 Tau-Pathologie

Intrazelluläre Aggregate aus hyperphosphoryliertem Tau sind das zweite neuropathologische Hauptmerkmal der AD. Tau gehört zur Gruppe der Mikrotubuli-assoziierten Proteine und befindet sich vor allen in den Axonen der Neuronen (Guo et al., 2017). Im gesunden Organismus bindet Tau an Mikrotubuli, stabilisiert diese dadurch und begünstigt deren Polymerisation (Mandelkow and Mandelkow, 2012). Das Tau-Protein kann zudem noch posttranslational modifiziert werden, wobei die Phosphorylierung, ausgelöst durch A β , an spezifischen Epitopen von besonderer Bedeutung für die AD ist (Selkoe and Hardy, 2016). Durch die Phosphorylierung wird zum einen die Bindung an Mikrotubuli gestört und zum anderen die Aggregation zu Oligomeren und anschließend zu NFTs begünstigt (Guo et al., 2017; Zhang et al., 2021). Die Ausbreitung der NFTs im Gehirn folgt dabei einem bestimmten Muster und wird deshalb auch zur Einteilung der AD in Braak-Stadien verwendet (Braak and Braak, 1991). Wie genau sich Tau im Gehirn ausbreitet ist nicht abschließend geklärt. Tau-Oligomere können zum einen zwischen Neuronen transportiert werden, zum anderen sind auch Mikroglia in der Lage durch Phagozytose und anschließender Bildung Tau-haltiger Exosomen zur Ausbreitung der Tau-Pathologie beizutragen (Asai et al., 2015; Zhang et al., 2021). Die neurotoxischen Effekte der NFTs sind ebenfalls noch Gegenstand aktueller Forschung. Bekannt ist jedoch, dass vor allem phosphoryliertes Tau den axonalen Transport stört, indem es die Mikrotubuli destabilisiert und auch die Bindung von Dynein und Kinesin an Mikrotubuli behindert (Guo et al., 2017).

1.5 Mikroglia

1.5.1 Mikroglia und ihre Funktion

Mikroglia sind die Immunzellen des zentralen Nervensystems und üben vielfältige Funktionen aus. Es wird zwischen verschiedenen Formen von Mikroglia abhängig von deren Aktivierungszustand unterschieden. Ruhende, nicht-aktivierte Mikroglia zeichnen sich durch einen kleinen Zellkörper und feine, stark verzweigte Zellfortsätze aus, mit denen sie ihre Umgebung aktiv überwachen (Kettenmann et al., 2011; Nimmerjahn et al., 2005). Mikroglia sind außerdem in der Lage, dysfunktionale, inaktive Synapsen zu eliminieren und zu phagozytieren, um dadurch wieder Raum für neue synaptische Verbindungen zu schaffen. Weiterhin können sie den Zelltod durch Freisetzung von Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) sowie reaktiver Sauerstoffspezies auslösen (ROS) und die Zellen anschließend durch Phagozytose aufnehmen (Sierra et al., 2010; Wolf et al., 2017). Zusammenfassend sind Mikroglia an der Homöostase im zentralen Nervensystem, aber auch entscheidend am Erhalt der synaptischen Plastizität beteiligt.

1.5.2 Janusköpfige Funktion der Mikroglia in der Alzheimerkrankheit

Mikroglia spielen eine wichtige Rolle in der AD, da sie abhängig vom Milieu und Aktivierungszustand sowohl neuroprotektive als auch zytotoxische Effekte ausüben können. Bei pathologischen Veränderungen im Gehirn und Gewebeschädigungen gehen die ruhenden Mikroglia in einen aktivierten Phänotyp über. Dabei nehmen sie eine amöbenähnliche Form mit dickeren und kürzeren Fortsätzen an. Die aktivierten Mikroglia bewegen sich zudem aktiv zum Ort der Schädigung bzw. Pathologie (Kettenmann et al., 2011). Aufgrund dieser verschiedenen Eigenschaften nehmen aktivierte Mikroglia in der AD eine wichtige Stellung ein. Die dabei lang benutzte dichotome Unterteilung in proinflammatorische (M1) und antiinflammatorische (M2) Mikroglia wird mittlerweile kritisch hinterfragt (Tang and Le, 2016). Vielmehr scheint die Aktivierung von Mikroglia ein komplexer und dynamischer Prozess zu sein, der sich im Verlauf der Erkrankung verändern kann (Sarlus and Heneka, 2017; Wolf et al., 2017). Mikroglia sind in der Lage, A β mittels *Pattern-Recognition-Rezeptoren*, wie beispielsweise *Toll-like-* und *Scavenger-Rezeptoren* zu binden. Die Bindung über diese

Rezeptoren führt zur Aktivierung und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (Sarlus and Heneka, 2017; Xu et al., 2022). Sie sind außerdem in der Lage A β -Plaques durch Freisetzung von Neprilysin oder durch das *Insulin-Degrading-Enzyme* abzubauen (Condello et al., 2015; Wolf et al., 2017). Dazu formieren sich Mikroglia bereits innerhalb der ersten 24 Stunden um neu entstandene Plaques (Meyer-Luehmann et al., 2008). Die mikrogliale Phagozytose bildet dabei gemeinsam mit der neurovaskulären Einheit die Grundlage der A β -*Clearance* (Sarlus and Heneka, 2017). Die sich dabei formierenden Mikroglia bilden mit ihren Fortsätzen zudem eine Barriere um die Plaques und kompaktieren diese dadurch. Sie schützen somit die umliegenden Neuronen vor toxischen A β ₄₂-Oligomeren, die die Plaques umgeben (Condello et al., 2015). Der TREM2-Signalweg spielt bei diesem Prozess eine Schlüsselrolle, indem er die Anzahl Plaque-assoziiierter Mikroglia (PAM) erhöht, deren Überleben verbessert und zudem noch deren Übergang in einen neuroprotektiven, krankheitsassoziierten Subtypen reguliert (Keren-Shaul et al., 2017; Wang et al., 2015). Allerdings sind gerade die neuroprotektiven Funktionen, wie die A β -Phagozytose zum einen durch das Altern und zum anderen durch die von A β ausgelöste chronische Aktivierung der Mikroglia beeinträchtigt (Krabbe et al., 2013; Njie et al., 2012; Sarlus and Heneka, 2017).

Mikroglia können jedoch auch neurotoxische Effekte auf ihre Umgebung ausüben. Gemeinsam mit dem Komplementsystem sind sie an dem durch A β -Oligomere ausgelösten Synapsenverlust zu Beginn der AD beteiligt (Hong et al., 2016). Mikroglia werden durch A β aktiviert und schütten zahlreiche proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α aus (Sarlus and Heneka, 2017). Im Rahmen dieser Aktivierung sind sie in der Lage, die Apoptose in Neuronen durch TNF- α und ROS auszulösen und wirken so direkt zytotoxisch (Wolf et al., 2017). Vor allem bei chronischer Aktivierung der Mikroglia durch A β kommt es zur Aufrechterhaltung dieser inflammatorischen Antwort und somit zur chronischen Neuroinflammation (Sarlus and Heneka, 2017).

Zusammenfassend zeichnen sich Mikroglia durch ihre Fähigkeit aus abhängig vom Milieu neuroprotektiv oder zytotoxisch zu agieren. Das Altern, die chronische Aktivierung und die fortschreitende Alzheimer-Pathologie führen dabei zur mikroglialen Dysfunktion und zum Übergang in einen inflammatorischen und zytotoxischen Phänotyp.

1.6 *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2* (TREM2)

1.6.1 TREM2 – Vorkommen und physiologische Funktion

Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 (TREM2) ist ein Transmembranprotein mit einer extrazellulären Typ-V-Immunglobulin-Komponente und dem intrazellulären Adapterprotein *DNAX Activating Protein of 12 kDa* (DAP12), das sich auf Mikroglia, Osteoklasten und Makrophagen befindet (Ulrich et al., 2017). TREM2 ist in der Lage, verschiedene Apolipoproteine, darunter auch APOE und *Clusterin* zu binden, wobei die Affinität zu lipidierten Formen dieser Proteine deutlich höher ist (Yeh et al., 2016). Die Aktivierung von TREM2 führt über die Phosphorylierung von DAP12 zur Aktivierung zahlreicher intrazellulärer Signalkaskaden (Ulrich et al., 2017). TREM2 spielt somit eine wichtige Rolle für den Metabolismus und die Funktion von Mikroglia. Ein Mangel an TREM2 führt zu gesteigerter Autophagie, Einschränkungen des *mammalian Target of Rapamycin*-Signalwegs (mTOR-Signalwegs) und somit zu Störungen des mikroglialen Energiehaushalts (Ulland et al., 2017). Während heterozygote Mutationen das Risiko für eine LOAD erhöhen, führt der komplette Funktionsverlust von TREM2 oder seinem Adaptermolekül DAP12 zur Nasu-Hakola-Krankheit, die mit der Ausbildung von Knochenzysten und einer EOAD einhergeht (Paloneva et al., 2002).

1.6.2 TREM2 in der Alzheimer-Krankheit

In den letzten Jahren wurden Mutationen von TREM2 entdeckt, die stark mit dem Auftreten der AD assoziiert sind. So weisen heterozygote Träger der TREM2 R47H Variante ein ähnlich hohes Risiko auf an der AD zu erkranken wie heterozygote Träger des APOE ϵ 4-Allels. Allerdings ist die TREM2 Risikovariante wesentlich weniger verbreitet als das APOE ϵ 4 Allel. Beispielsweise tragen nur 0,63% der Isländer ein Allel der TREM2 R47H Variante, während hingegen circa 17,3% Träger eines APOE ϵ 4-Allels sind (Guerreiro et al., 2013; Holtzman et al., 2012; Jonsson et al., 2013).

In Mausmodellen konnte bereits gezeigt werden, dass die TREM2-Expression in Mikroglia bereits zu Beginn der AD zunimmt (Guerreiro et al., 2013). Dabei ist die Expression von TREM2 in Mikroglia um A β -Plaques und vor allem in deren Fortsätzen,

die in direktem Kontakt mit den A β -Plaques stehen, stark erhöht (Yuan et al., 2016). TREM2 spielt in der AD eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Mikroglia und deren Interaktion mit A β -Plaques. Zunächst vermittelt TREM2 den, durch A β ausgelösten, Übergang von ruhenden Mikroglia in einen sogenannten krankheitsassoziierten Subtyp. Dieser Subtyp findet sich beinahe ausschließlich in der Nähe von A β -Plaques und exprimiert wichtige Gene für die Phagozytose und den Lipidmetabolismus (Keren-Shaul et al., 2017). TREM2 bindet A β dabei nicht direkt, sondern Phospholipide und Apolipoproteine wie APOE und *Clusterin*, die mit A β assoziiert sind. Interessanterweise ist die Affinität von TREM2 zu diesen Lipiden bei der R47H-Risikovariante herabgesetzt (Wang et al., 2015; Yeh et al., 2016). Weiterhin reguliert TREM2 die Orientierung der Mikroglia und die Polarisierung ihrer Fortsätze zu den A β -Plaques. Dieser Vorgang ist wichtig für die Komprimierung der Plaques und die Bildung einer mikroglialen Barriere. Ein Mangel von TREM2, aber auch die R47H-Risikovariante führen dabei zur gestörten Proliferation sowie Resilienz und somit zu einer verringerten Anzahl von PAM. Sie führen außerdem zu dysfunktionalen Mikroglia mit dünnen Fortsätzen, fehlender Polarisierung und somit zu einer gestörten Interaktion mit den A β -Plaques. Die von Mikroglia bedeckte Plaqueoberfläche ist dabei verringert, während die Umgebung mehr dystrophe Nervenfortsätze und eine verstärkte Tau-Pathologie aufweist. (Condello et al., 2015; Prokop et al., 2019; Wang et al., 2016; Yuan et al., 2016). Mikroglia im Frontalkortex mit der TREM2 R47H-Risikovariante zeigen zudem Veränderungen intrazellulärer Signalwege zugunsten eines proinflammatorischen Phänotyps verglichen mit AD-Kontrollen ohne TREM2-Mutation (Prokop et al., 2019). TREM2 wirkt sich auch positiv auf die mikrogliale A β Phagozytose aus. Durch Bindung an *Low-Density-Lipoprotein* (LDL), *Clusterin* und APOE, die wiederum Komplexe mit A β bilden, kann TREM2 die mikrogliale Phagozytose von A β vermitteln. Der TREM2-Signalweg vermittelt zudem eine verstärkte Expression von *cluster of differentiation 36* (CD36), einem *pattern recognition receptor* für A β auf Mikroglia, der die A β -Phagozytose ebenfalls steigert (Kim et al., 2017). Es konnte gezeigt werden, dass die R47H Variante von TREM2 die Bindung an diese Apolipoproteine schwächt und deren Aufnahme verringert. Darüber hinaus führt auch ein quantitativer TREM2-Mangel zur Verringerung der A β -Phagozytose (Yeh et al., 2016).

Das Altern und das Stadium der AD scheinen ebenfalls Einfluss auf die Effekte von TREM2 auszuüben. Zwar führt ein TREM2-*Knockout* zu Beginn der AD zu einer Verbesserung der Plaque-Pathologie im Hippokampus und zur Verminderung der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) (Jay et al., 2015); in fortgeschrittenen Stadien führt ein TREM2-Mangel jedoch zur Exazerbation der Pathologie mit größeren und diffuseren Plaques. Zudem ist die Anzahl der PAM und deren Phagozytoseaktivität zu beiden Zeitpunkten vermindert (Jay et al., 2017).

Zusammenfassend spielt TREM2 eine wichtige Rolle für die Funktion der Mikroglia und deren Interaktion mit A β -Plaques. TREM2 vermittelt dabei den Übergang der Mikroglia in einen krankheitsassoziierten Subtypen sowie deren Ansammlung und Barrierebildung um A β -Plaques. Weiterhin fördert es die Phagozytose von A β und stellt damit eine wichtige Säule für die zerebrale A β -*Clearance* dar. Die wichtige Funktion in der AD wird zudem durch die seltene TREM2 R47H Risikovariante untermauert, die einen ebenso starken Risikofaktor für die AD darstellt wie APOE4.

1.7 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

1.7.1 TNF- α – Vorkommen und physiologische Funktion

Tumornekrosefaktor- α ist ein Mitglied der TNF-Superfamilie, die aus insgesamt 29 Rezeptoren und 19 Liganden besteht. TNF- α liegt als Homotrimer in membrangebundener Form (mTNF- α) vor, kann jedoch durch das *TNF- α Converting Enzyme* (TACE) von der Membran in eine lösliche Form (sTNF- α) gespalten werden. Es gibt zwei Rezeptoren die TNF- α binden können. Der Tumornekrosefaktor- α -Rezeptor 1 (TNFR1) wird ubiquitär exprimiert und besitzt eine *death domain*. Die Bindung von TNF- α an den TNFR1 kann durch diese *death domain* zum Zelltod führen, aber auch über die Aktivierung des *Nuclear-Factor-Kappa B* (NF- κ B) Signalwegs zum Überleben der Zelle beitragen und pro-inflammatorische Effekte ausüben. Der TNFR2 ist nicht ubiquitär verbreitet und findet sich unter anderem auf Mikroglia, Endothelzellen und Subpopulationen von T-Zellen. Während der TNFR1 mTNF- α und sTNF- α gleichermaßen bindet, weist der TNFR2 eine höhere Affinität für mTNF- α auf. Der TNFR2 vermittelt vor allem protektive Effekte wie die Geweberegeneration und

unterstützt das Überleben der Zellen. TNF- α wird physiologisch in Neuronen und Mikroglia exprimiert. Bei Verletzungen und Stimuli wird TNF- α darüber hinaus auch im Endothel, in Oligodendrozyten und Ependymzellen exprimiert (Decourt et al., 2017). Welchen Effekt TNF- α auslöst hängt von zahlreichen Faktoren ab und unterliegt komplexen Regulationsmechanismen.

Zusammenfassend führt die Aktivierung des TNFR1 eher zu einer zytotoxischen und proinflammatorischen Antwort, während die Aktivierung des TNFR2 das Zellüberleben und die Regeneration fördert (Dostert et al., 2019).

1.7.2 TNF- α in der Alzheimer-Krankheit

Die durch Mikroglia vermittelte chronische Neuroinflammation und Zytotoxizität spielen eine wichtige Rolle in der Alzheimer-Krankheit. Auch die systemische Inflammation, beispielsweise im Rahmen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder der rheumatoiden Arthritis (RA) steigert das Risiko für die Entwicklung der AD (Zhou et al., 2020). TNF- α zählt in diesem Zusammenhang zu den am häufigsten untersuchten proinflammatorischen Zytokinen. Ob TNF- α im Serum und Liquor von Alzheimer-Erkrankten erhöht ist, ist nach wie vor umstritten. Einige Studien konnten eine solche Erhöhung gerade bei schweren Verläufen im Liquor und Serum von AD-Erkrankten nachweisen (Brosseron et al., 2014).

In der AD führen A β -Oligomere zur Freisetzung von TNF- α aus Mikroglia (Dhawan et al., 2012). Durch einen autokrinen Feedbackmechanismus erhöht sich neben TNF- α auch die mikrogliale Expression von IL-1 β , IL-6 und der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), die allesamt pro-inflammatorische Effekte ausüben (Kuno et al., 2005). Besonders im Rahmen der chronischen Aktivierung der Mikroglia und durch das proinflammatorische Milieu trägt TNF- α wesentlich zur Zytotoxizität bei. In einem Mausmodell der AD führten chronisch erhöhte TNF- α -Spiegel in Verbindung mit der Alzheimer-Pathologie zum Zelltod von Neuronen. Erhöhte TNF- α -Spiegel ohne Alzheimer-Pathologie hatten jedoch keinen Einfluss auf den neuronalen Zelltod (Janelins et al., 2008). Die von TNF- α ausgeübte Zytotoxizität beruht dabei am ehesten auf der Bindung an den TNFR1, da eine Deletion des TNFR1 in einem Mausmodell der AD die Neuronen vor dem Zelltod schützen konnte (He et al., 2007).

Die medikamentöse Hemmung von TNF- α als therapeutischer Ansatz für die AD ist noch Gegenstand aktueller Forschung. Wie oben beschrieben, kann die systemische Inflammation im Rahmen einer RA das Risiko für die Entwicklung einer AD erhöhen. Patientinnen und Patienten mit RA, die ein gegen TNF- α gerichtetes Medikament erhalten haben, weisen dabei ein geringeres Risiko auf, an der AD zu erkranken, als Betroffene, die keine TNF- α -Blocker erhalten haben (Zhou et al., 2020). Leider mangelt es derzeit noch an groß angelegten randomisierten klinischen Studien, sodass die Wirksamkeit der TNF- α -Inhibition in Bezug auf die AD nicht abschließend geklärt ist.

1.8 Kallikrein-8

1.8.1 Vorkommen und physiologische Funktion

Kallikrein-8 (KLK8), auch Neuropsin genannt, ist eine extrazelluläre Serinprotease und wird physiologisch im Gehirn exprimiert. KLK8 ist in der Lage, Neuregulin-1 (NRG1), Fibronectin, *Neuronal Cell Adhesion Molecule L1* (L1CAM) und den Ephrinrezeptor B2 (EPHB2) zu spalten (Matsumoto-Miyai et al., 2003; Shimizu et al., 1998; Tamura et al., 2012). Es nimmt eine wichtige Funktion in der frühen Phase der Langzeitpotenzierung ein und ist somit an der Gedächtnisbildung beteiligt (Tamura et al., 2006). Darüber hinaus reguliert KLK8 über den EPHB2-Signalweg in der Amygdala die Ängstlichkeit. Der EPHB2 wird dabei durch KLK8 gespalten, wodurch es zur verstärkten Expression des FK506 *Binding Protein-5* (FKBP5) kommt. Dieses erhöht wiederum die Sensitivität für Glucocorticoide und verstärkt somit die Ängstlichkeit (Attwood et al., 2011).

1.8.2 Bedeutung in der Alzheimer-Krankheit

Einen ersten Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der AD und KLK8 gab eine 2001 veröffentlichte Studie, bei der im Vergleich zu Gesunden 11,5-fach erhöhte KLK8-Spiegel im Hippokampus von Alzheimer-Erkrankten beobachtet wurden (Shimizu-Okabe et al., 2001). Unsere Arbeitsgruppe war die erste, die in den rezenten Jahren den Zusammenhang zwischen KLK8 und der AD weiter erforscht hat. Dabei konnte gezeigt werden, dass KLK8 schon lange vor dem Auftreten der Alzheimer-Pathologie im Gehirn

von transgenen Mäusen und erkrankten Menschen stark erhöht ist. Hervorzuheben ist dabei, dass die *mKlk8*-Expression im Hippokampus am stärksten erhöht ist. Jedoch konnte auch im Zerebellum, einem von der Alzheimer-Pathologie erst spät und wenig betroffenen Areal, eine verstärkte *mKlk8*-Expression beobachtet werden (Herring et al., 2016). Darüber hinaus zeigen Frauen und weibliche Mäuse per se höhere KLK8-Proteinspiegel als Männer und männliche Mäuse. In fortgeschrittenen Stadien der AD (P360) sind weibliche Mäuse außerdem stärker von der Neuroinflammation betroffen. Sie zeigen, verglichen mit männlichen Mäusen, eine verstärkte Mikrogliose im Neokortex, den Basalganglien und dem Hippokampus. Die Mikroglia in weiblichen Mäusen exprimieren außerdem mehr TNF- α in fortgeschrittenen (P360) und weniger TREM2 in moderaten Stadien (P180). Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Mikroglia transgener weiblicher Mäuse im Vergleich zu männlichen einen eher proinflammatorischen und weniger neuroprotektiven Phänotypen einnehmen (Keyvani et al., 2018).

1.8.3 Kallikrein-8 als Biomarker

Da die neuropathologischen Veränderungen dem Symptombeginn der AD um Jahre vorausgehen können, kann vermutet werden, dass Patientinnen und Patienten von einer früh begonnenen Therapie stärker profitieren. Es wird deshalb nach wie vor nach verlässlichen und wenig invasiven Biomarkern gesucht, die eine frühzeitige Diagnose der AD ermöglichen. In einer von unserem Institut veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass sich die Bestimmung von KLK8 im Liquor ebenso gut als diagnostischer Marker eignet wie die etablierten Biomarker der AD ($A\beta_{42}$ und T-Tau). Darüber hinaus ist er für die Diagnose der MCI der Bestimmung von $A\beta_{42}$ im Liquor sogar überlegen. Die Bestimmung von KLK8 im Blut zeigt hingegen eine ähnliche Genauigkeit für die Diagnose der MCI, während sie den herkömmlichen Biomarkern für die Diagnose der AD leicht unterlegen ist (Teuber-Hanselmann et al., 2020).

1.8.4 Kallikrein-8 als therapeutisches Zielmolekül

Um das therapeutische Potential der KLK8-Inhibition zu untersuchen, wurden 150 Tage alten weiblichen Mäusen mit (*hAPP* +/-: n=16) und ohne Alzheimer-Pathologie (*hAPP*-/-: n=16) osmotische Pumpen implantiert, die entweder den Anti-KLK8-Antikörper, ein Kontroll-IgG oder Kochsalzlösung in den Ventrikel der Mäuse injizierten. Die Dauer der Behandlung betrug 4 Wochen. Die Antikörper-vermittelte KLK8-Inhibition verminderte die in AD-Mäusen pathologisch gesteigerte Ängstlichkeit und verbesserte gleichzeitig das räumliche Gedächtnis. Sie führte außerdem zur Dichteerhöhung der dendritischen Dornen und steigerte die Komplexität der synaptischen Verbindungen. Auf molekularer Ebene führte die KLK8-Inhibition zur Steigerung der Plastizitätsmarker Synaptophysin und *Growth-Associated-Protein 43* (GAP43). Darüber hinaus führte die Antikörper-vermittelte KLK8-Inhibition zur Modulation der amyloidogenen Prozessierung von APP, indem es die Konzentration von A β ₄₂ und *C-terminal-fragment- β* (CTF β) verringerte, wohingegen es die Konzentration des nicht gespaltenen APPs steigerte. Da die Effekte am ehesten auf der Modulation früher Prozesse in der Amyloidproduktion beruhen, hatte die Antikörpertherapie keine Effekte auf die Anzahl diffuser und *core*-Plaques in allen Hirnarealen, führte jedoch zu einer Verringerung von Volumen und Größe der diffusen Plaques in den Basalganglien.

Weiterhin wurde auch die mikrogliale Interaktion mit den Plaques durch die Antikörpertherapie verbessert, indem sie die Anzahl der PAM in den Basalganglien signifikant und im Neokortex zumindest im Trend steigerte. Auch die durch Mikroglia vermittelte A β -*Clearance* wurde durch die Antikörpertherapie gesteigert. In Glia-Zellkulturen führte die KLK8-Inhibition zur Verdopplung des intragialen A β ₄₂ und zur Verbesserung der mikroglialen Autophagie.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die 4-wöchige Antikörper-vermittelte KLK8-Inhibition auf Verhaltens- und molekularer Ebene zahlreiche positive Effekte ausübt. Dabei war der Benefit dieser Therapie bei transgenen Tieren mit pathologisch erhöhter *mKlk8*-Expression am stärksten ausgeprägt (Herring et al., 2016).

Die Antikörper-vermittelte KLK8-Inhibition zeigte bereits Verbesserungen in zahlreichen Alzheimer-assoziierten Pathologien. Das übergeordnete Ziel meiner Arbeit ist nun die Verifizierung dieser Ergebnisse mit Hilfe eines alternativen genetischen Ansatzes. Hierzu wurde die *mKlk8*-Expression mit Hilfe eines *Knockdowns* permanent um 50% reduziert.

Durch diesen genetischen Ansatz soll unter anderem verifiziert werden, dass die durch den anti-KLK8-Antikörper vermittelten Effekte auch tatsächlich auf der Inhibition von KLK8 und nicht etwa durch KLK8-unabhängige unspezifische Antikörper-Wechselwirkungen vermittelt wurden. In der vorliegenden Dissertation wird dabei gezielt auf die Auswirkungen auf die mikrogliale Neuroprotektion und Zytotoxizität eingegangen.

2 FRAGESTELLUNGEN

Mikroglia spielen als Immunzellen des zentralen Nervensystems eine wichtige Rolle in der Pathogenese der AD, da sie sowohl zytotoxische als auch neuroprotektive Funktionen ausüben. Sie sind in der Lage mit A β -Plaques zu interagieren, um diese anschließend zu phagozytieren und eine schützende Barriere zu bilden. Sie sind jedoch auch in der Lage, durch inflammatorische Prozesse zur Zytotoxizität und somit zum Verlust von Neuronen beizutragen. Eine vorherige Publikation unserer Arbeitsgruppe hat bereits die Effekte einer temporären Antikörper-vermittelten Inhibition von KLK8 auf die mikrogliale Funktion untersucht. In der vorliegenden Arbeit werden nun die Effekte einer permanenten *Knockdown*-vermittelten 50%igen Reduktion von *mKlk8* auf die mikrogliale Neuroprotektion und Zytotoxizität untersucht. Daraus ergaben sich folgende Fragestellungen für meine Arbeit:

- 1) Welchen Einfluss hat die permanente genetisch herbeigeführte *mKlk8*-Reduktion auf die Anzahl Plaque-assoziiierter Mikroglia im Neokortex, Hippokampus und den Basalganglien von transgenen Mäusen?
- 2) Welchen Effekt hat die permanente genetisch herbeigeführte *mKlk8*-Reduktion auf die zerebralen TREM2-Proteinspiegel im transgenen Mausmodell der AD?
- 3) Welchen Effekt hat die permanente genetisch herbeigeführte *mKlk8*-Reduktion auf die zerebralen TNF- α -Proteinspiegel im transgenen Mausmodell der AD?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Allgemeines

Im Folgenden werden die Materialien und Methoden beschrieben. Die Probenvorbereitung (3.6), das Anfertigen der Western Blots (3.8) und die stereologische Quantifizierung der Mikroglia um die A β -Plaques (3.10) sowie die Statistik (3.11) wurden von mir selbst durchgeführt. Die Tierhaltung (3.2), die Verhaltensphänotypisierung (3.3), die Gewebegewinnung und Aufbereitung (3.4), die Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry (3.5) sowie die Fluoreszenzgelelektrophorese (3.7) und die Immunhistochemie (3.9) wurden von Mitarbeitern des Instituts durchgeführt und sind somit kein experimenteller Bestandteil meiner Dissertation, dienen jedoch als Grundlage für meine experimentelle Arbeit. Die Datenerhebung wurde verblindet durchgeführt, sodass der Untersucher den Genotyp der untersuchten Proben nicht kannte.

3.2 Versuchstiere und Probengewinnung

3.2.1 F0 Gründerstämme

Die TgCRND8 Mäuse sind hemizygote Träger des doppelt mutierten humanen Amyloid-Vorläuferprotein-Gens (Amyloid-Precursor-Protein, *hAPP*) mit den „Swedish“ (KM670/671NL) und „Indiana“ (V717F) Mutationen unter Kontrolle eines Hamster Prionen Protein Promotors auf einem C57BL/6-C3H/HeJ Hintergrundstamm. Diese Mutationen führen ab P90 zur Bildung von A β -Plaques in den Gehirnen der Mäuse und Einschränkungen der kognitiven Leistungsfähigkeit (Chishti et al., 2001). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass es ab P30 zu einem Anstieg von KLK8 in den Gehirnen der Mäuse kommt (Herring et al., 2016). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die KLK8 Spiegel bei weiblichen Mäusen höher als bei männlichen Mäusen sind (Keyvani et al., 2018).

Weiterhin wurden *mKlk8-Knockout* Mäuse (*mKlk8*^{-/-}) auf einem C57BL/6J Hintergrundstamm (B6.129P2-KLK8^{<tm1Shio>}, RIKEN BioResource Center) genutzt. Diese Mäuse sind lebensfähig und fertil, zeigen jedoch Einschränkungen in der

Langzeitpotenzierung während der Gedächtnisbildung (Tamura et al., 2006). Zudem zeigen sich Auffälligkeiten in Form von vergrößerten Somata der Pyramidenzellen, der Abnahme von asymmetrischen Synapsen, sowie einer Zunahme der Parvalbumin-produzierenden Zellen (Hirata et al., 2001).

3.2.2 F1 Zwischengeneration

Zunächst wurden die *mKlk8-Knockout* Mäuse (*mKlk8*^{-/-}) mit Wildtypmäusen (WT) für *Klk8* (*mKlk8*^{+/+}) auf einem C3H/HeJ Hintergrundstamm gekreuzt, sodass *mKlk8-Knockdown* Mäuse (*mKlk8*^{+/-}) mit dem C57BL/6-C3H/HeJ Hintergrundstamm entstanden. Dieser Hintergrundstamm ist derselbe, dem auch die TgCRND8 Mäuse angehören.

3.2.3 F2 Experimentalmausgeneration

Um die Expression von *Klk8* in TgCRND8 Mäusen permanent zu reduzieren, wurden 10 weibliche *mKlk8-Knockdown* Mäuse (*hAPP*^{-/-}; *mKlk8*^{+/-}) aus der Zwischengeneration mit 10 männlichen TgCRND8 Mäusen (*hAPP*^{+/-}; *mKlk8*^{+/+}) verpaart. Dabei entstanden die Versuchstiere mit den vier erwünschten Genotypen:

- Transgene Mäuse mit einer AD-ähnlichen Pathologie und erhöhtem zerebralen KLK8 Proteinspiegeln (*hAPP*^{+/-}; *mKlk8*^{+/+})
- Transgene Mäuse mit einer 50%igen Reduktion von *mKlk8* und AD-ähnlicher Pathologie (*hAPP*^{+/-}; *mKlk8*^{+/-})
- Nicht-transgene Mäuse ohne Alzheimer-Pathologie und physiologischer *mKlk8* Expression (*hAPP*^{-/-}; *mKlk8*^{+/+})
- Nicht transgene Mäuse mit *mKlk8 knock-down*, die somit 50% weniger *mKlk8* produzieren als die Wildtypmäuse (*hAPP*^{-/-}; *mKlk8*^{+/-})

In der nachfolgenden Tabelle wird die Anzahl der im Rahmen meiner Doktorarbeit untersuchten Tiere pro Genotyp nach Geschlechtern getrennt dargestellt.

			Plaque-assoziierte Mikroglia	TREM-2	TNF- α
<i>hAPP</i> ^{+/-}	<i>mKlk8</i> ^{+/+}	♂	12	12	12
		♀	11 (HC + BG) 10 (NC)	12	12
	<i>mKlk8</i> ^{+/-}	♂	11	11	11
		♀	12	12	12
<i>hAPP</i> ^{-/-}	<i>mKlk8</i> ^{+/+}	♂	-	13	13
		♀	-	10	10
	<i>mKlk8</i> ^{+/-}	♂	-	12	12
		♀	-	12	12
n (gesamt)			46	94	94

Tabelle 1: Anzahl der Versuchstiere in den durchgeführten Untersuchungen.

3.2.4 Tierhaltung

F2 Mäuse aller Genotypen und Geschlechter wurden bis P30 zusammen mit ihrem Muttertier in Standardkäfigen (Makrolon Typ III) gehalten. Ab P30 wurden die Mäuse dann in nach Geschlechtern getrennten Gruppen von 3-4 Mäusen in Standardkäfigen untergebracht und so bis P207 gehalten. Mäuse aller Generationen wurden an P30 durch konventionelle PCRs mit Primern für *hAPP*, die murine *sex determining region (mSry)* und *mKlk8* genotypisiert. Zur Bestimmung des *mKlk8* Genotyps wurden drei verschiedene Primer genutzt, um zwischen *mKlk8*^{+/+}, *mKlk8*^{+/-} und *mKlk8*^{-/-} zu unterscheiden. Die Mäuse hatten jederzeit freien Zugang zu Nahrung und Wasser. Um einer Verfälschung des Verhaltens der untersuchten Mäuse durch den elterlichen Genotyp entgegenzuwirken, wurden gleiche Anzahlen männlicher und weiblicher Mäuse von den verschiedenen Zuchtpaaren den Experimentalgruppen zugeordnet. Die Mäuse der F2 Generation waren lebensfähig und fertil und zeigten keine weiteren Pathologien verglichen mit den F0 und F1 Generationen.

3.3 Verhaltensphänotypisierung

Zur Verhaltensphänotypisierung wurden die Versuchstiere zunächst eine Woche an einen umgekehrten Tag-Nacht-Rhythmus gewöhnt. Die eigentliche Phänotypisierung fand in einem fortgeschrittenen Symptomstadium der AD zwischen P214 und P216 statt. Die Testung des Ängstlichkeitsverhaltens an P214 erfolgte im *Elevated Plus Maze* (EPM). An P215 wurde das Erkundungsverhalten durch den *Open-Field-Test* (OFT) untersucht. Schließlich wurde die Objektwiedererkennung an P216 durch den *Novel Object Test* (NOT) geprüft.

3.4 Gewebeaufbereitung

Nach der Verhaltensphänotypisierung wurden die Mäuse an $P226 \pm 0.77$ in tiefer Anästhesie getötet. Dabei wurde zunächst eine Anästhesie mit einem CO_2/O_2 -Gemisch (Flussrate 1.8 l/Min.) durchgeführt, wobei O_2 nach und nach durch CO_2 ersetzt wurde. Als die Mäuse betäubt waren, erfolgte die Tötung durch pures CO_2 . Anschließend wurden die Gehirne der Mäuse entnommen, wobei die linke Hemisphäre in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurde. Der Neokortex, der entorhinale Kortex, der Hippokampus sowie die Amygdala wurden aus der rechten Hemisphäre präpariert. Aus den Arealen wurde separat voneinander RNA, DNA und die Proteinfraction mittels Trizol Reagenz extrahiert.

3.4.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der RNA wurden die zuvor entnommenen Hirnareale aus dem Gefrierschrank geholt und anschließend mit Hilfe eines Mikrodismembrators (s. Tab. 14) unter Zugabe von 800 μl TRIzol™-Reagenz (s. Tab. 2) zertrümmert. Das entstandene Homogenisat wurde in ein Reaktionsgefäß mit weiteren 800 μl TRIzol™-Reagenz überführt. Dann folgte die Phasentrennung durch Zugabe von 200 μl Chloroform (s. Tab. 13) mit anschließendem Vortexen und Zentrifugation (15 Min., 13000 rpm, 4°C). Die Interphase enthielt die DNA, die untere Phase die Proteine. Diese beiden Phasen wurden zur DNA-Isolation und Proteinisolation im Reaktionsgefäß belassen. Die obere

Phase, die die RNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 µl TRIzol™-Reagenz überführt. Im Anschluss erfolgte eine erneute Phasentrennung durch Zugabe von 100 µl Chloroform und 2 Min. Inkubation bei Raumtemperatur. Daraufhin erfolgte eine weitere Zentrifugation (15 Min., 13000 rpm, 4°C). Die dabei entstandene obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde durch Zugabe von 800 µl Isopropylalkohol (s. Tab. 13), 10 Min. Inkubation und anschließendem Zentrifugieren (60 Min., 13000 rpm, 4°C) gefällt. Anschließend wurde das dabei entstandene Pellet zwei Mal gewaschen, indem dieses nach Zugabe von 80% Ethanol (in DEPC-H₂O (s. Tab. 12) zentrifugiert (5 Min., 13000 rpm, 4°C) wurde. Der Überstand wurde dabei jeweils verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das RNA-Pellet getrocknet und in 20 µl DEPC-H₂O gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

Gebrauchsfertige Lösungen	Hersteller
Trizol-Reagent	Ambion, life Technologies, Carlsbad, California, USA

Tabelle 2: Gebrauchsfertige Lösungen Gewebeaufbereitung

3.4.2 DNA-Isolierung

Zur organischen und Interphase aus der ersten Phasentrennung wurden 480 µl 100% Ethanol (s. Tab. 13) pipettiert, durch Invertierung gemischt und anschließend bei Raumtemperatur 2 Min. inkubiert. Darauf folgte die Zentrifugation bei 4°C und 5000 rpm. Der dabei entstandene Überstand wurde in 2 neue Reaktionsgefäße überführt und für die Proteinextraktion genutzt. Das DNA-Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.3 Proteinextraktion

Zunächst wurden 2,4 ml Isopropylalkohol zum Überstand aus der DNA-Isolation gegeben. Nach Vortexen und 10 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde zentrifugiert (10 Min., 13000 rpm, 4°C). Das dabei entstandene Proteinpellet wurde nach Verwerfen des Überstands mit 3,2 ml 0,3M Guanidinhydrochlorid-Lösung (in 95% Ethanol)

(s. Tab. 12) für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 Min., 10.000 rpm, 4°C). Das Waschen wurde zwei weitere Male wiederholt. Das Protein-Pellet wurde in 1,6 ml 100% Ethanol gegeben und ein weiteres Mal zentrifugiert (5 Min., 10000 rpm, 4°C). Daraufhin wurde der Überstand verworfen und das Pellet in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde zerkleinert und getrocknet. Zum Lösen des Pellets wurden 800 µl (für Neokortex) oder 600 µl (Hippokampus) 1% SDS (s. Tab. 12), sowie PMSF (1:100) (s. Tab. 12) und Proteinaseinhibitorcocktail (1:1000) (s. Tab. 13) hinzugegeben. Zum Lösen des Pellets wurde die Probe bei 40°C mit maximal 900 rpm geschüttelt und anschließend mittels Ultraschall behandelt. Falls es zur Sedimentbildung kam, wurde erneut zentrifugiert und der Überstand abgetrennt. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

3.5 Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry

Zur quantitativen Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das Verfahren nach Lowry angewendet (Lowry et al., 1951). Die Proteinbestimmung nach Lowry beruht auf der Biuretreaktion. Bei der Biuretreaktion erfolgt die Bildung blauvioletter quadratisch planarer Komplexe der Kupfer-(II)-Ionen aus der Lösung im alkalischen Milieu mit den Peptidbindungen der Proteine. Beim Verfahren nach Lowry werden diese im nächsten Schritt zu Kupfer-(I)-Ionen reduziert. Die Kupfer-(I)-Ionen reduzieren anschließend das gelbe Folin-Ciocalteau-Reagenz. Durch die Reduktion des Folin-Ciocalteau-Reagenzes entsteht der Farbkomplex Molybdänblau. Die Färbung ist proportional zur Proteinkonzentration und kann mittels Photometrie bestimmt werden. Dazu wurden zunächst Verdünnungen (V10, V20) der in 1% SDS gelösten Proben angefertigt. Diese wurden nun als Triplikate in die Vertiefungen (*Wells*) der 96 Well Platte (s. Tab. 14) pipettiert. Zudem wurden zum Vergleich Proteinstandards aus bovinen Serumalbumin (s. Tab. 13) angesetzt. Anschließend wurde Reagenz A' (durch Mischung aus Reagenz A und Reagenz S) hergestellt (s. Tab. 3) und 25 µl der Lösung zu den Proben pipettiert. Nach der Zugabe von 200 µl Reagenz B (s. Tab. 3) folgten 15 Min. Inkubation. Zuletzt wurde die photometrische Messung dann bei einer Wellenlänge von 750 nm mit Hilfe eines Photometers (s. Tab. 14) durchgeführt.

Gebrauchsfertige Lösungen	Hersteller
DC Protein Assay Kit	5000112 Bio-Rad, München
Reagenz A (Lowry)	5000113 Protein Assay Reagent A, Bio Rad, München
Reagenz B (Lowry)	5000114 Protein Assay Reagent B, Bio Rad, München
Reagenz S (Lowry)	5000115 Protein Assay Reagent S, Bio Rad, München

Tabelle 3: Gebrauchsfertige Lösungen Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry

3.6 Probenvorbereitung

Als erstes wurden die Proteinproben aus dem -80°C Tiefkühler geholt und zunächst bei 40°C unter Schütteln aufgetaut. Der Lysispuffer (s. Tab. 12), die Probe und der 5x β -Mercaptoethanol-SDS-Ladepuffer wurden anschließend entsprechend dem Protokoll pipettiert. Nach 5 Min. Denaturierung im Thermomixer bei 95°C , wurden die Proben für 5 Min. im Kühlschrank gekühlt und anschließend zentrifugiert (5 Min., 2000 rpm). Die Denaturierung durch Hitze, SDS und dem β -Mercaptoethanol ist notwendig, da so die Wechselwirkungen zwischen Proteinen (Quartärstruktur) und die Tertiärstrukturen der Proteine aufgehoben werden, sodass die Bewegung im Acrylamidgel ausschließlich von der Größe des Proteins abhängig ist.

3.7 Fluoreszenzgelelektrophorese

Zur Quantifizierung der gesamten Proteinmenge in einer Probe wurde eine Fluoreszenzgelelektrophorese durchgeführt. Diese dient zur Kontrolle gleicher Proteinauftragsmengen für die anschließend durchgeführten Western Blots. Die Fluoreszenzgele (*TGX stain free gels*) wurden entsprechend der Anleitung (s. Tab. 4) mit dem *TGX-Stain-Free Fast-Cast Acrylamide Kit* (s. Tab. 5) vorbereitet. Nach Auftragen der Proben folgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 5 Min. in 1x SDS-Laufpuffer (s. Tab. 12) gewaschen und daraufhin 5 Min. mit UV-Licht im ChemiDoc XRS+ System angeregt (s. Tab. 14).

Das UV-Licht führt dabei zur Reaktion der Trihaloverbindungen im Gel mit den Tryptophanmolekülen der Proteine. Dadurch kommt es zur Fluoreszenz. Das Signal wurde mit Hilfe des Programms *Image Lab 2.0* densitrometrisch ausgewertet. Alle Proben wurden stets als Duplikat angesetzt und die Ergebnisse miteinander verglichen, wobei die Ergebnisse der Duplikate nicht mehr als 10% voneinander abweichen sollten. Bei Abweichungen über 10% wurde eine dritte Messung durchgeführt.

TGX-Fluoreszenzgele:	
Trenngele (10%) Ansatz für 2 Gele	6 ml Resolver A 6 ml Resolver B 90 µl APS (10%) 9 µl Temed
Sammelgele (4%)	2 ml Stacker A 2 ml Stacker B 30 µl APS 6 µl Temed

Tabelle 4: TGX-Fluoreszenzgele

Gebrauchsfertige Lösungen	Hersteller
TGX-Stain-Free Fast-Cast Acrylamide Kit, 10%	Bio-Rad, Laboratories Inc., Hercules, USA

Tabelle 5: Gebrauchsfertige Lösungen Fluoreszenzelektrophorese

3.8 Western Blotting

Die Durchführung der Western Blots erfolgte nach dem *TankBlot*-Verfahren. Dabei werden die Proteine zunächst elektrophoretisch in einem 10% Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dort erfolgt dann der Proteinnachweis mit Hilfe bestimmter Antikörper. In dieser Arbeit wurden die Proteine *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2* (TREM2) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) untersucht und quantifiziert.

3.8.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgte wie in 3.6 beschrieben.

3.8.2 Gelelektrophorese

Die 10% SDS-Polyacrylamidgele wurden entsprechend der Anleitung (s. Tab. 6) vorbereitet und zwischen zwei Glasplatten gegossen. Die Elektrophoresekammer wurde daraufhin mit den Gelen bestückt und anschließend mit 1x SDS-Laufpuffer (s. Tab. 12) aufgefüllt. Anschließend wurden die Taschen der Gele mit den Proteinproben beladen, wobei die 1. Tasche mit Proteinmarker (s. Tab. 13) befüllt wurde. Der Marker besteht aus mit Farbstoff gekoppelten Proteinen bekannter Größe und gibt Aufschluss welche Molekülmassen auf welcher Höhe im Gel zu finden sind. Außerdem dient es zur Orientierung darüber, wie weit die Gelelektrophorese fortgeschritten ist. Die Befüllung der restlichen Kammern mit den Proben erfolgte mit 25 µl der Proben, was einer Proteinmasse von 20 µg entsprach. Die Elektrophorese wurde durch Anlegen einer 120 V Spannung über ungefähr 90 Min. durchgeführt, bis die durch Bromphenolblau angefärbte Lauffront der Proteinproben das Gelende erreicht hat. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele von den Glasplatten getrennt und das Sammelgel abgetrennt. Die Gele wurden dann 15 Min. in Blotpuffer (s. Tab. 12) gewaschen.

Acrylamidgele:	
Trenngel 10% (Ansatz für 2 Gele)	4660 µl Acrylamid 3500 µl Lower Tris 5840 µl Aqua dest. 100 µl APS (10%) 20 µl TEMED
Sammelgel 4% (Ansatz für 2 Gele)	830 µl Acrylamid 1250 µl Upper Tris 2920 µl Aqua dest. 40 µl APS (10%) 10 µl Temed

Tabelle 6: Acrylamidgele

3.8.3 Blotting und Proteindetektion

Im nächsten Schritt wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde das zuvor in Blotpuffer gewaschene Gel und die Nitrozellulosemembran zusammen mit Filterpapieren und Schwämmen in das sogenannte „Blot Sandwich“ eingespannt. Nach Einsetzen des Blot-Sandwichs in die Blotkammer wurde diese mit Blotpuffer aufgefüllt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte bei 4°C und konstanter Stromstärke von 0,25 A über 70 Min. Nach abgeschlossenem Proteintransfer folgte das Waschen der Membranen in 1x TST (s. Tab. 12) und der Proteinnachweis auf den Membranen mit Ponceau S-Lösung (s. Tab. 12). Dabei bindet Ponceau-Rot reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine und färbt die Proteine dadurch an. Im Anschluss wurden die Membranen durch Waschen mit 1x TST entfärbt. Zum Nachweis von TREM2 wurden die Membranen zunächst 60 Min. mit 5% MMP (in 1x TST gelöst) (s. Tab. 12) blockiert. Dabei sollen die restlichen unspezifischen Proteinbindungsstellen der Nitrozellulosemembran durch die Proteine aus dem MMP blockiert, beziehungsweise abgesättigt werden. Das verhindert unspezifische Bindungen des Primär- und Sekundärantikörpers. Die Inkubation mit dem TREM2 Antikörper (1:1000, ABIN749678, antibodies-online.com, s. Tab. 7) erfolgte bei 4°C auf einem Schüttler über Nacht. Anschließend wurde die Antikörperlösung entfernt und die Membranen erneut zweimal je 15 Min. mit 1x TST gewaschen. Es erfolgte eine erneute Blockierung mit 5% MMP (in 1x TST) über 1 h. Dann wurden die Membranen mit dem Anti-rabbit Sekundärantikörper, verdünnt in 5% MMP (1:15000, 111-035-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., s. Tab. 7), 1 h inkubiert. Dieser ist gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und zudem mit einer Peroxidase gekoppelt. Die Peroxidase katalysiert im nächsten Schritt die *enhanced luminol-based chemiluminescent*-Reaktion (ECL-Reaktion). Zuletzt wurden die Membranen drei Mal je 15 Min. mit 1x TST gewaschen.

Antikörper	Bezeichnung	Hersteller
Anti-TREM2 (Western Blots)	Antikörper gegen TREM2 ABIN749678	Antibodies-online.com, Aachen
Anti-TNF- α (Western Blots)	Antikörper gegen TNF- α , ab6671	Abcam, Cambridge, UK
Anti-rabbit (Western Blots)	Sekundärantikörper Polyclonal Goat Anti-Rabbit 111-035-003,	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.

Tabelle 7: Antikörper Western Blotting

3.8.4 ECL-Reaktion und Bildgenerierung

Schließlich konnte die Proteinbestimmung mittels Chemilumineszenz durchgeführt werden. Dazu wurde die jeweilige Membran mit dem ECL-Kit (s. Tab. 8) inkubiert. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (*horseradish-peroxidase*, HRP) katalysiert dabei die Oxidation des Luminols durch das Peroxid-Reagenz aus dem ECL-Kit. Bei der Oxidation des Luminols entsteht ein Lichtsignal, das proportional zur vorhandenen Proteinmenge ist. Das Signal wurde mit einer Digitalkamera (ChemiDoc XRS; Bio-Rad) (s. Tab. 14) aufgenommen und anschließend mit der *Image Lab 2.0* Densitometrie Software (Bio-Rad) ausgewertet. Die Normierung der Signale erfolgte im Abgleich mit der Menge an Gesamtprotein, die in den zuvor angefertigten Fluoreszenzgelen bestimmt wurde.

Gebrauchsfertige Lösungen	Hersteller
Amersham TM ECL Select Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare for life Sciences UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK, RPN 2235
Millipore Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Normales ECL)	Millipore Corporation Billerica, MA, USA Merck KGaA, Darmstadt

Tabelle 8: Gebrauchsfertige Lösungen ECL-Reaktion

3.8.5 Membranstripping und Nachweis von TNF- α

Zum Nachweis von TNF- α wurden die zuvor genutzten Membranen „gestrippt“. Dazu wurden sie zunächst kurz mit Tris-gepufferter Saline mit TweenTM 20 (TBS-T) (s. Tab. 12) gewaschen und anschließend 1 h bei 50°C mit Stripping-Puffer (s. Tab. 12) inkubiert. Beim *Stripping* werden die zuvor an die Membran gebundenen Antikörper mit Hilfe von Wärme und dem Strippingpuffer von der Membran gelöst. Der Puffer wurde dann entsorgt und die Membranen 3x15 Min. in TBS-T gewaschen. Es wurde 1 h mit 1% Bovinem Serumalbumin (BSA) in TBS-T (s. Tab. 12) blockiert und über Nacht mit dem in 1% BSA in TBS-T angesetzten TNF- α -Antikörper (1:500, ab6671, abcam, s. Tab. 7) inkubiert. Nach Entfernung der überschüssigen Antikörperlösung, wurden die Membranen 2x15 Min. mit 1xTBS-T gewaschen. Die Blockierung wurde 1 h mit 1% BSA in TBS-T durchgeführt. Der Anti-*rabbit* Sekundärantikörper in 1% BSA in TBS-T (1:15000, 111-035-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., s. Tab.7) wurde anschließend zu den Membranen gegeben. Nach 1 h Inkubation wurden die Membranen 3x15 Min. mit TBS-T gewaschen. Die Bildgenerierung erfolgte wie in 3.8.4.

3.9 Immunhistochemie

Ziel der Immunhistochemie war die Bestimmung der Mikroglia um die A β -Plaques. Dazu wurden zunächst die Mikroglia mit Hilfe einer Immunfärbung gegen *Allograft Inflammatory Factor 1* (AIF1) dargestellt. AIF1 oder auch *ionized calcium-binding adapter molecule 1* (IBA1) ist ein calcium-bindendes Protein, das ausschließlich von Makrophagen und Mikroglia exprimiert wird und somit zum Nachweis von Mikroglia im Gehirn benutzt werden kann (Sasaki et al., 2001). Im nächsten Schritt wurden dann die A β -Plaques angefärbt. Zur Darstellung wurden wie beim Western Blot zwei Antikörper benutzt. Der Primärantikörper ist gegen das gesuchte Antigen gerichtet. Der Sekundärantikörper bindet anschließend den Primärantikörper und das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym (Peroxidase, alkalische Phosphatase) führt zur Bildung der Farbstoffe. Der Farbstoff bildet sich somit an den Stellen, an denen der Antikörper das gesuchte Antigen gebunden hat. Der genaue Vorgang wird im Folgendem beschrieben.

3.9.1 AIF1-Färbung

Für die Immunhistologie wurden die linken Hemisphären der in 3.2.3 beschriebenen Versuchstiere in 4% Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Dann wurden 10 µm dicke Schnitte im Abstand von 100 µm in koronarer Schnittführung angefertigt. Nun erfolgte eine Färbung gegen AIF1 zur Darstellung der Mikroglia. Hierzu wurde ein Wasserbad auf 95°C aufgeheizt und der 10 mM Citratpuffer (pH 6.0) (s. Tab. 12) vorgewärmt, womit die Schnitte 20 Min. behandelt wurden. Anschließend wurde das Gewebe mit 1% TritonX (s. Tab. 13) permeabilisiert. Darauf folgte eine Behandlung mit 3% H₂O₂ für 5 Min. (s. Tab. 13), um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren. Anschließend wurde 10 Min. mit 200 µl prä-Block (s. Tab. 10) geblockt, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Nun folgte eine Spülung mit Waschpuffer (s. Tab. 12) und daran anschließend die 2-stündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem AIF1-Antikörper (1:300, APO8912PU-N, Acris/OriGene, s. Tab. 9). Nach der Spülung folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Anti-goat (1:600, E0466, DAKO, s. Tab. 9) für 30 Min. bei Raumtemperatur. Der Sekundärantikörper ist notwendig, da das HRP-Polymer (s. Tab. 10) ausschließlich an Antikörper von Mäusen und Kaninchen binden kann. Weil der AIF1-Antikörper aus Ziegen gewonnen wird, wurde vor Zugabe der Meerrettichperoxidase zunächst mit dem oben genannten Sekundärantikörper inkubiert, der in Kaninchen gewonnen wird und somit vom HRP-Polymer gebunden werden kann. Nach erneutem Spülen folgte die 30 Min. Inkubation mit Meerrettichperoxidase-Polymer. Anschließend wurde noch ein letztes Mal gespült und 10 Min. mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Substratlösung (DAB-Lösung) (s. Tab. 10) inkubiert. Die Oxidation des DAB mit Wasserstoffperoxid aus dem Inkubationsmedium wird durch die Meerrettichperoxidase katalysiert und führt zur Bildung eines braunen Farbstoffs an den Mikroglia.

Antikörper	Bezeichnung	Hersteller
AIF1 (Immunhistochemie)	Polyclonal Goat, Anti AIF1, APO8912PU-N	Acris/OriGene, Rockville, Maryland, USA
Anti-Goat (Immunhistochemie)	Sekundärantikörper Polyclonal Rabbit Anti-Goat, E0466	DAKO Denmark ApS, Glostrup Dänemark

Tabelle 9: Antikörper Immunhistochemie

Gebrauchsfertige Lösungen	Hersteller
Antibody Diluent	Zytomed System GmbH Berlin, ZUC025-500
DAB	DAKO Denmark ApS, Glostrup Dänemark K5007
ZytoChem Plus HRP Polymer System (Prä- und Postblock Maus/Rabbit)	Zytomed System GmbH, Berlin, REF: POLHRP-100

Tabelle 10: Gebrauchsfertige Lösungen Immunhistochemie

3.9.2 A β -Färbung

Im zweiten Schritt wurde die A β -Gegenfärbung durchgeführt. Die gegen AIF1 gefärbten Schnitte wurden zunächst 3 Min. mit 100% Ameisensäure (s. Tab. 13) vorbehandelt und anschließend mit Waschpuffer gespült. Darauf folgte die Behandlung mit 3% H₂O₂ für 5 Min. Nach erneuter Spülung wurden die Schnitte 10 Min. mit Präblock (Zytomed) behandelt. Der Primärantikörper (1:150, M0872, DAKO, s. Tab. 11) gegen A β wurde zugegeben und für 30 Min. inkubiert. Nach Spülung mit Waschpuffer erfolgte die Zugabe von 200 μ l Postblock (Zytomed) (s. Tab. 10). Der hier verwendete Primärantikörper wurde aus Mäusen gewonnen. Der Sekundärantikörper richtet sich gegen die Spezies aus der der Primärantikörper gewonnen wurde, somit aber auch gegen das hier verwendete Hirngewebe der Maus. Deshalb ist der Postblock notwendig, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren und störende Hintergrundfärbungen zu vermeiden.

Daraufhin wurden 200 µl Alkalische Phosphatase-Polymer (AP-Polymer) zugegeben und für 30 Min. inkubiert. Nach Spülung wurde dann das AP-Substrat hinzugegeben. Die an die Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase setzte nun Phosphat aus den Substraten frei. Das freigewordene Phosphat reagierte mit den zugesetzten Chemikalien und führte zur Bildung eines rötlichen Niederschlags an den Aβ-Plaques.

Antikörper	Bezeichnung	Hersteller
Aβ (Immunhistochemie)	Monoclonal Mouse, Anti-Human Beta- Amyloid Clone 6F/3D, M0872	DAKO Denmark ApS, Glostrup Dänemark

Tabelle 11: Antikörper Immunhistochemie

3.10 Stereologische Quantifizierung der Mikroglia um die Aβ-Plaques

Zur Visualisierung wurden ein Mikroskop (Nikon i80) (s. Tab. 14), eine Digitalkamera (3/4" chip, 36-bit color, DV-20, MicroBrightField) (s. Tab. 14) und die Software Stereo Investigator 11 (MicroBrightField) (s. Tab. 14) genutzt. Dabei wurden pro Versuchstier 6 Schnitte im Abstand von 100 µm untersucht. Die Zählung erfolgte, indem zunächst die Umrisse des jeweiligen Areals (Neokortex, Hippokampus, Basalganglien) markiert wurden. Anschließend wurde mit dem *Fractionator* die *Counting-frame* (300x300 µm) und die *Grid-size* (425 x 425 µm) festgelegt. Dann folgte bei 200-facher Vergrößerung die Zählung der Aβ-Plaques und der Mikroglia, die sich um diese formierten. Die Ergebnisse wurden anschließend als Anzahl der Mikroglia pro Aβ-Plaque dargestellt.

3.11 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS 22 (s. Tab. 14) durchgeführt. Das Vorliegen der Normalverteilung wurde zunächst mit dem Kolmogorow-Smirnov-Test und Q-Q-Plot überprüft. Mittels Levene Test wurde anschließend die Homogenität der Varianzen berechnet. Der *Knockdown*-Effekt auf die Anzahl der PAM wurde mittels zweiseitigem t-Test untersucht. Zur Überprüfung des Transgen-Effekts und *Knockdown*-Effekts auf die

TREM2- und TNF- α -Expression erfolgte der Vergleich mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Mann-Whitney-U-Test. Das Signifikanzniveau (α) wurde auf 0,05 festgelegt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Puffer und Lösungen	
DEPC-H ₂ O	500 µl DEPC 500 ml Aqua bidest
0,3M Guanidinhydrochlorid-95%- Ethanol-Lösung	Für 100 ml Ansatz: 2,866 g Guanidin-HCl 5 ml DEPC-H ₂ O 95 ml Ethanol
0,5M EDTA pH 8,0	Für 1 l Ansatz: 186,1 g EDTA in 800ml Aqua bidest. Lösen Mit NaOH-Lsg auf pH 8,0 einstellen Mit Aqua bidest. Auf 1 L auffüllen
0,1M EGTA	Für 100 ml Ansatz: 3,8035 g EGTA auf 100 ml Aqua dest.
Lysispuffer	Ansatz für 100 ml: 10 ml 10mM Tris/HCl (pH 8.0) 3 ml 150mM NaCl 2 ml 2% Igpal 10 ml 1% Na-Desoxycholat 0,2 ml 1mM EDTA 1 ml 1mM EGTA Anschließend auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen
1% SDS-Lsg	1 g SDS auf 100 ml Aqua dest. geben und lösen
10x-SDS-Laufpuffer Für 1x Laufpuffer 1:10 verdünnt in aqua dest.	Ansatz für 1 l: 144 g Glycin 39 g Tris 19 g SDS Auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen
Blotpuffer	3,03 g Tris

	<p>14,4 g Glycin 200 ml Methanol Auf 1 L mit aqua dest. auffüllen</p>
Citratpuffer	<p>18 ml 0,1M Citronensäuremonohydrat 82 ml 0,1M Trinatriumcitrat-dihydrat pH auf 6 einstellen mit Aqua dest auf 1 L auffüllen</p>
Waschpuffer	20-fach DCS
<p>10xTST-Puffer Für 1xTST 1:10 verdünnt in Aqua dest.</p>	<p>Ansatz für 1 L 100 ml 1M Tris (pH=7,6) 300 ml 5M NaCl 5 ml Tween 20 Auf 1 L mit Aqua dest. auffüllen</p>
<p>10xTBST-Puffer Für 1xTBST anschließend 1:10 verdünnt mit Aqua dest.</p>	<p>Ansatz für 1 L: 24,2 g Tris 80 g NaCl In 800 ml Aqua bidest. lösen pH mit HCl (37%ig) auf 7,6 einstellen mit Aqua bidest auf 1 L auffüllen 1ml Tween 20 zugeben und lösen</p>
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	P7626, Sigma-Aldrich
<p>Ponceaurot-Stammlösung Zum Anfärben 1:10 verdünnen mit Aqua dest.</p>	<p>Ansatz für 100 ml: 0,5 g PonceauS 1 ml Essigsäure 98,5 ml Aqua dest.</p>
5%MMP in TST	<p>Ansatz für 500ml: 25 g MMP (SKIM-Milk) Mit 1xTST auf 500 ml auffüllen</p>
1%BSA in TBST	<p>Ansatz für 500 ml: 5g BSA in 500 ml 1xTBST auflösen</p>

Strippingpuffer	0,32 ml β -Mercaptoethanol 10 ml 10% SDS-Lösung 3,125 ml 1M Tris (pH 6,7) Auf 50 ml mit A. dest auffüllen
Upper Tris	30,28 g Tris 2 g SDS Auffüllen auf 500 ml mit Aqua dest pH auf 6,8 einstellen mit HCl
Lower Tris	90,855 g Tris 2 g SDS Auffüllen auf 500 ml mit Aqua dest pH auf 8,8 einstellen mit HCl
5x β -Mercaptoethanol-SDS-Laufpuffer	1 ml 0,5M Tris/HCl, pH 6,8 0,8 ml Glycerol 1,6 ml 10% SDS 0,4 ml β -Mercaptoethanol 0,4 ml Bromphenolblau (1%Stock) 4 ml Aqua dest.

Tabelle 12: Puffer und Lösungen

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Ameisensäure	Merck KGaA, Darmstadt
APS Ammoniumperoxidisulfat	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Aqua B. Braun	B. Braun Melsungen, Melsungen AG, Melsungen
Bromphenolblau Na-Salz	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
BSA	Jackson ImmunoResearch Laboratories inc., Pennsylvania, USA
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Citronensäuremonohydrat	Merck KGaA, Darmstadt

Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11-245 kDa)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, P7710S
DEPC	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
EDTA	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
EGTA	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Ethanol	Honeywell International Inc., Morristown USA
Formalin/Roti-Histofix 4%	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Guanidin HCl	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
H ₂ O ₂	Merck KGaA, Darmstadt
HCl	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Igepal	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
IHC-Waschpuffer (20-fach)	DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg
Isopropylalkohol	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Avantor Performance Materials Poland S. A., Gliwice, Polen
Skim Milk Powder (=MMP)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Na Desoxycholat	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
NaCl	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
NaOH	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) 1:100, #P7626	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
PonceauS	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Proteinaseinhibitorcocktail (1:1,000, #P8340)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
SDS	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
TEMED	Bio-Rad
Trinatriumcitrat-dihydrat	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe

Tris	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Triton X	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tween 20	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe

Tabelle 13: Chemikalien und Hersteller

Geräte und Programme	Hersteller
96 well-Platte und Microplate Photometer	Nunc™ MicroWell™ 96-Well Platte, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts USA
Autostainer Plus (DAKO)	Agilent Technologies
ChemiDoc™ XRS+ System	Bio-Rad, München Laboratories Inc. Hercules USA
Eppendorf Research® Pipette 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Thermomixer® compact	Eppendorf AG, Hamburg
Farbdigitalkamera 3/4“ chip, 36-bit color, DV-20	MicroBrightField Bioscience, Williston, USA
Hamilton Pipette, 50 µl Model 705 RN	Hamilton Company, Reno, USA
Heraeus™ Pico™ 17 Mikrozentrifuge	Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA
Image Lab 2.0	Bio Rad, München
Magnetrührer, lab disc	VWR International GmbH, Darmstadt
MaxQ 2000 Open-Air Platform Shaker	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Mikro-Dismembrator S	(85030-522-30) Sartorius AG, Göttingen
Mini- PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Nikon Eclipse 80i Mikroskop	Nikon Corporation, Tokyo, Japan

Photometer Multiskan FC	ThermoFisher Scientific, Typ 357, REF 51119000
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, California, USA
Präzisionswaage, Sartorius Talent	Sartorius AG, Göttingen
Protran Nitrocellulose Membrane Filters	Whatman Porengröße 0,2 µm, VWR International GmbH Darmstadt
Quantity One 1-D Analysis Software	Bio Rad, Laboratories Inc., Hercules, USA
SPSS 22 Software	IBM
Stereo Investigator® 11 Software	MicroBrightField
Vortex-Genie 2 Mixer	Scientific Industries Inc., New York, USA

Tabelle 14: Geräte und Programme

4 ERGEBNISSE

In dieser Doktorarbeit wurde der Effekt eines Kallikrein-8-*Knockdowns* auf die mikrogliale Neuroprotektion und Zytotoxizität in einem fortgeschrittenen Stadium der AD in einem transgenen CRND8-Mausmodell untersucht. Dabei wurden transgene und Wildtypmäuse mit und ohne Kallikrein-8-*Knockdown* beider Geschlechter untersucht.

4.1 Auswirkungen des *mKlk8-Knockdowns* auf die mikrogliale Dichte um A β -Plaques

Zur Untersuchung der mikroglialen Dichte um A β -Plaques wurden zunächst die Mikroglia durch eine immunhistochemische Färbung von AIF1 dargestellt. AIF1 wird vor allem in aktivierten Mikroglia und Makrophagen exprimiert (Sasaki et al., 2001). Anschließend erfolgte die Gegenfärbung von A β zur Darstellung der Plaques. Zur Auswertung wurde die Anzahl der Mikroglia um die A β -Plaques stereologisch quantifiziert. In dieser Arbeit wurden die Effekte eines permanenten *mKlk8-Knockdowns* auf die mikrogliale Dichte um A β -Plaques in beiden Geschlechtern untersucht. Vorherige Arbeiten aus unserem Institut konnten schon zeigen, dass bereits eine kurzfristige Inhibition von KLK8 durch eine 4-wöchige Antikörpertherapie gegen KLK8 mit einer Zunahme der PAM in den Basalganglien einhergeht (Herring et al., 2016). Für die folgenden Fragestellungen (4.1.1 – 4.1.3) wurden ausschließlich transgene Tiere untersucht, da nur diese die A β -Pathologie entwickeln.

4.1.1 Der *mKlk8-Knockdown* führt zu einer signifikanten Erhöhung der Plaque-assoziierten Mikroglia in den Basalganglien

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der *mKlk8-Knockdown* zu einer signifikanten Erhöhung der PAM (n/Plaque) in den Basalganglien um ca. 6,3% ($p=0,0215$) führt (*hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/+}: $4,78 \pm 0,09$ vs. *hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/-} $5,08 \pm 0,1$). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern nachgewiesen werden ($p>0,1$), daher werden die Daten männlicher und weiblicher Mäuse gepoolt dargestellt.

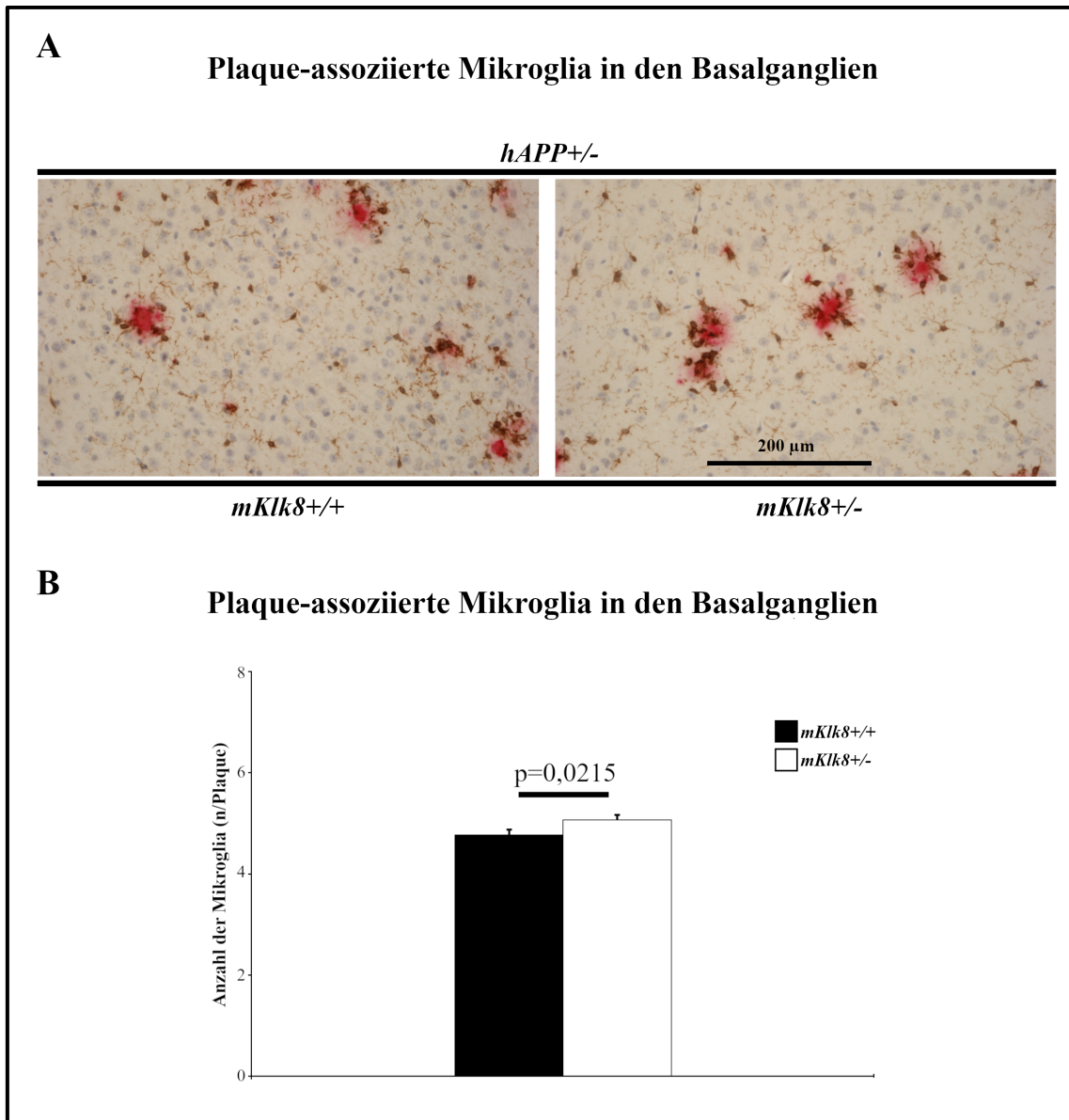


Abbildung 1: Erhöhung der Anzahl von PAM in den Basalganglien durch den *mKlk8*-Knockdown. (A) ((Modifiziert nach (Herring et al., 2021))) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung von Basalganglien transgener Mäuse (*hAPP+/-*) mit (*mKlk8+/-*) und ohne (*mKlk8+/+*) Knockdown von *mKlk8*. Dargestellt sind die PAM in den Basalganglien ohne *mKlk8*-Knockdown (*mKlk8+/+*, links) und mit *mKlk8*-Knockdown (*mKlk8+/-*, rechts). Die Mikroglia (braun) sind durch immunhistochemische Färbung gegen AIF1 angefärbt und die Plaques (rot) durch immunhistochemische Färbung gegen A β . Eichbalkengröße: 200 μ m. (B) Dargestellt ist die Anzahl der PAM in den Basalganglien im Säulendiagramm. Einheit: n/Plaque. Angabe als Mittelwert \pm SEM. Es zeigte sich, dass die Anzahl der PAM durch den *mKlk8*-Knockdown (weiß, *mKlk8+/-*) im Vergleich zu den Tieren ohne *mKlk8*-Knockdown (schwarz, *mKlk8+/+*) erhöht wurde. Der p-Wert beschreibt den Knockdown-Effekt. Gruppengrößen: *mKlk8+/+*: n(σ)=12, n(ϕ)=11; *mKlk8+/-*: n(σ)=11, n(ϕ)=12. Die Daten männlicher und weiblicher Mäuse werden gepoolt dargestellt. Die Statistik erfolgte mittels zweiseitigem t-Test.

4.1.2 Der *mKlk8-Knockdown* führt zu einer signifikanten Erhöhung der Plaque-assoziierten Mikroglia im Hippokampus

Es konnte gezeigt werden, dass der *mKlk8-Knockdown* zu einer signifikanten Erhöhung der PAM im Hippokampus um ca. 7,4% ($p=0,0243$) führt

(*hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/+}: $5,68 \pm 0,12$ vs. *hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/-}: $6,1 \pm 0,13$).

Die Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Mäusen waren nicht signifikant ($p>0.1$), daher werden die Daten männlicher und weiblicher Mäuse gepoolt dargestellt.

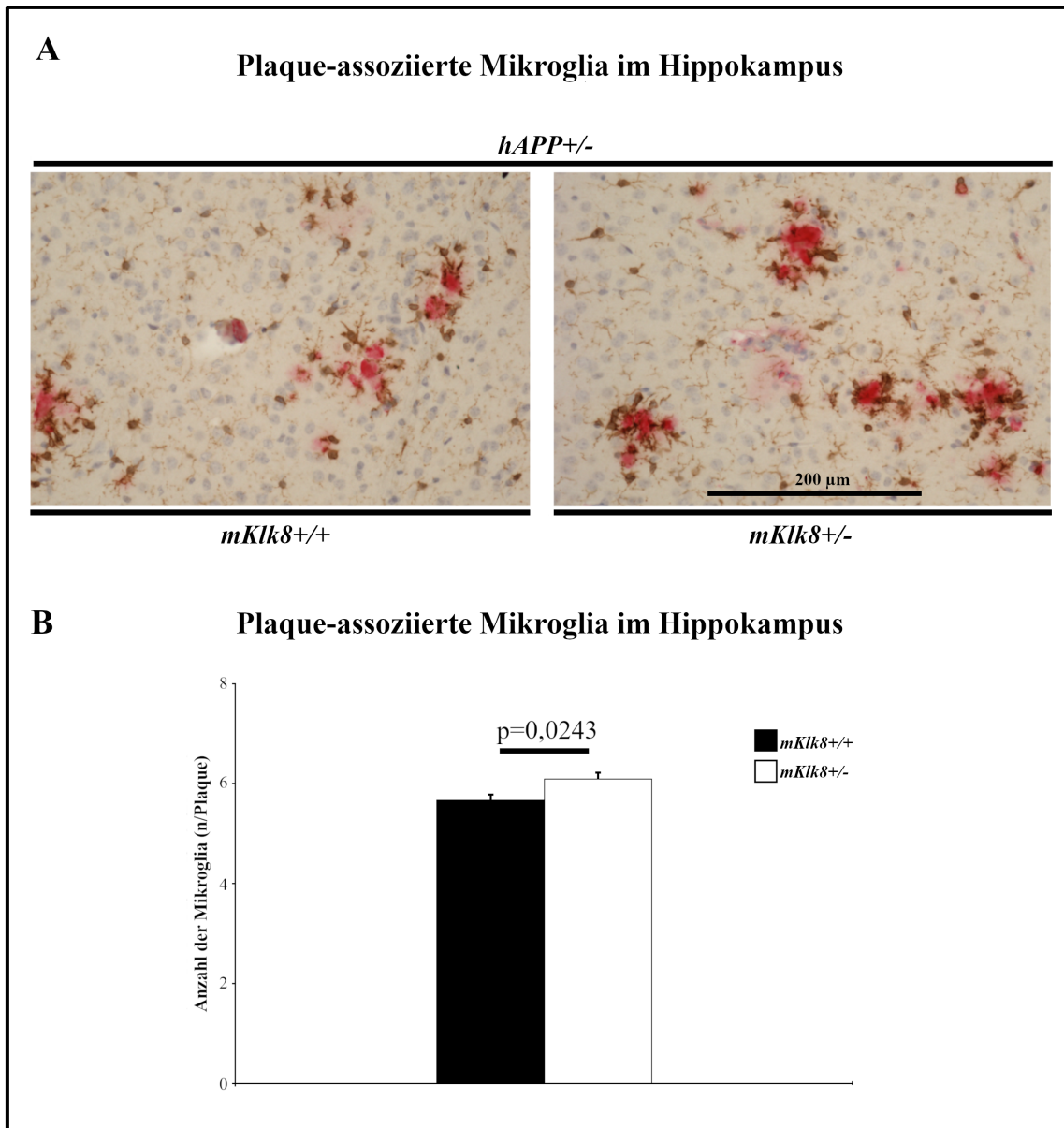


Abbildung 2: Erhöhung der Anzahl von PAM im Hippokampus durch den *mKlk8*-Knockdown. (A) Repräsentative Lichtmikroskopische Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung aus dem Hippokampus transgener Mäuse (*hAPP+/-*). Eichbalkengröße: 200 μm . Dargestellt sind die PAM im Hippokampus ohne *mKlk8*-Knockdown (*mKlk8+/+*, links) und mit *mKlk8*-Knockdown (*mKlk8+/-*, rechts). Die Mikroglia (schwarz) sind durch AIF1 angefärbt und die Plaques (rot) durch Färbung gegen A β . (B) Dargestellt ist die Anzahl der PAM im Säulendiagramm. Einheit: n/Plaque. Angabe als Mittelwert \pm SEM. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der PAM durch den *mKlk8*-Knockdown (weiß, *mKlk8+/-*) im Vergleich zu den Wildtypen (schwarz, *mKlk8+/+*) erhöht wurde. Der p-Wert beschreibt den *Knockdown*-Effekt. Gruppengröße: *hAPP+/-*: *mKlk8+/+*: n(σ)=12, n(φ)=11; *mKlk8+/-*: n(σ)=11, n(φ)=12. Die Daten männlicher und weiblicher Mäuse werden gepoolt dargestellt. Die Statistik erfolgte mittels t-Test.

4.1.3 Der *mKlk8-Knockdown* hat keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl der Plaque-assoziierten Mikroglia im Neokortex

In Vorarbeiten aus unserem Institut konnte bereits gezeigt werden, dass die vorübergehende KLK8-Blockade keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der PAM im Neokortex hatte (Herring et al., 2016). In Übereinstimmung damit konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass auch eine permanente KLK8-Reduktion keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der PAM hat (*hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/+}: $5,97 \pm 0,11$ vs. *hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/-}: $5,93 \pm 0,09$, $p > 0,1$).

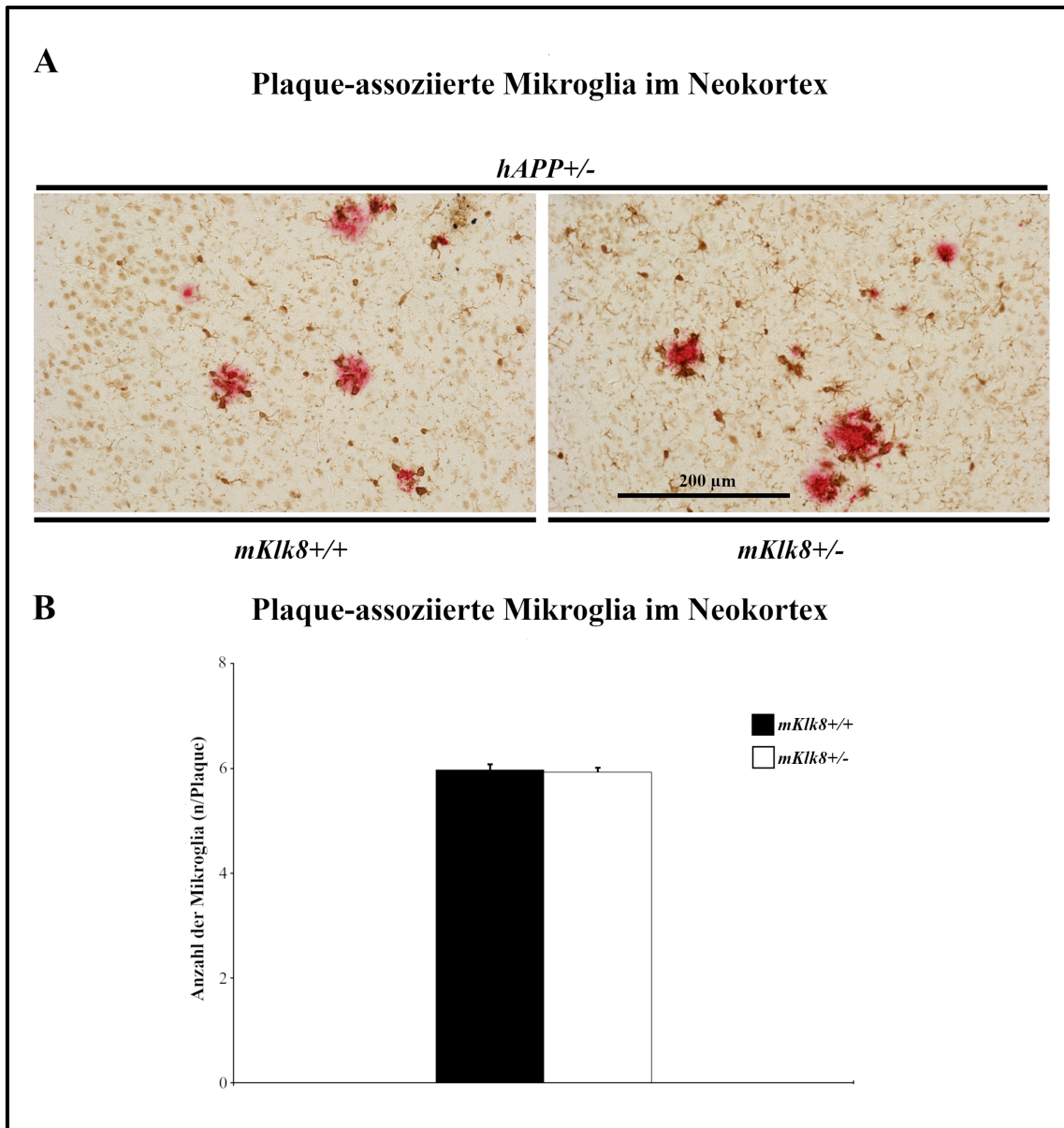


Abbildung 3: Der *mKlk8*-Knockdown hat keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Anzahl der PAM im Neokortex. (A) Repräsentative Lichtmikroskopische Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung aus dem Neokortex transgener Mäuse (*hAPP+/-*). Eichbalkengröße: 200µm. Dargestellt sind die PAM im Neokortex ohne *mKlk8*-Knockdown (*mKlk8+/+*, links) und mit *mKlk8*-Knockdown (*mKlk8+/-*, rechts). Die Mikroglia (schwarz) sind durch AIF1 angefärbt und die Plaques (rot) durch Färbung gegen Aβ. (B) Dargestellt ist die Anzahl der PAM im Neokortex im Säulendiagramm. Einheit: n/Plaque. Angabe als Mittelwert ± SEM. Es zeigt sich, dass die Anzahl der PAM durch den *mKlk8*-Knockdown (weiß) nicht statistisch signifikant ($p \geq 0,1$) beeinflusst wird. Gruppengröße: *hAPP+/-*: *mKlk8+/+*: $n(\text{♂})=12$, $n(\text{♀})=10$; *mKlk8+/-*: $n(\text{♂})=11$, $n(\text{♀})=12$. Die Daten männlicher und weiblicher Mäuse werden gepoolt dargestellt. Die Statistik erfolgte mittels t-Test.

4.2 Der *mKlk8-Knockdown* erhöht TREM2 im Neokortex transgener Mäuse

TREM2 dient als *in-vivo* Indikator für die mikrogliale Phagozytoseaktivität und Neuroprotektion (Condello et al., 2015; Ulland et al., 2017). Es gibt bereits Arbeiten, die nahelegen, dass bestimmte mit einem Funktionsverlust einhergehende TREM2-Mutationen einen starken Risikofaktor für die Entwicklung der AD darstellen (Guerreiro et al., 2013; Ulland et al., 2017). Vorherige Arbeiten aus unserem Institut konnten bereits zeigen, dass es durch eine 4-wöchige Anti-KLK8-Antikörpertherapie zu einer Verbesserung der mikroglialen A β -Phagozytose kommt. (Herring et al., 2016)

Zur Bestimmung der mikroglialen Phagozytoseaktivität und Neuroprotektion wurde in dieser Arbeit der Einfluss des *mKlk8-Knockdowns* auf die TREM2-Expression untersucht.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die AD-ähnliche Pathologie zu einer signifikanten Verringerung von TREM2 im Neokortex von transgenen Mäusen führt. So war die TREM2-Expression in AD-erkrankten Mäusen (*hAPP*^{+/-}) ohne *mKlk8-Knockdown* im Vergleich zu gesunden Mäusen (*hAPP*^{-/-}; *mKlk8*^{+/+}) um 14% verringert (*hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/+}: $0,86 \pm 0,039$ vs. *hAPP*^{-/-} *mKlk8*^{+/+}: $1,0 \pm 0,0456$, $p=0,0268$).

Der *mKlk8-Knockdown* führte zudem zu einer signifikanten Erhöhung der TREM2-Spiegel bei transgenen Tieren um 26,7% und somit zur Anhebung der TREM2-Expression auf das Niveau gesunder Wildtypmäuse. (*hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/+}: $0,86 \pm 0,039$ vs. *hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/-}: $1,09 \pm 0,065$, $p=0,0002$; Referenz: *hAPP*^{-/-} *mKlk8*^{+/+} = 1).

Auch bei nicht-transgenen Tieren kam es durch den *mKlk8-Knockdown* zu einem statistisch signifikanten Anstieg der TREM2-Proteinspiegel um 17% (*hAPP*^{-/-} *mKlk8*^{+/+}: $1,0 \pm 0,045$ vs. *hAPP*^{-/-} *mKlk8*^{+/-}: $1,17 \pm 0,057$, $p=0,0221$). Die Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Mäusen waren nicht signifikant ($p>0.1$), daher werden die Daten männlicher und weiblicher Mäuse gepoolt dargestellt.

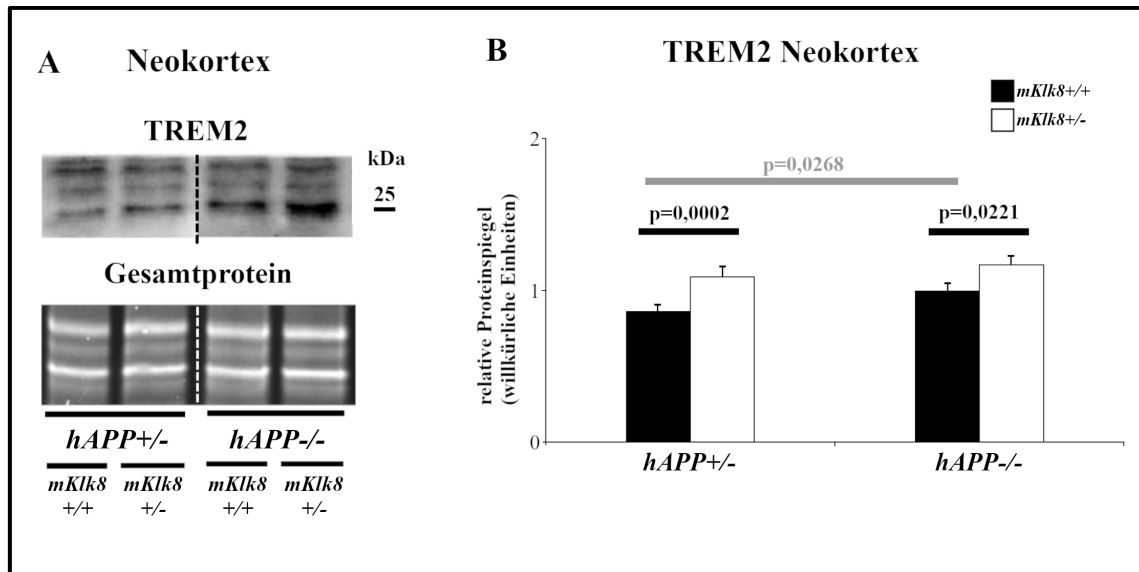


Abbildung 4: Der *mKlk8*-Knockdown führt zu einer Erhöhung der TREM2-Spiegel im Neokortex. (A) Repräsentative TREM2-Western-Blot Aufnahme (oben) und Gesamtprotein aus der Fluoreszenz-Gelelektrophorese (unten) als Lade-Kontrolle. Angabe der Proteingröße in Kilodalton (kDa). (B) Quantitative Darstellung der relativen TREM2-Spiegel in Neokortex transgener (*hAPP* +/-, links) und nicht-transgener (*hAPP* -/-, rechts) Tiere als Säulendiagramm. Angabe in Mittelwert \pm SEM. Der *mKlk8*-Knockdown (weiß, *mKlk8* +/-) führt in transgenen Tieren zu einer signifikanten Steigerung der TREM2-Proteinspiegel. Auch bei nicht transgenen Tieren (*hAPP* -/-, rechts) führte der *mKlk8*-Knockdown (weiß, *mKlk8* +/-) zu einer signifikanten Steigerung der TREM2-Proteinspiegel. Dabei ist zu betonen, dass der *Knockdown* in transgenen Tieren den TREM2-Spiegel auf das Niveau nicht transgener Wildtypen anhebt. Weiterhin ist zu beobachten, dass es durch die AD in Mäusen zu einer signifikanten Verringerung des TREM2-Spiegels kommt. Die schwarzen p-Werte beschreiben den *mKlk8*-Knockdown-Effekt. Der graue p-Wert beschreibt den *hAPP*-Transgen-Effekt für Wildtypen (*mKlk8* +/+). Gruppenverteilung: transgen (*hAPP* +/-); *mKlk8* +/+ : n(♂)=12, n(♀)=12; *mKlk8* +/- : n(♂)=11, n(♀)=12; nicht-transgen (*hAPP* -/-): *mKlk8* +/+ : n(♂)=13, n(♀)=10; *mKlk8* +/- : n(♂)=12, n(♀)=12. Die Daten männlicher und weiblicher Mäuse werden gepoolt dargestellt. Die Statistik erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Mann-Whitney-U-Test.

4.3 Der *mKlk8-Knockdown* hat keinen Einfluss auf die TNF- α Expression im Neokortex

Im Folgenden wird der Einfluss des *mKlk8-Knockdowns* auf die mikrogliale Zytotoxizität dargestellt. Dazu wurde TNF- α mittels Western-Blot im Neokortex nachgewiesen.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass die AD-ähnliche Pathologie in transgenen Tieren keinen signifikanten Effekt auf die TNF- α -Expression im Neokortex hatte. (*hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/+}: $0,95 \pm 0,041$ vs. *hAPP*^{-/-} *mKlk8*^{+/+}: $1,0 \pm 0,06$, $p > 0,1$) Ebenso hatte auch der *mKlk8-Knockdown* keinen signifikanten Effekt auf die neokortikalen TNF- α -Spiegel, weder in transgenen Tieren (*hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/+}: $0,95 \pm 0,04$ vs. *hAPP*^{+/-} *mKlk8*^{+/-}: $0,89 \pm 0,04$; $p > 0,1$), noch in nicht-transgenen Mäusen (*hAPP*^{-/-} *mKlk8*^{+/+}: $1,0 \pm 0,06$ vs. *hAPP*^{-/-} *mKlk8*^{+/-}: $0,96 \pm 0,08$; $p > 0,1$).

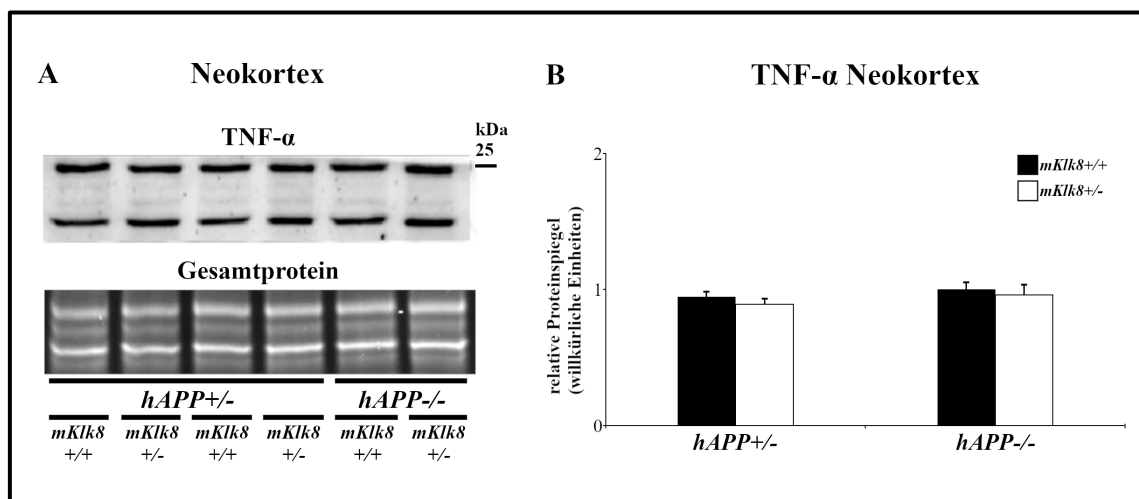


Abbildung 5: Der *mKlk8-Knockdown* hat keinen signifikanten Effekt auf die TNF- α -Proteinspiegel im Neokortex. (A) Repräsentative Western-Blot Aufnahmen der neokortikalen TNF- α -Spiegel (oben), sowie die Gesamtproteinmenge (unten) aus der Fluoreszenz-Gelelektrophorese. Angabe der Proteingröße in kDa. (B) Quantitative Darstellung der relativen TNF- α -Spiegel im Neokortex transgener (*hAPP*^{+/-}, linke Gruppe) und nicht transgener Mäuse (*hAPP*^{-/-}, rechte Gruppe). Angabe in Mittelwert \pm SEM. Weder das *hAPP*-Transgen noch der *mKlk8-Knockdown* zeigen einen statistisch signifikanten Effekt auf die neokortikalen TNF- α -Proteinspiegel ($p > 0,1$). Gruppenverteilung: transgen (*hAPP*^{+/-}); *mKlk8*^{+/+}: $n(\text{♂})=12$, $n(\text{♀})=12$; *mKlk8*^{+/-}: $n(\text{♂})=11$, $n(\text{♀})=12$; nicht-transgen (*hAPP*^{-/-}): *mKlk8*^{+/+}: $n(\text{♂})=13$, $n(\text{♀})=10$; *mKlk8*^{+/-}: $n(\text{♂})=12$, $n(\text{♀})=12$. Die Daten männlicher und weiblicher Mäuse werden gepoolt dargestellt. Die Statistik erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Mann-Whitney-U-Test.

5 DISKUSSION

Aufgrund der nach wie vor nicht abschließend geklärten Pathogenese und daraus folgend auch dem Mangel an effektiven Therapien stellt die AD eine der größten medizinischen Herausforderungen unserer Zeit dar.

Kallikrein-8 ist ein bis dato wenig bekannter Faktor im Kontext der AD, der bei der Entstehung dieser Krankheit möglicherweise eine entscheidende Rolle spielt. Unsere Arbeitsgruppe war die erste, die die Rolle von KLK8 in der AD näher erforscht hat. In vorherigen Arbeiten unseres Instituts konnte nicht nur gezeigt werden, dass die KLK8-Proteinspiegel schon bereits vor der Entstehung der Alzheimer-typischen Pathologien im Gehirn stark erhöht waren, sondern auch, dass eine temporäre Antikörper-vermittelte Inhibition des exzessiven KLK8 zur Verbesserung zahlreicher Alzheimer-assoziierten Veränderungen führte. Dabei ließen sich diese therapeutischen Effekte nicht nur auf molekularer oder neuropathologischer, sondern auch auf verhaltensphänotypischer Ebene nachweisen (Herring et al., 2016). In dieser Arbeit wurde der Effekt einer permanenten *Knockdown*-vermittelten 50%igen Reduktion auf die mikrogliale Neuroprotektion und Zytotoxizität untersucht.

5.1 Der *mKlk8-Knockdown* verbessert die Alzheimer-assoziierte mikrogliale Dysfunktion

Mikroglia spielen eine zentrale Rolle in der Eliminierung von toxischem A β und der Protektion umliegender Neuronen in der AD. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass es im Verlauf der AD zur mikroglialen Dysfunktion und Entwicklung einer chronischen Entzündungsreaktion kommt (Krabbe et al., 2013; Sarlus and Heneka, 2017). Diese fehlgeleitete mikrogliale Antwort konnte in dieser Arbeit anhand einer verringerten Anzahl von PAM im Hippokampus und den Basalganglien sowie verringerter TREM2-Proteinspiegel im Gehirn transgener Mäuse (im Vergleich zu gesunden Wildtypmäusen) bestätigt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein *mKlk8-Knockdown* zur Verbesserung dieser mikroglialen Dysfunktion führt, indem er die Anzahl der PAM im Hippokampus und den Basalganglien signifikant erhöht und die neokortikalen TREM2-Proteinspiegel in Alzheimer-erkrankten Mäusen auf physiologische Werte von

nicht-erkrankten Wildtypmäusen anhebt. Selbst bei nicht-transgenen Tieren wurde ein signifikanter Anstieg der TREM2-Proteinspiegel nachgewiesen. Der *mKlk8-Knockdown* hatte hingegen keinen Einfluss auf das proinflammatorisch wirkende TNF- α .

Insgesamt konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass es durch eine permanente 50%ige KLK8-Reduktion zur Verbesserung der mikroglialen Neuroprotektion kommt, indem er die Anzahl der PAM im Hippokampus und den Basalganglien und die neokortikalen TREM2-Proteinspiegel erhöht. Ein Effekt auf die neokortikalen TNF- α -Proteinspiegel konnte jedoch nicht beobachtet werden. Ebenso konnten in den hier untersuchten Parametern keine geschlechterspezifischen Unterschiede nachgewiesen werden. Die Ergebnisse legen jedoch nahe, dass es zu einer Verschiebung des mikroglialen Wirkspektrums zugunsten der Neuroprotektion kommt.

5.2 Funktion und Zusammenspiel der untersuchten Proteine

Mikroglia spielen als Immunzellen des zentralen Nervensystems eine Schlüsselrolle im gesunden sowie erkrankten Gehirn. Zu deren Hauptfunktion gehört die Erhaltung der empfindlichen Homöostase, die das reibungslose Arbeiten der Neuronen gewährleistet (Kettenmann et al., 2011). In der AD sind die Mikroglia in ihrer Funktion beeinträchtigt. Ergebnisse anderer Institute legen nahe, dass diese Dysfunktion durch die A β -Pathologie selbst ausgelöst wird und nicht umgekehrt (Krabbe et al., 2013). Die dysfunktionalen Mikroglia sind somit nicht in der Lage die Homöostase im Gehirn aufrecht zu erhalten. Weiterhin zeigen die Mikroglia in der AD vermehrt einen inflammatorischen Phänotyp, wodurch es zur weiteren Schädigung der umliegenden Neuronen kommt (Sarlus and Heneka, 2017). Durch die Bildung einer Barriere um die Plaques und deren Phagozytose sind sie zudem an der *Clearance* von A β und der Neuroprotektion beteiligt (Ulland et al., 2017; Wang et al., 2016; Yuan et al., 2016). Somit wäre es wünschenswert die Funktion der Mikroglia wiederherzustellen, um so die Neuroprotektion und mikrogliale A β -*Clearance* zu verstärken.

Mikroglia sind zudem auch an der Entstehung der A β -Plaques beteiligt. In der AD kommt es zunächst zur Bildung von locker gepackten diffusen A β -Plaques, die sich anschließend zu den pathognomischen *core*-Plaques mit dichtem Kern und einer Umgebungsreaktion mit dystrophen Neuriten und Mikroglia entwickeln (Röhr et al., 2020; Serrano-Pozo et

al., 2011). Mikroglia orientieren sich schon innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Entstehung der Plaques zu diesen und umgeben sie mit ihren Fortsätzen (Meyer-Luehmann et al., 2008). Die Plaques werden durch die PAM kompaktiert, was zudem den Übergang in die oben genannten *core*-Plaques begünstigt und die Abschirmung der umliegenden Neuronen vor toxischen A β -Spezies bewirkt (Condello et al., 2015; Yuan et al., 2016). Die Anzahl der Plaque-assoziierten-Mikroglia ist dabei proportional zu der von mikroglialen Fortsätzen bedeckten Plaqueoberfläche. Dementsprechend sind auch die neuroprotektiven Eigenschaften der Mikroglia wie die Komprimierung der Plaques und Bildung einer Barriere direkt abhängig von der Anzahl der PAM. An diesen essenziellen Schritten ist insbesondere der auf Mikroglia vorhandene Rezeptor TREM2 beteiligt. (Condello et al., 2015; Jay et al., 2017).

TREM2 hat sich in den letzten Jahren zu einem wichtigen Baustein der Alzheimer-Pathogenese entwickelt. TREM2 ist ein Transmembranrezeptor mit Immunglobulinkomponente, der sich im zentralen Nervensystem ausschließlich auf Mikroglia befindet und Lipide um A β bindet (Ulrich et al., 2017; Yeh et al., 2016). Er nimmt eine zentrale Rolle im mikroglialen Energiehaushalt ein und moduliert in der AD den Übergang der Mikroglia in einen aktivierten, krankheitsassoziierten Subtyp (Keren-Shaul et al., 2017; Ulland et al., 2017). Darüber hinaus ist TREM2 an der mikroglialen Orientierung zu den Plaques sowie der Polarisierung der Fortsätze beteiligt und trägt somit entscheidend zur Bildung der mikroglialen Barriere und so zur Protektion der umliegenden Neuronen bei. Verdeutlicht wird die wichtige Rolle von TREM2 anhand der R47H Risikovariante, die das Risiko an AD zu erkranken ebenso stark erhöht wie das APOE ϵ 4 Allel (Guerreiro et al., 2013; Holtzman et al., 2012). Wichtig ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass sowohl ein quantitativer als auch ein funktioneller Mangel, wie beispielsweise die TREM2 R47H Mutation, zur Exazerbation der AD-Pathologie führt (Guerreiro et al., 2013; Jonsson et al., 2013; Yuan et al., 2016). Die bei Mangel oder Mutationen von TREM2 beobachtete Abnahme der PAM scheint dabei das Ergebnis gehemmter Proliferation und verminderten Überlebens der Mikroglia zu sein. (Ulland et al., 2017; Wang et al., 2016). Die Mikroglia zeigen zudem auch strukturelle Veränderungen wie dünnere Fortsätze und verlieren ihre Fähigkeit die Plaques zu kompaktieren und mit einer schützenden Barriere zu umgeben. Die Folge sind freiliegende, nicht bedeckte Amyloidfibrillen, die nach außen strahlen und somit auch

eine verstärkte neuritische Dystrophie (Wang et al., 2016; Yuan et al., 2016). Es wurden auch durch TREM2 vermittelte positive Effekte auf die mikrogliale Phagozytoseaktivität beschrieben. Der Einfluss von TREM2 auf die mikrogliale Phagozytoseaktivität ist noch nicht abschließend geklärt. Aktuell geht man davon aus, dass ein TREM2-Mangel zur Beeinträchtigung der Phagozytose führt. Es gibt jedoch auch eine Arbeit, die schlussfolgert, dass TREM2 über die Expression von CD36 sogar zwingend für die Phagozytose von A β erforderlich ist. (Kim et al., 2017; Yeh et al., 2016). Andere Arbeiten legen nahe, dass die Phagozytose zwar durch einen TREM2-Mangel beeinträchtigt ist, dieser Mangel aber nicht allein in der Lage ist, die Effekte der exazerbierten A β -Pathologie zu erklären (Yuan et al., 2016).

Neben den neuroprotektiven Funktionen sind Mikroglia auch in der Lage, über verschiedene Effektoren den Zelltod auszulösen und die Neuroinflammation zu verstärken (Sarlus and Heneka, 2017). TNF- α zählt in dieser Hinsicht zu den bekanntesten Vertretern. Obwohl die Effekte von TNF- α in der AD nicht abschließend geklärt sind, übt TNF- α im Kontext der AD in erster Linie zytotoxische und proinflammatorische Effekte aus. So zeigen Alzheimer-Erkrankte mit erhöhten TNF- α -Spiegeln eine schnellere Krankheitsprogression, während gegen TNF- α gerichtete *Biologica* das Risiko an der AD zu erkranken senken (Brosseron et al., 2014; Zhou et al., 2020). In der AD kommt es durch die chronische Aktivierung der Mikroglia zur Ausschüttung von TNF- α und somit zur Bildung eines proinflammatorischen Milieus. Zusammen mit der Alzheimer-Pathologie kann TNF- α über Aktivierung des TNFR1 zytotoxisch wirken und somit zum Zelltod der Neuronen führen (Dostert et al., 2019; He et al., 2007).

5.3 Einordnung meiner Ergebnisse in den Gesamtkontext der Alzheimer-Krankheit

Zur korrekten Einordnung meiner Ergebnisse muss man zunächst zwei Tatsachen hervorheben: Zum einen, dass sich Mikroglia nicht strikt in einen proinflammatorischen und neuroprotektiven Subtypen einteilen lassen. Vielmehr ist die mikrogliale Aktivierung ein dynamischer Prozess, der sich auf einem Spektrum zwischen beiden Eigenschaften bewegt (Sarlus and Heneka, 2017; Wolf et al., 2017). Zum anderen, dass die Mäuse in dieser Arbeit zu einem späten Zeitpunkt in einem fortgeschrittenen Stadium der AD

untersucht wurden ($P=226$). In dieser Arbeit wurde eine *Knockdown*-vermittelte Erhöhung der PAM im Hippokampus und den Basalganglien, nicht jedoch im Neokortex beobachtet. Übereinstimmend zeigte eine frühere Arbeit unseres Instituts, dass die Antikörper-vermittelte KLK8-Inhibition ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf die PAM im Neokortex, dafür jedoch eine Erhöhung in den Basalganglien hervorrief (Herring et al., 2016). Vorherige Arbeiten legen nahe, dass es sich bei der Proliferation von Mikroglia ebenso wie der Orientierung zu den A β -Plaques um ein frühes Ereignis in der Pathogenese der AD handelt (Meyer-Luehmann et al., 2008). Der Neokortex ist als erstes und am stärksten von der Plauepathologie betroffen, während der Hippokampus und die Basalganglien später und weniger stark betroffen sind (Thal et al., 2002). In den später betroffenen Arealen besteht somit noch größeres Potential zur Komprimierung der Plaques und deren Phagozytose, da es sich bei den Plaques noch um neuere, diffuser arrangierte Amyloid-Ablagerungen handelt. In einer Vorarbeit unserer Arbeitsgruppe fanden sich im Neokortex bereits zu einem früheren Zeitpunkt (P185) schon wesentlich mehr *core*- als diffuse Plaques (Herring et al., 2016). Es kann also vermutet werden, dass die wesentlichen Prozesse im Neokortex zu diesem späten Zeitpunkt schon beinahe abgeschlossen sind. Zur abschließenden Klärung dieser Frage sollten jedoch noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Interessanterweise beobachteten wir zudem eine erniedrigte Anzahl diffuser Plaques in allen drei untersuchten Arealen sowie eine Verringerung der *core*-Plaques in den Basalganglien. Dabei wäre denkbar, dass ein Teil dieser Effekte durch die Erhöhung der PAM und damit verbundenen verstärkten Phagozytose hervorgerufen wird.

Die erhöhte TREM2-Konzentration legt eine Verbesserung zahlreicher mikroglialer Funktionen nahe. Zwar gibt es auch Studien, die zeigen, dass der Verlust von TREM2 vor allem zu Beginn der AD die Plauepathologie und gleichzeitig die Expression inflammatorischer Proteine vermindert. In den späten Stadien des TREM2-Verlustes kommt es jedoch zur Exazerbation der Plauepathologie mit großen und diffusen Plaques, sowie zu einer Verminderung der PAM und Phagozytose (Jay et al., 2017). Da die Mäuse in dieser Arbeit in einem fortgeschrittenen Stadium der AD untersucht worden sind, ist auch hier von einem positiven Effekt auf die mikrogliale Funktion auszugehen. Übereinstimmend konnten wir in Zellkulturen beobachten, dass der *Knockdown* die Resilienz der Mikroglia gegenüber A β_{42} steigert. Darüber hinaus wiesen wir eine

Verbesserung der mikroglialen Phagozytose durch den *Knockdown* nach (Herring et al., 2021). Interessanterweise gibt es auch Arbeiten, die gerade zu Beginn der AD eine Erhöhung von TREM2 beobachten (Guerreiro et al., 2013). Diese Daten stehen nicht im Widerspruch zu unseren Beobachtungen. Ursache hierfür könnte eine stärkere initiale Aktivierung der Mikroglia zu Beginn der Plauepathologie sein, die im weiteren Verlauf langsam abklingt. In einer Arbeit aus unserem Institut ließ sich genau diese Abnahme von TREM2 im weiteren Progress der AD beobachten. Insbesondere waren im moderaten Stadium der AD auch Weibchen stärker betroffen als männliche transgene Tiere (Keyvani et al., 2018). Auch hier sind weitere Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten im Hinblick auf geschlechterspezifische Unterschiede notwendig.

Der *Knockdown* zeigte keine signifikanten Effekte auf die neokortikalen TNF- α -Proteinspiegel. In Zusammenschau mit den anderen Parametern lässt sich jedoch vermuten, dass es dennoch zur Abnahme der Zytotoxizität kommt, da sich das Wirkspektrum insgesamt zugunsten der Neuroprotektion verschiebt. TNF- α ist je nach Milieu und dem von ihm aktivierten Rezeptor in der Lage, das Überleben von Neuronen und Mikroglia zu verbessern (Dostert et al., 2019; Janelins et al., 2008). In diesem Zusammenhang wäre es für zukünftige Arbeiten interessant, die Proteinspiegel der verschiedenen TNF- α -Rezeptoren zu untersuchen, da hauptsächlich der TNFR1 für die Zytotoxizität verantwortlich ist. Hingegen wäre eine Steigerung von TNFR2 eher ein Hinweis auf protektive und regenerative Prozesse.

5.4 Mögliche Mechanismen der *Knockdown*-vermittelten Effekte

Wie Kallikrein-8 seine Effekte ausübt, ist noch nicht abschließend geklärt. In vorherigen Arbeiten konnten wir jedoch schon einige Substrate und Signalwege identifizieren. Zu den Substraten zählen unter anderem L1CAM, Fibronectin, NRG-1 und EPHB2. All diese Proteine und Rezeptoren sind auch an der AD-Pathologie beteiligt (Matsumoto-Miyai et al., 2003; Shimizu et al., 1998; Tamura et al., 2012). Besonders hervorzuheben ist an dieser Stelle der Einfluss auf den EPHB2 Signalweg. Durch Spaltung von EPHB2 kommt es zur verstärkten Expression von FKB5. Dieses erhöht wiederum die Glukokortikoidsensitivität und verstärkt somit die Ängstlichkeit (Attwood et al., 2011). Vereinbar mit diesen Beobachtungen konnten wir schon durch eine vierwöchige

Antikörpertherapie eine Reduktion der Ängstlichkeit und Normalisierung der molekularen Signatur nachweisen. (Herring et al., 2016). Diese Ergebnisse konnten weiter durch unseren genetischen Ansatz verifiziert werden (Herring et al., 2021).

Die Zusammenhänge zwischen Kallikrein-8 und seinen Substraten, hier besonders hervorzuheben EPHB2, und den in dieser Arbeit untersuchten Proteinen TREM2 sowie TNF- α sind noch Gegenstand aktueller Forschung. Eine Arbeit konnte eine Steigerung von EPHB2 durch Bindung von TNF- α an den TNFR2 über den NF-KB Signalweg nachweisen (Pozniak et al., 2016). Über die Regulation von TREM2 und einen Zusammenhang mit KLK8 oder EPHB2 gibt es bis dato keine Arbeiten. Hinweise auf eine Interaktion zwischen EPHB2 und TREM2 könnte eine Vorarbeit aus unserem Institut geben. Dort führte die Inkubation eines Anti-EPHB2-Antikörpers zur Aufhebung der KLK8-Antikörper vermittelten Effekte auf die Phagozytoseaktivität. Hier ergibt sich der Verdacht, dass auch TREM2 durch den EPHB2-Signalweg beeinflusst werden könnte (Herring et al., 2016). Dennoch sind weitere Arbeiten notwendig, die die Interaktion zwischen den hier untersuchten Proteinen untersuchen.

5.5 Geschlechterspezifische Unterschiede der KLK8-Proteinspiegel in der Alzheimer-Krankheit

Frauen erkranken wesentlich häufiger an der AD als Männer (2021 Alzheimer's disease facts and figures, 2021; Kisa et al., 2022). Die Ursache hierfür ist nicht abschließend geklärt. Es konnten jedoch im Rahmen von vorherigen Untersuchungen aus unserem Institut geschlechterspezifische Unterschiede in der AD selbst und auch bei der KLK8-Expression beobachtet werden. Zunächst scheinen transgene weibliche Mäuse zum einen früher und zum anderen auch stärker von der AD-Pathologie betroffen zu sein. Eine Ursache für diese Unterschiede könnte die frühe (P90) im Vergleich zu männlichen transgenen Tieren stärker ausgeprägte KLK8-Erhöhung von circa 25% in transgenen weiblichen Mäusen sein. Diese KLK8-Erhöhung konnte darüber hinaus auch beim Menschen nachgewiesen werden. Hier zeigten Frauen ebenfalls wesentlich höhere KLK8-Proteinspiegel im Hippokampus als Männer. (Herring et al., 2016; Keyvani et al., 2018). Als mögliche Ursache konnte das weibliche Sexualhormon Estradiol identifiziert

werden, welches im Gegensatz zu Dihydrotestosteron in der Lage ist, die KLK8-Produktion zu induzieren (Keyvani et al., 2018).

Interessanterweise zeigten sich auch in der mikroglialen Funktion wichtige geschlechterspezifische Unterschiede. Zunächst ist die Anzahl der PAM in der Nähe von diffusen Plaques in transgenen Weibchen im Vergleich zu männlichen Tieren erniedrigt, während die Anzahl von diffusen und *core*-Plaques, die von keinerlei Mikroglia umgeben waren, in Weibchen erhöht war. Darüber hinaus zeigten sich die TREM2-Proteinspiegel bei weiblichen AD-Mäusen bereits ab P180 schon signifikant verringert, verglichen mit männlichen Mäusen. Diese fallen dann bis P360 weiter ab und sinken auf ein ähnliches Niveau wie in männlichen Mäusen. Zudem zeigten weibliche, an Alzheimer erkrankte Mäuse, in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (P360) höhere TNF- α -Proteinspiegel, verglichen mit den männlichen Versuchstieren (Keyvani et al., 2018). Interessanterweise ließen sich in dieser Arbeit keine geschlechtsspezifischen Unterschiede nachweisen. Ursache hierfür könnte im Hinblick auf die Anzahl der PAM und TREM2 auch hier der Untersuchungszeitpunkt sein. Gegebenenfalls ließen sich zu einem früheren Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen transgenen Mäusen nachweisen, sodass auch hier weitere Untersuchungen notwendig sind.

5.6 Weitere Effekte einer *Knockdown*-vermittelten *mKlk8*-Reduktion

In unserer Arbeitsgruppe wurden neben den Auswirkungen des *mKlk8-Knockdowns* auf die mikrogliale Neuroprotektion und Zytotoxizität auch zahlreiche andere Facetten der AD untersucht.

Analog zur vorherigen Arbeit aus unserem Institut konnten erhöhte KLK8-Proteinspiegel bei transgenen Mäusen gegenüber Wildtypen, sowie auch bei transgenen Weibchen gegenüber transgenen Männchen beobachtet werden. Der *Knockdown* führte zudem zur Verbesserung zahlreicher Faktoren. Hervorzuheben sind hier die Effekte auf die neuropathologischen Hauptmerkmale. Beispielsweise kam es *Knockdown*-vermittelt zur Reduktion der diffusen A β -Plaques im Neokortex, Hippokampus und den Basalganglien. Zudem wurde eine erniedrigte Anzahl der *core*-Plaques in den Basalganglien beobachtet. Zum einen wird dabei die hAPP-Prozessierung beeinflusst, da die Produkte der amyloidogenen Prozessierung wie A β ₄₂ und CTF- β vermindert waren, während sAPP α

(im Trend) erhöht war. Die BACE1-Proteinspiegel zeigten sich ebenfalls vermindert. Zum anderen ist es auch denkbar, dass die *Knockdown*-vermittelte Erhöhung der PAM im Hippokampus und den Basalganglien sowie die Erhöhung der neokortikalen TREM2-Spiegel zur verbesserten Phagozytose und somit Verringerung der A β -Plaques beiträgt. Darüber hinaus wurde auch die vaskuläre *Clearance*, die ebenfalls eine wichtige Rolle in der Eliminierung von A β spielt verbessert. Im Rahmen der 4-wöchigen Anti-KLK8-Antikörpertherapie zeigten sich bereits Verbesserungen der A β -Transporter. Analog konnte auch hier, vermittelt durch den *Knockdown*, eine Steigerung der A β -Efflux-Transporter *Multidrug Resistance Protein 1B* (MDR1) und *low density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) (in transgenen Weibchen) auf Wildtypniveau nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur temporären Antikörper-vermittelten KLK8-Inhibition führt die permanente *Knockdown*-vermittelte Reduktion außerdem zur Anhebung der Gefäßdichte im Hippokampus transgener Tiere auf Wildtypniveau sowie zur Verringerung des A β -Influx-Transporters *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) in transgenen Weibchen (Herring et al., 2021).

Darüber hinaus wurden auch Verbesserungen des zweiten Hauptmerkmals, der Tau-Pathologie, beobachtet. In erster Linie verbesserte sich vermittelt durch den *Knockdown* das Verhältnis von phosphoryliertem zum Gesamt-Tau, durch eine Steigerung des Gesamt-Tau.

Auch die pathologisch verminderte Synaptogenese wurde durch den *Knockdown* verbessert, indem die neuronale Proliferation und Differenzierung im Hippokampus gesteigert wird. Auch die *Spine*-Dichte (in transgenen Weibchen) und Komplexität dieser Verbindungen wurde durch den *Knockdown* signifikant erhöht. Wie erwartet kam es in diesem Zusammenhang auch zum Anstieg der in transgenen Tieren verminderten KLK8-Substrate EPHB2, L1CAM und Fibronectin.

Neben den neuropathologischen und biochemischen Verbesserungen wurden auch klinisch positive Effekte beobachtet. Analog zur temporären KLK8-Blockade zeigten sich auch hier *Knockdown*-vermittelte anxiolytische Effekte wie ein ausgeprägteres Erkundungsverhalten. Außerdem kam es zur Verbesserung der Objekterkennung (Herring et al., 2021).

In Zusammenschau der Ergebnisse sind durch die Verbesserung von zahlreichen Aspekten der AD wie der mikroglialen Dysfunktion und der neurovaskulären Einheit signifikante Effekte auf die Neuroprotektion und der A β -*Clearance* und somit auch auf die A β -Pathologie zu erwarten. Diese Veränderungen auf molekularer Ebene zeigen sich auch in Form von klinischen und verhaltensphänotypischen Verbesserungen.

5.7 Grenzen dieser Arbeit und dieses Mausmodells

Die Grundlage dieser Arbeit bildet das transgene CRND8-Mausmodell. Daraus ergeben sich Grenzen der Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf den Menschen. Zunächst bestehen Unterschiede zwischen den beiden Spezies an sich wie beispielsweise unterschiedliche KLK8-Proteinspiegeln im Verlauf der AD. So kommt es bei Alzheimer-erkrankten Mäusen kurz nach Beginn erneut zu einem Anstieg und anschließend erst zum Abfall von KLK8 mit zunehmendem Alter. Bei Menschen sind die höchsten KLK8-Proteinspiegel hingegen zu Beginn der AD zu beobachten, die dann im Verlauf abfallen (Keyvani et al., 2018).

Durch den genetischen *Knockdown* wurde zudem eine permanente Reduktion von KLK8 herbeigeführt. Diese permanente Reduktion schränkt die Übertragbarkeit ein, da sie an sich nicht physiologisch ist und eine permanente Reduktion an auch nicht wünschenswert ist. Allerdings hilft uns der genetische Ansatz in diesem Fall bei der Frage, ob die beobachteten Effekte tatsächlich auf die KLK8-Reduktion und nicht auf unspezifische Effekte des zuvor verwendeten Anti-KLK8-Antikörpers zurückzuführen sind.

Des Weiteren ist das TgCRND8 Mausmodell durch die verwendeten Mutationen des *hAPP*-Gens als Modell für eine erbliche und früh auftretende Variante der AD zu verstehen. Wie bereits erwähnt, macht die LOAD mit ihrer multifaktoriellen Genese den Großteil der Alzheimer-Erkrankungen aus, während die erblich bedingten, autosomal dominanten Formen der AD, nur einen Bruchteil von circa 1% der Alzheimer-Erkrankungen ausmacht (Bekris et al., 2010). Allerdings zeigen unsere Arbeiten, dass es sowohl durch die permanente Reduktion als auch durch die temporäre Inhibition von KLK8 zur Verbesserung der kompromittierten mikroglialen und neurovaskulären *Clearance*-Mechanismen kommt. Gerade diese eingeschränkte *Clearance* stellt ein Hauptproblem der LOAD dar (Selkoe and Hardy, 2016). Wir konnten in unserer Arbeit

darüber hinaus nachweisen, dass die KLK8-Reduktion neben der *Clearance* zahlreiche weitere Aspekte, insbesondere auch die Neuroprotektion, verbessert und somit auch einen multifaktoriellen Ansatz darstellt. Für das von uns verwendete Mausmodell sprechen zudem die Parallelen in Bezug auf die Alzheimerpathologie per se und im Hinblick auf die Symptomatik. So zeigen Mäuse ähnlich wie Alzheimer-Erkrankte stärker ausgeprägte Ängstlichkeit und die typischen Einschränkungen der Gedächtnisfunktion (Herring et al., 2021; Herring et al., 2016).

Es bleibt somit erst einmal abzuwarten, inwieweit die Ergebnisse aus dem Mausmodell auf den Menschen übertragbar sind. Die von uns beobachteten Parallelen sowie multifaktoriellen Verbesserungen durch den *mKlk8-Knockdown* sprechen jedoch für eine kausale Rolle von KLK8 in der Alzheimer-Pathologie.

5.8 Kallikrein-8 als Chance in der Therapie der Alzheimer-Krankheit

Die bis dato wenig bekannte Serinprotease Kallikrein-8 ist ein vielversprechendes Zielmolekül für die Diagnostik und Therapie der AD. Die Tatsache, dass stark erhöhte Kallikrein-8-Proteinspiegel schon lange vor Beginn der Alzheimer-Pathologie und dazu auch noch in Hirnarealen, die wenig und erst spät von der AD betroffen sind, nachgewiesen werden können, legen eine kausale Rolle in der AD nahe. Zudem beeinflusst KLK8, obwohl es nur ein Protein ist, eine Reihe von verschiedenen Signalwegen (Herring et al., 2021; Herring et al., 2016). Zudem lässt sich diese Erhöhung auch als diagnostisches Verfahren nutzen, da die Kallikrein-8-Bestimmung im Liquor genauso gute Ergebnisse wie die konventionellen Marker zeigt. Dabei ist sie diesen zur Diagnose der MCI sogar überlegen (Teuber-Hanselmann et al., 2020). In dieser Arbeit wurde ein *Knockdown*-vermittelter neuroprotektiver Effekt der Mikroglia in Bezug auf die Alzheimerpathologie nachgewiesen. Es kam zur Erhöhung der PAM und TREM2-Proteinspiegel, während keine Effekte auf die TNF- α -Konzentration zu beobachten waren. In unserem Institut konnten wir zudem zeigen, dass die Substrate von KLK8, EPHB2, L1CAM, Neuregulin und Fibronectin, die ebenfalls eine Rolle in der AD spielen, durch den *Knockdown* erhöht wurden. Aber auch im Bereich der Synaptogenese, der Neurovaskulären Einheit und die A β -Pathologie selbst wurden zahlreiche positive Effekte beobachtet.

Aus diesen Ergebnissen kann man zwei Schlussfolgerungen ziehen: Zum einen wird dadurch bestätigt, dass die Effekte der KLK8-Antikörpertherapie tatsächlich auf einer KLK8-Inhibition beruhen. Zum anderen ergeben sich daraus Hinweise, dass ein früher Therapiebeginn einen größeren therapeutischen Benefit mit sich bringt. Zudem wurden *Knockdown*-vermittelt in den von mir untersuchten Proteinen keine negativen Effekte auf gesunde Wildtypmäuse beobachtet. Insgesamt zeigen sich durch den *Knockdown* selbst in gesunden Wildtypmäusen kaum negative Effekte. Es wurde lediglich eine geringfügige Abnahme von EPHB2, MDR1 und Beclin-1 in Wildtypmäusen sowie eine leicht verringerte *Spine*-Dichte in männlichen Wildtypmäusen beobachtet (Herring et al., 2021).

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass Kallikrein-8 eine wichtige Rolle in der Entstehung der Alzheimerkrankheit spielt, da durch den *Knockdown* Verbesserungen in zahlreichen und insbesondere den Hauptmechanismen der AD beobachtet wurden. Zuvor konnten wir zeigen, dass es zu einem Anstieg von Kallikrein-8 auch in wenig betroffenen Hirnarealen und bereits bevor erste klinische Symptome auftreten, kommt (Herring et al., 2016). Hervorzuheben ist an dieser Stelle auch, dass es zu einer Verbesserung der kompromittierten *Clearance*-Mechanismen durch Verbesserung der mikroglialen sowie neurovaskulären Dysfunktion kommt. Zu klären bleibt jedoch, wie KLK8 im Detail seine Effekte in der AD ausübt. Mit dieser Arbeit wurde bereits ein wichtiger Teil zur Grundlagenforschung und zum weiteren Verständnis der Alzheimer-Krankheit und der Rolle von KLK8 beigetragen.

Es bleibt weiterhin die Frage bestehen, ob sich die vielversprechenden Ergebnisse aus den Tierversuchen auch auf den Menschen übertragen lassen. Dazu bedarf es weiterer Studien. Gerade vor dem Hintergrund der ernüchternden Ergebnissen des gegen A β gerichteten Antikörpers Aducanumab stellt die KLK8-Antikörpertherapie als alternativer multifaktorieller Ansatz eine große Chance für Millionen Alzheimer-Erkrankte weltweit dar (Mullard, 2021). Mit dem vorhandenen diagnostischen Potential der KLK8 Bestimmung im Liquor und Serum in Kombination mit der Antikörpertherapie bietet sich somit in Zukunft möglicherweise die Chance einer individualisierten Alzheimer-Therapie.

Zusammenfassend handelt es sich bei Kallikrein-8 um ein vielversprechendes Protein im Kontext der AD, da es einen pathophysiologischen, diagnostischen und sogar therapeutischen Ansatz darstellt. In dieser Arbeit konnten durch eine permanente *Knockdown*-vermittelte 50%ige Reduktion von KLK8 positive Effekte auf die mikrogliale Funktion im Rahmen der AD nachgewiesen werden. Konkret führt der *mKlk8-Knockdown* dabei zur Steigerung der PAM im Hippokampus und den Basalganglien und der neokortikalen TREM2-Proteinspiegel und somit zu einer Verschiebung der Mikroglia in Richtung eines neuroprotektiven Wirkspektrums.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In einer vorherigen Arbeit unseres Instituts konnte gezeigt werden, dass eine temporäre Antikörper-vermittelte Reduktion der Serinprotease Kallikrein-8 (KLK8), die im Rahmen der Alzheimer-Krankheit übermäßig im Gehirn der Erkrankten exprimiert wird, zu zahlreichen Verbesserungen der Alzheimer-Pathologie führte. In dieser Arbeit wurde nun der Effekt einer permanenten, *Knockdown*-vermittelten Kallikrein-8-Reduktion auf die mikrogliale Neuroprotektion und Zytotoxizität in einem transgenen CRND8 Mausmodell untersucht. Dabei erfolgte der Vergleich zwischen transgenen Mäusen mit und ohne Kallikrein-8-Knockdown und Wildtypmäusen mit und ohne Kallikrein-8-Knockdown in beiden Geschlechtern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Anzahl Plaque-assoziiierter Mikroglia im Neokortex, Hippokampus und den Basalganglien stereologisch quantifiziert. Außerdem wurden die neokortikalen Proteinspiegel von *Triggering Receptor Expressed in Myeloid Cells 2* (TREM2) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) mittels Western Blot bestimmt.

Wir konnten dabei zeigen, dass ein Kallikrein-8-*Knockdown* die mikrogliale Funktion verbessert, indem es die Anzahl Plaque-assoziiierter Mikroglia im Hippokampus und den Basalganglien erhöht. Darüber hinaus führt der Kallikrein-8-*Knockdown* zur Anhebung der neokortikalen TREM2-Proteinspiegel in transgenen Tieren auf das Niveau gesunder Wildtypmäuse. Ein signifikanter Effekt auf die neokortikalen TNF- α -Proteinspiegel konnte ebenso wie geschlechterspezifische Unterschiede allerdings nicht beobachtet werden.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die in der Alzheimer Krankheit pathologisch erhöhten Kallikrein-8-Proteinspiegel eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Alzheimer Krankheit einnehmen. Somit bietet sich Kallikrein-8 durch die vielfältigen Effekte als vielversprechendes Zielprotein für zukünftige Diagnostik und Therapien an und sollte im Hinblick darauf weiter mittels klinischer Studien evaluiert werden.

7 SUMMARY

Previous work from our laboratory has shown, that a temporary antibody-mediated reduction of the serine-protease Kallikrein-8 (KLK8), which is overexpressed in the human and transgenic murine brain affected by Alzheimer's disease (AD), leads to amelioration of multiple features of AD including microglial dysfunction. In this work the effects of a permanent knockdown-mediated reduction of Kallikrein-8 on the microglial neuroprotection and cytotoxicity in a transgenic CRND8 mouse model was further examined. We therefore compared transgenic mice with and without Kallikrein-8-knockdown and wildtype mice with and without KLK8-knockdown of both sexes.

This was achieved through stereological quantification of plaque-associated microglia in the neocortex, hippocampus, and basal ganglia. Furthermore, the neocortical protein levels of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 (TREM2) and Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) were measured by using Western blot.

In this work we were able to demonstrate, that the knockdown of Kallikrein-8 improves the microglial function in AD by increasing the number of plaque-associated microglia in the hippocampus and basal ganglia. In addition, the Kallikrein-8-knockdown leads to a rise of the neocortical TREM2 protein levels in AD affected mice to that of healthy wildtype mice. A significant effect on the neocortical TNF- α levels could not be observed. In this work we showed that the pathologically high Kallikrein-8 protein levels play a significant role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Thereby Kallikrein-8 presents itself as a promising diagnostic and therapeutic target, which should be further examined through clinical studies.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. 2021 Alzheimer's disease facts and figures. (2021). *Alzheimer's & Dementia* 17, 327-406.
2. Asai, H., Ikezu, S., Tsunoda, S., Medalla, M., Luebke, J., Haydar, T., Wolozin, B., Butovsky, O., Kügler, S., and Ikezu, T. (2015). Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* 18, 1584-1593.
3. Attwood, B.K., Bourgeois, J.-M., Patel, S., Mucha, M., Schiavon, E., Skrzypiec, A.E., Young, K.W., Shiosaka, S., Korostynski, M., Piechota, M., Przewlocki, R., and Pawlak, R. (2011). Neuropsin cleaves EphB2 in the amygdala to control anxiety. *Nature* 473, 372-375.
4. Bekris, L.M., Yu, C.-E., Bird, T.D., and Tsuang, D.W. (2010). Review Article: Genetics of Alzheimer Disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 23, 213-227.
5. Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239-259.
6. Brosseron, F., Krauthausen, M., Kummer, M., and Heneka, M.T. (2014). Body fluid cytokine levels in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a comparative overview. *Mol Neurobiol* 50, 534-544.
7. Cacace, R., Slegers, K., and Van Broeckhoven, C. (2016). Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement* 12, 733-748.
8. Chishti, M.A., Yang, D.S., Janus, C., Phinney, A.L., Horne, P., Pearson, J., Strome, R., Zuker, N., Loukides, J., French, J., Turner, S., Lozza, G., Grilli, M., Kunicki, S., Morissette, C., Paquette, J., Gervais, F., Bergeron, C., Fraser, P.E., Carlson, G.A., George-Hyslop, P.S., and Westaway, D. (2001). Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem* 276, 21562-21570.
9. Condello, C., Yuan, P., Schain, A., and Grutzendler, J. (2015). Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A β 42 hotspots around plaques. *Nature Communications* 6, 1-14.
10. Decourt, B., Lahiri, D.K., and Sabbagh, M.N. (2017). Targeting Tumor Necrosis Factor Alpha for Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 14, 412-425.
11. Dhawan, G., Floden, A.M., and Combs, C.K. (2012). Amyloid- β oligomers stimulate microglia through a tyrosine kinase dependent mechanism. *Neurobiol Aging* 33, 2247-2261.

12. Dostert, C., Grusdat, M., Letellier, E., and Brenner, D. (2019). The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond. *Physiol Rev* 99, 115-160.
13. Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J.S., Younkin, S., Hazrati, L., Collinge, J., Pocock, J., Lashley, T., Williams, J., Lambert, J.C., Amouyel, P., Goate, A., Rademakers, R., Morgan, K., Powell, J., St George-Hyslop, P., Singleton, A., and Hardy, J. (2013). TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 368, 117-127.
14. Guo, T., Noble, W., and Hanger, D.P. (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol* 133, 665-704.
15. Habib, A., Sawmiller, D., and Tan, J. (2017). Restoring Soluble Amyloid Precursor Protein α Functions as a Potential Treatment for Alzheimer's Disease. *J Neurosci Res* 95, 973-991.
16. He, P., Zhong, Z., Lindholm, K., Berning, L., Lee, W., Lemere, C., Staufenbiel, M., Li, R., and Shen, Y. (2007). Deletion of tumor necrosis factor death receptor inhibits amyloid beta generation and prevents learning and memory deficits in Alzheimer's mice. *J Cell Biol* 178, 829-841.
17. 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., Döbersalske, C., Schramm, S., Jöckel, K.H., Münster, Y., and Keyvani, K. (2021). Genetic knockdown of Klk8 has sex-specific multi-targeted therapeutic effects on Alzheimer's pathology in mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* 47, 611-624.
18. Herring, A., Münster, Y., Akkaya, T., Moghaddam, S., Deinsberger, K., Meyer, J., Zahel, J., Sanchez-Mendoza, E., Wang, Y., Hermann, D.M., Arzberger, T., Teuber-Hanselmann, S., and Keyvani, K. (2016). Kallikrein-8 inhibition attenuates Alzheimer's disease pathology in mice. *Alzheimers Dement* 12, 1273-1287.
19. Hirata, A., Yoshida, S., Inoue, N., Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Taniguchi, M., Matsuyama, T., Kato, K., Iizasa, H., Kataoka, Y., Yoshida, N., and Shiosaka, S. (2001). Abnormalities of synapses and neurons in the hippocampus of neuropsin-deficient mice. *Mol Cell Neurosci* 17, 600-610.
20. Holtzman, D.M., Herz, J., and Bu, G. (2012). Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, 1-24.
21. Hong, S., Beja-Glasser, V.F., Nfonoyim, B.M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K.M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B.A., Lemere, C.A., Selkoe, D.J., and Stevens, B. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* 352, 712-716.

22. Jack, C.R., Jr., Bennett, D.A., Blennow, K., Carrillo, M.C., Dunn, B., Haeberlein, S.B., Holtzman, D.M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J.L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K.P., Rowe, C.C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H.M., and Sperling, R. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 14, 535-562.
23. Janelins, M.C., Mastrangelo, M.A., Park, K.M., Sudol, K.L., Narrow, W.C., Oddo, S., LaFerla, F.M., Callahan, L.M., Federoff, H.J., and Bowers, W.J. (2008). Chronic neuron-specific tumor necrosis factor-alpha expression enhances the local inflammatory environment ultimately leading to neuronal death in 3xTg-AD mice. *Am J Pathol* 173, 1768-1782.
24. Jay, T.R., Hirsch, A.M., Broihier, M.L., Miller, C.M., Neilson, L.E., Ransohoff, R.M., Lamb, B.T., and Landreth, G.E. (2017). Disease Progression-Dependent Effects of TREM2 Deficiency in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 37, 637-647.
25. Jay, T.R., Miller, C.M., Cheng, P.J., Graham, L.C., Bemiller, S., Broihier, M.L., Xu, G., Margevicius, D., Karlo, J.C., Sousa, G.L., Coteleur, A.C., Butovsky, O., Bekris, L., Staugaitis, S.M., Leverenz, J.B., Pimplikar, S.W., Landreth, G.E., Howell, G.R., Ransohoff, R.M., and Lamb, B.T. (2015). TREM2 deficiency eliminates TREM2+ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med* 212, 287-295.
26. Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P.V., Snaedal, J., Bjornsson, S., Huttenlocher, J., Levey, A.I., Lah, J.J., Rujescu, D., Hampel, H., Giegling, I., Andreassen, O.A., Engedal, K., Ulstein, I., Djurovic, S., Ibrahim-Verbaas, C., Hofman, A., Ikram, M.A., van Duijn, C.M., Thorsteinsdottir, U., Kong, A., and Stefansson, K. (2013). Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 368, 107-116.
27. Kent, S.A., Spires-Jones, T.L., and Durrant, C.S. (2020). The physiological roles of tau and A β : implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. *Acta Neuropathol* 140, 417-447.
28. Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T.K., David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., Itzkovitz, S., Colonna, M., Schwartz, M., and Amit, I. (2017). A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* 169, 1276-1290.
29. Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91, 461-553.
30. Keyvani, K., Münster, Y., Kurapati, N.K., Rubach, S., Schönborn, A., Kocakavuk, E., Karout, M., Hammesfahr, P., Wang, Y.C., Hermann, D.M., Teuber-Hanselmann, S., and Herring, A. (2018). Higher levels of kallikrein-8 in female brain may increase the risk for Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 28, 947-964.

31. Kim, S.M., Mun, B.R., Lee, S.J., Joh, Y., Lee, H.Y., Ji, K.Y., Choi, H.R., Lee, E.H., Kim, E.M., Jang, J.H., Song, H.W., Mook-Jung, I., Choi, W.S., and Kang, H.S. (2017). TREM2 promotes A β phagocytosis by upregulating C/EBP α -dependent CD36 expression in microglia. *Sci Rep* 7, 1-12.
32. Kisa, A., Kisa, S., El-Jaafary, S., Ayano, G., Shiri, R., and Oancea, B. (2022). Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Public Health*, 105-125.
33. Krabbe, G., Halle, A., Matyash, V., Rinnenthal, J.L., Eom, G.D., Bernhardt, U., Miller, K.R., Prokop, S., Kettenmann, H., and Heppner, F.L. (2013). Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology. *PLoS One* 8, 1-8.
34. Kuno, R., Wang, J., Kawanokuchi, J., Takeuchi, H., Mizuno, T., and Suzumura, A. (2005). Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor- α . *J Neuroimmunol* 162, 89-96.
35. Livingston, G., Huntley, J., Sommerlad, A., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Brayne, C., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Costafreda, S.G., Dias, A., Fox, N., Gitlin, L.N., Howard, R., Kales, H.C., Kivimäki, M., Larson, E.B., Ogunniyi, A., Orgeta, V., Ritchie, K., Rockwood, K., Sampson, E.L., Samus, Q., Schneider, L.S., Selbæk, G., Teri, L., and Mukadam, N. (2020). Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet* 396, 413-446.
36. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
37. Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2012). Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, 1-25.
38. Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Yamasaki, H., Tamura, H., Nakamura, Y., and Shiosaka, S. (2003). NMDA-dependent proteolysis of presynaptic adhesion molecule L1 in the hippocampus by neuropsin. *J Neurosci* 23, 7727-7736.
39. McKhann, G.M., Knopman, D.S., Chertkow, H., Hyman, B.T., Jack, C.R., Jr., Kawas, C.H., Klunk, W.E., Koroshetz, W.J., Manly, J.J., Mayeux, R., Mohs, R.C., Morris, J.C., Rossor, M.N., Scheltens, P., Carrillo, M.C., Thies, B., Weintraub, S., and Phelps, C.H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7, 263-269.
40. Meyer-Luehmann, M., Spire-Jones, T.L., Prada, C., Garcia-Alloza, M., de Calignon, A., Rozkalne, A., Koenigsknecht-Talboo, J., Holtzman, D.M., Baeskaï, B.J., and Hyman, B.T. (2008). Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 451, 720-724.

41. Mullard, A. (2021). Landmark Alzheimer's drug approval confounds research community. *Nature* 594, 309-310.
42. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314-1318.
43. Njie, E.G., Boelen, E., Stassen, F.R., Steinbusch, H.W., Borchelt, D.R., and Streit, W.J. (2012). Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiol Aging* 33, 1-12.
44. Paloneva, J., Manninen, T., Christman, G., Hovanes, K., Mandelin, J., Adolfsson, R., Bianchin, M., Bird, T., Miranda, R., Salmaggi, A., Tranebjaerg, L., Kontinen, Y., and Peltonen, L. (2002). Mutations in two genes encoding different subunits of a receptor signaling complex result in an identical disease phenotype. *Am J Hum Genet* 71, 656-662.
45. Pozniak, P.D., Darbinyan, A., and Khalili, K. (2016). TNF- α /TNFR2 Regulatory Axis Stimulates EphB2-Mediated Neuroregeneration Via Activation of NF- κ B. *J Cell Physiol* 231, 1237-1248.
46. Prokop, S., Miller, K.R., Labra, S.R., Pitkin, R.M., Hoxha, K., Narasimhan, S., Changolkar, L., Rosenbloom, A., Lee, V.M., and Trojanowski, J.Q. (2019). Impact of TREM2 risk variants on brain region-specific immune activation and plaque microenvironment in Alzheimer's disease patient brain samples. *Acta Neuropathol* 138, 613-630.
47. Rajan, K.B., Weuve, J., Barnes, L.L., McAninch, E.A., Wilson, R.S., and Evans, D.A. (2021). Population estimate of people with clinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in the United States (2020-2060). *Alzheimers Dement* 17, 1966-1975.
48. Reitz, C., and Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol* 88, 640-651.
49. Röhr, D., Boon, B.D.C., Schuler, M., Kremer, K., Hoozemans, J.J.M., Bouwman, F.H., El-Mashtoly, S.F., Nabers, A., Großerueschkamp, F., Rozemuller, A.J.M., and Gerwert, K. (2020). Label-free vibrational imaging of different A β plaque types in Alzheimer's disease reveals sequential events in plaque development. *Acta Neuropathologica Communications* 8, 1-13.
50. Sarlus, H., and Heneka, M.T. (2017). Microglia in Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 127, 3240-3249.
51. Sasaki, Y., Ohsawa, K., Kanazawa, H., Kohsaka, S., and Imai, Y. (2001). Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 292-297.

52. Selkoe, D.J., and Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8, 595-608.
53. Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., and Hyman, B.T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1, 1-13.
54. Shimizu-Okabe, C., Yousef, G.M., Diamandis, E.P., Yoshida, S., Shiosaka, S., and Fahnestock, M. (2001). Expression of the kallikrein gene family in normal and Alzheimer's disease brain. *Neuroreport* 12, 2747-2751.
55. Shimizu, C., Yoshida, S., Shibata, M., Kato, K., Momota, Y., Matsumoto, K., Shiosaka, T., Midorikawa, R., Kamachi, T., Kawabe, A., and Shiosaka, S. (1998). Characterization of recombinant and brain neuropsin, a plasticity-related serine protease. *J Biol Chem* 273, 11189-11196.
56. Sierra, A., Encinas, J.M., Deudero, J.J., Chancey, J.H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L.S., Tsirka, S.E., and Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7, 483-495.
57. Tamura, H., Ishikawa, Y., Hino, N., Maeda, M., Yoshida, S., Kaku, S., and Shiosaka, S. (2006). Neuropsin is essential for early processes of memory acquisition and Schaffer collateral long-term potentiation in adult mouse hippocampus in vivo. *J Physiol* 570, 541-551.
58. Tamura, H., Kawata, M., Hamaguchi, S., Ishikawa, Y., and Shiosaka, S. (2012). Processing of neuregulin-1 by neuropsin regulates GABAergic neuron to control neural plasticity of the mouse hippocampus. *J Neurosci* 32, 12657-12672.
59. Tang, Y., and Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology* 53, 1181-1194.
60. Teuber-Hanselmann, S., Rekowski, J., Vogelgsang, J., von Arnim, C., Reetz, K., Stang, A., Jöckel, K.H., Wiltfang, J., Esselmann, H., Otto, M., Tumani, H., Herring, A., and Keyvani, K. (2020). CSF and blood Kallikrein-8: a promising early biomarker for Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 91, 40-48.
61. Thal, D.R., Rüb, U., Orantes, M., and Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58, 1791-1800.
62. Thal, D.R., Walter, J., Saido, T.C., and Fändrich, M. (2015). Neuropathology and biochemistry of A β and its aggregates in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica* 129, 167-182.
63. Ulland, T.K., Song, W.M., Huang, S.C.-C., Ulrich, J.D., Sergushichev, A., Beatty, W.L., Loboda, A.A., Zhou, Y., Cairns, N.J., Kambal, A., Loginicheva, E., Gilfillan, S.,

- Cella, M., Virgin, H.W., Unanue, E.R., Wang, Y., Artyomov, M.N., Holtzman, D.M., and Colonna, M. (2017). TREM2 Maintains Microglial Metabolic Fitness in Alzheimer's Disease. *Cell* 170, 649-663.
64. Ulrich, J.D., Ulland, T.K., Colonna, M., and Holtzman, D.M. (2017). Elucidating the Role of TREM2 in Alzheimer's Disease. *Neuron* 94, 237-248.
65. Villemagne, V.L., Burnham, S., Bourgeat, P., Brown, B., Ellis, K.A., Salvado, O., Szoëke, C., Macaulay, S.L., Martins, R., Maruff, P., Ames, D., Rowe, C.C., and Masters, C.L. (2013). Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol* 12, 357-367.
66. Wang, Y., Cella, M., Mallinson, K., Ulrich, J.D., Young, K.L., Robinette, M.L., Gilfillan, S., Krishnan, G.M., Sudhakar, S., Zinselmeyer, B.H., Holtzman, D.M., Cirrito, J.R., and Colonna, M. (2015). TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell* 160, 1061-1071.
67. Wang, Y., Ulland, T.K., Ulrich, J.D., Song, W., Tzaferis, J.A., Hole, J.T., Yuan, P., Mahan, T.E., Shi, Y., Gilfillan, S., Cella, M., Grutzendler, J., DeMattos, R.B., Cirrito, J.R., Holtzman, D.M., and Colonna, M. (2016). TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *J Exp Med* 213, 667-675.
68. Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G.C., Wu, Y.T., Prina, A.M., Winblad, B., Jönsson, L., Liu, Z., and Prince, M. (2017). The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010. *Alzheimers Dement* 13, 1-7.
69. Wolf, S.A., Boddeke, H.W., and Kettenmann, H. (2017). Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol* 79, 619-643.
70. Xu, Y.J., Au, N.P.B., and Ma, C.H.E. (2022). Functional and Phenotypic Diversity of Microglia: Implication for Microglia-Based Therapies for Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 14, 1-20.
71. Yeh, F.L., Wang, Y., Tom, I., Gonzalez, L.C., and Sheng, M. (2016). TREM2 Binds to Apolipoproteins, Including APOE and CLU/APOJ, and Thereby Facilitates Uptake of Amyloid-Beta by Microglia. *Neuron* 91, 328-340.
72. Yuan, P., Condello, C., Keene, C.D., Wang, Y., Bird, T.D., Paul, S.M., Luo, W., Colonna, M., Baddeley, D., and Grutzendler, J. (2016). TREM2 Haplodeficiency in Mice and Humans Impairs the Microglia Barrier Function Leading to Decreased Amyloid Compaction and Severe Axonal Dystrophy. *Neuron* 90, 724-739.
73. Zhang, H., Cao, Y., Ma, L., Wei, Y., and Li, H. (2021). Possible Mechanisms of Tau Spread and Toxicity in Alzheimer's Disease. *Front Cell Dev Biol* 9, 1-16.
74. Zhang, Y.W., Thompson, R., Zhang, H., and Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 4, 1-13.

75. Zhou, M., Xu, R., Kaelber, D.C., and Gurney, M.E. (2020). Tumor Necrosis Factor (TNF) blocking agents are associated with lower risk for Alzheimer's disease in patients with rheumatoid arthritis and psoriasis. *PLoS One* *15*, 1-23.

9 SUPPLEMENTÄRE DATEN

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Erhöhung der Anzahl von PAM in den Basalganglien durch den mKlk8-Knockdown.....	47
Abbildung 2: Erhöhung der Anzahl von PAM im Hippokampus durch den mKlk8-Knockdown.....	49
Abbildung 3: Der mKlk8-Knockdown hat keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Anzahl der PAM im Neokortex.....	51
Abbildung 4: Der mKlk8-Knockdown führt zu einer Erhöhung der TREM2-Spiegel im Neokortex.	53
Abbildung 5: Der mKlk8-Knockdown hat keinen signifikanten Effekt auf die TNF- α -Proteinspiegel im Neokortex.	54

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anzahl der Versuchstiere in den durchgeführten Untersuchungen.....	26
Tabelle 2: Gebrauchsfertige Lösungen Gewebeaufbereitung	28
Tabelle 3: Gebrauchsfertige Lösungen Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry .	30
Tabelle 4: TGX-Fluoreszenzgele.....	31
Tabelle 5: Gebrauchsfertige Lösungen Fluoreszenzelektrophorese.....	31
Tabelle 6: Acrylamidgele	32
Tabelle 7: Antikörper Western Blotting	34
Tabelle 8: Gebrauchsfertige Lösungen ECL-Reaktion	34
Tabelle 9: Antikörper Immunhistochemie.....	37
Tabelle 10: Gebrauchsfertige Lösungen Immunhistochemie.....	37
Tabelle 11: Antikörper Immunhistochemie.....	38
Tabelle 12: Puffer und Lösungen	42
Tabelle 13: Chemikalien und Hersteller.....	44
Tabelle 14: Geräte und Programme.....	45

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µl	mikroliter
A	Ampere
AD	<i>Alzheimer's Disease</i> , Alzheimer Krankheit (<i>Alzheimer's disease</i>)
AIF1	<i>Allograft Inflammatory Factor 1</i>
APOE	Apolipoprotein E
Aβ	Beta-Amyloid
BACE1	<i>Beta-Site Of Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1</i>
BG	Basalganglien
BSA	Bovines Serumalbumin
CD36	<i>Cluster of Differentiation 36</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTFβ	<i>C terminal fragment β</i>
DAB-Lösung	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Substratlösung
DAP12	<i>DNAX Activating Protein of 12 kDa</i>
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>Enhanced Luminol-based Chemiluminescent</i>
EOAD	<i>Early-Onset Alzheimer's Disease</i>
EPHB2	Ephrinrezeptor B2
EPM	<i>Elevated-Plus-Maze</i>
FDG-PET	Fluorodeoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie
FKBP5	<i>FK506 Binding Protein-5</i>
GAP43	<i>Growth-Associated-Protein 43</i>
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hAPP	humanes Gen des Amyloid-Vorläuferproteins
HC	Hippokampus
HRP	<i>horseradish-peroxidase</i> , Meerrettich Peroxidase
IBA1	<i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i> (= AIF1)
IL-1β	Interleukin-1β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
kDa	Kilodalton
KLK8	Kallikrein-8, Kallikrein-8 / Neuropsin
L1CAM	<i>Neuronal Cell Adhesion Molecule L1</i>
LDL	<i>Low-Density-Lipoprotein</i>
LOAD	<i>Late-Onset Alzheimer's Disease</i>
LRP1	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1</i>
M	Molare Masse
MCI	<i>mild cognitive impairment</i>
MDR1	<i>Multidrug Resistance Protein 1B</i>
Min.	Minuten

<i>mKlk8</i>	murines Kallikrein-8
MMP	Magermilchpulver
<i>mSry</i>	<i>murine sex determining region of Y</i>
mTNF- α	membrangebundenes TNF- α
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
n	Stichprobengröße
NC	Neokortex
NFTs	<i>Neurofibrillary Tangles</i>
NF- κ B	<i>Nuclear-Factor-Kappa B</i>
NOT	<i>Novel-Object-Test</i>
NRG1	Neuregulin-1
O ₂	Sauerstoff
OFT	<i>Open-Field-Test</i>
p	Signifikanzwert
P	Postnataler Lebensstag
PAM	Plaque-assoziierte Mikroglia
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>PSEN1</i>	Presenilin-1
<i>PSEN2</i>	Presenilin-2
RA	Rheumatoide Arthritis
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEM	Standardabweichung
sTNF- α	lösliches sTNF- α
TACE	<i>TNF-α converting enzyme</i>
TBS-T	<i>Tris buffered Saline mit Tween</i>
TgCRND8	Transgenes Alzheimer-Mausmodel CRND8
TNFR1	Tumornekrosefaktor- α -Rezeptor 1
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha, Tumornekrosefaktor α
TREM2	<i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2</i>
TST	<i>Tris Buffered Saline with Tween</i>
V	Volt
V10	10-fache Verdünnung
vs	versus
WT	Wildtyp
α	Signifikanzniveau

11 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich Frau Professor Keyvani für die Möglichkeit danken meine Promotion in Ihrem Institut durchführen zu können. Darüber hinaus bedanke ich mich für die hervorragende und zuverlässige Betreuung während des gesamten Vorhabens und besonders während des Schreibprozesses.

Großer Dank gilt auch Herrn PD Arne Herring und Frau Dr. Yvonne Münster, die sowohl bei theoretischen und methodischen Belangen als auch bei der praktischen Durchführung stets ein offenes Ohr hatten und mit Rat und Tat zur Seite standen.

Weiterhin möchte ich mich bei Michaela Knoll und Nicole Macha für die exzellente Einarbeitung und Mitbetreuung im Labor sowie die zahlreichen Ratschläge bedanken.

Außerdem danke ich meinen Mitstreitern Nils Grammon, Luisa-Maria Scholz und Sofia Krebs für das angenehme Miteinander und die Unterstützung in frustrierenden Abschnitten meiner Laborzeit.

Schließlich möchte ich mich noch bei meiner Familie und Freunden bedanken, die mich auf zahlreiche Art und Weisen bei meinem Promotionsvorhaben unterstützt haben.

12 LEBENSLAUF

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