

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Neuropathologie

Effekte eines genetischen Knockdowns von Kallikrein-8 auf die zerebrale Mikrogliose  
und Expression der Inflammationsmarker AIF1 und PTGER 2 in einem transgenen  
Mausmodell der Alzheimer-Krankheit

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Nils Grammon  
aus Kamen  
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/81572

**URN:** urn:nbn:de:hbz:465-20240307-092723-6

Alle Rechte vorbehalten.

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

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Februar 2024

Diese Arbeit ist zum Teil in der folgenden Veröffentlichung enthalten:

Herring, A., Kurapati, N.K., Krebs, S., **Grammon, N.**, Scholz, L.M., Voss, G., Miah, M.R., Budny, V., Mairinger, F., 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 .....	7
1.1 Morbus Alzheimer .....	7
1.2 Ätiologie Morbus Alzheimer .....	8
1.3 Pathophysiologie Morbus Alzheimer .....	9
1.3.1 Extrazelluläre Plaque-Ablagerung des $\beta$ -Amyloid-Peptids.....	9
1.3.2 Intrazelluläre neurofibrilläre Tangles/Tau-Pathologie .....	12
1.4 Therapie des Morbus Alzheimer .....	13
1.5 Mikroglia und Inflammation im Rahmen des Morbus Alzheimer .....	14
1.6 AIF-1 und PTGER 2.....	16
1.6.1 AIF-1/IBA-1 .....	16
1.6.2 PTGER2.....	16
1.7 Kallikrein-8.....	17
1.7.1 Physiologische Funktion.....	17
1.7.2 Potenziell pathologische Rolle im Rahmen des Morbus Alzheimer .....	19
1.7.3 Kallikrein-8 als mögliches therapeutisches Target.....	20
2 FRAGESTELLUNGEN.....	21
3 MATERIAL UND METHODEN .....	22
3.1 Tiermodell .....	22
3.1.1 Gründerstämme .....	22
3.1.2 Intermediär-Generation .....	23
3.1.3 Experimental-Generation.....	23
3.2 Tierhaltung.....	24
3.3 Verhaltensphänotypisierung .....	24
3.4 Probengewinnung .....	25
3.4.1 Extraktion von DNA, RNA und Proteinen.....	26
3.5 Proteinanalyse.....	27
	4

3.5.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach LOWRY .....	27
3.5.2	Probenvorbereitung .....	28
3.5.3	Fluoreszenz-Gelelektrophorese .....	28
3.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	28
3.5.5	Western-Blot und Antikörperblockierung .....	29
3.5.6	Chemilumineszenz-Basierte Proteindetektion.....	31
3.6	Immunhistologische Färbung AIF-1 positiver Mikrogliazellen .....	31
3.7	Stereologische Quantifizierung AIF1-positiver Mikrogliazellen und Zelldichte.....	33
3.8	Statistik .....	34
4	ERGEBNISSE.....	35
4.1	Der genetische Knockdown von Kallikrein 8 hat keinen Einfluss auf die Gesamtanzahl zerebraler aktivierter Mikroglia in einem AD-Mausmodell.....	35
4.2	Effekte eines genetischen Knockdowns von Kallikrein-8 auf die neokortikale Expression von Neuro-Inflamationsmarkern in einem transgenen Mausmodell .....	40
4.2.1	Der genetische Knockdown von Kallikrein-8 senkt das Proteinlevel des Inflamationsmarkers AIF-1 nur in weiblichen transgenen Mäusen.....	40
4.2.2	Der genetische Knockdown von Kallikrein-8 hat keinen Einfluss auf die Proteinlevel des Inflamationsmarkers PTGER2 .....	42
5	DISKUSSION .....	44
5.1	Einfluss von KLK8 auf die zerebrale Mikrogliose.....	44
5.2	Einfluss des KLK8-Knockdowns auf die Expression des Inflamations-/Aktivitätsmarkers AIF1 .....	46
5.3	Einfluss des KLK8-Knockdowns auf den Inflamationsmarker PTGER2.....	48
5.4	Limitationen.....	50
5.5	Diese Arbeit im Kontext des Gesamtprojektes.....	50
5.6	Fazit und Ausblick.....	51
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	53
7	SUMMARY .....	54

8 LITERATURVERZEICHNIS .....	55
9 ANHANG.....	64
9.1 Abkürzungsverzeichnis .....	64
9.2 Abbildungsverzeichnis .....	64
9.3 Tabellenverzeichnis .....	64
9.4 Chemikalien, Lösungen, Puffer und Geräte .....	65
9.4.1 Chemikalien und Kits .....	65
9.4.2 Puffer, Lösungen und Gele .....	66
9.4.3 Materialien, Geräte und Software.....	69
10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	70
11 DANKSAGUNG .....	73
12 LEBENSLAUF .....	74

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Morbus Alzheimer

Die Erkrankung Morbus Alzheimer ist durch einen fortschreitenden Verfall der mnestischen und kognitiven Leistungen charakterisiert und wird von der „World Health Organisation“ (WHO) dem Formenkreis der neurodegenerativen Erkrankungen zugeordnet (Soria Lopez et al., 2019). Der aktuelle „Global status report on the public health response to dementia 2021“ der WHO spricht von weltweit etwa 55 Millionen an einer Demenzform erkrankten Menschen. Die Hauptursache der Demenz liegt zu etwa 60-70% in einer Alzheimer-Erkrankung (AD) (Silva et al., 2019; Tao et al., 2020). Bereits jetzt ist die AD Teil der Top 50 Krankheiten, die mit dem größten Verlust an Lebensjahren weltweit einhergehen (Soria Lopez et al., 2019).

Der Krankheitsverlauf zeigt eine interindividuelle Diversität und schreitet mit unterschiedlicher Geschwindigkeit patientenabhängig voran. Dieser Verlauf lässt sich hierbei bestmöglich durch das sogenannte Alzheimer Kontinuum beschreiben. Patienten durchlaufen zunächst eine Phase der präklinischen AD ohne apparente Symptomatik jedoch bereits mit potenziellem Nachweis Alzheimer- spezifischer Marker (Dubois et al., 2016). Es folgt eine Übergangsphase, das sogenannte MCI („Mild Cognitive Impairment“). Dieses wird im Allgemeinen über eine milde Symptomatik, bestehend aus einer geringfügigen kognitiven Einschränkung ohne zusätzliche Beeinträchtigung der Alltagsaktivität definiert (Roberts and Knopman, 2013). Die finale Phase des Alzheimer Kontinuums manifestiert sich in der eigentlichen Alzheimer- Erkrankung, die sich je nach Ausprägung wiederum in 3 Phasen einteilen lässt. Diese 3 Phasen, mild, moderat und schwer, differenzieren sich vor allem in der jeweiligen Alltagsbeeinträchtigung durch die AD. Anfänglich ist vor allem das Kurzzeitgedächtnis betroffen. Im Verlauf der Erkrankung kommt es jedoch zu ausgeprägten Formen der Apathie, Agnosie, Aphasie, Desorientierung und motorischen Einschränkungen, die beispielsweise den Schluck- oder Sprechakt beeinflussen (Alzheimer's disease facts and figures, 2022).

Die facettenreiche Symptomatik der Erkrankung sowie die interindividuelle Progressionsgeschwindigkeit kann bereits mit Auftreten milderer Formen, spätestens jedoch bei ausgeprägter Beeinträchtigung der Alltagsaktivität, intensive Langzeitpflege

erforderlich machen. Infolgedessen entsteht daher eine hohe soziale und ökonomische Belastung für die Gesellschaft und betroffene Familien (Jia et al., 2018). Aktuell werden die weltweiten Kosten durch die WHO auf ca. 1,3 Billionen US\$ pro Jahr geschätzt, wobei dieser Kostenanteil bis 2030 auf ca. 2,8 Billionen US\$ steigen könnte. Diese immense finanzielle Belastung in Kombination mit dem erheblichen pflegerischen Aufwand durch die Angehörigen (ca. 89 Billionen Stunden) unterstreichen den hohen negativen sozioökonomischen Impact, den Morbus Alzheimer für unsere Gesellschaft darstellt (Global status report on the public health response to dementia, 2021).

Durch die Dynamik des demographischen Wandels und die damit einhergehende Zunahme des durchschnittlichen Lebensalters, wird Morbus Alzheimer weiter an Relevanz zunehmen. Nach Schätzungen der WHO wird die weltweite Anzahl der Alzheimer-Patienten bereits 2030 ca. 78 Millionen betragen und bis 2050 auf ca. 130 Millionen steigen (Armstrong, 2019; Global status report on the public health response to dementia, 2021).

## **1.2 Ätiologie Morbus Alzheimer**

In den letzten Jahrzehnten ist es bisher nicht gelungen die exakte Ätiologie der AD zu verifizieren. Verschiedene Forschungsgruppen haben jedoch potenzielle Risikofaktoren für die AD erarbeiten können.

Die häufigste Form der Erkrankung, sporadisch in einem höheren Lebensalter auftretend, wird durch ein Zusammenspiel multifaktorieller Risikofaktoren hervorgerufen. Über 20 genetische Risikofaktoren konnten bis zum heutigen Tag entschlüsselt werden. Eines dieser Risikogene ist das APOE-Gen  $\epsilon 4$ , welches zu einem Odds Ratio für eine AD von 3 bei heterozygoten bis etwa 12 bei homozygoten Trägern führt. Die Risikogene nehmen auf unterschiedliche biologische Abläufe wie die Induktion der Immunantwort, den Cholesteroll-Stoffwechsel oder die Transportwege des endosomalen Vesikel-Recyclings, Einfluss (Lane et al., 2018). Des Weiteren existiert eine Reihe erworbener Risikofaktoren, wie Bluthochdruck, mangelnde physische Aktivität, niedriger Bildungsstand, Diabetes mellitus Typ 2 oder Rauchen, welche das Risiko an Alzheimer zu erkranken signifikant erhöhen (Reitz et al., 2011).

Die familiäre Variante der AD, welche etwa 5% aller Patienten betrifft, konnte genetisch vollkommen entschlüsselt werden. Eine Mutation des Amyloid-Precursor-Protein-Gens (APP-Gen), des Presenilin-1-Gens (PSEN1) oder des Presenilin-2-Gens (PSEN2) führt zu einer erhöhten Amyloid-Produktion und Plaque-Ablagerung. Dies resultiert in einem Auftreten der Krankheit bereits zwischen dem 30.-50. Lebensjahr sowie in einem deutlich akzelerierten Krankheitsverlauf (Lane et al., 2018).

Obwohl es noch keine definitiven Aussagen über Ursprung und Progression der sporadischen Form des Morbus Alzheimer gibt, gelten die extrazellulären Ablagerungen von  $\beta$ -Amyloid Plaques und die intrazelluläre Anreicherung neurofibrillärer Tangles als pathognomisch für die Erkrankung und bilden die Grundlage der Amyloid-Hypothese (Alzheimer's disease facts and figures, 2022; Blessed et al., 1968).

### **1.3 Pathophysiologie Morbus Alzheimer**

#### **1.3.1 Extrazelluläre Plaque-Ablagerung des $\beta$ -Amyloid-Peptids**

Ein wesentliches Schlüsselement der Pathologie der AD ist die Bildung extrazellulärer Plaques bestehend aus Ablagerungen des Amyloid  $\beta$ -Peptids ( $A\beta$ ) (Glennner and Wong, 1984). Diese Ablagerungen entstehen in Folge eines Ungleichgewichts zwischen der Produktion und des Abtransportes (Lee et al., 2017). Im Rahmen der sporadischen AD ist vornehmlich der Abtransport eingeschränkt, wohingegen die Mutationen bei der familiären AD in einer gesteigerten Produktion von  $A\beta$ -Peptiden resultieren (Masters et al., 2015). Extrazelluläre Plaque-Ablagerungen können durch ihre Anfärbbarkeit mittels Kongo-Rot und Thioflavin-S in zwei unterschiedliche Plaque-Arten kategorisiert werden (Serrano-Pozo et al., 2011). Diffuse, Kongo-Rot- und Thioflavin-S-negative Plaques, zeigen nach aktuellem Kenntnisstand keine neurotoxischen oder synapto-destruktiven Eigenschaften, wohingegen Kongo-Rot- und Thioflavin-S-positive, kerndichte Plaques mit Neuronen- und Synapsenverlust sowie einer Aktivierung von Astro- und Mikrogliazellen assoziiert sind (Urbanc et al., 2002; Vehmas et al., 2003).

Die Ausbreitung der  $A\beta$ -Plaques über die gesamte Hirnregion kann in fünf unterschiedliche Phasen unterteilt werden (Thal et al., 2002). Frühe Ablagerungen finden sich in Phase eins vor allem in den Regionen des Neokortex, wohingegen in Phase zwei bereits Ablagerungen in den limbischen Regionen wie etwa dem entorhinalen Kortex, dem Subiculum, der Amygdala und des Gyrus cinguli zu finden sind. In Phase drei sind

dann auch subkortikale Areale wie die Basalganglien und der Thalamus betroffen. Fortfolgend sind in Phase vier auch im Hirnstamm (Medulla oblongata und Pons) und final sogar innerhalb der Kleinhirnrinde Amyloid-Ablagerungen nachweisbar (Trejo-Lopez et al., 2022).

Ein Vorläufer des pathogenen  $A\beta_{42}$ -Peptids ist, das vor allem in Neuronen stärker exprimierte, transmembrane „Amyloid-Precursor Protein“ (APP). Physiologischerweise scheint APP vor allem eine Rolle bei der Synapsenbildung, der Neuausprägung dendritischer Verzweigung und der neuronalen Migration zu spielen (Müller et al., 2017). APP wird im Wesentlichen durch drei membranständige Sekretasen prozessiert und in Bestandteile unterschiedlicher Länge gespalten. In Abhängigkeit von der Kombination und Reihenfolge der Sekretasen kann die Prozessierung des APP sowohl auf eine amyloide als auch nicht-amyloide Weise erfolgen (siehe Abbildung 1) (Andrew et al., 2016).

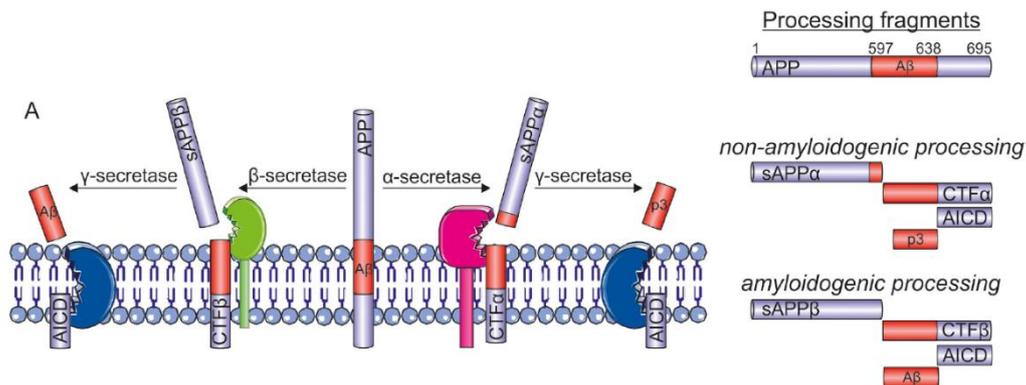


Abbildung 1 (Modifiziert nach Andrew et al., 2016): Prozessierung des Amyloid-Precursor Proteins (APP)

(A). Es wird die schrittweise Prozessierung des APP gezeigt. Rechtsseitig ist die Verarbeitung durch die  $\alpha$ - &  $\gamma$ -Sekretase zu erkennen, welche die nicht-amyloide Prozessierung repräsentiert. Linksseitig des zentralen, membranständigen APP ist die Prozessierung durch die  $\beta$ - &  $\gamma$ -Sekretase zu erkennen, welche im Endprodukt der amyloiden Prozessierung, dem  $A\beta$ , endet.

Im Rahmen der nicht-amyloiden Prozessierung werden etwa 90% des membranständigen APP durch die  $\alpha$ -Sekretase, zugehörig zur enzymatischen Familie eines Disintegrins und verschiedener Metalloproteasen (ADAM-Gruppe), zu „soluble APP“ (sAPP) $\alpha$  und dem 83 Aminosäuren langen „C-terminal fragment of APP“ (CTF) $\alpha$  gespalten (Murphy and LeVine, 2010). Besonders das Spaltprodukt sAPP $\alpha$  zeigt neuroprotektive Eigenschaften wie die Steigerung der Anzahl dendritischer Verzweigungen oder auch der synaptischen Plastizität (Corrigan et al., 2012; Fol et al., 2016). Dies wirkt der eigentlichen Alzheimer-

Pathologie entgegen und scheint die physiologische Bedeutung des APP zu unterstreichen.

Die amyloide Prozessierung von APP beginnt mit der  $\beta$ -Sekretase, auch „beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme“ (BACE) genannt. BACE ist eine membrangebundene Aspartyl-Protease, die ubiquitär im Körper in den Formen BACE1 und BACE2 exprimiert wird (Murphy and LeVine, 2010). BACE1, die im Hirngewebe primär exprimierte Variante, und BACE2 spalten APP in die Derivate sAPP $\beta$  und das in der Membran verbleibende 99 Aminosäuren lange CTF $\beta$  (Selkoe, 1999). CTF $\beta$  wird im Anschluss rasant durch die  $\gamma$ -Sekretase, eine Aspartyl-Protease, deren aktives Zentrum durch Presenilin 1&2 (PSEN 1&2) gebildet wird, zu 90% in A $\beta$ <sub>40</sub> und zu ca. 5-10% in das schwer lösliche hydrophobe A $\beta$ <sub>42</sub>-Peptid umgewandelt (Li et al., 2000; Selkoe, 2001). Diese beiden Arten des A $\beta$ -Peptids stellen die Hauptvarianten der CTF $\beta$ -Verarbeitung durch die  $\gamma$ -Sekretase dar. Für beide gilt eine nachgewiesene Neurotoxizität sowie eine direkte Beteiligung an der A $\beta$ -Plaques-Bildung. A $\beta$ <sub>40</sub> wird häufiger durch die  $\gamma$ -Sekretase von CTF $\beta$  abgespalten, zeigt jedoch eine deutlich geringere Neurotoxizität. Vor allem A $\beta$ <sub>42</sub> wirkt signifikanter neurotoxisch, ist hochgradig unlöslich und besitzt eine stärkere Neigung zur Aggregat-Bildung als A $\beta$ <sub>40</sub> (Tiwari et al., 2019). Produziertes A $\beta$  kann auf verschiedene Weise abtransportiert und abgebaut werden. An erster Stelle ist hier der enzymatische Abbau durch die Peptidasen Insulin-konvertierendes Enzym, Nephilysin und das Endothelin-konvertierende Enzym zu nennen (Carson and Turner, 2002). Die zweite Möglichkeit besteht im sogenannten Rezeptor-vermittelten Abtransport des A $\beta$ -Peptids. Dieser wird durch den „Lipoprotein-related-receptor“ (LPR) und durch den „Receptor for advanced glycation end products“ (RAGE) vermittelt (Tanzi et al., 2004). Beide Möglichkeiten des Abtransports scheinen jedoch nicht primär im Rahmen der AD eingeschränkt zu sein (Blennow et al., 2006). Des Weiteren existiert eine weitere Alternative über den glymphatischen (glia-lymphatischen) Transportweg, durch welchen A $\beta$  über die zerebrospinale Flüssigkeit (CSF) abtransportiert wird (de Leon et al., 2017). Dieser scheint im Rahmen der AD gestört zu sein, sodass sich A $\beta$  im Hirngewebe anreichert (Rasmussen et al., 2018). Der gestörte Abtransport von A $\beta$ <sub>42</sub> führt zu einer Anreicherung des Peptids und einer schrittweisen Fibrillogenese von A $\beta$ -Monomeren zu Oligomeren, Protofibrillen und über einen nukleationsabhängigen Polymerisierungsprozess final zu Fibrillen (Katzmarski et al., 2020). Die im Rahmen

dieses Prozesses geformten A $\beta$ -Oligomere und A $\beta$ -Fibrillen bilden die Grundlage der für die Alzheimer Pathologie relevanten kernverdichteten Plaque-Ablagerungen, wobei gerade den verschiedenen A $\beta$ -Oligomeren eine höhere schädliche und neurotoxische Komponente nachgewiesen werden konnte (Lee et al., 2017).

### 1.3.2 Intrazelluläre neurofibrilläre Tangles/Tau-Pathologie

Ein weiterer pathophysiologischer Grundaspekt der AD ist die Bildung intrazellulärer neurofibrillärer Tangles (NFTs) aus hyperphosphoryliertem Tau. Ähnlich der extrazellulären A $\beta$ -Plaque-Bildung folgt auch die Verteilung der intrazellulären NFTs einem charakteristischen Muster und ermöglicht so eine gradhafte Einteilung in sechs Stadien (Braak and Braak, 1991). Die physiologische Grundform des Tau-Proteins ist ein gut lösliches, Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP). In seinen verschiedenen Isoformen und unterschiedlichen Phosphorylierungsgraden interagiert Tau mit Tubulin und stabilisiert die Zusammensetzung der Mikrotubuli (Mohandas et al., 2009). Tau wird im Rahmen seiner Zellaufgaben von verschiedenen Proteinkinasen phosphoryliert. Im Zuge der AD kommt es vor allem durch die Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) und die Cyclin-abhängige Protein Kinase 5 (cdk5) zu einer Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins (Takashima et al., 1998). Dieser Vorgang fördert die Aggregation von hyperphosphoryliertem Tau zu doppelhelixartig gewundenen Filamenten (PHF), welche sich dann zu NFTs zusammenlagern (Iqbal and Grundke-Iqbal, 2008). Hyperphosphoryliertes Tau verliert die Möglichkeit, sich an Tubulin zu binden und fördert auf diese Weise nicht mehr die Zusammensetzung und Stabilisierung der Mikrotubuli. Es kommt zu einer Störung des axonalen Transports und durch Einschränkung des Zellmetabolismus letztendlich zum Untergang des Neurons (Chong et al., 2018). Zusätzlich zu den pathologischen Effekten auf die Neuronen beeinträchtigt die Tau-Pathologie ebenfalls die physiologische Funktion der Synapsen. Hier ist eine Beeinträchtigung der Übertragung zwischen einzelnen Synapsen sowie ein Verlust von Synaptophysin zu beobachten (Alldred et al., 2012). Aktuelle Erkenntnisse lassen offen, ob die neurotoxische Wirkung der NFTs in ihnen selbst ruht oder vielmehr auf vorläufige Formen der Aggregation des hyperphosphorylierten Taus zurückzuführen ist (Patterson et al., 2011).

## 1.4 Therapie des Morbus Alzheimer

Es gibt zurzeit keinen krankheit-modifizierenden Therapieansatz für die AD. Aktuelle Therapien verfolgen als Ziel vor allem eine qualitative und quantitative Beeinflussung des Krankheitsverlaufes. Wie bereits in Kapitel 1.3.1 genauer beschrieben, ist der komplexe pathologische Prozess bis hierhin immer noch nicht vollständig entschlüsselt. Wissenschaftliche Arbeiten konnten zeigen, dass bereits Dekaden vor Auftreten der eigentlichen Symptomatik irreversible Schäden auf molekularer und intrazellulärer Ebene im Bereich des gesamten Hirngewebes auftreten können. Dies stellt die kurative Medizin vor komplexe Probleme, sodass bis heute nur symptommodifizierende Ansätze existieren (Atri, 2019).

Zu diesen symptommodifizierenden Ansätzen gehören beispielsweise Medikamente der Gruppe der Acetylcholinesterasehemmer wie Donezepil, Galantamin oder Rivastigmin und der N-Methyl-Aspartat-Antagonist (NMDA) Memantin (Bar-On et al., 2002; Reisberg et al., 2003; Rogers and Friedhoff, 1996).

Moderne Ansätze einer Therapie blieben bislang in Phase III der klinischen Studien trotz vielversprechender Ergebnisse im Tiermodell ohne bleibenden Effekt auf den Krankheitszustand der Studienpatienten. Hierzu gehören beispielsweise die Antikörper Bapineuzumab und Solanezumab, welche die mikrogliale Phagozytose von A $\beta$ -Plaques im Parenchym vermitteln sollen. In der klinischen Studie konnten diese jedoch keine kognitive Verbesserung generieren (Doody et al., 2014; Salloway et al., 2014). Der zuletzt durch die „Food and Drug Association“ (FDA) vorläufig im Eilverfahren zugelassene Antikörper Aducanumab ist trotz initial vielversprechender Ergebnisse in klinischen Phase III Studien auf Grund des negativen Nutzen-Risiko-Verhältnisses erneut auf dem Prüfstand. Bei mangelndem Wirkungsnachweis könnte er die Zulassung durch die FDA wieder verlieren (Behl et al., 2022). Ein krankheit-modifizierender Therapieansatz und ein ausgeprägteres Verständnis der grundlegenden Aspekte der Alzheimer-Pathologie bleiben also auch weiterhin Kernbestandteil aktueller Forschung.

## 1.5 Mikroglia und Inflammation im Rahmen des Morbus Alzheimer

Mikroglia repräsentieren einen Teil des dem zentralen Nervensystem eigenen Immunsystems. Sie sind die primär immunkompetenten Zellen des Gehirns und verkörpern die hirneigenen Makrophagen (Ginhoux et al., 2010). Im Wesentlichen erfüllen Mikrogliazellen drei Funktionen. Zu diesen gehören die Detektion von Veränderungen im zerebralen Milieu, die Migration sowie der Erhalt der synaptischen Plastizität und der myelinen Homöostase im Falle von Verletzungen. Auch der Schutz vor schädlichen Stimuli mit Hilfe der „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) und „damage-associated molecular patterns“ (DAMPs) ist Teil des mikroglialen Aufgabenfelds (Kwon and Koh, 2020). In ihrem physiologischen Ruhezustand zeigen Mikroglia außerdem einen signifikanten Einfluss auf verschiedene Entwicklungsschritte innerhalb des zentralen Nervensystems wie etwa die Errichtung neuronaler Kreisläufe, die Neurogenese und die Instandhaltung der synaptischen Plastizität (Diaz-Aparicio et al., 2020; Paolicelli et al., 2011).

Im Kontext der AD kommt es durch Formierung und Ablagerung des extrazellulären A $\beta$ -Peptids zu verschiedenen Interaktionen mit den residenten Mikroglia. Mikroglia fungieren als Teil des A $\beta$ -Clearance-Systems, indem sie mittels Phago- und Endozytose durch die mikroglialen „Scavenger“ Rezeptoren (SRs) A $\beta$ -Fibrillen erkennen und intrazellulär mit Hilfe von Insulysin, Nepriysin und Matrix Metalloproteinase (MMP) 9 abbauen (El Khoury et al., 1996; Hickman et al., 2008). Die Expression der SRs sowie das Level intrazellulärer A $\beta$ -degradierender-Enzyme zeigen sich mit zunehmendem Alter deutlich reduziert, sodass die mikrogliale Fähigkeit zur Phago- und Endozytose eingeschränkt wird (Hickman et al., 2008). Infolgedessen steigt die extrazelluläre A $\beta$ -Belastung kontinuierlich an und es kommt zu einer Kommunikation von A $\beta$  und einem mikroglialen Rezeptorkomplex. Dieser besteht aus dem „Pattern-Recognicing Rezeptor“ (PRR) CD36 und einem Heterodimer, das sich aus den „Toll-like“ Rezeptoren (TLR) 4 und 6 zusammensetzt. Auf diese Weise wird die Mikrogliazelle inflammatorisch aktiviert und beginnt mit der Synthese der inflammatorischen Zytokine, NO-Synthetase, Cyclooxygenase 2 und verschiedener Neurotoxine (El Khoury et al., 2003). Zusätzlich kommt es über intrazelluläre Signalwege zur Aktivierung eines

Rezeptorproteinkomplexes, bestehend aus „nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors“ und dem „pyrin domain-containing protein 3“ (NLRP3), welcher auch als Inflammasom bezeichnet wird. Die Aktivierung von NLRP3 resultiert in einer gesteigerten Expression aktivierter Caspase-1, sowie einer Erhöhung der Interleukin (IL-) 1 $\beta$  Level. IL-1 $\beta$  wird mittels Caspase-1 aktiviert und trägt maßgeblich zum inflammatorischen Geschehen bei, indem es eine Umwandlung der Mikroglia in den aktivierten M1-Phänotyp unterstützt. Diese Untervariante aktivierter Mikroglia wirkt proinflammatorisch und zeigt eine verminderte A $\beta$ -Clearance-Funktion (Heneka et al., 2013). Die anhaltend proinflammatorische Wirkung der M1 Mikroglia wird durch die Sekretion verschiedener Zytokine wie beispielsweise Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  und Interleukin-6 $\beta$  (IL-6 $\beta$ ) vermittelt und resultiert mit fortschreitender Progredienz der AD in einem Untergang der Neuronen und Synapsen (Tang and Le, 2016). Ergänzend zur proinflammatorischen Komponente besitzen Mikroglia die Fähigkeit, nach Kontakt mit löslichen A $\beta$ -Oligomeren, Synapsen zu phagozytieren. Dieser Vorgang wird komplementabhängig durch CR3 getriggert. Auf diese Weise kommt es zusätzlich zu einem Mikroglia- und Komplementsystem-vermittelten Synapsenverlust (Hong et al., 2016). Die Inflammation und die dadurch verursachte Neurodegeneration wird jedoch nicht allein durch die Mikroglia verursacht und aufrechterhalten. Vielmehr ist der gesamte Vorgang das Ergebnis der Interaktion verschiedener neurotoxischer und pro-inflammatorischer Mediatoren. Beteiligt sind die bereits oben genannten TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 $\beta$ , aber auch eine Reihe weiterer Mediatoren wie Interleukin-33 (IL-33), „mitogen-activated-proteinkinase“ (MAP) und ein intrazellulärer Calciumanstieg. Diese Reaktionen werden jedoch vor allem durch die Mikroglia und deren Kommunikation mit anderen zellulären Bestandteilen wie den Astrozyten, Mast- und T-Zellen getriggert und resultieren final in der mit der Inflammation einhergehenden Neurodegeneration (Kempuraj et al., 2016).

## 1.6 AIF-1 und PTGER 2

### 1.6.1 AIF-1/IBA-1

Der „Allograft Inflammatoryfactor 1“ (AIF-1) oder auch „ionized calcium binding adaptor molecule 1“ (IBA-1) ist ein 17 Kilodalton (kDA) schweres, aus 147 Aminosäuren bestehendes und von monozytischen Zellen exprimiertes Protein. Es wird vor allem in zerebralen Mikrogliazellen gebildet und fungiert als Adaptermolekül zur Weiterleitung von Calcium-Signalen (Ito et al., 1998). AIF-1 kann dazu verwendet werden, Mikroglia in verzweigter, aktivierter, amöboider und dystropher Form immunhistochemisch kenntlich zu machen (Lier et al., 2021). In Abhängigkeit einer neuroinflammatorischen Aktivität wird AIF-1 in Mikroglia hochreguliert, sodass das Protein als Marker für ein inflammatorisches Geschehen genutzt werden kann. Zusätzlich deutet eine Abnahme des Proteins auf eine antiinflammatorische Beeinflussung dieses Geschehens hin. Eine reduzierte Expression resultiert in einem Shift der pro-inflammatorischen M1-Mikroglia zu neuroprotektiv tätigen M2-Mikroglia und führt so zu einer Umwandlung der neurotoxischen/inflammatorischen Wirkweise der Mikroglia-Zellen hin zu einer neuroprotektiven/anti-inflammatorischen (Zeng et al., 2019). Des Weiteren zeigt AIF1 auch eine Beteiligung an der Reorganisation des Zellskeletts und der Aktivierung der Mikrogliazellen. Mittels „cross-linking“ von Aktin wird durch AIF1 die Membranausstülpung, als essenzieller Bestandteil der Motilität und Phagozytose, beeinflusst (Kenkhuis et al., 2022).

### 1.6.2 PTGER2

Der Prostaglandinrezeptor E<sub>2</sub> (PTGER2) ist einer von vier von den Mikrogliazellen exprimierten Prostaglandinrezeptoren. Nach Bindung von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) übernimmt PTGER2 eine Rolle bei der Aktivierung der Mikrogliazellen. Durch die Bindung von PGE<sub>2</sub> kommt es zu verschiedenen pro-inflammatorischen Mechanismen in den Mikrogliazellen wie beispielsweise eine durch Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) mitvermittelte Steigerung der Nitritoxid (NO)-Produktion (Nagano et al., 2017). Des Weiteren führt eine Aktivierung von PTGER2 zu einer Potenzierung der intrazellulären Cyclooxygenase-2 (COX-2) durch welche es zur Bildung weiterer pro-inflammatorischer Mediatoren wie TNF- $\alpha$  kommt (Nagano et al., 2021). Die zerebralen Level von PTGER2 können deshalb

dazu verwendet werden, das inflammatorische Geschehen und die mikrogliale Beteiligung im Kortex zu monitoren (Herring et al., 2021). Darüber hinaus existiert ein potenziell positiver Effekt in einem Alzheimer-ähnlichen Mausmodell, der durch eine Deletion des PTGER2 vermittelt wird. Durch Mikrogliazellen verursachter oxidativer Stress und zerebrale A $\beta$ -Level wurden im Rahmen dieser Deletion reduziert. Auch die amyloide Prozessierung des APP, gemessen an retrograden  $\beta$ -CTF-Leveln, wurde vermindert (Liang et al., 2005).

## **1.7 Kallikrein-8**

### 1.7.1 Physiologische Funktion

Kallikrein-8 (KLK8; Synonym Neuropsin) ist eine in der extrazellulären Matrix vorliegende Serinprotease, welche eine ähnliche Substratspezifität wie Trypsin aufweist. Ihr Genlokus liegt auf dem langen Arm des Chromosom-19 und setzt sich aus sechs Exons zusammen, von denen das erste Exon nicht codierend ist. KLK8 verarbeitet die Substrate Vitronectin, Fibronectin, das Zelladhäsionsmolekül („cell adhesion molecule“ CAM) L1, Neuregulin-1 (NRG-1), sowie den Ephrin-Rezeptor B2 (EphB2) (Bukowski et al., 2020). Vornehmlich wird KLK8 in den Pyramidenzellen der Hippokampusregionen CA1-3 und den magnozellulären Neuronen der lateralen und basolateralen Areale der Amygdala exprimiert. Im Rahmen einer erhöhten neurologischen Aktivität kommt es zu einer Steigerung der KLK8 Expression (Chen et al., 1995). KLK8 erfüllt substratspezifisch verschiedene Aufgaben im zerebralen System. Über die Abspaltung der extrazellulären Domäne des neuronalen präsynaptischen Zelladhäsionsmoleküls L1 spielt es eine wichtige Rolle im hippokampusassoziierten räumlichen Lernen. Vor allem in den Phasen der „early onset“ Langzeitpotenzierung (E-LPT) und damit in der Bildung neuer Gedächtniseindrücke ist KLK8 essenziell. Hier wird die Spaltung des L1 CAM über ein postsynaptisches NMDA-vermitteltes Signal ausgelöst, wodurch es zu präsynaptischen Adhäsionsänderungen und erhöhter synaptischer Plastizität kommt. Diese Veränderung ist unabdingbar für eine stabile Potenzierung, wodurch KLK8 zum Bindeglied zwischen postsynaptischem Signal und präsynaptischer Anpassung und somit zwischen neuronalem Reiz und aktivem Gedächtnisaufbau wird. KLK8 nimmt somit eine essenzielle Rolle im Umbau der extrazellulären Matrix (EZM) und Vermittlung der synaptischen Plastizität ein (Tamura et al., 2006).

Des Weiteren nimmt KLK8 über Neuregulin-1 (NRG-1), einen Rezeptor Tyrosinkinase Liganden, durch Modulation der Gaba-Aminobuttersäure (GABA) vermittelten Übertragung weiteren Einfluss auf die synaptische Plastizität. Dieser Signalweg spielt sowohl eine Rolle für das menschliche Gedächtnis, scheint bei Funktionsverlust aber auch eine der Ursachen für geistige Erkrankungen wie Schizophrenie zu sein. KLK-8 spaltet die extrazelluläre Domäne des reifen NRG-1 und nimmt NRG-1 so seine Heparin-bindende Domäne. Auf diese Weise wird eine Ligandeneinheit aus dem Glycosaminoglykan-Pool frei und löst die Phosphorylierung des NRG-1 Rezeptors ErbB4 aus. Dies vermittelt im Rahmen der E-LTP eine Signalübertragung über den NRG-1 Rezeptor ErbB4 und ist für eine physiologische Modulation der E-LTP mittels KLK8 wichtig (Tamura et al., 2012).

Ein weiteres Substrat von KLK8 ist das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin, welches im zentralen Nervensystem exprimiert wird. KLK8 spaltet die Haupt-Fibrinbindungsdomäne des Fibronectin ab und beeinflusst so direkt seine Funktion als Zelladhäsionsmolekül (Shimizu et al., 1998). Abschließend muss vor allem die Interaktion des KLK8 mit dem Ephrin-Typ B-Rezeptor 2 (EphB2) berücksichtigt werden. EphB2 ist Bestandteil der großen Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) und nimmt eine signifikante Rolle in verschiedenen intrazerebralen Entwicklungen und Reaktionen ein. Im Rahmen der embryologischen Entwicklung modulieren Eph-Rezeptoren die Migration der Neuralleiste sowie das axonale Wachstum und die Reifung der Axone. Hierbei werden zwei Sorten der EphR unterschieden. Zum einen gibt es Typ A Rezeptoren, die über Glycosylphosphatidylinositol (GPI) an die Zellmembran verankerten Typ A Ephrinen kommunizieren. Des Weiteren existieren Typ B Rezeptoren wie EphB2, die mit der transmembranen Domäne des Typ B Ephrins interagieren (Henderson et al., 2001). EphB2 ist darüber hinaus auch im adulten ZNS essenziell für verschiedene Funktionen wie etwa die Neurogenese, Angiogenese oder die Interaktion mit Astrozyten und Fibroblasten im Rahmen neurovaskulärer Reparaturen (Ernst et al., 2019).

EphB2 kommuniziert darüber hinaus mit der NR1 Rezeptoruntereinheit des NMDA-Rezeptors (NMDAR) (Attwood et al., 2011). Auf diese Weise übernimmt EphB2 eine Rolle im Rahmen der Langzeitpotenzierung (LTP) beispielsweise im Hippocampus. Synaptische Aktivität und Kognition werden NMDA-abhängig und durch eine EphB2-

vermittelte Regulation der synaptischen Lokalisation des NMDAR positiv beeinflusst (Hu et al., 2017). Des Weiteren findet auch eine Interaktion von EphB2 und den postsynaptischen „ $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid“ (AMPA) - Rezeptoren (AMPA) statt. Die AMPAR stellen den Großteil der Neurotransmitter-Rezeptoren im ZNS dar und sind in die synaptische Plastizität involviert. Eine über EphB2 vermittelte Endozytose dieser Rezeptoren spielt vor allem im Rahmen der synaptischen Langzeitdepression (LTD) eine wichtige Rolle (Irie et al., 2005). Positive Prozesse wie Angiogenese und Neurogenese sowie die Vermittlung der synaptischen Plastizität im Hippocampus werden durch die Spaltung von EphB2 durch KLK8 negiert. Während die EphB2/NMDAR-Interaktion beispielsweise im Hippocampus durch KLK8 gedämpft wird, erfährt sie in der Amygdala eine Potenzierung durch KLK8. Im Rahmen von traumatischen Ereignissen kommt es durch die EphB2/NMDAR- Interaktion zu einer gesteigerten Expression des sogenannten „Stressgens“ Fkbp5 und so zu einer Entwicklung der Angstreaktion. Durch eine KLK8-vermittelte Spaltung des extrazellulären Anteils von EphB2 kann der Rezeptor freier mit der N1 Untereinheit des NMDAR interagieren und die Dynamik der EphB2/NMDAR-Interaktion wird gesteigert. Dies resultiert in einer gesteigerten Fkbp5-Expression. Dieser Aspekt der Angstentwicklung wird darüber hinaus auch noch durch eine erhöhte Expression von KLK8 bei einem entsprechenden neuronalen Reiz verstärkt (Attwood et al., 2011). Neben einer durch KLK8 verstärkten Angst- und Stressreaktion behindert Fkbp5 darüber hinaus die Degradation von Tau und fördert die Neurotoxizität (Bailus et al., 2021). Gesteigerte Level an Fkbp5 scheinen darüber hinaus eine Veränderung der Assoziation des Hitzeschockproteins-90 (Hsp90) zu den AMPAR und damit ein erhöhtes Recycling dieser Rezeptoren hervorzurufen. Dieser Vorgang resultiert in einer negativen Beeinflussung des Lern- und Gedächtnisprozesses (Blair et al., 2019).

### 1.7.2 Potenziell pathologische Rolle im Rahmen des Morbus Alzheimer

KLK8 nimmt als extrazelluläre Serinprotease an einem breiten Spektrum zerebraler Vorgänge teil. Neben Einflüssen auf die räumliche Gedächtnisbildung und Modifizierung der synaptischen Plastizität spielt KLK-8 über Fibronectin auch eine Rolle in der Zelladhäsion und Rekrutierung. Angiogenese, genau wie Neurogenese, aber auch die Entwicklung und Steuerung der Angstreaktion werden durch KLK8 beeinflusst. Diese

Parameter und zerebralen Abläufe sind im Rahmen der AD pathologisch alterniert und implizieren eine mögliche Rolle von KLK-8 in der Pathogenese der Erkrankung.

Darüber hinaus konnten die Arbeitsgruppe um Cissé zeigen, dass EphB2-Proteinlevel und mRNA-Level im Bereich des Hippocampus in transgenen Mausmodellen gegenüber Wildtyp Mäusen bereits frühzeitig pathologisch abgesenkt sind. Auf diese Weise gesenkte NMDAR-Ströme und die Beeinträchtigung der LTP konnten über eine Lentiviren-vermittelte Erhöhung der EphB2-Expression revidiert werden (Cissé et al., 2011). Trotz der Substratspezifität von KLK8 zu EphB2 und der Fähigkeit der Protease, Teile des EphB2 zu spalten und Einfluss auf seine Wirkung zu nehmen, wurden bisher nur wenige Rückschlüsse auf eine Beteiligung von KLK-8 an der Alzheimer-Pathologie gezogen.

Mittels einer Analyse der Gehirne von Alzheimer-Patienten und unter Nutzung des transgenen (Tg) CRND8-Mausmodells konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass KLK8 bereits präklinisch, noch deutlich vor Auftreten erster A $\beta$ -Pathologien, erhöht ist. Mit einer Analyse der Serum- und Rückenmarksflüssigkeits-Level von KLK8 ließ sich zudem demonstrieren, dass KLK8 die exakte diagnostische Akkuratheit bereits etablierter Alzheimer-Biomarker wie etwa A $\beta$ <sub>42</sub> aufweist und im Rahmen des MCI sogar übertrifft (Teuber-Hanselmann et al., 2020). Unter Berücksichtigung des frühen Anstiegs zerebraler KLK8-Level scheint es deshalb wahrscheinlich, dass KLK8 in der kausalen Wirkungskette der Alzheimer-Pathogenese eine frühe Komponente darstellt.

### 1.7.3 Kallikrein-8 als mögliches therapeutisches Target

Unter Annahme der These, dass KLK8 eine frühe Komponente in der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung darstellt, untersuchte unsere Arbeitsgruppe deshalb eine Blockade von KLK-8 als potenzielles therapeutisches Target. Eine intraventrikuläre Applikation eines KLK-8 Antikörpers resultierte hierbei in einer gesteigerten A $\beta$ -Clearance, einer Reduktion zerebraler A $\beta$ - und Tau-Level sowie einer erhöhten Neuroplastizität. Darüber hinaus zeigten therapierte Mäuse eine deutlich verbesserte kognitive Leistungsfähigkeit und signifikant reduzierte Angstlevel (Herring et al., 2016). Diese Arbeit ist ein neuer Ansatz um die pathomechanische Funktion von KLK8 im Kontext der AD und seine putative Rolle als ein therapeutisches Target zu verifizieren.

## 2 FRAGESTELLUNGEN

In Kapitel 1.5 dieser Arbeit wurden die Mikroglia und ihre Rolle in Bezug auf die Inflammation und daraus resultierende Neurodegeneration in der Pathogenese des Morbus Alzheimer dargestellt. Die von unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Blockade von KLK8 mit Hilfe eines intraventrikulär applizierten Antikörpers zeigte auf viele pathologische Aspekte der Erkrankung positive Auswirkungen. Mikroglia vermitteln über die von ihnen verursachte Inflammation eine stetige, progrediente Neurodegeneration. Im Rahmen dieser Neurodegeneration und dem damit verbundenen Neuronenuntergang kommt es zwangsläufig zu einer Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten. Unter Verwendung einer KLK8-Antikörpertherapie zeigte sich eine deutliche Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten. Dies legt die Vermutung nahe, dass KLK8 direkt oder indirekt mit der residenten Mikroglia interagiert und die von diesen Zellen vermittelte Inflammation beeinflusst, woraus sich die Fragestellung dieser Arbeit ergibt.

1. Welchen Einfluss übt ein genetischer Knockdown von Kallikrein-8 unter Berücksichtigung geschlechterspezifischer Differenzen, sowie im Hinblick auf die krankheitszyklisch unterschiedlich schwer betroffene Areale des Neokortex, Hippokampus und der Basalganglien, auf die im Rahmen des Morbus Alzheimer auftretende Mikrogliose aus?
2. Inwiefern wird die Sekretion des mikroglialen Inflammationsmarker AIF1 durch einen Knockdown von Kallikrein-8 unter Einbezug des Geschlechtes und der krankheitszyklisch unterschiedlich stark betroffenen Areale des Neokortex, Hippokampus und der Basalganglien beeinflusst?
3. Inwiefern wird die Sekretion des mikroglialen Inflammationsmarkers PTGER2 durch einen Knockdown von Kallikrein-8 unter Einbezug des Geschlechts und der krankheitszyklisch unterschiedlich stark betroffenen Areale des Neokortex, Hippokampus und der Basalganglien beeinflusst?

### 3 MATERIAL UND METHODEN

**Im folgenden Kapitel werden das dieser Arbeit zugrunde liegende Tiermodell, sowie die verwendeten Methoden und Versuchsabläufe aufgeführt und erläutert. In diesem Zusammenhang genutzte Materialien finden sich in einer tabellarischen Auführung im Anhang. Die Datenerhebung erfolgte verblindet. Die Arbeitsschritte 3.1-3.4, sowie 3.5.1, 3.5.3 und 3.6 wurden nicht eigenständig, sondern durch andere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe durchgeführt, dienten jedoch als Grundlage für meine Arbeit. Die Arbeitsschritte Probenvorbereitung (3.5.2), Gelelektrophorese (3.5.4), Tank-Western-Blot-Verfahren (3.5.5), Chemilumineszenz-basierte Proteindetektion (3.5.6), sowie die stereologische Quantifizierung (3.7) und die statistische Auswertung der Daten (3.8) wurden eigenständig durchgeführt.**

#### 3.1 Tiermodell

Zur Untersuchung der *in vivo* Auswirkungen einer dauerhaften KLK8-Reduktion auf die Alzheimer-Pathologie wurde durch Kreuzung ein genetischer Knockdown des murinen *Klk8* Gens (*mKlk8*<sup>+/-</sup>) im Alzheimer-Mausmodell TgCRND8 generiert. Im Folgenden werden nun Gründerstämme, Intermediär- und Experimentalgeneration näher beschrieben.

##### 3.1.1 Gründerstämme

1. Der erste Gründerstamm, der transgene CRND8-Mausstamm (Tanz Center for Research in Neurodegenerative Diseases, Toronto, Kanada), zeichnet sich durch eine hemizygote Doppelmutation des humanen Amyloid-Vorläuferprotein-695-Transgens [*hAPP*<sup>+/-</sup>], bestehend aus der „Swedish“ und „Indiana“ Mutation [*KM670/671NL & V717F*], kontrolliert durch den Hamster Prion-Protein-Promoter auf einem C57BL/6-C3H/HeJ Hybrid-Hintergrund Stamm aus (Chishti et al., 2001). Die transgenen CRND8-Mäuse zeigen bereits ab dem 30. postnatalen Tag (P30) einen zerebralen Überschuss an KLK8 (Herring et al., 2016). Zerebrale Amyloid-Beta (A $\beta$ ) Plaque Bildung, sowie kognitiven Einschränkungen setzen etwa ab P90 ein (Chishti et al., 2001).

2. Der zweite Gründerstamm entspricht *mKlk8*-knockout Mäusen (homozygoter knockout für murines *Klk8* [*mKlk8*<sup>-/-</sup>] gebildet auf einem C57BL/6J Hintergrundstamm (B6.129P2-KLK8<sup>tm1Shio</sup>, RIKEN BioResource Research Center, Tsukuba, Japan). Diese Mäuse sind lebensfähig und fertil, zeigen jedoch eine Verminderung der hippokampalen Langzeitpotenzierung (LTP) in Kombination mit den Hippokampus-assoziierten Gedächtnisleistungen (Tamura et al., 2006). Auch präsentieren sie milde hippokampale, synaptische und neurologische Auffälligkeiten, wie etwa ein vergrößertes Pyramidenzell-Soma, eine Reduktion der Dichte von asymmetrischen Synapsen, sowie eine erhöhte Anzahl Parvalbumin-produzierender Zellen (Hirata et al., 2001).

### 3.1.2 Intermediär-Generation

Für die Intermediär-Generation wurden die Mäuse mit homozygotem knock-down für murines *Klk8* [*mKlk8*<sup>-/-</sup>] mit nicht transgenen C3H/HeJ Mäusen, wildtypisch für *mKlk8* [*mKlk8*<sup>+/+</sup>] gekreuzt. Dies resultierte in heterozygoten *mKlk8* knock-down Mäusen [*mKlk8*<sup>+/-</sup>] auf einem C57BL/6-C3H/HeJ Hintergrundstamm, welcher dem Hintergrund des TgCRDN8-Modells entspricht.

### 3.1.3 Experimental-Generation

Mit dem Ziel die KLK8-Expression in den TgCRND8 Mäusen permanent zu senken, wurden 10 weibliche, nicht-transgene [*hAPP*<sup>-/-</sup>] *mKlk8* knockdown Mäuse [*mKlk8*<sup>+/-</sup>] der Intermediärgeneration mit 10 männlichen transgenen CRND8 Mäusen ohne *mKlk8* Knockdown [*hAPP*<sup>+/-</sup>, *mKlk8*<sup>+/+</sup>] gepaart. Dies resultierte in den folgenden 4 gewünschten Genotypen:

1. Transgene Mäuse mit Alzheimer-Pathologie und mit einem knock-down für *mKlk8* [*hAPP*<sup>+/-</sup>, *mKlk8*<sup>+/-</sup>], welche um 50% geringere Level an KLK8 produzieren als TgCRND8 Mäuse ohne *mKlk8* Knockdown.
2. Transgene Mäuse mit Alzheimer-Pathologie aber ohne den *mKlk8* knock-down [*hAPP*<sup>+/-</sup>, *mKlk8*<sup>+/+</sup>]. Diese Mäuse besitzen erhöhte zerebrale KLK8 Level im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Herring et al., 2016; Keyvani et al., 2018).

3. Nicht-transgene Mäuse mit einem *mKlk8* knock-down die keine Alzheimer-ähnlichen Pathologien zeigen, jedoch geringere Level an KLK8 produzieren als Wildtyp-Mäuse ohne Knockdown [*hAPP*<sup>-/-</sup>, *mKlk8* +/-].
4. Nicht-transgene Mäuse, die weder eine Alzheimer ähnliche Pathologie noch verminderte zerebrale *mKlk8* Level besitzen [*hAPP* <sup>-/-</sup>, *mKlk8* +/+] (Wildtyp).

### 3.2 Tierhaltung

Alle Mäuse jeder Generation und jedes Genotyps lebten in Standardhaltung (SH) in Käfigen des Typs Makrolon III, zusammen mit ihren Müttern bis P30 (frühe juvenile Phase, vor Auftreten der Alzheimer-Pathologie). Ab P30 wurden die Mäuse mit Hilfe einer konventionellen PCR-Analyse für *hAPP* und *mKlk8* genotypisiert. Hierzu wurden drei verschiedene Primer genutzt, um zwischen *mKlk8* <sup>-/-</sup>, *mKlk8* +/- und *mKlk8* +/+ Genotypen unterscheiden zu können. Außerdem wurde mittels PCR der murinen *sex determining region Y (mSry)* eine Verifizierung des Geschlechts vorgenommen. Im Anschluss wurden die Mäuse in Standardhaltung in Gruppen von 3-4 Versuchstieren gleichen Geschlechts gehalten. Für die Generierung der Intermediär- und Experimentalgeneration wurden jeweils ein weibliches und ein männliches Tier zusammen im Käfig gehalten. Sowohl Futter als auch Leitungswasser standen den Tieren aller Generationen jederzeit zur freien Verfügung. Im Vergleich zu den Mäusen der Intermediär- und Gründergenerationen wiesen auch die Mäuse der Experimentalgeneration keine zusätzlichen Pathologien auf.

Um eine Effektverzerrung durch den elterlichen Genotyp auf den Phänotyp der Experimentalgeneration zu verhindern, wurden die Versuchsgruppen zufällig und zu gleichen Anteilen aus den Nachkommen der Zuchtpaare zusammengesetzt.

### 3.3 Verhaltensphänotypisierung

Die Untersuchung des Verhaltens der Experimentalgeneration erfolgte mittels verschiedener Tests zwischen P210 und P234. In dieser Phase befanden sich die Tiere bereits in einem fortgeschrittenen Stadium der Alzheimer-ähnlichen Krankheit. Vor Durchführung der Verhaltenstests wurden die Tiere zunächst für eine Woche an einen invertierten Tag und Nacht Rhythmus gewöhnt.

Die Untersuchung der Ängstlichkeit der Tiere erfolgte mittels des *Elevated Plus Maze* (EPM) (Young et al., 2008). Das explorative Verhalten der Tiere konnte mittels *Open-Field Tests* (OF) analysiert werden (Kilic et al., 2010). Als letztes erfolgte die Untersuchung des Gedächtnisses zur Objekt-Wiedererkennung mittels *Novel-Object-Tests* (Ennaceur and Meliani, 1992).

Tabelle 1 zeigt die Anzahl der Tiere pro Gruppe der Experimentalgeneration, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit untersucht wurden:

Gruppe	Geschlecht	hAPP-Transgen	mKlk8-knockdown	Anzahl der Tiere
1	♀	+/-	+/+	12
2	♀	+/-	+/-	12
3	♂	+/-	+/+	12
4	♂	+/-	+/-	11
5	♀	-/-	+/+	10
6	♀	-/-	+/-	12
7	♂	-/-	+/+	13
8	♂	-/-	+/-	12
Gesamt	/	/	/	94

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

### 3.4 Probengewinnung

Im Anschluss an die Verhaltensphänotypisierung wurden die Mäuse der Experimentalgeneration zur Probengewinnung an Tag P226 ( $\pm 0,77$ ) getötet. Zunächst wurden sie hierzu mit Hilfe eines CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> Gemisches betäubt und im Anschluss mit Hilfe reinen Kohlenstoffdioxids bei einer Flussrate von 1,8 l/min getötet. Es folgte die Entnahme des Hirngewebes. Hierzu wurden die getöteten Mäuse dekapitiert. Die linke Hemisphäre der Tiere wurde mittels Formalin fixiert, anschließend in Paraffin eingebettet und zugeschnitten. Dieser Teil diente der immunhistologischen Färbung und anschließenden stereologischen Auswertung. Aus der anderen Hemisphäre wurden Neokortex, entorhinaler Kortex, sowie der Hippokampus getrennt voneinander isoliert und anschließend mittels Flüssigstickstoff bei -80°C tiefgefroren. Der entorhinale Kortex und der Hippokampus wurden zur DNA, RNA und Proteinextraktion mittels TRIzol-Reagenzes ohne sub-zelluläres Fraktionieren, mit Hilfe eines Protease-Inhibitor-Cocktails und PMSF verwendet. Der Neokortex diente der DNA, RNA und

Proteinextraktion mittels TRIzol-Reagenzes oder der Proteinextraktion mittels Proteinextraktionspuffers.

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

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

#### 3.4.1 Extraktion von DNA, RNA und Proteinen

Zur Extraktion von DNA, RNA und Proteinen wurde der zuvor auf  $-80^{\circ}\text{C}$  gefrorene Neocortex der rechten Hemisphäre der Tiere der Experimentalgeneration verwendet. Für den gesamten Arbeitsteil der RNA-Isolierung wurde mit RNase-freien Spritzen gearbeitet. Zunächst wurde das Gewebe zusammen mit  $800\ \mu\text{l}$  Trizol-Reagenz (s. 8.4) in einem Mikrodismembrator für 2 min bei 2500 rpm zertrümmert, um homogenisierte Proben zu erhalten. Das entstandene Homogenat wurde dann in einem Reaktionsgefäß mit  $800\ \mu\text{l}$  Trizol-Reagenz zusammengeführt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Zwecks Phasentrennung erfolgte dann die Zugabe von  $200\ \mu\text{l}$  Chloroform. Zunächst wurde das Homogenat für 5 Sekunden gevortext und dann für 2 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation mit 13000 rpm bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Durch die Phasentrennung zeigte die Probe nun eine obere, wässrige Phase, welche die RNA enthielt, eine mittlere, trübe Phase, die die DNA enthielt, sowie eine untere, Protein-enthaltende, organische Phase. Zur Weiterverarbeitung wurde die obere Phase mit  $500\ \mu\text{l}$  Trizol-Reagenz in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend folgte nach einer Zugabe von  $100\ \mu\text{l}$  Chloroform und 2-minütiger Inkubation bei RT eine 15-minütige Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13000 rpm, sodass erneut eine obere Phase entstand, welche in ein weiteres Gefäß überführt wurde. Die Fällung der RNA wurde mittels einer weiteren, 10-minütigen Inkubation dieser oberen Phase bei RT unter Zugabe von  $800\ \mu\text{l}$  Isopropylalkohol und einer folgenden 60-minütigen Zentrifugation mit 13000 rpm bei  $4^{\circ}\text{C}$  erreicht. Das entstandene RNA-Pellet wurde durch zweimaliges Versetzen mit 80%-Ethanol in Diethylpyrocarbonat (DEPC)- $\text{H}_2\text{O}$  und anschließender Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$

und 13000 rpm für 5 min gereinigt. Der Überstand konnte jeweils verworfen werden und das Pellet wurde abschließend getrocknet. Zur Lagerung wurde das Pellet in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgelöst und bei -80°C gelagert. Die zuvor gewonnene mittlere und organische Phase des ursprünglichen Homogenats wurde zwecks DNA-Isolierung mit 480 µl 100% Ethanol für 2 min bei RT inkubiert und anschließend 5 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Proteinextraktion abgezogen und zu gleichen Teilen auf 2 Reaktionsgefäße aufgeteilt. Das entstandene DNA-Pellet wurde bei -80°C gelagert. Für die Proteinextraktion wurde dem Überstand der DNA-Isolation 2,4 ml Isopropylalkohol hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 13000 rpm, um ein Proteinpellet zu erhalten. Das Proteinpellet wurde dann in 3 sich wiederholenden Waschschritten gereinigt. Hierzu wurden dem Pellet 3,2 ml 0,3 M Guanidinhydrochlorid Lösung in 95%-Ethanol hinzugegeben, für 20 min bei RT inkubiert und abschließend bei 4°C für 4 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde jedes Mal verworfen. Nach dem letzten Waschschriff wurden 1,6 ml 100%-Ethanol hinzugegeben und für 5 min bei 4°C und 10000 rpm zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde dann zerkleinert und bei 40°C auf dem Heizblock getrocknet. Das Proteinpellet wurde mit Hilfe eines Proteinase-Inhibitor-Cocktails (1:1000), Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) (1:100) und 800 µl Aqua dest. mit 1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) gelöst. Zur optimalen Lösung wurden die Proben bei 40°C mehrmals geschüttelt und beschallt. Bei -80°C wurden sie dann zur Konservierung gelagert.

### **3.5 Proteinanalyse**

#### **3.5.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach LOWRY**

Unter Verwendung der Lowry-Methode (Lowry et al., 1951) wurde eine quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration in den zuvor extrahierten Proben durchgeführt. Hierzu wurde das DC<sup>TM</sup> Protein Assay Kit II verwendet. Es folgte eine photometrische Messung bei 750 nm im Multiscan<sup>TM</sup> FC.

### 3.5.2 Probenvorbereitung

Die Proben wurden zunächst von  $-80^{\circ}\text{C}$  mit Hilfe eines Thermomixers aufgetaut. Im Anschluss wurde der benötigten Proteinmenge ein Standard-Lysispuffer, sowie 5x Sodiumdodecylsulfat (SDS)-2-Mercaptoethanol (s. Tabelle im Anhang) zugegeben. Es folgte eine 5-minütige Denaturierung bei  $95^{\circ}\text{C}$  im Thermomixer und eine darauffolgende Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 min. Für jede angesetzte Probe betrug die Proteinmenge zur Bestimmung von AIF1 und PTGER2 jeweils  $30\ \mu\text{g}$  in einem Volumen von  $25\ \mu\text{l}$ . Die zerebrale Expression der genannten Proteine wurde bei 94 Tieren der Experimentalgeneration mindestens im Duplikat bestimmt (s. Tabelle 1).

### 3.5.3 Fluoreszenz-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der gesamten aufgetragenen Proteinmenge der Proben wurde eine Fluoreszenz-Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurden mit Hilfe des TGX Stain-Free™ Fast Cast™ Acrylamide Kits nach Vorgabe Trenngele und Sammelgele (s. Tabelle im Anhang) angefertigt. Für die Fluoreszenz-Gelelektrophorese wurden jeweils  $10\ \mu\text{g}$  der Proben in einem Volumen von  $25\ \mu\text{l}$  aufgetragen und die Gele unter UV-Licht des Kamera ChemiDoc XRS+ Systems für 5 Minuten aktiviert. Auf diese Weise konnte die Kamera des ChemiDoc XRS+ Systems im Modus UV-Transillumination die so entstandene Fluoreszenz erfassen und aufnehmen. Die Analyse der Signalstärke der Proteine erfolgte abschließend mit Hilfe der Image Lab™ Software (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA).

### 3.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine abhängig von ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld voneinander getrennt. Hierzu wurden zunächst Polyacrylamidgele (bestehend aus einem Trenn- und Sammelgel, siehe Tabelle 9.2.4 Anhang) angefertigt. Die Geltaschen wurden anschließend mit den zuvor vorbereiteten Proben befüllt. Die erste Geltasche jedes Gels wurde zur Orientierung und Ermittlung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine mit einem Größenmarker bestückt. Anschließend wurde die Phoresekammer mit 1x SDS Laufpuffer (siehe Tabelle

9.2.4 Anhang) aufgefüllt. Unter einer konstanten Elektrophorese-Spannung von 120 V erfolgte die Protein-Auftrennung für etwa 2h. Der Vorgang wurde mit dem Erreichen der Bromphenolblaubande des Markers am unteren Ende des Laufgels beendet.

### 3.5.5 Western-Blot und Antikörperblockierung

Im Anschluss an die Auftrennung der Proteine erfolgte zur weiteren Analyse ein Transfer der Proteine mittels elektrophoretischer Übertragung von den Trenngelen auf eine Nitrozellulose-Trägermembran unter Verwendung des Tank-Blot-Verfahrens (Towbin et al., 1979).

Hierzu wurden die Gele zunächst in einem 4°C kaltem Blot-Puffer für 5-15 min geschwenkt. Zeitgleich wurden die Einzelteile des „Blot-Sandwiches“ (Schwämme, Filter und Membran) ebenfalls in Blot-Puffer äquilibriert. Anschließend folgte die Konfiguration des „Blot-Sandwiches“, bestehend aus dem Gel und den vorher beschriebenen Bestandteilen. Die Blottingkammer wurde mit dem „Blot-Sandwich“, einem Kühlakku, einem Magnetrührer und dem 4°C kalten Blotpuffer gefüllt. Anschließend wurden die Proteine bei einer Spannung von 140 V und einer Stromstärke von 0,25 A für 1 Stunde unter ständigem Rühren horizontal auf die Nitrozellulosemembran übertragen.

Die Nitrozellulosemembran wurde im nächsten Schritt zunächst für 5 min in 1x TST (s. Anhang 8.4.) gewaschen. Anschließend wurde der erfolgreiche Proteintransfer mittels Ponceau S-Färbung (s. 8.4.) kontrolliert. Zwecks Färbung wurde die Nitrozellulosemembran für 5 min auf dem Schüttler mit Ponceau S-Färbung inkubiert. Bei erfolgreicher Färbung wurde die Membran mittels 1x TST Waschschrift wieder vollständig entfernt und für die Blockierung verwendet.

Zunächst wurden die Membranen hierzu für 30 min bei RT in 5% Magermilchpulver (MMP)-TST (s. 8.4.) als Blockierungsmedium inkubiert. Hierdurch sollten unspezifische Bindungen der Antikörper durch Blockierung und somit Maskierung unspezifischer Antigene verhindert werden. Für die Analyse der Proteine AIF1 und PTGER2 folgte nun die Inkubation mittels des Primärantikörpers bei 4°C über Nacht. Dieser wurde in einer zuvor festgelegten Konzentration (siehe Tabelle 2) mit 5% MMP in 1x TST verdünnt und auf die Membranen gegeben. Nach 12h wurden die Membranen zunächst für 3x 10 min in TST gewaschen, um nicht gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen. Einer

erneuten 30-minütigen Blockierung mit 5% MMP-TST bei RT folgte die Inkubation mit *horseradish*-Peroxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörpern (ebenfalls in 5% MMP-TST verdünnt, siehe Tabelle 3) für insgesamt 60 min. Abschließend wurden die Membranen mittels mehrerer Waschschrte auf die Chemilumineszenz-basierte Proteindetektion vorbereitet.

<b>Primärantikörper</b>	<b>Typ</b>	<b>Verdünnung in 5%MMP-1xTST</b>	<b>Hersteller, Katalognummer</b>
Anti-AIF1	Rabbit	1:500	Abcam Inc., Cambridge Massachusetts, USA, Ab 178847
Anti-PTGER2	Rabbit	1:1000	OriGene Technologies, Inc., Rockville, Maryland, USA TechnologiesAP01201PU- N

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper zur Blockierung im Anschluss an das Western-Blot-Verfahren

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Verdünnung in 5%MMP-1xTST</b>	<b>Hersteller, Katalognummer</b>
Anit-rabbit IgG	HRP-konjugiert	1:10000 <sup>(1)</sup>	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Cambridgeshire, UK; 111-035-003

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper im Anschluss an die erste Blockierung. (1) Für beide Primärantikörper wurde jeweils der gleiche Sekundärantikörper in gleicher Verdünnung verwendet

### 3.5.6 Chemilumineszenz-Basierte Proteindetektion

Durch das Verfahren der Chemilumineszenz-basierten Proteindetektion wurde im letzten Arbeitsschritt die Proteine AIF1, unter Verwendung des Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagent-Kits und PTGER2, unter Verwendung des Immobilon Western HRP-Substrat Kits, quantifiziert. Die verwendete Kamera des ChemiDoc XRS+ Systems wurde zunächst mit Hilfe der Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) für die optimale Expositionszeit, Zoom und Fokussierung kalibriert. Im Anschluss wurde die Membran für diesen Arbeitsschritt mit einem *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Kit, welches Luminol und ein Peroxid Reagenz enthält, für 1 min inkubiert. Das an den Sekundärantikörper konjugierte HRP reduziert, in Abhängigkeit von seiner Menge, das vorliegende Peroxid-Reagenz, welches dann vom Luminol unter Emission von blauem Licht (Chemilumineszenz) als Oxidationsmittel genutzt wird. Je größer die gebundene Anzahl an Sekundärantikörpern an den untersuchten Proteinen, desto stärker ist das zu beobachtende Chemilumineszenz-Signal. Dieses wird nun in der Dunkelkammer der Digitalkamera (ChemiDoc XRS+ System, BioRad, München) erfasst und mit Hilfe der Software Image Lab 2.0 (BioRad, München) ausgewertet. Nach dem Prinzip der Densitometrie (Lichtmenge pro Fläche) wurde die von den Proteinbanden ausgesendete Signalstärke (Abhängig von der Bandendicke und damit von der Proteinmenge) in einen Zahlenwert umgerechnet. Die so berechneten Zahlenwerte konnten dann mittels der in 3.5.3 beschriebenen Fluoreszenz-Gelelektrophorese auf die Gesamt-Proteinmenge normiert werden. Am Ende wurde die Chemilumineszenz-Signal-Intensität hintergrundkorrigiert. Im Sinne einer hohen Reliabilität wurde jede Probe mindestens im Duplikat und bei Abweichung der Duplikat-Messung von mehr als 10% im Triplikat quantifiziert.

### 3.6 Immunhistologische Färbung AIF-1 positiver Mikrogliazellen

Die linke Hemisphäre der Mäuse wurde mittels immunhistologischer Färbung präpariert, sodass eine stereologische Analyse der AIF1 positiven Mikrogliazellen im Gewebe möglich war. Das Gewebe der Mäuse der Experimentalgeneration wurde zunächst mittels 4% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden diese Paraffinblöcke koronar in 10 µm dicke Präparate geschnitten und auf Objektträgern

fixiert. Um die Präparate für die Färbung zu entparaffinieren, wurden sie zunächst mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe in der Reihenfolge Xylol, 100%-Ethanol, 96%-Ethanol, 70%-Ethanol und für eine Wässerung abschließend mit Aqua dest. behandelt. Im Anschluss wurden die Präparate mit einem zuvor auf 95°C vorgewärmten Citratpuffer (s. 8.4) für 20 min inkubiert. In dieser Phase erfolgte die *heat-induced epitope retrieval* (HIER)-Reaktion, um die Epitop-Verfügbarkeit zu verbessern. Nach 20-minütiger Abkühlung bei RT wurden die Präparate für weitere 20 min mit 1% Triton (gelöst in Aqua dest.) inkubiert um die Zellen zu permeabilisieren. Nun folgte eine 5-minütige Behandlung mittels 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*peroxidase blocking solution*), bei welcher die Präparate vor und nach der Behandlung in 1x Waschpuffer gegeben wurden. Die Präblockierung erfolgte darauffolgend für 10 min, bevor die Präparate erneut mit Waschpuffer gespült wurden. Die Präparate wurden dann in einer feuchten Färbekammer positioniert. Der primäre *AIF1*-Antikörper sowie der sekundäre *anti-goat* Antikörper wurde mittels *antibody diluent* verdünnt (s. 8.4.). Zunächst wurden die Präparate für 2 Stunden bei RT mit dem primären Antikörper inkubiert, bevor ein weiterer Waschschrift erfolgte. Im Anschluss erfolgte eine 20-minütige Inkubation bei RT mit dem gegen den ersten Antikörper gerichteten zweiten Antikörper und ein weiterer Waschschrift. Durch eine 30-minütige Zugabe des HRP-Polymers, gefolgt von der Applikation des Diaminobenzidins (DAB), konnte eine Färbung der *AIF-1* positiven Mikrogliazellen im Gewebe erzielt werden. Die Reagenzien für die Prä- und Postblockierung, ebenso wie das HRP-Polymer, stammten aus dem ZytoChem Plus HRP Polymer System-Kit. Um die Präparate abschließend wieder zu entwässern und zu konservieren, erfolgte die oben beschriebene Alkoholreihe in umgekehrter Reihenfolge, beginnend mit Aqua dest., 70%- Ethanol, 96%-Ethanol, 100%- Ethanol und abschließend Xylol. Zur Fixierung der Deckgläser auf den Objektträgern wurde dann das Eindeckmittel Cytoseal XYL verwendet. Die so erstellten Präparate wurden vor der stereologischen Quantifizierung *AIF-1* positiver Mikrogliazellen verblindet.

Primär-Antikörper	Isotyp	Verdünnung	Hersteller, Katalognummer
Anti-AIF1	goat-IgG	1:300	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland, AP08912PU-N
Anti-Goat	rabbit-IgG	1:600	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland, E0466

Tabelle 4: Verwendete Antikörper zur immunhistologischen Färbung

### 3.7 Stereologische Quantifizierung AIF1-positiver Mikrogliazellen und Zelldichte

Die stereologische Quantifizierung AIF1-positiver Mikroglia-Zellen erfolgte in den Tieren der Experimentalgeneration (s. Tabelle 1) in der linken Hemisphäre. Hierbei wurden die Bereiche Neokortex, Hippokampus und Basalganglien untersucht. Verwendung fand hierbei ein Lichtmikroskop, welches über eine Digitalkamera mit der Software *Stereo Investigator 11* (MicroBrightField Bioscience, Williston, USA) verbunden war. Für die Quantifizierung wurden die Objektträger zu Beginn in einer 20-fachen Vergrößerung mit einer Belichtungszeit von 15 ms unter dem Mikroskop positioniert, um die Kontur des zu untersuchenden Areals in der *Stereo Investigator 11* Software einzuzichnen und seine Größe zu registrieren. Dieser Schritt der Größenregistrierung wurde für jedes Areal gesondert durchgeführt. Anschließend wurde eine 200-fache Vergrößerung mit einer Belichtungszeit von 30 ms bei geöffnetem Kondensator eingestellt. Die Größe des Zählrahmens wurde in der Software auf 250 x 250  $\mu\text{m}$  und die Größe des Zählrasters auf 375 x 375  $\mu\text{m}$  eingestellt. Quantifiziert wurden alle Mikrogliazellen mit einem sichtbaren Zellsoma. Die Ergebnisse wurden als Anzahl der AIF1-positiven Mikrogliazellen in Relation zur Größe der untersuchten Areale Neokortex, Hippocampus und Basalganglien ( $\text{n}/\text{mm}^2$ ) angegeben. Pro Tier der Experimentalgeneration wurden jeweils 6 Schnitte mit einem Abstand von 100  $\mu\text{m}$  zwischen den Schnitten untersucht.

### 3.8 Statistik

Zur Auswertung und Signifikanzanalyse wurden die in dieser Arbeit erhobenen Daten verschiedenen statistischen Tests unterzogen. Hierzu wurde die Software IBM ® SPSS Statistics ® 22 verwendet. Vor Durchführung der Tests wurde ein Signifikanzlevel ( $\alpha$ ) von  $P < 0,05$  festgelegt. Die Daten wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests und mittels Q-Q-Diagrammen auf ihre Normalverteilung überprüft. Mittels Levene-Tests konnte die Varianzhomogenität bestimmt werden. Die Mittelwertvergleiche mehrerer Gruppen der normalverteilten Daten erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Transgen-Status (*hAPP* +/- vs. *hAPP* -/-) und dem *mKlk8*-Genotyp als Zwischensubjektfaktoren. Im Anschluss wurde mittels *least significant difference* (LSD)-*post hoc* Test ermittelt, ob signifikante Unterschiede der abhängigen Variablen in den vier untersuchten Gruppen (transgene Mäuse mit Alzheimer-ähnlicher Pathologie und erhöhten zerebralen KLK8-Leveln [*hAPP* +/-, *mKlk8* +/+], transgenen Mäusen mit 50% reduzierten zerebralen KLK8 Leveln [*hAPP* +/-, *mKlk8* +/-], nicht transgenen Mäusen ohne *hAPP*-Transgen mit [*hAPP* -/-, *mKlk8* +/-] und ohne *mKlk8* knock-down [*hAPP* -/-, *mKlk8* +/+], existieren. Der Einfluss des Geschlechts wurde durch eine Varianzanalyse mit dem Geschlecht (♀ vs. ♂) als Zwischensubjektionsfaktor ermittelt. Durch Anwendung des Kruskal-Wallis-Test, sowie des Mann-Whitney-U-Tests wurden die Mittelwerte der nicht-normalverteilten Daten miteinander verglichen.

## 4 ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss eines Knockdowns von Kallikrein 8 auf verschiedene pathophysiologische Aspekte der Alzheimererkrankung, vor allem im Hinblick auf die Neuroinflammation und Mikrogliose, untersucht. Im Zuge dessen wurden ebenfalls geschlechterspezifische Unterschiede analysiert und die ermittelten Ergebnisse im Falle von statistisch relevanten Unterschieden geschlechtergetrennt und im Falle ausbleibender geschlechterspezifischer Unterschiede geschlechtergepoolt präsentiert.

### 4.1 Der genetische Knockdown von Kallikrein 8 hat keinen Einfluss auf die Gesamtanzahl zerebraler aktivierter Mikroglia in einem AD-Mausmodell

Wie bereits mehrfach gezeigt, wies die durch die Alzheimer-ähnliche Pathologie betroffene transgene Mauspopulation [*hAPP+/-*] im Vergleich zu nicht-transgenen Tieren [*hAPP-/-*] eine deutlich erhöhte zerebrale Mikroglia-dichte auf (Herring et al., 2016). Hierbei ergab sich für die Mikroglia-dichte im Bereich des Neokortex eine höchstsignifikante Zunahme für transgene Mäuse ohne genetischen Knockdown [*hAPP+/-, mKlk8 +/+*] gegenüber des Wildtyps [*hAPP-/-, mKlk8 +/+*] von +85%. (*hAPP+/-, mKlk8 +/+*: 305,85±6,99 vs. *hAPP-/-, mKlk8 +/+*: 165,50±4,43,  $p=6,05e^{-28}$ ) (siehe Abbildung 2).

Die Anzahl an Mikroglia im Bereich des Hippocampus nahm in der transgenen Mauspopulation ohne genetischen Knockdown für Kallikrein-8 [*hAPP+/-, mKlk8 +/+*] gegenüber der Wildtyppopulation [*hAPP-/-, mKlk8 +/+*] um +63% zu. (*hAPP+/-, mKlk8 +/+*: 289,87±6,86 vs. *hAPP-/-, mKlk8 +/+*: 177,92±4,71,  $p=4,26e^{-9}$ ) (siehe Abbildung 3). Außerdem konnte für die Mikroglia-dichte im Bereich der Basalganglien eine Zunahme von +31% im Vergleich der transgenen Mauspopulation [*hAPP+/-, mKlk8 +/+*] gegenüber der Wildtyppopulation [*hAPP-/-, mKlk8 +/+*] ermittelt werden. (*hAPP+/-, mKlk8 +/+*: 170,45±3,19 vs. *hAPP-/-, mKlk8 +/+*: 129,68±3,57,  $p=5,57e^{-14}$ ) (siehe Abbildung 4).

Ein Effekt des genetischen Knockdowns von Kallikrein-8 auf die zerebrale Mikrogliose konnte im Vergleich der transgenen Mauspopulation ohne Knockdown für Kallikrein 8 [*hAPP +/-, mKlk8 +/+*] gegenüber der transgenen Mauspopulation mit Knockdown für

Kallikrein-8 [*hAPP*<sup>+/-</sup>, *mKlk8* <sup>+/-</sup>] für keinen der untersuchten zerebralen Abschnitte nachgewiesen werden ( $p > 0,1$ ). Mäuse der Wildtyppopulation [*hAPP*<sup>-/-</sup>, *mKlk8* <sup>+/+</sup>] wiesen keinen statistisch signifikanten Unterschied in der zerebralen Mikroglia-dichte gegenüber Mäusen ohne Alzheimererkrankung mit genetischem Knockdown für Kallikrein-8 auf [*hAPP*<sup>-/-</sup>, *mKlk8* <sup>+/-</sup>] ( $p > 0,1$ ).

In der geschlechterdifferenzierten Auswertung konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Geschlechtern der Experimentalpopulationen festgestellt werden ( $p > 0,1$ ), weshalb die oben genannten Ergebnisse geschlechterzusammenfassend dargestellt wurden.

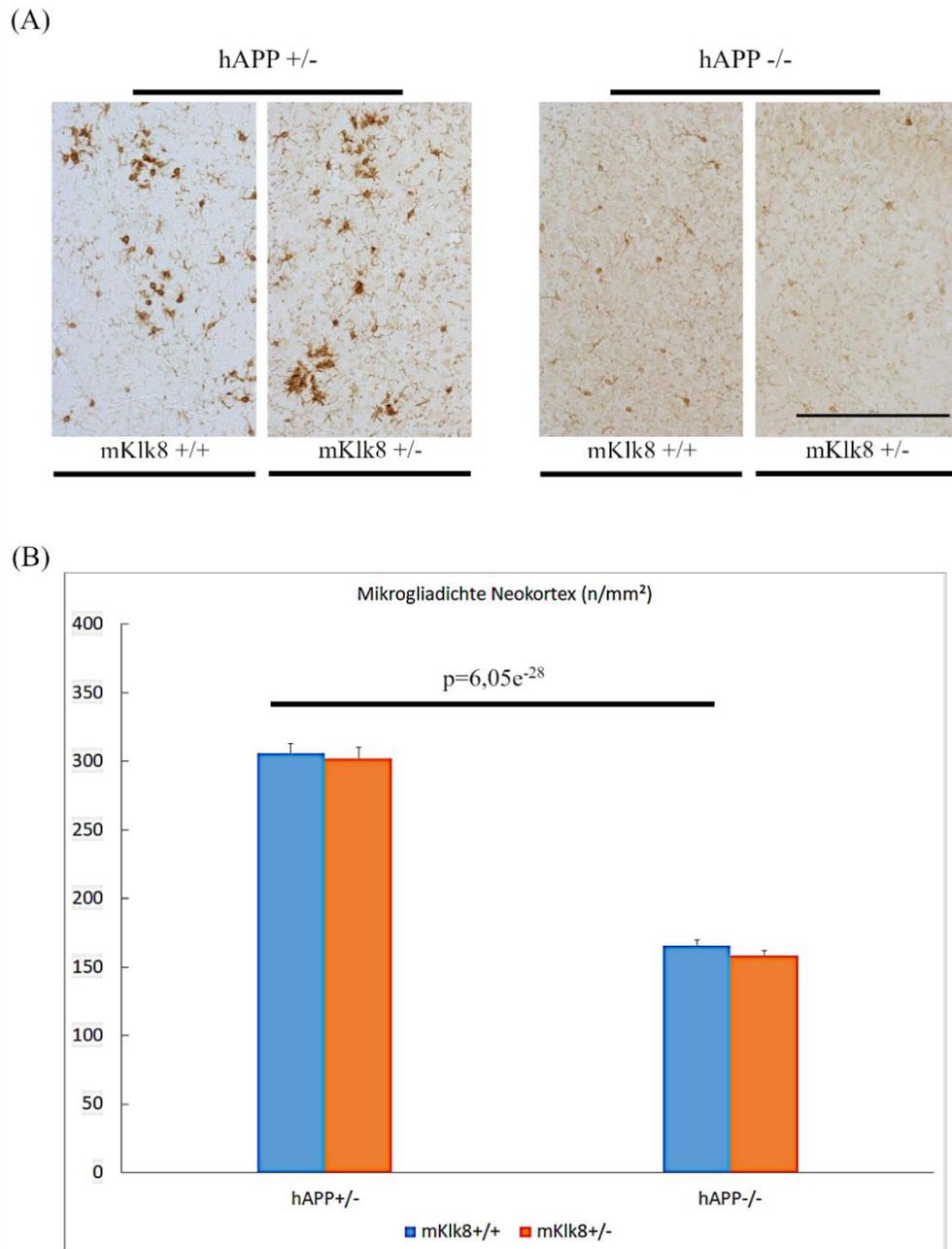


Abbildung 2 Mikrogliaendichte im Bereich des Neokortex

(A) Immunhistologisch gefärbte AIF-1 positive Mikrogliazellen im Neokortex von transgenen Mäusen [hAPP +/-] und nicht transgenen Mäusen [hAPP -/-] jeweils ohne Knockdown für Kallikrein-8 [mKlk8 +/+ ] und mit Knockdown für Kallikrein-8 [mKlk8 +/-]; Scale Bar: 200µm

(B) Stereologische Quantifizierung der Mikrogliaendichte im Bereich des Neokortex, Anzahl der Tiere gesamt n=94 (hAPP +/-, mKlk8 +/+ ♀ n=12, hAPP +/- mKlk8 +/- ♀ n=12, hAPP +/- mKlk8 +/+ ♂ n= 12, hAPP +/- mKlk8 +/- ♂ n= 11, hAPP +/-, mKlk8 +/+ ♀ n=13, hAPP -/- mKlk8 +/- ♀ n=14, hAPP -/- mKlk8 +/+ ♂ n= 10, hAPP -/- mKlk8 +/- ♂ n= 10). Die Auswertung erfolgte mittels ANOVA und LSD, dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM in einem Balkendiagramm.

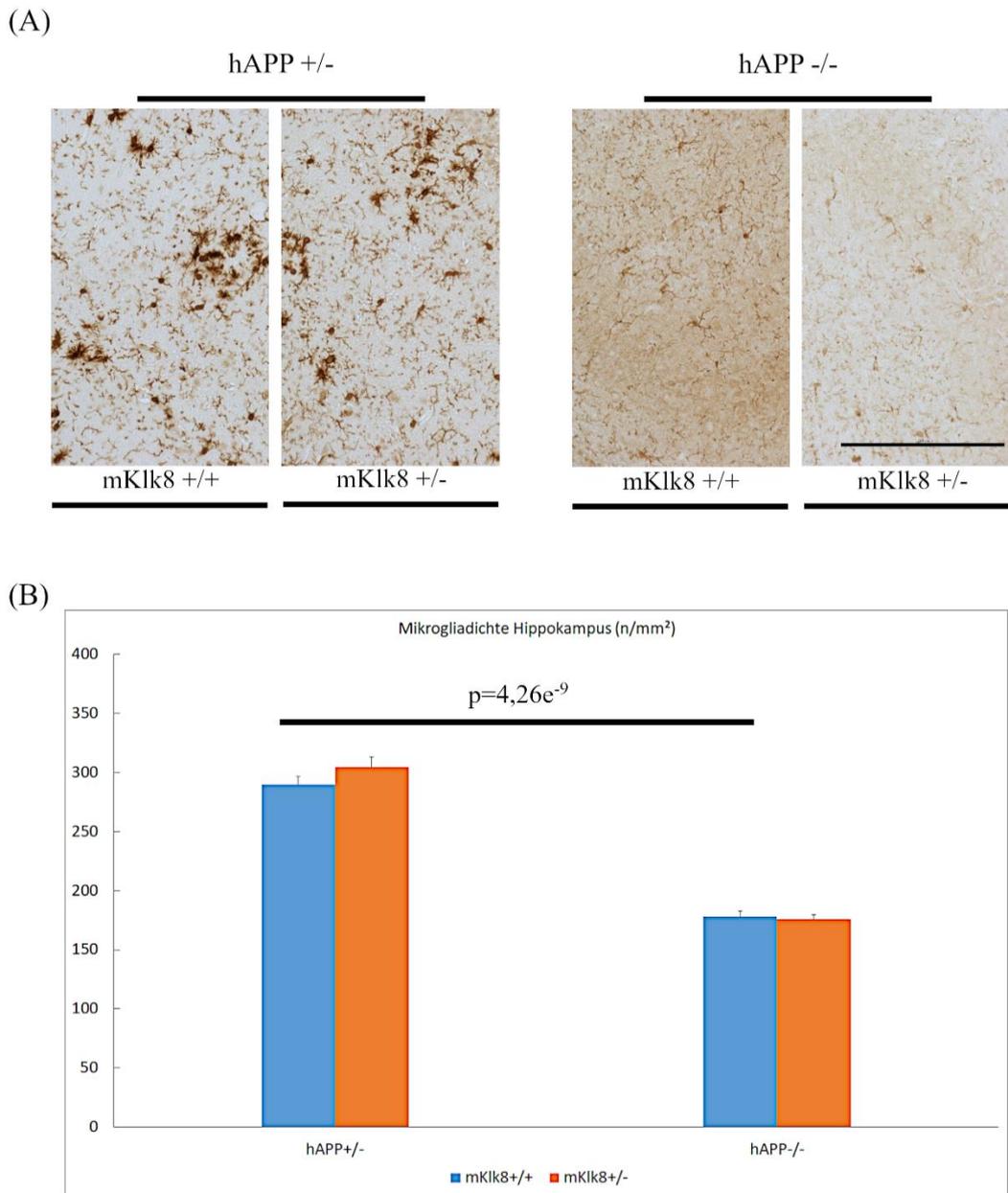


Abbildung 3 Mikroglia dichte im Bereich des Hippocampus

(A) Immunhistologisch gefärbte AIF-1 positive Mikrogliazellen im Hippocampus von transgenen Mäusen [hAPP +/-] und nicht transgenen Mäusen [hAPP -/-] jeweils ohne Knockdown für Kallikrein-8 [mKlk8 +/-] und mit Knockdown für Kallikrein-8 [mKlk8 +/-]; Scale Bar: 200µm

(B) Stereologische Quantifizierung der Mikroglia dichte im Bereich des Hippocampus, Anzahl der Tiere gesamt n=94 (hAPP +/-, mKlk8 +/- ♀ n=12, hAPP +/- mKlk8 +/- ♀ n=12, hAPP +/- mKlk8 +/- ♂ n= 12, hAPP +/- mKlk8 +/- ♂ n= 11, hAPP +/-, mKlk8 +/- ♀ n=13, hAPP -/- mKlk8 +/- ♀ n=14, hAPP -/- mKlk8 +/- ♂ n= 10, hAPP -/- mKlk8 +/- ♂ n= 10). Die Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney U Test, dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM in Form eines Balkendiagrammes.

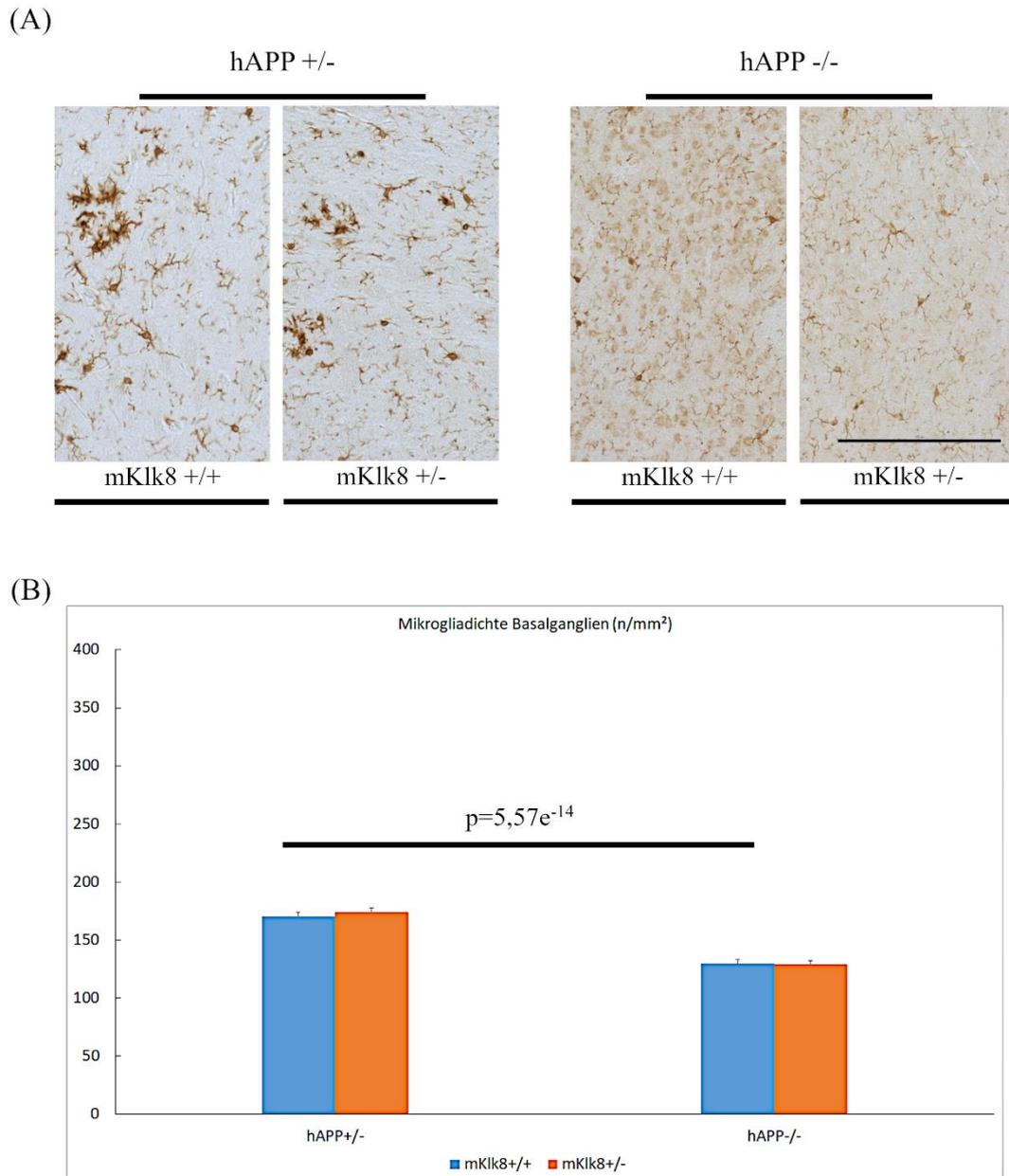


Abbildung 4 Mikrogliaedichte im Bereich der Basalganglien

(A) Immunhistologisch gefärbte AIF-1 positive Mikrogliazellen der Basalganglien von transgenen Mäusen [hAPP +/-] und nicht transgenen Mäusen [hAPP -/-] jeweils ohne Knockdown für Kallikrein-8 [mKlk8 +/+] und mit Knockdown für Kallikrein-8 (mKlk8 +/-); Scale Bar: 200µm

(B) Stereologische Quantifizierung der Mikrogliaedichte im Bereich der Basalganglien, Anzahl der Tiere gesamt n=94 (hAPP +/-, mKlk8 +/+ ♀ n=12, hAPP +/- mKlk8 +/- ♀ n=12, hAPP +/- mKlk8 +/+ ♂ n= 12, hAPP +/- mKlk8 +/- ♂ n= 11, hAPP +/-, mKlk8 +/+ ♀ n=13, hAPP -/- mKlk8 +/- ♀ n=14, hAPP -/- mKlk8 +/+ ♂ n= 10, hAPP -/- mKlk8 +/- ♂ n= 10). Die Auswertung erfolgte mittels ANOVA und LSD, dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM mit Hilfe eines Balkendiagramms.

## 4.2 Effekte eines genetischen Knockdowns von Kallikrein-8 auf die neokortikale Expression von Neuro-Inflammationsmarkern in einem transgenen Mausmodell

Die Effekte eines genetischen Knockdowns von Kallikrein-8 auf die inflammatorische Reaktion der Mikrogliazellen im Rahmen der Alzheimererkrankung wurde anhand der Proteinlevel der Inflammationsmarker AIF-1 und PTGER 2 untersucht.

### 4.2.1 Der genetische Knockdown von Kallikrein-8 senkt das Proteinlevel des Inflammationsmarkers AIF-1 nur in weiblichen transgenen Mäusen

Mittels Western-Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass von der Alzheimer-ähnlichen Pathologie betroffene Mauspopulationen [*hAPP*<sup>+/-</sup>] signifikant höhere Proteinlevel an AIF-1 aufweisen als nicht von der AD betroffene Populationen [*hAPP*<sup>-/-</sup>]. In transgenen Mäusen ohne genetischen Knockdown für Kallikrein-8 [*hAPP*<sup>+/-</sup>, *mKlk8*<sup>+/+</sup>] steigerte sich das Proteinlevel von AIF-1 im Vergleich zu Mäusen der Wildtyppopulation [*hAPP*<sup>-/-</sup>, *mKlk8*<sup>+/+</sup>] um +51%. (*hAPP*<sup>+/-</sup>, *mKlk8*<sup>+/+</sup>: 1,51±0,10 vs. *hAPP*<sup>-/-</sup>, *mKlk8*<sup>+/+</sup>: 1±0,04, p=0,00039).

Für die zerebralen Proteinlevel von AIF-1 in weiblichen Mäusen der transgenen Population mit genetischem Knockdown für Kallikrein-8 [*hAPP*<sup>+/-</sup>, *mKlk8*<sup>+/-</sup>, ♀] konnte im Vergleich zu weiblichen Mäusen der transgenen Population ohne Knockdown für Kallikrein-8 [*hAPP*<sup>+/-</sup>, *mKlk8*<sup>+/+</sup>, ♀] eine Reduktion um -27,6% ermittelt werden. (*hAPP*<sup>+/-</sup>, *mKlk8*<sup>+/-</sup>, ♀: 1,32±0,05 vs. *hAPP*<sup>+/-</sup>, *mKlk8*<sup>+/+</sup>, ♀: 1,82±0,11, p=0,023).

Für männliche Vertreter der gleichen Genotypen [*hAPP*<sup>+/-</sup>, *mKlk8*<sup>+/-</sup>, ♂ vs. *hAPP*<sup>+/-</sup>, *mKlk8*<sup>+/+</sup>, ♂] ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied ermitteln (p>0,1).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Proteinlevel von AIF-1 bei weiblichen transgenen Mäusen ohne genetischen Knockdown für Kallikrein-8 [*hAPP*<sup>+/-</sup>, *mKlk8*<sup>+/+</sup>, ♀] gegenüber männlichen Vertretern desselben Genotyps [*hAPP*<sup>+/-</sup>, *mKlk8*<sup>+/+</sup>, ♂] um +53% höher sind. (*hAPP*<sup>+/-</sup>, *mKlk8*<sup>+/+</sup>, ♀: 1,82±0,11 vs. *hAPP*<sup>+/-</sup>, *mKlk8*<sup>+/+</sup>, ♂: 1,19±0,1, p=0,006).

Weitere geschlechterspezifische Vergleiche der Proteinlevel von AIF-1 der transgenen Populationen [*hAPP*<sup>+/-</sup>] ohne genetischen Knockdown für Kallikrein-8 [*mKlk8*<sup>+/+</sup>] oder mit genetischem Knockdown für Kallikrein-8 [*mKlk8*<sup>+/-</sup>] und nicht transgenen Populationen [*hAPP*<sup>-/-</sup>] ohne genetischem Knockdown für Kallikrein-8 [*mKlk8*<sup>+/+</sup>]

oder mit genetischem Knockdown für Kallikrein-8 [*mKlk8+/-*] untereinander ergaben keine statistisch relevanten Unterschiede ( $p > 0,1$ ).

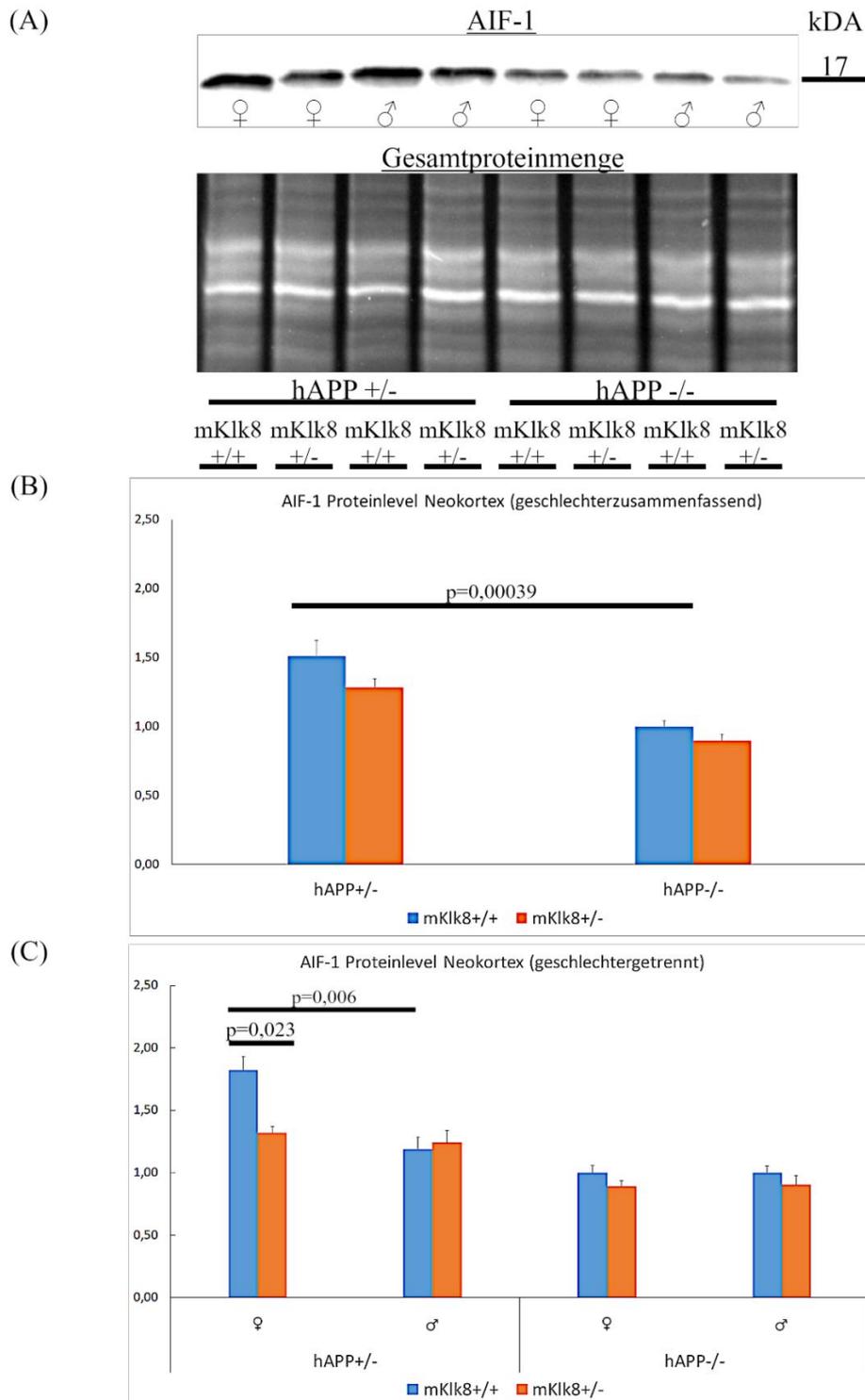


Abbildung 5 Proteinlevel des Inflammationsmarkers AIF-1 im Neokortex

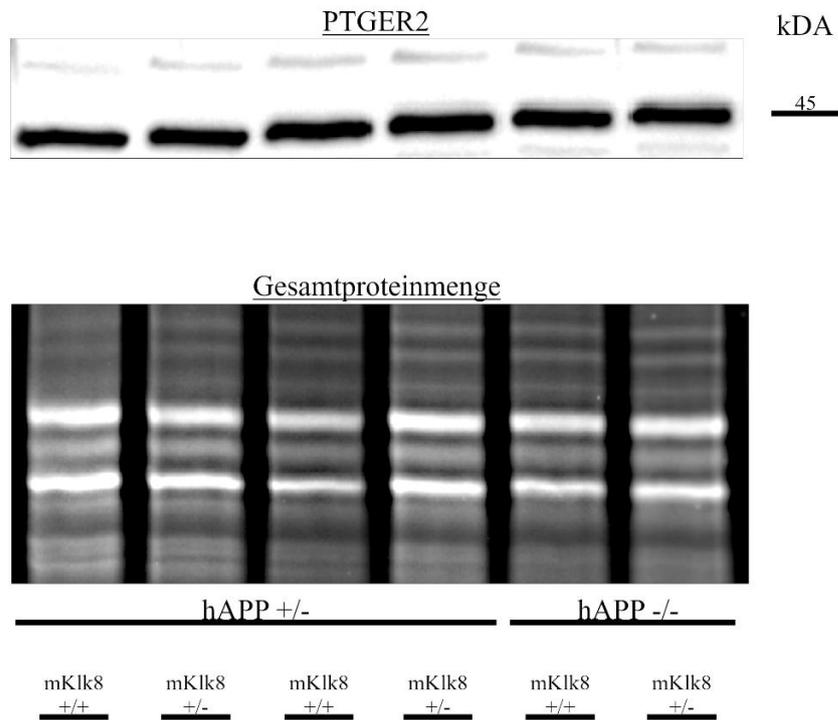
(A) Repräsentatives Western-Blot Bild des Inflammationsmarkers AIF-1 im Neokortex sowohl transgener Mäuse [hAPP +/-] und nicht transgener Mäuse [hAPP -/-], jeweils ohne genetischem Knockdown für Kallikrein-8 [mKlk8 +/+ ] und mit genetischem Knockdown für Kallikrein-8 [mKlk8 +/-], in Kombination mit einer Fluoreszenz-Gelelektrophorese zur Bestimmung der gesamten aufgetragenen Proteinmenge.

(B) Statistische Auswertung der ermittelten Proteinkonzentrationen von AIF-1 unter Verwendung des ANOVA und Games-Howell post hoc Test. Darstellung der Mittelwerte +/- SEM unter Normierung auf den Wildtyp, WT=1, geschlechterzusammenfassend. (C) Statistische Auswertung der ermittelten Proteinkonzentrationen von AIF-1 unter Verwendung des ANOVA und Games-Howell post hoc Test, Darstellung der Mittelwerte +/- SEM unter Normierung auf den Wildtyp, WT=1, in Form eines Balkendiagrammes, geschlechtergetrennt. Anzahl der Tiere gesamt n=94 (hAPP +/-, mKlk8 +/+ ♀ n=12, hAPP +/- mKlk8 +/- ♀ n=12, hAPP +/- mKlk8 +/+ ♂ n= 12, hAPP +/- mKlk8 +/- ♂ n= 11, hAPP +/-, mKlk8 +/+ ♀ n=13, hAPP -/- mKlk8 +/- ♀ n=14, hAPP -/- mKlk8 +/+ ♂ n= 10, hAPP -/- mKlk8 +/- ♂ n= 10),

#### 4.2.2 Der genetische Knockdown von Kallikrein-8 hat keinen Einfluss auf die Proteinlevel des Inflammationsmarkers PTGER2

Im Vergleich transgener Mäuse [hAPP +/-] ohne genetischen Knockdown für Kallikrein-8 [mKlk8 +/+ ] mit genetischem Knockdown für Kallikrein-8 [mKlk8 +/-] und nicht transgener Mäuse [hAPP -/-] ohne genetischem Knockdown für Kallikrein-8 [mKlk8 +/+ ] mit genetischem Knockdown für Kallikrein-8 [mKlk8 +/-] konnten weder in der geschlechtergetrennten noch zusammenfassenden Analyse statistisch signifikante Unterschiede in den neokortikalen Proteinlevel des Inflammationsmarkers PTGER2 ermittelt werden ( $p > 0,1$ ). Der Vergleich der Proteinlevel von PTGER2 in der transgenen Mauspopulationen [hAPP +/-] mit der nicht transgenen Mauspopulationen [hAPP -/-] zeigte weder geschlechtergetrennt noch zusammenfassend betrachtet statistisch signifikanten Unterschiede ( $p > 0,1$ ) (siehe Abbildung 5).

(A)



(B)

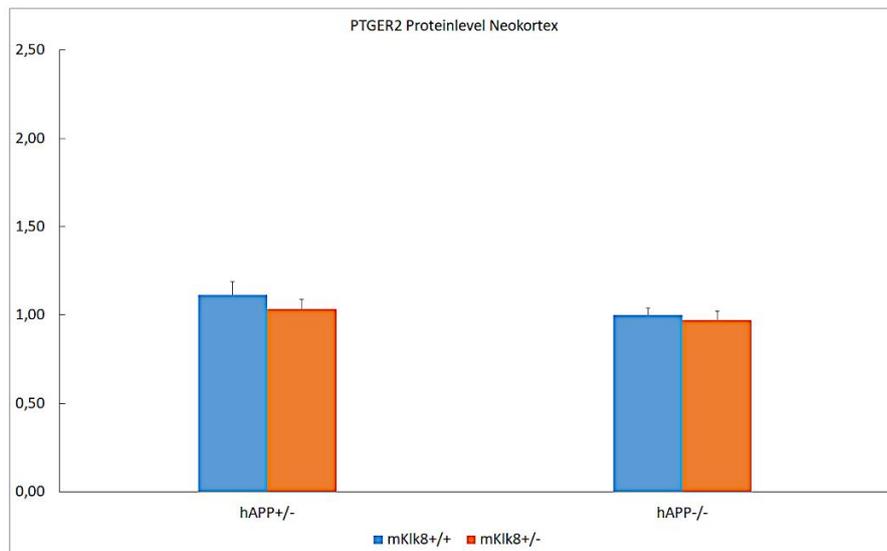


Abbildung 6 Proteinlevel des Inflammationsmarkers PTGER2 im Neokortex

(A) Repräsentatives Western-Blot Bild des Inflammationsmarkers PTGER2 im Neokortex sowohl transgener Mäuse [hAPP +/-] und nicht transgener Mäuse [hAPP -/-], jeweils ohne genetischem Knockdown für Kallikrein-8 [mKlk8 +/+ ] und mit genetischem Knockdown für Kallikrein-8 [mKlk8 +/-], in Kombination mit einer Fluoreszenz-Gelelektrophorese zur Bestimmung der gesamten aufgetragenen Proteinmenge.

(B) Statistische Auswertung der ermittelten Proteinkonzentrationen für PTGER2 mittels ANOVA und LSD unter Darstellung der Mittelwerte +/- SEM unter Normierung auf den Wildtyp, WT=1, geschlechterzusammenfassend in Form eines Balkendiagrammes. Anzahl der Tiere gesamt n=94 (hAPP +/-, mKlk8 +/+ ♀ n=12, hAPP +/- mKlk8 +/- ♀ n=12, hAPP +/- mKlk8 +/+ ♂ n= 12, hAPP +/- mKlk8 +/- ♂ n= 11, hAPP +/-, mKlk8 +/+ ♀ n=13, hAPP -/- mKlk8 +/- ♀ n=14, hAPP -/- mKlk8 +/+ ♂ n= 10, hAPP -/- mKlk8 +/- ♂ n= 10).

## 5 DISKUSSION

Morbus Alzheimer zählt zum Formenkreis der neurodegenerativen Erkrankungen. Insbesondere die spontan im Alter auftretende Variante stellt unter dem Gesichtspunkt des demographischen Wandels einen progredient zunehmenden negativen sozioökonomischen Impact für die weltweite Bevölkerung dar. Wie bereits in Kapitel 1.1 dieser Arbeit erläutert, prognostizieren Expertengruppen eine in der Zukunft signifikant ansteigende Anzahl betroffener Menschen. Unter diesem Aspekt scheint es umso wichtiger, einen kurativen Therapieansatz der Erkrankung zu erforschen. Dies kann nur gelingen, indem man die bis heute nicht vollständig verstandene Pathophysiologie der AD weiter entschlüsselt und potenzielle „Targets“ eines medikamentösen Therapieansatzes eruiert. Diese Arbeit befasst sich, als Teil eines größeren Forschungsprojektes, mit einem Baustein der facettenreichen pathologischen Vorgänge und Wirkungsketten im Rahmen der Krankheit. Hierzu wurde die Wechselwirkung zwischen der extrazellulären, plastizitäts- und synapsenmodulierenden Serinprotease KLK8 und den residenten Mikroglia untersucht. Diese Zellen vermitteln im Rahmen der Erkrankung eine neuroinflammatorische und potenziell zytotoxische Modulation des zerebralen Systems. Unsere Forschungsgruppe zeigte bereits die deutlich vor dem Auftreten klinischer Merkmale entstehende Hochregulation der KLK8-mRNA-Expression und ihre diagnostische Signifikanz als Marker im Serum und CSF von Alzheimerpatienten (Teuber-Hanselmann et al., 2020). Des Weiteren wurden die unterschiedlichen Einflüsse einer KLK8-Antikörperblockade auf verschiedenste Alzheimer-assoziierte Pathologien untersucht (Herring et al., 2016). Deshalb schien es schlüssig, die Einflüsse eines permanenten KLK8-Knockdowns auf einzelne pathologische Prozesse, wie beispielsweise die Mikrogliose und Expression neuroinflammatorischer Marker wie AIF1 und PTGER2, zu inspizieren.

### 5.1 Einfluss von KLK8 auf die zerebrale Mikrogliose

Mit Hilfe eines primären AIF1-Antikörpers wurden AIF1-positive Mikrogliazellen in den zerebralen Abschnitten des frontalen Neokortex, des Hippokampus und der Basalganglien kenntlich gemacht und anschließend stereologisch quantifiziert. Hierbei konnte für alle Vertreter der TgCRND8 Mauspopulation gegenüber Vertretern der nicht

transgenen Population ein signifikanter Anstieg in der Dichte AIF1-positiver, aktivierter Mikrogliazellen in allen zerebralen Bereichen festgestellt werden. Unsere Arbeitsgruppe beobachtete bereits einen Anstieg AIF1-positiver Mikrogliazellen im Bereich der Basalganglien transgener Mäuse. Diese Erkenntnis kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt und auf die zerebralen Areale des frontalen Neokortex und Hippocampus erweitert werden, die ebenfalls früh im Verlauf der AD pathologische Änderungen erfahren (Herring et al., 2016). Ein genereller Anstieg aktivierter Mikroglia und damit eine Beteiligung der Zellen an der pathophysiologischen Kaskade der AD, wie durch Hickmann et al beschrieben, kann deshalb bestätigt werden (Hickman et al., 2008).

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit potenzielle Einflüsse eines mKLK8-Knockdowns auf Vertreter der TgCRND8 Mauspopulation analysiert. Hierbei wurden auch potenzielle geschlechterspezifische Unterschiede sowie die Auswirkungen des Knockdowns in unterschiedlichen Hirnarealen wie Neokortex, Hippocampus und den Basalganglien berücksichtigt. Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen transgenen Mäusen mit genetischem Knockdown im Vergleich zu Mäusen ohne genetischen Knockdown, unabhängig von Geschlecht oder untersuchtem Hirnareal. Die totale Anzahl AIF1-positiver, aktivierter Mikrogliazellen wird dementsprechend durch den Knockdown von KLK8 nicht beeinflusst. Andere Mitglieder unserer Forschungsgruppe konnten jedoch zeigen, dass der genetische Knockdown von KLK8 die Funktionsweise AIF1-positiver Mikroglia positiv beeinflusst. So resultiert der Knockdown beispielsweise in einem Anstieg aktivierter, plaqueassoziiierter AIF1-positiver Mikroglia mit Phagozytoseaktivität (Herring et al., 2021). Mittels Western-Blot Analyse zeigte unsere Arbeitsgruppe darüber hinaus einen Anstieg der Proteinlevel von „secreted phosphoprotein 1“ und „triggering receptor expressed on myeloid cells 2“, welche eine erhöhte Resilienz sowie Phagozytoseaktivität der Mikroglia indizieren (Herring et al., 2021). Der im Rahmen dieser Arbeit ausbleibende Effekt des KLK8-Knockdowns auf die Gesamtanzahl AIF1-positiver Mikroglia sollte deshalb im Kontext weiterer Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe nicht negativ interpretiert werden, sondern scheint auf einen Aufgabenwechsel der Mikrogliazellen hinzudeuten. Auch konnte unsere Arbeitsgruppe in dieser Studie zeigen, dass die Mikroglia einen morphologischen Wandel von statisch verzweigten zu amöboid mobilen Zellen vollziehen (Herring et al., 2021).

Weitere Forschungsgruppen entdeckten in der Vergangenheit bereits die Fähigkeit der Mikrogliazellen, verschiedene Phänotypen auszubilden, und damit einhergehend verschiedene Funktionen zu erfüllen. Die Arbeitsgruppe um Heneka et al zeigte, dass Mikrogliazellen in Form eines M1- oder M2-Phänotyps vorliegen können (Heneka et al., 2013). Während Zellen des M1-Phänotyps vor allem proinflammatorische und zytotoxische Funktionsweisen demonstrieren, agieren Mikrogliazellen des M2-Phänotyps auf neuroprotektive Weise und sind in der Lage, Amyloid- $\beta$  Ablagerungen im zerebralen Gewebe zu phagozytieren. Zudem konnte unsere Arbeitsgruppe bereits 2016 mittels einer KLK8-Blockade unter Verwendung eines Antikörpers eine gesteigerte A $\beta$ -Clearance und Autophagieleistung der zerebralen Mikrogliazellen demonstrieren (Herring et al., 2016).

Zusammenfassend scheint die Gesamtanzahl AIF1-positiver aktivierter Mikroglia durch den genetischen Knockdown von KLK8, unabhängig der zerebralen Lokalisation oder des Geschlechts der Versuchstiere, nicht beeinflusst zu werden. Hinsichtlich der weiteren Untersuchung unserer Arbeitsgruppe und anderer Forschungsgruppen könnte der genetische Knockdown von KLK8 jedoch in einem inflammations- und krankheitsmodulierenden Shift der mikroglialen Funktion resultieren. Es scheint, dass durch den Knockdown ein Funktionswechsel statischer, inflammatorischer, neurotoxischer Mikroglia zu mobilen, phagozytierenden und neuroprotektiven Mikroglia unterstützt wird.

## **5.2 Einfluss des KLK8-Knockdowns auf die Expression des Inflammations-/Aktivitätsmarkers AIF1**

Mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens in Kombination mit einer anschließenden Antikörperblockierung und chemilumineszenz-basierten Proteindetektion konnte in dieser Arbeit ein signifikanter Anstieg des Inflammationsmarkers AIF1 für transgene Mäuse ohne genetischen Knockdown von KLK8 gegenüber nicht transgenen Mäusen ohne genetischen Knockdown von KLK8 für den Neokortex ermittelt werden. AIF1 ist Teil der Wirkungskaskade proinflammatorischer Abläufe und wird von monozytären Zellen exprimiert (Ito et al., 1998). Eine neuroinflammatorische Komponente der AD auf Basis der oben genannten und vergangener Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen scheint

deshalb wahrscheinlich (Zeng et al., 2019). Darüber hinaus indiziert der parallele Anstieg aktivierter Mikrogliazellen und AIF1 in transgenen Mäusen ohne Knockdown im Vergleich zur Wildtyppopulation eine Partizipation der zerebralen Mikroglia am inflammatorischen Geschehen im Neokortex. Fortführend wurde für transgene weibliche Mäuse ohne genetischen Knockdown für KLK8 im Vergleich zu männlichen Mäusen desselben Genotyps eine Zunahme der AIF1-Level von 53 % im frontalen Neokortex ermittelt. Zusätzlich zu diesem Ergebnis konnte im Rahmen der AIF1-Proteinlevelbestimmung eine Reduktion in der weiblichen transgenen Mauspopulation mit Knockdown um 27,6% im Vergleich zur transgenen Population ohne Knockdown beobachtet werden. Beide Ergebnisse unterstützen bereits vorausgegangene Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe hinsichtlich des weiblichen Geschlechts als potenzieller Risikofaktor. 2018 wurden verschiedene Pathologien der AD unter Berücksichtigung des Geschlechts transgener Mäuse durch unsere Forschungsgruppe examiniert. Zusammenfassend wurden nicht nur eine erhöhte Plaquebelastung und eine erhöhte neurovaskuläre Dysfunktion, sondern auch signifikant erhöhte Level diffuser Mikroglia und erhöhte Inflammation für das weibliche Geschlecht beobachtet (Keyvani et al., 2018). Dies scheint in Korrelation mit einem amplifizierten KLK8-Level weiblicher transgener Mäuse gegenüber männlichen Vertretern desselben Genotyps zu stehen (Keyvani et al., 2018). Die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten gesteigerten AIF1-Level in weiblichen transgenen Mäusen und die Senkung der AIF1-Level in weiblichen transgenen Mäusen durch einen KLK-8 Knockdown indizieren eine Verbindung zwischen AIF1, KLK8 und dem weiblichen Geschlecht als Risikofaktor für einen fulminanteren Krankheitsverlauf. In Hinsicht auf vergangene Ergebnisse unserer Forschungsgruppe könnte die beobachtete Reduktion von AIF1 möglicherweise auf initial höheren KLK8-Leveln bei weiblichen transgenen Mäusen und der Estradiol-abhängigen KLK8-Expressionssteigerung basieren (Keyvani et al., 2018). Dieser wird durch einen Knockdown der Serinprotease entgegengewirkt, sodass die AIF1-Level weiblicher transgener Mäuse durch einen Knockdown reduziert wurden. Die ausbleibende Beeinflussung der AIF1-Level in den Vergleichen der männlichen transgenen Mäuse mit und ohne Knockdown für KLK8 unterstreicht die Rolle des weiblichen Geschlechts in diesem Zusammenhang noch deutlicher. Eine direkte Beeinflussung der KLK8-Expression durch das Hormon Testosteron besteht nach

aktuellem Kenntnisstand nicht (Keyvani et al., 2018), sodass ausbleibende Veränderungen bei männlichen Mäusen im Erwartungshorizont lagen. Des Weiteren gab es in den nicht transgenen Mauspopulationen mit und ohne Knockdown und unabhängig vom Geschlecht keine signifikante Beeinflussung der AIF1-Level. Ein negativer Einfluss des KLK8-Knockdowns auf physiologische AIF1-Level ist unter Einbeziehung dieser Beobachtung unwahrscheinlich und könnte KLK8 umso mehr als potenzielles therapeutisches Target qualifizieren. Im letzten Schritt der Analysen wurden männliche transgene Mäuse in Abhängigkeit des KLK8-Knockdown-Status miteinander verglichen. Eine signifikante Reduktion der AIF1-Level konnte für männliche Vertreter der transgenen Population durch einen Knockdown nicht erwirkt werden. Der ausbleibende Einfluss auf das männliche Geschlecht könnte in den bereits, wie oben beschriebenen generell gesteigerten AIF1-Level in weiblichen Versuchsgruppen liegen. Dies wiederum beruht auf einer verstärkten Beeinflussung der KLK8-Expression und damit auch AIF1-Steigerung durch das Hormon Estradiol (Keyvani et al., 2018). Im männlichen zerebralen System scheint KLK8 im Hinblick auf die anfänglich bereits niedrigeren AIF1-Level einen geringeren Einfluss auf neuroinflammatorische Vorgänge im Rahmen der AD zu besitzen, sodass der Knockdown Versuch den Inflammationsmarker nicht signifikant beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Arbeit, insbesondere der Analyse des Inflammationsmarkes AIF1, zeigen erneut geschlechtsspezifische Unterschiede im Hinblick auf die Pathophysiologie der AD und das komplexe Zusammenspiel einzelner Bestandteile der inflammatorischen Kaskaden hinsichtlich des Geschlecht.

### **5.3 Einfluss des KLK8-Knockdowns auf den Inflammationsmarker PTGER2**

Analog zur Analyse von AIF1 wurden die zerebralen Proteinlevel des Inflammationsmarkers PTGER2 ebenfalls in dieser Arbeit examiniert. Im Vergleich der unterschiedlichen Experimentalgruppen konnte für keine dieser Gruppen ein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Die Neuroinflammation ist ein wichtiger Bestandteil des pathophysiologischen Vorganges im Rahmen der AD und darüber hinaus Komponente des neurodegenerativen Prozesses (Akiyama et al., 2000). Vor allem die in dieser Arbeit ausbleibende Differenz der PTGER2-Level im Vergleich transgener Mäuse mit nicht transgenen Mäusen erweist sich unter Berücksichtigung vergangener Arbeiten unserer

Forschungsgruppe als Überraschung (Herring et al., 2016). Im Verlauf vorangegangener Arbeiten unseres Teams wurde eine initiale Blockade von KLK8 mittels eines spezifischen Antikörpers untersucht. Hierbei zeigten sich die PTGER2-Level für transgene Mäuse mit und ohne Antikörperbehandlung per se eleviert (Herring et al., 2016), sodass im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls ein Anstieg erwartet wurde. Der ausbleibende Anstieg des PTGER2 könnte auf einem zeitlichen Unterschied beider Untersuchungsansätze beruhen. So beziffert sich die Differenz des Zeitpunkts der Euthanasie der murinen Probanden auf ca. 42 Tage (P184 im Antikörperversuch versus P226 im Rahmen dieser Arbeit). AD-Mäuse erreichen ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium etwa ab dem 210. Tag ihres Lebenszyklus. Der ausbleibende Anstieg der PTGER2-Level könnte sich durch ein progredienteres Stadium der Erkrankung erklären. Einem initialen Anstieg mit Maximum folgt auf Grund des zunehmenden Zelluntergangs ein erneuter Rückgang der Expression im weit fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung. Die inflammatorische Rolle von PTGER2 bei verschiedenen Erkrankungen, sowie die Beeinflussung der inflammatorischen Funktion der Mikroglia konnte bereits durch verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt werden (Fu et al., 2015) (Liang et al., 2005; Nagano et al., 2021). Zwar konnte ein Anstieg von PTGER2 in dieser Arbeit nicht beobachtet werden, andere Teilergebnisse dieser Arbeit, wie der Anstieg der AIF1-Level im frontalen Neokortex transgener Mäuser, belegen jedoch ein inflammatorisches Geschehen. Zusammenfassend scheint ein Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der Probenentnahme und damit dem Krankheitsstadium der transgenen Mäuse und dem Ausmaß der PTGER2-Expression zu existieren. Eine grundlegende Beteiligung von PTGER2 am neuroinflammatorischen Geschehen scheint jedoch basierend auf vorangegangenen Ergebnisse unserer und anderer Arbeitsgruppen gesichert. So zeigte bereits der Antikörperversuchs unseres Forschungsteams erhöhte PTGER2-Level für transgene Mäuse (Herring et al., 2016). Eine Fluktuation der PTGER2-Level im Rahmen der AD und damit auch ein wechselnder Einfluss auf die Neuroinflammation könnte im Rahmen zukünftiger Studien näher untersucht werden.

## 5.4 Limitationen

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse hinsichtlich der Pathophysiologie der AD können auf Grund der Untersuchung am Tiermodell nur limitiert auf humane Krankheitsabläufe übertragen werden. Jedoch konnten bereits in vergangenen Arbeiten gewisse Parallelen hinsichtlich pathophysiologischer Abläufe zwischen tierischen und menschlichen Probanden gezogen werden. Die Gründergeneration dieses Tiermodells zeigte basierend auf der Mutation des APP-Gens eine Ähnlichkeit zur familiären Alzheimer Erkrankung (FAD), von der ca. 5 % aller an Alzheimer erkrankten Personen betroffen sind. Abgesehen von ihrem früheren Auftreten und der rasanteren Progredienz weist die FAD kaum histologische und klinische Unterschiede zur „Late onset Alzheimer disease“ auf und eignet sich deshalb zur Untersuchung der Pathologie der Erkrankung. Abschließend ist hervorzuheben, dass Tiermodelle, bis auf ihre teilweise limitierte Übertragbarkeit auf das humane Krankheitsgeschehen, die Grundlage neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse bilden und voraussichtlich auch in näherer Zukunft bilden werden (Robinson et al., 2019).

## 5.5 Diese Arbeit im Kontext des Gesamtprojektes

Um die Rolle von KLK8 in der pathophysiologischen Kaskade näher zu examinieren, wurden die bereits im Rahmen des Antikörper-Versuches untersuchten positiven Effekte der KLK8-Blockade, unter dem Aspekt eines genetischen Knockdowns der Serinprotease, untersucht. Der Knockdown von KLK8 wirkte der A $\beta$ -Pathologie sowie der Tau-Phosphorylierung im transgenen hAPP-Mausmodell entgegen. Eine Beeinflussung der amyloiden APP-Prozessierung und eine Reduktion von A $\beta$ <sub>42</sub> in bestimmten zerebralen Abschnitten konnte ebenfalls gezeigt werden. Darüber hinaus wirkte sich der Knockdown positiv auf die neurovaskuläre Funktion und A $\beta$ -Clearance über die Bluthirnschranke aus und zeigte eine Steigerung der Autophagie und A $\beta$ -Phagozytose über zerebrale Mikroglia (Herring et al., 2021). Als Teil des großen Gesamtprojektes befasste sich diese Arbeit vor allem mit dem Einfluss eines KLK8-Knockdowns auf die neuronale Inflammation und Mikrogliose in Kerngebieten der AD. Nach aktuellem Forschungsstand konnte noch keine direkte substratvermittelte Verbindung zwischen KLK8 und der mikroglialen Aktivität beobachtet werden. Nichtsdestotrotz beeinflussen positive Effekte des genetischen Knockdowns, wie etwa

die Reduktion der A $\beta$ -Belastung, den Aktivierungsstatus der Mikroglia indirekt. Mikroglia bilden nicht nur einen Teil des A $\beta$ -Clearance-Systems (Hickman et al., 2008), sondern können rezeptorvermittelt durch A $\beta$ -Ablagerungen inflammatorisch aktiviert werden (El Khoury et al., 2003). Eine Reduktion der A $\beta$ -Belastung, bedingt durch den genetischen Knockdown von KLK8, könnte die verminderte inflammatorische Aktivierung der Mikrogliazellen in Bezug auf die AIF1-Proteinlevel erklären. Auch ein potenzieller Shift der Mikrogliazellen von zytotoxischen zu phagozytotisch-neuroprotektiven Phänotypen könnte eine der indirekten Auswirkungen des KLK8-Knockdowns symbolisieren. Aufgrund der facettenreichen Pathologien der AD war es deshalb für das Gesamtprojekt unserer Forschungsgruppe wichtig neben den direkten substratspezifischen auch indirekte Effekte des KLK8-Knockdowns zu untersuchen. Zu diesen indirekten Effekten gehören die Beeinflussung der residenten Mikroglia und die Modulation der zerebralen Neuroinflammation.

## **5.6 Fazit und Ausblick**

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass vor allem weibliche transgene Mäuse erhöhte Level an Inflammationsmarkern präsentieren, die durch einen Knockdown von KLK8 reduziert werden konnten. Das weibliche Geschlecht scheint also im Rahmen der Alzheimer Erkrankung ein möglicher signifikanter Risikofaktor zu sein, der durch eine gezielte Therapie beeinflusst werden könnte. Darüber hinaus ist zwar die Gesamtanzahl aktivierter Mikroglia durch einen Knockdown nicht nachhaltig beeinflusst worden, in der Gesamtschau mit anderen Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe scheinen die Mikroglia jedoch im Rahmen der Ausschaltung von KLK8 einen Funktionswechsel zu vollziehen. So zeigte unser Gesamtprojekt eine verstärkte Plaueassoziation, Resilienz und erhöhte Autophagieaktivität zerebraler Mikroglia im Rahmen des genetischen Knockdowns von KLK8 (Herring et al., 2021). Eine Unterstützung physiologischer, mikroglial-vermittelter Abbauprozesse scheint ein potenzieller Nutzen des KLK8-Knockdowns zu sein. Positiv sind darüber hinaus die ausbleibenden Effekte auf nicht transgene Mäuse. Durch den Knockdown von KLK8 wurde in der nicht transgenen Generation kein Gesundheitsschaden verursacht, sodass eine negative Beeinflussung der zerebralen physiologischen Homöostase und physiologischer Abläufe im Rahmen dieses Versuches auszuschließen ist.

Eine zukünftige Verwendung, beispielsweise von KLK8 spezifischen Antikörpern, scheint auf gesunde Individuen keinen negativen Einfluss auszuüben. Die beobachteten Einflüsse des genetischen Knockdowns von KLK8 auf weibliche transgene Mäuse und die im Rahmen des Gesamtprojektes beobachteten positiven Effekte auf beispielsweise die mikrogliale Funktionsweise ohne Beeinflussung gesunder, physiologischer Abläufe, qualifiziert KLK8 als interessantes therapeutisches Target in der Entwicklung zukünftiger kurativer Therapieansätze. Des Weiteren indizieren die initial in weiblichen transgenen Mäusen im Vergleich zu männlichen Vertretern derselben Population erhöhten AIF1-Level eine Risikorolle des weiblichen Geschlechts für einen schwereren Krankheitsverlauf, wie bereits in der Vergangenheit gezeigt werden konnte (Keyvani et al., 2018).

Die Rolle von KLK8 als diagnostischer Marker (Teuber-Hanselmann et al., 2020) und die mannigfaltigen positiven Beeinflussungen pathophysiologischer Vorgänge durch eine KLK8-Blockade oder einen generellen Knockdown, qualifizieren die Serinprotease als auch in der Zukunft hochinteressantes therapeutisches Zielmolekül. Weitere Forschungen vor allem in Hinblick auf die Wirkung einer KLK8-Blockade im menschlichen System sind wünschenswert und sollten in der Zukunft forciert werden.

Inwiefern KLK8 in Zukunft als diagnostischer Marker oder therapeutisches Zielmolekül verwendet wird, lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht sicher voraussagen. Die Untersuchung des KLK8-Knockdowns unter Verwendung des transgenen CRND8 Mausmodells zeigte jedoch die Verstrickung des Moleküls in verschiedene pathologische Abläufe, die im Rahmen der AD auftreten. Sicher ist, dass eine frühestmögliche kausale Therapie der neurodegenerativen Erkrankung essenziell ist, um irreversible neurologische Schäden zu verhindern und den sozioökonomischen Impact auf die Gesellschaft und betroffene Familien zu minimalisieren.

Diese Forschungsarbeit soll im Sinne der Grundlagenforschung helfen, die Pathophysiologie der AD besser zu verstehen und mögliche therapeutische Targets zu identifizieren. Die positiven Effekte auf die neuronale Inflammation im frontalen Neokortex, die im Rahmen einer KLK8-Suppression beobachtet wurden, lassen die Hoffnung steigen, ein solches mögliches therapeutisches Target identifiziert zu haben. Eine Übertragung in den klinischen Alltag und nähere Untersuchung von KLK8 als ein potenzielles therapeutisches Target sollte deshalb forciert werden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Weltweit sind aktuell circa 50 Millionen Menschen von einer Demenzform betroffen, die zu 70 % durch Morbus Alzheimer (AD) bedingt ist. Unserer Arbeitsgruppe gelang es in vergangenen Projekten, die Serinprotease Kallikrein-8 (KLK8) als mögliches frühes Schlüssel-molekül in der pathophysiologischen Wirkungskette der Erkrankung zu identifizieren. Ein möglicher Einfluss von KLK8 auf die Aktivierung der Mikrogliazellen und die zerebrale Inflammation sollte in dieser Forschungsarbeit eruiert werden.

Grundlage der Forschung bildete ein Tiermodell, in welchem Mäuse mit einem genetischen Knockdown für murines KLK8 (mKlk8) [*mKlk8 +/-*] mit transgenen Mäusen, die das humane Amyloid-Vorläuferprotein (hAPP) überexprimieren [*hAPP+/-*], gekreuzt wurden.

In Abhängigkeit von ihrem Status bezüglich der Amyloid-Überexpression (transgen) und des genetischen Knockdowns für KLK8 wurden die Nachkommen hinsichtlich der Anzahl aktivierter „Allograft Inflammatory 1“ (AIF1)-positiver Mikroglia und der Inflammationsmarker AIF1 und Prostaglandinrezeptor E<sub>2</sub> (PTGER2) im zerebralen Gewebe untersucht.

Aktivierte Mikroglia wurden in den zerebralen Arealen des frontalen Neokortex, des Hippocampus sowie der Basalganglien mit AIF1-Antikörpern markiert und stereologisch quantifiziert. Für alle Bereiche konnte eine signifikante Steigerung AIF1-positiver Mikroglia im Vergleich transgener Mäuse zu nicht transgenen Mäusen ermittelt werden. Die Inflammationsmarker AIF1 und PTGER2 wurden für den frontalen Neokortex mittels Western-Blot analysiert. Transgene Mäuse zeigten hierbei deutlich erhöhte Level an AIF1. Der genetische Knockdown von KLK8 resultierte in einer Reduktion der AIF1-Level in weiblichen transgenen Mäusen. Transgene weibliche Mäuse ohne Knockdown zeigten darüber hinaus erhöhte AIF1-Level im Vergleich zu männlichen Mäusen des gleichen Genotyps.

Die totale Anzahl aktivierter Mikroglia wird durch einen Knockdown von KLK8 nicht beeinflusst. Jedoch kommt es vor allem bei weiblichen transgenen Mäusen durch einen Knockdown zu einer Reduktion der AIF1-Level und damit zu einer positiven Beeinflussung der neuroinflammatorischen Komponente der Erkrankung. KLK8 scheint auf Basis dieser Erkenntnis also eine Rolle in der Pathophysiologie der AD zu spielen.

## 7 SUMMARY

Today nearly 50 million people suffer from dementia, which in 70% is caused by Alzheimer's Disease (AD). Previous studies of our workgroup have identified Kallikrein-8 (KLK8) as a potential upstream mover of Alzheimer's pathogenesis. Here we try to investigate the potential influence of a reduction of cerebral KLK8-Levels through genetic knockdown on microglial activation and cerebral inflammation. Therefore, mice with a genetic knockdown for murine KLK8 (mKlk8) [*mKlk8 +/-*] were crossed with transgenic mice that express increased levels of human amyloid-precursor protein (hAPP) [*hAPP +/-*].

Depending on transgene and knockdown status, protein levels of the inflammatory markers allograft inflammatory factor 1 (AIF1) and prostaglandin receptor E2 (PTGER2) in the frontal neocortex were examined using western blotting. Microglia activation in the frontal neocortex, hippocampus and basal ganglia was measured using stereological quantification of AIF1-positive microglia.

Transgenic mice showed higher levels of activated microglia through all examined regions compared to non-transgenic mice.

Protein levels of the inflammatory marker AIF1 were per se increased in transgenic mice compared to non-transgenic mice, regardless of knockdown status. Female transgenic mice showed more enhanced levels of AIF1 than male transgenic mice. A knockdown of KLK8 reduced the protein level of AIF1 in female transgenic mice with knockdown, compared to female transgenic mice without knockdown.

Reducing elevated KLK8 levels in female transgenic mice via knockdown seem to have a positive impact on cerebral neuroinflammation, showing a potential role of KLK8 in AD pathology.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G.M., Cooper, N.R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B.L., Finch, C.E., Frautschy, S., Griffin, W.S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I.R., McGeer, P.L., O'Banion, M.K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F.L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G., and Wyss-Coray, T. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21, 383-421.
2. Alldred, M.J., Duff, K.E., and Ginsberg, S.D. (2012). Microarray analysis of CA1 pyramidal neurons in a mouse model of tauopathy reveals progressive synaptic dysfunction. *Neurobiol Dis* 45, 751-762.
3. Alzheimer's disease facts and figures. (2022). *Alzheimers Dement* 18, 700-789.
4. Andrew, R.J., Kellett, K.A., Thinakaran, G., and Hooper, N.M. (2016). A Greek Tragedy: The Growing Complexity of Alzheimer Amyloid Precursor Protein Proteolysis. *J Biol Chem* 291, 19235-19244.
5. Armstrong, R.A. (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* 57, 87-105.
6. Atri, A. (2019). Current and Future Treatments in Alzheimer's Disease. *Semin Neurol* 39, 227-240.
7. Attwood, B.K., Bourgognon, J.M., Patel, S., Mucha, M., Schiavon, E., Skrzypiec, A.E., Young, K.W., Shiosaka, S., Korostynski, M., Piechota, M., Przewlocki, R., and Pawlak, R. (2011). Neuropsin cleaves EphB2 in the amygdala to control anxiety. *Nature* 473, 372-375.
8. Bailus, B.J., Scheeler, S.M., Simons, J., Sanchez, M.A., Tshilenge, K.T., Creus-Muncunill, J., Naphade, S., Lopez-Ramirez, A., Zhang, N., Lakshika Madushani, K., Moroz, S., Loureiro, A., Schreiber, K.H., Hausch, F., Kennedy, B.K., Ehrlich, M.E., and Ellerby, L.M. (2021). Modulating FKBP5/FKBP51 and autophagy lowers HTT (huntingtin) levels. *Autophagy* 17, 4119-4140.
9. Bar-On, P., Millard, C.B., Harel, M., Dvir, H., Enz, A., Sussman, J.L., and Silman, I. (2002). Kinetic and structural studies on the interaction of cholinesterases with the anti-Alzheimer drug rivastigmine. *Biochemistry* 41, 3555-3564.
10. Behl, T., Kaur, I., Sehgal, A., Singh, S., Sharma, N., Makeen, H.A., Albratty, M., Alhazmi, H.A., Felemban, S.G., Alsubayiel, A.M., Bhatia, S., and Bungau, S. (2022). "Aducanumab" making a comeback in Alzheimer's disease: An old wine in a new bottle. *Biomed Pharmacother* 148, 112746.

11. Blair, L.J., Criado-Marrero, M., Zheng, D., Wang, X., Kamath, S., Nordhues, B.A., Weeber, E.J., and Dickey, C.A. (2019). The Disease-Associated Chaperone FKBP51 Impairs Cognitive Function by Accelerating AMPA Receptor Recycling. *eNeuro* 6.
12. Blennow, K., de Leon, M.J., and Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet* 368, 387-403.
13. Blessed, G., Tomlinson, B.E., and Roth, M. (1968). The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry* 114, 797-811.
14. Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239-259.
15. Bukowski, L., Chernomorchenko, A.M.F., Starnawska, A., Mors, O., Staunstrup, N.H., Børghlum, A.D., and Qvist, P. (2020). Neuropeptide Y in mental health. *J Physiol Sci* 70, 26.
16. Carson, J.A., and Turner, A.J. (2002). Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metalloproteases? *J Neurochem* 81, 1-8.
17. Chen, Z.L., Yoshida, S., Kato, K., Momota, Y., Suzuki, J., Tanaka, T., Ito, J., Nishino, H., Aimoto, S., Kiyama, H., and et al. (1995). Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus. *J Neurosci* 15, 5088-5097.
18. 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.
19. Chong, F.P., Ng, K.Y., Koh, R.Y., and Chye, S.M. (2018). Tau Proteins and Tauopathies in Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol* 38, 965-980.
20. Cissé, M., Halabisky, B., Harris, J., Devidze, N., Dubal, D.B., Sun, B., Orr, A., Lotz, G., Kim, D.H., Hamto, P., Ho, K., Yu, G.Q., and Mucke, L. (2011). Reversing EphB2 depletion rescues cognitive functions in Alzheimer model. *Nature* 469, 47-52.
21. Corrigan, F., Vink, R., Blumbergs, P.C., Masters, C.L., Cappai, R., and van den Heuvel, C. (2012). sAPP $\alpha$  rescues deficits in amyloid precursor protein knockout mice following focal traumatic brain injury. *J Neurochem* 122, 208-220.
22. de Leon, M.J., Li, Y., Okamura, N., Tsui, W.H., Saint-Louis, L.A., Glodzik, L., Osorio, R.S., Fortea, J., Butler, T., Pirraglia, E., Fossati, S., Kim, H.J., Carare, R.O., Nedergaard, M., Benveniste, H., and Rusinek, H. (2017). Cerebrospinal Fluid Clearance in Alzheimer Disease Measured with Dynamic PET. *J Nucl Med* 58, 1471-1476.

23. Diaz-Aparicio, I., Paris, I., Sierra-Torre, V., Plaza-Zabala, A., Rodríguez-Iglesias, N., Márquez-Ropero, M., Beccari, S., Huguet, P., Abiega, O., Alberdi, E., Matute, C., Bernales, I., Schulz, A., Otrokocsi, L., Sperlagh, B., Happonen, K.E., Lemke, G., Maletic-Savatic, M., Valero, J., and Sierra, A. (2020). Microglia Actively Remodel Adult Hippocampal Neurogenesis through the Phagocytosis Secretome. *J Neurosci* *40*, 1453-1482.
24. Doody, R.S., Thomas, R.G., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., Raman, R., Sun, X., Aisen, P.S., Siemers, E., Liu-Seifert, H., and Mohs, R. (2014). Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* *370*, 311-321.
25. Dubois, B., Hampel, H., Feldman, H.H., Scheltens, P., Aisen, P., Andrieu, S., Bakardjian, H., Benali, H., Bertram, L., Blennow, K., Broich, K., Cavado, E., Crutch, S., Dartigues, J.F., Duyckaerts, C., Epelbaum, S., Frisoni, G.B., Gauthier, S., Genthon, R., Gouw, A.A., Habert, M.O., Holtzman, D.M., Kivipelto, M., Lista, S., Molinuevo, J.L., O'Bryant, S.E., Rabinovici, G.D., Rowe, C., Salloway, S., Schneider, L.S., Sperling, R., Teichmann, M., Carrillo, M.C., Cummings, J., and Jack, C.R., Jr. (2016). Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers Dement* *12*, 292-323.
26. El Khoury, J., Hickman, S.E., Thomas, C.A., Cao, L., Silverstein, S.C., and Loike, J.D. (1996). Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* *382*, 716-719.
27. El Khoury, J.B., Moore, K.J., Means, T.K., Leung, J., Terada, K., Toft, M., Freeman, M.W., and Luster, A.D. (2003). CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J Exp Med* *197*, 1657-1666.
28. Ennaceur, A., and Meliani, K. (1992). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. III. Spatial vs. non-spatial working memory. *Behav Brain Res* *51*, 83-92.
29. Ernst, A.S., Böhler, L.I., Hagenston, A.M., Hoffmann, A., Heiland, S., Sticht, C., Bendszus, M., Hecker, M., Bading, H., Marti, H.H., Korff, T., and Kunze, R. (2019). EphB2-dependent signaling promotes neuronal excitotoxicity and inflammation in the acute phase of ischemic stroke. *Acta Neuropathol Commun* *7*, 15.
30. Fol, R., Braudeau, J., Ludewig, S., Abel, T., Weyer, S.W., Roederer, J.P., Brod, F., Audrain, M., Bemelmans, A.P., Buchholz, C.J., Korte, M., Cartier, N., and Müller, U.C. (2016). Viral gene transfer of APP $\alpha$  rescues synaptic failure in an Alzheimer's disease mouse model. *Acta Neuropathol* *131*, 247-266.
31. Fu, Y., Yang, M.S., Jiang, J., Ganesh, T., Joe, E., and Dingledine, R. (2015). EP2 Receptor Signaling Regulates Microglia Death. *Mol Pharmacol* *88*, 161-170.
32. Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., Samokhvalov, I.M., and Merad, M. (2010). Fate

mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841-845.

33. Glenner, G.G., and Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120, 885-890.

34. Global status report on the public health response to dementia. (2021). Geneva: World Health Organization.

35. Henderson, J.T., Georgiou, J., Jia, Z., Robertson, J., Elowe, S., Roder, J.C., and Pawson, T. (2001). The receptor tyrosine kinase EphB2 regulates NMDA-dependent synaptic function. *Neuron* 32, 1041-1056.

36. Heneka, M.T., Kummer, M.P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T.C., Gelpi, E., Halle, A., Korte, M., Latz, E., and Golenbock, D.T. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 493, 674-678.

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

38. Herring, A., Munster, Y., Akkaya, T., Moghaddam, S., Deinsberger, K., Meyer, J., Zahel, J., Sanchez-Mendoza, E., Wang, Y., Hermann, D.M., Arzberger, T., Teuber-Hanselmann, S., and Keyvani, K. (2016). Kallikrein-8 inhibition attenuates Alzheimer's disease pathology in mice. *Alzheimers Dement* 12, 1273-1287.

39. Hickman, S.E., Allison, E.K., and El Khoury, J. (2008). Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 28, 8354-8360.

40. 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.

41. 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.

42. Hu, R., Wei, P., Jin, L., Zheng, T., Chen, W.Y., Liu, X.Y., Shi, X.D., Hao, J.R., Sun, N., and Gao, C. (2017). Overexpression of EphB2 in hippocampus rescues impaired NMDA receptors trafficking and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell Death Dis* 8, e2717.

43. Iqbal, K., and Grundke-Iqbal, I. (2008). Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *J Cell Mol Med* 12, 38-55.
44. Irie, F., Okuno, M., Pasquale, E.B., and Yamaguchi, Y. (2005). EphrinB-EphB signalling regulates clathrin-mediated endocytosis through tyrosine phosphorylation of synaptojanin 1. *Nat Cell Biol* 7, 501-509.
45. Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., and Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* 57, 1-9.
46. Jia, J., Wei, C., Chen, S., Li, F., Tang, Y., Qin, W., Zhao, L., Jin, H., Xu, H., Wang, F., Zhou, A., Zuo, X., Wu, L., Han, Y., Han, Y., Huang, L., Wang, Q., Li, D., Chu, C., Shi, L., Gong, M., Du, Y., Zhang, J., Zhang, J., Zhou, C., Lv, J., Lv, Y., Xie, H., Ji, Y., Li, F., Yu, E., Luo, B., Wang, Y., Yang, S., Qu, Q., Guo, Q., Liang, F., Zhang, J., Tan, L., Shen, L., Zhang, K., Zhang, J., Peng, D., Tang, M., Lv, P., Fang, B., Chu, L., Jia, L., and Gauthier, S. (2018). The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide. *Alzheimers Dement* 14, 483-491.
47. Katzmarski, N., Ziegler-Waldkirch, S., Scheffler, N., Witt, C., Abou-Ajram, C., Nuscher, B., Prinz, M., Haass, C., and Meyer-Luehmann, M. (2020). A $\beta$  oligomers trigger and accelerate A $\beta$  seeding. *Brain Pathol* 30, 36-45.
48. Kempuraj, D., Thangavel, R., Natteru, P.A., Selvakumar, G.P., Saeed, D., Zahoor, H., Zaheer, S., Iyer, S.S., and Zaheer, A. (2016). Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Spine* 1.
49. Kenkhuis, B., Somarakis, A., Kleindouwel, L.R.T., van Roon-Mom, W.M.C., Höllt, T., and van der Weerd, L. (2022). Co-expression patterns of microglia markers Iba1, TMEM119 and P2RY12 in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 167, 105684.
50. 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.
51. Kilic, E., ElAli, A., Kilic, U., Guo, Z., Ugur, M., Uslu, U., Bassetti, C.L., Schwab, M.E., and Hermann, D.M. (2010). Role of Nogo-A in neuronal survival in the reperfused ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 969-984.
52. Kwon, H.S., and Koh, S.H. (2020). Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* 9, 42.
53. Lane, C.A., Hardy, J., and Schott, J.M. (2018). Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 25, 59-70.

54. Lee, S.J., Nam, E., Lee, H.J., Savelieff, M.G., and Lim, M.H. (2017). Towards an understanding of amyloid- $\beta$  oligomers: characterization, toxicity mechanisms, and inhibitors. *Chem Soc Rev* *46*, 310-323.
55. Li, Y.M., Xu, M., Lai, M.T., Huang, Q., Castro, J.L., DiMuzio-Mower, J., Harrison, T., Lellis, C., Nadin, A., Neduveilil, J.G., Register, R.B., Sardana, M.K., Shearman, M.S., Smith, A.L., Shi, X.P., Yin, K.C., Shafer, J.A., and Gardell, S.J. (2000). Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature* *405*, 689-694.
56. Liang, X., Wang, Q., Hand, T., Wu, L., Breyer, R.M., Montine, T.J., and Andreasson, K. (2005). Deletion of the prostaglandin E2 EP2 receptor reduces oxidative damage and amyloid burden in a model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* *25*, 10180-10187.
57. Lier, J., Streit, W.J., and Bechmann, I. (2021). Beyond Activation: Characterizing Microglial Functional Phenotypes. *Cells* *10*.
58. 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.
59. Masters, C.L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C.C., Sperling, R.A., and Cummings, J.L. (2015). Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers* *1*, 15056.
60. Mohandas, E., Rajmohan, V., and Raghunath, B. (2009). Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian J Psychiatry* *51*, 55-61.
61. Müller, U.C., Deller, T., and Korte, M. (2017). Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat Rev Neurosci* *18*, 281-298.
62. Murphy, M.P., and LeVine, H., 3rd (2010). Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis* *19*, 311-323.
63. Nagano, T., Nishiyama, R., Sanada, A., Mutaguchi, Y., Ioku, A., Umeki, H., Kishimoto, S., Yamanaka, D., Kimura, S.H., and Takemura, M. (2017). Prostaglandin E(2) potentiates interferon- $\gamma$ -induced nitric oxide production in cultured rat microglia. *J Neurochem* *140*, 605-612.
64. Nagano, T., Tsuda, N., Fujimura, K., Ikezawa, Y., Higashi, Y., and Kimura, S.H. (2021). Prostaglandin E(2) increases the expression of cyclooxygenase-2 in cultured rat microglia. *J Neuroimmunol* *361*, 577724.
65. Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., and Gross, C.T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* *333*, 1456-1458.
66. Patterson, K.R., Remmers, C., Fu, Y., Brooker, S., Kanaan, N.M., Vana, L., Ward, S., Reyes, J.F., Philibert, K., Glucksman, M.J., and Binder, L.I. (2011). Characterization of

prefibrillar Tau oligomers in vitro and in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 286, 23063-23076.

67. Rasmussen, M.K., Mestre, H., and Nedergaard, M. (2018). The glymphatic pathway in neurological disorders. *Lancet Neurol* 17, 1016-1024.

68. Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., and Möbius, H.J. (2003). Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 348, 1333-1341.

69. Reitz, C., Brayne, C., and Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 7, 137-152.

70. Roberts, R., and Knopman, D.S. (2013). Classification and epidemiology of MCI. *Clin Geriatr Med* 29, 753-772.

71. Robinson, N.B., Krieger, K., Khan, F.M., Huffman, W., Chang, M., Naik, A., Yongle, R., Hameed, I., Krieger, K., Girardi, L.N., and Gaudino, M. (2019). The current state of animal models in research: A review. *Int J Surg* 72, 9-13.

72. Rogers, S.L., and Friedhoff, L.T. (1996). The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. The Donepezil Study Group. *Dementia* 7, 293-303.

73. Salloway, S., Sperling, R., Fox, N.C., Blennow, K., Klunk, W., Raskind, M., Sabbagh, M., Honig, L.S., Porsteinsson, A.P., Ferris, S., Reichert, M., Ketter, N., Nejadnik, B., Guenzler, V., Miloslavsky, M., Wang, D., Lu, Y., Lull, J., Tudor, I.C., Liu, E., Grundman, M., Yuen, E., Black, R., and Brashear, H.R. (2014). Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 370, 322-333.

74. Selkoe, D.J. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399, A23-31.

75. Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741-766.

76. Serrano-Pozo, A., Froesch, M.P., Masliah, E., and Hyman, B.T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1, a006189.

77. 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.

78. Silva, M.V.F., Loures, C.M.G., Alves, L.C.V., de Souza, L.C., Borges, K.B.G., and Carvalho, M.D.G. (2019). Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *J Biomed Sci* 26, 33.

79. Soria Lopez, J.A., González, H.M., and Léger, G.C. (2019). Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol* 167, 231-255.
80. Takashima, A., Honda, T., Yasutake, K., Michel, G., Murayama, O., Murayama, M., Ishiguro, K., and Yamaguchi, H. (1998). Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta by amyloid beta peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci Res* 31, 317-323.
81. 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.
82. 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.
83. Tang, Y., and Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 53, 1181-1194.
84. Tanzi, R.E., Moir, R.D., and Wagner, S.L. (2004). Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron* 43, 605-608.
85. Tao, Y., Han, Y., Yu, L., Wang, Q., Leng, S.X., and Zhang, H. (2020). The Predicted Key Molecules, Functions, and Pathways That Bridge Mild Cognitive Impairment (MCI) and Alzheimer's Disease (AD). *Front Neurol* 11, 233.
86. 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.
87. 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.
88. Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., and Nair, M. (2019). Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Nanomedicine* 14, 5541-5554.
89. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
90. Trejo-Lopez, J.A., Yachnis, A.T., and Prokop, S. (2022). Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics* 19, 173-185.
91. Urbanc, B., Cruz, L., Le, R., Sanders, J., Ashe, K.H., Duff, K., Stanley, H.E., Irizarry, M.C., and Hyman, B.T. (2002). Neurotoxic effects of thioflavin S-positive amyloid

deposits in transgenic mice and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13990-13995.

92. Vehmas, A.K., Kawas, C.H., Stewart, W.F., and Troncoso, J.C. (2003). Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24, 321-331.

93. Young, E.J., Lipina, T., Tam, E., Mandel, A., Clapcote, S.J., Bechard, A.R., Chambers, J., Mount, H.T., Fletcher, P.J., Roder, J.C., and Osborne, L.R. (2008). Reduced fear and aggression and altered serotonin metabolism in *Gtf2ird1*-targeted mice. *Genes Brain Behav* 7, 224-234.

94. Zeng, H., Liu, N., Yang, Y.Y., Xing, H.Y., Liu, X.X., Li, F., La, G.Y., Huang, M.J., and Zhou, M.W. (2019). Lentivirus-mediated downregulation of  $\alpha$ -synuclein reduces neuroinflammation and promotes functional recovery in rats with spinal cord injury. *J Neuroinflammation* 16, 283.

## 9 ANHANG

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

### 9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 (Modifiziert nach Andrew et al., 2016): Prozessierung des Amyloid-Precursor Proteins (APP).....	10
Abbildung 2 Mikroglia-dichte im Bereich des Neokortex .....	37
Abbildung 3 Mikroglia-dichte im Bereich des Hippocampus .....	38
Abbildung 4 Mikroglia-dichte im Bereich der Basalganglien.....	39
Abbildung 5 Proteinlevel des Inflammationsmarkers AIF-1 im Neokortex .....	41
Abbildung 6 Proteinlevel des Inflammationsmarkers PTGER2 im Neokortex .....	43

### 9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Anzahl der untersuchten Tiere der Experimentalgeneration für Western-Blot-Analysen und AIF-1 Stereologie .....	25
Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper zur Blockierung im Anschluss an das Western-Blot-Verfahren.....	30
Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper im Anschluss an die erste Blockierung.....	30
Tabelle 4: Verwendete Antikörper zur immunhistologischen Färbung .....	33

## 9.4 Chemikalien, Lösungen, Puffer und Geräte

## 9.4.1 Chemikalien und Kits

<b>Chemikalien &amp; Kits</b>	<b>Bezeichnung/Artikelnummer &amp; Hersteller</b>
1 % SDS	SDS ultra pure, 2326.2 Roth., Karlsruhe, BRD
3,3-Diaminobenzidin	N3231L, New England Biolabs, Ipswich, USA
4% gepuffertes Formaldehyd	Roti-Histofix 41, PO87.4, Roth, Karlsruhe, BRD
10% TGX Stain-Free FastCast Acrylamid Kit	BioRad, 1610183, München, BRD
Antibody Diluent	Zytomed Systems, POLHRP-100, Berlin, BRD
Chloroform	Carl Roth GmbH, X984.1, Karlsruhe, BRD
Cytoseal XYL	
DC <sup>TM</sup> Protein Assay Kit II	50000112, BioRad, München, BRD
Ethanol	Honeywell Research Chemicals, 02857, Morris Plains, USA
Isopropanol	Merck KGaA, K53060395107, Darmstadt, BRD
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich GmbH, BRD
Proteinstandard als WB-Marker	Color Prestained Protein Standard, P7712S, New England Biolabs, Ipswich, USA
Temed	BioRad, München, BRD
TRIzol-Reagent	15596-026, Ambion RNA, Life Technologies, Karlsbad, CA, USA

Westernblot-Detection-Kit	1) Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagent-Kit, RPN2235, GE Healthcare Life Sciences, GB 2) Immobilon Western HRP-Substrat Kit, WBKLS0500, EMD Millipore Corporation, Burlington, MA, USA
ZytoChem HRP Polymer-System Kit	Zytomed Systems, POLHRP-100, Berlin, BRD

## 9.4.2 Puffer, Lösungen und Gele

Puffer, Lösungen & Gele	Zusammensetzung
12,5% Trenngel	2920µl Acrylamid/Bisacrylamid 1750µl Lower Tris 2330µl H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> 50µl APS (10%) 10µl Temed
4% Sammelgel	415µl Acrylamid/Bisacrylamid 625µl Upper Tris 1460µl H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> 20% APS (10%) 5µl Temed
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Peroxidase Blocking Solution	
5%-Magermilchpulver	25g Magermilchpulver Ad 500ml 1xTST
0,5% Ponceau S Gebrauchslösung: 1x Ponceau S	0,5g Ponceau S 98,5ml dH <sub>2</sub> O 1ml Eisessig
0,3M Guanidinhydrochlorid-Lösung in 95% Ethanol	2,866g Guanidin-HCl 5ml DEPC-H <sub>2</sub> O 95ml EtOH (100% ig)
5x SDS Auftragspuffer	4ml Aqua dest.

	1ml 0,5M Tris/HCl pH 6,8 0,8ml Glycerol 1,6ml 10% SDS 0,4ml $\beta$ -Mercapto-EtOH 0,4ml Bromphenolblau (1% Stock)
10x SDS Laufpuffer  Gebrauchslösung: Verdünnt auf 1x SDS	1000ml Aqua dest. 144g Glycine 39g Tris 19g SDS
10x TST-Puffer  Gebrauchslösung: 1x TST	100ml 1M Tris/HCl (pH7,6) 300ml NaCl 5g (5ml) Tween
Blotpuffer	3,03g Tris 14,4g Glycin 200ml Methanol Ad 1000ml Aqua bidest
Citratpuffer pH6	
DEPC-Wasser	500 $\mu$ l DEPC Ad 500ml Aqua bidest
Lower Tris	90,855g Tris (entspricht 1,5M) 2g SDS (entspricht 0,4%) Ad 500ml Aqua dest. pH auf 8,8 einstellen mittels HCl
Paraffin	
Standard-Lysispuffer	10ml 100mM Tris/HCl (pH8) 3ml 5M NaCl 2ml Igpal Detergenz (100% Stock) 10ml Na Desoxycholat (10% Stock) 0,2ml 0,5M EDTA 1ml 100mM EGTA 1g SDS

---

Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) (1:100)	
Proteinaseinhibitorcocktail (1:1000)	
Tris/HCl pH8	12,114g Tris 100ml Aqua dest. 37% HCl (Einstellung pH8)
Tris/HCl pH7	12,114g Tris 100ml Aqua dest. 37% HCl (Einstellung pH 7,6)
Upper Tris	30,28g Tris (entspricht 0,5 M) 2g SDS (entspricht 0,4%) Ad 500ml Aqua dest. PH auf 6,8 einstellen mittels HCl
Xylol	

## 9.4.3 Materialien, Geräte und Software

<b>Bezeichnung</b>	<b>Gerät/Software</b>	<b>Hersteller</b>
Blot-Apparatur	Mini Trans-Blot Cell	BioRad, München, BRD
Digitalkamera	Gel Doc XR+. Molecular Imager	BioRad, München, BRD
Elektrophoresekammer	Mini Protean Tetra Cell	BioRad, München, BRD
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, BRD
Lichtmikroskop	Nikon Eclipse 80i	Nikon, Tokyo, Japan
Magnetrührer	IKA RCT classic	IKA, Staufen, BRD
Mikrodismembrator	Mikrodismembrator	Sartorius AG, Göttingen
Nitrozellulosemembran	Protran Nitrocellulose Membran Filters	VWR International GmbH, Darmstadt, BRD
Plate-Reader	Multiskan FC	Thermo Scientific, Asheville, NC, USA
Kalibrierungssoftware für Chemilumineszenz	Quantity One 1-D Analysis Software	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Spannungsgeräte	PowerPac HC	BioRad, München, BRD
Stereologische Auswertung	Stereo Investigator 11 Software	MicroBright-Field, Williston, VT, USA
Vortex	Vortex-Genie II	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Western-Blot Auswertung	Image Lab 2.0 Densitometrie Software	BioRad, München, BRD
Zentrifuge	Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Scientific, Asheville, NC, USA

## 10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>Abkürzung</b>	<b>Erläuterung</b>
AD	Alzheimer Erkrankung
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AMPAR	AMPA-Rezeptor
APP	Amyloid-Precursor-Protein
A $\beta$	Amyloid- $\beta$ -Peptid
BACE	beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme
CAM	Cell adhesion molecule
CDK5	Cyclin-abhängige Protein Kinase 5
COX	Cyclooxygenase
CSF	Zerebrospinale Flüssigkeit
CTF	C-terminal Fragment
DAB	Diaminobenzidin
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ECL	Enhanced chemiluminescence
EphB2	Ephrin-Rezeptor B2
EPM	Elevated Plus Maze
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAD	Familiäre AD
FDA	Food and Drug Association
GABA	Gaba-Aminobuttersäure
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GSK-3	Glycogen Synthase Kinase-3
HIER	Heat-induced epitope retrieval
HRP	Horseradish-Peroxidase

Hsp90	Hitzeschockprotein 90
IBA-1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
kDA	Kilodalton
KLK8	Kallikrein-8
MAP	Mitogen-activated Proteinkinase
MCI	Mild cognitive impairment
mKlk8	Murines Klk8
MMP	Magermilchpulver
mSry	Murines sex determining region Y
NFTs	Neurofibrilläre Tangles
NLRP3	nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors“ und dem „pyrin domain-containing protein 3
NMDA	N-Methyl-Aspartat-Antagonist
NMDAR	NMDA-Rezeptor
NO	Nitroxid
NRG-1	Neuregulin-1
OF	Open Field
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PHF	Doppelhelixartig gewundene Filamente
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PSEN	Presenilin
PTGER2	Prostaglandinrezeptor E2
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
RT	Raumtemperatur
RTKs	Rezeptor-Tyrosinkinasen
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat

SH	Standardhaltung
SRs	Scavenger-Rezeptoren
Tg	Transgen
TLR	Toll-Like-Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	World Health Organisation

## 11 DANKSAGUNG

Vorweg möchte ich mich bei Univ.-Prof. Dr. med. Kathy Keyvani für die Möglichkeit einer Promotion an ihrer Fakultät bedanken. Die intensive und anstrengende Zeit im Labor in Verbindung mit der konstruktiven Kritik, Anregung und stetigen Motivation haben mich ebenso wie ihre Begeisterung für die Forschung geprägt. Ich bin ihnen für ihre Mühen, ihren Einsatz und ihre ehrliche Art dankbar und weiß sie als meine Doktormutter sehr zu schätzen.

Für die interessante und abwechslungsreiche Zeit im Labor bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. Arne Herring, Nicole Macha und Michaela Knoll, sowie allen weiteren Mitarbeiter:innen des Instituts. Danke für eure Freundschaft und euren Rat.

Zu guter Letzt gilt ein besonderer Dank meiner Familie, meiner Mutter, Sabine Grammon, meinem Vater Martin Grammon und meinem Bruder Benedikt Grammon. Euer Verständnis, eure Unterstützung und die stetige Motivation haben mich erfolgreich durch ein gesamtes Studium und nun auch durch die intensive Zeit der Forschung begleitet. Um meinen Dank ausreichend mit Worten beschreiben zu können, müsste ich dieser Doktorarbeit noch unzählige Seiten hinzufügen, weshalb ich es bei einem kurzen Satz belassen muss. Ich bin dankbar euch an meiner Seite zu wissen.

## 12 LEBENSLAUF

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