

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Neuropathologie

**Effekte des Kallikrein 8 Knockdown auf die hippocampale Dendritenkomplexität
und den neuronalen Tau Metabolismus in einem transgenen CRND8-Mausmodell
der Alzheimer-Krankheit**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Katharina Luise Helene Haase

aus Wuppertal

2024

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
D U I S B U R G
E S S E N

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

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

DOI: 10.17185/duepublico/82617

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20241218-075237-5

Alle Rechte vorbehalten.

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

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 2024

Anteile dieser Dissertation sind in folgender Publikation enthalten:

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

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG	6
1.1 Die Alzheimer-Krankheit	6
1.1.1 Klinik und Einteilung	6
1.1.2 Epidemiologie und volkswirtschaftliche Konsequenzen.....	7
1.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren	7
1.1.4 Pathogenese	8
1.1.5 Diagnostik und Therapie	11
1.2 Kallikrein 8.....	14
1.2.1 Physiologische Funktion.....	14
1.2.2 Kallikrein 8 im Kontext der Alzheimer-Krankheit.....	15
2 FRAGESTELLUNGEN.....	17
3 MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 Tiermodell	19
3.1.1 Gründerstämme	19
3.1.2 Knockdown Generierung.....	20
3.1.3 Experimentaltiergeneration	21
3.2 Tierhaltung	23
3.2.1 Haltungsbedingungen	23
3.2.2 Verhaltensphänotypisierung	23
3.2.3 Behördliche Genehmigung und Haltungsrichtlinien	24
3.3 Stereologie.....	24
3.3.1 Probengewinn und Gewebeaufbereitung für <i>in vivo</i> Analysen	24
3.3.2 Bestimmung der neuronalen Plastizität von weiblichen Tieren	24
3.4 Probengewinn und Gewebeaufbereitung für <i>in vitro</i> Analysen	27
3.4.1 Zellkultur primärer Neurone.....	28
3.4.2 RNA-, DNA- und Proteinextraktion mittels TRIzol Reagenz.....	30
3.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	32
3.5 Analyse Tau Metabolismus in transgenen Tieren via Western Blot <i>in vitro</i>	33
3.5.1 Fluoreszenz-SDS-PAGE	33
3.5.2 Probenvorbereitung	34
3.5.3 Gelelektrophorese	35
3.5.4 Blotting	36

3.5.5	Immunmarkierung	37
3.5.6	Immundetektion durch Chemolumineszenz	38
3.5.7	Membranstripping	39
3.6	Statistik.....	40
4	ERGEBNISSE.....	41
4.1	Klk8-Knockdown steigert die strukturelle hippocampale Neuroplastizität	41
4.1.1	Klk8-Knockdown verbessert die hippocampale Spine-Dichte.....	43
4.1.2	Klk8-Knockdown verbessert die hippocampale Dendritenkomplexität.....	45
4.2	Klk8-Knockdown affiziert nicht den Tau Metabolismus <i>in vitro</i>	48
4.2.1	Klk8-Knockdown affiziert nicht die <i>total</i> -Tau-Level primärer Neurone.....	48
4.2.2	Klk8-Knockdown affiziert nicht die <i>phospho</i> -Tau-Level primärer Neurone.....	48
4.2.3	Klk8-Knockdown affiziert nicht die p-Tau/t-Tau-Ratio primärer Neurone	49
5	DISKUSSION	50
5.1	Reduktion exzessiver Klk8-Level verbessert die strukturelle Neuroplastizität	50
5.2	Tau Metabolismus im Kontext des Kallikrein-8 Knockdown	54
5.3	KLK8-KD verbessert multiple Facetten der Alzheimer Erkrankung.....	56
5.4	Geschlechtsspezifische Unterschiede.....	58
5.5	Limitationen, Stärken und Ausblick.....	59
5.6	Schlussfolgerung	61
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	62
7	SUMMARY	63
8	LITERATURVERZEICHNIS	64
9	TABELLARISCHER ANHANG	73
9.1	Abbildungsverzeichnis	73
9.2	Tabellenverzeichnis.....	73
9.3	Chemikalienverzeichnis	74
9.4	Verzeichnis Material, Geräte, Software	76
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	78
11	DANKSAGUNG.....	80
12	LEBENS LAUF	81

1 EINLEITUNG

1.1 Die Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit (*Alzheimer's disease*, AD) ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung und mit einem Anteil von 60-80% weltweit die häufigste Ursache für Demenz. Sie ist morphologisch gekennzeichnet durch Akkumulation von extrazellulärem β -Amyloid (A β) und intrazellulärem hyperphosphoryliertem Tau (*phospho-Tau*; pTau), während klinisch der fortschreitende Verlust des Arbeitsgedächtnisses sowie der Exekutivfunktionen die Krankheit vordergründig definiert. Dies führt nicht nur zu einer hohen Belastung von Patient*innen und Angehörigen, sondern auch zu erheblichen gesundheitsökonomischen Folgen (2023 Alzheimer's disease facts and figures, 2023).

1.1.1 Klinik und Einteilung

Zum Kontinuum der AD gehört die präklinische Phase, charakterisiert durch pathologische Alterationen wie zerebrale Amyloidablagerungen oder strukturelle Veränderungen wie Synapsenverlust und Neuroplastizitätsdefizite, welche einer demenziellen Erkrankung um bis zu 20 Jahre vorausgehen können. Treten klinische Symptome wie zeitlicher und/oder räumlicher Orientierungsverlust, Gedächtniseinschränkungen sowie affektive oder beginnende Störungen der Exekutivfunktionen auf, so markiert dies, solange die Alltagskompetenz erhalten ist, die Phase der milden kognitiven Einschränkung (*mild cognitive impairment*, MCI). Kommt es zum vollständigen Verlust der Alltagskompetenz, handelt es sich um die Alzheimer-Demenz, welche je nach Ausprägungsgrad des demenziellen Syndroms in drei Stadien (mild, moderat und schwerwiegend) eingeteilt wird und unter anderem geprägt ist durch Amnesie, Aphasie, Agnosie und Apraxie (Sperling et al., 2011). Infolge von Dysphagie als Ausdruck der Pathologie im Hirnstamm, vermehrter Bettlägerigkeit als Teil des Apraxie-Komplexes und verminderter Eigenwahrnehmung kommt es zu erhöhter Vulnerabilität für internistische Folgeerkrankungen, welche maßgeblich die Mortalität der AD bestimmen. Die durchschnittliche Lebenserwartung nach Diagnosestellung beträgt im Mittel 5-8 Jahre (Liang et al., 2021).

1.1.2 Epidemiologie und volkswirtschaftliche Konsequenzen

Allein in Deutschland liegt die Prävalenz Demenzerkrankter aktuell bei 1,8 Millionen Betroffenen, weltweit bei 52 Millionen, von denen 70-80% auf die AD zurückzuführen sind. Dabei stellen Frauen mit zwei Dritteln nicht nur die überwiegende Mehrheit der Betroffenen dar, sondern weisen ebenfalls häufiger schwere Verläufe mit rascherer Progredienz auf (Nichols, 2022). Global gesehen kam es über die letzten 30 Jahre bereits zu dramatischen Anstiegen der Prävalenz (+148%), Inzidenz (+161%) sowie Demenz-assoziiierter Todesfälle (+189%) und Prognosen zufolge setzt sich dieser Trend zukünftig fort (Nichols, 2019). So werden für Deutschland für das Jahr 2050 2,8 Millionen und global bis zu 152 Millionen Patient*innen erwartet. Ursachen werden unter anderem im demografischen Wandel, einem schädlichen Lebensstil und nicht zuletzt in mangelnden therapeutischen Möglichkeiten vermutet (Nichols, 2022). Durch den Verlust der Alltagskompetenz ist die AD nicht nur eine Erkrankung mit hohem Morbiditätsgrad, sondern geht als Hauptvertreter der Demenzen, welche die 7. häufigste Todesursache weltweit bilden (WHO, 2023), zudem mit einer hohen Mortalität einher. Dies hat nicht nur eine große soziokulturelle Belastung für Betroffene und Versorger zur Folge, sondern stellt ebenfalls bereits jetzt, mit geschätzten Kosten von 345 Milliarden US-Dollar allein in den USA für das Jahr 2023, eine der größten ökonomischen Herausforderungen für das Gesundheitssystem dar (2023 Alzheimer's disease facts and figures, 2023). Zukünftig gehen unterschiedliche Hochrechnungen von anfallenden Kosten zwischen 9,12 Billionen (Jia et al., 2018) und 16,9 Billionen US-Dollar weltweit aus (Nandi et al., 2022).

1.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren

Die AD lässt sich in eine monogenetische frühe, vor dem 65. Lebensjahr einsetzende Form (*Early onset Alzheimer's disease*, EOAD), und eine polygenetische späte, nach dem 65. Lebensjahr einsetzende Form (*Late onset Alzheimer's disease*, LOAD), einteilen. Die EOAD geht typischerweise mit einer rascheren Krankheitsprogression einher und macht ca. 5 % der AD Fälle aus (Lanoiselée et al., 2017). Ursächlich sind Mutationen, entweder am Gen des Amyloid Vorläufer Proteins (*Amyloid precursor protein*, APP) selbst, oder an Genen von Spaltungsenzymen der amyloiden Prozessierung wie Präsenilin 1 (*PSEN1*) und Präsenilin 2 (*PSEN2*), welche die katalytische Untereinheit der γ -Sekretase codieren

und so Einfluss auf die Interaktion mit APP nehmen (Kent et al., 2020). Für die Ausbildung einer LOAD zeigen sich ebenfalls genetische Risikofaktoren. Genomweite Assoziationsstudien haben über 70 Genloci identifiziert die mit einem erhöhten AD-Erkrankungsrisiko einher gehen. Die stärkste Korrelation eine AD zu entwickeln, weist hier insbesondere das Apolipoprotein E4 (APOE- ϵ 4) auf (Bellenguez et al., 2022). Die Ursachen der LOAD sind bisher ungeklärt, jedoch geht man von einem komplexen Zusammenspiel unterschiedlicher Risikofaktoren aus. Den stärksten Risikofaktor stellt das steigende Lebensalter dar. Das weibliche Geschlecht ist ebenfalls mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert, Ursachen werden bisher in soziokulturellen und biologischen Unterschieden (Keyvani et al., 2018; Nebel et al., 2018) vermutet. Neben diesen nicht modifizierbaren Risikofaktoren ist die AD mit zahlreichen Lebensstil-assoziierten Risikofaktoren vergesellschaftet. So steigern unter anderem kardiovaskuläre Risikofaktoren (Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas, Bewegungsmangel, Alkohol-/Nikotinoxzess), ein niedriger Bildungsstatus, Depression und Umwelteinflüsse das Risiko an einer AD zu erkranken (Livingston et al., 2020).

1.1.4 Pathogenese

Die Pathogenese der AD ist komplex und bis dato nicht hinreichend geklärt. Hauptmerkmale sind die Amyloid- und die Tau-Pathologie, neuroinflammatorische Prozesse und Neuroplastizitätsdefizite, die letztendlich zu strukturellen neurodegenerativen Veränderungen führen (2023 Alzheimer's disease facts and figures, 2023).

Amyloidpathologie und Neuroinflammation

Eines der Kennzeichen der AD ist die pathologische Akkumulation von neurotoxischen A β -Oligomeren und extrazelluläre A β -Plaque-Formation. Im Zuge der AD kommt es durch die vorrangig amyloide Prozessierung des APP durch die β - und γ -Sekretase im Gegensatz zur nicht-amyloiden Prozessierung durch die α - und γ -Sekretase, zu erhöhter Produktion toxischer, zu Aggregation neigender A β -Oligomere. Gleichzeitig steigern Einschränkungen und Schädigungen der neurovaskulären Einheit und des lymphatischen Systems durch mangelnde Bereinigung ebenfalls die pathologische Akkumulation von A β und fördern die extrazelluläre Plaque-Formation (Kent et al., 2020;

Scheltens et al., 2021). Diese Plaques bilden ein für die AD typisches zentrales neuropathologisches Hauptmerkmal und wurden für die Diagnostik nach CERAD-Kriterien (*consortium to establish a registry for alzheimer's disease*) genutzt (Mirra et al., 1991). Durch Ansammlung amyloider Spaltprodukte und toxische Schädigung der Neurone kommt es zur Aktivierung der Mikroglia, den Immunzellen des zentralen Nervensystems (ZNS). Diese tragen in ihrer Funktion durch Phagozytose zur Beseitigung der Amyloidablagerungen bei. Zudem aggravieren sie durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie dem Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin 1- β (IL-1- β) das chronischen-inflammatorischen Umgebungsmilieu. In dessen Folge kommt es zu mikroglialer Dysfunktion und mit Mobilisierung zytotoxischer Mikroglia zur Schädigung der Neurone, was den neuronalen Zelluntergang weiter fördert (Ising et al., 2019; Scheltens et al., 2021). Zusätzlich kommt es im Verlauf zu einer Astrozytenaktivierung, welche wiederum die amyloide Prozessierung und die Hyperphosphorylierung von Tau stimulieren (Bellaver et al., 2023).

Tau-Pathologie

Das zytoskelett-assoziierte Protein Tau erfüllt zahlreiche Aufgaben im zentralen Nervensystem. Von besonderer Bedeutung sind dabei seine physiologische Rolle in der Stabilisation der Mikrotubuli durch Bindung an Tubulin und damit Bewahrung des mikrotubulären Apparates vor plötzlicher Desintegration der Mikrotubuli aus ihrem Verband. Zudem reguliert Tau die Mikrotubuli-Dynamik und bewahrt sie durch Bindung an Katanin und Tubulin vor vorzeitigem Abbau. Von zentraler Bedeutung ist ebenfalls die Rolle von Tau als Regulator des axonalen Transportes, sowohl anterograd über Kinesin, als auch retrograd über Dynein. Dabei hält Tau also Regulatorprotein des Zytoskeletts eine zentrale Stellung bei der Synapsenformation und, als axonaler Stabilisator, bei der strukturellen neuronalen Plastizität. Zusätzlich schützt Tau die Desoxy-Ribonucleinsäure (Desoxyribonucleoidacid, DNA) vor oxidativem Stress (Kent et al., 2020; Tapia-Rojas et al., 2019). Kommt es, wie im Rahmen der AD, zu einer vermehrten Phosphorylierung des Taus, so neigt es zur Aggregation zunächst in Fibrillen (*paired helical filaments*, PHF) und später in neurofibrillären Bündeln (*neurofibrillary tangles*, NFTs). NFTs bilden das zweite neuropathologische Hauptmerkmal der AD und ihre Intensität und Distribution werden diagnostisch nach Braak eingeteilt (Braak and

Braak, 1991). Durch den Verlust der axonalen Stabilität kommt es nicht nur zur plastischen Veränderungen im Zytoskelett mit gestörter Zellarchitektur, sondern auch zum Erliegen des intrazellulären Transportes. Mangelnde Nährstoffversorgung und fehlender Abtransport von Metaboliten können die mitochondriale Funktion einschränken und fördern weiteren Synapsenverlust und Zelluntergang (Kent et al., 2020; Kopeikina et al., 2011).

Veränderungen der Neuroplastizität

Neuroplastizität ist die Grundvoraussetzung für lebenslanges Lernen und Kognition sowie für das Überleben als essenzieller Mechanismus zur Anpassung an die Umwelt (Humeau and Choquet, 2019). Der Begriff der Neuroplastizität beschreibt die Fähigkeit der neuronalen Netzwerke dynamisch in ihrer Konformität auf verschiedenste Stimuli reagieren zu können. Dem liegen unterschiedliche Mechanismen zugrunde, welche durch innere und äußere Einflüsse reguliert werden und in strukturelle und funktionelle Prozesse unterteilt werden können (Weerasinghe-Mudiyanselage et al., 2022). Die strukturelle Neuroplastizität umfasst verschiedene Aspekte der Neuronen Morphologie, darunter die Expansion und Retraktion von Dendriten, die Veränderungen der dendritischen Verzweigungsrate, die Modifikationen in ihrer dendritischen Komplexität sowie die Veränderungen in Dichte und Form synaptischer Dornfortsätze (Spines). Darüber hinaus spielt die hippocampale Neurogenese eine entscheidende Rolle bei der strukturellen Anpassung des Gehirns. Funktionelle Neuroplastizität beinhaltet die aktivitätsabhängige Regulation und Ausschüttung von Neurotransmittern, Veränderungen in der Rezeptorlandschaft der Synapsen, Modifikationen in der Exzitabilität von Neuronen sowie die Prozesse der Langzeit-Potenzierung (LTP) und Langzeit-Depression (Weerasinghe-Mudiyanselage et al., 2022).

Ein genauerer Blick auf die strukturelle Neuroplastizität erlaubt die Charakterisierung entscheidender, quantifizierbarer Parameter, wie den Spines und der dendritischen Komplexität. Spines sind mikroskopisch kleine, dornenförmige (*spine*), aktinreiche Membranausstülpungen auf neuronalen Dendriten, welche aktivitätsabhängig in Dichte und Form verändert werden. Ihnen kommt eine essenzielle Rolle bei der exzitatorischen postsynaptischen Signaltransmission zu (Knobloch and Mansuy, 2008). Die Dendritenlänge, Dendritenverzweigung und dendritische Komplexität sind messbare

definierende Aspekte der strukturellen Neuroplastizität. Diese Merkmale beeinflussen die Fähigkeit von Neuronen, Signale effizient übertragen und integrieren zu können (Weerasinghe-Mudiyanselage et al., 2022).

Im Kontext der AD zeigt sich die Neuroplastizität sowohl quantitativ als auch qualitativ beeinträchtigt. Alterationen zeigen sich insbesondere im Hippocampus zunächst in der *Cornu Ammonis Region 1* (CA1), gefolgt vom *Subiculum*, der CA2 und CA3 Region sowie dem *Gyrus dentatus* (Weerasinghe-Mudiyanselage et al., 2022). Quantitativ führt die AD unter anderem durch Akkumulation toxischer Aggregate und synaptischer Degradation durch aktivierte Mikroglia zu Synapsen- und Neuronenverlust. Zudem werden aufgrund gestörter hippocampaler Neurogenese weniger neue Neurone ausgebildet (Moreno-Jiménez et al., 2019). Qualitative Veränderungen durch die AD betreffen, neben geringerer cholinergischer Rezeptordichte und erhöhter NMDA-Rezeptordichte auf der funktionellen Seite, die strukturelle Neuroplastizität bei der neurodegenerativen Erkrankung im besonderen Maße. Dendritische Abnormalitäten und synaptische Dysfunktion sind häufig und treten früh bei AD Patient*innen auf. So ist die Dichte dendritischer Dornfortsätze bei AD Erkrankten Menschen und im Mausmodell herabgesetzt. Ebenso sind sowohl die Dendritenlänge als auch die dendritische Verzweigungsrate, bei AD Patient*innen und im Mausmodell geringer ausgeprägt (Knobloch and Mansuy, 2008; Spires-Jones and Knafo, 2012; Weerasinghe-Mudiyanselage et al., 2022). Diese qualitativen Veränderungen in der strukturellen Neuroplastizität können durch synaptischen Verlust zu kognitiven, für die AD charakteristischen Beeinträchtigungen führen und korrelieren stark mit dem klinischen Ausprägungsgrad (Tzioras et al., 2023; Weerasinghe-Mudiyanselage et al., 2022).

1.1.5 Diagnostik und Therapie

Die definitive Diagnose der AD kann bis heute nur *post mortem* nach neuropathologischen Kriterien (z. B. CERAD und Braak) gestellt werden. Klinisch kommen neben passender Anamnese neuropsychologische Tests, wie die *mini mental state examination* (MMSE) und der DemTec®, infrage. Zudem können liquorbasierte (*cerebrospinal fluid*, CSF) Biomarker wie verminderte Konzentrationen des A β 42-Peptids oder erhöhte Konzentrationen von Gesamt-Tau (*total Tau*, t-Tau) und phosphoryliertem-Tau (*phospho-Tau*, p-Tau) wegweisend sein. Plasmabasierte Biomarker konnten sich wegen mangelnder diagnostischer Sicherheit bisher nicht

durchsetzen. Bildgebende Verfahren kommen zum Ausschluss von anderen Ursachen (vaskulärer, neoplastischer oder entzündlicher Genese) zum Einsatz und können Zeichen der Neurodegeneration wie Hippocampusatrophie in der Magnetresonanztomographie (MRT) oder des kortikalen Hypometabolismus in der Fluor-Desoxy-Glucose-Positronenemissionstomographie (FDG-PET) aufzeigen. Molekulare Bildgebungsverfahren sind bereits in der Lage Amyloid- (z.B. durch Amyloid-PET) oder Tauablagerungen zu visualisieren, jedoch mit niedriger Spezifität und nur in spezialisierten Zentren (Deuschl, 2016; Scheltens et al., 2021). Zudem gibt es durch Polygene-Risiko-Scores die Möglichkeit das individuelle Erkrankungsrisiko zu berechnen (Bellenguez et al., 2022). Trotz dieser vielfältigen Optionen gibt es *bis dato* nur limitierte Möglichkeiten frühe Stadien der AD zuverlässig, wenig invasiv und kosteneffizient zu diagnostizieren.

Therapeutisch sind in Deutschland aktuell nur sogenannte Neuro-Enhancer zugelassen. Insbesondere Acetylcholinesterase-Inhibitoren wie Donepezil, Rivastigmin und Galantamin sollen das cholinerge Defizit ausgleichen und werden durch den NMDA-Antagonisten Memantin ergänzt. Große Bedeutung kommt einem multimodalen Therapiekonzept, unter Einbezug von kognitiver Stimulation, Ergotherapie und Physiotherapie zum Ausgleich motorischer Defizite, Verbesserung der Alltagskompetenz und zur Förderung der Teilhabe an der Gesellschaft, zu (Deuschl, 2016). Im Jahr 2021 reformierte die beschleunigte Zulassung des monoklonalen anti-Amyloid-Antikörpers Aducanumab durch die *US Food and Drug Administration* (FDA) die Therapielandschaft der AD. Mangelnde Testung in fortgeschrittenen Stadien der AD, Sicherheitsbedenken und unzureichende Beweise des klinischen Nutzens machten die FDA-Zulassung zu einer der umstrittensten Entscheidungen in der aktuellen pharmazeutischen Geschichte (Rabinovici, 2021). 2022 wurde Aducanumab durch den anti-Amyloid-Antikörper Lecanemab ergänzt (van Dyck et al., 2023). Neben unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie Kopfschmerzen, Unverträglichkeitsreaktionen, Abnormalitäten in der Bildgebung und des auf frühe Stadien der AD limitierten Einsatzbereiches, adressieren anti-Amyloid-Antikörper nur eines von vielen Hauptmerkmalen der AD (2023 Alzheimer's disease facts and figures, 2023; Rabinovici, 2021). Zudem gehen rezente Analysen von einem inadäquaten Kosten-Nutzen-Verhältnis aus (Ross et al., 2022; Whittington et al., 2022). Auch therapeutische Ansätze mit dem

Zielmolekül Tau oder Immuntherapien wie der CD20-Antikörper Rituximab erwiesen sich bisher als nicht wegweisend (Scheltens et al., 2021).

Nach Dekaden intensiver Forschung, die praktisch ausschließlich auf die A β - und Tau-Pathologie fokussiert war steht uns bis heute keine wirksame pharmazeutisch-therapeutische Strategie zur Verfügung (2023 Alzheimer's disease facts and figures, 2023; Rabinovici, 2021; Scheltens et al., 2021). Entsprechend besteht, in Anbetracht der kommenden sozioökonomischen Herausforderungen, ein großer Bedarf für einen effektiv krankheitsmodifizierenden therapeutischen Ansatz. Die Identifikation und Entwicklung neuer Zielmoleküle zur Diagnostik und Therapie der AD, welche die facettenreiche, komplexe Pathogenese der AD widerspiegeln und weiter entschlüsseln, sind von eklatanter Wichtigkeit und eine der größten medizinischen Herausforderungen unserer Zeit.

1.2 Kallikrein 8

1.2.1 Physiologische Funktion

Kallikrein 8 (KLK8, alias Neuropsin) ist eine plastizitätsmodulierende Serinprotease aus der Familie der Gewebskallikreine. Diese besteht aus 15 bisher bekannten Isoformen, die sich in ihrer Funktion und ihrem Vorkommen in verschiedenen Geweben unterscheiden. Kallikrein 8 ist hauptsächlich zerebral, hier vor allem im limbischen System ausgeprägt und nimmt eine zentrale Funktion in der Regulation der hippocampalen Neuroplastizität ein (Debela et al., 2018; Mella et al., 2020). So kann KLK8 durch Prozessierung von Proteinen wie dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül 1 (L1-CAM), dem extrazellulären Matrixprotein Fibronectin, dem Protein Neuroregulin-1 (NRG1) und dem Ephrin-B2-Rezeptor (EphB2-Rezeptor) vielfältig auf die strukturelle und funktionelle Neuroplastizität einwirken. Damit kommt KLK8 eine zentrale Rolle in der Regulation von Gedächtnisprozessen, Lernen und Kognition zu (Attwood et al., 2011; Matsumoto-Miyai et al., 2003; Shimizu et al., 1998; Tamura et al., 2012). Funktionell beeinflusst KLK8 frühe (Tamura et al., 2006) und späte Phasen (Ishikawa et al., 2011) der Langzeitpotenzierung, kontrolliert die hippocampalen Gamma-Oszillationen und beeinflusst die synaptische Assoziativität (Ishikawa et al., 2008; Kawata et al., 2017). *In vitro* moduliert KLK8 zudem die Dendritenlänge, die dendritische Verzweigungsrate (Oka et al., 2002) und beeinflusst indirekt die Spine-Dynamik (Münster et al., 2020). Zu niedrige Konzentrationen der plastizitätsmodulierenden Protease können im Mausmodell zu strukturellen Defekten und verminderter hippocampus-assoziiertes Gedächtnisleistung und Kognition führen, was die zentrale Einbindung von KLK8 bei der Gedächtnisbildung unterstreicht (Hirata et al., 2001; Konar et al., 2018). *In vitro* zeigt eine KLK8-Inhibition erhöhte EphB2-Level, während ein KLK8-Exzess zu einer EphB2-Rezeptor-Depletion führt (Münster et al., 2020). Über die Herabregulation des EphB2-Rezeptors ist KLK8 zudem in der Lage, Einfluss auf die Struktur, Morphologie und Differenzierung von Pyramidenzellneuronen zu nehmen (Zhang et al., 2021). Zusätzlich steigert KLK8 die Ängstlichkeit im Mausmodell durch Interaktion mit dem EphB2-Rezeptor in der Amygdala (Attwood et al., 2011). Störungen der physiologischen KLK8-Funktion sind bereits in Zusammenhang mit Epilepsie (Momota et al., 1998), Depression (Terayama et al., 2005) und Multipler Sklerose (Chang et al., 2016) bekannt.

1.2.2 Kallikrein 8 im Kontext der Alzheimer-Krankheit

KLK8 ist im Hippocampus AD-Erkrankter 11,5-fach höher ausgeprägt als bei Gesunden und bereits in der präklinischen Phase der Erkrankung zeigt sich bei AD-Patient*innen und AD-erkrankten Mäusen auf mRNA-Ebene ein KLK8-Exzess mit nachfolgender Depletion des EphB2-Rezeptors (Herring et al., 2016; Shimizu-Okabe et al., 2001). Zudem zeigen Frauen und weibliche AD-erkrankte transgene Mäuse *per se* höhere KLK8-Level als ihre männliche Vergleichsgruppe. *In vitro* war β -Östradiol, nicht aber Dihydroxytestosteron in der Lage, KLK8 in differenzierten SH-SY5Y Neuroblastom-Zellen zu induzieren (Keyvani et al., 2018). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass bei einer Kohorte von 237 eingeschlossenen Patient*innen erhöhte KLK8-Level bei AD-Erkrankten eine gleichwertige, und bei MCI-Patient*innen im CSF und Plasma eine sensitivere diagnostische Leistung im Vergleich zu den etablierten Biomarkern wie A β 42, *total*-Tau und *phospho*-Tau aufweisen (Teuber-Hanselmann et al., 2020). Zudem ist nur bei MCI-Patient*innen mit amnestischer Komponente ein Zusammenhang mit erhöhten Plasmaspiegeln von KLK8 im Vergleich zu kognitiv gesunden Kontrollen zu beobachten (Schramm et al., 2021; Schramm et al., 2023).

Eine Inkubation primärer A β -produzierender Neurone mit KLK8 und einem anti-KLK8-Antikörper *in vitro* führte zu erhöhter dendritischer Komplexität und Somagröße. Zudem zeigte eine KLK8-Inhibition *in vitro* erhöhte t-Tau-Level, während relativ dazu erniedrigte p-Tau-Level verzeichnet wurden (Münster et al., 2020).

Eine 4-wöchige antikörpervermittelte Reduktion der zerebralen KLK8-Level in Alzheimer-ähnlich erkrankten transgenen Mäusen des *Center of Research for neurodegenerative diseases* (CRND8) zeigte multiple therapeutische Effekte wie eine Reduktion der Tau-Hyperphosphorylierung unter anderem an der Bindungsstelle Serin 396 (pSer396) und eine Verbesserung der strukturellen Plastizität. Dabei führte eine KLK8-Inhibition zur Steigerung der dendritischen Spine-Dichte im Frontalkortex, erhöhter dendritischer Komplexität bei höherer dendritischer Verzweigungsrate und Dendritenlänge sowie erhöhter Anzahl neuronaler proliferativer Vorläuferzellen. Zusätzlich wurde die A β -Belastung durch Inhibition der amyloiden Prozessierung vermindert und eine verbesserte Clearance durch Stärkung der neurovaskulären Einheit, der mikroglialen Phagozytose und Autophagie erreicht. Neben diesen molekularen Effekten zeigten sich auch klinische Verbesserungen nach KLK8-Inhibition durch eine

Erhöhung der kognitiven Leistung und reduziertes Angstverhalten in transgenen Tieren (Herring et al., 2016; Münster et al., 2020).

Bereits eine kurzfristige antikörpervermittelte Inhibition des KLK8-Exzesses in einem moderaten Krankheitsstadium zeigte bei transgenen CRND8-Mäusen beachtliche therapeutische Effekte nicht nur auf molekularer Ebene, sondern verbesserte ebenfalls die kognitive Leistung. Zudem weist die frühe, meist vor den ersten sichtbaren Amyloidablagerungen messbare KLK8-Erhöpfung auf eine kausale Rolle der Protease in der Pathophysiologie der AD hin. Diese Erkenntnisse lassen sowohl das diagnostische, als auch das therapeutische Potenzial von KLK8 erahnen. Unbekannt sind jedoch mögliche weitere molekulare Interaktionspartner des anti-KLK8-Antikörpers und längerfristige, über 4 Wochen hinausreichende Effekte.

Im Rahmen eines groß angelegten Projektes wurden nun die Hypothese der Schlüsselrolle von KLK8 in der Pathophysiologie der AD und des Nutzens von KLK8 als therapeutisches Zielmolekül überprüft. Dabei wurde durch einen neuen Ansatz mittels genetischem *Knockdown* die zerebrale Klk8-Expression um 50 % reduziert, wodurch die potenzielle Interaktion des KLK8-Antikörpers mit anderen Molekülen umgangen werden konnte. Untersucht wurden zahlreiche molekulare und ethologische Aspekte der AD-Pathologie. Dabei lag der Fokus meiner Doktorarbeit darauf, Auswirkungen dieser permanenten Klk8-Reduktion auf die strukturelle Neuroplastizität und den neuronalen Tau Metabolismus in primären Neuronen transgener Tiere zu untersuchen. Im folgenden Kapitel werden die hierbei relevanten Fragestellungen detailliert dargestellt.

2 FRAGESTELLUNGEN

- 1) Welche Auswirkungen hat der Klk8-Knockdown auf die hippocampale strukturelle Neuroplastizität in einem transgenen CRND8-Mausmodell der Alzheimer-Pathologie in weiblichen Tieren *in vivo*?
 - a) Welchen Effekt hat eine permanente Klk8-Reduktion auf die hippocampale Spine-Dichte pyramidaler Neurone weiblicher Tiere in der *Cornu ammonis Region 1* (CA1)?
 - b) Welchen Effekt hat eine permanente Klk8-Reduktion auf die hippocampale Dendritenlänge, Dendritenverzweigung und dendritische Komplexität pyramidaler Neurone weiblicher Tiere in der *Cornu ammonis Region 1* (CA1)?

- 2) Welche Auswirkungen hat der Klk8-Knockdown auf den Tau Metabolismus in primären Neuronen, gewonnen aus dem Gehirn der TgCRND8-Maus *in vitro*?
 - a) Welchen Effekt hat eine permanente Klk8-Reduktion auf die Expression von Tau (Tau-5) in primären Neuronen transgener Tiere mit und ohne permanente Klk8-Reduktion?
 - b) Welchen Effekt hat eine permanente Klk8-Reduktion auf die Expression von phosphoryliertem Tau (pSer396) in primären Neuronen transgener Tiere mit und ohne permanente Klk8-Reduktion?
 - c) Welchen Effekt hat eine permanente Klk8-Reduktion auf die Relation von Tau (Tau-5) zu phosphoryliertem Tau (pSer396) in primären Neuronen transgener Tiere mit und ohne permanente Klk8-Reduktion?

3 MATERIAL UND METHODEN

Die hier erhobenen Daten wurden verblindet generiert, d.h. dem Untersucher waren weder Genotyp noch Geschlecht des zu untersuchenden Tieres bekannt.

Die Arbeitsschritte 3.1 bis 3.3.1. sowie 3.4.1. und 3.4.2. wurden durch andere Mitglieder der Arbeitsgruppe am Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Essen durchgeführt und stellen keinen praktischen Anteil der hier vorliegenden Doktorarbeit dar. Jedoch bilden sie als notwendige Vorarbeiten das unumgängliche Fundament für die hier erfolgten Analysen.

Die Datenerhebung zu 3.3.2. - Bestimmung der neuronalen Plastizität in einem transgenen Klk8-Knockdown in vivo - wurde in Zusammenarbeit mit einer Masterstudentin der Arbeitsgruppe durchgeführt. Analysiert wurden von mir nach Entblindung die weiblichen Tiere, während die männlichen Tiere von meiner Kollegin im Rahmen ihrer Masterarbeit analysiert wurden.

Die Arbeitsschritte 3.4.3.- Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry, 3.5.- Analyse des Tau Metabolismus in transgenen Tieren via Western Blot in vitro - sowie 3.6.- Statistik, wurden im Rahmen dieser Arbeit eigenständig durchgeführt.

Zur besseren Lesbarkeit sind Herstellerangaben dem Chemikalienverzeichnis (9.3) im Anhang zu entnehmen. Geräte, Materialien und Software wurden im Text erwähnt und sind alphabetisch im Verzeichnis Geräte, Material und Software (9.4) gelistet.

3.1 Tiermodell

Zur Generierung eines heterozygoten *Knockdown* (KD) für murines Klk8 (*mKlk8+/-*) bei einer Alzheimer-ähnlichen Pathologie wurden zum einen transgene Mäuse (Tg) des *Center of Research for Neurodegenerative Diseases* (CRND8) Mausmodells (TgCRND8) genutzt, welche ebendiese Alzheimer-ähnliche Pathologie ausbilden, und zum anderen Mäuse mit einem homozygoten *Knockout* (Klk8-KO) für murines Klk8 (*mKlk8-/-*). Zunächst wurde der heterozygote *mKlk8*-KD generiert (Vgl. Abbildung 1; A), indem Klk8-KO Mäuse mit dem C3H/HeJ-Stamm (Hintergrund der TgCRND8 Mäuse) gekreuzt wurden. Die hier entstandene Knockdown-Maus bildete zusammen mit der TgCRND8 Maus die Parentalgeneration (Vgl. Abbildung 1, B), aus der nach Verpaarung die 4 unterschiedlichen Gruppen der Experimentaltiergeneration hervorgingen. Im folgenden Abschnitt werden die Verpaarungen sowie die Eigenschaften und Besonderheiten der unterschiedlichen Mausstämme und Experimentaltiergruppen genauer erläutert. Für ein genaues Kreuzungsschema siehe Abbildung 1.

3.1.1 Gründerstämme

TgCRND8

In dieser Studie wurden transgene Tiere des CRND8 Mausmodells als Stamm für Alzheimer-ähnlich erkrankte Tiere genutzt (Tanz Center for Research in Neurodegenerative Diseases, Toronto, Kanada).

Auslöser dieser Alzheimer-ähnlichen Erkrankung ist eine Doppelmutation im humanen Amyloid Vorläuferprotein 695 (*human amyloid precursor protein- hAPP 695*), welche hemizygot getragen (*hAPP+/-*) durch die Mutationen *Swedish* (KM670/671 NL) oder *Swedish* und *Indiana* (KM670/671 NL + V717F) ausgelöst, und durch den spezifischen Prionen Protein Promotor (PrP) des syrischen Hamsters kontrolliert wird. Die Basis für das transgene Mausmodell bildet der hybride Hintergrundstamm C57BL/6-C3H/HeJ, welcher zugleich als nicht-transgene Kontrolle in dieser Studie dient. Hauptmerkmal der TgCRND8 Tiere ist die hemizygot Überexpression des *hAPP 695*, was mit einer vermehrten amyloiden Prozessierung einhergeht und somit bereits vergleichsweise früh zur klinischen Ausprägung einer Alzheimer-ähnlichen Pathologie führt.

Bereits zum postnatalen Tag 65 (P65) lassen sich bei einigen Tieren, und ab P90 bei allen Tieren Thioflavin S-positive Amyloidablagerungen feststellen, welche mit fortschreitendem Alter zunehmen. Zudem ist mit 11 Wochen (P77) das räumliche Orientierungsvermögen der TgCRND8 Mäuse im *Water Maze Test* signifikant schlechter als bei gleichaltrigen nicht transgenen Artgenossen (Chishti et al., 2001). Ab 7 Monaten lässt sich vermehrt hyperphosphoreliertes Tau (*phospho-Tau*) nachweisen, jedoch kommt es zu keinem Zeitpunkt zur Bildung neurofibrillärer Bündel (Bellucci et al., 2007).

Kallikrein-8-Knockout Mäuse (Klk8 -KO)

Tiere dieses Stammes wurden genutzt, um einen heterozygoten Knockdown für Klk8 zu generieren (B6.129P2-Klk8 ^{tm1Shio}, RIKEN BioResource Research Center, Tsukuba, Japan). Klk8-KO Mäuse sind homozygot ausgeknockt für murines Klk8 (*mKlk8*^{-/-}) auf Basis des C57BL/6J Hintergrundstammes. Sie zeigen weder Einschränkungen in der Überlebensfähigkeit noch Fertilität (Herring et al., 2021). Allerdings zeigen sie morphologische Auffälligkeiten im Hippocampus, wie vergrößerte Pyramidenzellsomata, vermehrt Parvalbumin-positive Zellen sowie eine geringere Dichte der Synapsen. Dies führt unter anderem zu einer Störung der Langzeitpotenzierung und Einschränkungen der Hippocampus-assoziierten Gedächtnisleistung (Hirata et al., 2001).

3.1.2 Knockdown Generierung

Zunächst wurden Klk8-KO Mäuse (*mKlk8*^{-/-}) mit nicht-transgenen, für Klk8 wildtypischen (*mKlk8*^{+/+}) C3H/HeJ Tieren verpaart (Vgl. Abbildung 1;A).

Diese Mausgeneration, mit einer dauerhaft reduzierten zerebralen Klk8 Expression (-50 %) auf Basis desselben hybriden Hintergrundstammes (C57BL/6-C3H/HeJ) wie die TgCRND8 Mäuse, hier im Weiteren bezeichnet als Klk8-Knockdown (Klk8-KD) Mäuse (*mKlk8*^{+/-}), zeigte weder eine von den Elterntieren abweichende Pathologie noch eine verkürzte Überlebenszeit (Herring et al., 2021). Gemeinsam mit der TgCRND8-Maus bildete die Klk8-KD Maus die Parentalgeneration aus der die Experimentaltiere hervorgingen (Vgl. Abbildung 1; B).

3.1.3 Experimentaltiergeneration

Zur Generierung der Experimentaltiergeneration wurden im nächsten Schritt 10 Klk8-Knockdown Weibchen (*mKlk8+/-*) mit 10 männlichen TgCRND8 (*hAPP+/-*) Mäusen verpaart. Aus dieser Verpaarung entstanden die folgenden Genotypen der Experimentaltiergeneration (Vgl. Abbildung 1; C):

(a) *hAPP +/-, mKlk8+/+*

- Transgene, Alzheimer-ähnlich erkrankte Tiere ohne eine permanente Klk8-Reduktion, die Klk8-Spiegel sind (pathologiebedingt) höher als bei Wildtyp Tieren.

(b) *hAPP +/-, mKlk8+/-*

- Transgene, Alzheimer-ähnlich erkrankte Tiere mit einer permanenten Reduktion der zerebralen Klk8 Expression um 50%, Klk8-Knockdown.

(c) *hAPP -/-, mKlk8+/+*

- Nicht-transgene Tiere ohne permanente Klk8 Suppression, Wildtyp-Tiere.

(d) *hAPP -/-, mKlk8+/-*

- Nicht-transgene Tiere mit einer permanenten Reduktion der zerebralen Klk8 Expression um 50%, Wildtyp-Tiere mit Klk8-Knockdown.

Tiere der Experimentaltiergeneration, unabhängig vom Genotyp, zeigten keine zusätzlichen Pathologien und waren normal lebensfähig. Der allgemeine Gesundheitsstatus war nicht eingeschränkt, was durch die Arbeitsgruppe anhand von Überlebenszeitkurven und Gewichtsverläufen dokumentiert wurde (Herring et al., 2021). Die experimentellen Gruppen wurden randomisiert und zu gleichen Teilen aus allen 10 Verpaarungen zusammengesetzt, um ein potenzielles Bias im Verhaltensphänotyp aufgrund des parental Genotyps zu minimieren.

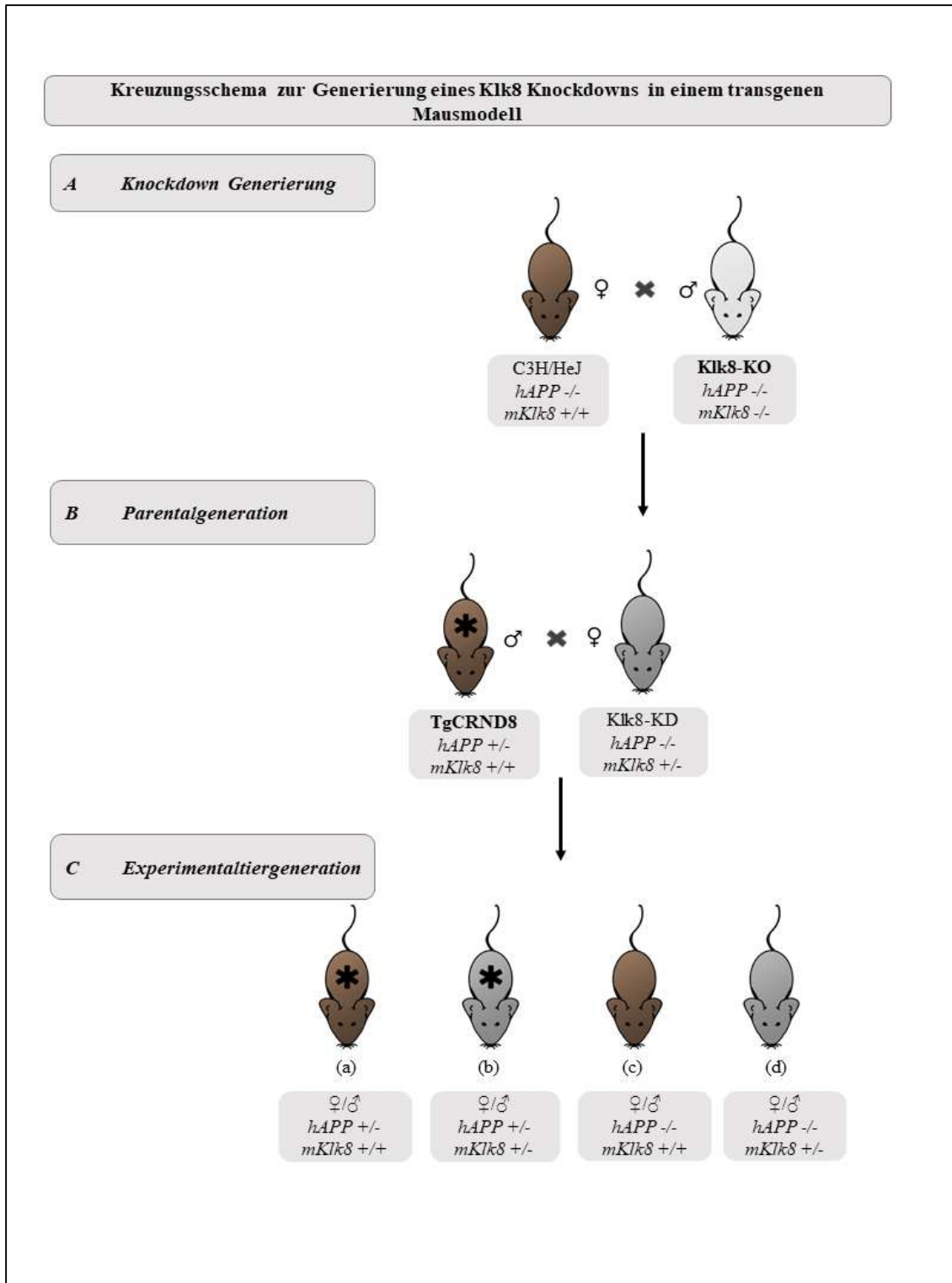


Abbildung 1: Kreuzungsschema transgener Klk8-Knockdown

Darstellung des Genotyps. Transgene Mäuse wurden mit einem Stern (*) dargestellt. *Weiß-* homozygot für Klk8 ($mKlk8^{-/-}$); *grau-* heterozygot für Klk8 ($mKlk8^{+/-}$); *braun-* physiologische/pathologische Klk8 (Über-) Expression ($mKlk8^{+/+}$). Die Gründergenerationen (Klk8-KO, TgCRND8) wurde fett markiert. ♀: weibliche Tiere, ♂: männliche Tiere.

3.2 Tierhaltung

Die Haltung der Tiere erfolgte im zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen, Hufelandstraße 55, 45147 Essen.

3.2.1 Haltungsbedingungen

Bis zum 30. postnatalen Tag (P30) wurden alle Tiere mit ihren Muttertieren unter Standard-Haltungs-Bedingungen (SH) in Polykarbonat-Käfigen Typ Makrolon III (37,5 cm x 21,5 cm x 15 cm) gehalten. Dabei wurde ein strenger 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus eingehalten. Die Umgebungstemperatur betrug stets 22 +/- 2 °C und die Luftfeuchtigkeit betrug 45 +/- 10 %. An P30 wurde mittels konventioneller PCR der *hAPP*-, der *mKlk8*-Status sowie das Geschlecht über die *murine sex determining region Y (mSry)* erfasst. Ab P30 erfolgte die Haltung in geschlechtsgleichen Gruppen, getrennt vom Muttertier mit jeweils 3-4 Individuen, ebenfalls in Makrolon Typ III Käfigen unter SH-Bedingungen. Wasser und Futter waren zu jeder Zeit *ad libitum* verfügbar.

3.2.2 Verhaltensphänotypisierung

Zur Verhaltensphänotypisierung wurden alle Gruppen zunächst über 7 Tage an einen invertierten Tag- und Nacht-Rhythmus gewöhnt. Die Phänotypisierung erfolgte zwischen P214-216. An Tag P214 wurde mittels *Elevated Plus Maze Test* (EPM) das Angstverhalten der Tiere getestet (Pellow et al., 1985). An Tag P215 wurde im *Open Field* (OF) das Erkundungsverhalten, sowie die Grundaktivität der Mäuse bestimmt (Denenberg, 1969). Darauf folgte an Tag P216 der *Novel Object Test* (NOT), welcher Erinnerungsvermögen und Gedächtnisleistung der Tiere testete (Akkerman et al., 2012). Um Gerüche und Spuren zu eliminieren, wurde vor und nach jedem Test das Testfeld (EPM, OF, NOT) mit 70 % Ethanol gereinigt. In jedem Test wurde das Verhalten durch die Video Mot 3D Software (TSE, Version 7.0.1) automatisch registriert und aufgezeichnet. Hierbei wurden unter anderem die Aufenthaltsdauer, Bewegung und das Erkundungsverhalten der Tiere verfolgt und ausgewertet.

3.2.3 Behördliche Genehmigung und Haltungsrichtlinien

Die Haltung, Zucht, Euthanasie und Organentnahme aller in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurde unter Berücksichtigung geltender EU (EU Directive 2010/63/EU), sowie der *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments* (ARRIVE) Richtlinien durchgeführt. Eine Bewilligung des Landesamtes für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz (LANUV) des Landes Nordrhein-Westfalen lag unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2014.A488 vor.

3.3 Stereologie

3.3.1 Probengewinn und Gewebeaufbereitung für *in vivo* Analysen

Die Tötung der Tiere erfolgte in fortgeschrittenem Krankheitsalter an Tag P226. Dabei wurden die Tiere zunächst mit einem Gasgemisch aus Sauerstoff (O₂) und Kohlenstoffdioxid (CO₂) bei einer Flussrate von 1,8 l/min betäubt und nach schrittweisem Ersatz des Sauerstoffes mit CO₂ schließlich mit 100 %igem CO₂ getötet. Danach erfolgten die sofortige Dekapitation und Präparation der Gehirne. Hierzu wurden der Neokortex, der entorhinale Kortex sowie der Hippocampus einer Hemisphäre präpariert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur späteren Weiterverarbeitung für DNA, RNA und Proteinextraktion mittels TRIzol Reagenz bei -80 °C zwischengelagert. Hippocampi derselben Hemisphäre wurden in Golgi-Cox-Lösung (PK401-A, FD Rapid GolgiStain Kit, FD Technologies) gefärbt und im Anschluss in 150 µm dicke koronare Sektionen geschnitten. Diese koronaren Schnitte wurden im weiteren Verlauf zur morphometrischen Analyse der neuronalen Plastizität verwendet. Die andere, intakte Hemisphäre wurde in Formalin fixiert, und nach Aufbereitung in Paraffin in 10 µm großen koronaren Schnitten zur weiteren Analyse mittels Immunhistochemie verwendet.

3.3.2 Bestimmung der neuronalen Plastizität von weiblichen Tieren

Zur Ermittlung der strukturellen neuronalen Plastizität bei einem permanenten Klk8-Knockdown in weiblichen Tieren wurden 150 µm breite koronare Schnitte der Hippocampi aller 4 Genotypen in Golgi-Cox-Lösung gefärbt und morphometrisch analysiert.

Bestimmung der Dichte synaptischer Dornfortsätze in pyramidalen Neuronen der *Cornu ammonis* Region 1

Zunächst wurde die hippocampale Dichte der Spines (synaptische Dornfortsätze) von pyramidalen Neuronen der *Cornu ammonis* Region 1 (CA1) stereologisch mittels NeuroLucida 11 Software (MicroBrightField) am Mikroskop (Nikon 80i) bestimmt. Dabei wurde auf vier 20 µm langen Abschnitten pro Neuron die Anzahl der Spines in 1000facher Vergrößerung jeweils apikal-proximal, apikal-distal, basal-proximal und basal-distal erhoben. Ein proximaler Dendrit wurde ab der 1. Verzweigung definiert und ein distaler ab der 3. Verzweigung. Zur Verdeutlichung des Vorgangs siehe Abbildung 2, A1. Pro Tier wurden 10 pyramidale Neurone vermessen. Die Anzahl der Tiere nach Gruppen für die Spine Evaluation betrug dabei:

hAPP^{+/-}; *mKlk8*^{+/+} n= 9

hAPP^{+/-}; *mKlk8*^{+/-} n= 8

hAPP^{-/-}; *mKlk8*^{+/+} n= 7

hAPP^{-/-}; *mKlk8*^{+/-} n= 9

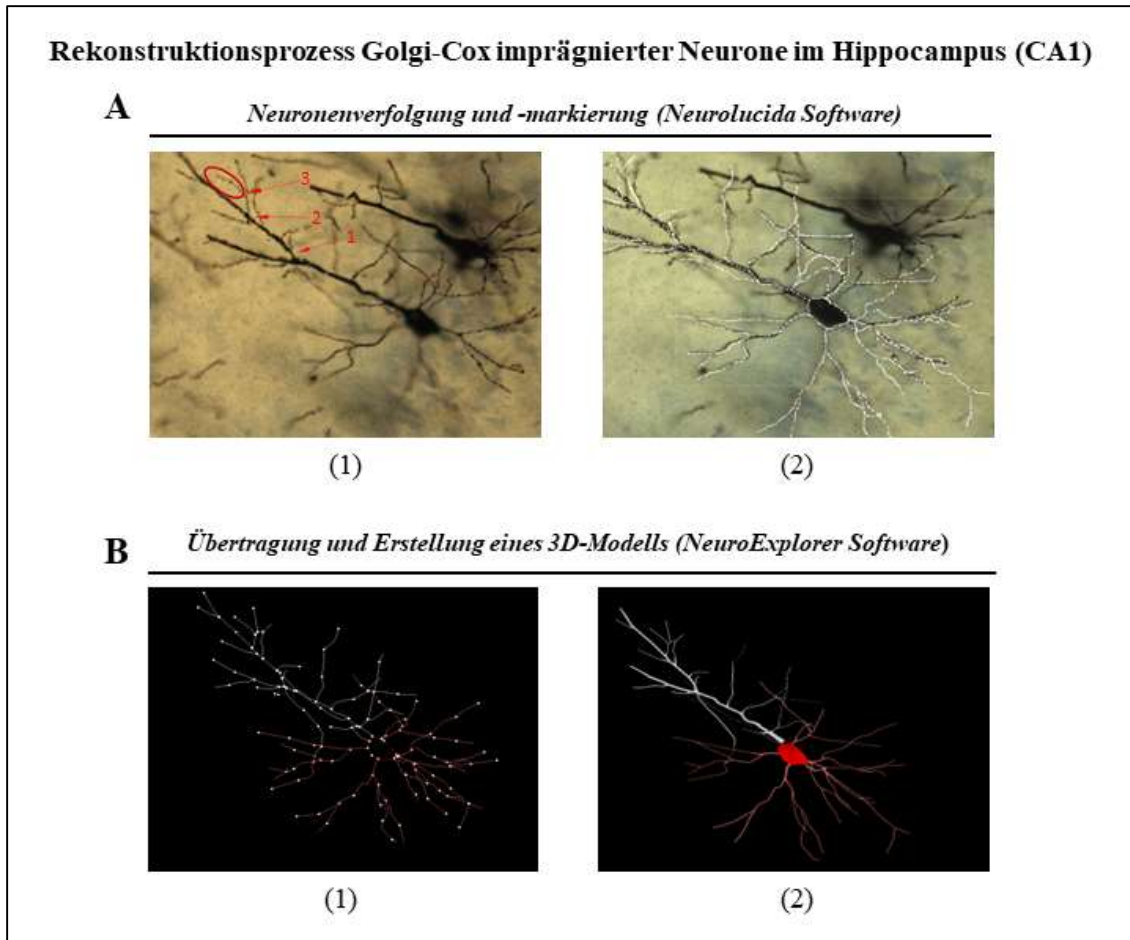


Abbildung 2: Rekonstruktionsprozess Golgi-Cox Neurone

(A) Mikroskopische Darstellung in 20facher Vergrößerung eines Golgi-Cox imprägnierten pyramidalen Neurons im Hippocampus (CA1). Exemplarische Darstellung der Neuronenverfolgung und Nachzeichnung mittels NeuroLucida Software. **(1)** Natives Neuron mit Pfeilmarkierung (rot) der 1., 2., und 3. Verzweigung und Umrandung (rot) eines apikal distalen Bereiches zur Spine Quantifizierung. **(2)** Natives Neuron mit Darstellung aller verfolgten Äste zur dreidimensionalen Rekonstruktion mittels NeuroLucida Software.

(B) Übertragung und dreidimensionale Rekonstruktion des Neurons mittels NeuroExplorer Software. **(1)** Darstellung des in NeuroLucida verfolgten Neurons in der NeuroExplorer Software **(2)** Dreidimensionale Darstellung des in NeuroLucida verfolgten Neurons. Apikaldendrit-weiß; Soma-rot; Basaldendriten-rosé

Neuronenrekonstruktion in pyramidalen Neuronen der *Cornu ammonis* Region 1

In einem zweiten Schritt wurden die hippocampalen Neurone der CA1 Region in 400facher Vergrößerung dreidimensional unter Verwendung der Neurolucida 11 Software nachgezeichnet (Vgl. Abbildung 2, A2), durch die NeuroExplorer Software (MicroBrightField) rekonstruiert (Vgl. Abbildung 2, B) und Parameter, wie die Dendritenlänge, die Dendritenverzweigung und die dendritische Komplexität analysiert. Die dendritische Komplexität ist eine arithmetische Größe und setzt sich wie folgt zusammen:

$$\frac{[\text{Summe der Endäste} + \text{Zahl der Endigungen}]}{x}$$

$$[\text{gesamte Dendritenlänge} / \text{Zahl der primären Dendriten}]$$

Endigungen wurden hier definiert als das Ende eines Dendriten und die Summe der Endäste wurde definiert als Summe der Tochterzweige eines aus dem Soma entsprossenen Dendriten. Die Rekonstruktion umfasste nicht nur die Verfolgung und Darstellung aller apikalen und basalen Dendriten und ihrer jeweiligen Tochterzweige einer Pyramidenzelle, sondern auch die Verfolgung der Äste in der Tiefe (Z-Ebene), welche eine dreidimensionale Darstellung und Analyse der Neurone ermöglichte. Pro Tier wurden 5 Neurone rekonstruiert. Die Anzahl der Tiere nach Gruppen betrug hierbei:

$$hAPP^{+/-}; mKlk8^{+/+} \quad n=8$$

$$hAPP^{+/-}; mKlk8^{+/-} \quad n=8$$

$$hAPP^{-/-}; mKlk8^{+/+} \quad n=5$$

$$hAPP^{-/-}; mKlk8^{+/-} \quad n=7$$

3.4 Probengewinn und Gewebeaufbereitung für *in vitro* Analysen

Zur Evaluation des Tau Metabolismus in transgenen Mäusen mit einem heterozygoten Klk8-Knockout wurden primäre Neurone aus neonatalen transgenen Mäusen gezüchtet, Proteinproben isoliert und genormt, die Gesamtproteinbeladung mittels Fluoreszenz-SDS-PAGE ermittelt und anschließend mittels Western Blot Methodik analysiert.

3.4.1 Zellkultur primärer Neurone

Zur Gewinnung der Proteinproben für die Untersuchung des Tau Metabolismus wurde zunächst eine Zellkultur zur Züchtung primärer Neurone angelegt. Hierzu wurden primäre Neurone aus den Neokortex transgener (*hAPP +/-*) neonataler (P0) Tiere beider Geschlechter, mit und ohne Klk8-Knockdown isoliert und in Neuronenmedium kultiviert. Genotyp und Geschlecht wurden vor der Präparation mittels PCR bestimmt. Für genaue Konzentrationen der verwendeten Medien siehe Tabelle 1.

Isolation primärer muriner Neurone

Nach Dekapitierung der Tiere wurde der Caput mit Ethanol (EtOH) übergossen und Haut, Knorpel und Knochen mit der Pinzette entfernt. Nach Freilegung des Cerebrums wurde dieses in eine Petrischale mit Präparierpuffer überführt. Anschließend wurden unter dem Binocular (Carl Zeiss) die beiden Hemisphären voneinander getrennt, Hirnstamm, Mittelhirn und Cerebellum entfernt und das Präparat von Meningen befreit, um einer Verunreinigung durch Fibroblasten in der Zellkultur vorzubeugen.

In jeder Hemisphäre wurden nun Hippocampus und Neokortex isoliert und in separate mit 1 ml Präparierpuffer befüllte Eppendorf Gefäße überführt. Der restliche Cortex wurde auf gleiche Weise für gliale Kulturen weiterverarbeitet, bildet jedoch keinen weiteren Bestandteil dieser Dissertation. Die Weiterverarbeitung erfolgte unter der Sterilbank (Haereus Bio Flow, HERAsafe®). Nach Absinken des Gewebes im Eppendorf Gefäß wurde der Präparierpuffer abgenommen und durch 1 ml (im Wasserbad für 5 min bei 37 °C vorgewärmte) Papainlösung ersetzt. Dieses Gemisch wurde für 20 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und anschließend durch 1 ml Gliamedium ersetzt. Nach erneuter Abnahme und Ersetzen des Gliamediums wurde es im 3. Durchgang mit 1 ml Ovomuroid ersetzt und mit der 1000 µl Pipette 10-15 x trituriert, um eine homogene Zellsuspension herzustellen. Diese Suspension wurde anschließend in, mit 5 ml Gliamedium bestückten, 15 ml Falcon-Röhrchen bei 800 Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*, rpm) für 10 min zentrifugiert (Haraeus Megafuge, Thermo Scientific Eppendorf AG). Zur Bestimmung der Zellzahl, wurde das Medium durch 1 ml Neuronenmedium ersetzt und die Zellen mittels Zellkammer (Neubauer Zellkammer, Brandt GmbH) ausgezählt.

Zellkultur

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 150 000 Zellen pro Well in 24-Well Platten (Nunclon™ Delta Surface, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) ausgesät. Nach initialem Mediumersatz nach 24. Im weiteren Verlauf wurden Poly-D-Lysin (PDL) beschichtete Platten verwendet. Um diese Beschichtung zu erzeugen, wurden 12-Well Platten (Cellstar®, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Oberösterreich) mit 700 µl/ Well sowie 24-Well Platten mit 400 µl/ Well für 30-60 min im Brutschrank inkubiert, anschließend mit der Vakuumpumpe (HLC, Oehmen) abgesaugt und 3x mit entsprechender Menge *Aqua destillata* (Aqua dest.) gereinigt. Nach 15 min Trocknung unter der Sterilbank wurden die Platten versiegelt und bei 4 °C aufbewahrt. Zur Quantifizierung des Zellüberlebens wurden 350 000 Zellen pro Well in PDL-beschichteten 24-Well Platten ausgesät und mittels XTT-Kit nach 1, 4, 7 und 14 Tagen *in vitro* (*days in vitro*, DIV), wobei DIV4 und DIV7 gepooled wurden, ausgewertet. Die Zellüberlebensraten dienen der Normierung sowie zur Evaluation der Gruppenunterschiede. Um den neuronalen Tau und Aβ-Metabolismus zu bestimmen, wurden 500 000 Zellen pro Well in PDL-beschichteten 12-Well Platten ausgesät und an DIV 1, DIV 4, DIV 8 und DIV 11 wurde jeweils die Hälfte des Mediums ersetzt. Dabei wurde der Überstand zum Zweck der Evaluation der Aβ42 Konzentrationen verwendet, was keinen Teil dieser Arbeit darstellt. An DIV 14 wurden die Zellen wie nachfolgend beschrieben mittels TRIzol-Reagenz lysiert. Hierbei wurden jeweils 3-4 Wells zusammengeführt.

Tabelle 1: Material Zellkultur primäre Neurone

Medium/ KIT	Zusammensetzung
Neuronenmedium	<u>50 ml Ansatz:</u> 48,5 ml Neurobasal A (mit 1% Glutamax versetzt) 1 ml B27 500 µl Penicillin-Streptomycin
Papainlösung	2 mg/ml Papain 40 µg/ml DNase (gelöst in Neurobasal A)
Ovomucoid	1 mg/ml Trypsininhibitor 50 µg/ml BSA 40 µg/ml DNase

	(gelöst in Neurobasal A)
Präparierpuffer	20 ml 0,6 % Glucose (6g Glucose in 100 ml (<i>Hank's balanced salt solution</i> , HBSS) 2 ml 10 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure) gelöst in 178 ml HBSS

3.4.2 RNA-, DNA- und Proteinextraktion mittels TRIzol Reagenz

Zunächst wurde jede Probe der Zellkultur, welche bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Eisschrank zwischengelagert wurden, aufgetaut und in je 1 ml TRIzol lysiert. Zur Verwendung kamen stets RNase-freie Pipettenspitzen sowie die RNaseZap-Solution zur Reinigung der Arbeitsfläche. Zur Kühlung der Proben wurde flüssiger Stickstoff und Trockeneis genutzt. Nach Zugabe von 200 μl Chloroform wurden die Proben für 5 Sekunden (s) durch den Vortexer (Vortex-Genie 2, Scientific Industries) gemischt und für 2-3 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Dann wurden die Proben für 15 min bei 13 000 rpm zentrifugiert und auf Eis zwischengelagert. Dabei erfolgte die Phasentrennung der Proben in eine obere, (RNA-haltige), eine intermediäre (DNA-haltige) und eine untere (Protein-haltige) Phase. Nach initialer Entnahme und Überführung der RNA-haltigen Phase in ein mit 500 μl TRIzol-Reagenz bestücktes Reaktionsgefäß, wurden die Eppendorf-Gefäße mit intermediärer und basaler Phase zur späteren Weiterverarbeitung kühl (max. $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht im Kühlschrank) gelagert.

Zur Aufreinigung der RNA wurden dem RNA-TRIzol-Gemisch 100 μl Chloroform hinzugegeben, erneut 5 s gevortext und 2 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben 15 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die nun aufgereinigte RNA gefällt. Dafür wurde die RNA extrahiert, indem zunächst 800 μl Isopropylalkohol zugegeben, für 10 min bei RT inkubiert und dann bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min bei 13 000 rpm zentrifugiert wurden. Nach Bildung des RNA-Pellets, wurde dieses 2x in 1 ml 80 % Ethanol (verdünnt mit DEPC- H_2O =Diethylpyrocarbonat-Wasser) gewaschen, indem die Proben bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ jeweils 5 min bei 13 000 rpm zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde abgetragen und verworfen. Die Pellets wurden getrocknet, dann erneut in 20 μl DEPC- H_2O gelöst und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur Weiterverarbeitung gelagert.

Zur Isolierung der DNA wurden die nach der RNA-Extraktion zwischengelagerten Proben verwendet. Das DNA-Pellet wurde durch Zugabe von 480 µl 100% EtOH (Ethanol), einer 2-minütigen Inkubation bei RT, sowie einer anschließenden 5-minütigen Zentrifugation bei 5 000 rpm bei 4 °C hergestellt. Der proteinreiche Überstand wurde entnommen und zur weiteren Verwendung in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Das DNA-Pellet wurde zur späteren Weiterverarbeitung bei – 80 °C gelagert.

Zur Proteinextraktion wurde der Überstand aus der DNA-Isolation verwendet. Zur Fällung der Proteine wurden 2,4 ml Isopropylalkohol hinzugefügt und, nach Inkubation bei RT über 10 min, für weitere 10 min bei 13000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Proteinpellet wurde dann, nach Entfernung des Überstandes 3x in 3,2 ml einer 0,3 M Guanidinhydrochloridlösung (s. Tabelle 2) gewaschen, indem das Pellet nach dem Schütteln für 20 min bei RT inkubiert wurde und anschließend für 5 min bei 10 000 rpm bei 4 °C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach vorsichtigem Abtupfen mit Zellstoff mit einer Kanüle zerkleinert und unter Aufsicht auf einem Heizblock mit einer Temperatur von 40 °C für ca. 10-15 min getrocknet. Anschließend wurde das Proteinpellet in 100 µl 1% SDS bei 40 °C auf dem Schüttler mit max. 900 rpm gelöst. Bei Sediment wurde der Überstand kurzzeitig abzentrifugiert und in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Abschließend konnten die nun aufgereinigten Proteinproben bei -80 °C bis zur späteren Weiterverarbeitung gelagert werden.

Tabelle 2: Lösungen zur Proteinextraktion

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
DEPC-H₂O	<u>500 ml Ansatz:</u> 500 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) 500 ml Aqua bidest
0,3 M Guanidinhydrochloridlösung (in 95%-EtOH)	<u>100 ml Ansatz:</u> 2,866 g Guanidin HCL 5 ml DEPC-H ₂ O 95 ml 100 % EtOH

3.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung der Proben wurde die Methode nach Lowry (Lowry et al., 1951) mittels DC Proteinessay Kit II (BioRad, München, BRD) angewandt. Hierbei wird nach einer 2-stufigen Reduktionsreaktion die Proteinkonzentration der Proben photometrisch bestimmt. Auf Basis der Biuret-Reaktion entsteht in alkalischer Lösung ein blauvioletter Kupfer(II)- Peptidkomplex, der anschließend durch Zugabe von Folin-Ciocalteu-Reagenz zu Molybdänblau reduziert wird. Danach wird photometrisch die Intensität der Blaufärbung ausgewertet, welche sich proportional zur vorhandenen Proteinmenge verhält und damit der Proteinquantifizierung der Proben dient. Alle Proben wurden im Triplikate bestimmt.

Hierbei wurde aus den mit 1% SDS versetzten Proben eine Verdünnungsreihe erstellt:

-V0: 5 µl Probe

-V5: 4 µl Probe + 16 µl 1% SDS

-V10: 2 µl Probe + 18 µl 1% SDS

-V20: 1 µl Probe + 19 µl 1% SDS

-V50: 1 µl Probe + 49 µl 1% SDS

Die Proben wurden in einer 96-Well Platte (Nunc™ MicroWell™ 96-Well Platte, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) mit 5 µl vorgelegt. Dann wurden 25 µl eines vorher hergestellten Gemisches aus Reagenz A und S, sowie 200 µl Reagenz B hinzugefügt und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 750 nm photometrisch mittels MultiskanFC (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA) ausgewertet.

Tabelle 3: Lösungen zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Lösungen und Materialien	Artikelnummer und Hersteller
Reagenz A	5000113, BioRAD, München
Reagenz B	5000114, BioRAD, München
Reagenz S	5000115, BioRAD, München
BSA Proteinstandard	5000007, BioRAD, München

3.5 Analyse Tau Metabolismus in transgenen Tieren via Western Blot *in vitro*

Zur Evaluation der Wirkung eines permanenten Klk8-Knockdowns auf die *total*-Tau und *phospho*-Tau Level der *in vitro* gezüchteten primären Neurone von ausschließlich transgenen Tieren, wurden die Proteine zunächst mittels Fluoreszenz-Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Fluoreszenz-SDS-PAGE) normiert, und anschließend mittels Western Blot Verfahren quantifiziert.

Es wurden 2 Gruppen unterschieden:

$$hAPP^{+/-}; mKlk8^{+/-} \quad n=7$$

$$hAPP^{+/-}; mKlk8^{+/+} \quad n=10$$

Jedes Gel wurde als Duplikat erstellt. Analysiert wurden 17 Proben.

In dieser Arbeit wurde zunächst via Western Blot die *total*-Tau Menge (Tau-5) bestimmt und anschließend nach Entfernung von Primär- und Sekundärantikörper mittels Membran-Stripping, *phospho*-Tau (*pSer396*) bestimmt. Alle erhobenen Daten der Einzelproteine wurden anhand der Gesamtproteinbeladung mittels Fluoreszenz SDS-PAGE normalisiert.

3.5.1 Fluoreszenz-SDS-PAGE

Die Fluoreszenz-SDS-PAGE dient der Proteinquantifizierung der gesamten Proteinbeladung einer Probe. Zunächst wurden die Fluoreszenz-Gele mittels TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit (s. 9.3. Chemikalienverzeichnis) den Angaben in Tabelle 4 entsprechend vorbereitet. Anschließend folgte die Probenvorbereitung durch Zugabe des Detergens SDS, welches die Proben durch Komplexbildung denaturiert und negativ lädt. Dann wurden die Proteine über eine Gelelektrophorese nach ihrer Molekülgröße und dem spezifischen Gewicht aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht aktiviert, wobei hier durch die Aktivierung der im Gel enthaltenen Trihalolverbindungen eine Verbindung zu dem in den Proteinen vorkommenden Tryptophan hergestellt wurde (Ladner et al., 2004). In der Dunkelkamera (ChemiDoc XRS, BioRad, München) wurde die Intensität der emittierten Signale aufgefangen, welche sich proportional zur Proteinmenge verhalten und densitometrisch mittels Image Lab 2.0 Software (BioRad, München) ausgewertet. Hierdurch wurde eine sehr genaue

Erfassung der Gesamtproteinbeladung ermöglicht, welche der Normalisierung der Proben der Zielproteine dienen.

3.5.2 Probenvorbereitung

Die Proteinkonzentration der Proben wurde bereits im Vorfeld mittels Lowry bestimmt. Zunächst wurden die bei -80 °C gelagerten Proben im Schüttler bei 40 °C aufgetaut. Anschließend wurden die Proben jeweils mit RIPA Lysepuffer und 5xSDS-Auftragspuffer (s. Tabelle 5) so verdünnt, dass jede Probe in 25 µl exakt 10 µg Protein enthielt. Danach wurden die Proben 5 min bei 95 °C im Schüttler inkubiert. Nach 5-minütiger Lagerung im Kühlschrank wurden die Proben bei 2 000 rpm 5 min zentrifugiert und konnten dann zum Auftragen verwendet, oder bei -20 °C gefroren zwischengelagert werden.

Tabelle 4: Lösungen und Puffer zur Fluoreszenz SDS-PAGE

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Sammelgel (4%)	1 ml Stacker A 1 ml Stacker B 15 µl 10% APS (5 g APS auf 50 ml mit Aqua dest.) 3 µl TEMED
Trenngel (10%)	3 ml Resolver A 3 ml Resolver B 45 µl 10% APS (5g APS auf 50ml mit Aqua dest.) 4,5 µl TEMED
10x SDS-Laufpuffer	<u>2 l Ansatz</u> 288 g Glycin 78 g Tris 38 g SDS Auffüllen mit Aqua dest. auf 2 l

Tabelle 5: Puffer zur Probenvorbereitung

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
RIPA Puffer	<u>100 ml Ansatz</u> 20 ml 50 mM Tris pH 8,0 3 ml 5M NaCl 1 ml NP-40 (Nonidet P40) 100 mg Deoxycholat 100 mg SDS 5 ml 100 mM EDTA 36 mg 1,10 Phenantroline 10 ml Natriumfluorid 44,6 mg Na-pyrophosphat 21,6 mg β -glycerophosphat 18,4 mg Na-orthovandate
RIPA Lysepuffer	494 μ l RIPA Puffer 5 μ l PMSF 0,5 μ l Protease Inhibitor Cocktail 0,5 μ l 1 M DTT <u>5 ml Ansatz– Lagerung 4 °C</u> 4,675 ml RIPA Puffer 0,325 ml 1M DTT 5 μ l Protease Inhibitor 50 μ l PMSF
Auftragspuffer (5xSDS)	<u>100 ml Ansatz:</u> 4 ml Aqua dest. 1 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,8 ml Glycerol 1,6 ml 10% SDS 0.4 ml β -Mercaptoethanol 0,4 ml Bromphenolblau

3.5.3 Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde die Methode der SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach Laemmli angewendet. Dabei wandern zuvor durch SDS denaturierte, negativ geladene Proteine rein aufgrund ihres Molekulargewichtes in unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Anlegen einer definierten Spannung zur Anode, was zu einer genauen Auftrennung der einzelnen Proteine führt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Proteine ist dabei

abhängig von der Porengröße des Gels. Das Polyacrylamidgel besteht üblicherweise aus 2 Phasen, zum einen dem Trenngel und zum anderen dem Sammelgel.

Es wurden 16,5 %ige Polyacrylamid Gele der Firma BioRAD verwendet. Zunächst wurde die Kammer mit 1x SDS Laufpuffer (s. Tabelle 6) gefüllt, die Taschen mit Aqua dest. gereinigt und anschließend die Proben Abbildung 3 entsprechend aufgetragen. Dann wurde die Elektrophorese bei 120 V für ca. 3 Stunden, bzw. bis die Lauffront das Gelende erreicht hatte, durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele von ihrem Träger getrennt und nach Entfernung der Taschen und des Sammelgels in Blotpuffer (s. Tabelle 6) für 15 min gewaschen.

<i>Tasche</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>mKlk8-Status</i> (Marker)		+/+	+/+	+/-	+/-	+/+	+/+	+/-	+/-	
<i>Geschlecht</i>				♀				♂		

Abbildung 3: Schematischer Gelauftrag

Schematische Darstellung eines Westernblotgels mit exemplarischen Gelauftrag zur Quantifizierung des neuronalen Tau Metabolismus in primären Neuronen. Genutzt wurden Proben transgener (*hAPP*^{+/-}) weiblicher (♀) und männlicher (♂) Tiere mit (*mKlk8*^{+/-}) und ohne Klk8-KD (*mKlk8*^{+/+}).

3.5.4 Blotting

Im nächsten Schritt wurden die nun aufgetrennten Proteine mittels Tank-Blot-Verfahren (Towbin et al., 1979) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Im Unterschied zur Gelelektrophorese verläuft die Spannung horizontal, um die Proteine auf die Nitrozellulosemembran zu übertragen. Dazu wurde das Gel in einem Blot-Sandwich bestehend aus 2 Schwämmen, 2 Filtern, dem Gel und der Nitrozellulosemembran in den Blot Tank eingesetzt, welcher mit Blotpuffer (4 °C) aufgefüllt wurde. Die Spannung betrug hier konstant 140 Volt und die Stromstärke konstant 0,25 mA, wobei hier unter ständigem Rühren mittels Magnetrührer für 1 Stunde geblottet wurde.

Nach Abschluss des Blottings wurde die nun mit Proteinen beladene Membran 5 min auf dem Schüttler in 1x TST (s. Tabelle 6) gewaschen und anschließend für 5 min in 1x Ponceau S (s. Tabelle 6) gefärbt. Durch das Anfärben wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht und es konnte der Erfolg der Elektrophorese und des Blottings kontrolliert

werden. Bei Erfolg wurde nun die gefärbte Membran auf Höhe von 58 kDA und 25 kDA geschnitten und durch mehrfaches Waschen mit 1xTST wieder entfärbt. Die genaue Schnitthöhe konnte anhand des zuvor aufgetragenen Markers abgeschätzt werden und wurde in diesem Fall gewählt, da neben Tau und *phospho*-Tau zwei weitere Proteine i.e. *APP-Full length (APP-FL)* und *C-terminales fragment β (CTF- β)* analysiert wurden, was jedoch in dieser Arbeit nicht weiter thematisiert wird.

Tabelle 6: Puffer Gelelektrophorese und Blotting

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
10x SDS Laufpuffer	<u>2 l Ansatz</u> 288 g Glycin 78 g Tris 38 g SDS Auffüllen mit Aqua dest. auf 2 l
Blotpuffer	<u>1 l Ansatz</u> 3,03 g Glycin 14,4 g Tris 200 ml Methanol Mit Aqua dest auf 1 l auffüllen
Ponceau S	<u>100 ml Ansatz</u> 0,5 g Ponceau S 1 ml Eisessig 98,5 ml Aqua dest.
10 x TST	<u>1 l Ansatz:</u> 100 ml Tris HCl, pH 7,6 300 ml NaCl 5 g Tween 20
5%-MMP in 1x TST	<u>500 ml Ansatz:</u> 25 g Skim Milk Powder (MMP) durch 1x TST auf 500 ml auffüllen

3.5.5 Immunmarkierung

Nach dem Zuschnitt wurden die Membranen in mit 5% Magermilchpulver (MMP) versetzten TST für 30 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Dies führt zu einer Blockade der unspezifischen Antikörperbindungsstellen auf der Membran. Die

Primärantikörper binden nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip hochspezifisch und proportional zur Proteinmenge an das zu detektierende Protein auf der Trägermembran. Die Inkubation in zuvor ausgetesteter Verdünnung durch das Blockierungsmedium erfolgte über Nacht (mind. 12 Stunden) bei 4 °C auf dem Schüttler. Für genaue Antikörperkonzentrationen siehe Tabelle 7. Nachdem der Primärantikörper abgenommen wurde, wurde die Membran 2x 10 min in 1x TST gewaschen und erneut für 30 min bei RT mit 5 % MMP-TST blockiert. Anschließend wurde der Sekundärantikörper, welcher mit einer Peroxidase konjugiert an den Primärantikörper bindet, hinzugegeben und für 1 Stunde bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran 3x 10 min in 1x TST gewaschen.

Tabelle 7: Primär- und Sekundärantikörper

Bezeichnung	Konzentration	Artikelnummer, Hersteller	Spezies (Wirt)	Spezies (Reaktivität)
Anti-Tau (Tau-5)	1:1000	210-241, Sigma Aldrich, Taufkirchen, BRD	Maus	Maus, Mensch, Schaf, Ratte
Anti-Mouse IgG	1:10000	A3682, Sigma Aldrich, Taufkirchen, BRD	Ziege	Maus
Phospho-Tau (pSer396)	1:1000	44-752G, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA	Hase	Maus, Mensch, Ratte
Anti-Rabbit- HRP (IgG)	1:10000	111-035-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. 872 West Baltimore Pike. West Grove, PA, US	Ziege	Hase

3.5.6 Immundetektion durch Chemolumineszenz

Durch die spezielle Konjugation des Sekundärantikörpers ist dieser in der Lage, bei Hinzugabe seines Substrates eine Chemolumineszenzreaktion zu katalysieren, wobei das

emittierte Licht proportional zum umgesetzten Substrat und somit proportional zur Proteinmenge auf der Membran ist.

In diesem Fall wird durch das ECL™ Kit (GE HealthCare, Chicago, IL, USA) Peroxidreagenz und Luminol hinzugegeben, welches von der am Sekundärantikörper gebundenen Peroxidase reduziert und durch das Luminol als Substrat zur Oxidation unter Emission von blauem Licht genutzt wird. Diese Reaktion wurde in einer speziellen Dunkelkammer mit Digitalkamera (ChemiDoc, BioRad, München) erfasst und durch zuvor ermittelte optimale Blenden-, Expositionszeit- und Zoomeinstellungen wurden Bilder generiert. Diese Bilder konnten mithilfe der Software ImageLab 2.0 (BioRad, München) densitometrisch ausgewertet werden.

3.5.7 Membranstripping

Um in einem zweiten Schritt *phospho*-Tau (pSer396) evaluieren zu können, wurde die Membran von allen Antikörperrückständen zum Nachweis von *total*-Tau mittels Strippings gereinigt. Zunächst wurde die Membran für 10 min bei RT auf dem Schüttler in 1x TST gewaschen. In dieser Zeit wurde der Stripping Puffer entsprechend Tabelle 8 angesetzt und dann für 10 min in einem 50 °C warmen Wasserbad erhitzt. Danach wurde die Membran mit dem Stripping Puffer für eine Stunde im Wasserbad bei 50 °C inkubiert. Nachdem der Stripping Puffer unter dem Abzug verworfen und die Membran 1x 1min, dann 3x 10 min mit TST gewaschen wurde, konnte die Membran erneut mit MMP-TST blockiert werden und die Arbeitsschritte 3.6.4 und 3.6.5. mit spezifischem Antikörper gegen *phospho*-Tau (pSer396) durchgeführt werden.

Tabelle 8: Strippingpuffer

Puffer	Zusammensetzung
Stripping-Puffer	<u>50 ml Ansatz</u> 10 ml 10 % SDS 3,125 ml 1 M Tris/ HCL (pH 6,7) 0,32 ml β -Mercaptoethanol Aqua dest. (auf 50 ml auffüllen)

3.6 Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwerte sowie Standardfehler des Mittelwertes (*Standard Error of Mean, SEM*) dargestellt. Die Normalverteilung der Daten wurde anhand des einfachen Kolmogorov-Smirnov Tests sowie Quantil-Quantil-Diagrammen durch Histogramme verifiziert. Vergleiche von zwei Gruppen wurden bei parametrischen Datensätzen mittels *Student's* T-Test durchgeführt. Die Varianzhomogenität wurde sowohl durch den Levene Test, als auch durch den Bartlett's Test bestätigt. Der Alpha-Fehler wurde auf ein Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen wurde bei $p < 0,05$ (*), hochsignifikant bei $p < 0,01$ (**), und höchstsignifikant bei $p < 0,001$ (***) anerkannt. Ein Trend (T) wurde zwischen $0,1 > p > 0,05$ anerkannt. Alle statistischen Tests, sowie die Erstellung der Graphen wurden mit der Software SPSS 22 (IBM Company, New York, USA) sowie der Software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

In dieser Dissertation wurden zum einen Effekte eines genetischen Klk8-Knockdowns auf die strukturelle Neuroplastizität in dem transgenen CRND8-Mausmodell der Alzheimer Pathologie *in vivo* an weiblichen Tieren untersucht, und zum anderen Effekte eines permanenten Klk8-Knockdowns auf den neuronalen Tau Metabolismus in primären Neuronen transgener Tiere *in vitro*. Die hier dargestellte Doktorarbeit stellt ein Teilprojekt innerhalb eines übergeordneten Projekts dar, das sich mit Auswirkungen einer permanenten Klk8-Suppression mittels Knockdown von Kallikrein 8 auf die Alzheimer-Pathologie beschäftigt. (Herring et al., 2021).

4.1 Klk8-Knockdown steigert die strukturelle hippocampale Neuroplastizität

Der Einfluss einer permanenten Klk8 Suppression in transgenen weiblichen Tieren hinsichtlich der strukturellen Neuroplastizität wurde an pyramidalen Neuronen der *Cornu ammonis* Region 1 (CA1) des Hippocampus untersucht. Dabei wurde die Dichte der synaptischen Dornfortsätze (*Spines*) mittels stereologischer Verfahren in unterschiedlichen Regionen i.e. apikal und basal, jeweils proximal und distal erfasst. Zudem wurde die Dendritenkomplexität anhand einer dreidimensionalen Neuronenrekonstruktion untersucht, wobei hier Parameter wie die Dendritenlänge und Dendritenverzweigung der Pyramidenzellneurone quantifiziert wurden (Vgl. Abbildung 2, Kapitel 3.3.2.). Repräsentative Abbildungen der Golgi-Cox imprägnierten Neurone, Spines sowie der dreidimensionalen Neuronenrekonstruktion werden in Abbildung 4 dargestellt.

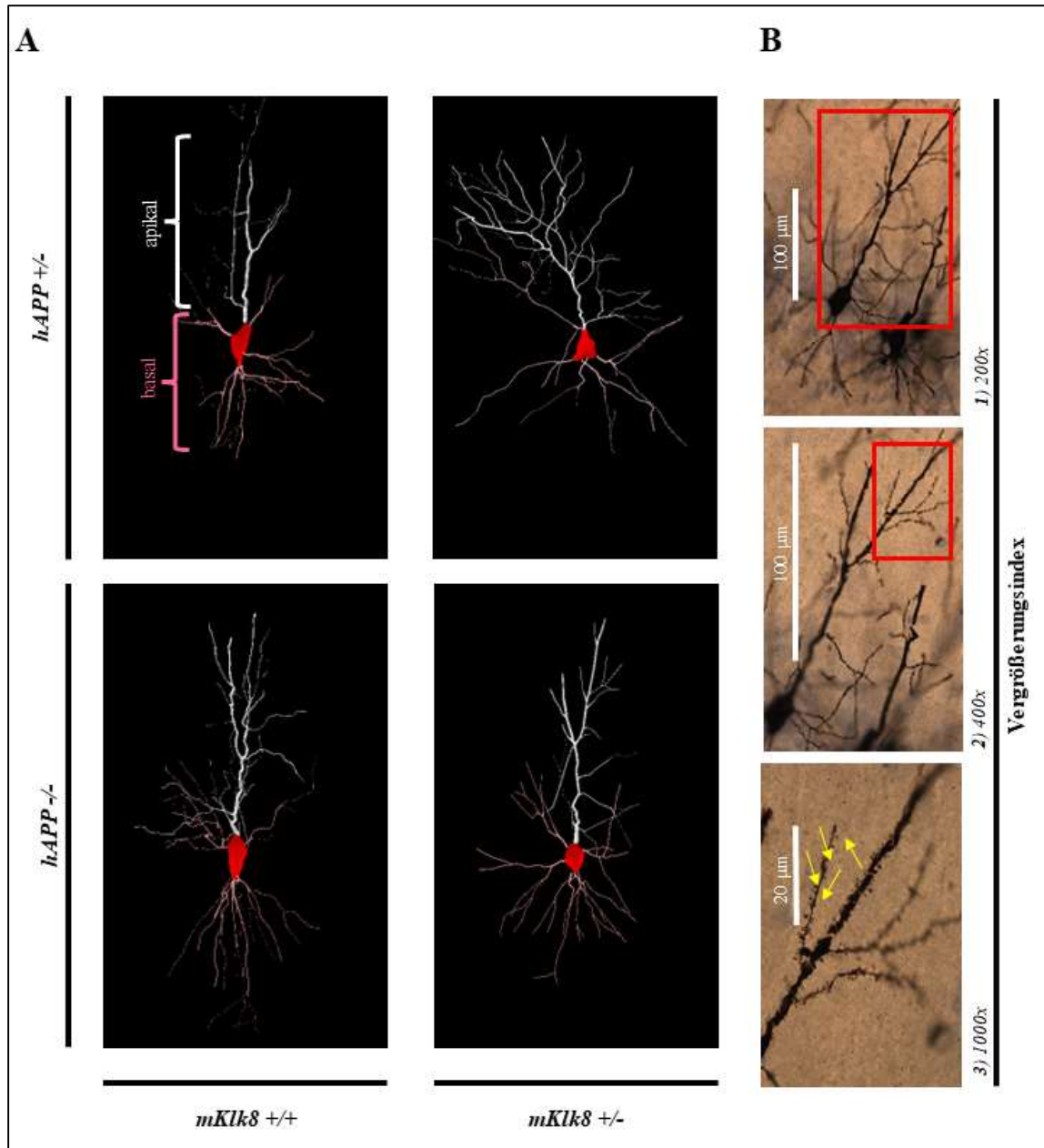


Abbildung 4: Repräsentative Darstellung pyramidalen Neurone im Hippocampus

(A) Repräsentative Darstellung dreidimensional rekonstruierter Pyramidenzellneurone im Hippocampus (CA1) weiblicher Tiere. Markierung apikaler Dendriten (weiß), basaler Dendriten (rosé) und der Zellsomata (rot). Darstellung aller 4 experimentellen Gruppen, Tiere mit (*hAPP*^{+/-}) und ohne (*hAPP*^{-/-}) Alzheimer-ähnliche Pathologie mit (*mKlk8*^{+/-}) und ohne *Klk8*-KD (*mKlk8*^{+/+}).

(B) Darstellung einer Vergrößerungsreihe in 1) 200facher, 2) 400facher und 3) 1000facher Vergrößerung eines Golgi-Cox imprägnierten Pyramidenzellneurons im Hippocampus (CA1) weiblicher Tiere, mit Markierung des Vergrößerungsbereiches (roter Kasten) und Maßstabs. Exemplarische Darstellung eines Dendritenastes mit Pfeilmarkierung (gelb) der Spines.

4.1.1 Klk8-Knockdown verbessert die hippocampale Spine-Dichte

Die Quantifizierung der Spines weiblicher transgener (*hAPP*^{+/-}) und nicht-transgener (*hAPP*^{-/-}) Mäuse mit (*mKlk8*^{+/-}) und ohne (*mKlk8*^{+/+}) Klk8-KD erfolgte im fortgeschrittenen Krankheitsalter (P226) an pyramidalen Neuronen der CA1 Region des Hippocampus. Hierbei wurden jeweils apikale (Vgl. Abbildung 5) und basale (Vgl. Abbildung 6) Abschnitte ausgewertet und verglichen (Vgl. Abbildung 4B).

Apikale Spine-Dichte

Apikal proximal zeigte sich bei transgenen Tieren mit Klk8-KD eine höhere Spine-Dichte als bei transgenen Tieren ohne Klk8-KD (+11,05 %; $p=0,025$). Hingegen zeigten sich apikal proximal keine Unterschiede in der Spine-Dichte zwischen nicht-transgenen mit und ohne Klk8-KD (Vgl. Abbildung 5A). Apikal distal zeigten weder Alzheimer-ähnlich erkrankte Tiere, noch Wildtypiere Unterschiede der Spine-Dichte durch einen Klk8-KD (Vgl. Abbildung 5B).

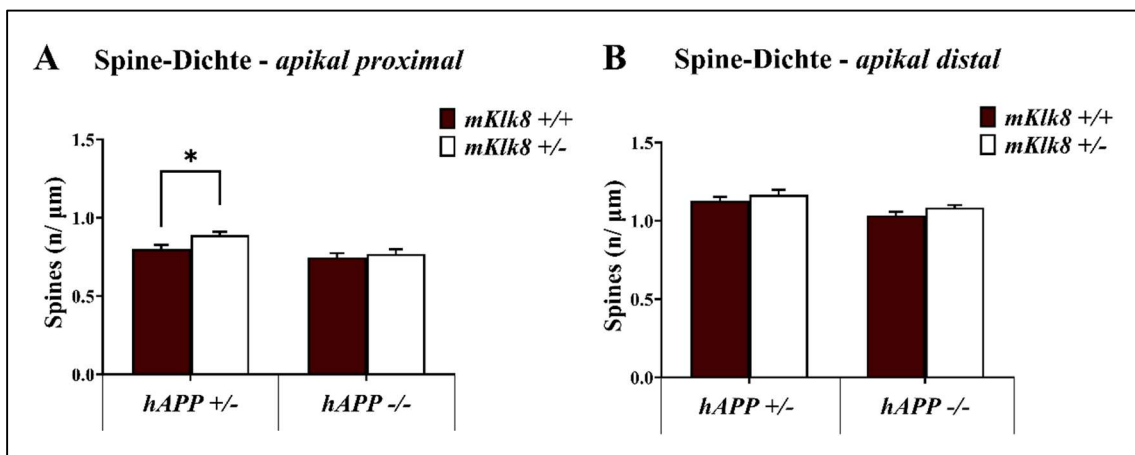


Abbildung 5: Apikale Spine-Dichte weiblicher Tiere

Darstellung der Spine-Dichte (n/µm) in pyramidalen Neuronen der CA1 Region des Hippocampus als Säulendiagramm. Zunahme der apikal proximalen Spine-Dichte in transgenen weiblichen Tieren durch einen Klk8-Knockdown (KD; $p=0,0250$). Die Darstellung erfolgt als Mittelwert \pm SEM (*Standard error of the mean*). Dargestellt sind weibliche Tiere mit (*hAPP*^{+/-}) und ohne (*hAPP*^{-/-}) Alzheimer-ähnliche Pathologie nach apikal proximaler (A) und distaler (B) Region ausgewertet, jeweils mit (*mKlk8*^{+/-}; weiß) und ohne Klk8-KD (*mKlk8*^{+/+}; rot). Testung der Normalverteilung durch Kolmogorov-Smirnov. Berechnung der statistischen Signifikanzen bei Normalverteilung durch einen ungepaarten Student's T-Test. Anzahl der Tiere nach Gruppen: *hAPP* +/−; *mKlk8* +/+ $n=9$, *hAPP*+/-;*mKlk8*+/- $n=8$, *hAPP*-/-; *mKlk8* +/+ $n=7$, *hAPP*-/-; *mKlk8*+/- $n=9$.

Basale Spine-Dichte

Zudem zeigten transgene Tiere mit permanenter Klk8-Suppression basal proximal die Tendenz einer höheren Spine-Dichte als Tiere mit nativen Klk8-Leveln (+11,61 %, $p=0,0667$, Vgl. Abbildung 6A). Auch basal distal exprimierten transgene Knockdown-Tiere mehr Spines pro Fläche als Alzheimer-ähnlich erkrankte Tiere ohne Klk8-KD (+8,98 %; $p=0,015$. Vgl. Abbildung 6B). Wildtyp-Tiere mit Klk8-KD zeigten hingegen weder basal proximal noch basal distal eine Veränderung der Spine-Dichte im Vergleich zu Wildtyp-Tieren ohne Klk8-KD.

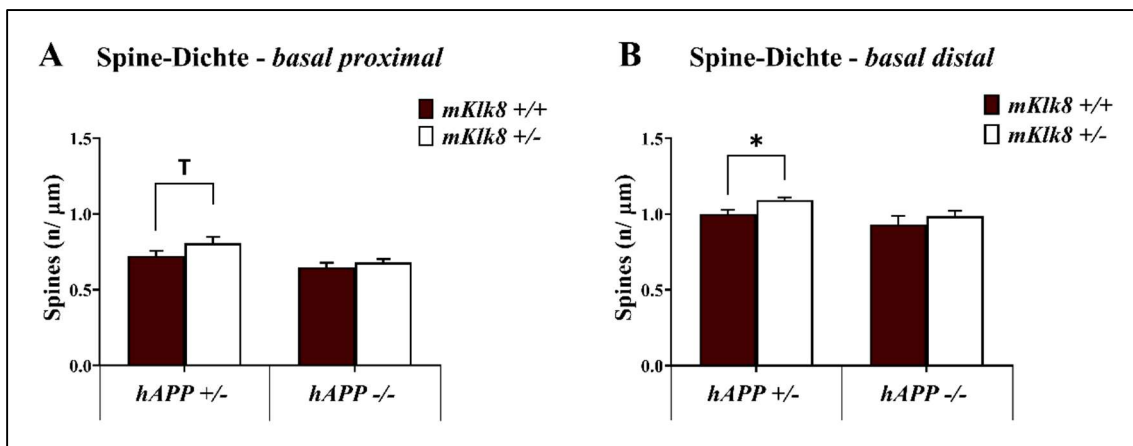


Abbildung 6: Basale Spine-Dichte weiblicher Tiere

Darstellung der Spine-Dichte ($n/\mu\text{m}$) in pyramidalen Neuronen der CA1 Region des Hippocampus als Säulendiagramm. Tendenz der Zunahme der basal proximalen Spine-Dichte in transgenen weiblichen Tieren durch einen Klk8-KD ($p=0,0667$). Zunahme der basal distalen Spine-Dichte in transgenen weiblichen Tieren durch einen Klk8-KD ($p=0,0150$). Dargestellt sind weibliche Tiere mit ($hAPP +/-$) und ohne ($hAPP -/-$) Alzheimer-ähnliche Pathologie nach basal proximaler (A) und distaler (B) Region ausgewertet, jeweils mit ($mKlk8 +/-$; weiß) und ohne Klk8-KD ($mKlk8 +/+$; rot). Testung der Normalverteilung durch Kolmogorov-Smirnov. Berechnung der statistischen Signifikanzen bei Normalverteilung durch einen ungepaarten Student's T-test. Anzahl der Tiere nach Gruppen: $hAPP +/-$; $mKlk8 +/+$ $n=9$, $hAPP +/-$; $mKlk8 +/-$ $n=8$, $hAPP -/-$; $mKlk8 +/+$ $n=7$, $hAPP -/-$; $mKlk8 +/-$ $n=9$.

4.1.2 Klk8-Knockdown verbessert die hippocampale Dendritenkomplexität

Neben der Quantifizierung der Spine-Dichte wurden die durchschnittliche Dendritenverzweigung (n/Neuron; Vgl. Abbildung 7), die durchschnittliche Dendritenlänge (μm ; Vgl. Abbildung 8) und die damit einhergehende Dendritenkomplexität (relative Einheiten; *arbitrary units* - a.u; Vgl. Abbildung 9) als Indikator für die dendritische Neuroplastizität in weiblichen Tieren ausgewertet. Dies erfolgte durch dreidimensionale Rekonstruktion der Golgi-Cox imprägnierten Neurone der CA1 Region des Hippocampus mittels NeuroLucida und NeuroExplorer Software (Vgl. Abbildung 4,A).

Dendritenverzweigung

Hierbei zeigten transgene Tiere infolge des Klk8-Knockdowns die Tendenz einer höheren Dendritenverzweigung im apikalen Bereich (+13,27 %; $p=0,0805$; Vgl. Abbildung 7A), während sie basal (Vgl. Abbildung 7B) keine relevanten Unterschiede in den verschiedenen Gruppen aufwiesen. Nicht-transgene Tiere zeigten weder apikal noch basal Unterschiede in den untersuchten Gruppen.

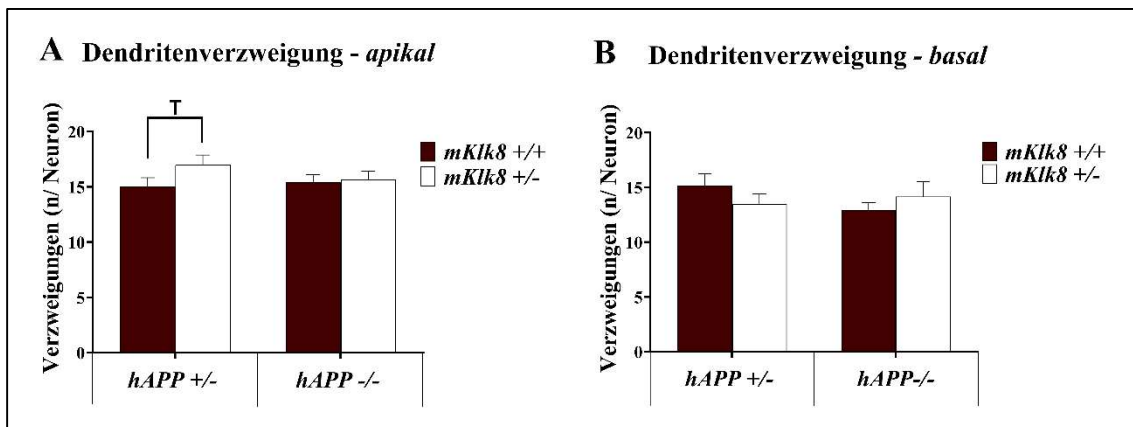


Abbildung 7: Hippocampale Dendritenverzweigung weiblicher Tiere

Darstellung der Analyse der Dendritenverzweigung (n/Neuron) in pyramidalen Neuronen der CA1 Region des Hippocampus (A) apikal und (B) basal. Tendenz der Zunahme der apikalen Dendritenverzweigung in transgenen weiblichen Tieren durch einen Klk8-KD ($p=0,0610$). Darstellung als Säulendiagramm (Mittelwert \pm SEM). Analysiert wurden weibliche Tiere mit (hAPP +/-) und ohne (hAPP -/-) Alzheimer-ähnliche Pathologie nach apikaler und basaler Region ausgewertet, jeweils mit (mKlk8 +/-; weiß) und ohne Klk8-KD (mKlk8 +/-; rot). Testung der Normalverteilung durch Kolmogorov-Smirnov. Berechnung der statistischen Signifikanzen bei Normalverteilung durch einen ungepaarten Student's T-test. Anzahl der Tiere nach Gruppen: hAPP +/-; mKlk8 +/- $n=8$, hAPP +/-; mKlk8 +/- $n=8$, hAPP -/-; mKlk8 +/- $n=5$, hAPP -/-; mKlk8 +/- $n=7$.

Dendritenlänge

Auch die Dendritenlänge wurde durch den Klk8-Knockdown bei transgenen Tieren apikal positiv beeinflusst, wenn auch nur als Tendenz (+13,55 %, $p=0,061$; Vgl. Abbildung 8A). Hingegen wurde bei der basalen Dendritenlänge in transgenen Mäusen keine Veränderungen durch eine permanente Klk8 Suppression festgestellt (Vgl. Abbildung 8B). Zudem beeinflusste der Klk8-Knockdown in nicht-transgenen Tieren die Dendritenlänge in keiner der untersuchten Regionen (Vgl. Abbildung 8).

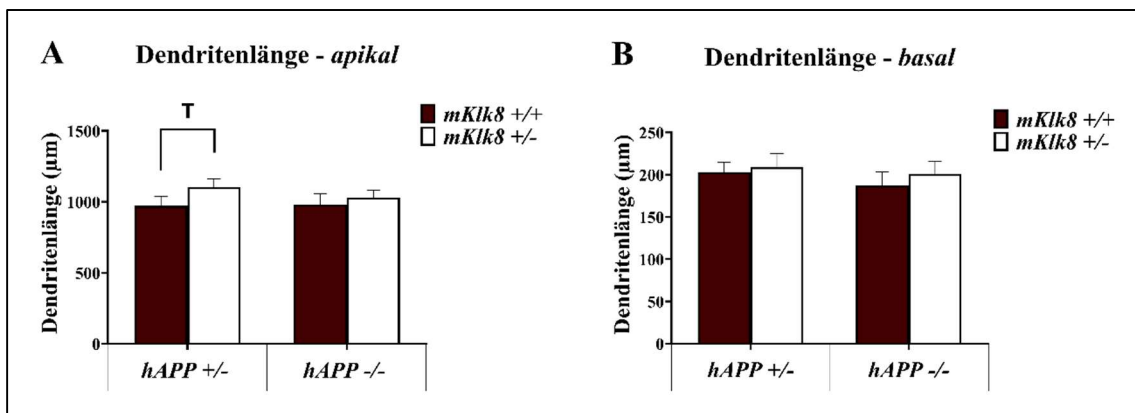


Abbildung 8: Hippocampale Dendritenlänge weiblicher Tiere

Darstellung der Analyse der Dendritenlänge (μm) in pyramidalen Neuronen der CA1 Region des Hippocampus (**A**) *apikal* und (**B**) *basal*. Tendenz der Zunahme der apikalen Dendritenlänge in transgenen weiblichen Tieren durch einen Klk8-KD ($p=0,0790$). Darstellung als Säulendiagramm (Mittelwert \pm SEM). Analysiert wurden weibliche Tiere mit (*hAPP* +/-) und ohne (*hAPP* -/-) Alzheimer-ähnliche Pathologie nach apikaler und basaler Region ausgewertet, jeweils mit (*mKlk8* +/-; weiß) und ohne Klk8-Knockdown (*mKlk8* +/+; rot). Testung der Normalverteilung durch Kolmogorov-Smirnov. Berechnung der statistischen Signifikanzen bei Normalverteilung durch einen ungepaarten Student's T-test. Anzahl der Tiere nach Gruppen: *hAPP* +/-; *mKlk8* +/+ $n=8$, *hAPP* +/-; *mKlk8* +/- $n=8$, *hAPP* -/-; *mKlk8* +/+ $n=5$, *hAPP* -/-; *mKlk8* +/- $n=7$.

Dendritenkomplexität

Die Dendritenkomplexität wurde durch den Klk8-Knockdown apikal in transgenen Tieren deutlich verbessert. Im Vergleich von Tieren ohne Klk8-KD mit Tieren mit permanentem Klk8-KD betrug dieser Anstieg 34,1 % ($p=0,0364$; Vgl. Abbildung 9A). Die Dendritenkomplexität verblieb im basalen Dendritenbereich durch einen Klk8-Knockdown unverändert (Vgl. Abbildung 9B). Auch bei wildtypischen Tieren blieb die Komplexität der apikalen und basalen Dendriten in den verschiedenen Gruppen (mit- und ohne Klk8-Knockdown) unberührt (Vgl. Abbildung 9).

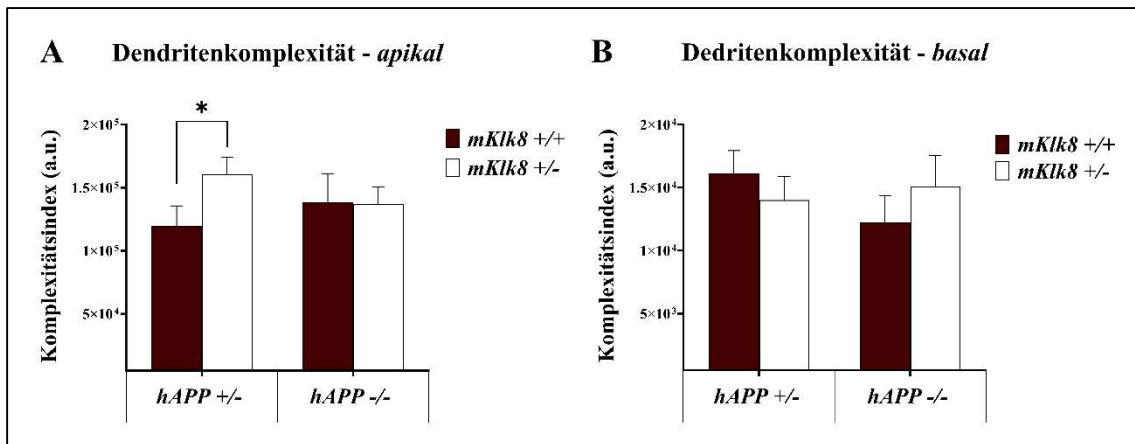


Abbildung 9: Hippocampale Dendritenkomplexität weiblicher Tiere

Darstellung der Analyse der Dendritenkomplexität (*arbitrary units- a.u.*) in pyramidalen Neuronen der CA1 Region des Hippocampus (A) *apikal* und (B) *basal*. Zunahme der apikalen Dendritenkomplexität in transgenen weiblichen Tieren durch einen Klk8-KD ($p=0,0364$). Darstellung als Säulendiagramm (Mittelwert \pm SEM). Analysiert wurden weibliche Tiere mit (*hAPP*+/-) und ohne (*hAPP*-/-) Alzheimer-ähnliche Pathologie nach apikaler und basaler Region ausgewertet, jeweils mit (*mKlk8*+/-; weiß) und ohne Klk8-Knockdown (*mKlk8*+/+; rot) unter Verwendung der folgenden Formel: [Summe der Endäste + Zahl der Endigungen]x[gesamte Dendritenlänge / Anzahl der primären Dendriten]. Testung der Normalverteilung durch Kolmogorov-Smirnov. Berechnung der statistischen Signifikanzen bei Normalverteilung durch einen ungepaarten Student's T-test. Anzahl der Tiere nach Gruppen: *hAPP* +/-; *mKlk8* +/+ $n=8$, *hAPP*+/-;*mKlk8*+/- $n=8$, *hAPP*-/-; *mKlk8* +/+ $n=5$, *hAPP*-/-; *mKlk8*+/- $n=7$.

4.2 Klk8-Knockdown affiziert nicht den Tau Metabolismus *in vitro*

Zur Evaluation des Einflusses einer permanenten Klk8-Reduktion auf den zerebralen Tau Metabolismus wurden aus neonatalen (P0) transgenen Tieren primäre Neurone extrahiert, für 14 Tage *in vitro* (*days in vitro*- DIV) kultiviert, und hinsichtlich ihrer Tau-Proteinlevel untersucht (Vgl. Kapitel 3.5.). Dabei wurde der Fokus nicht nur auf die totalen (gesamt) Tau-Level gesetzt, sondern auch das Vorliegen von (hyper-) phosphoryliertem Tau wurde quantifiziert. Für repräsentative Blot- und Fluoreszenzbilder siehe Abbildung 10B.

4.2.1 Klk8-Knockdown affiziert nicht die *total*-Tau-Level primärer Neurone

Um den Effekt einer permanenten Reduktion von Klk8 auf die Gesamtmenge (*total*-Tau, Tau-5) des intrazellulären Transportproteins Tau zu analysieren, wurde zu einem frühen Untersuchungszeitpunkt in primären Neuronen (DIV14) die Proteinmenge mittels Western Blot gegen Tau-5 bestimmt. Eine permanente Klk8-Suppression in Form eines Knockdowns mit einer konsekutiven Reduktion der zerebralen Klk8-Level um 50 % zeigte hier jedoch keinen Effekt auf die *total*-Tau Proteinmenge in weiblichen und männlichen transgenen CRND8-Mäusen ($p=0.999$, Vgl. Abbildung 10A1).

4.2.2 Klk8-Knockdown affiziert nicht die *phospho*-Tau-Level primärer Neurone

Eines der Hauptmerkmale der Alzheimer-Pathologie ist auf zellulärer Ebene die Tau-Pathologie, welche vor allem durch vermehrte Phosphorylierung und im weiteren Verlauf durch Bildung neurofibrillärer Bündel und konsekutiv gestörtem axonalen Transport gekennzeichnet ist. (Iqbal et al., 1993). Durch die Quantifizierung und nachfolgende densitometrische Analyse der Proteinmenge von phosphoryliertem Tau an der Bindungsstelle Serin 396 (pSer396), konnte kein signifikanter Unterschied der Proteinmenge zwischen transgenen Klk8-Knockdown Tieren und Mäusen mit nativen Klk8-Leveln festgestellt werden ($p=0,985$; Vgl. Abbildung 10A2).

4.2.3 Klk8-Knockdown affiziert nicht die p-Tau/t-Tau-Ratio primärer Neurone

Zur Einschätzung der Wirkung einer permanenten Klk8-Reduktion auf den Tau Metabolismus wurden die Gesamtmengen der nativen (*total*-Tau; Tau-5) und hyperphosphorylierten (*phospho*-Tau; pSer396) Tau-Level in Relation gesetzt, indem der Anteil an *phospho*-Tau auf die *total*-Tau Menge bezogen wurde ($Ratio = p\text{-Tau}/t\text{-Tau}$). Dabei wurden transgene (*hAPP*^{+/-}), männliche und weibliche Tiere, mit und ohne Klk8-Knockdown miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, wie schon zuvor in der Einzelbetrachtung der Proteine, kein signifikanter Unterschied in der p-Tau/t-Tau Ratio zwischen transgenen Tieren mit Klk8-Knockdown und CRND8-Mäusen mit nativen Klk8-Leveln ($p=0.952$, Vgl. Abbildung 10A3).

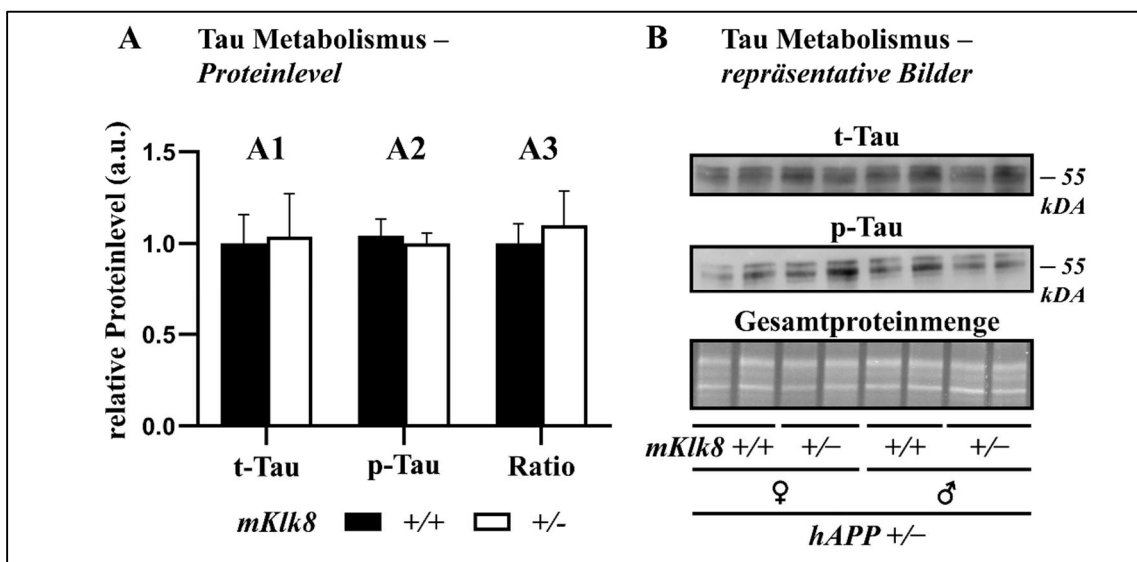


Abbildung 10: Analyse des Tau Metabolismus transgener Tiere

(A) Säulendiagramm der durch Western Blot quantifizierten Level von A1- t-Tau; *total*-Tau (Tau-5), A2- p-Tau; hyperphosphoryliertem (*phospho*-) Tau (pSer396) und A3- der p-Tau/t-Tau-Ratio in transgenen Tieren (*hAPP*^{+/-}) mit (*mKlk8*^{+/-}) und ohne (*mKlk8*^{+/+}) Klk8-KD. Darstellung als Mittelwerte \pm SEM. Gezeigt werden relative Proteinlevel (*arbitrary units* - a.u.) nach Normalisierung gegen die Gesamtproteinmenge via Fluoreszenz-Elektrophorese. Die Statistik erfolgte bei parametrischen Datensätzen durch den *Student's* T-Test. Anzahl der Tiere nach Gruppen: *hAPP*^{+/-}; *mKlk8*^{+/+} $n=10$, *hAPP*^{+/-}; *mKlk8*^{+/-} $n=7$.

(B) Repräsentative Darstellung der Western Blots von *total*-Tau (Tau-5), hyperphosphoryliertem Tau (pSer396) und der Gesamtproteinmenge durch Fluoreszenz-Elektrophorese von transgenen (*hAPP*^{+/-}) Tieren mit (*mKlk8*^{+/-}, weiß) und ohne (*mKlk8*^{+/+}, schwarz) Klk8-KD von weiblichen (♀) und männlichen (♂) Tieren. Beide Proteine sind mit einem Molekulargewicht von 55 Kilodalton (kDa) angeben.

5 DISKUSSION

Das strukturelle Neuroplastizitätsdefizit zeigt die stärkste Korrelation mit der klinischen Abnahme kognitiver Funktionen im Rahmen der Alzheimer-Krankheit (Spires-Jones and Knafo, 2012). Studien zeigten bereits erste Hinweise für die Beteiligung der plastizitätsmodulierenden Protease Kallikrein 8 im Kontext der AD sowie erste therapeutische Erfolge im Mausmodell über eine transiente Antikörper-vermittelte Inhibition (Herring et al., 2016; Keyvani et al., 2018; Münster et al., 2020).

Erstmals konnten nun durch eine Knockdown-vermittelte, permanente Reduktion von Klk8 Verbesserungen der strukturellen hippocampalen Neuroplastizität in Form einer erhöhten Spine-Dichte, erhöhten Dendritenlänge, Dendritenverzweigungsrate, und Dendritenkomplexität in transgenen weiblichen Tieren nachgewiesen werden. Zudem konnte erstmals gezeigt werden, dass der neuronale Tau Metabolismus in primären Neuronen transgener Tiere durch einen Klk8-Knockdown unverändert blieb.

5.1 Reduktion exzessiver Klk8-Level verbessert die strukturelle Neuroplastizität

Diese Arbeit konnte zeigen, dass die strukturelle hippocampale Neuroplastizität in weiblichen Tieren durch einen Klk8-KD gesteigert werden konnte, ohne die strukturelle Plastizität von weiblichen Wildtyp-Tieren zu beeinflussen. Neben den weiblichen Tieren, welche Bestandteil dieser Arbeit waren, wurden im Rahmen des Gesamtprojektes zu Effekten eines Klk8-KD ebenfalls, analog zu den hier erfolgten Analysen, männliche transgene (*hAPP*^{+/-}) und nicht transgene (*hAPP*^{-/-}) Tiere mit (*mKlk8*^{+/-}) und ohne (*mKlk8*^{+/+}) Klk8-KD im Hinblick auf die hippocampale strukturelle Neuroplastizität untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass männliche transgene Tiere in keiner der ausgewerteten Regionen (i.e. apikal proximal und distal sowie basal proximal und distal) hinsichtlich der Spine-Dichte in der hippocampalen CA1 Region von einem Klk8-Knockdown profitieren. Im Gegenteil zeigten männliche wildtypische Tiere mit physiologischen Klk8-Leveln sogar eine Reduktion der Spine-Dichte im apikal proximalen Bereich bei simultanem Klk8-KD.

Während die männlichen Tiere bezüglich der Spine-Dichte von einem Klk8-KD nicht oder nur nachteilig beeinflusst wurden, zeigten Analysen weiterer Aspekte der

strukturellen Neuroplastizität, namentlich der dendritischen Länge, der dendritischen Verzweigung und der dendritischen Komplexität, dass transgene Tiere mit Alzheimer-ähnlicher Pathologie *per se* apikal eine niedrigere dendritische Komplexität aufweisen als Wildtypiere. Durch einen Klk8-KD glichen sich die Level von transgenen Tieren in den untersuchten Aspekten in der apikalen Region nicht nur auf das Niveau der wildtypischen Tiere an, sondern übertrafen diese sogar (Herring et al., 2021).

Die Verbesserung der strukturellen Neuroplastizität durch einen Klk8-KD ließ sich nicht nur durch stereologische und rekonstruktive Verfahren nachweisen, sondern zeigte sich ebenfalls auf molekularer Ebene. Im Rahmen des Gesamtprojektes zu Effekten eines permanenten Klk8-Knockdown in TgCRND8-Mäusen, wurden ebenfalls Marker der neuronalen Plastizität auf Proteinebene untersucht, welche einen interessanten Ansatzpunkt zur Erklärung der vielfach verbesserten Neuroplastizität aufzeigen. Synaptophysin (SYP) ist ein Marker der synaptischen Dichte, welcher bereits früh im Krankheitsverlauf der AD reduziert ist (Masliah et al., 2001). Das *growth associated protein 43* (GAP43) ist nicht nur an frühen Prozessen der Synaptogenese und des neuronalen Zellwachstums beteiligt, sondern ebenfalls bei axonalem Wachstum, synaptischer Plastizität und Lern- und Gedächtnisprozessen involviert (Sandelius et al., 2019). GAP43 zeigt sich in fortgeschrittenem Krankheitsstadium bei AD-Erkrankten reduziert (Masliah et al., 2001). Das *activity-regulated cytoskeleton-associated protein* (ARC) reguliert synaptische Plastizität unter anderem durch Modifikation der Spine-Dichte und Konformität (Ringsevjen et al., 2023). Alle zellulären Neuroplastizitäts-Marker (SYP, GAP43 und ARC) zeigten sich in TgCRND8 Mäusen *per se* reduziert, konnten jedoch durch eine Knockdown-vermittelte permanente Klk8-Suppression auf Level von wildtypischen Tieren angehoben werden, während bei wildtypischen Tieren kein Effekt auftrat (Herring et al., 2021).

Neben Störungen der zellulären Neuroplastizität kommt es bei der AD zu Einschränkungen der hippocampalen Neurogenese (Moreno-Jiménez et al., 2019). Durch einen permanenten Klk8-KD konnte die Anzahl nicht differenzierender und neuronal differenzierender postmitotischer Zellen unterschiedlicher Stadien gesteigert werden. Die Arbeitsgruppe konnte nicht nur Verbesserungen der strukturellen Plastizität auf zellulärer

Ebene nachweisen, sondern ebenfalls klinische Verbesserungen der Kognition und des Arbeitsgedächtnisses durch einen Klk8-KD feststellen (Herring et al., 2021).

Bereits 2016 konnte über eine transiente 4-wöchige Inhibition mittels intraventrikulärer Antikörperapplikation gegen KLK8 eine Verbesserung der Neuroplastizitätsdefekte in AD-erkrankten Tieren erzielt werden (Herring et al., 2016). Vergleicht man die Ergebnisse des Klk8-KD mit den Ergebnissen der anti-KLK8-Behandlung, so zeigen sich vielfach Parallelen trotz unterschiedlicher Versuchsansätze. Während im Knockdown-Projekt die hippocampale Neuroplastizität untersucht wurde, wurden bei den Untersuchungen zu Effekten eines anti-KLK8-Ak im Frontalkortex Analysen in der Pyramidenzellschicht V durchgeführt. Analog zu einer permanenten Klk8-Reduktion zeigte eine 4-wöchige KLK8-Inhibition ebenfalls Verbesserungen der apikal proximalen sowie der basal distalen Spine-Dichte. Zusätzlich zeigte sich eine signifikante Verbesserung der apikal distalen Spine-Dichte in transgenen Tieren durch eine KLK8-Inhibition; ein Effekt, welcher bei der permanenten Klk8-Reduktion ausblieb (Herring et al., 2021; Herring et al., 2016). Wildtypische Tiere wurden durch eine transiente KLK8-Inhibition entweder nicht beeinflusst, oder zeigten sogar apikal proximal eine erniedrigte Spine-Dichte (Herring et al., 2016). Dieses Ergebnis ist kompatibel mit der erniedrigten Spine-Dichte männlicher Tiere durch einen Klk8-KD (Herring et al., 2021). Während im Knockdown-Projekt Geschlechterunterschiede evaluiert wurden, lässt sich bei der Antikörper-vermittelten KLK8-Inhibition und folgender Reduktion der Spine-Dichte keine Geschlechterabhängigkeit darstellen. Auch die dendritische Verzweigung, dendritische Länge und dendritische Komplexität zeigten sich in transgenen Tieren analog zu einem Klk8-KD durch eine transiente KLK8-Inhibition verbessert. Darüber hinaus wurde die basale dendritische Verzweigung durch eine KLK8-Inhibition verbessert und sogar wildtypische Tiere profitierten bezüglich der dendritischen Länge und Komplexität von einer KLK8-Inhibition (Herring et al., 2016). Ein Effekt, der unter einem Klk8-KD ebenfalls nicht zu beobachten war. Auch die Level der plastizitätsassoziierten Moleküle SYP und GAP43 glichen sich nach KLK8-Inhibition bei transgenen Tieren an das Niveau unbehandelter Wildtypiere an, während ARC nur von einem permanenten Klk8-KD profitierte (Herring et al., 2021; Herring et al., 2016).

In einer verwandten Arbeit unserer Arbeitsgruppe, konnte gezeigt werden, dass bei simultaner Inkubation A β -produzierender Neurone mit humanem rekombinanten Kallikrein 8 und einem anti-KLK8-Ak *in vitro* die Somagröße sowie die Dendritenlänge gesteigert werden konnte. Dieser Effekt zeigte sich EphrinB2-abhängig, da eine zusätzliche Inkubation mit einem anti-EphrinB2-Ak den Effekt nahezu vollständig aufhob (Münster et al., 2020).

Trotz der gemeinsamen Herabregulation des Proteins KLK8 sind beide Versuchsansätze, eine genetische Herabregulation in Kontrast zu einer antikörper-vermittelten, 4-wöchigen Inhibition, grundverschieden. Während es sich bei der anti-KLK8-Behandlung um eine transiente auf 4-Wochen beschränkte Reduktion exzessiver KLK8-Level in einem voll ausgereiftem Nervensystem handelt, sind bei einem genetisch v-vermittelten Klk8-KD bereits während der Ontogenese prä- und perinatal die Level von Klk8 reduziert. Es ist bekannt, dass KLK8 als Substrat essenziell für die Entwicklung des Nervensystems ist. Eine KLK8-Defizienz zeigt negative Effekte, wie strukturelle Defekte und eine verminderte hippocampus-assoziierte Gedächtnisleistung und Kognition im Mausmodell (Hirata et al., 2001; Konar et al., 2018). Zudem kommt es zu Störungen der frühen und späten Phasen der Langzeitpotenzierung (Ishikawa et al., 2008; Tamura et al., 2006) und der hippocampalen Gamma-Oszillationen (Kawata et al., 2017). Eine weitere wichtige Rolle kommt KLK8 bei der Ausreifung von Nervenzellen und Synaptogenese zu (Nakamura et al., 2006). Es scheint, als sei nur eine physiologische Menge von KLK8 in der Lage, die gesunde Entwicklung der Nervenzellen zu gewährleisten, und als hätten sowohl zu hohe, als auch zu niedrige KLK8-Spiegel eine schädliche Wirkung.

Bei Betrachtung dieser multiplen essenziellen Funktionen von KLK8, erscheinen negative Effekte während eines Klk8-KD nicht nur denkbar, sondern sogar nachvollziehbar. Trotzdem zeigte sich im Knockdown-Projekt lediglich eine Erniedrigung der Spine-Dichte männlicher Tiere sowie eine Erniedrigung der Proteinlevel von EPHB2, *multi-drug-resistant transporter 1* (MDR1) und Beclin-1 (Herring et al., 2021). Bei transienter KLK8-Inhibition zeigten sich sogar nur eine leicht erniedrigte Spine-Dichte in wildtypischen Tieren. Wodurch begründet sich nun das großteilige Ausbleiben erwartbarer negativer Effekte?

Eine mögliche Erklärung könnte eine Pufferzone am unteren Ende der KLK8-Level sein. Auch sollte bedacht werden, dass im Rahmen des Klk8-KD eine Reduktion der KLK8-Level um -50% durchgeführt wurde, und keinesfalls von einer kompletten Klk8-Defizienz auszugehen ist. Zusätzlich könnte eine Klk8-Reduktion möglicherweise durch synergistische Effekte anderer Vertreter der Kallikrein-Familie abgemildert werden (Mella et al., 2020). Zusammenfassend ergibt dies ein breites therapeutisches Fenster für eine mögliche zukünftige Behandlung der Alzheimer-Erkrankung mit KLK8 als Zielmolekül.

5.2 Tau Metabolismus im Kontext des Kallikrein-8 Knockdown

Es ist bekannt, dass die Ablagerung von pathologisch verändertem Tau in neurofibrillären Bündeln (NFT) ein histopathologisches Kardinalzeichen der Alzheimer-Krankheit ist. Auf zellulärer Ebene kommt es zu einer vermehrten Phosphorylierung des Transportproteins Tau, welche die Fibrillationsneigung erhöht (Kent et al., 2020).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein permanenter Klk8-KD *in vitro* in primären Neuronen transgener Alzheimer-ähnlich erkrankter Tiere keinen messbaren Effekt auf die Konzentrationen von *total*-Tau, *phospho*-Tau oder die p-Tau/t-Tau Ratio hat.

Hingegen zeigten *in vivo* Daten unserer Arbeitsgruppe im Rahmen des Gesamtprojektes zu Effekten einer permanenten Klk8-Reduktion eine Verbesserung der p-Tau/t-Tau Ratio zugunsten des physiologischen *total*-Tau. Eine Verminderung der Gesamtkonzentration von *phospho*-Tau konnte nicht festgestellt werden. Die verbesserte Ratio konnte daher hauptsächlich einem erhöhten Anteil an *total*-Tau und weniger der vermehrten Aktivierung von Dephosphorylierungssignalwegen zugeschrieben werden, es zeigte sich keine erhöhte Aktivität von Enzymen der Dephosphorylierung. Weder eine erhöhte Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PIK3), noch eine Inhibition der Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3 β) ließen sich durch einen permanenten Klk8-KD nachweisen (Herring et al., 2021).

Im Gegensatz dazu zeigten sich bei der anti-KLK8-Behandlung zwar auch erniedrigte Level des p-Tau an der Phosphorylierungsstellen S202/T205, p-S396 und T121/S214,

diese waren jedoch begleitet von erhöhter Aktivierung der PIK3 und Inhibition der GSK3 β , zeigten also eine gesteigerte Tau-Dephosphorylierung (Herring et al., 2016). Inkubation von SH-SY5Y Neuroblastom-Zellen und auch primären A β -produzierenden Neuronen mit humanen rekombinanten KLK8 reduzierte *in vitro* die Expression von *total*-Tau, während gleichzeitige Ko-Inkubation mit KLK8 und anti-KLK8-Ak diesen Effekt aufhob. Eine Verbesserung der p-Tau/t-Tau Ratio zugunsten des *total*-Tau konnte also ebenfalls *in vitro* nachgewiesen werden. Es konnte durch simultane Inkubation oben genannter Zelllinien mit humanem KLK8, anti-KLK8-Ak und anti-EPHB2-Ak gezeigt werden, dass dieser Effekt EPHB2- β abhängig erzielt wurde. Hingegen zeigte sich durch Zugabe von humanem KLK8 analog zu den Ergebnissen meiner Dissertation keine Veränderung bei *phospho*-Tau, gemessen an den Bindungsstellen S396, S202/T205, und T231 (Münster et al., 2020). Wie könnten nun diese zum Teil divergenten Ergebnisse erklärbar sein?

Es gibt eine Reihe von Unterschieden bei der Datenerhebung der verschiedenen Projekte. Neben der Tatsache, dass *in vivo* und *in vitro* Daten nicht gleichzusetzen sind, unterscheidet sich ein permanenter Klk8-KD, wie bereits ausführlich erläutert, grundlegend von einer anti-KLK8-Behandlung. Zusätzlich birgt die hier angewandte Methodik eine starke Varianz durch unterschiedliche Untersuchungszeitpunkte. Während *in vivo* Proben im Knockdown-Projekt in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium (i.e. postnataler Tag 226) untersucht wurden, wurden *in vitro* primäre Neurone an postnatalen Tag 0 (P0) extrahiert, über 14 Tage inkubiert und anschließend analysiert. Zudem ist bekannt, dass in dem verwendeten TgCRND8-Mausmodell erst ab P70 NFTs nachweisbar sind (Bellucci et al., 2007). Durch die frühzeitige Isolation kommt es zudem weniger zu Interaktionen mit umgebenden Strukturen und Proteinen. Es ist bekannt, dass die Tau-Pathologie sekundär, nach der zellulären Phase bestehend aus toxischer Schädigung durch β -Amyloid, neurovaskulärer Dysfunktion und Neuroinflammation, ausgebildet wird (Scheltens et al., 2021). Zudem konnte neben einer in Teilen Astrozyten-abhängigen Verstärkung der A β -abhängigen Induktion der Tau-Pathologie (Bellaver et al., 2023) gezeigt werden, dass ebenfalls durch A β -induzierte mikrogliale Aktivierung die Tau-Pathologie entscheidend verstärkt wird (Ising et al., 2019). Eine frühe Isolation und mangelnde Interaktion mit anderen Zellreihen wie Astrozyten oder aktivierter Mikroglia könnte also die Ausprägung der Tau-Pathologie reduziert haben.

Abseits von einem möglicherweise zu frühen Untersuchungszeitpunkt und mangelnder Umgebungsinteraktion wurden in dieser Arbeit die isolierten primären Neurone aus methodischen Gründen aus dem gesamten Kortex isoliert, während in den Untersuchungen zu Effekten eines Klk8-KD auf die Tau-Pathologie *in vivo*, erhöhte *total*-Tau Level bei einem Klk8-KD im entorhinalen Kortex nachgewiesen wurden (Herring et al., 2021). Es ist bekannt, dass sich die Tau-Pathologie nicht diffus verbreitet, sondern zunächst im entorhinalen Kortex, über den Hippocampus und anschließend über den (Neo-) Kortex ausbreitet (Chen and Yu, 2023). Unterschiede in der Ausprägung der Tau-Pathologie zwischen beiden Projekten erscheinen also nachvollziehbar. In meinem Projekt konnte keine verminderte Phosphorylierung an der Bindungsstelle Serin 396 durch einen Klk8-KD nachgewiesen werden. Jedoch können Effekte des Klk8-KD, analog zu den anderen Projekten unserer Arbeitsgruppe, an anderen Phosphorylierungsstellen wie S202/T205, T231 oder T121/S214, welche in diesem Projekt nicht untersucht wurden, nicht ausgeschlossen werden (Herring et al., 2021).

5.3 KLK8-KD verbessert multiple Facetten der Alzheimer Erkrankung

Neben Effekten auf die neuronale Plastizität verbesserte eine permanente Klk8-Suppression mittels Knockdown die zerebrale Belastung durch β -Amyloid zum einen durch geringere Produktion, da unter Klk8-KD die nicht-amyloide Prozessierung überwog, und zum anderen durch erhöhte zerebrale Bereinigung. Diese wurde vor allem durch Wiederherstellung der unter AD entstandenen neurovaskulären Dysfunktion, Zunahme der zerebralen Autophagie und Aktivierung phagozytotischer Mikroglia bewirkt (Herring et al., 2021).

Doch welche Mechanismen könnten dieser multifokalen strukturellen Verbesserung der AD-assoziierten Pathologien, neben der bereits beschriebenen Restitution von zellulären plastizitätsassoziierten Molekülen (i.e. SYP, GAP43 und ARC), auf Level von gesunden Wildtyptieren, zugrunde liegen?

Eine weitere mögliche Erklärung findet sich in der Betrachtung der Substrate von KLK8. Es ist bekannt, dass L1CAM, NRG-1 und FN Substrate der Serinprotease KLK8 sind (Debela et al., 2018; Mella et al., 2020). Die Level der KLK8-Substrate konnten in transgenen AD-erkrankten Tieren durch einen Klk8-KD auf Level unbehandelter

Wildtyptiere angehoben werden. Dieser Effekt zeigte sich, bis auf die isolierte Zunahme von FN durch den Klk8-KD in ausschließlich weiblichen Tieren, geschlechtsunabhängig (Herring et al., 2021). Das Protein L1CAM zeigt zusätzlich zu seinen plastizitätsmodulierenden Eigenschaften wie Förderung der Synapsenformation, Neuronenlänge und Neuronenmigration ebenfalls eine Reduktion der A β -Plaquelastung im Mausmodell (Hu et al., 2022). Fibronektin fördert nicht nur die zelluläre Stabilität als extrazelluläres Matrixprotein, sondern ist durch Interaktion mit APP in der Lage die β -Amyloidproduktion zu verringern (Noda et al., 2018). NRG-1 ist über sein Substrat ErbB4 in der Lage, die synaptische Plastizität durch GABAerge Signaltransmission zu formen (Tamura et al., 2012) und zeigt nach KLK8-Inhibition ebenfalls erhöhte kortikale Level (Münster et al., 2020). Des Weiteren konnte *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden, dass KLK8 die Dendritenlänge und das Dendritenwachstum reguliert (Konar et al., 2018; Oka et al., 2002). Mögliche *Downstream* Interaktionspartner sind, neben den bereits genannten Substraten, das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2c (MAP2c) und die Proteinkinase A (PKA), welche KLK8-abhängige Aktivität zeigen und in der Lage sind, das axonale Wachstum und die Zellorganisation insbesondere von Nervenzellen zu regulieren (Konar et al., 2018; Sánchez et al., 2000).

Ein weiteres prominentes Substrat von KLK8 ist der EphrinB2-Rezeptor (EPHB2). So wird unter anderem das Enzym Reelin, welches dafür bekannt ist, Spines zu modulieren und über die Proteine Nck und Pak das axonale Wachstum zu regulieren, durch EPHB2 gesteuert (Herz and Chen, 2006; Srivastava et al., 2013). Zusätzlich wird durch EPHB2, nicht nur die strukturelle, sondern auch die funktionelle Neuroplastizität insbesondere über NMDA-abhängige Signaltransduktion in Alzheimer-erkrankten Tieren verbessert und sogar die kognitive Leistung positiv beeinflusst (Cissé et al., 2011). Neben seinen plastizitätsmodulierenden Eigenschaften konnte durch EPHB2-Stimulation ebenfalls erhöhte Tau-Dephosphorylierung via Anstieg der PI3K und anschließender Inaktivierung der GSK3 β stimuliert werden (Jiang et al., 2015).

Zusätzlich ist EPHB2 in der Lage, neben der Förderung der Angiogenese, Einfluss auf die Blut-Hirn-Schranke zu nehmen, was nicht nur der neurovaskulären Dysfunktion entgegenwirkt, sondern auch durch Wiederherstellung der zellulären Bereinigung mit einer Erniedrigung der Amyloid-Belastung einher geht (Xing et al., 2019). Weiterhin zeigten sowohl die mikrogliale Phagozytose, als auch die zelluläre

Autophagie-Maschinerie eine EPHB2-abhängige Aktivität (Herring et al., 2021; Herring et al., 2016; Zhong et al., 2019).

Die multifokale Einbindung von KLK8 und insbesondere seiner *Downstream* Substrate in die komplexe Pathogenese der AD, legt die Vermutung einer zentralen und möglicherweise sogar kausalen Rolle in der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung nahe.

5.4 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Nicht zuletzt zeigten sich, gerade in Bezug auf die hippocampale Spine-Dichte, deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede. Während weibliche Tiere großteilig und in verschiedenen Regionen (i.e. apikal proximal, apikal distal und basal proximal) von einem Klk8-KD profitierten, zeigten männliche Tiere nicht nur keine Unterschiede durch die permanente Suppression von Klk8, sondern zeigten bei Wildtyptieren mit physiologischen Klk8-Leveln sogar eine erniedrigte Spine-Dichte im apikal proximalen Bereich. Auch das extrazelluläre Matrixprotein FN und weitere Proteine wie Transporter der Blut-Hirn-Schranke LRP oder RAGE zeigten geschlechtsspezifische Abweichungen (Herring et al., 2021). Wie kommen nun diese Unterschiede zwischen beiden Geschlechtern zustande?

Es ist bekannt, dass der Anteil an Frauen mit AD mit 2/3 deutlich höher ist als der Anteil männlicher Patienten (Nebel et al., 2018). Auch sind Frauen im Regelfall stärker von der AD betroffen und weisen ein schlechteres *Outcome* auf (2023 Alzheimer's disease facts and figures, 2023; Nichols, 2019). Die erhöhte Lebenserwartung von Frauen im Allgemeinen und andere Lifestyle-assoziierte Faktoren bieten keinen zufriedenstellenden Ansatz zur Erklärung dieser offenkundigen Geschlechtsdifferenzen. Weibliche transgene Tiere zeigen bereits in moderatem Krankheitsstadium eine ausgeprägtere Aβ-Plaquelastung als männliche gleichaltrige Tiere. Auch in spätem Krankheitsstadium zeigen weibliche transgene Tiere eine höhere Ausprägung der Neuroinflammation, eine erniedrigte Neuroplastizität und nicht zuletzt eine schlechtere Leistung in Testungen zu Kognition und Ängstlichkeitsverhalten. Zugleich zeigten weibliche Tiere und Frauen erhöhte Klk8-Level in frühen Krankheitsstadien der AD (Keyvani et al., 2018). Wie bereits mehrfach belegt, zeigt KLK8 Beteiligung an vielen Prozessen, welche in der AD gestört sind. Die Reduktion exzessiver Klk8-Level hat eine

multifokale Verbesserung unterschiedlichster Aspekte der AD-Pathologie zur Folge (Herring et al., 2021; Herring et al., 2016; Münster et al., 2020). Eine frühe Erhöhung von KLK8 und höhere KLK8-Spiegel in der weiblichen Kohorte könnten also eine mögliche Erklärung für die geschlechtsspezifischen Differenzen darstellen. Auch zeigten *in vitro* Versuche in neuronalen und mikroglialen Zellreihen, dass β -Östradiol als weibliches Geschlechtshormon in der Lage ist, die Klk8-Produktion zu induzieren, während Dihydroxytestosteron als männliches Geschlechtshormon keinen Effekt zeigte. Niedrige Dihydroxytestosteron-Konzentrationen waren im Gegenteil sogar dazu in der Lage, die Zellviabilität in mikroglialen Zellreihen *in vitro* zu steigern (Keyvani et al., 2018). Die unterschiedlichen Wirkungen der Geschlechtshormone auf die KLK8-Level unter experimentellen Bedingungen liefern einen weiteren Ansatzpunkt zur Erklärung der Abweichungen der AD zwischen beiden Geschlechtern.

5.5 Limitationen, Stärken und Ausblick

Welche Bedeutung kommt nun den hier erhobenen Erkenntnissen zu?

Grundsätzlich wurden die hier gewonnenen Erkenntnisse nach gängiger wissenschaftlicher Praxis im Rahmen eines Mausmodells und durch Zellkultur erhoben. Es gilt, physiologische Unterschiede zwischen Maus und Mensch zu beachten, daher sind hier erhobene Ergebnisse nicht in vollem Umfang auf den Menschen übertragbar. Dennoch teilen Maus und Mensch ca. 90% des Erbmaterials und ermöglichen die Untersuchung von Erkrankungen, die bei Menschen oft jahrzehntelang voranschreiten und bilden so eine wichtige Basis für jegliche Grundlagenforschung (Masopust et al., 2017). Das in diesem Projekt genutzte Mausmodell bildet als Modell der monogenetischen EOAD nur ca. 5% der tatsächlichen Alzheimer Erkrankungen ab (Lanoiselée et al., 2017).

Die hier angewandte Methodik zur Untersuchung des Tau Metabolismus mittels Zellkultur primärer Neurone und anschließender Western-Blot Quantifizierung unterliegt ebenfalls einer gewissen Vulnerabilität durch äußere Einflüsse wie z.B. der Antikörper-Antigen-Bindung und potenziellen Antikörper-Interaktionen, Untersucherabhängigkeit sowie technischer Ausstattung (Pillai-Kastoori et al., 2020; Sahu et al., 2019). Zudem bietet ein Zellkulturansatz kein Abbild der physiologischen Bedingungen, in denen

komplexe Interaktionen zwischen verschiedenen Zellarten und Signalstoffen erfolgen (Pampaloni et al., 2007).

Das hier angewandte Paradigma eines genetischen Knockdowns bietet keinen sinnvollen kurativen Ansatz zum praktischen Vollzug einer spezialisierten Therapie der AD. Denkbar wäre eine medikamentöse Antikörper-basierte Darreichungsform, welche hochspezifisch an KLK8 bindet und bereits im vorangegangenen Projekt der Arbeitsgruppe beachtliche Erfolge im Mausmodell erzielte (Herring et al., 2016).

Durch das aktuelle Projekt zu Effekten eines Klk8-KD konnten Erkenntnisse zu einer möglichen kausalen Rolle von KLK8 nicht nur bekräftigt, sondern sogar ausgeweitet werden. Eine potenzielle Interaktion des KLK8-Ak selbst, konnte mittels genetischem Ansatz umgangen und die beobachteten Effekte konnten der verminderten Klk8-Expression zugeschrieben werden. Dabei bildet diese Studie einen substanziellen Mehrwert durch Aufdeckung weiterer molekularer Interaktionspartner von KLK8. Insbesondere der Neuroplastizität kommt bei der neurodegenerativen Erkrankung ein hoher Stellenwert zu, da sie stark mit der klinischen Abnahme kognitiver Funktionen korreliert (Spires-Jones and Knafo, 2012). Wie bereits beschrieben bilden die in dieser Dissertation untersuchten Aspekte der Spine-Dichte, dendritischen Länge, -Verzweigung und Komplexität die strukturelle Grundvoraussetzung für höhere kortikale Funktionen (Weerasinghe-Mudiyanselage et al., 2022). Die Untersuchung von Auswirkungen des KLK8-KD auf Wildtyptiere ohne KLK8-Exzess kann als Basis für weitere Untersuchungen zur therapeutischen Breite einer KLK8-basierten Therapie genutzt werden.

Kallikrein-8 sollte als Zielmolekül zur Behandlung der Alzheimer-Erkrankung dringlichst in Betracht gezogen werden. Die frühe Erhöhung im Krankheitsverlauf bei Maus und Mensch sowie therapeutisches Potenzial bei unterschiedlichsten, in der AD alterierten Prozessen, konnte nun zum wiederholten Male gezeigt werden (Herring et al., 2021; Herring et al., 2016; Münster et al., 2020; Teuber-Hanselmann et al., 2020).

Zukünftig sollten weitere Studien nicht nur therapeutische und diagnostische Erkenntnisse vertiefen. Weitere Untersuchungen zur Darreichungsform, Dosisfenster, und weiteren molekularen Interaktionspartnern von KLK8 sind notwendig, um ein sicheres, kosteneffektives und wirksames Therapiekonzept zu entwickeln.

5.6 Schlussfolgerung

Die Alzheimer Krankheit ist aufgrund ihrer Komplexität und trotz Jahren intensiver Forschung eine der herausforderndsten Erkrankungen unserer Zeit. Über Dekaden konnte kein Durchbruch in der effektiven Behandlung der Alzheimer Erkrankung erzielt werden. Mit der plastizitätsmodulierenden Protease KLK8 konnte unsere Arbeitsgruppe ein Molekül identifizieren, welches nicht nur als Biomarker genutzt werden kann, sondern nachweislich multiple therapeutische Effekte auf die verschiedensten Domänen der Alzheimer Pathologie ausübt. Diese Arbeit konnte zeigen, dass die Neuroplastizitätsdefizite durch einen Klk8-KD in weiblichen Alzheimer-erkrankten Tieren abgemildert werden können, ohne dabei gesunde Tiere ohne Klk8-Exzess negativ zu beeinflussen. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Klk8-KD den Tau Metabolismus in primären Neuronen nicht beeinflusst. In welchem Ausmaß diese Erkenntnisse dazu beitragen können die AD weiter zu entschlüsseln bleibt abzuwarten. In Anbetracht der hohen sozioökonomischen Belastung durch die AD sollten weitere Untersuchungen zu diesem vielversprechenden Zielmolekül dringlichst vorangetrieben werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Kallikrein 8 (KLK8) ist eine plastizitätsmodulierende Protease, welche verschiedenste, in der Alzheimer Krankheit (AD) eingeschränkte kortikale Prozesse, wie reduzierte strukturelle Neuroplastizität und den Tau Metabolismus, beeinflusst. Bereits früh im Krankheitsverlauf zeigt sich sowohl human als auch murin ein Klk8-Exzess. Eine 4-wöchige Inhibition mittels Antikörper konnte multiple positive Effekte auf Pathologien der AD im Mausmodell zeigen. Frauen sind häufiger und schwerer von der AD betroffen und weisen *per se* höhere kortikale Klk8-Level auf.

In diesem Projekt wurden Auswirkungen eines permanenten genetisch-vermittelten Knockdown (KD) von Klk8 (-50%) auf die hippocampale strukturelle Plastizität weiblicher Tiere sowie den neuronalen Tau Metabolismus primärer Neurone in einem Mausmodell mit Alzheimer-ähnlich erkrankten transgenen Mäusen des *Center of Research for neurodegenerative diseases* (CRND8) untersucht. Dabei wurden an vier experimentellen Gruppen jeweils mit- und ohne AD und mit- und ohne Klk8-KD Untersuchungen zur Spine Dichte, der dendritischen Länge, Verzweigungsrate und Komplexität mittels stereologischer Quantifizierung Golgi-Cox imprägnierter pyramidaler Neurone sowie dreidimensionaler Neuronenrekonstruktion mittels Neurolucida Software durchgeführt. Zudem wurden *in vitro* Analysen zur Evaluation des Tau Metabolismus in primären Neuronen bestehend aus der Quantifizierung von *total-Tau* (Tau-5), phospho Tau (pSer396) und der total-/phospho Tau Ratio via Westernblot durchgeführt.

Ein Klk8-KD erhöht in weiblichen Tieren die Spine Dichte und dendritische Komplexität pyramidaler Neurone und zeigt die Tendenz, die dendritische Länge und dendritische Verzweigungsrate apikal zu erhöhen ohne Wildtyp-Tiere zu beeinflussen. In primären Neuronen transgener Tiere zeigte ein Klk8-KD keine Auswirkungen auf den Tau Metabolismus. Zusammenfassend zeigte sich durch einen Klk8-KD *in vivo* eine Verbesserung der strukturellen Neuroplastizität, während sich *in vitro* keine Veränderungen des Tau Metabolismus zeigten. Dies unterstreicht das therapeutische Potenzial von Klk8 als Schlüsselmolekül in der AD. Zukünftige Untersuchungen sollten sich auf weitere Effekte von Klk8 sowie Regulatoren der Enzymaktivität im Kontext der AD fokussieren.

7 SUMMARY

Kallikrein 8 (KLK8) is a plasticity modulating protease that affects several processes in the brain, such as neuroplasticity and tau metabolism which are impaired in Alzheimer's disease (AD). Cerebral KLK8 levels are elevated in human and mice at incipient stages of AD and short-term anti-body-mediated KLK8 inhibition mitigates several aspects of AD-pathology. Furthermore, females display higher cerebral KLK8 levels than males independent of AD. Recent results underline the clinical relevance of KLK8, demonstrating blood and CSF KLK8 as a potential new biomarker for early stages of AD. Accordingly, KLK8 appears to be a promising new diagnostic and therapeutic target in AD.

In the present study we permanently suppressed KLK8 in an Alzheimer's mouse model with pathologically increased cerebral KLK8 levels. Therefore, transgenic mice of the *Center of Research for neurodegenerative diseases* (CRND8) were crossed with KLK8 knockdown mice, resulting in AD mice with or without reduced KLK8 levels. In my doctoral thesis I aimed to identify the long-term effects of KLK8 knockdown (KLK8-KD) on structural neuroplasticity in female transgenic and non-transgenic mice by quantification of spine density, dendritic arborization, dendritic outgrowth and thus dendritic complexity, following 3D-reconstruction of pyramidal neurons from Golgi-Cox impregnated hippocampus utilizing NeuroLucida software. Moreover, the *in vitro* effect of KLK8-KD on tau metabolism in primary neurons was assessed by quantifying total tau and phospho-tau (pSer396-tau) levels via Western Blot. KLK8-KD increased spine density and complexity. Additionally, KLK8-KD tended to increase dendritic arborization and dendritic outgrowth in diseased females without affecting neuroplasticity in non-diseased mice. In primary neurons, KLK8-KD did not alter tau and phospho-tau levels and thus did not interfere with tau metabolism.

In summary, KLK8-KD improves neuroplasticity in female AD mice but does not affect tau metabolism in primary neurons, underlining the potential of KLK8 as a therapeutic target in AD. Ongoing studies should evaluate additional *in vivo* and *in vitro* effects of KLK8-KD on AD-related disturbances.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. 2023 Alzheimer's disease facts and figures. (2023). *Alzheimers Dement* 19, 1598-1695.
2. Akkerman, S., Blokland, A., Reneerkens, O., van Goethem, N.P., Bollen, E., Gijsselaers, H.J., Lieben, C.K., Steinbusch, H.W., and Prickaerts, J. (2012). Object recognition testing: methodological considerations on exploration and discrimination measures. *Behav Brain Res* 232, 335-347.
3. Attwood, B.K., Bourgoignon, J.M., Patel, S., Mucha, M., Schiavon, E., Skrzypiec, A.E., Young, K.W., Shiosaka, S., Korostynski, M., Piechota, M., Przewlocki R, Pawlak R. (2011). Neuropsin cleaves EphB2 in the amygdala to control anxiety. *Nature* 473, 372-375.
4. Bellaver, B., Povala, G., Ferreira, P.C.L., Ferrari-Souza, J.P., Leffa, D.T., Lussier, F.Z., Benedet, A.L., Ashton, N.J., Triana-Baltzer, G., Kolb, H.C., Tissot C, Therriault J, Servaes S, Stevenson J, Rahmouni N, Lopez OL, Tudorascu DL, Villemagne VL, Ikonovic MD, Gauthier S, Zimmer ER, Zetterberg H, Blennow K, Aizenstein HJ, Klunk WE, Snitz BE, Maki P, Thurston RC, Cohen AD, Ganguli M, Karikari TK, Rosa-Neto P, Pascoal TA. (2023). Astrocyte reactivity influences amyloid- β effects on tau pathology in preclinical Alzheimer's disease. *Nat Med* 29, 1775-1781.
5. Bellenguez, C., Küçükali, F., Jansen, I.E., Kleindam, L., Moreno-Grau, S., Amin, N., Naj, A.C., Campos-Martin, R., Grenier-Boley, B., Andrade, V., Holmans PA, Boland A, Damotte V, van der Lee SJ, Costa MR, Kuulasmaa T, Yang Q, de Rojas I, Bis JC, Yaquub A, Prokic I, Chapuis J, Ahmad S, Giedraitis V, Aarsland D, Garcia-Gonzalez P, Abdelnour C, Alarcón-Martín E, Alcolea D, Alegret M, Alvarez I, Álvarez V, Armstrong NJ, Tsolaki A, Antúnez C, Appollonio I, Arcaro M, Archetti S, Pastor AA, Arosio B, Athanasiu L, Bailly H, Banaj N, Baquero M, Barral S, Beiser A, Pastor AB, Below JE, Benček P, Benussi L, Berr C, Besse C, Bessi V, Binetti G, Bizarro A, Blesa R, Boada M, Boerwinkle E, Borroni B, Boschi S, Bossù P, Bråthen G, Bressler J, Bresner C, Brodaty H, Brookes KJ, Brusco LI, Buiza-Rueda D, Bürger K, Burholt V, Bush WS, Calero M, Cantwell LB, Chene G, Chung J, Cuccaro ML, Carracedo Á, Cecchetti R, Cervera-Carles L, Charbonnier C, Chen HH, Chillotti C, Ciccone S, Claassen JAHR, Clark C, Conti E, Corma-Gómez A, Costantini E, Custodero C, Daian D, Dalmaso MC, Daniele A, Dardiotis E, Dartigues JF, de Deyn PP, de Paiva Lopes K, de Witte LD, Debette S, Deckert J, Del Ser T, Denning N, DeStefano A, Dichgans M, Diehl-Schmid J, Diez-Fairen M, Rossi PD, Djurovic S, Duron E, Düzel E, Dufouil C, Eiriksdottir G, Engelborghs S, Escott-Price V, Espinosa A, Ewers M, Faber KM, Fabrizio T, Nielsen SF, Fardo DW, Farotti L, Fenoglio C, Fernández-Fuertes M, Ferrari R, Ferreira CB, Ferri E, Fin B, Fischer P, Fladby T, Fließbach K, Fongang B, Fornage M, Fortea J, Foroud TM, Fostinelli S, Fox NC, Franco-Macías E, Bullido MJ, Frank-García A, Froelich L, Fulton-Howard B, Galimberti D, García-Alberca JM, García-González P, Garcia-Madrona S, Garcia-Ribas G, Ghidoni R, Giegling I, Giorgio G, Goate AM, Goldhardt O, Gomez-Fonseca D, González-Pérez A, Graff C, Grande G, Green E, Grimmer T, Grünblatt E, Grunin M, Gudnason V, Guetta-Baranes T, Haapasalo A, Hadjigeorgiou G, Haines JL,

Hamilton-Nelson KL, Hampel H, Hanon O, Hardy J, Hartmann AM, Hausner L, Harwood J, Heilmann-Heimbach S, Helisalmi S, Heneka MT, Hernández I, Herrmann MJ, Hoffmann P, Holmes C, Holstege H, Vilas RH, Hulsman M, Humphrey J, Biessels GJ, Jian X, Johansson C, Jun GR, Kastumata Y, Kauwe J, Kehoe PG, Kilander L, Ståhlbom AK, Kivipelto M, Koivisto A, Kornhuber J, Kosmidis MH, Kukull WA, Kuksa PP, Kunkle BW, Kuzma AB, Lage C, Laukka EJ, Launer L, Lauria A, Lee CY, Lehtisalo J, Lerch O, Lleó A, Longstreth W Jr, Lopez O, de Munain AL, Love S, Löwemark M, Luckcuck L, Lunetta KL, Ma Y, Macías J, MacLeod CA, Maier W, Mangialasche F, Spallazzi M, Marquié M, Marshall R, Martin ER, Montes AM, Rodríguez CM, Masullo C, Mayeux R, Mead S, Mecocci P, Medina M, Meggy A, Mehrabian S, Mendoza S, Menéndez-González M, Mir P, Moebus S, Mol M, Molina-Porcel L, Montreal L, Morelli L, Moreno F, Morgan K, Mosley T, Nöthen MM, Muchnik C, Mukherjee S, Nacmias B, Ngandu T, Nicolas G, Nordestgaard BG, Olaso R, Orellana A, Orsini M, Ortega G, Padovani A, Paolo C, Papenberg G, Parnetti L, Pasquier F, Pastor P, Peloso G, Pérez-Cordón A, Pérez-Tur J, Pericard P, Peters O, Pijnenburg YAL, Pineda JA, Piñol-Ripoll G, Pisanu C, Polak T, Popp J, Posthuma D, Priller J, Puerta R, Quenez O, Quintela I, Thomassen JQ, Rábano A, Rainero I, Rajabli F, Ramakers I, Real LM, Reinders MJT, Reitz C, Reyes-Dumeyer D, Ridge P, Riedel-Heller S, Riederer P, Roberto N, Rodriguez-Rodriguez E, Rongve A, Allende IR, Rosende-Roca M, Royo JL, Rubino E, Rujescu D, Sáez ME, Sakka P, Saltvedt I, Sanabria Á, Sánchez-Arjona MB, Sanchez-Garcia F, Juan PS, Sánchez-Valle R, Sando SB, Sarnowski C, Satizabal CL, Scamosci M, Scarmeas N, Scarpini E, Scheltens P, Scherbaum N, Scherer M, Schmid M, Schneider A, Schott JM, Selbæk G, Seripa D, Serrano M, Sha J, Shadrin AA, Skrobot O, Slifer S, Snijders GJL, Soininen H, Solfrizzi V, Solomon A, Song Y, Sorbi S, Sotolongo-Grau O, Spalletta G, Spottke A, Squassina A, Stordal E, Tartan JP, Tárraga L, Tesí N, Thalamuthu A, Thomas T, Tosto G, Traykov L, Tremolizzo L, Tybjærg-Hansen A, Uitterlinden A, Ullgren A, Ulstein I, Valero S, Valladares O, Broeckhoven CV, Vance J, Vardarajan BN, van der Lugt A, Dongen JV, van Rooij J, van Swieten J, Vandenberghe R, Verhey F, Vidal JS, Vogelgsang J, Vyhnalek M, Wagner M, Wallon D, Wang LS, Wang R, Weinhold L, Wiltfang J, Windle G, Woods B, Yannakouli M, Zare H, Zhao Y, Zhang X, Zhu C, Zulaica M; EADB; GR@ACE; DEGESCO; EADI; GERAD; Demgene; FinnGen; ADGC; CHARGE; Farrer LA, Psaty BM, Ghanbari M, Raj T, Sachdev P, Mather K, Jessen F, Ikram MA, de Mendonça A, Hort J, Tsolaki M, Pericak-Vance MA, Amouyel P, Williams J, Frikke-Schmidt R, Clarimon J, Deleuze JF, Rossi G, Seshadri S, Andreassen OA, Ingelsson M, Hiltunen M, Sleegers K, Schellenberg GD, van Duijn CM, Sims R, van der Flier WM, Ruiz A, Ramirez A, Lambert JC. (2022). New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. *Nat Genet* 54, 412-436.

6. Bellucci, A., Rosi, M.C., Grossi, C., Fiorentini, A., Luccarini, I., and Casamenti, F. (2007). Abnormal processing of tau in the brain of aged TgCRND8 mice. *Neurobiol Dis* 27, 328-338.

7. Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239-259.

8. Chang, S., Bok, P., Sun, C.-P., Edwards, A., and Huang, G.-J. (2016). Neuropsin Inactivation Has Protective Effects against Depressive-Like Behaviours and Memory Impairment Induced by Chronic Stress. *PLOS Genetics* 12, e1006356.
9. Chen, Y., and Yu, Y. (2023). Tau and neuroinflammation in Alzheimer's disease: interplay mechanisms and clinical translation. *J Neuroinflammation* 20, 165.
10. Chishti, M.A., Yang, D.S., Janus, C., Phinney, A.L., Horne, P., Pearson, J., Strome, R., Zuker, N., Loukides, J., French, J., Turner S, Lozza G, Grilli M, Kunicki S, Morissette C, Paquette J, Gervais F, Bergeron C, Fraser PE, Carlson GA, George-Hyslop PS, 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.
11. 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 GQ, Mucke L. (2011). Reversing EphB2 depletion rescues cognitive functions in Alzheimer model. *Nature* 469, 47-52.
12. Debela, M., Magdolen, V., Skala, W., Elsässer, B., Schneider, E.L., Craik, C.S., Biniossek, M.L., Schilling, O., Bode, W., Brandstetter, H., Goettig P. (2018). Structural determinants of specificity and regulation of activity in the allosteric loop network of human KLK8/neuropsin. *Scientific Reports* 8, 10705.
13. Denenberg, V.H. (1969). Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann N Y Acad Sci* 159, 852-859.
14. Deuschl, G., Maier, W. (2016). Leitlinie "Demenzen" (https://register.awmf.org/assets/guidelines/038-0131_S3-Demenzen-2016-07.pdf Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Fachgesellschaften e.V. (AWMF)).
15. 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 KH, Münster Y, Keyvani K. (2021). Genetic knockdown of Klk8 has sex-specific multi-targeted therapeutic effects on Alzheimer's pathology in mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* 47, 611-624.
16. Herring, A., Munster, Y., Akkaya, T., Moghaddam, S., Deinsberger, K., Meyer, J., Zahel, J., Sanchez-Mendoza, E., Wang, Y., Hermann, D.M., Arzberger T, Teuber-Hanselmann S, Keyvani K. (2016). Kallikrein-8 inhibition attenuates Alzheimer's disease pathology in mice. *Alzheimers Dement* 12, 1273-1287.
17. Herz, J., and Chen, Y. (2006). Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* 7, 850-859.
18. Hirata, A., Yoshida, S., Inoue, N., Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Taniguchi, M., Matsuyama, T., Kato, K., Iizasa, H., Kataoka, Y., Yoshida N, Shiosaka S. (2001). Abnormalities of synapses and neurons in the hippocampus of neuropsin-deficient mice. *Mol Cell Neurosci* 17, 600-610.

19. Hu, J., Lin, S.L., and Schachner, M. (2022). A fragment of cell adhesion molecule L1 reduces amyloid- β plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis* 13, 48.
20. Humeau, Y., and Choquet, D. (2019). The next generation of approaches to investigate the link between synaptic plasticity and learning. *Nat Neurosci* 22, 1536-1543.
21. Iqbal, K., Alonso, A., Gong, C., Khatoon, S., Kudo, T., Singh, T., and Grundke-Iqbal, I. (1993). Molecular pathology of Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 53, 325-335.
22. Ishikawa, Y., Horii, Y., Tamura, H., and Shiosaka, S. (2008). Neuropsin (KLK8)-Dependent and -Independent Synaptic Tagging in the Schaffer-Collateral Pathway of Mouse Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 28, 843-849.
23. Ishikawa, Y., Tamura, H., and Shiosaka, S. (2011). Diversity of neuropsin (KLK8)-dependent synaptic associativity in the hippocampal pyramidal neuron. *J Physiol* 589, 3559-3573.
24. Ising, C., Venegas, C., Zhang, S., Scheiblich, H., Schmidt, S.V., Vieira-Saecker, A., Schwartz, S., Albasset, S., McManus, R.M., Tejera, D., Griep A, Santarelli F, Brosseon F, Opitz S, Stunden J, Merten M, Kayed R, Golenbock DT, Blum D, Latz E, Buée L, Heneka MT. (2019). NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. *Nature* 575, 669-673.
25. Jia, J., Wei, C., Chen, S., Li, F., Tang, Y., Qin, W., Zhao, L., Jin, H., Xu, H., Wang, F., Zhou A, Zuo X, Wu L, Han Y, Han Y, Huang L, Wang Q, Li D, Chu C, Shi L, Gong M, Du Y, Zhang J, Zhang J, Zhou C, Lv J, Lv Y, Xie H, Ji Y, Li F, Yu E, Luo B, Wang Y, Yang S, Qu Q, Guo Q, Liang F, Zhang J, Tan L, Shen L, Zhang K, Zhang J, Peng D, Tang M, Lv P, Fang B, Chu L, Jia L, Gauthier S. (2018). The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide. *Alzheimers Dement* 14, 483-491.
26. Jiang, J., Wang, Z.H., Qu, M., Gao, D., Liu, X.P., Zhu, L.Q., and Wang, J.Z. (2015). Stimulation of EphB2 attenuates tau phosphorylation through PI3K/Akt-mediated inactivation of glycogen synthase kinase-3 β . *Sci Rep* 5, 11765.
27. Kawata, M., Morikawa, S., Shiosaka, S., and Tamura, H. (2017). Ablation of neuropsin-neuregulin 1 signaling imbalances ErbB4 inhibitory networks and disrupts hippocampal gamma oscillation. *Translational Psychiatry* 7, e1052-e1052.
28. Kent, S.A., Spires-Jones, T.L., and Durrant, C.S. (2020). The physiological roles of tau and A β : implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. *Acta Neuropathol* 140, 417-447.
29. Keyvani, K., Munster, Y., Kurapati, N.K., Rubach, S., Schonborn, A., Kocakavuk, E., Karout, M., Hammesfahr, P., Wang, Y.C., Hermann, D.M., Teuber-Hanselmann S,

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

30. Knobloch, M., and Mansuy, I.M. (2008). Dendritic Spine Loss and Synaptic Alterations in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology* 37, 73-82.

31. Konar, A., Kumar, A., Maloney, B., Lahiri, D.K., and Thakur, M.K. (2018). A serine protease KLK8 emerges as a regulator of regulators in memory: Microtubule protein dependent neuronal morphology and PKA-CREB signaling. *Scientific Reports* 8, 9928.

32. Kopeikina, K.J., Carlson, G.A., Pitstick, R., Ludvigson, A.E., Peters, A., Luebke, J.I., Koffie, R.M., Frosch, M.P., Hyman, B.T., and Spires-Jones, T.L. (2011). Tau accumulation causes mitochondrial distribution deficits in neurons in a mouse model of tauopathy and in human Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol* 179, 2071-2082.

33. Ladner, C.L., Yang, J., Turner, R.J., and Edwards, R.A. (2004). Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Anal Biochem* 326, 13-20.

34. Lanoiselée, H.M., Nicolas, G., Wallon, D., Rovelet-Lecrux, A., Lacour, M., Rousseau, S., Richard, A.C., Pasquier, F., Rollin-Sillaire, A., Martinaud, O., Quillard-Muraine M, de la Sayette V, Boutoleau-Bretonniere C, Etcharry-Bouyx F, Chauviré V, Sarazin M, le Ber I, Epelbaum S, Jonveaux T, Rouaud O, Ceccaldi M, Félician O, Godefroy O, Formaglio M, Croisile B, Auriacombe S, Chamard L, Vincent JL, Sauvée M, Marelli-Tosi C, Gabelle A, Ozsancak C, Pariente J, Paquet C, Hannequin D, Champion D; collaborators of the CNR-MAJ project. (2017). APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Med* 14, e1002270.

35. Liang, C.S., Li, D.J., Yang, F.C., Tseng, P.T., Carvalho, A.F., Stubbs, B., Thompson, T., Mueller, C., Shin, J.I., Radua, J., Stewart R, Rajji TK, Tu YK, Chen TY, Yeh TC, Tsai CK, Yu CL, Pan CC, Chu CS. (2021). Mortality rates in Alzheimer's disease and non-Alzheimer's dementias: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Healthy Longev* 2, e479-e488.

36. Livingston, G., Huntley, J., Sommerlad, A., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Brayne, C., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Costafreda SG, Dias A, Fox N, Gitlin LN, Howard R, Kales HC, Kivimäki M, Larson EB, Ogunniyi A, Orgeta V, Ritchie K, Rockwood K, Sampson EL, Samus Q, Schneider LS, Selbæk G, Teri L, Mukadam N. (2020). Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet* 396, 413-446.

37. 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.

38. Masliah, E., Mallory, M., Alford, M., DeTeresa, R., Hansen, L.A., McKeel, D.W., Jr., and Morris, J.C. (2001). Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* 56, 127-129.

39. Masopust, D., Sivula, C.P., and Jameson, S.C. (2017). Of Mice, Dirty Mice, and Men: Using Mice To Understand Human Immunology. *J Immunol* *199*, 383-388.
40. Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Yamasaki, H., Tamura, H., Nakamura, Y., and Shiosaka, S. (2003). NMDA-Dependent Proteolysis of Presynaptic Adhesion Molecule L1 in the Hippocampus by Neuropsin. *The Journal of Neuroscience* *23*, 7727-7736.
41. Mella, C., Figueroa, C.D., Otth, C., and Ehrenfeld, P. (2020). Involvement of Kallikrein-Related Peptidases in Nervous System Disorders. *Front Cell Neurosci* *14*, 166.
42. Mirra, S.S., Heyman, A., McKeel, D., Sumi, S.M., Crain, B.J., Brownlee, L.M., Vogel, F.S., Hughes, J.P., van Belle, G., and Berg, L. (1991). The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* *41*, 479-486.
43. Momota, Y., Yoshida, S., Ito, J., Shibata, M., Kato, K., Sakurai, K., Matsumoto, K., and Shiosaka, S. (1998). Blockade of neuropsin, a serine protease, ameliorates kindling epilepsy. *Eur J Neurosci* *10*, 760-764.
44. Moreno-Jiménez, E.P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., Ávila, J., and Llorens-Martín, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med* *25*, 554-560.
45. Münster, Y., Keyvani, K., and Herring, A. (2020). Inhibition of excessive kallikrein-8 improves neuroplasticity in Alzheimer's disease mouse model. *Experimental Neurology* *324*, 113115.
46. Nakamura, Y., Tamura, H., Horinouchi, K., and Shiosaka, S. (2006). Role of neuropsin in formation and maturation of Schaffer-collateral L1cam-immunoreactive synaptic boutons. *Journal of Cell Science* *119*, 1341-1349.
47. Nandi, A., Counts, N., Chen, S., Seligman, B., Tortorice, D., Vigo, D., and Bloom, D.E. (2022). Global and regional projections of the economic burden of Alzheimer's disease and related dementias from 2019 to 2050: A value of statistical life approach. *EClinicalMedicine* *51*, 101580.
48. Nebel, R.A., Aggarwal, N.T., Barnes, L.L., Gallagher, A., Goldstein, J.M., Kantarci, K., Mallampalli, M.P., Mormino, E.C., Scott, L., Yu, W.H., Maki PM, Mielke MM. (2018). Understanding the impact of sex and gender in Alzheimer's disease: A call to action. *Alzheimers Dement* *14*, 1171-1183.
49. Nichols, E., Steinmetz JD, other GBD Collaborators (2022). Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Public Health* *7*, e105-e125.

50. Nichols, E., Szeke C E I, other GBD collaborators (2019). Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* 18, 88-106.
51. Noda, Y., Kuzuya, A., Tanigawa, K., Araki, M., Kawai, R., Ma, B., Sasakura, Y., Maesako, M., Tashiro, Y., Miyamoto, M., Uemura K, Okuno Y, Kinoshita A. (2018). Fibronectin type III domain-containing protein 5 interacts with APP and decreases amyloid β production in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 11, 61.
52. Oka, T., Akisada, M., Okabe, A., Sakurai, K., Shiosaka, S., and Kato, K. (2002). Extracellular serine protease neuropsin (KLK8) modulates neurite outgrowth and fasciculation of mouse hippocampal neurons in culture. *Neuroscience Letters* 321, 141-144.
53. Pampaloni, F., Reynaud, E.G., and Stelzer, E.H. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 839-845.
54. Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., and Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14, 149-167.
55. Pillai-Kastoori, L., Schutz-Geschwender, A.R., and Harford, J.A. (2020). A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Anal Biochem* 593, 113608.
56. Rabinovici, G.D. (2021). Controversy and Progress in Alzheimer's Disease - FDA Approval of Aducanumab. *N Engl J Med* 385, 771-774.
57. Ringsevjen, H., Egbenya, D.L., Bieler, M., Davanger, S., and Hussain, S. (2023). Activity-regulated cytoskeletal-associated protein (Arc) in presynaptic terminals and extracellular vesicles in hippocampal synapses. *Front Mol Neurosci* 16, 1225533.
58. Ross, E.L., Weinberg, M.S., and Arnold, S.E. (2022). Cost-effectiveness of Aducanumab and Donanemab for Early Alzheimer Disease in the US. *JAMA Neurol* 79, 478-487.
59. Sahu, M.P., Nikkilä, O., Lågas, S., Kolehmainen, S., and Castrén, E. (2019). Culturing primary neurons from rat hippocampus and cortex. *Neuronal Signal* 3, Ns20180207.
60. Sánchez, C., Díaz-Nido, J., and Avila, J. (2000). Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol* 61, 133-168.
61. Sandelius, Å., Portelius, E., Källén, Å., Zetterberg, H., Rot, U., Olsson, B., Toledo, J.B., Shaw, L.M., Lee, V.M.Y., Irwin, D.J., Grossman M, Weintraub D, Chen-Plotkin A, Wolk DA, McCluskey L, Elman L, Kostanjevecki V, Vandijck M, McBride J, Trojanowski JQ, Blennow K. (2019). Elevated CSF GAP-43 is Alzheimer's disease specific and associated with tau and amyloid pathology. *Alzheimer's & Dementia* 15, 55-64.

62. Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C.E., Cummings, J., and van der Flier, W.M. (2021). Alzheimer's disease. *Lancet* 397, 1577-1590.
63. Schramm, S., Jokisch, M., Jöckel, K.H., Herring, A., and Keyvani, K. (2021). Is kallikrein-8 a blood biomarker for detecting amnesic mild cognitive impairment? Results of the population-based Heinz Nixdorf Recall study. *Alzheimers Res Ther* 13, 202.
64. Schramm, S., Krizanovic, N., Roggenbuck, U., Jöckel, K.H., Herring, A., Keyvani, K., and Jokisch, M. (2023). Blood Kallikrein-8 and Non-Amnesic Mild Cognitive Impairment: An Exploratory Study. *J Alzheimers Dis Rep* 7, 327-337.
65. Shimizu-Okabe, C., Yousef, G.M., Diamandis, E.P., Yoshida, S., Shiosaka, S., and Fahnestock, M. (2001). Expression of the kallikrein gene family in normal and Alzheimer's disease brain. *Neuroreport* 12, 2747-2751.
66. Shimizu, C., Yoshida, S., Shibata, M., Kato, K., Momota, Y., Matsumoto, K., Shiosaka, T., Midorikawa, R., Kamachi, T., Kawabe, A., Shiosaka S. (1998). Characterization of Recombinant and Brain Neuropsin, a Plasticity-related Serine Protease*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 11189-11196.
67. Sperling, R.A., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Bennett, D.A., Craft, S., Fagan, A.M., Iwatsubo, T., Jack, C.R., Jr., Kaye, J., Montine, T.J., Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster MV, Phelps CH. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7, 280-292.
68. Spires-Jones, T., and Knaf, S. (2012). Spines, plasticity, and cognition in Alzheimer's model mice. *Neural Plast* 2012, 319836.
69. Srivastava, N., Robichaux, M.A., Chenuaux, G., Henkemeyer, M., and Cowan, C.W. (2013). EphB2 receptor forward signaling controls cortical growth cone collapse via Nck and Pak. *Molecular and Cellular Neuroscience* 52, 106-116.
70. 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.
71. 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.
72. Tapia-Rojas, C., Cabezas-Opazo, F., Deaton, C.A., Vergara, E.H., Johnson, G.V.W., and Quintanilla, R.A. (2019). It's all about tau. *Prog Neurobiol* 175, 54-76.

73. Terayama, R., Bando, Y., Yamada, M., and Yoshida, S. (2005). Involvement of neuropsin in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 52, 108-118.
74. 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, Keyvani K. (2020). CSF and blood Kallikrein-8: a promising early biomarker for Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 91, 40-48.
75. 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.
76. Tzioras, M., McGeachan, R.I., Durrant, C.S., and Spires-Jones, T.L. (2023). Synaptic degeneration in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology* 19, 19-38.
77. van Dyck, C.H., Swanson, C.J., Aisen, P., Bateman, R.J., Chen, C., Gee, M., Kanekiyo, M., Li, D., Reyderman, L., Cohen, S., Froelich L, Katayama S, Sabbagh M, Vellas B, Watson D, Dhadda S, Irizarry M, Kramer LD, Iwatsubo T. (2023). Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* 388, 9-21.
78. Weerasinghe-Mudiyanselage, P.D.E., Ang, M.J., Kang, S., Kim, J.S., and Moon, C. (2022). Structural Plasticity of the Hippocampus in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* 23.
79. Whittington, M.D., Campbell, J.D., Rind, D., Fluetsch, N., Lin, G.A., and Pearson, S.D. (2022). Cost-Effectiveness and Value-Based Pricing of Aducanumab for Patients With Early Alzheimer Disease. *Neurology* 98, e968-e977.
80. WHO, W.H.O. (2023, 15.03.2023). Fact Sheet Dementia. Retrieved 12.10.2023, 2023
81. Xing, S., Pan, N., Xu, W., Zhang, J., Li, J., Dang, C., Liu, G., Pei, Z., and Zeng, J. (2019). EphrinB2 activation enhances angiogenesis, reduces amyloid- β deposits and secondary damage in thalamus at the early stage after cortical infarction in hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 39, 1776-1789.
82. Zhang, L., Qi, Z., Li, J., Li, M., Du, X., Wang, S., Zhou, G., Xu, B., Liu, W., Xi, S., Xu Z, Deng Y. (2021). Roles and Mechanisms of Axon-Guidance Molecules in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 58, 3290-3307.
83. Zhong, S., Pei, D., Shi, L., Cui, Y., and Hong, Z. (2019). Ephrin-B2 inhibits A β (25-35)-induced apoptosis by alleviating endoplasmic reticulum stress and promoting autophagy in HT22 cells. *Neurosci Lett* 704, 50-56.

9 TABELLARISCHER ANHANG

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kreuzungsschema transgener Klk8-Knockdown.....	22
Abbildung 2: Rekonstruktionsprozess Golgi-Cox Neurone.....	26
Abbildung 3: Schematischer Gelauftrag	36
Abbildung 4: Repräsentative Darstellung pyramidaler Neurone im Hippocampus.....	42
Abbildung 5: Apikale Spine-Dichte weiblicher Tiere.....	43
Abbildung 6: Basale Spine-Dichte weiblicher Tiere	44
Abbildung 7: Hippocampale Dendritenverzweigung weiblicher Tiere	45
Abbildung 8: Hippocampale Dendritenlänge weiblicher Tiere	46
Abbildung 9: Hippocampale Dendritenkomplexität weiblicher Tiere.....	47
Abbildung 10: Analyse des Tau Metabolismus transgener Tiere	49

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Material Zellkultur primäre Neurone.....	29
Tabelle 2: Lösungen zur Proteinextraktion.....	31
Tabelle 3: Lösungen zur Proteinkonzentrationsbestimmung	32
Tabelle 4: Lösungen und Puffer zur Fluoreszenz SDS-PAGE.....	34
Tabelle 5: Puffer zur Probenvorbereitung	35
Tabelle 6: Puffer Gelelektrophorese und Blotting.....	37
Tabelle 7: Primär- und Sekundärantikörper	38
Tabelle 8: Strippingpuffer	39

9.3 Chemikalienverzeichnis

Chemikalien:	Hersteller
Acrylamid- Stammlösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
2-4-2-Hydroxyethyl-1-Piperazinyl-Ethansulfonsäure (HEPES)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Anti-Mouse, A3682	Sigma Aldrich, Taufkirchen, BRD
Anti-Rabbit-HRP, 111-035-003	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. 872 West Baltimore Pike. West Grove, PA, US
Anti-Tau, 210-241	Sigma Aldrich, Taufkirchen, BRD
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
B27 (2%) (17504-044)	Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK
Betaglycerophosphat	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
BSA Proteinstandard	5000007, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA, München
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
Colour Prestained Starndard Protein Ladder 10-230kDA	Biolabs, New England, USA
DC™ Protein Assay Kit II	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA, München, BRD
Deoxycholat	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
DEPC	Invitrogen Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, USA
destilliertes Wasser (Aqua dest)	Braun Meisingen AG, Meisingen, BRD
DNase	Worthington Biochemical Corporation
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
EGTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
Eisessig (1%)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
Ethansäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
Glucose	Serva Electrophoresis, Heidelberg, BRD
GlutaMAX™ (1%) (35050-061)	Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK
Glycerol	Merck, Darmstadt, BRD
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
Golgi- Cox Färbung PK401-A FD Rapid GolgiStain Kit	FD Technologies
Guanidin Hydrochlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, BRD
Magermilchpulver	Sigma Aldrich, Taufkirchen, BRD

Methanol	J.T. Baker, Avantor Performance Materials, Center Valley, USA
N,N,N',N'- Tetramethylethylenamin (TEMED)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natrium- Desoxychololat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD GmbH, Karlsruhe, BRD
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Natriumhydrogenpyrophosphat	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Natriumorthovandate	AppliChem, Darmstadt, Germany
NP-40 (Nonidet p40)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Papain	Worthington Biochemical Corporation
Penicillin Streptomycin (1%) (15140-12-2)	Gibco, Life Technologies Limited, Paisley, UK
Phenantroline	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Phospho-Tau, 44-752G	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
PMSF (Phenylmethansulfonyl Fluorid)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Poly-D Lysin (P6407)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Ponceau-S	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
Proteaseinhibitor Cocktail (P8340)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Proteinstandard	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA, München, BRD
Reagenz A	5000113, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA, München
Reagenz B	5000114, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA, München
Reagenz S	5000115, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA, München
RNaseZap- Solution	Ambion Incl. Austin, Tx, USA
SDS (Sodiumdodecylsulfat) ultra pure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 10%	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Tris pH 6,8	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
Tris pH 8,0	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
TRIzol™ Reagent, Invitrogen™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Trypsininhibitor	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Tween 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD
XTT Kit (9095S)	Cell Signaling Technology
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD

9.4 Verzeichnis Material, Geräte, Software

Gerät/Software	Bezeichnung	Hersteller
12- Well Platte	Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Oberösterreich
24- Well Platte	Nunclon™ Delta Surface	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA
96-Well Platte	Nunc™ MicroWell™ 96-Well Platte	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA
Bildprogramm (inklusive Digitalkamera)	ChemiDoc XRS+ System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Bildsoftware	Quantity-One 1D Analysis Software	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Binocular		Carl Zeiss
Blottingkammer		Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Elektrophoresekammer	Mini Protean® Tetra Cell Casting	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Eppendorf Gefäße		Eppendorf AG
Falcon Röhrchen		Oehmen
Lichtmikroskop	Nikon Eclipse 80i	Nikon
Magnetrührer	RCT classic	IKA
MultiScan FC		Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA
Nitrozellulosemembran	Protan Nitrocellulose Membrane Filters	VWR International GmbH
Photometer	MultiskanFC Bio-Photometer	Thermo Scientific Eppendorf AG
Pipetten	Pipetus standard	Hirschmann Laborgeräte
Polyacrylamid Gele (16,5%)		Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Quantifizierungssoftware	ImageLab 2.0	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Rekonstruktionssoftware	NeuroExplorer Software	MicroBrightfield
Spannungsquelle (Westernblot)	PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Statistiksoftware	SPSS	IBM Company
Statistiksoftware	Graphpad Prism	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Stereologiesoftware	NeuroLucida 11	MicroBrightfield
Sterilbank	Haereus Bio Flow	HERAsafe®
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf AG
Vakuumpumpe	HLC	Oehmen
Video Software	Video Mot 3D Software (Version 7.0.1)	TSE Systems Inc., Chesterfield, USA
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries

Waage	TE3102S	Sartorius AG
Wasserbad		Gesellschaft für Labortechnik, Buchwedel, BRD
Zellkammer	Neubauer Zellkammer	Brandt GmbH
Zentrifuge	Haereus Pico 17	Thermo Scientific Eppendorf AG
Zentrifuge	Haereus Megafuge	Thermo Scientific Eppendorf AG

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AD	<i>Alzheimer's disease</i>
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
APP-FL	<i>Amyloid Precursor Protein- full length</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AK	Antikörper
APOE-ε4	<i>Apolipoprotein E</i>
a.u.	<i>arbitrary units</i>
Aβ	Beta-Amyloid
CRND8	<i>Center of Research for Neurodegenerative Diseases</i>
CSF	cerebrospinal fluid
CERAD	<i>consortium to establish a registry for Alzheimer's disease</i>
CA1	Cornu ammonis Region 1
CTFβ	c-terminales Fragment β
DIV	<i>days in vitro</i>
DNA	<i>desoxyribonucleoid acid</i>
EOAD	<i>early onset Alzheimer's disease</i>
EPM	<i>elevated plus mace test</i>
EphB2	Ephrin B2
EtOH	Ethanol
FDG-PET	Fluordesoxyglucose-Positronenemmissionstomographie
hAPP	<i>human amyloid precursor protein</i>
p-Tau	hyperphosphoryliertes Tau
IL-1-β	Interleukin 1β
Klk8	murines Kallikrein 8
KLK8	Humanes Kallikrein 8
kDA	Kilodalton
KD	<i>Knockdown</i>
KO	<i>Knockout</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
LOAD	<i>late onset Alzheimer's disease</i>
MMP	Magermilchpulver
MRT	Magnetresonanztomographie
MCI	<i>mild cognitively impaired</i>
MMSE	<i>mini mental state examination</i>
mSry	<i>murine sex determining region</i>
mKlk8	murines Kallikrein 8
NFT	<i>neurofibrillary tangles</i>
L1-CAM	neuronales Zelladhäsionsmolekül 1
NRG-1	Neuroregulin 1
NOT	<i>novel object test</i>

OF	<i>open field test</i>
PHF	<i>paired helical filaments</i>
pSer396	phosphoreliertes Tau (Bindungsstelle Serin 396)
PDL	Poly-D-Lysin
P	postnataler Tag
PSEN 1/2	Präsenilin 1/2
RT	Raumtemperatur
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RNA	<i>ribonucleoid acid</i>
O ₂	Sauerstoff
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	<i>Standard Error of Mean</i>
SH	Standardhaltung
t-Tau	<i>total Tau</i>
Tg	transgen
TNF α	Tumornekrosefaktor α
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

11 DANKSAGUNG

Ich bedanke mich in erster Linie herzlichst bei Univ.-Prof. Dr.med. Kathy Keyvani für die Ermöglichung der Promotion an ihrem Institut sowie für die kontinuierliche Betreuung und ausgeprägte fachliche Unterstützung.

Weiterhin bedanke ich mich herzlichst bei Herrn Dr. rer. nat. Arne Herring und Frau Dr. rer. nat. Katharina Groll, die mir mit fachlichem Rat stets tatkräftig zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Frau Michaela Knoll und Frau Nicole Macha für die freundliche Einarbeitung im Labor und die zahlreichen Vorarbeiten, ohne die mein eigenes Projekt nicht hätte stattfinden können.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und insbesondere meinem Partner für die emotionale und technische Unterstützung sowie die stetige Bestärkung in meinen Vorhaben nicht nur während der Dissertation, sondern über das ganze Studium und darüber hinaus.

12 LEBENSLAUF

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