

Die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms durch RAN Peptide beim Morbus Huntington

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Dokortitels

Der hohen medizinischen Fakultät

Der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Raúl Nicolas Jamin

aus Essen

2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Patrick Weydt
2. Gutachter*in: Prof. Dr. med. Matthias Geyer
Institut für angeborene Immunität

Tag der Mündlichen Prüfung: 06.07.2023

Aus der Klinik für Neurodegenerative Erkrankungen
Direktor: Prof. Dr. med. Ullrich Wüllner

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1 Morbus Huntington	9
1.1.1 Prävalenz und Ätiologie	9
1.1.2 Pathophysiologie	11
1.1.3 Inflammation	14
1.1.4 Klinische Manifestationen	15
1.1.5 Therapie	16
1.2 RAN Translation	18
1.2.1 Pathomechanismus	18
1.2.2 RAN-Translation im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen	19
1.3 Inflammasome	24
1.3.1 Das NLRP3 Inflammasom	25
1.3.2 Das NLRP3 Inflammasom in neurodegenerativen Erkrankungen	27
1.4 Ansatz des Projektes und Fragestellung	29
2. Material und Methoden	31
2.1 Material	31
2.2 Methodischer Ansatz zur Beantwortung der Fragestellung	37
2.3 RAN-Protein Synthese	38
2.4 Huntingtin	38
2.5 Zellkultur	39
2.6 Inflammation priming und Zellstimulation	39
2.5 NLRP3 Inhibition	40
2.6 Phagozytoseassay	40
2.7 Western Blot	41
2.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	42
2.9 Zytokinarray	42
2.10 Zytotoxizität	43
2.11 Immunzytochemie	43

2.12	Statistische Analyse	44
3.	Ergebnisse	45
3.1	Interleukin-1 β Freisetzung.....	45
3.2	NLRP3-Inflammasom Inhibition und Priming	48
3.3	Behandlung mit Huntingtin	50
3.4	Phagozytose.....	52
3.5	Degradation	54
3.6	Immunzytochemie	54
3.7	Zytotoxizität	55
3.8	Weitere inflammatorische Pathways	56
4.	Diskussion	58
5.	Zusammenfassung.....	66
6.	Abbildungsverzeichnis	68
7.	Tabellenverzeichnis	69
8.	Literaturverzeichnis	70
9.	Danksagung	96

Abkürzungsverzeichnis

AIM2	Absent-in-Melanoma 2
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AS	Aminosäure
ASC	Apoptosis Associated Speck like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain
ASO	Antisense Oligonucleotide
A β	Amyloid Beta
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
C9ORF72	Chromosome 9 Open Reading Frame 72
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain
CNBP	Cellular Nucleic Acid binding Protein
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DAMP	Damage/Danger Associated Molecular Pattern
DM1	Myotone Dystrophie Typ 1
DMPK	Dystrophia Myotonica Proteinkinase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FADD	Fas-Associating Death Domain-Containing Protein
FECD	Fuchssche Endotheliale Korneale Dystrophie
FTD	Frontotemporale Demenz
GABA	gamma-Aminobutyric Acid
HD	Huntington's disease
HEAT	Huntingtin, Elongation Factor 3 (EF3), Protein Phosphatase 2 A (PP2A), Yeast Kinase TOR1
HTT	Huntingtin (Protein)
HTTex1	Huntingtin Exon 1 (Protein)
IRES	Internal Ribosome Entry Site
iPSC	induced Pluripotent Stem Cell
LRR	Leucine Rich Repeat
metRNA	methylated RNA
mHtt	mutated Huntingtin

LNA	locked nucleic acid
MBLN1	Muscleblind Like Splicing Regulator
NFT	Neurofibrillary Tangle
NLR	NOD-like Receptor
NLRP3	NLR family Pyrin Containing 3
NFKB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-Cells
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
ORF	Open Reading Frame
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC	Peripheral Blood Monocytes
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline + Tween
polyAla	poly Alanin
polyCys	poly Cystein
polyGln/polyQ	poly Glutamin
polyLeu	poly Leucin
polySer	poly Serin
PTM	Posttranslationale Modifikation
PRD	Proline Rich Domain
PRR	Pattern Recognition Receptor
RAN	Repeat-Associated-Non-ATG-induced
RCT	Randomised Controlled Trial
SCA8	Spinocerebelläre Ataxie 8
siRNA	silencing RNA
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOD1	Superoxiddysmutase 1
TDP43	Transactive response DNA-binding protein-43
UTR	Untranslated Region
wtHtt	wild type Huntingtin
ZFP	Zinkfingerprotein
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Morbus Huntington

1.1.1 Prävalenz und Ätiologie

Die 1872 durch George Huntington erstmals beschriebene Chorea Huntington (Huntington, 1872) ist eine der häufigsten monogenetischen neurodegenerativen Erkrankungen des Erwachsenenalters und folgt einem autosomal dominantem Vererbungsmuster. Verursacht wird die Erkrankung durch eine pathologische Expansion eines CAG Trinukleotids im Exon 1 des Huntingtin Gens (Htt) auf dem Chromosom 4p16.3., welches für das ubiquitär vorkommende Huntingtin Protein (Sadou und Humbert, 2016) codiert. Erstmals als ursächlich für diese Erkrankung identifiziert wurde das Htt 1993 (Macdonald, 1993). Metaanalysen fanden eine weltweite Prävalenz von 2.71 pro 100.000, wobei Prävalenzen in Nordamerika, Europa und Australien mit etwa 5.7/100.000 deutlich über denen in Asien mit etwa 0.4/100.000 liegen (Pringsheim et al., 2012). Die Inzidenz in westlichen Bevölkerungen wird zwischen 4.7 und 6.9 neuen Fällen pro Million geschätzt (Bates et al., 2015). Die regional deutlich unterschiedlichen Prävalenzen scheinen in einer in europäischstämmigen Populationen deutlich höheren durchschnittlichen Länge des CAG Repeats, dessen Expansion der Erkrankung zugrunde liegt (Bates et al., 2015), begründet zu sein (Squitieri et al., 1994). Während die durchschnittliche Repeatlänge in Asien bei 17.4 - 17.5 liegt, ist sie in Europa mit 18.4. - 18.6 höher. Ein weiterer Faktor, der eine reduzierte Häufigkeit besonders in Afrika erklären könnte, ist die geringere Durchführung von Testungen und unsichere Studienlage (Kremer et al., 1994).

Physiologische Repeatlängen im Htt liegen zwischen 3 und 35 CAG Repeats, eine Repeatlänge von > 40 ist mit einer vollständigen Penetranz der Erkrankung assoziiert (Langbehn et al., 2004). Höhere Repeatlängen sind mit einem früheren Erkrankungsbeginn vergesellschaftet (Rosenblatt et al., 2006), wobei die Länge des Repeats invers mit dem Erkrankungsalter korreliert. Insgesamt scheint die Repeatlänge als wichtigster Prädiktor zu etwa 60 % für den Zeitpunkt des Erkrankungsbeginnes verantwortlich zu sein, eine Vielzahl anderer Faktoren kann jedoch ebenfalls einen Einfluss auf diesen haben (Shelbourne et al., 2007). In juvenilen Formen der Erkrankung

werden Repeatlängen bis > 200 beobachtet, diese Expansionen führen zu einem frühen Erkrankungsbeginn mit disseminierter neurologischer und neuropsychiatrischer Pathologie und frühem Tod der Betroffenen, auch wenn derartige Repeatexpansionen äußerst selten sind (Quarrell et al., 2012): nur etwa 50% der von der juvenilen Form betroffenen Patienten zeigen Repeatlängen > 60 (Quarrell et al., 2013). Insgesamt ist die juvenile Form von HD jedoch selten, gepoolte Metaanalysen geben einen ungefähren Anteil von knapp unter 5% an allen Erkrankungsfällen an, wobei die Mehrheit der Fälle als „adolescent onset“ gewertet wird. Eine frühkindliche Manifestation ist nur für knapp über 1% der Fälle beschrieben (Quarrell et al., 2012). Für Repeatlängen zwischen 35 und 39 wird eine inkomplette Erkrankungspenetranz beschrieben (Nance et al., 1998). Mit steigender Repeatlänge erhöht sich das Risiko meiotischer Instabilität, wobei eine stärkere Tendenz zur Transmission verlängerter als verkürzter Repeats besteht (Wheeler et al., 2007). So kann das Risiko, bei einer parentalen Repeatlänge von 35 Repeats eine Repeatlänge von 36 zu vererben bis zu 21% betragen. Insbesondere bei der väterlichen Transmission ist das Risiko zur Vererbung verlängerter Repeats erhöht (Semaka et al., 2013). Erkrankungsalter und -schwere werden hierbei vollständig dominant durch den längeren CAG Repeat bestimmt, der kürzere CAG Repeat scheint unabhängig von seiner genauen Länge keine Rolle für den Erkrankungsverlauf zu spielen (Lee et al., 2012).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass es im Rahmen einer sogenannten somatischen Instabilität im Krankheitsverlauf auch interindividuell zur weiteren Verlängerung des CAG Repeats auch in nicht-replizierenden Zellen kommen kann. Durch diese Variante der Instabilität können auch nicht primär betroffene Zellen im individuellen Lebensverlauf die für eine Krankheitsmanifestation notwendige Repeatlänge überschreiten. Interessanterweise sind von dieser Instabilität besonders die im Krankheitsbild implizierten Zellen betroffen, so zeigen Neurone längere Zugewinne als Glia, Expansionen sind darüber hinaus im Striatum prominenter als im Cortex. Eine Korrelation von Arealen mit besonders verlängerten Repeats und spezifisch geschädigten Arealen in HD konnte jedoch nicht eindeutig hergestellt werden, dementsprechend ist das genaue Ausmaß, in dem diese Instabilität zur Pathologie beiträgt unklar (Shelbourne et al., 2007).

1.1.2 Pathophysiologie

Mit der Identifikation der Mutation im Huntington Gen ist die Ursache von HD seit 1993 eindeutig bekannt (Macdonald, 1993). Die überwiegende Mehrzahl der Hypothesen zur Pathophysiologie der Erkrankung befassen sich mit toxischen Effekten, die durch genetisch bedingte Veränderungen des Huntingtinproteins vermittelt sind.

Das ubiquitär vorkommende Huntingtinprotein ist in seiner physiologischen Form ein aus 3144 Aminosäuren bestehendes Protein mit einer Masse von 348 Kilodalton. Der Hauptbestandteil des Proteins sind sogenannte HEAT Repeats (Huntingtin, Elongation Factor 3 (EF3), Protein Phosphatase 2 A (PP2A), Yeast Kinase TOR1), Einheiten von circa 50 Aminosäuren, die von für posttranslationale Modifikationen (PTM) verantwortlichen disordered structures getrennt werden (Bates et al., 2015). Die HEAT Repeats bestehen aus zwei antiparallelen Alpha-Helices mit Haarnadelkonfiguration, die zusammen eine superhelikale hydrophobe Struktur bilden (Ross und Tabrizi, 2011). Die auf dem CAG Repeat basierende polyQ Sequenz am N-terminalen Ende des Htt ist 23 Repeats lang und wird von einer N-terminalen Sequenz von 17 AS sowie einer Proline Rich Domain (PRD) von 51 AS flankiert, diese drei Untereinheiten bilden das Htt exon 1 (Httex1). Eine genaue elektronenmikroskopische Darstellung des Htt bis auf eine Auflösung von 4Å wurde zuletzt durch Guo et. al publiziert (Guo et al., 2018). Huntingtin wird ubiquitär exprimiert, wobei gewebespezifische Variabilität mit deutlich gesteigerter Expression in neuronalem Gewebe besteht (Li et al., 1993). Innerhalb des neuronalen Gewebes ist die Expression von Htt nicht auf von HD betroffene Regionen limitiert, so kann Htt sowohl in verschiedenen striatalen Projektionsneuronen und Interneuronen, als auch in Cortex, Hippocampus und Cerebellum nachgewiesen werden (Saudou und Humbert, 2016).

Die physiologische Funktion des Htt ist nur unvollständig bekannt, allerdings ist es in einer Vielzahl von metabolischen Signalwegen involviert. Die aus einer Htt Inaktivierung resultierende Nonviabilität von Mausembryonen impliziert eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung (Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995), über verschiedene Mechanismen ist Htt an der neuronalen Entwicklung beteiligt (Saudou und Humbert, 2016). Mutationen führen zur Kompromittierung der neuronalen Homöostase (Molero et al., 2009). Weiterhin spielt Htt eine Rolle in BDNF Produktion und Transport sowie der

Vermittlung von Zell-Zell Interaktionen (Zuccato und Cattaneo, 2014). Ob die PolyQ Sequenz in physiologischer Länge relevante Funktionen einnimmt, ist weiterhin unklar (Wetzel, 2012). Vergangene Hypothesen bezüglich des Pathomechanismus von HD stellten vor Allem den toxischen Funktionsgewinn des mutierten Huntingtins in den Vordergrund, neuere Betrachtungen sehen zusätzlich einen Funktionsverlustmechanismus in der Neurogenese als Teil der Pathologie von HD (van der Plas et al., 2020). Htt wird auch im physiologischen Kontext verschiedentlich posttranslational modifiziert, die durch die polyQ Verlängerung bedingte Konformationsänderung beeinflusst diese PTM und darüber auch die Toxizität der Proteinsegmente (Bates et al., 2015). Die häufigsten posttranslationalen Modifikationen sind verschiedene Phosphorylierungen von Htt, die einen protektiven Effekt mit Reduktion toxischer Proteineffekte zu bewirken scheinen (Wang et al., 2010).

Htt wird in Folge der Modifikationen von Proteasen gespalten, worauf Fragmente mit der polyQ Sequenz in den Nukleus transloziert werden, wo sie im Kontext von HD durch Interferenz mit der Transkription einen Zelltod verursachen. Fragmente verschiedener Größe können in variablen Konzentrationen abhängig vom Ausmaß der Htt Expression des jeweiligen Zelltyps nachgewiesen werden, das kleinste Fragment, das in diesem Kontext durch alternatives Spleißen entsteht, ist das zuvor beschriebene Htt Exon1. Ausgelöst durch eine höhere Tendenz des mHtt zur „Self-aggregation“ und Formierung unphysiologischer Konformationen kommt es zur Bildung von Htt-haltigen Einschlusskörperchen verschiedener Größe. Größere Inklusionen tragen vermutlich nicht zur Toxizität bei, sie fungieren im Gegenteil als protektive Maßnahme zur Reduktion von löslichem toxischen mutiertem Htt (Miller et al., 2010), die Rolle kleinerer Htt-Aggregate in der HD-Pathologie ist jedoch nicht ausreichend bekannt. Durch Expression von mutiertem Htt kommt es zu komplexen Schädigungen verschiedenster nachgelagerter Prozesse. Die Anfälligkeit von Zellen für eine Htt-induzierte Schädigung hängt hierbei von verschiedenen Faktoren ab (Valor, 2015). Es kommt zur Interferenz mit Transkription und intrazellulärer Kommunikation und Transport (Ross und Tabrizi, 2011) sowie dem Kollaps des Proteostasenetzwerkes (Balch et al., 2008). Schädigungen der mitochondrialen Funktion bedingen einen gestörten Energiehaushalt in den von HD betroffenen zerebralen Regionen (Choo, 2004; Reddy und Shirendeb, 2012)Johri et al., 2013). Es kommt des

Weiteren zu Funktionsschädigungen der Synapsen (Nithianantharajah und Hannan, 2013) und weiteren intrazerebralen Signalwegen. Über durch Schädigung der Synapsen bedingte systemische Homöostasestörungen können auch nicht primär durch HD Pathologie implizierte Zellen sekundär geschädigt werden (Bates et al., 2015). Darüber hinaus kann es zu Störungen des axonalen Transportes (Gunawardena et al., 2003) sowie der zellulären Eisenhomöostase kommen (Hilditch-Maguire, 2000). Die Implikation einer derartigen Vielzahl an Signalwegen verdeutlicht nicht nur die Komplexität der Pathologie von HD, sondern impliziert darüber hinaus eine Vielzahl potentieller Ziele für prospektive Therapiemöglichkeiten. Es ist nicht vollständig verstanden, wie eine derart geringfügige Veränderung in der Proteinstruktur des Htt derartige Konformationsänderungen und die damit postulierten Pathomechanismen auslösen kann.

Daher verdienen in den vergangenen Jahren entdeckte weitere Pathomechanismen in HD, welche mHtt-unabhängige Stoffwechselwege im Krankheitsverlauf implizieren, besondere Aufmerksamkeit. Neben der RAN Translation, auf welche im weiteren Verlauf dieser Abhandlung noch ausführlich eingegangen werden wird, wurde zuletzt auch ein aus der expandierten CAG RNA entstehender Krankheitsaspekt nachgewiesen (de Mezer et al., 2011; Mykowska et al., 2011; Tsoi et al., 2012). Tripletrepeatbasierte RNA zeigt eine Tendenz zur Formierung von Haarnadelstrukturen, welche wiederum als Proteinbindestellen fungieren (Jasinska, 2003; Krzyzosiak et al., 2012). Eine Interaktion von Proteinen mit derart veränderten Bindestellen bedingt Defekte in verschiedenen zellulären Mechanismen. Es kommt zur Sequestrierung von MBLN1, was zu Fehlregulationen im Splicing und reduzierter rRNA-Bildung führt, sowie zur Formierung von siRNA, welche in Folge für eine RNA-Interferenz verantwortlich ist (Nalavade et al., 2013). Nicht zuletzt entsteht RAN Translation an diesen RNA-Haarnadelstrukturen (Bañez-Coronel et al., 2015). Die möglichen therapeutischen Implikationen dieser RNA-vermittelten Pathologie wurden von Rué et al. gezeigt. Mittels selektiver Inhibition der expandierten CAG Repeats in Httex1 Transkripten mit LNA (locked nucleic acid) modified CTG komplementären ASOs (Antisense Oligonucleotides) konnte nicht nur in einem humanen neuronalen Zellmodell die CAG Repeat basierte siRNA Toxizität aufgehoben werden (Bañez-Coronel et al., 2012), sondern auch in einem in vivo R 6/2 Mausmodell motorische Defizite ohne Modulation der mHTT Level deutlich verbessert werden. Ob eine

derartige Transkriptionshemmung auch RAN-Translation inhibiert, ist aktuell noch nicht bekannt (Rué et al., 2016). Diese Untersuchungen verdeutlichen die Notwendigkeit zur weiteren Evaluation mHtt-unabhängiger pathologischer Signalwege in HD und deren möglichen Nutzen in der Entwicklung HD-spezifischer Therapiemöglichkeiten.

1.1.3 Inflammation

Neuronale und periphere Inflammation ist ein wichtiger Aspekt zahlreicher, wenn nicht aller neurodegenerativer Erkrankungen. Die angeborene Immunantwort besteht aus einer Vielzahl von Zellen, wobei Mikroglia und Astrozyten die wichtigste Funktion einnehmen. Mikroglia reagieren als wichtigste immunkompetente Zellen des ZNS (Ransohoff und Perry, 2009) auf eine Vielzahl neuronaler Insulte, darunter neben infektiösen und zytotoxischen Stimuli auch auf die Präsenz von Proteinaggregationen, mit der Ausschüttung verschiedener proinflammatorischer (wie zum Beispiel IL-1, IL-6 und TNF-alpha), aber auch antiinflammatorischer Zytokine, was im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen sowohl protektive als auch schädigende Auswirkungen auf das ZNS haben kann (Wes et al., 2016). Persistiert der Stimulus, führt die fortdauernde Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zu einem Zustand chronischer Inflammation. Inflammationsreaktionen als pathophysiologische Komponente sind für eine Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen beschrieben, darunter Alzheimer (Sarlus und Heneka, 2017; Venegas und Heneka, 2017; Dansokho und Heneka, 2018), Parkinson (Le et al., 2016) und ALS (Philips und Robberecht, 2011). Auch in HD spielt insbesondere das angeborene Immunsystem des ZNS eine Rolle in der Pathogenese (Valadão et al., 2020).

Im Verhältnis zu den meisten Organen ist für Immunzellen eine gesteigerte Expression von mHtt RNA beschrieben (Soulet und Cicchetti, 2011), so konnte für HD eine mit der Krankheitsschwere korrelierende Aktivierung von Mikroglia in klinischen HD Patienten (Pavese et al., 2006), aber auch eine mit striataler Dysfunktion korrelierende Mikrogliaaktivierung in prä-HD Patienten mittels PET Studien nachgewiesen werden. Darüber hinaus korrelierte die Akkumulation von Mikroglia in Cortex und Striatum mit dem Ausmaß des neuronalen Verlustes (Tai et al., 2007). Die in HD Patienten erhöhte Expression von mHtt in Mikroglia (Moscovitch-Lopatin et al., 2010) kann bereits ohne externe Stimuli zu einer Aktivierung proinflammatorischer Signalwege führen, es kommt

zur gesteigerten Expression und Aktivität von die myeloische Abstammung bestimmenden Faktoren sowie zu einer gesteigerten Fähigkeit zur Induktion von neuronalem Tod (Crotti et al., 2014). Unter diesem und anderen Gesichtspunkten wird von einem im Rahmen von HD bestehenden „priming“ und damit erhöhtem basalem proinflammatorischem Potential ausgegangen. Auch in R6/2 Mäusen, einem HD Mausmodell mit einem Transgen für Exon 1 des humanen Htt mit >150 CAG repeats, konnte in präsymptomatischen Tieren eine vermehrte Mikrogliaaktivität nachgewiesen werden (Simmons et al., 2007). Über Mikroglia kommt es des Weiteren zu einer verstärkten Aktivierung des Komplementsystems in HD (Singhrao et al., 1999). Mutiertes Htt fungiert außerdem als Auslöser für oxidativen Stress in neuronalen und nicht neuronalen Zellen (Hands et al., 2011; Wyttenbach, 2002). Der genaue Anteil zellschädigender und zellprotektiver Aspekte der in der HD-Pathologie involvierten Aktivierung von Mikroglia ist aktuell noch nicht bekannt.

Ebenso konnte in Patienten mit HD eine Inflammationsreaktion im Plasma und CSF nachgewiesen werden (Dalrymple et al., 2007; Leblhuber et al., 1998), erhöhte Niveaus von peripherem IL-6 konnten schon 15 Jahre vor Beginn klinischer Symptome gezeigt werden und korrelieren mit der Schwere der klinischen Symptome. HD Patienten zeigen darüber hinaus erhöhte Konzentrationen von IL-6, IL-8 und TNF alpha im Liquor (Björkqvist et al., 2008), was weitere Belege für eine systemische Inflammation lange vor klinischer Krankheitsmanifestation liefert. Das genaue Ausmaß beziehungsweise die klinische Relevanz peripherer Inflammation für den Krankheitsprozess ist allerdings nicht sicher bekannt (Valadão et al., 2020). Eine Infiltration peripherer Immunzellen in das CNS ist kein krankheitstypischer Prozess in HD (Vonsattel et al., o. J.).

1.1.4 Klinische Manifestationen

Die klinische Manifestation von HD wird durch drei Hauptaspekte charakterisiert, die Ausprägung der einzelnen Faktoren im individuellen Krankheitsfall ist dabei äußerst heterogen. Determinierender Faktor für den Beginn klinischer Symptome ist die Länge des CAG Repeats (Andrew et al., 1993; Duyao et al., 1993; Stine et al., 1993), jedoch spielen eine Reihe von genetischen Faktoren ebenfalls eine Rolle für den Zeitpunkt der Erstmanifestation. Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl motorischer, kognitiver und

bildgebender Prädiktoren für den weiteren Krankheitsverlauf (Tabrizi et al., 2013). Das mittlere Alter klinischer Erkrankungsmanifestationen liegt zwischen 46 und 48 Jahren (Maat-Kievit et al., 2002). Studien wie PREDICT-HD (Paulsen et al., 2014) demonstrieren, dass HD-Patienten bezüglich kognitiven Skalen, aber auch intrazerebraler Bildgebung, bereits Jahre vor der klinischen Erkrankungsmanifestation signifikante Abweichungen von gesunden Kontrollgruppen zeigen.

Patienten mit HD leiden unter verschiedenen Symptomen. Definierend für die Erkrankung sind motorische Störungen wie Chorea, jedoch auch Bradykinesien und Koordinationsschwierigkeiten, welche insbesondere in späten Krankheitsphasen dominieren (Bates et al., 2015; Ghosh und Tabrizi, 2018). Darüber hinaus zeigen sich neurokognitive Einschränkungen bereits ab einem frühen Erkrankungsalter (Dumas, 2013; Stout et al., 2011), welche in einer subkortikalen Demenz kumulieren (Aretouli und Brandt, 2010; Duff et al., 2010; Paulsen et al., 2014; Stout et al., 2011). Eine dritte Achse klinischer Manifestationen von HD stellen neuropsychiatrische Symptome wie Depression, Apathie und Reizbarkeit dar, welche ebenfalls bereits in frühen Krankheitsstadien manifest werden können (Julien et al., 2007; Tabrizi et al., 2009; Epping und Paulsen, 2011; Reedeker et al., 2012; Thompson et al., 2012). HD Patienten versterben durchschnittlich etwa 15-20 Jahre nach Erkrankungsbeginn vor allem an opportunistischen Infektionen, Auszehrung und kardiovaskulären Ereignissen (Heemskerk und Roos, 2012; Reedeker et al., 2012)

1.1.5 Therapie

Auch nach Jahrzehnten von Forschung auf dem Feld der Therapieoptionen von HD konnte bis dato noch keine kausale Therapiemöglichkeit gefunden werden. Momentan beschränkt sich die zugelassene Therapie auf Symptomkontrolle sowie Therapie von Begleitpathologien. Zur Behandlung der Chorea sind Tetrabenazin, ein Inhibitor des vesikulären Monoamintransporters, der zu einer Dopamindepletion im ZNS führt (Huntington Study Group, 2006), sowie Tiaprid, ein typisches Neuroleptikum und Dopaminrezeptorantagonist zugelassen (Wittgens et al., 1996). Eine Behandlung mit Tetrabenazin sollte insbesondere in Bezug auf das Nebenwirkungsspektrum, welches eine Verschlechterung der depressiven Symptomatik beinhalten kann, erst begonnen

werden, wenn die Patienten sich subjektiv durch die Bewegungsstörungen eingeschränkt fühlen (Jankovic und Roos, 2014).

Da im Mausmodell eine Reversion des HD Phänotyps durch HTT-Gen Inaktivierung und mHTT Suppression erreicht werden konnte (Yamamoto et al., 2000; Wang et al., 2014), wurden vielfältige Versuche unternommen, HD mittels Senkung der Htt Expression zu behandeln. Antisense-Oligonucleotide (ASOs) senken Htt pre-mRNA durch Bindung und Aktivierung von RNase. Selektive ASOs binden allelspezifisch mHtt durch Zielen auf SNPRs, die im Wildtyp nicht vorhanden sind. Nachteilig ist hier anzumerken, dass geographische Unterschiede in den SNP bestehen, und ein entsprechendes ASO nur für einen Teil der Patienten anwendbar ist. Nichtselektive ASOs inhibieren auch das physiologische wtHtt, wobei eine partielle Inhibition vom wtHtt bis dato keinen negativen Effekt in Studien zeigen konnte. Langzeitstudien zu dieser Fragestellung fehlen jedoch (Leavitt et al., 2020). Sowohl die Studien für ein nonselektives Htt Transkript ASO (Ionis-HTTtx) (clinicaltrials.gov, NCT 03761849) als auch für zwei selektive ASOs (PRECISION-HD1+2, clinicaltrials.gov, NCT 03225833, NCT 03225846) wurden zuletzt vorzeitig beendet, da sie trotz Absenkung der Htt Spiegel im Liquor keinen positiven klinischen Effekt zeigten, sondern möglicherweise den Krankheitsverlauf sogar negativ beeinflusst haben. Nachteile von ASOs sind darüber hinaus, dass sie bislang intrathekal appliziert werden müssen, da sie die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können, und aufgrund ihres Abbaus durch körpereigene Nukleasen nur für 3 - 4 Monate stabil sind. Eine weitere Herausforderung ist ihre Verteilung im Hirn und die Erreichbarkeit tieferer Hirnstrukturen (Frank et al., 2022).

Weiterhin befinden sich Therapeutika wie AMT-130, eine gegen Htt gerichtete mikro-RNA als RNA-Interferenztherapie, momentan in klinischen Studien (clinicaltrials.gov, NCT 04120493). Um die neuroinflammatorische Komponente von HD therapeutisch zu adressieren wird aktuell der Immunmodulator Laquinimod (Legato-HD, NCT 02215616) in einer Phase II Studie evaluiert. In den bisher verfügbaren Daten ergibt sich keine Verbesserung der Klinik oder Verlangsamung des Progresses, jedoch wird eine Verlangsamung der Atrophie vor allem im Caudatum beschrieben (Reilmann et al., o. J.).

1.2 RAN Translation

1.2.1 Pathomechanismus

Die Vielzahl von klinischen Studien zur Absenkung des Htt, die trotz „target-engagement“ keinen positiven Effekt auf den klinischen Verlauf zeigen konnten, zwingen dazu auch andere, Htt-Protein unabhängige Pathomechanismen zu betrachten. Für die vorliegende Arbeit ist besonders die bereits erwähnte RAN-Translation von Interesse. Die Möglichkeit von der kanonischen Translation abweichender Translationsmechanismen, die ohne klassische Induktion durch ein AUG/ATG Codon funktionieren, wird bereits seit längerem beispielsweise im Rahmen von ribosomalem Profiling untersucht (Ingolia et al., 2011). Verschiedene Mechanismen von nonkanonischer Translation sind in diesem Kontext beschrieben. Repeat-Associated non ATG induced Translation oder kurz RAN-Translation ist ein neuartiger Mechanismus unkonventioneller Translation, der 2011 zuerst von Zu et. Al. im Kontext der Spinocerebellären Ataxie Typ 8 (SCA8) beschrieben wurde (Zu et al., 2011). SCA8 ist eine seltene, autosomal dominant vererbte Ataxieform, bei der es zu einer CTG.CAG Repeatexpansion im ATXN8 Gen auf Chromosom 13q21 auf im Mittel 116 CTG Repeats kommt (Day et al., 2000; Moseley et al., 2006) und welche sich in zerebellärer Symptomatik, Motoneuronddefekten sowie kognitiven und psychiatrischen Symptomen äußert (Zeman, 2004). Nach Mutation und entsprechender Ausschaltung des ATXN8 polyGln Protein ATG Startcodons wurde das polyGln Expansionsprotein unverändert weiterexprimiert. Darüber hinaus zeigte sich, dass nicht-AUG/ATG-abhängige homopolymere Translationsprodukte (in diesem Fall poly Alanin und poly Serin) in allen Leserahmen entstehen, und dass eine Expression individueller RAN-Konstrukte von der Repeatlänge der Expansion abhängig ist (Zu et al., 2011). Zu et al. hypothetisierten, dass die Option von nicht-AUG/ATG-assoziierter Translation RNA-Strukturabhängig ist und auf der Bildung von Haarnadelstrukturen basiert. Frühere Arbeiten hatten bereits die Möglichkeit von Translationsmodifikation durch RNA Strukturen gezeigt (Kozak, 1989), hypothetisiert wurde eine Verzögerung der ribosomalen 40s Untereinheit, die eine Interaktion zwischen Met-tRNA, Anticodon und AUG/Non-AUG Initiationsort ermöglicht (Kochetov et al., 2007). Haarnadelstrukturen können darüber hinaus Initiationsfaktoren und ribosomale Untereinheiten an sogenannte Internal Ribosome Entry Sites (IRES) rekrutieren, über welche wiederum eine nicht-ATG-induzierte Translation stattfinden kann (Jackson et al., 2010). Die durch diesen

Mechanismus entstandenen RAN-Peptide zeigten Akkumulationstendenzen in von dem kanonischen polyGln abweichenden Regionen. So wurden RAN poly Ala in Purkinjezellen (Zu et al., 2011) und poly Ser in subkortikalen Teilen und der tiefen weißen Substanz des Cerebellums nachgewiesen. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown des Transkriptionsfaktors eIF3F die Ablagerung von RAN Peptiden im Gewebe reduzieren konnte (Ayhan et al., 2018). Grundsätzlich besteht die Möglichkeit verschiedener Translationsinitiationen für RAN-Translation in unterschiedlichen genetischen Konstrukten mit entsprechenden krankheitsspezifischen Prozessen.

1.2.2 RAN-Translation im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen

Seit der Entdeckung im Rahmen der Spinocerebellären Ataxie wurde RAN-Translation im Kontext mehrerer neurodegenerativer Erkrankungen nachgewiesen. C9orf72 Amyotrophe Lateralsklerose und Frontotemporale Demenz als häufigste genetische Variante sowohl von familiärer als auch sporadischer ALS/FTD wird durch eine dominant vererbte Repeatexpansion eines GGGGCC Repeats im ersten Intron des C9orf72-Gens auf Chromosom 9p21 verursacht (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). Die Repeatlänge kann hier von 2-25 Repeats in gesunden Individuen auf über 1000 Repeats verlängert sein (Renton et al., 2011). Inzwischen hat sich gezeigt, dass diese Mutation bidirektional transkribiert wird, die Transkripte werden auch durch RAN Translation übersetzt, was in der Bildung von C9-polyGlyPro (GP), c9-polyGlyArg(GR) und C9-polyGlyAla (PA) vom sense sowie GP,PA und C9-polyProArg (PR) vom antisense Strang resultiert (Ash et al., 2013; Gendron et al., 2013; Mori et al., 2013; Zu et al., 2013). Die RAN Produkte sind auch im Liquor von Patienten nachweisbar (Lehmer et al., 2017). Wie auch in anderen Erkrankungen mit RAN-Translation kommt es darüber hinaus zur Bildung RAN-proteinhaltiger Inklusionen in Neuronen. Interessanterweise sind hier die ersten Motoneurone, deren Verlust Haupttreiber der motorischen ALS Pathologie ist, nicht primär impliziert, hauptsächliches Ablagerungsmaterial in diesen Neuronen scheint pathologisches TDP-43 zu sein (Gomez-Deza et al., 2015). Das Ausmaß, in dem RAN-Peptide in C9orf72 zur Pathologie beitragen, ist dementsprechend unklar und ihre toxische Wirkung in endogen produzierten Leveln umstritten. Zwar konnte eine deutliche Toxizität von RAN-Peptiden per se in verschiedenen Zellkultur- und tierischen Modellen nachgewiesen werden (Kwon et al., 2014; Schludi et al., 2017; Zhang et al., 2018), jedoch

gibt es widersprüchliche Erkenntnisse zur Frage der in vivo Toxizität. Zur Untersuchung dieser Fragestellung entwickelte Mausmodelle zeigen ebenfalls divergierende Ergebnisse. Während in einigen Mausmodellen eine molekulare Pathologie mit RAN Akkumulation ohne Manifestation in Form von neuronalen oder motorischen Symptomen nachgewiesen wurde (Peters et al., 2015, S. 7), zeigten andere Modelle eine deutliche RAN abhängige Pathologie. In dem Modell von Liu et. Al entwickelten Mäuse ALS-typische Symptomatik wie Motorneuronverlust, kortikale Atrophie, Denervation, Gewichtsverlust und verringertes Überleben korrelierend mit dem Ausmaß und der Lokalisation RAN reicher neuronaler Inklusionen (Zu et al., 2013).

In entsprechenden Mausmodellen konnte durch Verwendung von RAN-spezifischen ASOs oder RAN Antikörpern, welche zu neuronalen Ablagerungen kolokalisieren, eine deutliche Symptommilderung erreicht werden (Jiang et al., 2016; Nguyen et al., 2020). Diese Ergebnisse verdeutlichen nicht nur die Komplexität von RAN Pathologie in vivo und die Schwierigkeiten einer adäquaten Abbildung der Prozesse im humanen System, sondern zeigen gleichzeitig, dass eine gezielte RAN Peptid-Behandlung eine neue zumindest symptomatische therapeutische Option in einem Erkrankungsfeld darstellen könnte, in welchem zum aktuellen Zeitpunkt effiziente Therapien zur Verlangsamung des Krankheitsprogresses fehlen.

RAN-Translation wurde darüber hinaus in einer Vielzahl weiterer Erkrankungen über verschiedene Repeats nachgewiesen. Im Fragile X Tremor Ataxia Syndrome (FXTAS) kommt es zur Expansion eines CGG Repeats im FMR1 Gen des X Chromosomes, via RAN-Translation werden dort aus dem GGC und GCG reading frame poly Gly und poly Ala Proteine, sowie aus dem antisense CCG poly Pro, poly Arg und poly Ala produziert (Todd et al., 2013). Auch hier kommt es zur Bildung RAN-haltiger Inklusionen in verschiedenen in der Krankheit implizierten zerebralen Regionen (Krans et al., 2016). Auch für mehrere Formen der Myotonen Dystrophie ist die Bildung von RAN-Peptiden beschrieben. In der Myotonen Dystrophie Typ 1 (DM1), einer auf einer massiven CAG-CTG Repeatexpansion in der 3'UTR des DMPK Gens basierenden Erkrankung mit multisystemischer Manifestation, bei der es zu Myotonie und progressivem Muskelverlust kommt (Machuca-Tzili et al., 2005), kommt es zur Bildung von DM1 polyGln Aggregaten in verschiedenen Körperzellen (Zu et al., 2011). Auch in der Myotonen Dystrophie Typ 2,

die auf einer CCTG Expansion im CNBP Gen basiert (Liquori et al., 2001) kommt es zur Bildung von zwei verschiedenen Tetrapeptiden via RAN-Translation: Leucin-Prolin-Alanin-Cystein (LPAC) und Glutamin-Alanin-Glyzin-Arginin (QAGR). Diese RAN-Peptide konnten in Cortex, Striatum und Hippocampus von DM2 Patienten nachgewiesen werden (Zu et al., 2017). Weitere Erkrankungen, für die RAN-Translation gezeigt werden konnte, sind die Spinocerebelläre Ataxie Typ 31 (Ishiguro et al., 2017) und die Fuchs'sche Endotheliale Corneale Dystrophie (FECD) (Soragni et al., 2018).

Die vorliegende Literatur zeigt, dass es sowohl Gemeinsamkeiten als auch deutliche Unterschiede zwischen den RAN-Translationen in den einzelnen Krankheitsentitäten gibt. Ein wiederkehrendes Motiv ist eine Abhängigkeit von der Repeatlänge, welche unter anderem für Huntington (Bañez-Coronel et al., 2012) und C9orf72 ALS/FTD (Zu et al., 2013) besteht. Darüber hinaus zeigt sich über mehrere Erkrankungen hinweg eine Tendenz zur Akkumulation in der weißen Substanz (Ayhan et al., 2018, S. 3; Bañez-Coronel et al., 2015; Zu et al., 2017) mit häufig begleitender Aktivierung des hirneigenen Immunsystems, beispielsweise von Caspase 3 in HD. Die geographisch variable Dichte der RAN Ablagerungen suggeriert lokalisierte Mechanismen, die RAN-Translation auslösen können (Cleary und Ranum, 2017). Eine weiterer Interessanter Aspekt von RAN-Translation ist die hypothetisierte Möglichkeit einer Propagation von Zelle zu Zelle. RAN-Peptide oder für RAN-Peptid Translation verantwortliche Faktoren werden zwischen Zellen in C9orf72 Zellmodellen weitergegeben (Westergard et al., 2016). Verschiedene Möglichkeiten, RAN-Translation therapeutisch zu limitieren, wurden bereits nachgewiesen. Wie bereits zuvor beschrieben besteht die Möglichkeit einer direkten Antikörperverwendung gegen RAN-Konstrukte (Nguyen et al., 2020) im Kontext des beschriebenen C9orf72 Mausmodells.

1.2.3 RAN-Translation in Morbus Huntington

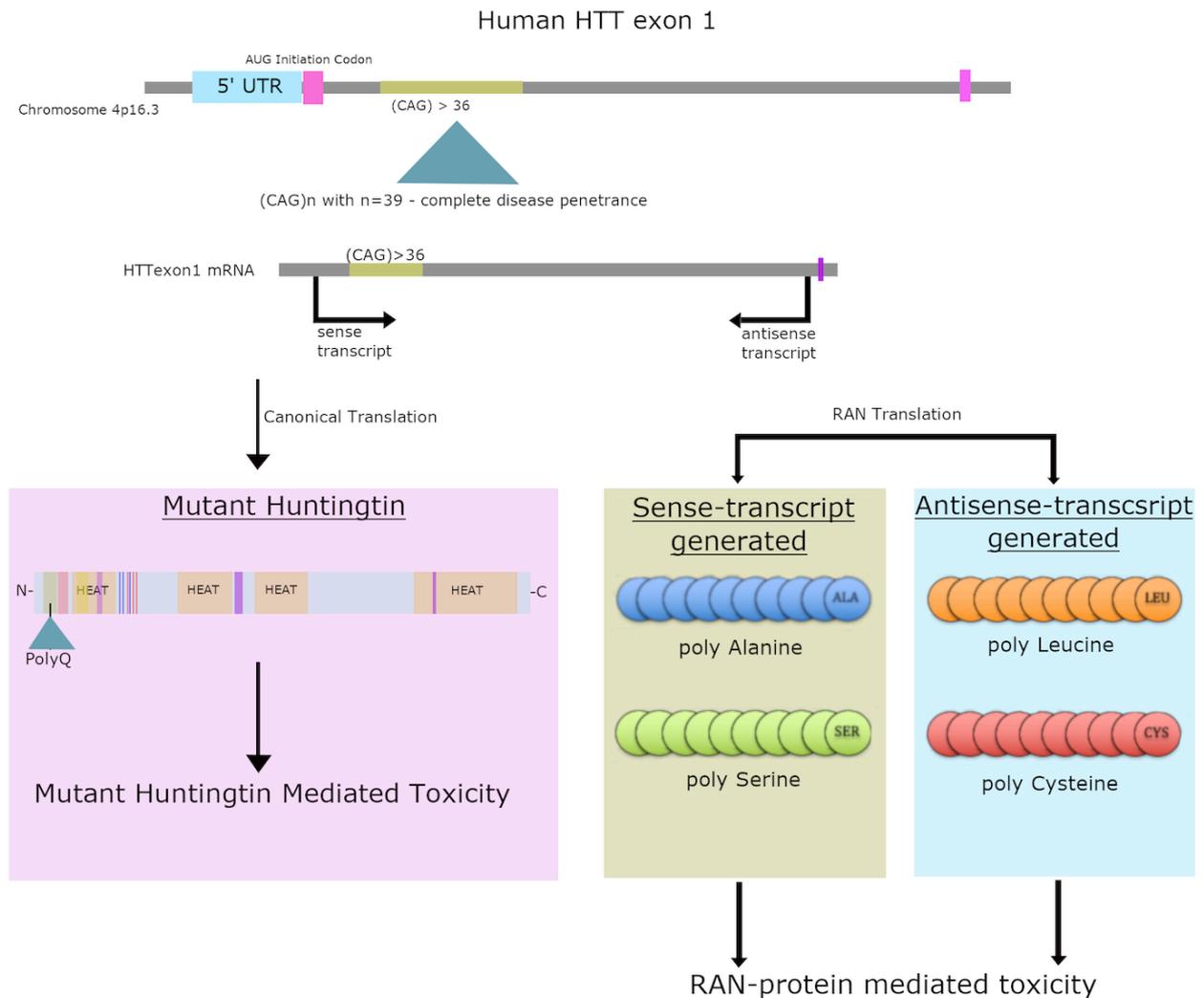


Abb. 1: modifiziert nach the Biology of Huntington (Saudou und Humbert, 2016): Schematische Darstellung der aus dem Htt Gen generierten Konstrukte

Einen signifikanten Anteil der bisher im Feld der Forschung bezüglich RAN-Translation in Huntington erfolgten Arbeit haben Bañez-Coronel et al. in ihrer 2015 publizierte Studie erbracht. Zunächst konnten sie nachweisen, dass in einem ORF des Httex1 mit 80 CAG Repeats poly Serin und poly Alanin RAN-Peptide auch in Abwesenheit eines AUG Startcodons exprimiert werden. Zum Vergleich verwendete CAG-23 und nicht-haarnadelformende CAA8 Konstrukte produzierten hingegen keine RAN-Peptide. Aus dem Antisensetranskript wurden poly Leucin (CUG) und poly Cystein (UGC) produziert.

In Folge wurden polyklonale Antikörper gegen die RAN Konstrukte entwickelt und verschiedene Regionen von Hirnschnitten von HD-Patienten auf die Präsenz von RAN getestet. Im Nucleus Caudatus und Putamen, zwei in HD besonders betroffenen Regionen, zeigte sich eine deutliche RAN Färbung in Neuronen sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch, darüber hinaus wurde RAN Färbung auch in Mikroglia und Astrozyten beobachtet. In der Capsula Interna, die in HD weitestgehend ausgespart bleibt, zeigte sich kaum RAN Färbung. Interessanterweise wurden in den besonders von RAN betroffenen Regionen keine poly Gln Aggregate gefunden. In einer folgenden Experimentenreihe wurden RAN positive Areale zusätzlich gegen IBA1, einen Mikroglia marker gefärbt. Es zeigte sich, dass es in den oben beschriebenen Regionen zu einer deutlichen Kolo kalisation von RAN und Mikroglia kommt. 40-50% der IBA1 positiven Zellen zeigten sich auch RAN positiv, was suggeriert, dass Mikroglia RAN-Petide oder RAN-positive Zellen aufnehmen oder aber selbst RAN exprimieren. Diese Ergebnisse implizieren, dass Mikroglia zu RAN positiven Regionen rekrutiert werden. Zusätzlich wurde eine Färbung gegen Caspase 3, einem Zelltod marker in HD durchgeführt. Es zeigte sich, dass 40-60% der Caspase positiven Zellen auch positiv für RAN waren.

Um potentielle zytotoxische Effekte von RAN Peptiden genauer zu evaluieren, wurden neuronale und gliale Zellen mit poly RAN und poly Gln Minigenen transfiziert. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg an Zelltod, die HD-RAN Konstrukte zeigten sich genauso oder stärker toxisch als eine alleinige poly Gln Expression. Ein mangelnder Anstieg des Zelltodes in transfizierten HEK293T Zellen suggeriert eine zellspezifische Vulnerabilität neuronaler Zellen gegenüber RAN Peptiden. In Folge konnten auch im frontalen Kortex und Cerebellum RAN Inklusionen detektiert werden, wobei die Stainingintensität unter der in Putamen und Caudatum liegt.

Zuletzt wurde eine Reihe von Httexon1 Minigenen mit zwischen 23 und 80 CAG Repeats entwickelt, um zu evaluieren, ob die Translation von RAN Konstrukten von der CAG Repeatlänge abhängt. Während poly Gln über alle Repeatlängen exprimiert wird, ergaben sich für die RAN Proteine spezifische minimale Repeatlängen. So wurde poly Ala in Zellen mit CAG Längen >52 Repeats, poly Ser in >35 Repeats exprimiert. Unter der Prämisse einer mit steigender Repeatlänge ebenfalls erhöhten RAN Peptid Translation wurden Hirnschnitte von Juvenile HD analysiert. Es zeigte sich deutlich elevierte RAN Färbung in

Striatum und frontalem Cortex, aber auch in dem in juveniler HD besonders impliziertem Cerebellum. Der genaue Beitrag von HD-RAN Proteinen zur Gesamtpathologie ist aktuell noch Gegenstand von Forschungen und Diskussionen. Yang et al. entwickelten ein CRISPR/Cas9 basiertes HD knock-in Mausmodell, welches RAN Peptide mit oder ohne poly Glutamin Peptid exprimiert. Hier konnten in RAN (+) polyGln (-) Mäusen weder intrazerebrales RAN Staining noch neuropathologische Auffälligkeiten gezeigt werden, letztere konnten jedoch im poly Gln (+) Modell nachgewiesen werden (Yang et al., 2020). Die theoretische Möglichkeit einer selektiven Inhibition von RAN-Translation durch CRISPR-basiertes RPS25-knockout wurde von Yamada et. al. beschrieben, neuropathologische und klinische Folgen dieser Inhibition sind allerdings bis dato nicht bekannt (Yamada et al., 2019).

1.3 Inflammasome

Inflammasome sind multimerische Proteinkomplexe, die sich als zentraler Teil der koordinierten angeborenen Immunantwort auf verschiedene Pathogene oder sterile Insulte beziehungsweise Stimuli formieren. Das angeborene Immunsystem wird via Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs) aktiviert, die die Präsenz von sogenannten Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPS) beziehungsweise Damage/Danger Associated Molecular Patterns (DAMPs) registrieren. Während PAMPS durch mikrobielle Komponenten aktiviert werden, werden DAMPS über endogene Stressfaktoren generiert (Takeuchi und Akira, 2010). Diese wiederum aktivieren die PRR, die in einen Inflammasomkomplex zur Aktivierung von Procaspase 1 oligomerisieren. Aktuell sind eine Reihe verschiedener Inflammasome bekannt, die nach ihren PRR benannt sind. Die zur NOD-like Receptor Gruppe (NLR) gehörenden Proteine bestehen aus einer Pyrin-Domäne am N-terminalen Ende, einer zentralen Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NACHT/NOD) und einer C-Terminalen leucinrepeatreichen Domäne (LRR), zu dieser Gruppe gehören NLRP1/2/3/6/12 und NLRC4 (Kelley et al., 2019). Weitere inflammasomformende PRR sind Absent-in-melanoma 2 (AIM2) und Pyrin (Sharma und Kanneganti, 2016). In NLRP1, NLRP3, AIM und Pyrin kommt es zusätzlich zur Bindung eines Adaptorproteins, des sogenannten Apoptosis Associated Speck like Proteins (ASC), das eine Caspase Activation and Recruitment Domain enthält (CARD), welche die Bindung von Procaspase 1 an das Inflammasom erleichtert (Franklin et al., 2014).

Es kommt zur Aktivierung von Caspase 1, welche pro-Interleukin 1 β und pro-Interleukin 18 in ihre aktiven Formen überführt (Martinon et al., 2002). IL1 β beeinflusst beziehungsweise initiiert eine Reihe von proinflammatorischen Genen sowie eine Migration von Immunzellen (Dinarello, 2009). Über Caspase 1 kommt es außerdem zur Aktivierung des Gasdermin-D Signalwegs, welcher in sogenannter Pyroptose, einem kontrollierten inflammatorischen Zelltod kumulieren kann, welcher zum Ziel hat, intrazelluläre Pathogene einer zirkulierenden Immunantwort auszusetzen, da sie im Gegensatz zur Apoptose zur Ruptur der Zellmembran führt (Miao et al., 2010, S. 1; Shi et al., 2015).

1.3.1 Das NLRP3 Inflammasom

Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit ist das NLRP3 Inflammasom. Für das NLRP3 Inflammasom wurden eine Reihe exogener und endogener Stimuli beschrieben, die zur Aktivierung führen, was eine Rolle als Sensor für globale zelluläre Veränderungen impliziert (Sharma und Kanneganti, 2016). Zur Aktivierung von NLRP3 ist zunächst ein sogenanntes Priming erforderlich. Dieses erfolgt via Exposition zu Stimuli wie Liganden an Toll-like oder NOD-like Rezeptoren sowie Caspase 8 und FADD (Fas-Associating Death Domain-Containing Protein), die den NF-KB Signalweg aktivieren, über welchen konsekutiv die NLRP3 Expression hochreguliert wird (Bauernfeind et al., 2009; Gurung et al., 2014). Auch endogene Zytokine wie TNF-alpha und IL-1 β verursachen ein Priming via NF-KB. Ein Priming des NLRP3 Inflammasoms in Abwesenheit dieser Faktoren ist durch Kobehandlung mit Lipopolysacchariden (LPS) über Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK-1) möglich (Lin et al., 2014; Schroder et al., 2012), diese Eigenschaft wird sich in dieser Arbeit zu Nutze gemacht. Ein weiterer Effekt des Primings ist die Modulation von Posttranslationalen Modifikationen (PTMS) wie Ubiquitinierung (Py et al., 2013), Phosphorylierung (Stutz et al., 2017) und Sumoylierung (Barry et al., 2018), welche ermöglichen, dass das Inflammasom in einem autosupprimierten aber signalkompetenten Status verharrt (Zheng und Kanneganti, 2020). In Folge dieses Priming Schrittes kann das NLRP3 Inflammasom durch verschiedenste Faktoren aktiviert werden, darunter ATP, Kalium, Häme, RNA und bakterielle Bestandteile. Hierbei ist nicht von einer direkten Interaktion, sondern von einer

Beeinflussung des Ionenflusses um das NLRP3 Inflammasom auszugehen (Kelley et al., 2019).

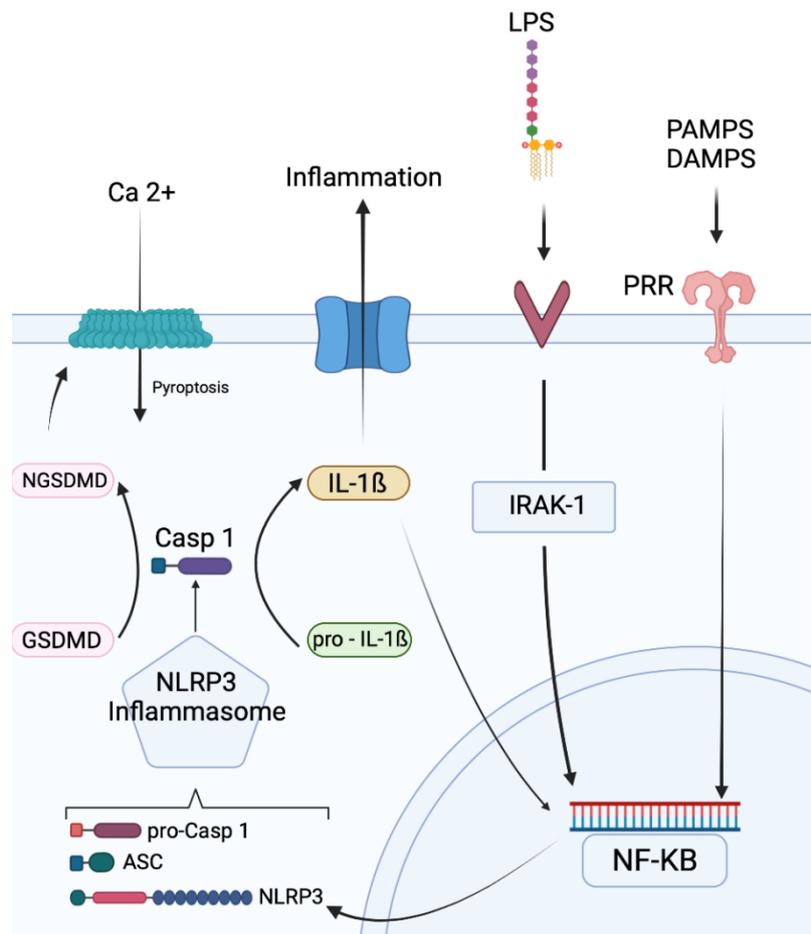


Abb. 2: Modifiziert nach Biorender Commons: Schematische Darstellung des NLRP3-Inflammasom Signalweges

Wie bereits unter dem Unteraspekt der NLR-Proteine erwähnt, besteht das NLRP3 aus einem LRR; einer NACHT/NOD- sowie einer PYD Domäne. Diese PYD Domäne interagiert mit der PYD Domäne des ASC, welches via CARD eine Bindung von pro-Caspase 1 über dessen eigene CARD verursacht. Hierdurch wird durch autokatalytische proteolytische Spaltung pro-Caspase in die aktive Caspase-1 Form überführt, welche dann zytosolisch verfügbare Zytokine wie pro-IL1 β und pro IL-18 in ihre aktiven Formen konvertiert, welche in Folge in den Extrazellulärraum sezerniert werden (Broz und Dixit, 2016). Verschiedene pharmakologische Wege zur Inhibition des NLRP3 sind

beschrieben. Von Relevanz für diese Studie sind zum einen die von der Firma IFM entwickelten IFM-514 und IFM-632, sulfonylharnstoffbasierte niedermolekulare Verbindungen, die selektiv das NLRP3 Inflammasom inhibieren (Torres et al., 2021). Einer der selektivsten Inhibitoren des NLRP3 Inflammasoms ist das disulfonylharnstoffhaltige MCC950, für welches verschiedene Wirkmechanismen beschrieben sind. Zum einen blockiert es die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms über eine Inhibition der ASC Oligomerisierung (Coll et al., 2015), zum anderen interagiert es mit der NACHT Domäne und blockiert so die ATP Hydrolyse und Formierung des NLRP3 Inflammasoms (Coll et al., 2019).

1.3.2 Das NLRP3 Inflammasom in neurodegenerativen Erkrankungen

Das NLRP3 Inflammasom wird als ubiquitär vorhandenes Protein auch im neuronalen Netzwerk, besonders in Mikroglia und Astrozyten exprimiert (Cho et al., 2014a). Dementsprechend ist auch für Erkrankungen, die das ZNS betreffen, die Aktivierung des Inflammasoms durch verschiedenste DAMPS/PAMPS beschrieben (Kaushik et al., 2012; Kim et al., 2015), die via Pattern Recognition Receptors wie TLR2, TLR4 und NLR an Mikroglia binden (Heneka et al., 2015). Insbesondere relevant ist im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen die Aktivierung des hirneigenen Immunsystems, unter anderem über NLRP3, durch endogene DAMPS, die im Rahmen der Grunderkrankung entstehen. Für Alzheimer als häufigste Demenzform ist die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms und konsekutive Inflammationsreaktion als ein Aspekt der komplexen Pathologie bereits beschrieben worden (Heneka et al., 2013). Alzheimer zeichnet sich durch eine unphysiologische Akkumulation von Proteinaggregaten als Amyloid- β haltige Plaques sowie Neurofibrillary Tangles aus hyperphosphoryliertem Tau aus (Blennow et al., 2006). Nach Aktivierung von NLRP3 durch Amyloid-Beta Fibrillen kommt es zur Inflammationsreaktion und Aktivierung von Cluster um Amyloid Beta Plaques bildenden Mikroglia, ein Prozess, der unter anderem in der Bildung der krankheitsrelevanten neurofibrillären Tangles (NFTs) kumuliert (Ising et al., 2019). Durch die Aktivierung von Inflammasomen in Mikroglia um A β kommt es zur vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (Saresella et al., 2016, S. 1), mittels NLRP3 Inhibition via MCC950 konnte die Akkumulation von A β im Mausmodell signifikant reduziert werden (Dempsey et al., 2017). Inflammatorische Prozesse stellen entsprechend neben der

neuronalen Komponente eine relevante Achse der Neurodegeneration in AD dar (Ising und Heneka, 2018).

Bei der Parkinson-Krankheit, einer der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen, welche sich durch den Verlust dopaminergener neuronaler Projektionen auf das Striatum sowie das Vorliegen intrazellulärer Einschlüsse fehlgefalteten alpha-Synukleins, sogenannten Levy-Körperchen (LBs) auszeichnet, spielt die Inflammation ebenfalls eine Rolle. Nach dem Zelltod kommt es zur Freisetzung von alpha-Synuklein, welches als DAMP fungiert und den NLRP3 Signalweg in Mikroglia aktiviert (Alvarez-Erviti et al., 2011). In Folge freigesetztes IL-1 β führt zu einer weiteren Schädigung der dopaminergen Neurone (Block et al., 2007; Ferrari et al., 2006). Caspase 1 fungiert darüber hinaus als Katalysator einer verstärkten alpha-Synuklein Akkumulation (Wang et al., 2016), verschiedene genetische Untersuchungen haben darüber hinaus NLRP3 Polymorphismen mit reduzierter Aktivität mit einem verminderten Risiko für PD assoziiert (von Herrmann et al., 2018). Vermehrte NLRP3 Aktivierung korreliert darüber hinaus mit Symptomschweregrad und Krankheitsprogress (Fan et al., 2020). Eine Inhibition des NLRP3 Inflammasoms mittels MCC950 konnte im Mausmodell sowohl motorische Symptomatik als auch nigrostriatalen Projektionsverlust und alpha-Synuklein Aggregation signifikant reduzieren (Gordon et al., 2018).

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) zeichnet sich durch eine progrediente Degenerationen von Motoneuronen aus (Ghasemi und Brown, 2018). Auch hier spielt Neuroinflammation eine zentrale Rolle im Krankheitsbild (Liu und Wang, 2017; Philips und Robberecht, 2011). Im SOD1(G93A) Mausmodell, dem geläufigsten Modell familiärer ALS, welche 10% aller ALS Fälle konstituiert, wurde eine elevierte NLRP3 Aktivität gezeigt (Debye et al., 2018). Der Krankheitsprozess in diesem Modell ist mit erhöhter NLRP3 und IL-1 β Expression vergesellschaftet. Auch in humanem ALS Gewebe konnte eine geringgradig erhöhte NLRP3 Aktivität nachgewiesen werden (Johann et al., 2015). Caspase-1 Level in ALS Patienten können erhöht sein, eine kausale Verknüpfung mit dem NLRP3 Inflammasom existiert allerdings nicht (Iłzecka et al., 2001). Transactive response DNA-binding protein-43 (TDP-43) als wichtige Komponente intraneuronaler Aggregate (Prasad et al., 2019) in ALS Patienten löst eine Freisetzung von mtDNA aus, welche wiederum das NLRP3 Inflammasom in Mikroglia aktiviert (Yu et al., 2020). Eine Kokultur

derart aktivierter Mikroglia mit Motoneuronen verursacht den Zelltod dieser, somit ergibt sich der Verdacht auf einen NLRP3-induzierten Mechanismus von Neurotoxizität via TDP-43 (Zhao et al., 2015). Interessanterweise zeigt sich in neurodegenerativen Erkrankungen mit NLRP3 Komponente die Fähigkeit von Mikroglia zum Abbau von fehlgefalteten Proteinen über lysosomale Autophagie reduziert (Cho et al., 2014a; Yuan et al., 2018; Wu et al., 2021). Dieser Prozess ist im physiologischen Kontext Teil der mikroglialen zellulären Homöostase und vermittelt den Abbau intrazellulärer Strukturen wie fehlgefalteter Proteine über Autophagosombildung (Glick et al., 2010).

Auch in HD wird eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms beschrieben. Unter den im CSF erhöhten und mit der klinischen Schwere korrelierenden inflammatorischen Biomarkern ist neben TNF-alpha, IL6 und IL8 auch IL-1 β (Rodrigues et al., 2016). In PBMCs von HD-Patienten konnte darüber hinaus eine erhöhte NLRP3 Aktivität im Vergleich zu gesunden Kontrollen gezeigt werden (Glinsky, 2008). Galectin-3 als Mediator von Neuroinflammation in HD wird über den NF-KB Signalweg und somit das NLRP3 Inflammasom aktiviert, eine Ausschaltung von Galectin reduziert Inflammation, Symptomatik und Huntingtinaggregation im Mausmodell (Siew et al., 2019). In einem R 6/2 HD Mausmodell konnte eine vermehrte Aktivierung von NLRP3 und Caspase 1 insbesondere in von HD betroffenen Neuronen demonstriert werden (Paldino et al., 2020). Kürzlich konnten Chen et. Al im R 6/2 Modell zeigen, dass eine systemische Behandlung mit dem NLRP3 Inhibitor MCC950 die NLRP3 Aktivität senkt und hierüber Neuroinflammation reduziert, was zu einem Rückgang der motorischen Symptome sowie einer erhöhten neuronalen Überlebensrate und einem längeren Gesamtüberleben der R 6/2 Mäuse führte (Chen et al., 2022).

1.4 Ansatz des Projektes und Fragestellung

Im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen kommt es zu multimodalen Aktivierungen des hirneigenen Immunsystems, welche individuell zur Pathologie der jeweiligen Erkrankung beitragen können. Immunvermittelte Pathomechanismen scheinen dabei, gemessen an der Möglichkeit zur Aufhaltung oder Linderung des Progresses verschiedener Erkrankungen durch selektive Immunmodulation, äußerst relevante Anteile am Gesamtbild der Erkrankungen zu haben. Eine dieser Erkrankungen ist HD. Als fatale chronisch neurodegenerative Erkrankung sind die genauen Pathomechanismen von HD

Gegenstand aktueller Forschung, zu diesem Zeitpunkt steht keine kausale Therapie zur Verfügung. Auch wenn die genauen Immunmechanismen noch nicht bekannt sind, wurde eine inflammatorische Komponente durch verschiedenste Studien gezeigt. Dementsprechend ergibt sich hier ein möglicher therapeutischer Ansatz. Unbekannt ist, welche Krankheitsaspekte Treiber dieser Komponente sind. RAN-Translation ist ein unkonventioneller Translationsmechanismus, welcher im Kontext verschiedener monogenetischer neurodegenerativer Erkrankungen nachgewiesen wurde. In HD werden über diesen Mechanismus vier homopolymere RAN Peptide gebildet: poly Alanin, poly Cystein, poly Leucin und poly Serin. Für diese Peptide wurden eine signifikante Neurotoxizität sowie eine Kolo-kalisation zu inflammatorischen Prozessen bereits beschrieben, eine kausale Verknüpfung besteht bislang jedoch noch nicht. Neben dem mHtt kommen RAN Peptide als Treiber von Neuroinflammation und damit HD-Pathologie in Frage.

Wir hypothesieren die Möglichkeit einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems, spezifisch über den Signalweg des NLRP3 Inflammasoms durch HD-RAN Peptide. Diese Studie zielt darauf, im Zellmodel grundsätzlich zu etablieren, dass HD-RAN Peptide als DAMPS fungieren, welche von Zellen des Immunsystems selektiv aufgenommen werden und dort via NLRP3 proinflammatorische Prozesse auslösen, die in einer kontinuierlichen Zytokinausschüttung und damit einem systemischen inflammatorischen Zustand kumulieren. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob eine therapeutische Inhibition der RAN-basierten Neuroinflammation möglich ist. Im Folgenden werden die Versuchsgruppen und -protokolle sowie die einzelnen Methoden genauer erläutert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Tab. 1: Geräte

Memmert ICO240 Inkubator	Memmert, Schwabach, DE
Kühlschrank (-20°C)	Mediline, Liebherr, Kirchdorf, DE
Kühlschrank (4°C)	Mediline, Liebherr, Kirchdorf, DE
Kühlschrank (-80°C)	V86 500i, Ewald, Rodenburg, DE
Zentrifuge – Zellkultur	Megafuge 40R, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifugen CF 5424/5430	Eppendorf, Hamburg, DE
VVR Rocking Platform	Avantor, Radnor, PA
Wasserbad	GFL, Burgwedel, DE
Elisa/BCA/LDH Assay Reader	TECAN Infinite 200 Pro, Männedorf, CH
Membran Reader	Odyssey [®] CLx Imaging System (LI-COR Biosciences)
Eppendorf Research Plus Pipetten	Eppendorf, Hamburg, DE
Brand Transfer Multipipette	Sigma Aldrich, St. Louis, MIS, USA
Multipipette M4	Eppendorf, Hamburg, DE
Sterile Arbeitsbank TFSC Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Gel transfer Box X Cell 4 Surelock [™] Midi	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trans Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Consort EV 202 Power	Sigma Aldrich, St. Louis, MIS, USA
Mikroskop – Zellzählung	Zeiss Primovert, Zeiss, DE
Mikroskop – Immunzytochemie	Nikon Eclipse Ni, Nikon, Tokyo, Japan
FACS Analyse	BD FACSCanto [™] II Flow Cytometer

Eppendorf Thermomixer C	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf Easypet Aspirator	Eppendorf, Hamburg, DE
Ohaus Explorer/Adventurer Waage	Ohaus, Parsippany, NJ, USA
Heidolph Unimax 1010 Schüttler	Heidolph, Schwabach, DE

Tab.2: Peptide

Poly Alanine	Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg
Poly Alanine + TAMRA	Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg
Poly Cysteine	Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg
Poly Cysteine +TAMRA	Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg
Poly Leucine	Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg
Poly Serine	Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg
Poly Serine + TAMRA	Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg
Htt exon 1 23 Q	Hilal Lashuel Group, EPFL, Lausanne
Htt exon 1 43 Q	Hilal Lashuel Group, EPFL, Lausanne

Tab.3: Verbrauchsmaterialien

Glaswaren	Schott Duran, Jena, DE
6/12/96 Well Platten Zellkultur	Cellstar, Sigma Aldrich, St. Louis, MIS, USA
96 Well Platten – Elisa	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
96 Well Platten – BCA Assay	Greiner Microplate, Greiner, AT
Falcon™ Centrifuge Tubes (15 ml, 50 ml); Flow Cytometry Tubes	Corning, Corning, NY, USA
Eppendorf™ Reaction Tubes (0.5, 1.5, 2.0 ml)	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettentips (20 µl, 250 µl, 1000 µl, 1200 µl, je mit und ohne Filter)	Saarstedt, Nümbrecht, DE
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning, Corning, NY, USA
Zellkulturflaschen (Größe T25, T75)	Greiner Bio One, Greiner, AT
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nitrozellulosemembran 0.2 µM	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Tab.4: Zelllinie:

J774.2	Sigma Aldrich, St. Louis, MIS, USA
--------	------------------------------------

Tab.5: Zellkulturreagenzien

Dulbecco's Modified Eagles Medium	Gibco, Waltham, MA, USA
Fetal Bovine Serum	Gibco, Waltham, MA, USA
Penicillin / Streptomycin	Gibco, Waltham, MA, USA
Trypsin / Trypsin-EDTA	Gibco, Waltham, MA, USA
N2 Supplement	Gibco, Waltham, MA, USA

PBS	Gibco, Waltham, MA, USA
-----	-------------------------

Tab.6: Chemikalien

Lipopolysaccharid	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nigericin	InvivoGen, San Diego, CA, USA
MCC 950	InvivoGen, San Diego, CA, USA
IFM-514	Eike Latz Group, Universitätsklinikum Bonn
Cytochalasin D	Sigma Aldrich, St. Louis, MIS, USA
Dimethylsulfoxid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Trypan Blue Stain 0.4%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
7 AAD Cell Viability Solution	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10 to 250 kDa	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tween 20® – Surfact-Amps® Detergent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
One Step™ Ultra TMB Solution Elisa	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tab.7: Readout Kits

IL-1 β Elisa Kit Maus	R & D Systems, MN, USA
IL-6 Elisa Kit Maus	R & D Systems, MN, USA
TNF-alpha Elisa Kit Maus	R & D Systems, MN, USA
Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit	R & D Systems, MN, USA
BCA Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pierce LDH Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tab.8: Antikörper

ms NLRP3 AG20B-0014-C100	Adipogen, San Diego, CA, USA
rbASC AG25B-0005-C100	Adipogen, San Diego, CA, USA
CS rb β -Actin #4967 primary antibody	Cell Signalling, Danvers, MA, USA
Sekundärantikörper	Licor Biosciences, Lincoln, NE, USA
CS Tech Iba1/AIF1 (E404W) r anti mAb	Cell Signalling, Danvers, MA, USA
CD 11b Bio-rad NCA 711 r anti mAb	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Wheat Germ Agglutinin	Biotium, Ca, USA
Phalloidin 470 Primary Antibody	Abcam, Cambridge, UK
Iba Anti Rbb488 Secondary Antibody	Abcam, Cambridge, UK
CD 11b anti ms 488 Secondary Antibody	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ProLong Gold Antifade Mountant + DAPI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Brilliant Violet 605 TM anti mouse CD 45 AB	Biolegend, San Diego, CA, USA
Brilliant Violet 421 TM anti mouse CD 11b AB	Biolegend, San Diego, CA, USA
PE Anti mouse CD 11b antibody for (TAMRA)	Biolegend, San Diego, CA, USA
Rat Anti Mouse CD 11b (MCA 711)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mouse Seroblock FCR FCR4G8	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Iba1/AIF-1 (E404W) XP [®] R mAB #17198	Cell Signalling, Danvers, MA, USA

Tab.9: Software

Excel 2021	Microsoft, Richmond, WA, USA
Graphpad Prism 9	Graphpad Software Inc., CA, USA
Fiji 2.5.0	Wayne Rusband; National Institute of Health
FlowJo 5	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
BioRender	Biorender, Toronto, Ontario, CA

2.2 Methodischer Ansatz zur Beantwortung der Fragestellung

Zur Beantwortung unserer Fragestellung haben wir einen dezidiert reduktionistischen Ansatz gewählt und uns für die Zelllinie J774.2 als experimentelles System entschieden. J774.2 sind murine, makrophagenähnliche Zellen mit gut charakterisierten funktionellen Eigenschaften. Kritisch für unsere Fragestellung ist, dass sie bei geeigneter Stimulation eine IL-1 β Antwort zeigen, für die eine Beteiligung des NLRP3 gut belegt ist (Jones et al., 2005).

In einer ersten Versuchsreihe wurde die grundsätzliche Möglichkeit einer Aktivierung des NLRP3 durch Kokultur von RAN Peptiden und J774.2 und anschließender Auswertung via IL-1 β Elisa sowie NLRP3 Western Blot evaluiert. Parallel dazu wurde eine einzelne Stimulation der J774.2 mit physiologischem und pathologischem Httex1 23/43Q sowie ein Kobehandlung mit Httex1 23/43Q und RAN-Proteinen auf die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms hin überprüft.

In der zweiten Versuchsreihe wurde mittels selektiver Inhibition des NLRP3 Signalwegs durch MCC950 und IFM-514 eine Spezifität der IL1 β Ausschüttung für den NLRP3 Signalweg untersucht.

In Folge wurde mittels TAMRA-ligierter RAN Peptide eine Internalisierung der extrazellulären RAN Peptide mittels Phagozytose evaluiert. Eine Inhibition dieser Internalisierung wurde mittels Cytochalasin D untersucht. Anschließend wurde die Option

eines intrazellulären Abbaus der internalisierten RAN Peptide visualisiert. Eine Internalisierung der RAN Peptide wurde darüber hinaus mittels Immunzytochemischen Verfahren dargestellt. Zuletzt wurde die Aktivierung weiterer inflammatorischer Signalwege mittels Zytokinarray sowie weiteren Elisass untersucht.

2.3 RAN-Peptid Synthese

Die in dieser Untersuchung verwendeten RAN Peptide wurden nach unseren Spezifikationen durch einen kommerziellen Hersteller (Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg) synthetisiert. Die vollsynthetische Herstellung hat gegenüber einer bakteriellen Transfixierung den für unsere Fragestellung entscheidenden Vorteil, dass eine Kontamination des Endproduktes mit hoch-immunogenen bakteriellen Lipopolysacchariden vermieden wird. Pragmatisch haben wir zunächst RAN Peptide mit einer Länge von jeweils 10 Repeats für poly Ala, poly Leu und poly Ser gewählt. Für poly Cys war technisch bedingt nur eine Synthese in einer Länge von 5 Repeats möglich.

Für die Phagozytose-Assays (s.u.) wurden TAMRA-ligierte Peptide mit 10 Repeats synthetisiert, die Herstellung eines TAMRA-ligierten poly Leu gelang nicht. Alle Peptide wurden vom Hersteller HPLC gereinigt und mittels MALDI Massenspektrometrie analysiert. Die Suspension der Peptide erfolgte in 1x PBS, die Peptide wurden bei -80°C aufbewahrt und Peptidsuspensionen vor Verwendung mittels Vortexer durchmischt. TAMRA-ligierte Peptide wurden während aller mit Ihnen durchgeführten Experimente vor Lichteinstrahlung abgeschirmt.

2.4 Huntingtin

Huntingtinmonomere wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Hilal Lashuel (EPFL, Lausanne) zur Verfügung gestellt. Physiologisches (23 CAG Repeats) und pathologisch verlängertes (43 CAG Repeats) Htt Exon 1 wurde als C-terminales His₆-SUMO (small ubiquitin related modifier) Tag generiert und abgespalten, bevor eine Reinigung des Httex123/43Q mittels HPLC erfolgte (Reif et al., 2018). Lagerung erfolgte bei -20°C, Die Resuspension erfolgte in 1x PBS.

2.5 Zellkultur

Die verwendete J774.2 Zelllinie wurde durchgängig in einem Inkubator bei 37°C und einer atmosphärischen CO₂ Konzentration von 5% aufbewahrt, die verwendeten Zelllinien wurden regelmäßig auf Kontamination durch Mykoplasmen untersucht. Alle Zellkulturexperimente wurden unter sterilen Bedingungen an Arbeitsplätzen mit Laminar Air Flow Systemen durchgeführt. J774.2 Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's Medium + 10% fötalem Kälberserum + 5% Penicillin/Streptomycin kultiviert und in regelmäßigen Abständen geteilt. Als Stimulationsmedium für die Zellkulturexperimente wurde Dulbecco's modified Eagle's Medium + 10% fötalem Kälberserum + 5% Penicillin/Streptomycin + 1x N2 Supplement verwendet.

2.6 Inflammation priming und Zellstimulation

Zur Durchführung der Stimulationsexperimente wurden J774.2 zunächst mittels Trypsin in der Kulturflasche gelöst. Nach Zentrifugation und Suspension in DMEM+FBS+P/S+N2 sowie Zellzählung mittels Trypan Blau Methode wurden die Zellen abhängig vom Experiment als 2 Millionen J774.2/well in 6 well plates oder 75.000 J774.2/well in 96 well plates pipettiert und über Nacht adhärirt. Am Folgetag wurden die Zellen zunächst zentrifugiert und 3x mit 1x PBS gewaschen, anschließend wurde die Adhärenz der Zellen mikroskopisch überprüft. Zum Priming des NLRP3 Inflammasomes erfolgte eine Vorbehandlung der zu stimulierenden Wells mittels 100 nM Lipopolysaccharid in DMEM + FBS + P/S + N2 für insgesamt 3 Stunden (Schroder et al., 2012). Nach Wiederholung des oben beschriebenen Waschschrilles erfolgte die Stimulation mittels einer zuvor durch Dosis-Antwort Testung bestimmten Konzentration von 100 uM RAN-Peptiden für einen Zeitraum von 24 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ im Inkubator. Hierbei wurden sowohl die RAN-Peptide einzeln als auch eine Kombination von je 25 uM aller vier RAN Peptide zur Erfassung von eventuellen komplementären Effekten evaluiert. Zusätzlich wurde eine Kobehandlung mit RAN Peptiden und jeweils 23Q/43Q Httex1 Monomeren (500 nM) zur Abbildung aller involvierten Proteine durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein Well mit vehikelstimulierten Zellen. Als Positivkontrollen wurden zum einen ein für 3 Stunden mit LPS behandeltes Well verwendet, um eine isolierte Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms durch den Primingschritt nachzubilden. Als zweite Positivkontrolle diente ein Well, welches zur maximalen NLRP3 Aktivierung nach dreistündigem Priming mittels

100 nM LPS für eine Stunde mit dem NLRP3 Stimulator Nigericin (5 μ M) (He et al., 2016) behandelt wurde. Nigericin als mikrobielles Toxin, welches vom grampositiven *Streptomyces Hygroscopius* sondiert wird, fungiert als Kaliumionophor und ermöglicht einen intrazellulären Kaliumefflux, welcher in Folge das NLRP3 aktiviert. Anschließend wurde der Überstand mittels Pipettierung in Eppendorf Vials transferiert und diese zur Entfernung zellulärer Bestandteile für 5 Minuten bei 4000 RPM zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand in ein neues Behältnis transferiert, welches mittels Trockeneis zur Vermeidung einer Zytokindegredation unmittelbar gefroren wurde. Die Lagerung der Überstände erfolgte bei -20°C . Darüber hinaus wurden 75.000 J774.2 in 96 Well plates nach Kultur, Zellzählung und Zentrifugation wie oben beschrieben ausgesät und in Folge mit verschiedenen Konzentrationen Httex1 23 und 43 Q mit oder ohne vorheriges dreistündiges Priming mit LPS (100 nM) stimuliert.

2.5 NLRP3 Inhibition

Zur Evaluation der NLRP3 Inhibition wurde der Versuchsaufbau aus 2.4 um eine Kobehandlung der jeweiligen RAN Peptide mit den beiden NLRP3 Inhibitoren MCC950 (20 μ M) und IFM-514 (500 nM) ergänzt. Darüber hinaus erfolgte zur Beantwortung der Fragestellung, ob ein Primingschritt zur Aktivierung des NLRP3 Inflammasomes durch RAN Peptide erforderlich ist, zusätzlich eine Stimulation mit RAN Peptiden für 24 h ohne vorheriges Priming. Neben den in 2.4 beschriebenen Kontrollen wurde zusätzlich die Potenz der NLRP3 Inhibition über Stimulation der J774.2 mit LPS (3h, 100 nM) + Nigericin (1h 5 μ M) mit jeweils paralleler Behandlung mit MCC950 und IFM-514 evaluiert.

2.6 Phagozytoseassay

600.000 J774.2 Zellen pro Well wurden nach dem in 2.4 beschriebenen Vorgehen in 12 Well Platten ausgesät und über Nacht in DMEM + PBS + P/S + N2 inkubiert. Nach zweimaliger Zentrifugation wurden in einer lichtgeschützten Umgebung entweder 10 μ M TAMRA-ligierte RAN-Peptide oder 10 μ M TAMRA-ligierte Peptide mit 2 beziehungsweise 10 μ M des Phagozytoseinhibitors Cytochalasin D in DMEM + PBS + P/S + N2 behandelt. Cytochalasin D inhibiert die Phagozytose über Interferenz mit der Zytostuktur durch Inhibierung der Actinligomerisation (Schliwa, 1982). Die untersuchten Zeiträume sind 1,2,3,6 und 24 Stunden, der Versuchsaufbau wurde derart gestaltet, dass alle Zeiträume

zum gleichen Zeitpunkt beendet wurden. Das überschüssige Medium wurde entfernt und die Zellen 3x mit 1x PBS gewaschen. Als Kontrollen dienten jeweils Wells ohne Stimulation, Stimulation mit 2/10 uM Cytochalasin D sowie Stimulation mit 0.1 uM DMSO. Zur Evaluation der Degradationskapazitäten wurden 600.000 J774.2 wie oben beschrieben für 24 Stunden mit 10 uM TAMRA-ligierter Peptide behandelt. In Folge wurde der Überstand entfernt und die Zellen 3x mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden erneut 700 uL DMEM + FBS + P/S + N2 hinzugegeben und die Zellen für weitere 24 Stunden inkubiert. In Folge wurde in beiden Experimentvarianten der Zellüberstand entfernt, die Zellen erneut mittels 1x PBS gewaschen und mit 300 uL Trypsin für 8 Minuten behandelt. Die Trypsinreaktion wurde mit 500 uL DMEM Complete gestoppt, die Zellen vom Well entfernt und die Lösung in FACS Röhren gegeben. Nach Zentrifugation (4 min, 300G, 4°C) wurde der Überstand entfernt und 1 ml Reagent Diluent (1% BSA in PBS) dazugegeben, erneut zentrifugiert und der Überstand anschließend entfernt. Pro Tube wurden je 1:200 CD11b/BV421 und CD45/BV605 in RD sowie in Folge 1:200 Fc Blockantikörper in RD hinzugegeben, jeweils für 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend erneut mit Reagent Diluent behandelt und zentrifugiert. Zuletzt wurden zur Zellviabilitätsdarstellung 5 uL 7AAD pro Tube hinzugegeben, 10 min inkubiert und der Wasch- und Zentrifugationsschritt wiederholt. Als Kompensationskontrollen dienten unbehandelte jeweils mit CD11b/BV421, CD45/BV604 und CD11b (TAMRA) PE gefärbte J774.2. Als Kompensationskontrolle zum 7AAD Staining dienten unbehandelte J774.2, welche vor 7AAD Staining für 8 Minuten mit 1 ml Triton behandelt wurden. Anschließend erfolgte die FACS Analyse mittels FACSCanto™ II Flow Cytometer sowie FlowJo.

2.7 Western Blot

Die nach dem Protokoll in 2.4 stimulierten J774.2 Zellen wurden in Ihren Wells zunächst 3x mit 1x PBS gewaschen und in Folge für 15 Minuten mittels 1x RIPA Puffer (50mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 0,5% Natriumdeoxycholat, 0,1% Natriumlaurylphosphat (SDS), 150mM Natriumchlorid, pH 7.2) mit 1x Proteaseinhibitor Cocktail auf Eis lysiert. In Folge wurden die J774.2 aus den Wells entfernt und für 5 Minuten bei 13.000 RPM bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in Folge vorsichtig von den hierbei gebildeten Pellets abpipettiert und in neue Eppendorf Röhren transferiert und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die Quantifikation der Proteine erfolgte mittels Thermo Fisher Scientific

Pierce™ BCA™ Assay nach Herstellerangaben, anschließend erfolgte der entsprechend der Proteinkonzentrationen im Lysat kalkulierte Transfer für 20 µg Proteine in 20 µL in Eppendorf Tubes mit 5 µL 1x Loading Buffer (0,2M Tris-HCl, 0,4 M DTT, 277mM 8% SDS, 6mM Bromophenol blue, 4,3 M Glycerol) und H₂O und eine Denaturierung für 5 Min bei 95°C. Die Samples wurden anschließend in ein 4-12% Bis-Tris Gel pipettiert, welches für 90 Min bei 150V, 300mA lief. Anschließend erfolgte der Membrantransfer via Turbo Blot System. Die Membran wurde anschließend 3x in PBST gewaschen. Primäre Antikörper (NLRP3, ASC, β-Actin) wurden entsprechend der Herstellerempfehlungen in PBS dazugegeben und die Membranen über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte nach dreimaligem Waschen mittels PBST die Behandlung mit den Sekundärintikörpern (1:20.000) für 1 Stunde. Nach erneutem Waschschrift erfolgte die Analyse der Membranen mittels Odyssey® CLx Imaging System (LI-COR Biosciences) sowie Lycor Image Studio Lite.

2.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Konzentration von Proteinen, die von den J774.2 als Reaktion auf die unter 2.4 beschriebene Stimulation in das Zellmedium abgegeben wurden, wurde mittels ELISA gemessen. Die Methode des Assays ist die Verwendung und Färbung proteinspezifischer Antikörper. Die hier beschriebenen ELISAs (R&D Solutions) wurden mittels kompletter Kits entsprechend der Herstellerprotokolle in designierten 96 well plates durchgeführt. Die Konzentrationen der entsprechenden Marker wurden mittels eines Microplate Readers (Tecan) bei einer Optischen Dichte von 450 nm gemessen und absolute Zytokinkonzentrationen mittels Verwendung einer Standardkurve des rekombinanten Proteins auf jeder individuellen Platte ermittelt.

2.9 Zytokinarray

Das Proteome Profiler Cytokine Array Kit ist ein membranbasierter Sandwich-Immunoassay, in welchem die zu analysierenden Proben zunächst mit einem Cocktail verschiedener Detektionsantikörper behandelt und in Folge mit Membranen inkubiert werden, die auf einzelnen Punkten jeweils über spezifische Capture Antikörper verfügen. Die so gebundenen Proteine können dann mittels Detektionsreagenten visualisiert werden. Dieser Prozess erlaubt die Visualisierung einer Vielzahl von Proteinen in einem

einzelnen Experiment. Der hier durchgeführte Zytokinarray wurde entsprechend der vom Hersteller angegebenen Protokolle mit 500 uL Überstand aus der in 2.4 durchgeführten Stimulation durchgeführt. Verwendet wurden hierfür 100 uM poly Cystein stellvertretend für ein einzelnes RAN Protein sowie Überstand von mit einer Mischung aus jeweils 25 uM aller RAN Proteine behandelten J774.2. Als Kontrolle wurde Überstand von mit 100 nM LPS und 5 uM Nigericin entsprechend 2.4 behandelten Zellen verwendet. Das Auslesen erfolgte mittels Odyssey® CLx Imaging System (LI-COR Biosciences) sowie Lycor Image Studio Lite, die Normalisierung erfolgte mithilfe der auf der Membran enthaltenen Kontrollen.

2.10 Zytotoxizität

Die Messung der Zellviabilität erfolgte mittels Laktatdehydrogenase (LDH) Assay. Lactatdehydrogenase wird als zytosolisches Enzym bei Schädigungen der Plasmamembran in das Zellkulturmedium freigesetzt. Die Messung der LDH erfolgte mittels Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit nach Herstellervorgaben in 96 well Microplates. Resultate wurden mittels Tecan Reader gemessen und über eine Standardkurve auf jeder individuellen Platte ermittelt. Die in Prozent angegebene Zytotoxizität wurde mittels vom Hersteller vorgegebenen Formeln ermittelt.

2.11 Immunzytochemie

500.000 J774.2 wurden in 12 Well Plates, in welche jeweils zuvor eine Glass Slide gegeben wurde, ausgesät und über Nacht im Inkubator adhärirt. Das Inkubationsmedium wurde entfernt und die Zellen in DMEM + FBS + P/S + N2 mit jeweils 10 uM TAMRA-ligierter RAN-Peptide für 6h behandelt. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Zellen mittels 4% PFA 15 Min an den Glass Slides fixiert. Nach erneutem Waschschrift mittels 1x PBS erfolgte eine Antikörperfärbung der Zellen mittels Iba1 (1:200), CD 11b (1:100), Wheat Germ Agglutinin 488 (1:1000) und Phalloidin 470 (1:200) Primärantikörpern für eine Stunde. Die verwendeten Konzentrationen richten sich nach den Data Sheets der Hersteller. Die sekundäre Antikörperfärbung erfolgte mittels Iba Anti Rb488 und CD 11b Anti ms488 Antikörpern. Die behandelten Glass Slides wurden anschließend mit je 7 uL Prolong Gold Antifade Mountant mit DAPI fixiert und lichtgeschützt aufbewahrt. Unmittelbar darauf erfolgte die bildgebende Darstellung mittels

konfokaler Mikroskopie in DAPI/FITC/TRITC Kanälen. Die Bilderverarbeitung erfolgte mittels Fiji ImageJ.

2.12 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit Graphad 7-8 Software durchgeführt. Jeder Datensatz beinhaltet mindestens drei unabhängige Experimente (n), die Anzahl der Replikate innerhalb der einzelnen Experimente ist abhängig vom jeweiligen Versuch. Eine Normalverteilungstestung erfolgt mittels Kruskal-Wallis oder D'Agostino-Pearson Test, darüber hinaus erfolgte jeweils eine Ausreißer-Analyse und gegebenenfalls Exklusion. In normalverteilten Ergebnissen erfolgte eine Analyse auf statistische Signifikanz mittels T-Test, sofern nur zwei Gruppen verglichen wurden, oder einfache Varianz-Analyse (One-Way-ANOVA), wenn mehr als zwei Gruppen verglichen wurden. Alle Resultate werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt, Signifikanzniveaus werden wie folgt titulierte: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

3. Ergebnisse

3.1 Interleukin-1 β Freisetzung

In dem unter 2.4 beschriebenen Versuchsaufbau konnte durch Stimulation der J774.2 Zellen mit 100 μ M einzelner RAN Peptide beziehungsweise einer Mischung aus je 25 μ M aller RAN Proteine (gezeigt als poly RAN) wie in Abb. 3 gezeigt nach vorigem Priming mit 100 nM LPS ein konsistenter signifikanter Release von IL-1 β demonstriert werden (n=6). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Freisetzung von IL-1 β sowohl zwischen den einzelnen Peptiden als auch zwischen einzelnen Peptiden und der Kombination. Darüber hinaus präsentierte sich der durch die Behandlung mit RAN Peptiden provozierte IL-1 β Release nicht signifikant von der Positivkontrolle (100 nM LPS + 5 μ M Nig) abweichend, durch ein isoliertes Priming mittels LPS konnte keine signifikante Freisetzung von IL-1 β erreicht werden.

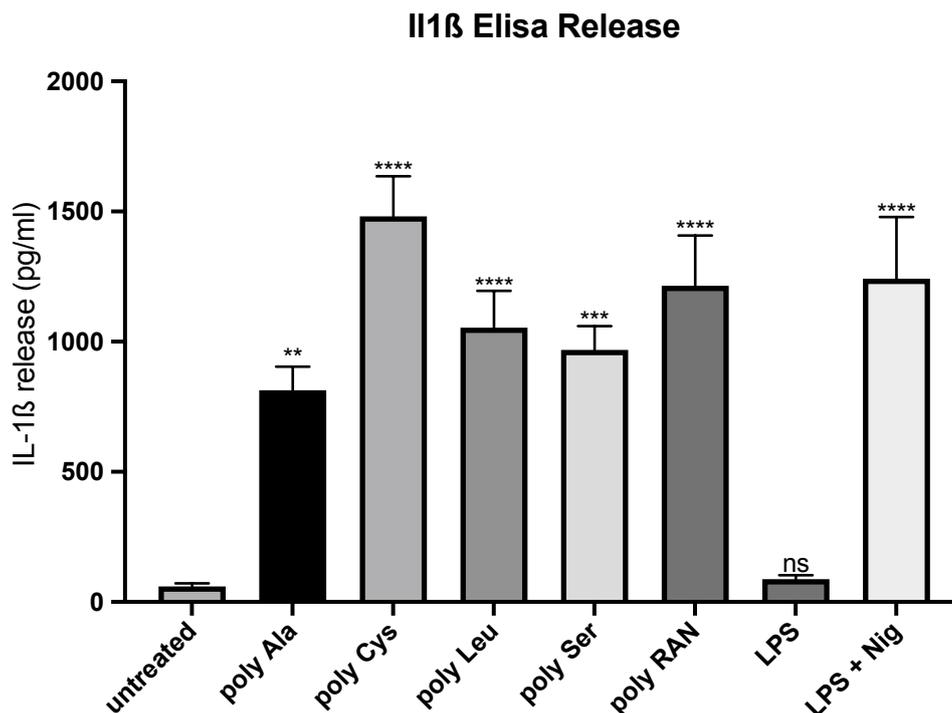


Abb. 3: Statistische Analyse der IL-1 β Konzentration nach RAN Stimulation

Die Balkendiagramme zeigen das arithmetische Mittel sowie den Standardfehler (SEM). * kennzeichnen den statistischen Unterschied im einfachen Anova zur negativen „Untreated“ Kontrollgruppe gemäß der in 2.10 beschriebenen Signifikanzniveaus, ns kennzeichnet das Fehlen einer Signifikanz; n = 6. Die IL-1 β Konzentration wird in pg/ml angegeben.

Die in dieser Experimentenreihe stimulierten J774.2 wurden gemäß 2.7 mittels Western Blot analysiert. In den Zelllysaten zeigte sich wie in Abb. 4 und 5 demonstriert eine im Verhältnis zur Negativkontrolle kontinuierlich elevierte NLRP3 Konzentration. Zunächst wurde im Rahmen der Evaluation einer Interaktion zwischen RAN-Proteinen und Httex1 23/43Q mit $n = 4$ ein signifikanter Anstieg für poly Ala ($p = 0.0092$), poly Leu ($p = 0.0211$), poly RAN ($p = 0.0179$), poly RAN + 23Q ($p=0.0025$) und poly RAN + 43 Q ($p = 0.004$) gezeigt (Abb. 4). Für die anderen RAN-Peptide zeigte sich kein signifikanter Anstieg, ebenso zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Experimentengruppen. Auch für die Positivkontrolle zeigte sich im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle keine signifikant gesteigerte NLRP3 Konzentration.

NLRP3 Western Blot

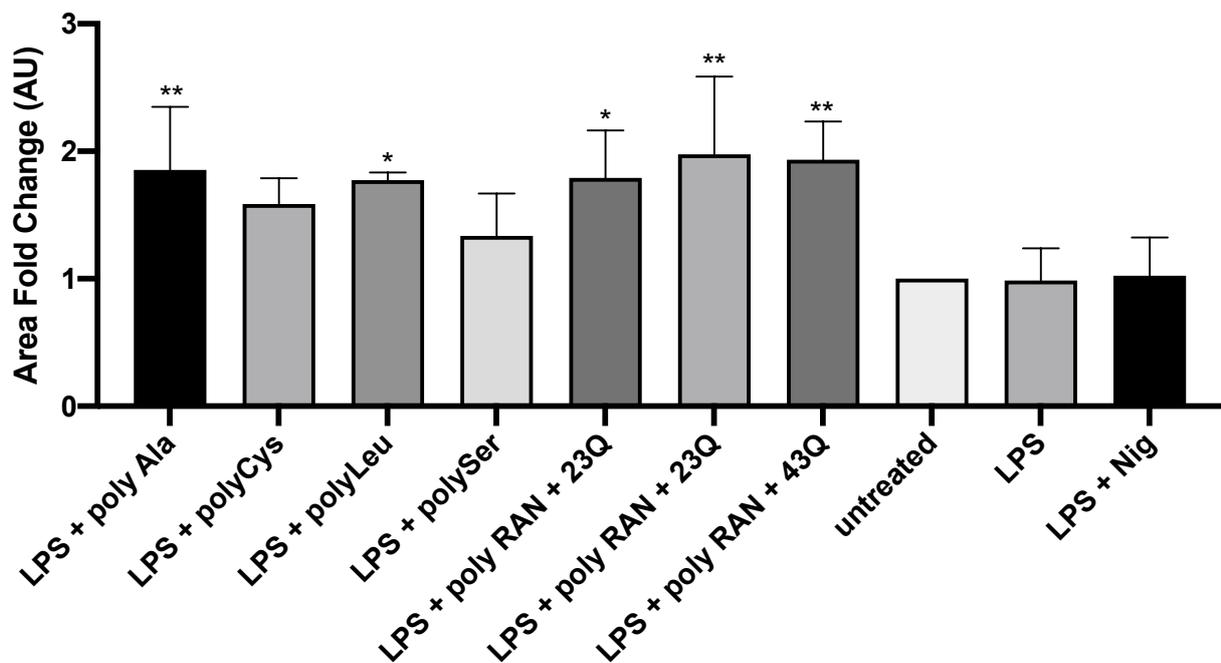


Abb. 4: Statistische von NLRP3 im Zelllysate nach RAN Stimulation

Die Balkendiagramme zeigen das arithmetische Mittel sowie den Standardfehler (SEM). * kennzeichnen den statistischen Unterschied im Kruskal-Wallis Test zur negativen „Untreated“ Kontrollgruppe gemäß der in 2.10 beschriebenen Signifikanzniveaus, ns kennzeichnet das Fehlen einer Signifikanz; $n = 4$. NLRP3 Konzentration wird als Area Fold Change (AU) im Vergleich zur negativen „Untreated“ Kontrollgruppe normalisiert auf β -Actin dargestellt.

In Folge wurden zur weiteren Signifikanzevaluation einzelner RAN Peptide die Experimente ohne Htt erneut durchgeführt, Abb 5 bildet ein n = 7 der Flächenveränderung (AU) im NLRP3 Western aus Zelllysaten nach RAN-Stimulation ab. Hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg von NLRP3 zur Negativkontrolle für alle RAN Proteine.

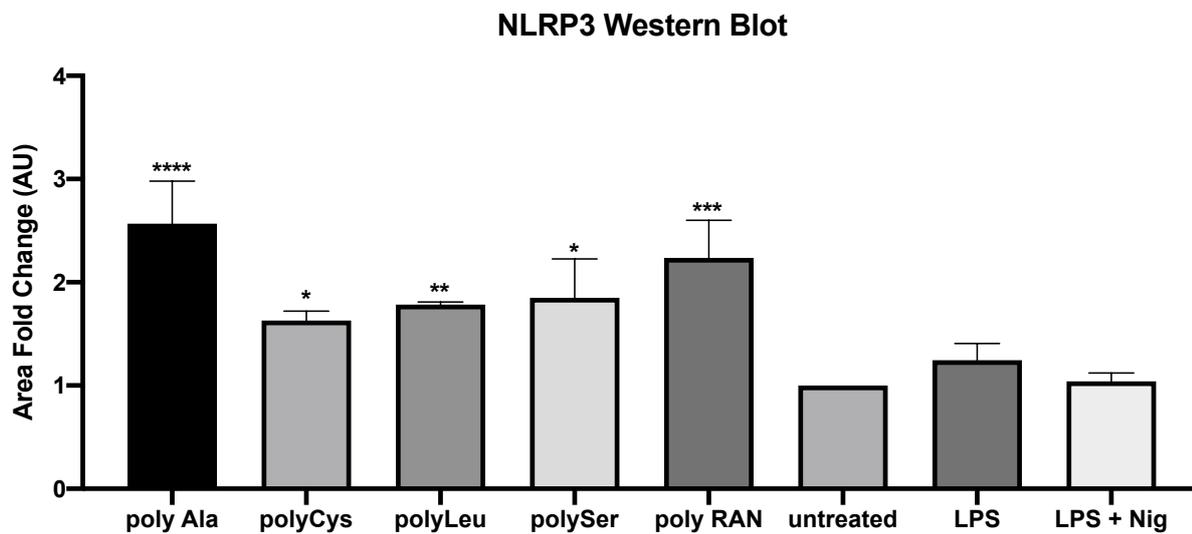


Abb. 5: Statistische Analyse von NLRP3 im Zelllysate nach RAN Stimulation II

Die Balkendiagramme zeigen das arithmetische Mittel sowie den Standardfehler (SEM). * kennzeichnen den statistischen Unterschied im Kruskal-Wallis Test zur negativen „Untreated“ Kontrollgruppe gemäß der in 2.10 beschriebenen Signifikanzniveaus, ns kennzeichnet das Fehlen einer Signifikanz; n = 7. NLRP3 Konzentration wird als Area Fold Change (AU) im Vergleich zur negativen „Untreated“ Kontrollgruppe normalisiert auf β -Actin dargestellt.

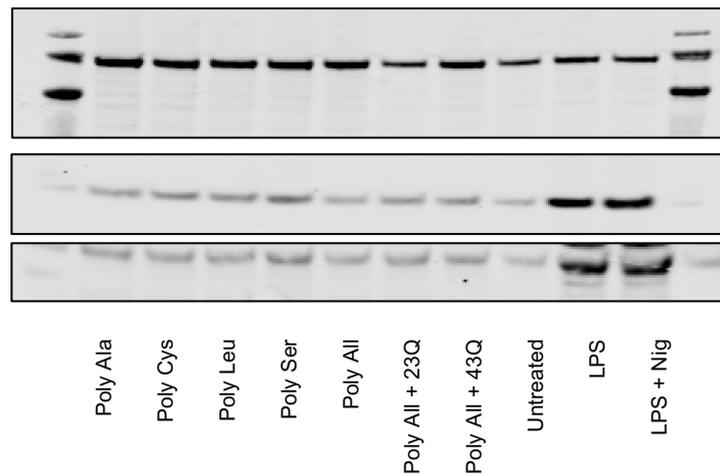


Abb. 6: Western Blot Membran der NLRP3 Konzentration im Zelllysat
Die abgebildete Membran zeigt die Banden für NLRP3, ASC und β -Actin.

3.2 NLRP3-Inflammasom Inhibition und Priming

Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse eines IL-1 β ELISA einer Stimulation von J774.2 Zellen mit 100 μ M RAN Proteinen mit und ohne vorheriges Priming mittels LPS, sowie mit Kobehandlung mit den beiden NLRP3 Inhibitoren MCC950 (20 μ M) und IFM-514 (500 nM). Als Kontrollen dienen zusätzlich LPS + Nig + MCC950/IFM-514 zur Verifikation einer NLRP3 Inhibition durch die beiden Substanzen ($n = 4$). In allen Stimulationen konnte zunächst nach statistischer Auswertung mittels einfachem Anova gezeigt werden, dass durch RAN Behandlung ohne vorheriges Priming mittels LPS keine signifikante IL-1 β Freisetzung (hier abgekürzt als ns) ausgelöst werden konnte, während auch in dieser Experimentenreihe eine Stimulation mit RAN Peptiden nach vorherigem Priming eine robuste Ausschüttung von IL-1 β auslöste ($p < 0.0001$ für alle RAN Peptide). Durch Kobehandlung mit beiden NLRP3 Inhibitoren konnte (in Abb. 7 durch das Signifikanzniveau oberhalb der jeweiligen Säulen dargestellt) die Freisetzung von IL-1 β in allen Experimenten signifikant reduziert werden. Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Inhibitoren bezüglich der jeweiligen residuellen IL-1 β -Ausschüttung. Darüber hinaus zeigte sich die residuelle IL-1 β Ausschüttung im Vergleich zur Negativkontrolle nicht signifikant erhöht. In den Kontrollen wurde die IL-1 β Ausschüttung ebenfalls signifikant gesenkt.

Anstieg der NLRP3 Konzentration, welche sich nicht signifikant von NLRP3 in stimulierten Zellen unterschied (Abb. 8).

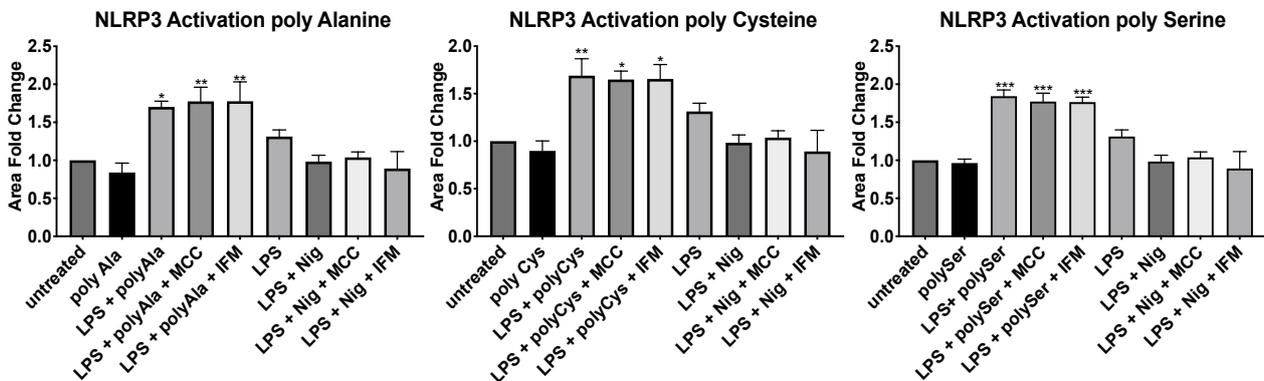


Abb. 8: Statistische Analyse von NLRP3 im Zelllysate, NLRP3 Inhibition

Die Balkendiagramme zeigen das arithmetische Mittel sowie den Standardfehler (SEM). * kennzeichnen den statistischen Unterschied im einfachen Anova zur negativen „Untreated“ Kontrollgruppe gemäß der in 2.10 beschriebenen Signifikanzniveaus, ns kennzeichnet das Fehlen einer Signifikanz; n = 3. NLRP3 Konzentration wird als Flächenveränderung (AU) im Vergleich zur negativen „Untreated“ Kontrollgruppe normalisiert auf β -Actin dargestellt.

3.3 Behandlung mit Huntingtin

In Folge wurde evaluiert, ob eine vergleichbare Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms mittels Httex1/23Q oder Httex1/43Q erreicht werden kann. In einer Dosis-Antwort Evaluationsreihe zeigte sich eine nicht dosisabhängige geringgradige signifikante IL-1 β Freisetzung nach Stimulation mit Htt und vorherigem Priming mit LPS. Hierbei bestand kein Unterschied im IL-1 β Release zwischen Httex1/23Q und Httex1/43Q (Abb. 9). In J774.2 ohne vorheriges Priming mit LPS konnte keine signifikante IL-1 β Freisetzung provoziert werden.

In Folge wurde zur Evaluation möglicher Komplementäreffekte eine Stimulation mit 100 μ M poly RAN (je 25 μ M aller RAN Peptide) zusammen mit jeweils 500 nM Httex1/23Q und Httex1/43Q durchgeführt (Abb 10). Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Stimulationsgruppen.

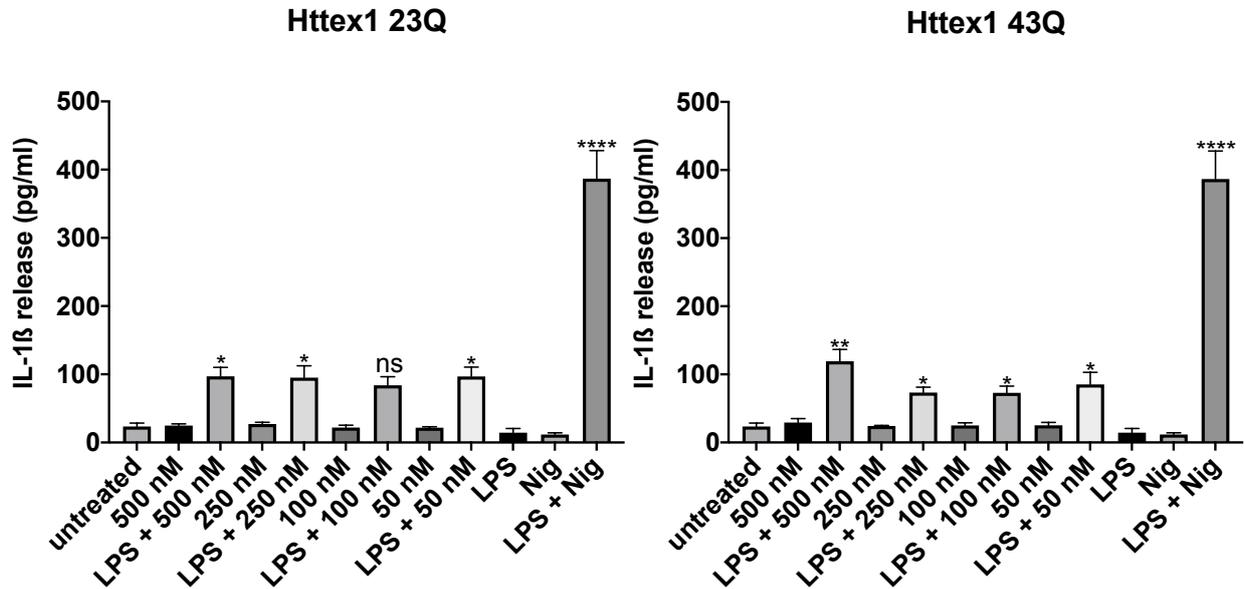


Abb. 9: IL-1 β Freisetzung nach Httex1 23/43Q Stimulation

Die Balkendiagramme zeigen das arithmetische Mittel sowie den Standardfehler (SEM). * kennzeichnen den statistischen Unterschied im einfachen Anova zur negativen „Untreated“ Kontrollgruppe gemäß der in 2.10 beschriebenen Signifikanzniveaus, ns kennzeichnet das Fehlen einer Signifikanz; n = 3. Die IL-1 β Konzentration wird in pg/ml angegeben.

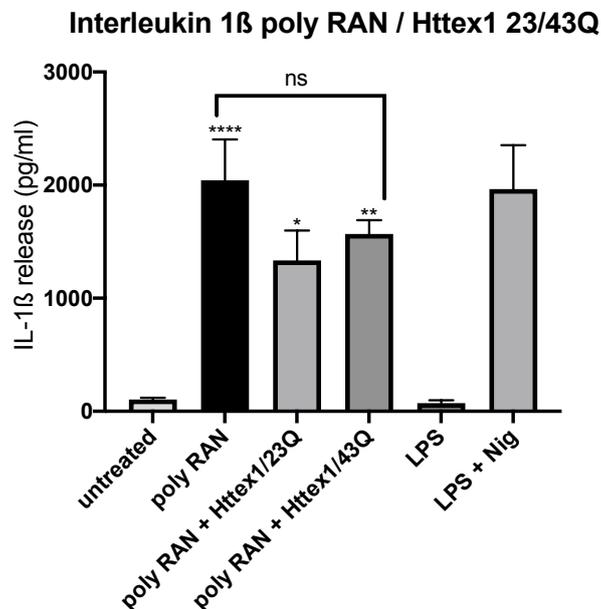


Abb. 10: Statistische Analyse von IL-1 β im Überstand, Kostimulation mit Htt

Die Balkendiagramme zeigen das arithmetische Mittel sowie den Standardfehler (SEM). * kennzeichnen den statistischen Unterschied im einfachen Anova zur negativen unbehandelten „Untreated“ Kontrollgruppe gemäß der in 2.10 beschriebenen Signifikanzniveaus, ns kennzeichnet das Fehlen einer Signifikanz zwischen den drei Stimulationsgruppen, n = 4. Die IL-1 β Konzentration wird in pg/ml angegeben.

3.4 Phagozytose

Mittels Phagozytoseassay wurde die Aufnahme von TAMRA-ligierten RAN Peptiden durch J774.2 evaluiert. Abb 11 zeigt die erste Experimentenreihe, in der eine zeitabhängige Aufnahme bis 24h evaluiert und als Anteil TAMRA positiver Zellen an der mittels FACS Canto analysierten Gesamtzellzahl dargestellt wird. Für alle drei analysierten RAN Peptide konnte eine signifikante zeitabhängige Aufnahme gezeigt werden, wobei sich die Aufnahmedynamik sowie die maximale Anzahl TAMRA positiver Zellen nach 24h zwischen den RAN Peptiden unterschieden. Die maximale Anzahl TAMRA positiver Zellen lag hier in der poly Serin Stimulation (96,5%) deutlich über der in den poly Alanin (53%) und poly Cystein (71%) Stimulationen.

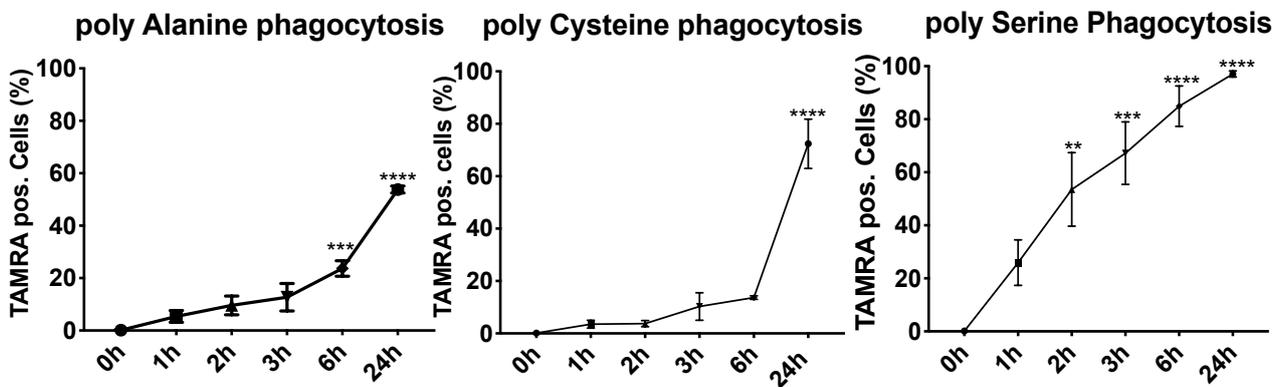


Abb. 11: Statistische Analyse der TAMRA positiven Zellen

Die Diagramme zeigen das arithmetische Mittel sowie den Standardfehler (SEM). * kennzeichnen den statistischen Unterschied im einfachen Anova zur negativen Kontrollgruppe, hier als „0h“ dargestellt gemäß der in 2.10 beschriebenen Signifikanzniveaus, $n = 4$. Der Anteil TAMRA positiver Zellen an der Gesamtzellzahl wird in % angegeben.

Parallel wurde die Möglichkeit einer Phagozytoseinhibition zunächst mittels 2 μM Cytochalasin D evaluiert. Hier zeigte sich in mit Cytochalasin D behandelten Stimulationsgruppen unabhängig vom RAN Peptid ein konstant niedrigerer Anteil an TAMRA positiven Zellen, welcher allerdings nur für den Punkt 6h (poly Alanin, $p = 0.008$) das Signifikanzniveau erreichte (Abb. 12). Zur Evaluation, ob die phagozytoseinhibierende Wirkung von Cytochalasin D in höheren Dosen signifikant ist, wurde in einer zweiten Experimentenreihe eine Behandlung mittels TAMRA ligiertem

RAN Peptid beziehungsweise TAMRA ligiertem RAN Peptid + 10 μ M Cytochalasin D für 24h durchgeführt (Abb. 13). Hier zeigte sich in der Auswertung eine signifikante Reduktion TAMRA positiver Zellen für die Stimulationsgruppen poly Ala ($p < 0.0001$) und poly Cys ($p = 0.0276$), jedoch nicht für poly Ser ($p = 0.1991$).

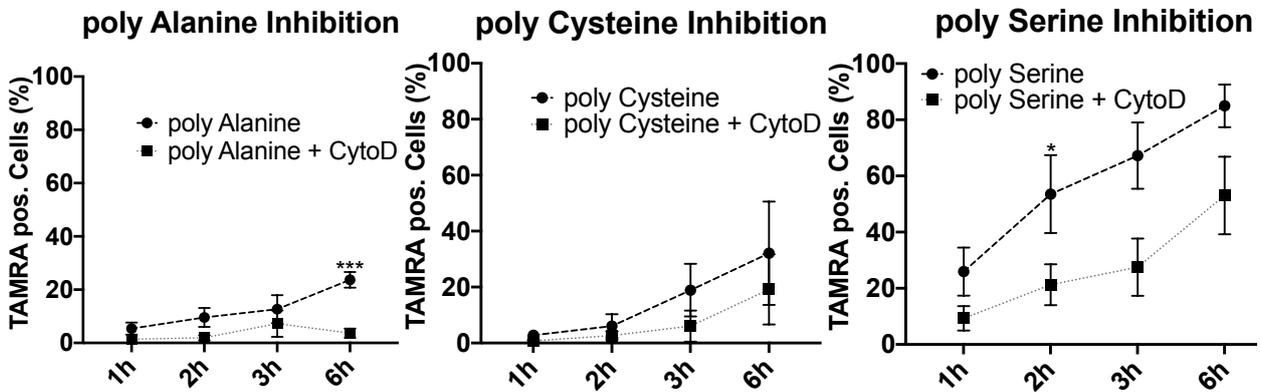


Abb. 12: Phagozytoseinhibition mittels Cytochalasin D nach 1 - 6 Stunden

Die Diagramme zeigen das arithmetische Mittel sowie den Standardfehler (SEM). * kennzeichnen den statistischen Unterschied im T-Test zwischen den Graphen am jeweiligen Zeitpunkt gemäß der in 2.10 beschriebenen Signifikanzniveaus, $n = 4$. Der Anteil TAMRA positiver Zellen an der Gesamtzellzahl wird in % angegeben.

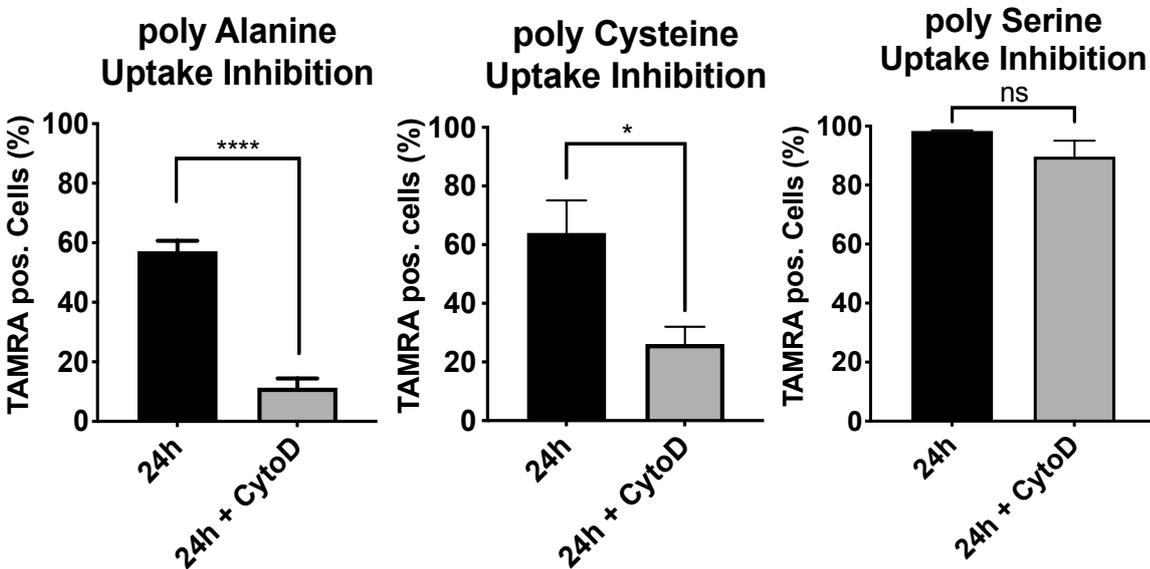


Abb. 13: Phagozytoseinhibition mittels Cytochalasin D nach 24 Stunden

Die Diagramme zeigen das arithmetische Mittel sowie den Standardfehler (SEM). * kennzeichnen den statistischen Unterschied im T-Test zwischen den beiden Stimulationsgruppen gemäß der in 2.10 beschriebenen Signifikanzniveaus, $n = 5$. Der Anteil TAMRA positiver Zellen an der Gesamtzellzahl wird in % angegeben.

3.5 Degradation

Im Rahmen der unter 2.6 beschriebenen Methodik wurde die Kapazität der J774.2 zur Degradation von RAN Peptiden mittels Degradationsassay demonstriert. Abb. 14 zeigt den Anteil TAMRA positiver Zellen nach 6h Stimulation sowie nach 6h Stimulation, Waschschritten und 24-stündiger Inkubation in DMEM + P/S + N2. Während hier für poly Serin eine signifikante Reduktion ($p < 0.0001$) der TAMRA positiven Zellen gezeigt werden konnte, bestanden für poly Alanin ($p = 0.5927$) und poly Cystein ($p = 0.1796$) zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

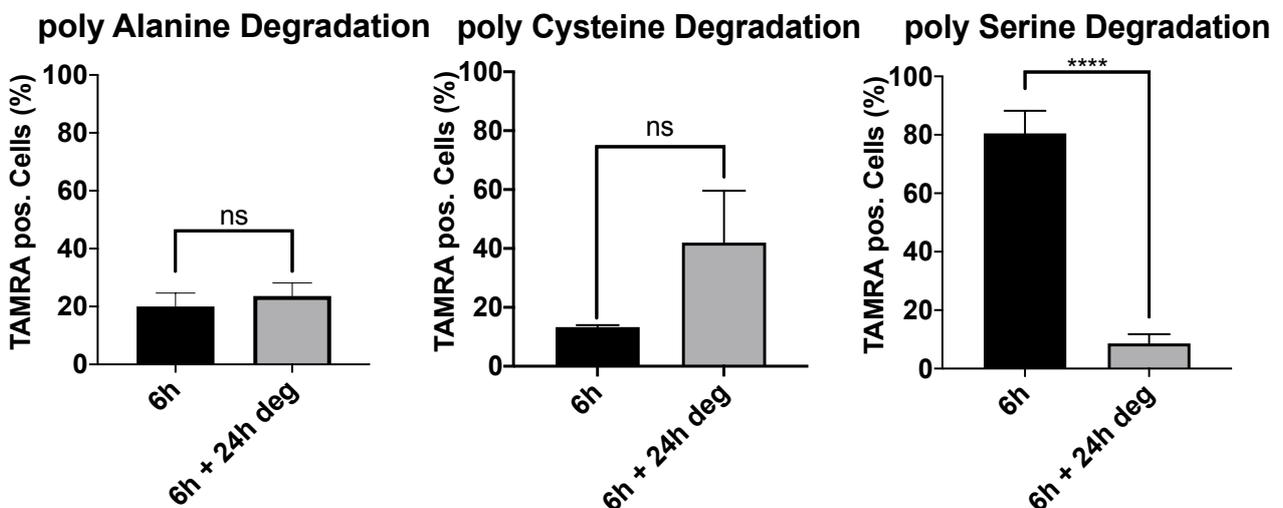


Abb. 14: Degradation von TAMRA-ligierten RAN-Peptiden

Die Diagramme zeigen das arithmetische Mittel sowie den Standardfehler (SEM). * kennzeichnen den statistischen Unterschied im T-Test zwischen den beiden Stimulationsgruppen gemäß der in 2.10 beschriebenen Signifikanzniveaus, $n = 5$. Der Anteil TAMRA positiver Zellen an der Gesamtzellzahl wird in % angegeben.

3.6 Immunzytochemie

Zur Visualisierung der Anreicherung von TAMRA-ligierten RAN Peptiden wurde nach dem unter 2.9 beschriebenen Protokoll eine immunzytochemische Färbung der mit RAN behandelten Zellen angefertigt. TAMRA-ligierte RAN Peptide sind hier mittels Fiji rot gefärbt im TRITC Kanal, Zellkerne blau angefärbt im DAPI Kanal, Zellmembranen grün angefärbt im FITC Kanal gezeigt. Wie zuvor beschrieben konnte ein TAMRA ligiertes poly Leucin nicht erfolgreich synthetisiert werden. Abb 16 zeigt zunächst eine Zellübersicht (10x Vergrößerung), in Folge dann eine symbolische 40x Vergrößerung. Es zeigt sich eine deutliche intrazelluläre Färbung für alle drei untersuchten Peptide.

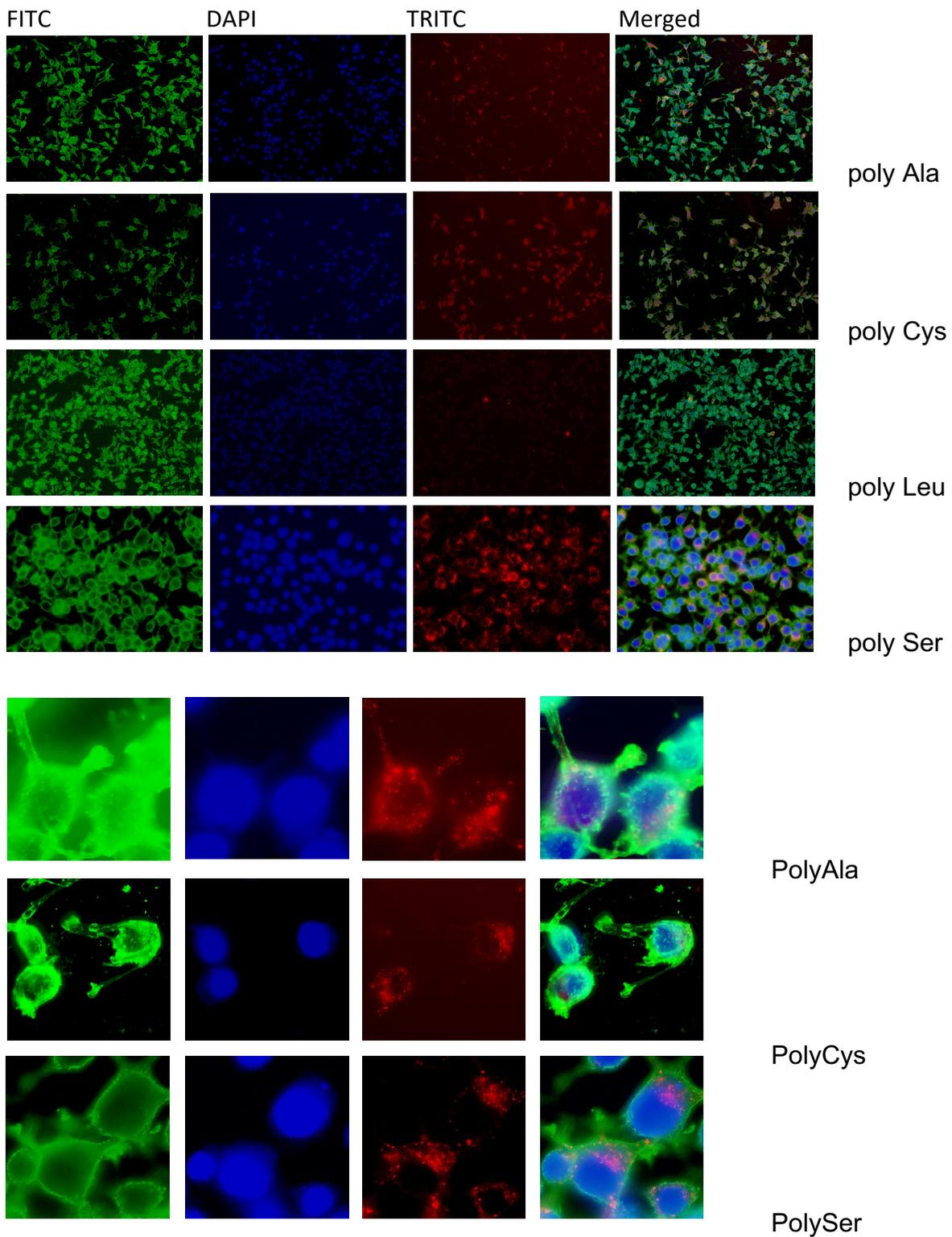


Abb. 15: Immunzytochemisches Staining von TAMRA-ligierten RAN-Peptiden

Bildliche Darstellung im FITC/DAPI/TRITC Kanal sowie Composite Overlay, farbliche Darstellung mittels Fiji.

Überstand der unter dem Versuchsaufbau aus 2.4 stimulierten J774.2 Zellen wurde mittels Zytotoxizitätsassay nach Herstellervorgaben analysiert (n= 3). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Zytotoxizität nach RAN Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle ($p > 0.05$) (Abb 16).

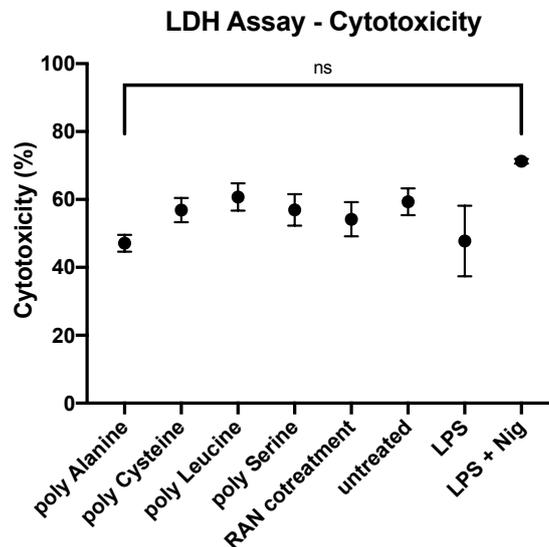


Abb. 16: Statistische Analyse der Zytotoxizität im LDH Assay

Die Diagramme zeigen das arithmetische Mittel sowie den Standardfehler (SEM). * kennzeichnen den statistischen Unterschied im einfachen Anova zwischen den jeweiligen Stimulationsgruppen und der Negativkontrolle gemäß der in 2.10 beschriebenen Signifikanzniveaus, n = 3. Die Zytotoxizität wird in % angegeben.

3.8 Weitere inflammatorische Signalwege

Zur Evaluation einer möglichen Aktivierung weiterer inflammatorischer Signalwege durch RAN Peptide wurden zunächst IL-6 und TNF-alpha ELISA nach Herstellervorgaben für unter 2.4 gewonnene Überstände durchgeführt. Wie in Abb 17 dargestellt ergaben sich für beide Experimentenreihen (jeweils n = 3) statistisch signifikante deutlich gestiegene Konzentrationen von IL-6 und TNF-Alpha im Überstand. In Folge wurde mittels dem unter 2.9 beschriebenen Protokoll ein Zytokinarray zur simultanen Evaluation multipler inflammatorischer Pathways durchgeführt (n=1). In Abb 18 wird die Veränderung der Expression verschiedener Zytokine im Vergleich zur Negativkontrolle als „Fold Change“ dargestellt. Hier zeigt sich eine deutlich erhöhte Expression sowohl der in den Voruntersuchungen beschriebenen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF-alpha, als auch weiterer Botenstoffe. Deutliche Expressionsänderungen zeigen sich für G-CSF und

RANTES/CCL5, des Weiteren präsentiert sich ein breites Spektrum elevierter Zytokine, unter anderem CXCL2/10, CCL12 und TREM 1.

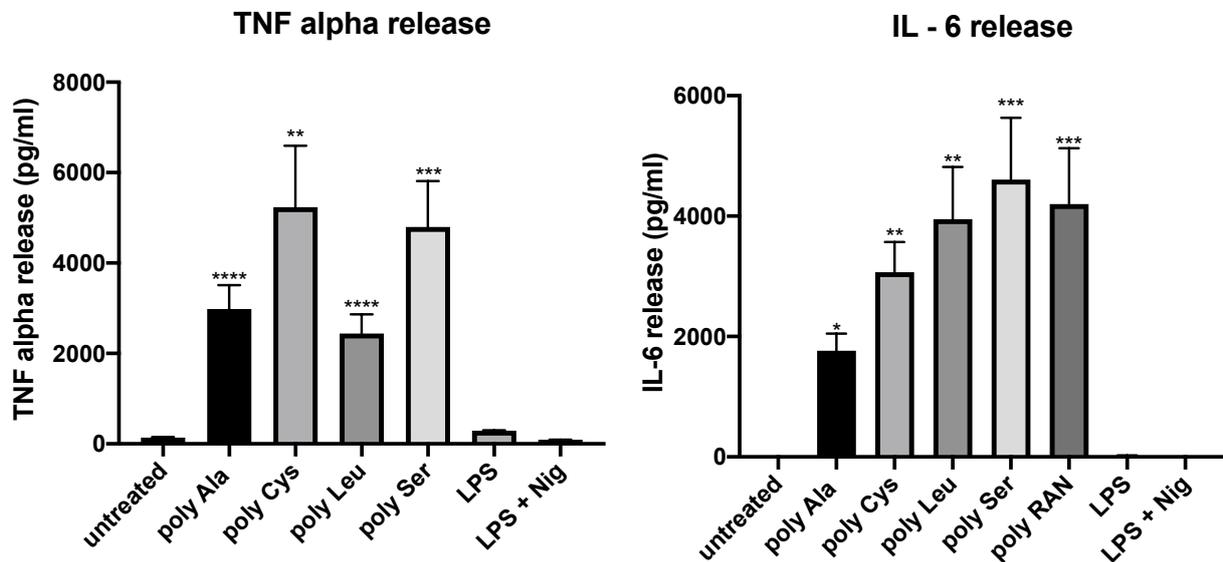


Abb. 17: Statistische Analyse der IL-6/TNF-alpha Konzentration im Überstand

Die Balkendiagramme zeigen das arithmetische Mittel sowie den Standardfehler (SEM). * kennzeichnen den statistischen Unterschied im einfachen Anova zur negativen „Untreated“ Kontrollgruppe gemäß der in 2.10 beschriebenen Signifikanzniveaus, ns kennzeichnet das Fehlen einer Signifikanz; jeweils n = 3. Zytokinkonzentrationen werden jeweils in pg/ml angegeben

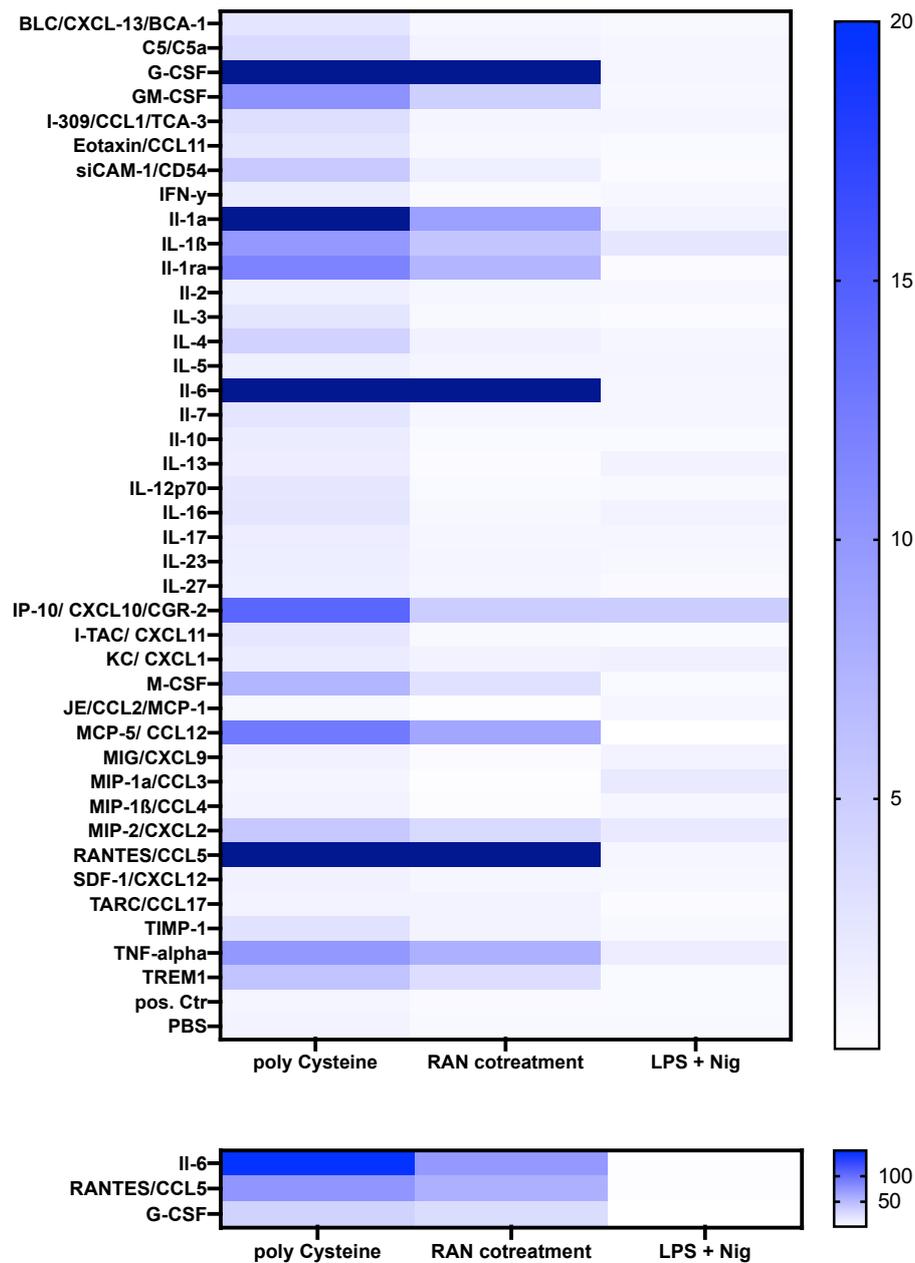


Abb. 18: HEAT Map der Zytokinexpression im Cytokine Array

Darstellung höherer Farbintensitäten als relatives Expressionsniveau im Vergleich zur Negativkontrolle. Verwendung einer zweiten Skala zur Darstellung von Zytokinen mit deutlich eleviertem Expressionsniveau, $n = 1$.

4. Diskussion

Morbus Huntington als eine der häufigsten monogenetischen neurodegenerativen Erkrankungen ist bezüglich der genauen krankheitsbedingenden Pathophysiologie bis dato nur unzureichend verstanden. Als treibender Faktor der multiaxialen Pathologie in

HD gilt das durch eine autosomal dominant vererbte pathologische Verlängerung eines CAG Repeats im Htt Gen auf Chromosom 4p16 erzeugte mutierte Huntingtin (Bates et al., 2015) auf über 40 Repeats (Langbehn et al., 2004). Die hierdurch bedingte toxische Funktionsgewinnmutation liegt einer Vielzahl pathologischer Prozesse zugrunde (Bates et al., 2015; Choo, 2004; Dalrymple et al., 2007; Gunawardena et al., 2003; Nithianantharajah und Hannan, 2013; Ross und Tabrizi, 2011). In HD wurde darüber hinaus eine inflammatorische Komponente des Krankheitsbildes demonstriert (Crotti et al., 2014). RAN Translation als RNA-strukturabhängiger nonkanonischer Translationsmechanismus, welcher eine Translation in allen Frames ohne Präsenz eines Startcodons initiieren kann, ist für verschiedene Repeatkonstellationen im Rahmen mehrerer neurodegenerativer Erkrankungen nachgewiesen worden (Glinsky, 2008; Todd et al., 2013; Zu et al., 2013). In HD kommt es zur repeatlängenabhängigen Bildung von 4 RAN Peptiden: poly Alanin, poly Serin, poly Cystein und poly Leucin, welche intrazerebrale zytotoxische Effekte bewirken (Bañez-Coronel et al., 2015).

Das NLRP3 Inflammasom ist ein multimerer Proteinkomplex, welcher als Sensor für globale zelluläre Veränderungen als Antwort auf verschiedene exo- und endogene Stimuli eine proinflammatorische Signalkaskade induzieren kann, welche über die Freisetzung von IL-1 β und IL-18 in einer Pyroptose kumulieren kann. Eine vermehrte NLRP3 Aktivierung ist für eine Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen beschrieben, auch in HD wurde das Inflammasom impliziert (Glinsky, 2008; Rodrigues et al., 2016; Siew et al., 2019).

Ziel dieser Arbeit war es, die Fähigkeit von RAN Peptiden zu evaluieren, als DAMPS zu fungieren und somit eine proinflammatorische intrazelluläre Kaskade in Mikroglia über die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms zu provozieren. Darüber hinaus soll evaluiert werden, ob eine pharmakologische Beeinflussung dieses Prozesses möglich ist.

Zunächst konnten wir mittels Phagozytoseassay darstellen, dass RAN Peptide selektiv von J774.2 internalisiert werden. Eine Kolokalisierung von RAN positiven Neuronen und Mikroglia und Überschneidungen zwischen RAN positiven Arealen und aktivierten Mikroglia haben Bañez-Coronel et al bereits in ihrer Studie gezeigt (Bañez-Coronel et al., 2015). Im Angesicht der ubiquitären Expression von Htt produzieren auch Mikroglia in HD

mHtt, was sich auf Ihre Funktion, unter anderem in Bezug auf ihre in HD gesteigerte Tendenz zur Induktion neuronalen Todes und ihr erhöhtes basales Inflammationsniveau auswirkt (Crotti et al., 2014). Hieraus lässt sich Fähigkeit von Mikroglia zur Expression von RAN Konstrukten in HD extrapolieren, weshalb im Falle einer intrazellulären RAN Färbung immer eine endogene Expression als Confounder zu erwarten ist. Dementsprechend liefert die Erkenntnis, dass extrazelluläre RAN Peptide in deutlichem Ausmaß von J774.2 aufgenommen werden erstmalig wichtige grundsätzliche Informationen („proof of principle“, Beweis des Prinzips) über die Funktion von Mikroglia im Kontext von HD-RAN Pathologie.

Zum einen zeigte sich, dass sich sowohl zeitliche Dynamik als auch maximale Aufnahmekapazität peptidspezifisch unterscheiden. Nach 24 h Behandlung mit einzelnen RAN Peptiden zeigten 96% der Mikroglia eine positive Färbung für poly Ser, jedoch nur etwa 56% beziehungsweise 72% der Mikroglia eine positive Färbung für poly Ala und Poly Cys (Abb. 11). Diese Aussage wird durch die peptidspezifisch differentielle Inhibition der Aufnahme von RAN durch den Actinpolymerisationsinhibitor Cytochalasin D untermauert. Während mittels Behandlung mit 2 μ M Cytochalasin D über alle Zeitpunkte tendenziell eine, wenngleich nicht statistisch signifikante, Reduktion des Prozentsatzes TAMRA positiver Zellen erreicht werden konnte (Abb. 12), zeigte eine Behandlung mit höheren Konzentrationen (10 μ M) für 24 Stunden lediglich für poly Ala und Cys einen signifikanten Effekt, während die poly Ser Phagozytose nicht signifikant inhibiert werden konnte. Eine deutlich höhere Fähigkeit von Mikroglia zur Internalisierung von poly Ser ist insofern interessant, als dass die Expression von poly Ser bei 35 Repeats, also dem Beginn einer pathologischen Elongation mit Potential zur Krankheitsmanifestation beginnt, poly Serin damit also in allen HD-Patienten endogen exprimiert wird.

Die Fähigkeit zur Internalisierung von RAN Peptiden durch Mikroglia wird darüber hinaus durch immunzytochemische Färbung verdeutlicht (ABB 15), hier zeigen sich TAMRA positive intrazytoplasmatische RAN Inklusionen in allen untersuchten Peptiden. Entsprechend lässt sich schlussfolgern, dass RAN Peptide im Mikroglia Modell selektiv phagozytiert werden.

Ein elementarer Prozess zur Degradation von unter anderem fehlgefalteten Proteinen im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen ist die mikrogliale lysosomale Autophagie über Autophagosombildung (Glick et al., 2010), welche sich im Kontext von neurodegenerativen Erkrankungen mit NLRP3 Komponente reduziert zeigt (Cho et al., 2014b; Yuan et al., 2018). Im Rahmen dieser Reduktion entsteht ein verstärkt proinflammatorisches Milieu, welches die Pathologie der entsprechenden Erkrankungen aggraviert (Wu et al., 2021). Wir evaluierten mittels Degradationsassay die Fähigkeit von J774.2 zum Abbau der binnen 6 Stunden internalisierten Peptide. Auch hier zeigten sich differentielle Ergebnisse für die einzelnen RAN Peptide. Während poly Ser binnen 24 Stunden zu großen Teilen abgebaut werden konnte, zeigte sich keine signifikante Reduktion TAMRA positiver J774.2 Zellen für poly Ala und poly Cys (Abb. 13). Dementsprechend besteht der Verdacht auf eine kontinuierliche Akkumulation spezifischer RAN Peptide in Mikroglia über gestörte Autophagiemechanismen, aus welcher eine Perpetualisierung der proinflammatorischen zellulären Umgebung resultieren könnte. Auch dieses Ergebnis sollte zusätzlich im Rahmen der unterschiedlichen Repeatlängen, bei denen einzelne RAN Peptide entstehen betrachtet werden. Poly Cys und poly Ala werden vor allem bei höheren Repeatlängen gebildet, welche mit der juvenilen Form der Erkrankung assoziiert sind. Eine Akkumulation dieser Proteine durch gestörte Autophagie und daraus resultierende Schädigungen mikroglialer Funktion, das generierte proinflammatorische Milieu sowie die Freisetzung von RAN Peptiden in den Liquor im Rahmen mikroglialer Apoptose könnten zusammen mit der RAN basierten neuronalen Pathologie zur Erklärung des frühen Erkrankungsbeginnes beitragen. Poly Ser als basierend auf der notwendigen Repeatlänge in allen HD-Patienten experimentiertes RAN Peptid wird mit deutlich höherer Effizienz abgebaut, entsprechend scheint sich das Ausmaß der Interferenz von RAN Peptid mit der mikroglialen Autophagie proteinspezifisch zu unterscheiden. Im Falle von poly Ser könnte dies ein Faktor im deutlich späteren Erkrankungsbeginn von HD-Patienten mit niedriger Repeatlänge im Verhältnis zu Patienten mit langen CAG-Expansionen, welche poly Ala und poly Cys exprimieren darstellen. Die genaueren Mechanismen dieser Akkumulation insbesondere in einem Modell zusätzlich endogen Htt und RAN exprimierender Zellen sollte über zukünftige Studien evaluiert werden. †

Mittels der beschriebenen Experimente wurde die Fähigkeit von RAN Peptiden, verschiedene proinflammatorische Prozesse in J774.2 Zellen auszulösen demonstriert. Zunächst zeigte sich, dass eine Behandlung mit allen RAN Peptiden eine signifikante Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms verursacht, welche in der Freisetzung von hohen Konzentrationen von Interleukin 1 β in den Zellüberstand resultiert (Abb. 3). Voraussetzung für die Aktivierung von NLRP3 ist hier allerdings das vorherige Priming des Inflammasomes, in diesem Fall durch LPS. In von HD betroffenen Individuen ist von einem basalen Priming von NLRP3 über die Aktivierung des NF-KB Pathways durch proinflammatorische Zytokine auszugehen (Lin et al., 2014; Schroder et al., 2012). Andere Untersuchungen demonstrierten bereits die Notwendigkeit eines Primingschrittes im Kontext anderer neurodegenerativer Erkrankungen wie Parkinson, wo die Aktivierung von NLRP3 durch Einführung eines Primingschrittes signifikant gesteigert werden konnte (Gordon et al., 2018; Haque et al., 2020).

Interessanterweise zeigten sich sowohl keine signifikanten Differenzen im Ausmaß der Aktivierung des NLRP3 Inflammasomes zwischen den verschiedenen RAN Peptiden als auch zwischen der Behandlung mit einzelnen RAN beziehungsweise einer Mischung aus allen 4 RAN Peptiden in einer kumulativ gleichen Konzentration (Abb. 3). Hieraus ergeben sich Hinweise auf einen Deckeneffekt in der Aktivierung von NLRP3 via RAN, gleichzeitig wurde gezeigt, dass es in diesem Kontext vermutlich keine Interaktion zwischen den einzelnen RAN Peptiden gibt, welche eine Exazerbation der NLRP3 Pathologie hervorrufen würden. Nichtsdestotrotz sollte ein prolongierter inflammatorischer Prozess aufgrund der intramikroglialen Akkumulationstendenz einzelner RAN Peptide, insbesondere Poly Ala und poly Cys in Erwägung gezogen werden. Darüber hinaus bewegte sich die mit den verwendeten Konzentrationen von RAN Peptide provozierte IL-1 β Freisetzung im Bereich der verwendeten Positivkontrollen. Entsprechend sollte in Erwägung gezogen werden, dass die verwendeten Konzentrationen das maximale NLRP3 basierte inflammatorische Potential des verwendeten Zellsystems ausreizen.

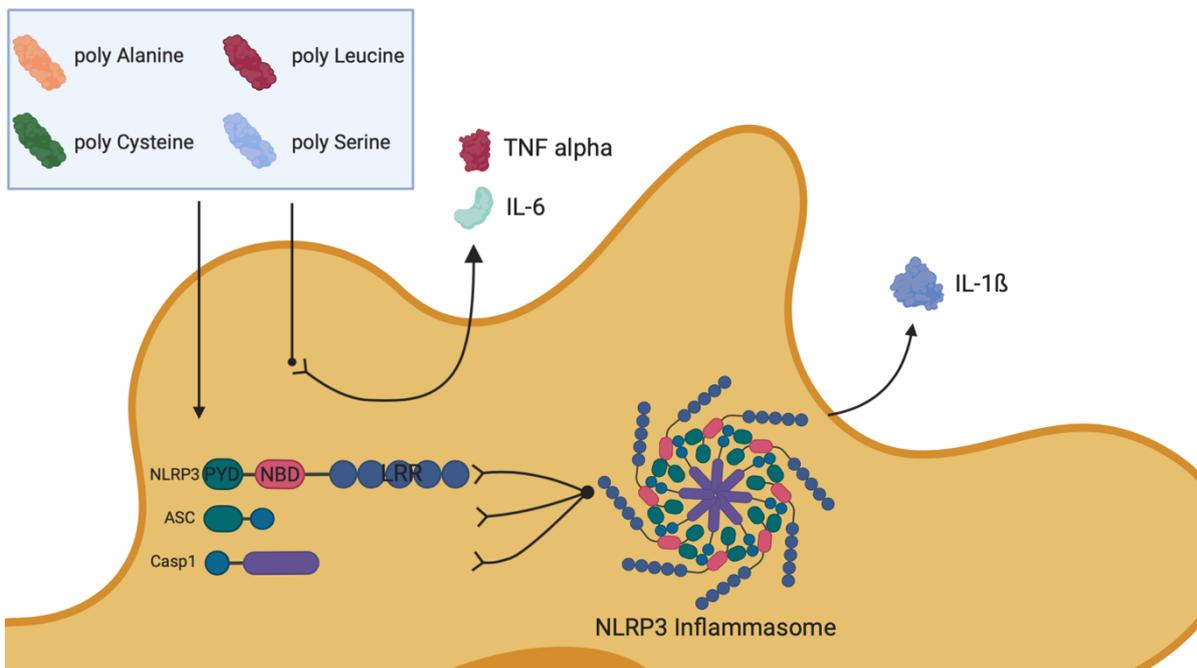


Abb. 19: Schematische Zusammenfassung der NLRP3 Aktivierung durch RAN-Peptide

In unseren Experimenten zeigte sich, dass Htt sowohl in seiner physiologischen 23Q als auch in einer pathologisch elongierten 43Q Variante lediglich eine geringe nicht dosis- und Httex1-Längenabhängige Interleukin 1 β Freisetzung provoziert. Auch eine gleichzeitige Stimulation mit RAN + Htt erbrachte im Verhältnis zur alleinigen RAN Stimulation keinen signifikanten Anstieg sowohl der IL-1 β Ausschüttung als auch der NLRP3 Expression. Dieses Ergebnis eröffnet neue Perspektiven auf das Verständnis, welcher Aspekt der Pathologie in HD der treibende Faktor der NLRP3 Achse innerhalb der neuroinflammatorischen Komponente ist. Bis dato gibt es keine experimentellen Studien, die die in HD implizierte NLRP3 Aktivierung kausal mit der Präsenz beziehungsweise der Funktion von Htt selbst verknüpfen. Darüber hinaus muss die Verknüpfung von Htt Expression mit Neuroinflammation generell in einigen vergangenen Studien im Lichte eines Confoundings durch RAN Peptide reevaluiert werden (Dalrymple et al., 2007; Crotti und Glass, 2015). Die aus dieser Experimentenreihe implizierten Ergebnisse bedürfen einer Validierung zum einen in Mikroglia selbst, zum anderen ebenfalls im Kontext endogen Htt/RAN exprimierender Zellen.

Dass von einer NLRP3 abhängigen Aktivierung ausgegangen werden sollte, zeigt sich darüber hinaus in den folgenden Experimenten zur NLRP3 Inhibition. Mittels der beiden NLRP3 Inhibitoren IFM-514 und MCC950 konnten die Konzentrationen von IL-1 β im Überstand deutlich signifikant gesenkt werden. Residuelle Konzentrationen im Überstand zeigten sich im Verhältnis zur Negativkontrolle nicht signifikant erhöht, die Funktionalität der Inhibitoren wurde darüber hinaus über die nahezu vollständige Inhibition von IL-1 β Freisetzung in den Positivkontrollen demonstriert. Beide Inhibitoren scheinen dabei die IL-1 β Freisetzung im gleichen Maße zu reduzieren, es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den residuellen Ausschüttungen nach Behandlung mit jeweils MCC950 oder IFM-514.

In dieser Experimentenreihe zeigte sich darüber hinaus ein konsistent signifikanter Anstieg der Konzentration von NLRP3 in Western Blots der mit RAN Peptiden behandelten Zellen nach vorherigem Priming mit LPS (Abb. 8). J774.2 Zellen ohne Priming zeigten keinen signifikanten Anstieg. Interessanterweise ist die Konzentration von NLRP3 selber in den mit MCC950/IFM-514 behandelten Zellen ebenfalls im Verhältnis zur Kontrolle signifikant erhöht. Als Erklärung hierfür könnten die differenziellen Wirkmechanismen der beiden Inhibitoren dienen. MCC950 blockiert nicht die Bildung des NLRP3 Inflammasoms per se, sondern die Überführung in eine aktive Konformation sowie die ATP Hydrolyse, welche zentral für die Funktion des Inflammasoms ist (Coll et al., 2019). In diesem Kontext betrachtenswert ist, dass in vorliegenden Studien zur NLRP3 Inhibition mittels MCC950 im Mausmodell ebenfalls elevierte NLRP3 Konzentrationen im Western Blot persistierten, während im BV2 Zellmodell ebenso wie hier im J774.2 Modell die NLRP3 Konzentration in den Positivkontrollen auf ein im Verhältnis zur Negativkontrolle nicht erhöhtes Niveau reduziert werden konnte. In den R 6/2 Mäusen kam es trotzdem zur deutlichen Symptomverbesserung sowie zum verbesserten Überleben von Neuronen (Chen et al., 2022). Im Angesicht der fortbestehenden Probleme in der Entwicklung therapeutischer Optionen zur sowohl symptomatischen als auch kausalen Therapie von HD sollte dementsprechend die Inhibition von Neuroinflammation im Allgemeinen beziehungsweise des NLRP3 Inflammasomes im Speziellen unabhängig davon, welcher Aspekt der Pathologie letztendlich das proinflammatorische Milieu generiert, in den Fokus der Medikamentenforschung gestellt werden.

Im Rahmen der dargestellten Experimente konnte darüber hinaus demonstriert werden, dass die proinflammatorische Wirkung von RAN Peptiden im J774.2 Modell sich nicht auf den NLRP3 Signalweg beschränkt, sondern in der Ausschüttung weiterer Zytokine mit divergierenden Signalwegen resultiert. Erhöhte Level von IL-6 und TNF alpha wurden in HD Patienten bereits Jahre vor dem Beginn klinischer Symptome nachgewiesen und korrelieren darüber hinaus mit der Symptomschwere (Björkqvist et al., 2008), auch RAN Peptide akkumulieren bereits in präklinischen Patienten (Bañez-Coronel et al., 2015). Die hier demonstrierte deutliche Freisetzung beider Zytokine nach Stimulation mit RAN Peptiden (Abb. 17) könnte diese beiden Faktoren von HD kausal miteinander verknüpfen.

Mittels Cytokine Array konnte darüber hinaus demonstriert werden, dass die systemische Antwort auf RAN Peptide nach Internalisierung durch Mikroglia über eine große Anzahl divergierender Signalwege vermittelt wird (Abb. 18). Neben den bereits in anderen Aspekten dieser Arbeit implizierten Signalwegen (IL-1 β , IL-6, TNF-alpha) zeigt sich hier auch eine antiinflammatorische Antwort. Granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) agiert nicht nur als Faktor in der Neurogenese, sondern reduziert im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen Amyloid Beta vermittelte Pathologie (Doi et al., 2014), verbessert die motorische Funktion von Mäusen nach Spinal Chord Injury (Chen et al., 2015) und fungiert als protektiver Faktor von Motorneuronen gegen Apoptose unter anderem in einem SOD1-ALS Modell (Pitzer et al., 2008). Die deutlich erhöhte Ausschüttung könnte also eine mikrogliavermittelte systemische Antwort gegenüber der RAN Neurotoxizität bedeuten. Die im Vergleich zu proinflammatorischen Zytokinen deutlich weniger erhöhte Ausschüttung eher antiinflammatorischer Substanzen wie IL-4, IL-5 und IL-10 (Garlanda et al., 2013) suggeriert jedoch ein Überwiegen der proinflammatorischen Komponente der Immunantwort. Darüber hinaus von Interesse ist die deutliche Aktivierung des Chemokins CCL5/RANTES. Ebenso wie NLRP3 wird CCL5 über NF-KB vermittelte Signalwege aktiviert (Soria und Ben-Baruch, 2008). CCL5 wird von verschiedenen Zellen, insbesondere Makrophagen und T-Leukozyten exprimiert und dient der Rekrutierung anderer Makrophagen, T-Zellen, Eosinophilen und Basophilen Zellen zum Ort der Inflammation (Aldinucci und Colombatti, 2014, S. 5). Zusammen mit weiteren in diesem Kontext aktivierten Chemokinen könnte es die zelluläre immunologische Antwort auf RAN Peptide koordinieren und so das proinflammatorische

Geschehen aggravieren. Weitere Experimente müssten die genauen Konsequenzen dieser Chemotaxis im Kontext von HD und RAN-HD Pathologie eruieren.

Limitierungen dieser Studie entstehen in erster Linie aus der Frage, ob die in dieser Zelllinie demonstrierten Ergebnisse auf humane Mikroglia übertragbar ist. Während diese Studie hauptsächlich darauf zielt zu eruieren, ob die generelle Möglichkeit von RAN Peptiden als DAMPS zu fungieren und so den NLRP3 Signalweg zu aktivieren besteht, werden weitere Untersuchungen dies im Kontext komplexerer Modelle mit zelleigener Expression von Htt und RAN Peptiden in endogenen Leveln untersuchen müssen. In dieser Studie verwendete RAN Konzentrationen dürften deutlich über den endogenen liegen, allerdings wird im Menschen eine kontinuierliche geringgradige Inflammation im Kontrast zu der hier dargestellten akuten deutlich exazerbierten Reaktion zur Darstellung der grundsätzlichen Funktion des NLRP3 im Kontext von HD RAN hypothetisiert. Darüber hinaus gibt es aktuell keinen Konsens zur exakten Länge von HD RAN Peptiden und es ist sogar wahrscheinlich, dass RAN-Translationsprodukte in vivo in variabler Länge vorliegen. Die Notwendigkeit zur Verwendung nicht bakteriell transfizierter RAN Peptide zur Vermeidung von intrinsischen Primingeffekten durch LPS-Kontamination machte aus technischen Gründen die Verwendung von 10 beziehungsweise 5 Repeat langen RAN Proteinen erforderlich.

5. Zusammenfassung

Neuroinflammation als ein treibender Faktor der Pathologie verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen spielt auch in der Pathologie von HD eine relevante Rolle. Durch die Entdeckung von RAN Translation, einem Mechanismus nonkanonischer RNA-strukturabhängiger Translation in HD ebenso wie im Kontext verschiedener anderer monogenetischer neurodegenerativer Erkrankungen wurde ein neuer Aspekt dieser und daraus resultierende verschiedentliche pathologische Prozesse im ZNS entdeckt. Wir konnten erstmalig diese beiden Prozesse mechanistisch miteinander verknüpfen und im Zellmodell eine Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms durch als DAMP fungierende HD-RAN in einem J774.2 Mikroglia-Zellmodell zeigen. Dabei konnten wir eine Ereigniskette von peptidabhängiger Aufnahme durch Phagozytose, Aktivierung des NLRP3

Inflammasoms und Freisetzung von Zytokinen sowie partiellem peptidspezifischem Abbau der internalisierten RAN Peptide experimentell nachweisen.

Zunächst konnten wir in unseren Versuchen darstellen, dass RAN Peptide selektiv und im proteinspezifischen Ausmaß durch Mikroglia via Phagozytose internalisiert werden. Dieser Prozess ist durch Phagozytoseinhibition ebenfalls proteinspezifisch partiell inhibierbar. Die Fähigkeit von J774.2, die intrazytoplasmatischen RAN Peptide über Autophagie zu degradieren, unterscheidet sich zwischen den spezifischen RAN Peptide und scheint insbesondere für poly Ala und poly Cys deutlich reduziert zu sein, woraus sich eine kontinuierliche Akkumulation von RAN Proteinen in J774.2 Zellen ergibt. Innerhalb der Zellen konnte eine deutliche Aktivierung des NLRP3 Pathways, welcher in der Ausschüttung von IL-1 β resultiert, demonstriert werden. Diese konnte durch selektive NLRP3 Inhibition nahezu vollständig annulliert werden. Eine Behandlung mit sowohl physiologischem als auch pathologischem Htt erbrachte keine zusätzliche NLRP3 Aktivierung im Verhältnis zur alleinigen Behandlung mit RAN Peptiden, gleichzeitig scheinen keine die NLRP3-Aktivierung aggravierenden Interaktionen zwischen den einzelnen RAN Peptiden zu bestehen. Die Behandlung mit RAN Peptiden wirkt sich nicht signifikant auf das Überleben von Mikroglia aus, allerdings kommt es zusätzlich zu NLRP3 zu einer Aktivierung verschiedener vor allem proinflammatorischer Pathways, die einer Vielzahl systemischer Antworten auf den Stimulus durch RAN zugrunde liegen dürften. Diese Erkenntnisse laden zu einer fortlaufenden Evaluation des proinflammatorischen Potentials von RAN Peptiden im Kontext komplexerer Systeme und im humanen Modell ein und zeigen einen Weg zur Therapie von HD mittels NLRP3 Inhibition.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der aus dem Htt Gen generierten Konstrukte	22
Abb. 2: Schematische Darstellung des NLRP3-Inflammasom Pathways	26
Abb. 3: Statistische Analyse der IL-1 β Konzentration nach RAN Stimulation	45
Abb. 4: Statistische Analyse von NLRP3 im Zelllysat nach RAN Stimulation	46
Abb. 5: Statistische Analyse von NLRP3 im Zelllysat nach RAN Stimulation II	47
Abb. 6: Western Blot Membran der NLRP3 Konzentration im Zelllysat	48
Abb. 7: Statistische Analyse von IL-1 β im Überstand, NLRP3 Inhibition	49
Abb. 8: Statistische Analyse von NLRP3 im Zelllysat, NLRP3 Inhibition	50
Abb. 9: IL-1 β Release nach Httex1 23/43Q Stimulation	51
Abb. 10: Statistische Analyse von IL-1 β im Überstand, Kostimulation mit Htt	51
Abb. 11: Statistische Analyse der TAMRA positiven Zellen	52
Abb. 12: Phagozytoseinhibition mittels Cytochalasin D nach 1 – 24 Stunden	53
Abb. 13: Phagozytoseinhibition mittels Cytochalasin D nach 24 Stunden	53
Abb. 14: Degradation von TAMRA.ligierten Proteinen	54
Abb. 15: Immunzytochemisches Staining von TAMRA-ligierten RAN-Proteinen	55
Abb. 16: Statistische Analyse der Zytotoxizität im LDH Assay	56
Abb. 17: Statistische Analyse der IL-6/TNF-alpha Konzentration im Überstand	57
Abb. 18: HEAT Map der Zytokinexpression im Cytokine Array	58
Abb. 19: Schematische Darstellung der NLRP3 Aktivierung durch RAN	63

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Devices	31
Tab. 2: Peptide	32
Tab. 3: Verbrauchsmaterialien	33
Tab. 4: Zelllinie	33
Tab. 5: Zellkulturreagenzien	33
Tab. 6: Chemikalien	34
Tab. 7: Readout Kits	35
Tab. 8: Antikörper	36
Tab. 9: Software	37

8. Literaturverzeichnis

Aldinucci D, Colombatti A. The Inflammatory Chemokine CCL5 and Cancer Progression. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 1–12. doi:10.1155/2014/292376

Alvarez-Erviti L, Couch Y, Richardson J, Cooper JM, Wood MJA. Alpha-synuclein release by neurons activates the inflammatory response in a microglial cell line. *Neurosci Res* 2011; 69: 337–342. doi:10.1016/j.neures.2010.12.020

Andrew SE, Paul Goldberg Y, Kremer B, Telenius H, Theilmann J, Adam S, Starr E, Squitieri F, Lin B, Kalchman MA, Graham RK, Hayden MR. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* 1993; 4: 398–403. doi:10.1038/ng0893-398

Aretouli E, Brandt J. Episodic Memory in Dementia: Characteristics of New Learning that Differentiate Alzheimer's, Huntington's, and Parkinson's Diseases. *Arch Clin Neuropsychol* 2010; 25: 396–409. doi:10.1093/arclin/acq038

Ash PEA, Bieniek KF, Gendron TF, Caulfield T, Lin W-L, DeJesus-Hernandez M, van Blitterswijk MM, Jansen-West K, Paul JW, Rademakers R, Boylan KB, Dickson DW, Petrucelli L. Unconventional Translation of C9ORF72 GGGGCC Expansion Generates Insoluble Polypeptides Specific to c9FTD/ALS. *Neuron* 2013; 77: 639–646. doi:10.1016/j.neuron.2013.02.004

Ayhan F, Perez BA, Shorrock HK, Zu T, Banez-Coronel M, Reid T, Furuya H, Clark HB, Troncoso JC, Ross CA, Subramony S, Ashizawa T, Wang ET, Yachnis AT, Ranum LP. SCA 8 RAN polySer protein preferentially accumulates in white matter regions and is regulated by EIF 3F. *EMBO J* 2018; 37:. doi:10.15252/emboj.201899023

Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting Proteostasis for Disease Intervention. *Science* 2008; 319: 916–919. doi:10.1126/science.1141448

Bañez-Coronel M, Ayhan F, Tarabochia AD, Zu T, Perez BA, Tusi SK, Pletnikova O, Borchelt DR, Ross CA, Margolis RL, Yachnis AT, Troncoso JC, Ranum LPW. RAN Translation in Huntington Disease. *Neuron* 2015; 88: 667–677.

doi:10.1016/j.neuron.2015.10.038

Bañez-Coronel M, Porta S, Kagerbauer B, Mateu-Huertas E, Pantano L, Ferrer I, Guzmán M, Estivill X, Martí E. A Pathogenic Mechanism in Huntington's Disease Involves Small CAG-Repeated RNAs with Neurotoxic Activity. *PLoS Genet* 2012; 8: e1002481. doi:10.1371/journal.pgen.1002481

Barry R, John SW, Liccardi G, Tenev T, Jaco I, Chen C-H, Choi J, Kasperkiewicz P, Fernandes-Alnemri T, Alnemri E, Drag M, Chen Y, Meier P. SUMO-mediated regulation of NLRP3 modulates inflammasome activity. *Nat Commun* 2018; 9: 3001. doi:10.1038/s41467-018-05321-2

Bates GP, Dorsey R, Gusella JF, Hayden MR, Kay C, Leavitt BR, Nance M, Ross CA, Scahill RI, Wetzel R, Wild EJ, Tabrizi SJ. Huntington disease. *Nat Rev Dis Primer* 2015; 1: 15005. doi:10.1038/nrdp.2015.5

Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V, Latz E. Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *J Immunol* 2009; 183: 787–791. doi:10.4049/jimmunol.0901363

Björkqvist M, Wild EJ, Thiele J, Silvestroni A, Andre R, Lahiri N, Raibon E, Lee RV, Benn CL, Soulet D, Magnusson A, Woodman B, Landles C, Pouladi MA, Hayden MR, Khalili-Shirazi A, Lowdell MW, Brundin P, Bates GP, Leavitt BR, Möller T, Tabrizi SJ. A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J Exp Med* 2008; 205: 1869–1877. doi:10.1084/jem.20080178

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *The Lancet* 2006; 368: 387–403. doi:10.1016/S0140-6736(06)69113-7

Block ML, Zecca L, Hong J-S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8: 57–69. doi:10.1038/nrn2038

Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat*

Rev Immunol 2016; 16: 407–420. doi:10.1038/nri.2016.58

Chen K-P, Hua K-F, Tsai F-T, Lin T-Y, Cheng C-Y, Yang D-I, Hsu H-T, Ju T-C. A selective inhibitor of the NLRP3 inflammasome as a potential therapeutic approach for neuroprotection in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neuroinflammation* 2022; 19: 56. doi:10.1186/s12974-022-02419-9

Chen W-F, Chen C-H, Chen N-F, Sung C-S, Wen Z-H. Neuroprotective Effects of Direct Intrathecal Administration of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Rats with Spinal Cord Injury. *CNS Neurosci Ther* 2015; 21: 698–707. doi:10.1111/cns.12429

Cho M-H, Cho K, Kang H-J, Jeon E-Y, Kim H-S, Kwon H-J, Kim H-M, Kim D-H, Yoon S-Y. Autophagy in microglia degrades extracellular β -amyloid fibrils and regulates the NLRP3 inflammasome. *Autophagy* 2014a; 10: 1761–1775. doi:10.4161/auto.29647

Cho M-H, Cho K, Kang H-J, Jeon E-Y, Kim H-S, Kwon H-J, Kim H-M, Kim D-H, Yoon S-Y. Autophagy in microglia degrades extracellular β -amyloid fibrils and regulates the NLRP3 inflammasome. *Autophagy* 2014b; 10: 1761–1775. doi:10.4161/auto.29647

Choo YS. Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1407–1420. doi:10.1093/hmg/ddh162

Cleary JD, Ranum LP. New developments in RAN translation: insights from multiple diseases. *Curr Opin Genet Dev* 2017; 44: 125–134. doi:10.1016/j.gde.2017.03.006

Coll RC, Hill JR, Day CJ, Zamoshnikova A, Boucher D, Massey NL, Chitty JL, Fraser JA, Jennings MP, Robertson AAB, Schroder K. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nat Chem Biol* 2019; 15: 556–559. doi:10.1038/s41589-019-0277-7

Coll RC, Robertson AAB, Chae JJ, Higgins SC, Muñoz-Planillo R, Inserra MC, Vetter I, Dungan LS, Monks BG, Stutz A, Croker DE, Butler MS, Haneklaus M, Sutton CE, Núñez G, Latz E, Kastner DL, Mills KHG, Masters SL, Schroder K, Cooper MA, O'Neill LAJ. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory

diseases. *Nat Med* 2015; 21: 248–255. doi:10.1038/nm.3806

Crotti A, Benner C, Kerman BE, Gosselin D, Lagier-Tourenne C, Zuccato C, Cattaneo E, Gage FH, Cleveland DW, Glass CK. Mutant Huntingtin promotes autonomous microglia activation via myeloid lineage-determining factors. *Nat Neurosci* 2014; 17: 513–521. doi:10.1038/nn.3668

Crotti A, Glass CK. The choreography of neuroinflammation in Huntington's disease. *Trends Immunol* 2015; 36: 364–373. doi:10.1016/j.it.2015.04.007

Dalrymple A, Wild EJ, Joubert R, Sathasivam K, Björkqvist M, Petersén Å, Jackson GS, Isaacs JD, Kristiansen M, Bates GP, Leavitt BR, Keir G, Ward M, Tabrizi SJ. Proteomic Profiling of Plasma in Huntington's Disease Reveals Neuroinflammatory Activation and Biomarker Candidates. *J Proteome Res* 2007; 6: 2833–2840. doi:10.1021/pr0700753

Dansokho C, Heneka MT. Neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2018; 125: 771–779. doi:10.1007/s00702-017-1831-7

Day JW, Schut LJ, Moseley ML, Durand AC, Ranum LPW. Spinocerebellar ataxia type 8: Clinical features in a large family. *Neurology* 2000; 55: 649–657. doi:10.1212/WNL.55.5.649

de Mezer M, Wojciechowska M, Napierala M, Sobczak K, Krzyzosiak WJ. Mutant CAG repeats of Huntingtin transcript fold into hairpins, form nuclear foci and are targets for RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 3852–3863. doi:10.1093/nar/gkq1323

Debye B, Schmülling L, Zhou L, Rune G, Beyer C, Johann S. Neurodegeneration and NLRP3 inflammasome expression in the anterior thalamus of SOD1(G93A) ALS mice: Neurodegeneration and NLRP3 inflammasome expression. *Brain Pathol* 2018; 28: 14–27. doi:10.1111/bpa.12467

DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J, Kouri N, Wojtas A, Sengdy P, Hsiung G-YR, Karydas A, Seeley WW, Josephs KA, Coppola G, Geschwind DH, Wszolek ZK, Feldman H, Knopman DS, Petersen RC, Miller BL, Dickson DW, Boylan KB, Graff-

Radford NR, Rademakers R. Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron* 2011; 72: 245–256. doi:10.1016/j.neuron.2011.09.011

Dempsey C, Rubio Araiz A, Bryson KJ, Finucane O, Larkin C, Mills EL, Robertson AAB, Cooper MA, O'Neill LAJ, Lynch MA. Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 promotes non-phlogistic clearance of amyloid- β and cognitive function in APP/PS1 mice. *Brain Behav Immun* 2017; 61: 306–316. doi:10.1016/j.bbi.2016.12.014

Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 519–550. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132612

Doi Y, Takeuchi H, Mizoguchi H, Fukumoto K, Horiuchi H, Jin S, Kawanokuchi J, Parajuli B, Sonobe Y, Mizuno T, Suzumura A. Granulocyte-Colony Stimulating Factor Attenuates Oligomeric Amyloid β Neurotoxicity by Activation of Neprilysin. *PLoS ONE* 2014; 9: e103458. doi:10.1371/journal.pone.0103458

Duff K, Paulsen JS, Beglinger LJ, Langbehn DR, Wang C, Stout JC, Ross CA, Aylward E, Carlozzi NE, Queller S, Group P-HI of the H. “Frontal” Behaviors Before the Diagnosis of Huntington’s Disease and Their Relationship to Markers of Disease Progression: Evidence of Early Lack of Awareness. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2010; 22: 196–207. doi:10.1176/jnp.2010.22.2.196

Dumas E. A review of cognition in Huntington s disease. *Front Biosci* 2013; S5: 1–18. doi:10.2741/S355

Duyao M, Ambrose C, Myers R, Novelletto A, Persichetti F, Frontali M, Folstein S, Ross C, Franz M, Abbott M, Gray J, Conneally P, Young A, Penney J, Hollingsworth Z, Shoulson I, Lazzarini A, Falek A, Koroshetz W, Sax D, Bird E, Vonsattel J, Bonilla E, Alvir J, Bickham Conde J, Cha J-H, Dure L, Gomez F, Ramos M, Sanchez-Ramos J, Snodgrass S, de Young M, Wexler N, Moscowitz C, Penchaszadeh G, MacFarlane H, Anderson M, Jenkins B, Srinidhi J, Barnes G, Gusella J, MacDonald M. Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington’s disease. *Nat Genet* 1993; 4: 387–392. doi:10.1038/ng0893-387

Duyao MP, Auerbach AB, Ryan A, Persichetti F, Barnes GT, McNeil SM, Ge P, Vonsattel J-P, Gusella JF, Joyner AL, MacDonald ME. Inactivation of the Mouse Huntington's Disease Gene Homolog *Hdh*. *Science* 1995; 269: 407–410. doi:10.1126/science.7618107

Epping EA, Paulsen JS. Depression in the early stages of Huntington disease. *Neurodegener Dis Manag* 2011; 1: 407–414. doi:10.2217/nmt.11.45

Fan Z, Pan Y-T, Zhang Z-Y, Yang H, Yu S-Y, Zheng Y, Ma J-H, Wang X-M. Systemic activation of NLRP3 inflammasome and plasma α -synuclein levels are correlated with motor severity and progression in Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* 2020; 17:. doi:10.1186/s12974-019-1670-6

Ferrari CC, Pott Godoy MC, Tarelli R, Chertoff M, Depino AM, Pitossi FJ. Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1 β in the substantia nigra. *Neurobiol Dis* 2006; 24: 183–193. doi:10.1016/j.nbd.2006.06.013

Frank W, Lindenberg KS, Mühlbäck A, Lewerenz J, Landwehrmeyer GB. Krankheitsmodifizierende Therapieansätze bei der Huntington-Krankheit: Blicke zurück und Blicke voraus. *Nervenarzt* 2022; 93: 179–190. doi:10.1007/s00115-021-01224-8

Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, Ratter JM, Stutz A, Engels G, Brenker C, Nordhoff M, Mirandola SR, Al-Amoudi A, Mangan MS, Zimmer S, Monks BG, Fricke M, Schmidt RE, Espevik T, Jones B, Jarnicki AG, Hansbro PM, Busto P, Marshak-Rothstein A, Hornemann S, Aguzzi A, Kastenmüller W, Latz E. The adaptor ASC has extracellular and „prionoid“ activities that propagate inflammation. *Nat Immunol* 2014; 15: 727–737. doi:10.1038/ni.2913

Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity* 2013; 39: 1003–1018. doi:10.1016/j.immuni.2013.11.010

Gendron TF, Bieniek KF, Zhang Y-J, Jansen-West K, Ash PEA, Caulfield T, Daugherty L, Dunmore JH, Castanedes-Casey M, Chew J, Cosio DM, van Blitterswijk M, Lee WC, Rademakers R, Boylan KB, Dickson DW, Petrucelli L. Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. *Acta Neuropathol (Berl)* 2013; 126: 829–

844. doi:10.1007/s00401-013-1192-8

Ghasemi M, Brown RH. Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018; 8: a024125. doi:10.1101/cshperspect.a024125

Ghosh R, Tabrizi SJ. Clinical Features of Huntington's Disease. , in: Nóbrega, C., Pereira de Almeida, L. (Hrsg.), *Polyglutamine Disorders, Advances in Experimental Medicine and Biology* 2018; Springer International Publishing, Cham, S. 1–28. doi:10.1007/978-3-319-71779-1_1

Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 2010; 221: 3–12. doi:10.1002/path.2697

Glinsky GV. SNP-guided microRNA maps (MirMaps) of 16 common human disorders identify a clinically accessible therapy reversing transcriptional aberrations of nuclear import and inflammasome pathways. *Cell Cycle* 2008; 7: 3564–3576. doi:10.4161/cc.7.22.7073

Gomez-Deza J, Lee Y, Troakes C, Nolan M, Al-Sarraj S, Gallo J-M, Shaw CE. Dipeptide repeat protein inclusions are rare in the spinal cord and almost absent from motor neurons in C9ORF72 mutant amyotrophic lateral sclerosis and are unlikely to cause their degeneration. *Acta Neuropathol Commun* 2015; 3: 38. doi:10.1186/s40478-015-0218-y

Gordon R, Albornoz EA, Christie DC, Langley MR, Kumar V, Manotovani S, Robertson AAB, Butler MS, Rowe DB, O'Neill LA, Kanthasamy AG, Schroder K, Cooper MA, Woodruff TM. Inflammasome inhibition prevents α -synuclein pathology and dopaminergic neurodegeneration in mice. *Sci Transl Med* 2018; 10:. doi:10.1126/scitranslmed.aah4066

Gunawardena S, Her L-S, Brusch RG, Laymon RA, Niesman IR, Gordesky-Gold B, Sintasath L, Bonini NM, Goldstein LSB. Disruption of Axonal Transport by Loss of Huntingtin or Expression of Pathogenic PolyQ Proteins in *Drosophila*. *Neuron* 2003; 40: 25–40. doi:10.1016/S0896-6273(03)00594-4

Guo Q, Bin Huang, Cheng J, Seefelder M, Engler T, Pfeifer G, Oeckl P, Otto M, Moser F, Maurer M, Pautsch A, Baumeister W, Fernández-Busnadiego R, Kochanek S. The cryo-

electron microscopy structure of huntingtin. *Nature* 2018; 555: 117–120. doi:10.1038/nature25502

Gurung P, Anand PK, Malireddi RKS, Vande Walle L, Van Opdenbosch N, Dillon CP, Weinlich R, Green DR, Lamkanfi M, Kanneganti T-D. FADD and Caspase-8 Mediate Priming and Activation of the Canonical and Noncanonical Nlrp3 Inflammasomes. *J Immunol* 2014; 192: 1835–1846. doi:10.4049/jimmunol.1302839

Hands S, Sajjad MU, Newton MJ, Wyttenbach A. In Vitro and in Vivo Aggregation of a Fragment of Huntingtin Protein Directly Causes Free Radical Production. *J Biol Chem* 2011; 286: 44512–44520. doi:10.1074/jbc.M111.307587

Haque MdE, Akther M, Jakaria Md, Kim I, Azam S, Choi D. Targeting the Microglial NLRP3 Inflammasome and Its Role in Parkinson's Disease. *Mov Disord* 2020; 35: 20–33. doi:10.1002/mds.27874

He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci* 2016; 41: 1012–1021. doi:10.1016/j.tibs.2016.09.002

Heemskerk A-W, Roos RAC. Aspiration pneumonia and death in Huntington's disease. *PLoS Curr* 2012; 4: RRN1293. doi:10.1371/currents.RRN1293

Heneka MT, Carson MJ, Khoury JE, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, Herrup K, Frautschy SA, Finsen B, Brown GC, Verkhratsky A, Yamanaka K, Koistinaho J, Latz E, Halle A, Petzold GC, Town T, Morgan D, Shinohara ML, Perry VH, Holmes C, Bazan NG, Brooks DJ, Hunot S, Joseph B, Deigendesch N, Garaschuk O, Boddeke E, Dinarello CA, Breitner JC, Cole GM, Golenbock DT, Kummer MP. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2015; 14: 388–405. doi:10.1016/S1474-4422(15)70016-5

Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, Griep A, Axt D, Remus A, Tzeng T-C, Gelpi E, Halle A, Korte M, Latz E, Golenbock DT. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 2013; 493: 674–678. doi:10.1038/nature11729

Hilditch-Maguire P. Huntingtin: an iron-regulated protein essential for normal nuclear and perinuclear organelles. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2789–2797. doi:10.1093/hmg/9.19.2789

Huntington G. On Chorea. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2003; 15: 109–112. doi:10.1176/jnp.15.1.109

Huntington Study Group. Tetrabenazine as antichorea therapy in Huntington disease: A randomized controlled trial. *Neurology* 2006; 66: 366–372. doi:10.1212/01.wnl.0000198586.85250.13

Ilzecka J, Stelmasiak Z, Dobosz B. Interleukin-1beta converting enzyme/Caspase-1 (ICE/Caspase-1) and soluble APO-1/Fas/CD 95 receptor in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 2001; 103: 255–258

Ingolia NT, Lareau LF, Weissman JS. Ribosome Profiling of Mouse Embryonic Stem Cells Reveals the Complexity and Dynamics of Mammalian Proteomes. *Cell* 2011; 147: 789–802. doi:10.1016/j.cell.2011.10.002

Ishiguro T, Sato N, Ueyama M, Fujikake N, Sellier C, Kanegami A, Tokuda E, Zamiri B, Gall-Duncan T, Mirceta M, Furukawa Y, Yokota T, Wada K, Taylor JP, Pearson CE, Charlet-Berguerand N, Mizusawa H, Nagai Y, Ishikawa K. Regulatory Role of RNA Chaperone TDP-43 for RNA Misfolding and Repeat-Associated Translation in SCA31. *Neuron* 2017; 94: 108-124.e7. doi:10.1016/j.neuron.2017.02.046

Ising C, Heneka MT. Functional and structural damage of neurons by innate immune mechanisms during neurodegeneration. *Cell Death Dis* 2018; 9: 120. doi:10.1038/s41419-017-0153-x

Ising C, Venegas C, Zhang S, Scheiblich H, Schmidt SV, Vieira-Saecker A, Schwartz S, Albasset S, McManus RM, Tejera D, Griep A, Santarelli F, Brosseron F, Opitz S, Stunden J, Merten M, Kaye R, Golenbock DT, Blum D, Latz E, Buée L, Heneka MT. NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. *Nature* 2019; 575: 669–673. doi:10.1038/s41586-019-1769-z

Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation

and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 113–127. doi:10.1038/nrm2838

Jankovic J, Roos RAC. Chorea associated with Huntington's disease: To treat or not to treat?: CHOREA ASSOCIATED WITH HUNTINGTON'S DISEASE. *Mov Disord* 2014; 29: 1414–1418. doi:10.1002/mds.25996

Jasinska A. Structures of trinucleotide repeats in human transcripts and their functional implications. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 5463–5468. doi:10.1093/nar/gkg767

Jiang J, Zhu Q, Gendron TF, Saberi S, McAlonis-Downes M, Seelman A, Stauffer JE, Jafar-nejad P, Drenner K, Schulte D, Chun S, Sun S, Ling S-C, Myers B, Engelhardt J, Katz M, Baughn M, Platoshyn O, Marsala M, Watt A, Heyser CJ, Ard MC, De Muynck L, Daugherty LM, Swing DA, Tessarollo L, Jung CJ, Delpoux A, Utzschneider DT, Hedrick SM, de Jong PJ, Edbauer D, Van Damme P, Petrucelli L, Shaw CE, Bennett CF, Da Cruz S, Ravits J, Rigo F, Cleveland DW, Lagier-Tourenne C. Gain of Toxicity from ALS/FTD-Linked Repeat Expansions in C9ORF72 Is Alleviated by Antisense Oligonucleotides Targeting GGGGCC-Containing RNAs. *Neuron* 2016; 90: 535–550. doi:10.1016/j.neuron.2016.04.006

Johann S, Heitzer M, Kanagaratnam M, Goswami A, Rizo T, Weis J, Troost D, Beyer C. NLRP3 inflammasome is expressed by astrocytes in the SOD1 mouse model of ALS and in human sporadic ALS patients: NLRP3 Inflammasome Expression in ALS. *Glia* 2015; 63: 2260–2273. doi:10.1002/glia.22891

Johri A, Chandra A, Flint Beal M. PGC-1 α , mitochondrial dysfunction, and Huntington's disease. *Free Radic Biol Med* 2013; 62: 37–46. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.016

Jones KJ, Perris AD, Vernallis AB, Worthington T, Lambert PA, Elliott TS. Induction of inflammatory cytokines and nitric oxide in J774.2 cells and murine macrophages by lipoteichoic acid and related cell wall antigens from *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* 2005; 54: 315–321. doi:10.1099/jmm.0.45872-0

Julien CL, Thompson JC, Wild S, Yardumian P, Snowden JS, Turner G, Craufurd D. Psychiatric disorders in preclinical Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Amp*

Psychiatry 2007; 78: 939–943. doi:10.1136/jnnp.2006.103309

Kaushik DK, Gupta M, Kumawat KL, Basu A. NLRP3 Inflammasome: Key Mediator of Neuroinflammation in Murine Japanese Encephalitis. PLoS ONE 2012; 7: e32270. doi:10.1371/journal.pone.0032270

Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. Int J Mol Sci 2019; 20: 3328. doi:10.3390/ijms20133328

Kim J-Y, Paton JC, Briles DE, Rhee D-K, Pyo S. *Streptococcus pneumoniae* induces pyroptosis through the regulation of autophagy in murine microglia. Oncotarget 2015; 6: 44161–44178. doi:10.18632/oncotarget.6592

Kochetov AV, Palyanov A, Titov II, Grigorovich D, Sarai A, Kolchanov NA. AUG_hairpin: prediction of a downstream secondary structure influencing the recognition of a translation start site. BMC Bioinformatics 2007; 8: 318. doi:10.1186/1471-2105-8-318

Kozak M. Context Effects and Inefficient Initiation at Non-AUG Codons in Eucaryotic Cell-Free Translation Systems. 1989; 9: 8

Krans A, Kearse MG, Todd PK. Repeat-associated non-AUG translation from antisense CCG repeats in fragile X tremor/ataxia syndrome: RAN Translation in FXTAS. Ann Neurol 2016; 80: 871–881. doi:10.1002/ana.24800

Kremer B, Goldberg P, Andrew SE, Theilmann J, Telenius H, Zeisler J, Squitieri F, Lin B, Bassett A, Almqvist E, Bird TD, Hayden MR. A Worldwide Study of the Huntington's Disease Mutation: The Sensitivity and Specificity of Measuring CAG Repeats. N Engl J Med 1994; 330: 1401–1406. doi:10.1056/NEJM199405193302001

Krzyzosiak WJ, Sobczak K, Wojciechowska M, Fiszer A, Mykowska A, Kozlowski P. Triplet repeat RNA structure and its role as pathogenic agent and therapeutic target. Nucleic Acids Res 2012; 40: 11–26. doi:10.1093/nar/gkr729

Kwon I, Xiang S, Kato M, Wu L, Theodoropoulos P, Wang T, Kim J, Yun J, Xie Y, McKnight SL. Poly-dipeptides encoded by the *C9orf72* repeats bind nucleoli, impede RNA

biogenesis, and kill cells. *Science* 2014; 345: 1139–1145. doi:10.1126/science.1254917

Langbehn D, Brinkman R, Falush D, Paulsen J, Hayden M, on behalf of an International Huntington's Disease Collaborative Group. A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length: Prediction of the age of onset and penetrance for HD. *Clin Genet* 2004; 65: 267–277. doi:10.1111/j.1399-0004.2004.00241.x

Le W, Wu J, Tang Y. Protective Microglia and Their Regulation in Parkinson's Disease. *Front Mol Neurosci* 2016; 9:. doi:10.3389/fnmol.2016.00089

Leavitt BR, Kordasiewicz HB, Schobel SA. Huntingtin-Lowering Therapies for Huntington Disease: A Review of the Evidence of Potential Benefits and Risks. *JAMA Neurol* 2020; 77: 764. doi:10.1001/jamaneurol.2020.0299

Leblhuber F, Walli J, Jellinger K, Tilz GP, Widner B, Laccone F, Fuchs D. Activated Immune System in Patients with Huntington's Disease. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36:. doi:10.1515/CCLM.1998.132

Lee J-M, Ramos EM, Lee J-H, Gillis T, Mysore JS, Hayden MR, Warby SC, Morrison P, Nance M, Ross CA, Margolis RL, Squitieri F, Orobello S, Di Donato S, Gomez-Tortosa E, Ayuso C, Suchowersky O, Trent RJA, McCusker E, Novelletto A, Frontali M, Jones R, Ashizawa T, Frank S, Saint-Hilaire MH, Hersch SM, Rosas HD, Lucente D, Harrison MB, Zanko A, Abramson RK, Marder K, Sequeiros J, Paulsen JS, on behalf of the PREDICT-HD study of the Huntington Study Group (HSG), Landwehrmeyer GB, on behalf of the REGISTRY study of the European Huntington's Disease Network, Myers RH, on behalf of the HD-MAPS Study Group, MacDonald ME, Gusella JF, on behalf of the COHORT study of the HSG. CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology* 2012; 78: 690–695. doi:10.1212/WNL.0b013e318249f683

Lehmer C, Oeckl P, Weishaupt JH, Volk AE, Diehl-Schmid J, Schroeter ML, Lauer M, Kornhuber J, Levin J, Fassbender K, Landwehrmeyer B, German Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration, Schludi MH, Arzberger T, Kremmer E, Flatley A, Feederle R, Steinacker P, Weydt P, Ludolph AC, Edbauer D, Otto M. Poly-GP in

cerebrospinal fluid links C9orf72-associated dipeptide repeat expression to the asymptomatic phase of ALS/FTD. *EMBO Mol Med.* 2017; 9: 859–868. doi:10.15252/emmm.201607486

Li S-H, Schilling G, Young WS, Li X-, Margolis RL, Stine OC, Wagster MV, Abbott MH, Franz ML, Ranen NG, Folstein SE, Hedreen JC, Ross CA. Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron* 1993; 11: 985–993. doi:10.1016/0896-6273(93)90127-D

Lin K-M, Hu W, Troutman TD, Jennings M, Brewer T, Li X, Nanda S, Cohen P, Thomas JA, Pasare C. IRAK-1 bypasses priming and directly links TLRs to rapid NLRP3 inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci* 2014; 111: 775–780. doi:10.1073/pnas.1320294111

Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, Jacobsen JF, Kress W, Naylor SL, Day JW, Ranum LPW. Myotonic Dystrophy Type 2 Caused by a CCTG Expansion in Intron 1 of *ZNF9*. *Science* 2001; 293: 864–867. doi:10.1126/science.1062125

Liu J, Wang F. Role of Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Front Immunol.* 2017; 8: 1005. doi:10.3389/fimmu.2017.01005

Maat-Kievit A, Losekoot M, Zwinderman K, Vlis MV-VD, Belfroid R, Lopez F, Van Ommen G-J, Breuning M, Roos R. Predictability of Age at Onset in Huntington Disease in the Dutch Population: *Medicine (Baltimore)* 2002; 81: 251–259. doi:10.1097/00005792-200207000-00001

Macdonald M. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993; 72: 971–983. doi:10.1016/0092-8674(93)90585-E

Machuca-Tzili L, Brook D, Hilton-Jones D. Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: A review. *Muscle Nerve* 2005; 32: 1–18. doi:10.1002/mus.20301

Marques Sousa C, Humbert S. Huntingtin: Here, There, Everywhere! *J Huntingt Dis* 2013;

2: 395–403. doi:10.3233/JHD-130082

Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome. *Mol Cell* 2002; 10: 417–426. doi:10.1016/S1097-2765(02)00599-3

Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, Warren SE, Wewers MD, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol* 2010; 11: 1136–1142. doi:10.1038/ni.1960

Miller J, Arrasate M, Shaby BA, Mitra S, Masliah E, Finkbeiner S. Quantitative Relationships between Huntingtin Levels, Polyglutamine Length, Inclusion Body Formation, and Neuronal Death Provide Novel Insight into Huntington's Disease Molecular Pathogenesis. *J Neurosci* 2010; 30: 10541–10550. doi:10.1523/JNEUROSCI.0146-10.2010

Molero AE, Gokhan S, Gonzalez S, Feig JL, Alexandre LC, Mehler MF. Impairment of developmental stem cell-mediated striatal neurogenesis and pluripotency genes in a knock-in model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106: 21900–21905. doi:10.1073/pnas.0912171106

Mori K, Weng S-M, Arzberger T, May S, Rentzsch K, Kremmer E, Schmid B, Kretzschmar HA, Cruts M, Van Broeckhoven C, Haass C, Edbauer D. The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTL/ALS. *Science* 2013; 339: 1335–1338. doi:10.1126/science.1232927

Moscovitch-Lopatin M, Weiss A, Rosas HD, Ritch J, Doros G, Kegel KB, Difiglia M, Kuhn R, Bilbe G, Paganetti P, Hersch S. Optimization of an HTRF Assay for the Detection of Soluble Mutant Huntingtin in Human Buffy Coats: A Potential Biomarker in Blood for Huntington Disease. *PLoS Curr* 2010; 2: RRN1205. doi:10.1371/currents.RRN1205

Moseley ML, Zu T, Ikeda Y, Gao W, Mosemiller AK, Daughters RS, Chen G, Weatherspoon MR, Clark HB, Ebner TJ, Day JW, Ranum LPW. Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8. *Nat Genet* 2006; 38: 758–769. doi:10.1038/ng1827

Mykowska A, Sobczak K, Wojciechowska M, Kozlowski P, Krzyzosiak WJ. CAG repeats mimic CUG repeats in the misregulation of alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 8938–8951. doi:10.1093/nar/gkr608

Nalavade R, Griesche N, Ryan DP, Hildebrand S, Krauß S. Mechanisms of RNA-induced toxicity in CAG repeat disorders. *Cell Death Dis* 2013; 4: e752–e752. doi:10.1038/cddis.2013.276

Nance MA, Seltzer W, Ashizawa T, Bennett R, McIntosh N, Myers RH, Potter NT, Shea DK. Laboratory Guidelines for Huntington Disease Genetic Testing. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1243–1247. doi:10.1086/301846

Nasir J, Floresco SB, O’Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, Borowski A, Marth JD, Phillips AG, Hayden MR. Targeted disruption of the Huntington’s disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 1995; 81: 811–823. doi:10.1016/0092-8674(95)90542-1

Nguyen L, Montrasio F, Pattamatta A, Tusi SK, Bardhi O, Meyer KD, Hayes L, Nakamura K, Banez-Coronel M, Coyne A, Guo S, Laboissonniere LA, Gu Y, Narayanan S, Smith B, Nitsch RM, Kankel MW, Rushe M, Rothstein J, Zu T, Grimm J, Ranum LPW. Antibody Therapy Targeting RAN Proteins Rescues C9 ALS/FTD Phenotypes in C9orf72 Mouse Model. *Neuron* 2020; 105: 645-662.e11. doi:10.1016/j.neuron.2019.11.007

Nithianantharajah J, Hannan AJ. Dysregulation of synaptic proteins, dendritic spine abnormalities and pathological plasticity of synapses as experience-dependent mediators of cognitive and psychiatric symptoms in Huntington’s disease. *Neuroscience* 2013; 251: 66–74. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.05.043

Paldino E, D’Angelo V, Sancesario G, Fusco FR. Pyroptotic cell death in the R6/2 mouse model of Huntington’s disease: new insight on the inflammasome. *Cell Death Discov* 2020; 6: 69. doi:10.1038/s41420-020-00293-z

Paulsen JS, Long JD, Johnson HJ, Aylward EH, Ross CA, Williams JK, Nance MA, Erwin CJ, Westervelt HJ, Harrington DL, Bockholt HJ, Zhang Y, McCusker EA, Chiu EM, Panegyres PK. Clinical and Biomarker Changes in Premanifest Huntington Disease Show

Trial Feasibility: A Decade of the PREDICT-HD Study. *Front Aging Neurosci* 2014; 6: doi:10.3389/fnagi.2014.00078

Pavese N, Gerhard A, Tai YF, Ho AK, Turkheimer F, Barker RA, Brooks DJ, Piccini P. Microglial activation correlates with severity in Huntington disease: A clinical and PET study. *Neurology* 2006; 66: 1638–1643. doi:10.1212/01.wnl.0000222734.56412.17

Peters OM, Cabrera GT, Tran H, Gendron TF, McKeon JE, Metterville J, Weiss A, Wightman N, Salameh J, Kim J, Sun H, Boylan KB, Dickson D, Kennedy Z, Lin Z, Zhang Y-J, Daugherty L, Jung C, Gao F-B, Sapp PC, Horvitz HR, Bosco DA, Brown SP, de Jong P, Petrucelli L, Mueller C, Brown RH. Human C9ORF72 Hexanucleotide Expansion Reproduces RNA Foci and Dipeptide Repeat Proteins but Not Neurodegeneration in BAC Transgenic Mice. *Neuron* 2015; 88: 902–909. doi:10.1016/j.neuron.2015.11.018

Philips T, Robberecht W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol* 2011; 10: 253–263. doi:10.1016/S1474-4422(11)70015-1

Pitzer C, Krüger C, Plaas C, Kirsch F, Dittgen T, Müller R, Laage R, Kastner S, Suess S, Spoelgen R, Henriques A, Ehrenreich H, Schäbitz W-R, Bach A, Schneider A. Granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2008; 131: 3335–3347. doi:10.1093/brain/awn243

Prasad A, Bharathi V, Sivalingam V, Girdhar A, Patel BK. Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci* 2019; 12: 25. doi:10.3389/fnmol.2019.00025

Pringsheim T, Wiltshire K, Day L, Dykeman J, Steeves T, Jette N. The incidence and prevalence of Huntington's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 2012; 27: 1083–1091. doi:10.1002/mds.25075

Py BF, Kim M-S, Vakifahmetoglu-Norberg H, Yuan J. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 Critically Regulates Inflammasome Activity. *Mol Cell* 2013; 49: 331–338. doi:10.1016/j.molcel.2012.11.009

Quarrell O, O'Donovan KL, Bandmann O, Strong M. The Prevalence of Juvenile Huntington's Disease: A Review of the Literature and Meta-Analysis. *PLoS Curr* 2012; 4: e4f8606b742ef3. doi:10.1371/4f8606b742ef3

Quarrell OW, Nance MA, Nopoulos P, Paulsen JS, Smith JA, Squitieri F. Managing juvenile Huntington's disease. *Neurodegener Dis Manag* 2013; 3: 267–276. doi:10.2217/nmt.13.18

Ransohoff RM, Perry VH. Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 119–145. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132528

Reddy PH, Shirendeb UP. Mutant huntingtin, abnormal mitochondrial dynamics, defective axonal transport of mitochondria, and selective synaptic degeneration in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* 2012; 1822: 101–110. doi:10.1016/j.bbadis.2011.10.016

Reedeker W, van der Mast RC, Giltay EJ, Kooistra TAD, Roos RAC, van Duijn E. Psychiatric Disorders in Huntington's Disease: A 2-Year Follow-up Study. *Psychosomatics* 2012; 53: 220–229. doi:10.1016/j.psych.2011.12.010

Reif A, Chiki A, Ricci J, Lashuel HA. Generation of Native, Untagged Huntingtin Exon1 Monomer and Fibrils Using a SUMO Fusion Strategy. *J Vis Exp JoVE* 2018; . doi:10.3791/57506

Reilmann R, Gordon MF, Anderson KE, Feigin A, Tabrizi SJ, Leavitt BR, Stout JC, Piccini P, Borowsky B, Rynkowski G, Volkinstein R, Savola J-M. The Efficacy and Safety Results of Laquinimod as a Treatment for Huntington Disease. *o. J.*; 1

Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L, Kalimo H, Paetau A, Abramzon Y, Remes AM, Kaganovich A, Scholz SW, Duckworth J, Ding J, Harmer DW, Hernandez DG, Johnson JO, Mok K, Ryten M, Trabzuni D, Guerreiro RJ, Orrell RW, Neal J, Murray A, Pearson J, Jansen IE, Sondervan D, Seelaar H, Blake D, Young K, Halliwell N, Callister JB, Toulson G, Richardson A, Gerhard A, Snowden J, Mann D, Neary D, Nalls MA, Peuralinna T, Jansson L, Isoviita V-M, Kaivorinne A-L, Hölttä-Vuori M, Ikonen E, Sulkava

R, Benatar M, Wu J, Chiò A, Restagno G, Borghero G, Sabatelli M, Heckerman D, Rogaeva E, Zinman L, Rothstein JD, Sendtner M, Drepper C, Eichler EE, Alkan C, Abdullaev Z, Pack SD, Dutra A, Pak E, Hardy J, Singleton A, Williams NM, Heutink P, Pickering-Brown S, Morris HR, Tienari PJ, Traynor BJ. A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Neuron* 2011; 72: 257–268. doi:10.1016/j.neuron.2011.09.010

Rodrigues FB, Byrne LM, McColgan P, Robertson N, Tabrizi SJ, Zetterberg H, Wild EJ. Cerebrospinal Fluid Inflammatory Biomarkers Reflect Clinical Severity in Huntington's Disease. *PLOS ONE* 2016; 11: e0163479. doi:10.1371/journal.pone.0163479

Rosenblatt A, Liang K-Y, Zhou H, Abbott MH, Gourley LM, Margolis RL, Brandt J, Ross CA. The association of CAG repeat length with clinical progression in Huntington disease. *Neurology* 2006; 66: 1016–1020. doi:10.1212/01.wnl.0000204230.16619.d9

Ross CA, Tabrizi SJ. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol* 2011; 10: 83–98. doi:10.1016/S1474-4422(10)70245-3

Rué L, Bañez-Coronel M, Creus-Muncunill J, Giralt A, Alcalá-Vida R, Mentxaka G, Kagerbauer B, Zomeño-Abellán MT, Aranda Z, Venturi V, Pérez-Navarro E, Estivill X, Martí E. Targeting CAG repeat RNAs reduces Huntington's disease phenotype independently of huntingtin levels. *J Clin Invest* 2016; 126: 4319–4330. doi:10.1172/JCI83185

Saresella M, La Rosa F, Piancone F, Zoppis M, Marventano I, Calabrese E, Rainone V, Nemni R, Mancuso R, Clerici M. The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2016; 11: 23. doi:10.1186/s13024-016-0088-1

Sarlus H, Heneka MT. Microglia in Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 2017; 127: 3240–3249. doi:10.1172/JCI90606

Saudou F, Humbert S. The Biology of Huntingtin. *Neuron* 2016; 89: 910–926. doi:10.1016/j.neuron.2016.02.003

Schliwa M. Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks. *J Cell Biol* 1982; 92: 79–

91. doi:10.1083/jcb.92.1.79

Schludi MH, Becker L, Garrett L, Gendron TF, Zhou Q, Schreiber F, Popper B, Dimou L, Strom TM, Winkelmann J, von Thaden A, Rentzsch K, May S, Michaelsen M, Schwenk BM, Tan J, Schooser B, Dieterich M, Petrucelli L, Höltter SM, Wurst W, Fuchs H, Gailus-Durner V, de Angelis MH, Klopstock T, Arzberger T, Edbauer D. Spinal poly-GA inclusions in a C9orf72 mouse model trigger motor deficits and inflammation without neuron loss. *Acta Neuropathol (Berl)* 2017; 134: 241–254. doi:10.1007/s00401-017-1711-0

Schroder K, Sagulenko V, Zamoshnikova A, Richards AA, Cridland JA, Irvine KM, Stacey KJ, Sweet MJ. Acute lipopolysaccharide priming boosts inflammasome activation independently of inflammasome sensor induction. *Immunobiology* 2012; 217: 1325–1329. doi:10.1016/j.imbio.2012.07.020

Semaka A, Kay C, Doty C, Collins JA, Bijlsma EK, Richards F, Goldberg YP, Hayden MR. CAG size-specific risk estimates for intermediate allele repeat instability in Huntington disease. *J Med Genet* 2013; 50: 696–703. doi:10.1136/jmedgenet-2013-101796

Sharma D, Kanneganti T-D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol* 2016; 213: 617–629. doi:10.1083/jcb.201602089

Shelbourne PF, Keller-McGandy C, Bi WL, Yoon S-R, Dubeau L, Veitch NJ, Vonsattel JP, Wexler NS, Arnheim N, Augood SJ. Triplet repeat mutation length gains correlate with cell-type specific vulnerability in Huntington disease brain. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 1133–1142. doi:10.1093/hmg/ddm054

Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F, Shao F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 2015; 526: 660–665. doi:10.1038/nature15514

Siew JJ, Chen H-M, Chen H-Y, Chen H-L, Chen C-M, Soong B-W, Wu Y-R, Chang C-P, Chan Y-C, Lin C-H, Liu F-T, Chern Y. Galectin-3 is required for the microglia-mediated brain inflammation in a model of Huntington's disease. *Nat Commun* 2019; 10: 3473. doi:10.1038/s41467-019-11441-0

Simmons DA, Casale M, Alcon B, Pham N, Narayan N, Lynch G. Ferritin accumulation in dystrophic microglia is an early event in the development of Huntington's disease. *Glia* 2007; 55: 1074–1084. doi:10.1002/glia.20526

Singhrao SK, Neal JW, Morgan BP, Gasque P. Increased Complement Biosynthesis By Microglia and Complement Activation on Neurons in Huntington's Disease. *Exp Neurol* 1999; 159: 362–376. doi:10.1006/exnr.1999.7170

Soragni E, Petrosyan L, Rinkoski TA, Wieben ED, Baratz KH, Fautsch MP, Gottesfeld JM. Repeat-Associated Non-ATG (RAN) Translation in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 2018; 59: 1888. doi:10.1167/iovs.17-23265

Soria G, Ben-Baruch A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Lett* 2008; 267: 271–285. doi:10.1016/j.canlet.2008.03.018

Soulet D, Cicchetti F. The role of immunity in Huntington's disease. *Mol Psychiatry* 2011; 16: 889–902. doi:10.1038/mp.2011.28

Squitieri F, Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Spence N, Zelsler J, Nichol K, Theilmann J, Greenberg J, Goto J, Kanazawa I, Vesa J, Peltonen L, Almqvist E, Anvret M, Telenius H, Lin B, Napolitano G, Morgan K, Hayden MR. DNA haplotype analysis of Huntington disease reveals clues to the origins and mechanisms of CAG expansion and reasons for geographic variations of prevalence. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 2103–2114. doi:10.1093/hmg/3.12.2103

Stine OC, Pleasant N, Franz ML, Abbott MH, Folstein SE, Ross CA. Correlation between the onset age of Huntington's disease and length of the trinucleotide repeat in IT-15. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1547–1549. doi:10.1093/hmg/2.10.1547

Stout JC, Paulsen JS, Queller S, Solomon AC, Whitlock KB, Campbell JC, Carlozzi N, Duff K, Beglinger LJ, Langbehn DR, Johnson SA, Biglan KM, Aylward EH, The PREDICT-HD Investigators and Coordinators of the Huntington Study Group. Neurocognitive signs in prodromal Huntington disease. *Neuropsychology* 2011; 25: 1–14. doi:10.1037/a0020937

Stutz A, Kolbe C-C, Stahl R, Horvath GL, Franklin BS, van Ray O, Brinkschulte R, Geyer M, Meissner F, Latz E. NLRP3 inflammasome assembly is regulated by phosphorylation of the pyrin domain. *J Exp Med* 2017; 214: 1725–1736. doi:10.1084/jem.20160933

Tabrizi SJ, Langbehn DR, Leavitt BR, Roos RA, Durr A, Craufurd D, Kennard C, Hicks SL, Fox NC, Scahill RI, Borowsky B, Tobin AJ, Rosas HD, Johnson H, Reilmann R, Landwehrmeyer B, Stout JC. Biological and clinical manifestations of Huntington's disease in the longitudinal TRACK-HD study: cross-sectional analysis of baseline data. *Lancet Neurol* 2009; 8: 791–801. doi:10.1016/S1474-4422(09)70170-X

Tabrizi SJ, Scahill RI, Owen G, Durr A, Leavitt BR, Roos RA, Borowsky B, Landwehrmeyer B, Frost C, Johnson H, Craufurd D, Reilmann R, Stout JC, Langbehn DR. Predictors of phenotypic progression and disease onset in premanifest and early-stage Huntington's disease in the TRACK-HD study: analysis of 36-month observational data. *Lancet Neurol* 2013; 12: 637–649. doi:10.1016/S1474-4422(13)70088-7

Tai YF, Pavese N, Gerhard A, Tabrizi SJ, Barker RA, Brooks DJ, Piccini P. Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Brain* 2007; 130: 1759–1766. doi:10.1093/brain/awm044

Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 2010; 140: 805–820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022

Thompson JC, Harris J, Sollom AC, Stopford CL, Howard E, Snowden JS, Craufurd D. Longitudinal Evaluation of Neuropsychiatric Symptoms in Huntington's Disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2012; 8

Todd PK, Oh SY, Krans A, He F, Sellier C, Frazer M, Renoux AJ, Chen K, Scaglione KM, Basrur V, Elenitoba-Johnson K, Vonsattel JP, Louis ED, Sutton MA, Taylor JP, Mills RE, Charlet-Berguerand N, Paulson HL. CGG Repeat-Associated Translation Mediates Neurodegeneration in Fragile X Tremor Ataxia Syndrome. *Neuron* 2013; 78: 440–455. doi:10.1016/j.neuron.2013.03.026

Torres S, Brol MJ, Magdaleno F, Schierwagen R, Uschner FE, Klein S, Ortiz C, Tyc O, Bachtler N, Stunden J, Bertheloot D, Kitanovic A, Sanchez B, Schrum J, Roush WR,

Franchi L, Byth K, Latz E, Trebicka J. The Specific NLRP3 Antagonist IFM-514 Decreases Fibrosis and Inflammation in Experimental Murine Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Front Mol Biosci* 2021; 8: 715765. doi:10.3389/fmolb.2021.715765

Tsoi H, Lau TC-K, Tsang S-Y, Lau K-F, Chan HYE. CAG expansion induces nucleolar stress in polyglutamine diseases. *Proc Natl Acad Sci* 2012; 109: 13428–13433. doi:10.1073/pnas.1204089109

Unified Huntington's disease rating scale: Reliability and consistency. *Mov Disord* 1996; 11: 136–142. doi:10.1002/mds.870110204

Valadão PAC, Santos KBS, Ferreira e Vieira TH, Macedo e Cordeiro T, Teixeira AL, Guatimosim C, de Miranda AS. Inflammation in Huntington's disease: A few new twists on an old tale. *J Neuroimmunol* 2020; 348: 577380. doi:10.1016/j.jneuroim.2020.577380

Valor LM. Transcription, Epigenetics and Ameliorative Strategies in Huntington's Disease: a Genome-Wide Perspective. *Mol Neurobiol* 2015; 51: 406–423. doi:10.1007/s12035-014-8715-8

van der Plas E, Schultz JL, Nopoulos PC. The Neurodevelopmental Hypothesis of Huntington's Disease. *J Huntingt Dis* 2020; 9: 217–229. doi:10.3233/JHD-200394

Venegas C, Heneka MT. Danger-associated molecular patterns in Alzheimer's disease. *J Leukoc Biol* 2017; 101: 87–98. doi:10.1189/jlb.3MR0416-204R

von Herrmann KM, Salas LA, Martinez EM, Young AL, Howard JM, Feldman MS, Christensen BC, Wilkins OM, Lee SL, Hickey WF, Havrda MC. NLRP3 expression in mesencephalic neurons and characterization of a rare NLRP3 polymorphism associated with decreased risk of Parkinson's disease. *Npj Park Dis* 2018; 4: 24. doi:10.1038/s41531-018-0061-5

Vonsattel J-P, Stevens TJ, Bird ED. Neuropathological Classification of Huntington's Disease. *o. J.*; 19

Wang N, Gray M, Lu X-H, Cattle JP, Holley SM, Greiner E, Gu X, Shirasaki D, Cepeda C, Li Y, Dong H, Levine MS, Yang XW. Neuronal targets for reducing mutant huntingtin

expression to ameliorate disease in a mouse model of Huntington's disease. *Nat Med* 2014; 20: 536–541. doi:10.1038/nm.3514

Wang W, Nguyen LTT, Burlak C, Chegini F, Guo F, Chataway T, Ju S, Fisher OS, Miller DW, Datta D, Wu F, Wu C-X, Landeru A, Wells JA, Cookson MR, Boxer MB, Thomas CJ, Gai WP, Ringe D, Petsko GA, Hoang QQ. Caspase-1 causes truncation and aggregation of the Parkinson's disease-associated protein α -synuclein. *Proc Natl Acad Sci* 2016; 113: 9587–9592. doi:10.1073/pnas.1610099113

Wang Y, Lin F, Qin Z-H. The role of post-translational modifications of huntingtin in the pathogenesis of Huntington's disease. *Neurosci Bull* 2010; 26: 153–162. doi:10.1007/s12264-010-1118-6

Wes PD, Holtman IR, Boddeke EWGM, Möller T, Eggen BJL. Next generation transcriptomics and genomics elucidate biological complexity of microglia in health and disease. *Glia* 2016; 64: 197–213. doi:10.1002/glia.22866

Westergard T, Jensen BK, Wen X, Cai J, Kropf E, Iacovitti L, Pasinelli P, Trotti D. Cell-to-Cell Transmission of Dipeptide Repeat Proteins Linked to C9orf72 -ALS/FTD. *Cell Rep* 2016; 17: 645–652. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.032

Wetzel R. Physical Chemistry of Polyglutamine: Intriguing Tales of a Monotonous Sequence. *J Mol Biol* 2012; 421: 466–490. doi:10.1016/j.jmb.2012.01.030

Wheeler VC, Persichetti F, McNeil SM, Mysore JS, Mysore SS, MacDonald ME, Myers RH, Gusella JF, Wexler NS, The US Venezuela Collaborative Research Group. Factors associated with HD CAG repeat instability in Huntington disease. *J Med Genet* 2007; 44: 695–701. doi:10.1136/jmg.2007.050930

Wittgens W, Schuier FJ, Trenckmann U. Behandlung von Chorea Huntington mit Tiaprid und Sulpirid. , in: Möller, H.-J., Müller-Spahn, F., Kurtz, G. (Hrsg.), Aktuelle Perspektiven der Biologischen Psychiatrie 1996; Springer Vienna, Vienna, S. 110–111. doi:10.1007/978-3-7091-6889-9_20

Wu A-G, Zhou X-G, Qiao G, Yu L, Tang Y, Yan L, Qiu W-Q, Pan R, Yu C-L, Law BY-K,

Qin D-L, Wu J-M. Targeting microglial autophagic degradation in NLRP3 inflammasome-mediated neurodegenerative diseases. *Ageing Res Rev* 2021; 65: 101202. doi:10.1016/j.arr.2020.101202

Wytttenbach A. Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1137–1151. doi:10.1093/hmg/11.9.1137

Yamada SB, Gendron TF, Niccoli T, Genuth NR, Grosely R, Shi Y, Glaria I, Kramer NJ, Nakayama L, Fang S, Dinger TJI, Thoeng A, Rocha G, Barna M, Puglisi JD, Partridge L, Ichida JK, Isaacs AM, Petrucelli L, Gitler AD. RPS25 is required for efficient RAN translation of C9orf72 and other neurodegenerative disease-associated nucleotide repeats. *Nat Neurosci* 2019; 22: 1383–1388. doi:10.1038/s41593-019-0455-7

Yamamoto A, Lucas JJ, Hen R. Reversal of Neuropathology and Motor Dysfunction in a Conditional Model of Huntington's Disease. *Cell* 2000; 101: 57–66. doi:10.1016/S0092-8674(00)80623-6

Yang S, Yang H, Huang L, Chen L, Qin Z, Li S, Li X-J. Lack of RAN-mediated toxicity in Huntington's disease knock-in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2020; 117: 4411–4417. doi:10.1073/pnas.1919197117

Yu C-H, Davidson S, Harapas CR, Hilton JB, Mlodzianoski MJ, Laohamonthonkul P, Louis C, Low RRJ, Moecking J, De Nardo D, Balka KR, Calleja DJ, Moghaddas F, Ni E, McLean CA, Samson AL, Tyebji S, Tonkin CJ, Bye CR, Turner BJ, Pepin G, Gantier MP, Rogers KL, McArthur K, Crouch PJ, Masters SL. TDP-43 Triggers Mitochondrial DNA Release via mPTP to Activate cGAS/STING in ALS. *Cell* 2020; 183: 636-649.e18. doi:10.1016/j.cell.2020.09.020

Yuan X, Bhat OM, Meng N, Lohner H, Li P-L. Protective Role of Autophagy in Nlrp3 Inflammasome Activation and Medial Thickening of Mouse Coronary Arteries. *Am J Pathol* 2018; 188: 2948–2959. doi:10.1016/j.ajpath.2018.08.014

Zeman A. Spinocerebellar ataxia type 8 in Scotland: genetic and clinical features in seven unrelated cases and a review of published reports. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;

75: 459–465. doi:10.1136/jnnp.2003.018895

Zhang Y-J, Gendron TF, Ebbert MTW, O'Raw AD, Yue M, Jansen-West K, Zhang X, Prudencio M, Chew J, Cook CN, Daugherty LM, Tong J, Song Y, Pickles SR, Castanedes-Casey M, Kurti A, Rademakers R, Oskarsson B, Dickson DW, Hu W, Gitler AD, Fryer JD, Petrucelli L. Poly(GR) impairs protein translation and stress granule dynamics in C9orf72-associated frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med* 2018; 24: 1136–1142. doi:10.1038/s41591-018-0071-1

Zhao W, Beers DR, Bell S, Wang J, Wen S, Baloh RH, Appel SH. TDP-43 activates microglia through NF- κ B and NLRP3 inflammasome. *Exp Neurol*. 2015; 273: 24–35. doi:10.1016/j.expneurol.2015.07.019

Zheng M, Kanneganti T. The regulation of the ZBP1-NLRP3 inflammasome and its implications in pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PANoptosis). *Immunol. Rev.* 2020; 297: 26–38. doi:10.1111/imr.12909

Zu T, Cleary JD, Liu Y, Bañez-Coronel M, Bubenik JL, Ayhan F, Ashizawa T, Xia G, Clark HB, Yachnis AT, Swanson MS, Ranum LPW. RAN Translation Regulated by Muscleblind Proteins in Myotonic Dystrophy Type 2. *Neuron* 2017; 95: 1292-1305.e5. doi:10.1016/j.neuron.2017.08.039

Zu T, Gibbens B, Doty NS, Gomes-Pereira M, Huguet A, Stone MD, Margolis J, Peterson M, Markowski TW, Ingram MAC, Nan Z, Forster C, Low WC, Schoser B, Somia NV, Clark HB, Schmechel S, Bitterman PB, Gourdon G, Swanson MS, Moseley M, Ranum LPW. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci* 2011; 108: 260–265. doi:10.1073/pnas.1013343108

Zu T, Liu Y, Banez-Coronel M, Reid T, Pletnikova O, Lewis J, Miller TM, Harms MB, Falchook AE, Subramony SH, Ostrow LW, Rothstein JD, Troncoso JC, Ranum LPW. RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. *Proc Natl Acad Sci* 2013; 110: E4968–E4977. doi:10.1073/pnas.1315438110

Zuccato C, Cattaneo E. Huntington's Disease. , in: Lewin, G.R., Carter, B.D. (Hrsg.), *Neurotrophic Factors, Handbook of Experimental Pharmacology* 2014; Springer Berlin

Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S. 357–409. doi:10.1007/978-3-642-45106-5_14

9. Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Betreuer und Doktorvater PD Dr. Patrick Weydt sowie Prof Dr. Michael Heneka, der meine Arbeit zunächst betreute, für ihre Arbeit und Unterstützung an diesem Projekt. Ich möchte mich darüber hinaus bei allen Mitgliedern der AG Heneka im DZNE für die stetige Unterstützung während der experimentellen Arbeit bedanken, insbesondere danke ich Cira Dansokho für die kontinuierliche Betreuung im Labor. Des Weiteren gilt mein Dank der Else Kröner Fresenius Stiftung, über deren BonnNi Stipendium diese Arbeit mitfinanziert wurde.

Meiner Partnerin Franziska Grau möchte ich für die stete Motivation und Begleitung während des Studiums und somit auch dieser Arbeit danken. Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, Peter René und Maïke Jamin, die meine Ausbildung ermöglicht und mich während dieser auf jede erdenkliche Art unterstützt haben.