

**NLRP3-directed *in vitro* use of antisense  
oligonucleotides (ASOs) in models of brain  
inflammation**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Charlotte Elisabeth Braatz**

aus München

2025

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Michael T. Heneka
2. Gutachter: Prof. Dr. Gunther Hartmann

Tag der Mündlichen Prüfung: 19.12.2024

Aus der Klinik für Neurodegenerative Erkrankungen und Gerontopsychiatrie

## Inhaltsverzeichnis

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>                           | 4  |
| <b>1. Deutsche Zusammenfassung</b>                     | 7  |
| 1.1 Einleitung                                         | 7  |
| 1.2 Material und Methoden                              | 11 |
| 1.3 Ergebnisse                                         | 18 |
| 1.4 Diskussion                                         | 23 |
| 1.5 Zusammenfassung                                    | 28 |
| 1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung | 29 |
| <b>2. Veröffentlichung</b>                             | 40 |
| Abstract                                               | 40 |
| Introduction                                           | 41 |
| Materials and Methods                                  | 41 |
| Results                                                | 44 |
| Discussion                                             | 59 |
| References                                             | 52 |
| <b>3. Danksagung</b>                                   | 55 |

## Abkürzungsverzeichnis

|           |                                                                                              |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| APP       | Amyloid-Vorläuferprotein                                                                     |
| A $\beta$ | Amyloid- $\beta$                                                                             |
| ANOVA     | Varianzanalyse (engl.: <i>ANalysis Of VAriance</i> )                                         |
| ASO       | Antisense-Oligonukleotid                                                                     |
| ASC       | engl.: <i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>                      |
| BCA       | Bicinchoninsäure (engl.: <i>bicinchoninic acid</i> )                                         |
| CARD      | engl.: <i>caspase activation and recruitment domain</i>                                      |
| DAMP      | Schaden-assoziiertes molekulares Muster (engl.: <i>damage-associated molecular pattern</i> ) |
| DFG       | Deutsche Forschungsgemeinschaft                                                              |
| DMSO      | Dimethylsulfoxid                                                                             |
| DNA       | Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i> )                                |
| DMD       | Duchenne-Muskeldystrophie                                                                    |
| ELISA     | Enzymimmunoassay (engl.: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )                          |
| EMA       | Europäische Arzneimittel-Agentur (engl.: <i>European Medicines Agency</i> )                  |
| FDA       | US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (engl.: <i>Food and Drug Administration</i> )        |
| GSDMD     | Gasdermin D                                                                                  |

|              |                                                                                                                    |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ICD-10-GM    | Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, German Modification |
| IgG          | Immunglobulin G                                                                                                    |
| IL-1 $\beta$ | Interleukin-1 $\beta$                                                                                              |
| IL-4         | Interleukin-4                                                                                                      |
| IL-6         | Interleukin-6                                                                                                      |
| IL-10        | Interleukin-10                                                                                                     |
| IL-12        | Interleukin-12                                                                                                     |
| IL-13        | Interleukin-13                                                                                                     |
| IL-18        | Interleukin-18                                                                                                     |
| LDH          | Lactatdehydrogenase                                                                                                |
| LPS          | Lipopolysaccharid                                                                                                  |
| MM Con.      | mismatched Kontrolle (engl.: <i>mismatched control</i> )                                                           |
| mRNA         | messenger RNA                                                                                                      |
| NFT          | neurofibrilläre Tangles                                                                                            |
| NLRP3        | engl.: <i>NOD-, LRR-, and pyrin domain-containing protein 3</i>                                                    |
| NOS2         | Stickstoffmonoxid-Synthase-2                                                                                       |
| NT Con.      | non-targeted Kontrolle                                                                                             |
| PBS          | phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i> )                                           |
| PET          | Positronen-Emissions-Tomographie                                                                                   |
| PMA          | Phorbol-12-Myristat-13-Acetat                                                                                      |

|                |                                                             |
|----------------|-------------------------------------------------------------|
| PPAR- $\gamma$ | Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma           |
| PRR            | Pattern-Recognition-Rezeptoren                              |
| PS1            | Presenilin-1                                                |
| RT-PCR         | Real-Time Quantitative PCR                                  |
| RIPA           | engl.: <i>ristocetin-induced platelet agglutination</i>     |
| RNA            | Ribonukleinsäure                                            |
| RNase H        | Ribonuklease H                                              |
| Scr. Con.      | scrambled Kontrolle (engl.: <i>scrambled control</i> )      |
| SEM            | Standardfehler (engl.: <i>standard error of the mean</i> )  |
| SMA            | spinalen Muskelatrophie                                     |
| TAMRA          | Carboxytetramethylrhodamine                                 |
| TGF- $\beta$   | engl.: <i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i> |
| TLR            | Toll-like Rezeptor                                          |
| TNF- $\alpha$  | Tumornekrosefaktor-alpha                                    |
| WT             | Wildtyp-Mäuse                                               |

# 1. Deutsche Zusammenfassung

## 1.1 Einleitung

Im Jahr 2019 litten weltweit rund 57,4 Millionen Menschen unter Demenz. In Deutschland lebten im Jahr 2021 rund 1,8 Millionen Menschen mit Demenz (Blotenberg et al., 2023). Aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung, der sinkenden Geburtenrate und der daraus resultierend alternden Bevölkerung wird die Zahl der Betroffenen Schätzungen zufolge bis zum Jahr 2050 auf 152,8 Millionen ansteigen (Nichols et al., 2022). Hierzulande könnten dann bis zu 2,8 Millionen Menschen betroffen sein (Nichols et al., 2022). Die Versorgung dieser wachsenden Patientengruppe stellt eine immense gesellschaftliche wie auch finanzielle Herausforderung dar (Michalowsky et al., 2019).

Der Begriff Demenz bezeichnet ein klinisches Syndrom, das mit der „Störung vieler höherer kortikaler Funktionen, einschließlich Gedächtnis, Denken, Orientierung, Auffassung, Rechnen, Lernfähigkeit, Sprache und Urteilsvermögen“ einhergeht (ICD-10-GM, Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) unter Beteiligung der Arbeitsgruppe ICD des Kuratoriums für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen (KKG), 2023). Die Ursachen hierfür sind vielfältig. In den meisten Fällen sind Demenzerkrankungen jedoch primär neurodegenerativer oder vaskulärer Genese (Arvanitakis et al., 2019). Die bei weitem häufigste Form der Demenz ist die Alzheimer-Erkrankung. Sie liegt 60 bis 70 Prozent aller Fälle zugrunde (World Health Organization, 2017).

Typischerweise beginnt die Alzheimer-Erkrankung schleichend über Monate bis Jahre (Dubois et al., 2014; McKhann et al., 2011). Charakteristische Frühsymptome sind Störungen des Kurzzeitgedächtnisses, aber auch neuropsychiatrische Beschwerden wie Schlafstörungen, Angst und eine depressive Verstimmung. Im weiteren Verlauf aggravierieren sich Defizite des episodischen Gedächtnisses (McKhann et al., 2011). Es kommt zur zunehmenden zeitlichen und örtlichen Desorientierung sowie zu

Beeinträchtigungen der visuell-räumlichen Wahrnehmung, der Sprachfunktionen und des Urteilsvermögens (Atri, 2019; Zvěřová, 2019).

Die präzise ätiologische Zuordnung von Demenzsyndromen ist herausfordernd. Grundsätzlich können definierte klinische Kriterien, neuropsychologische Testergebnisse sowie diverse Biomarker in Blut und Liquor auf eine Alzheimer-Erkrankung hinweisen (Dubois et al., 2014; McKhann et al., 2011; Reitz und Mayeux, 2014). Insbesondere Fortschritte in der zerebralen Bildgebung sowie die Entwicklung spezifischer Positronen-Emissions-Tomographie (PET) Tracer haben sich für die Alzheimer-Diagnostik als wertvoll erwiesen (Caselli et al., 2017; Reitz und Mayeux, 2014). Eine definitive Diagnosesicherung ist allerdings bis heute nur durch histopathologische Gewebeanalysen post mortem möglich (DeTure und Dickson, 2019).

Die zentralen histopathologischen Korrelate der Alzheimer-Erkrankung sind die extrazelluläre Ablagerung von Amyloid- $\beta$ (A $\beta$ )-Plaques sowie die intraneuronale Aggregation von hyperphosphorylierten Tau-Proteinen zu sogenannten neurofibrillären Tangles (NFT) (Klotz und Gelpi, 2021; Trejo-Lopez et al., 2022). A $\beta$  wird kontinuierlich synthetisiert und ist das Produkt der enzymatischen Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) durch zwei Proteasen,  $\gamma$ -Sekretase und  $\beta$ -Sekretase-1 (Heneka et al., 2014; Querfurth und LaFerla, 2010). Maßgeblich verantwortlich für den Abbau von A $\beta$  im Gehirn sind die Immunzellen des zentralen Nervensystems: die Mikroglia (Hansen et al., 2018; Heneka, Golenbock, et al., 2015; Sarlus und Heneka, 2017). Unter physiologischen Stoffwechselbedingungen sind Synthese und Abbau von A $\beta$  ausgeglichen. Geraten diese Vorgänge jedoch aus dem Gleichgewicht, kommt es zum fortschreitenden neuronalen Zelltod – die sporadische Form der Alzheimer-Erkrankung manifestiert sich (Mawuenyega et al., 2010). Die Auslöser dieser Dysbalance sind allerdings nach wie vor unklar und Gegenstand aktueller Forschung (Bartels et al., 2020; Hickman et al., 2018; Jorfi et al., 2023).

Fibrilläres A $\beta$  fungiert als sogenanntes *damage-associated molecular pattern* (DAMP), das über den Oberflächenrezeptor CD36 sowie verschiedene Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR) von Mikrogliazellen erkannt wird (Stewart et al., 2010; Venegas und Heneka, 2017). Anschließend werden verschiedene neuroinflammatorische Prozesse initiiert (Weiner und Frenkel, 2006). Eine zentrale Rolle spielen dabei die

Überexpression und Aktivierung des zytosolischen Inflammasom-Komplexes NLRP3 (engl.: *NOD-, LRR-, and pyrin domain-containing protein 3*) (Halle et al., 2008; Heneka et al., 2018). Innerhalb des oligomeren NLRP3-Inflammasoms bindet Pro-Caspase-1 an das Adapterprotein ASC (engl.: *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) und wird dadurch autokatalytisch aktiviert (Andreeva et al., 2021; Heneka et al., 2018; Hochheiser et al., 2022). Caspase-1 wiederum spaltet und aktiviert die Vorstufen der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Interleukin-18 (IL-18) sowie Gasdermin D (GSDMD) (Boucher et al., 2018; Heneka et al., 2018). Letzteres bildet eine Pore in der Plasmamembran, wodurch die Zytokine in den Extrazellularraum freigesetzt werden (Rathinam et al., 2019). Zusätzlich reguliert Gasdermin D die Pyroptose – eine Variante des programmierten Zelltods (X. Liu et al., 2016).

Die A $\beta$ -abhängige Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms konnte sowohl *in vitro* (Halle et al., 2008) als auch *in vivo* (Heneka et al., 2013) nachgewiesen werden. Interessanterweise erwies sich in transgenen APP/PS1 Mäusen, die für die familiäre Alzheimer Krankheit ursächliche Mutationen tragen, ein NLRP3-Knockout als protektiv (Heneka et al., 2013; Jankowsky et al., 2001). Die Aktivierung von Caspase-1 war signifikant reduziert und die IL-1 $\beta$ -Spiegel entsprachen den Werten von Wildtyp-Mäusen. Zudem waren diese Mäuse weitgehend vor dem Verlust kognitiver Funktionen und anderen mit der Alzheimer-Erkrankung assoziierten Folgeerscheinungen geschützt (Heneka et al., 2013).

Die Therapie der Alzheimer-Erkrankung ist limitiert. Zwar gibt es symptomatische Behandlungsmöglichkeiten mit Antidementiva wie Acetylcholinesterase-Hemmern und Glutamat-Antagonisten, eine kurative Therapieoption existiert allerdings bis heute nicht (Liu et al., 2019; Marucci et al., 2021). Folglich stellt die Inhibition des NLRP3-Inflammasoms einen vielversprechenden therapeutischen Ansatzpunkt dar (Heneka et al., 2013).

Bislang sind die Interleukin-1-Antagonisten Anakinra und Canakinumab für die klinische Verwendung zugelassen. Ein möglicher Nutzen bei Alzheimer-Patienten wurde allerdings noch nicht untersucht. Darüber hinaus werden derzeit diverse direkte NLRP3-Inhibitoren in anderen Krankheitsmodellen, die sich durch eine Überaktivierung des

NLRP3-Inflammasoms auszeichnen, getestet (Dinarello et al., 2012; Mangan et al., 2018).

Eine Alternative zur direkten pharmakologischen Hemmung stellt die Modulation der Proteinexpression durch sogenannte Antisense-Oligonukleotide (ASO) dar. ASOs sind kurzkettige, synthetische einzelsträngige Oligodeoxynukleotide, die über komplementäre Basenpaarung spezifisch an mRNA-Zielsequenzen binden. Die so entstandenen RNA-DNA-Heteroduplexe werden schließlich vom Enzym RNase H erkannt, was zum Abbau des mRNA-Strangs führt (Rinaldi und Wood, 2018).

ASOs wurden bereits zur Therapie neurologischer Erkrankungen wie der spinalen Muskelatrophie (SMA) und der Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) zugelassen (Bennett et al., 2021). Zudem werden sie derzeit bei einer Vielzahl weiterer neurologischer Krankheitsbilder wie der amyotrophen Lateralsklerose oder des Morbus Parkinson, sowie für die Behandlung der Tauopathie bei der Alzheimer-Erkrankung erprobt (Arvanitakis et al., 2019; Bennett et al., 2021; DeVos et al., 2017; Scharner und Aznarez, 2021; Schoch et al., 2016; Sud et al., 2014).

Die NLRP3-abhängige Neuroinflammation ist ein zentraler Faktor in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung (Heneka et al., 2013). Folglich stellen spezifische, gegen NLRP3 gerichtete Antisense-Oligonukleotide einen innovativen therapeutischen Ansatz zur Prävention neuroinflammatorischer Prozesse dar. Ziel der Studie war es, potentielle antiinflammatorische Effekte verschiedener, selbst designter gegen NLRP3 gerichteter Antisense-Oligonukleotide *in vitro* zu evaluieren. Hierfür wurden sowohl primäre, murine Mikrogliazellen als auch humane THP-1 Zellen verwendet. Durch die Inkubation mit spezifischen Antisense-Oligonukleotiden konnte die Bildung des NLRP3-Inflammasoms sowohl im murinen als auch im humanen Modell erfolgreich verhindert werden. Entsprechend waren die Spiegel des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  sowohl bei Nigericin- als auch bei A $\beta$ -abhängiger Stimulation des NLRP3-Inflammasoms signifikant reduziert (Braatz et al., 2023).

## 1.2 Material und Methoden

Für eine detaillierte Beschreibung der verwendeten Materialien inklusive Herstellerangaben wird auf den Abschnitt „Material and Methods“ der Originalpublikation verwiesen (Braatz et al., 2023).

### Design und Synthese der Antisense-Oligonukleotide

Zunächst wurde die räumliche Anordnung der homo sapiens und mus musculus NLRP3 mRNA in Sekundär- und Tertiärstrukturen analysiert. Hierfür wurde ein frei verfügbares Programm der ViennaRNA Web Services (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>) verwendet, das anhand der RNA-Faltung die Wahrscheinlichkeit der Basenpaarung berechnet. Auf dieser Grundlage konnten einige Zielsequenzen identifiziert werden, die sich potentiell zur Bindung eines spezifischen, komplementären Antisense-Oligonukleotids eignen.

Da CpG-Sequenzmotive wesentlich häufiger in bakterieller und viraler DNA vorkommen als in der DNA von Wirbeltieren, dienen sie dem Immunsystem zur Identifikation potenzieller Krankheitserreger (Weiner et al., 1997). Entsprechend können Antisense-Oligonukleotide, die CpG-Sequenzmotive enthalten, eine unerwünschte Immunstimulation hervorrufen. Um dies zu vermeiden wurden die NLRP3 gerichteten Antisense-Oligonukleotide mittels des von Sigma-Aldrich zur Verfügung gestellten Programmes OligoEvaluator™ auf CpG-Sequenzmotive untersucht. Auch eine mögliche Komplementarität innerhalb des jeweiligen Antisense-Oligonukleotids durch die Ausbildung einer Sekundärstruktur oder von Dimeren konnte mit dem OligoEvaluator™ identifiziert werden. Abschließend wurden alle Antisense-Oligonukleotide mittels BLAST-Analyse auf Off-Target-Effekte überprüft.

Die Antisense-Oligonukleotide, die in der Studie verwendet wurden, waren zwischen 18 und 21 Nukleotiden lang. Um eine ausreichende Stabilität gegenüber abbauenden Enzymen – insbesondere Endo- und Exonukleasen – zu gewährleisten, wurden die Antisense-Oligonukleotide mit einer Phosphorothioat-Modifikation versehen. Hierfür wird ein Sauerstoffatom im Phosphatanteil des Nukleotids durch ein Schwefelatom ersetzt (Rinaldi und Wood, 2018). Zusätzlich wurden am 5'- und 3'-Ende des Antisense-Oligonukleotids jeweils fünf RNA-Basen mit einer 2'-O-(2-methoxy)ethyl-Modifikation an der 2'-Position der Ribose eingebaut.

Um die spezifische Wirkung der gegen NLRP3 gerichteten ASOs abzubilden, wurden Kontrollexperimente mit „scrambled“ (Scr. Con.) und „mismatched“ (MM Con.) ASOs durchgeführt. Bei der „scrambled control“ sind die Basen des zielgerichteten ASOs in einer zufälligen Reihenfolge angeordnet. Die „mismatched control“ hingegen weist dieselbe Sequenz wie der gegen NLRP3 gerichtete ASO auf, enthält allerdings ein fünf Basen umfassendes Mismatch. Für einzelne Experimente diente außerdem ein unspezifischer, „non-targeted“ ASO (NT Con.) als Kontrolle. Alle nach diesem Schema designten ASOs wurden von Sigma-Aldrich synthetisiert. Die Sequenzen waren wie folgt, unterstrichene Abschnitte entsprechen 2'-O-(2-methoxy)ethyl-Modifikationen:

**Tab. 1:** Bezeichnung, Sequenz und GC-Gehalt der gegen NLRP3 gerichteten Antisense-Oligonukleotide. Modifiziert nach der Originalpublikation (Braatz et al., 2023)

| Name des ASOs     | Sequenz (5'-3')                  | GC-Gehalt (%) |
|-------------------|----------------------------------|---------------|
| human ASO 1       | <u>GAUGCCATCTTGACCCAU</u>        | 50            |
| human ASO 2       | <u>GCUCCGGTGCTCCTTGAUGA</u>      | 60            |
| human ASO 3       | <u>CCCAGGCTCCTCTGUGUCA</u>       | 63,2          |
| human Scr. Con. 2 | <u>GUCUATCTCAGGTGGUCGCC</u>      | 60            |
| human MM Con. 2   | <u>GCUCCGGTATGAATTGAUGA</u>      | 45            |
| mouse ASO 1       | <u>ACUCUGGCTGGTCCTUCUUA</u>      | 50            |
| mouse ASO 2       | <u>AUCCACTCTTCTTCAAGGC</u>       | 47,4          |
| mouse ASO 3       | <u>UCCCAGTGCCCAGTCCAAC</u>       | 63,2          |
| mouse ASO 4       | <u>UCACUTCAATCCACUUCA</u>        | 38,9          |
| mouse Scr. Con. 3 | <u>AGCUCCGCGACTCCUACCA</u>       | 63,2          |
| mouse MM Con. 3   | <u>UCCCAGTATATCGTCCAAC</u>       | 47,4          |
| mouse Scr. Con. 4 | <u>ACCUCCACTATACUUCAU</u>        | 38,9          |
| mouse MM Con. 4   | <u>UCACUTCCGATAACUUCA</u>        | 38,9          |
| NT Con.           | <u>CCUCUTACCTCAGTTACAATUUAUA</u> | 32            |

## Zellkultur

Für das murine Modell wurden Mikrogliazellen aus den Gehirnen von 0 bis 2 Tage alten Wildtyp-Mäusen (WT) gewonnen. Hierfür wurden zunächst die Meningen entfernt. Anschließend wurde das Gehirngewebe sowohl enzymatisch mit 0,25 % Trypsin als auch mechanisch in seine zellulären Bestandteile zerlegt. Daraus wurden gemischtzellige Kulturen angelegt und unter standardisierten Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach einer Inkubationsdauer von 7 bis 10 Tagen konnten die Mikrogliazellen durch leichtes Klopfen von der Astrozytenschicht am Boden der Zellkulturflasche gelöst werden. Die hierfür verwendeten Versuchstiere wurden gemäß den Anforderungen des Universitätsklinikums Bonn, des Veterinäramtes Bonn sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gehalten und behandelt. Insgesamt wurden für die Studie die Gehirne von 287 Wildtyp-Mäusen verwendet.

Für das humane Modell wurde eine THP-1 Zelllinie verwendet. Die Zellen wurden ebenfalls unter standardisierten Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und alle 3-4 Tage passagiert. Die Zellpassagen reichten von p7 bis p23.

## Transfektion der Zellen

Die ASOs wurden für die Transfektion zu Konzentrationen von 1 bis 300nM verdünnt. Anschließend wurden sie mit Lipofectamine RNAiMax (Endkonzentration: 0,3 µL/mL) gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Gemisch auf die Zellen pipettiert.

## Immunhistochemie und konfokale Mikroskopie

Die immunzytochemischen Untersuchungen sowie die anschließende konfokale Mikroskopie wurden maßgeblich von weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. M. T. Heneka (seinerzeit Universitätsklinikum Bonn) durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise findet sich in der Originalpublikation.

### Real-Time Quantitative PCR (RT-PCR)

Für die RT-PCR wurden je Vertiefung einer 24-well Mikrotiterplatte 300.000 primäre, murine Mikrogliazellen oder 600.000 THP-1 Zellen kultiviert. Nach vier bis sechs Stunden Inkubationszeit erfolgte die Transfektion der Zellen wie oben beschrieben. Die Endkonzentrationen der ASOs reichten von 1 bis 300 nM. Es folgte eine 72-stündige Inkubation der primären, murinen Mikrogliazellen und eine 48-stündige Inkubation der THP-1 Zellen mit den ASOs unter den oben genannten Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

Anschließend wurde die RNA mittels des „miRNeasy Micro Kit“ (Qiagen) gemäß Herstellerprotokoll extrahiert. Die so gewonnene RNA-Menge wurde spektrophotometrisch quantifiziert und jeweils 500 ng wurden durch eine Reverse Transkriptase Reaktion unter Verwendung des „High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit“ (Applied Biosystems™) in komplementäre DNA umgeschrieben.

Zur Analyse der Genexpression wurde schließlich die Real-Time Quantitative PCR durchgeführt. Diese ermöglicht die Quantifizierung mehrerer Zielgene in einer einzigen Reaktion durch Messung der Fluoreszenz sequenzspezifischer Sonden. Hierfür wurden der „TaqMan gene expression assay“, der „TaqMan Universal PCR Master Mix“ (Applied Biosystems) sowie das StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) verwendet. Die Auswertung der RT-PCR erfolgte mit der StepOne 2.2 Software von Applied Biosystems.

### Bestimmung der Zytokinsekretion

Für die Messung der Zytokinsekretion wurden pro Vertiefung einer 96-well Mikrotiterplatte 50.000 primäre murine Mikrogliazellen oder 80.000 THP-1 Zellen ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von vier bis sechs Stunden erfolgte die Transfektion der Zellen mit den jeweils spezifischen ASOs bei einer Endkonzentration von 30 nM. Anschließend wurden die primären, murinen Mikrogliazellen für 72 Stunden und die THP-1 Zellen für 48 Stunden unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert.

Nach der Inkubation mit den ASOs wurde das NLRP3-Inflammasom aktiviert. Hierfür wurden die Zellen zunächst für 3 Stunden mit 100 ng/mL Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert. Anschließend erfolgte eine sekundäre Stimulation entweder mit Nigericin (10  $\mu$ M) für 45 Minuten oder mit A $\beta$ 1-42 (5  $\mu$ M) für 24 Stunden. Bei der Stimulation mit A $\beta$ 1-42 gab es eine zusätzliche Kontrollgruppe, bei der ein Teil der Zellen nur mit dem zur Lösung von A $\beta$  verwendeten Puffer (DMSO) behandelt wurde.

Nach Stimulation der Mikroglia- und THP-1 Zellen wurde die Konzentration von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in den Zellüberständen bestimmt. Dazu wurden die „DuoSet“ ELISA-Kits der Firma R&D Systems gemäß Herstellerangaben verwendet. Schließlich wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmt. Die so ermittelten Werte wurden mittels linearer Regression unter Verwendung der Software GraphPad Prism 9 in die entsprechenden Standardkurven interpoliert und die Zytokinkonzentrationen bestimmt.

#### Zytotoxizität und Zellviabilität

Die primäre murine Mikroglia und die THP-1 Zellen wurden, wie im Abschnitt „Bestimmung der Zytokinsekretion“ beschrieben, ausgesät, transfiziert und stimuliert. Anschließend wurde als Indikator des Zelluntergangs die Freisetzung des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) analysiert. Hierfür wurden gemäß Herstellerprotokoll jeweils 50  $\mu$ l der Zellüberstände einem Detektions-Kit der Firma Roche hinzugefügt. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 N HCl beendet und die Absorption bei 490 und 680 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

#### Immunoblot

Für die Immunoblots wurden pro Vertiefung einer 6-well Mikrotiterplatte 1.000.000 primäre murine Mikrogliazellen oder 2.000.000 THP-1 Zellen ausgesät. Nach vier bis sechs Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen mit den jeweils spezifischen ASOs bei einer Endkonzentration von 30 nM transfiziert. Anschließend wurden die primären,

murinen Mikrogliazellen für 72 Stunden und die THP-1 Zellen für 48 Stunden unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert. Nach der Transfektion wurden die Zellen wie im Abschnitt „Bestimmung der Zytokinsekretion“ beschrieben mit LPS und Nigericin oder A $\beta$ 1-42 stimuliert, um die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms zu untersuchen.

Im Anschluss wurden die Proteine aus den Überständen mit Methanol und Chloroform ausgefällt. Um zusätzlich die Zelllysate zu gewinnen, wurden die an den Plattenböden anhaftenden Mikroglia- bzw. THP-1 Zellen zunächst mit PBS gewaschen und für 20 Minuten mit RIPA-Puffer lysiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Spatel mechanisch vom Plattenboden gelöst. Um die Proteinkonzentrationen der Zelllysate zu bestimmen, wurde ein BCA-Test mit dem „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“ gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Sowohl die aus den Überständen ausgefallten Proteine als auch die Zelllysate wurden schließlich in Ladepuffer resuspendiert und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert.

Daraufhin wurden die Proben mittels Gelelektrophorese auf einem 4- bis 12-prozentigen Bis-Tris-Gel in MES oder MOPS SDS Laufpuffer aufgetrennt. Die so entstandenen Proteinbanden wurden mithilfe des Trans-Blot Turbo™ Transfer Systems der Firma Bio-Rad auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren, wurden die Membranen für 30 Minuten mit gelöstem Albumin aus Rinderserum behandelt.

Schließlich wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit einem primären, spezifischen Antikörper (NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1 $\beta$ , NOS-2,  $\alpha$ -Tubulin) inkubiert. Nach dem Entfernen unspezifisch bindender Antikörper durch dreimaliges Waschen, wurden die Membranen mit einem geeigneten IgG-Sekundärantikörper behandelt. Durch die Bindung von Sekundär- und Primärantikörper wird eine Fluoreszenzreaktion hervorgerufen. Diese wurde mithilfe des Odyssey CLx Imaging Systems visualisiert. Zur Quantifizierung der Proteinbanden wurde die Software Image Studio verwendet.

## Phagozytose von Amyloid- $\beta$

Zur Untersuchung der A $\beta$ -Phagozytose wurden pro Vertiefung einer schwarzen 96-well Mikrotiterplatte 80.000 THP-1 Zellen ausgesät und, wie im Abschnitt „Bestimmung der Zytokinsekretion“ beschrieben, mit den ASOs transfiziert. Nach 48 Stunden wurde zu den Zellen neues Kulturmedium zugegeben, das TAMRA-markiertes A $\beta$  (0,25  $\mu$ M) enthielt. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden wurde das Kulturmedium vollständig entfernt und die Absorption bei 540 nm und 585 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Um extrazelluläre TAMRA-Signale auszulöschen wurde anschließend Trypanblau (0,2 %) zugegeben und die Absorption erneut gemessen. Schließlich wurden die Zellkerne mit H33342 angefärbt und die Absorption bei 360 nm und 418 nm gemessen, um das TAMRA-Signal auf die Zellzahl zu normalisieren.

## Statistik

Die Datenanalyse wurde mit GraphPad Prism 9 durchgeführt. Alle Datensätze dieser Studie basieren auf mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Datenpunkte entsprechen jeweils einem unabhängigen Experiment und werden in allen Diagrammen als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Es wurden keine Randomisierungsverfahren angewandt. Die Stichprobengröße wurde anhand früherer, vergleichbarer Studien geschätzt (Lučiūnaitė et al., 2020). Weder bei der Zellkultur noch bei der Datenanalyse wurde eine Verblindung vorgenommen.

Wurden nur zwei Gruppen statistisch analysiert, erfolgte ein Zweistichproben-t-Test. Zusätzlich wurde ein Kolmogorov-Smirnov-Normalitätstest durchgeführt, um zu prüfen, ob die Werte einer Gaußschen Verteilung entstammen. Für die Analyse von mehr als zwei Gruppen wurde eine einfaktorielle ANOVA mit Tukey-Test (post hoc) durchgeführt. Die auf die konkreten Datensätze jeweils angewandten statistischen Tests sind in den Bildunterschriften der Originalpublikation zu finden. Zusätzlich wurden alle Datensätze mittels Grubbs-Test (Alpha von 0,05) auf signifikante Ausreißer untersucht. Die Signifikanzniveaus sind mit \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  angegeben.

### 1.3 Ergebnisse

Ziel der Studie war es, die Effekte einer ASO-Therapie auf neuroinflammatorische Prozesse sowohl in einem murinen als auch in einem humanen Modell zu evaluieren. Hierfür wurden mehrere gegen NLRP3 gerichtete ASOs designt. Zunächst wurden Abschnitte der *homo sapiens* und *mus musculus* NLRP3 mRNA aufgesucht, die sich aufgrund ihrer räumlichen Anordnung in Sekundär- und Tertiärstrukturen potentiell zur Bindung eines spezifischen, komplementären ASOs eignen (Figure 1a, Figure 3a aus Braatz et al., 2023). Darauf basierend wurden 18 bis 21 Basenpaare umfassende maus- oder menschspezifische, komplementäre Oligonukleotide konzipiert (Tabelle 1). Unmodifizierte Oligonukleotide sind aufgrund ihrer chemischen Struktur äußerst anfällig für den enzymatischen Abbau durch Endo- und Exonukleasen (Bennett und Swayze, 2010; Crooke et al., 2017; Patil et al., 2005; Pulst, 2019; Rinaldi und Wood, 2018). Um eine ausreichende Stabilität gegenüber abbauenden Enzymen zu gewährleisten, wurde daher eine Phosphorothioat-Modifikation an der ASO-Hauptkette vorgenommen. Zusätzlich wurden im Sinne eines sogenannten Gapmers am 5'- und 3'-Ende jeweils fünf RNA-Basen mit einer 2'-O-(2-methoxy)ethyl-Modifikation integriert.

Zunächst wurden die für das murine Modell konzipierten ASOs getestet. Hierfür transfizierten wir primäre Mikrogliazellen von Wildtyp-Mäusen jeweils mit einem von vier verschiedenen, gegen NLRP3 gerichteten ASOs bei Endkonzentrationen von 0 bis 300 nM (Figure 1b aus Braatz et al., 2023). In ersten explorativen Experimenten erwies sich eine Inkubationszeit von 72 Stunden als optimal zur Herunterregulation des NLRP3-Signalweges. Während ASO 1 und ASO 2 die Expression von NLRP3 kaum beeinflussten (Figure 1c-d aus Braatz et al., 2023), zeigte sich bei der Transfektion der Mikrogliazellen mit ASO 3 oder ASO 4 eine dosisabhängige Reduktion der NLRP3 mRNA (Figure 1e-f aus Braatz et al., 2023). Insbesondere mit ASO 3 konnte die NLRP3 mRNA Expression um bis zu 50 % gesenkt werden (Figure 1e aus Braatz et al., 2023). Dieser Effekt spiegelte sich auch auf Proteinebene wider (Figure 1g-h aus Braatz et al., 2023).

Um die spezifische Wirkung der gegen NLRP3 gerichteten Antisense-Oligonukleotide abzubilden und etwaige Off-Target-Effekte auszuschließen, wurden anschließend Kontrollexperimente mit sogenannten „scrambled“ (Scr. Con.) und „mismatched“ (MM

Con.) Antisense-Oligonukleotiden zu ASO 3 durchgeführt. Verglichen mit diesen Kontrollen zeigte sich nach Behandlung mit ASO 3 ebenfalls eine signifikante Reduktion der NLRP3 Proteinkonzentrationen in den Zelllysaten der primären murinen Mikroglia (Figure 1g-h aus Braatz et al., 2023). Diese Daten legen nahe, dass ASO 3 ab einer Konzentration von 30 nM die mRNA-Expression von NLRP3 sequenzspezifisch inhibiert. Entsprechend wurde der mausspezifische ASO 3 für alle weiteren Experimente im murinen Modell verwendet.

Danach untersuchten wir, ob die ASO-bedingte Herunterregulation des NLRP3-Signalweges auch nach Stimulation der primären murinen Mikrogliazellen mit Lipopolysaccharid (LPS) und Nigericin anhält (Figure 2a aus Braatz et al., 2023). Wie zu erwarten, induzierte diese zweistufige Stimulation eine gesteigerte Expression von NLRP3 und Pro-IL-1 $\beta$  in den Zelllysaten (Figure 2b-c, Figure S2d aus Braatz et al., 2023). Während sich dieser Effekt auch nach der Behandlung mit den Kontroll-ASOs einstellte, zeigte sich nach der Behandlung mit ASO 3 eine signifikante Reduktion der NLRP3-Konzentration (Figure 2b-c aus Braatz et al., 2023).

In Anlehnung an den Ablauf des NLRP3-Signalweges wurde daraufhin die Freisetzung der Inflammasom-Komponenten in die Zellüberstände mittels ELISA und Western Blot näher betrachtet. Alle der NLRP3-Stimulation nachgeschalteten Prozesse zeigten dabei eine verstärkte Aktivität, was sich in erhöhten Konzentrationen von ASC, Caspase-1 und IL-1 $\beta$  sowie deren Vorläuferformen widerspiegelte (Figure 2e-h, Figure S2e-g aus Braatz et al., 2023). Durch eine Behandlung mit ASO 3 konnte dies jedoch wirksam verhindert werden. Insbesondere die Freisetzung von ASC, Caspase-1 und IL-1 $\beta$  war im Vergleich zu den Kontrollexperimenten signifikant reduziert (Figure 2e-h aus Braatz et al., 2023). Hierbei zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung des ASOs: Während eine Konzentration von 100 nM den extrazellulären IL-1 $\beta$ -Spiegel um 62 % senkte, führten Konzentrationen von 30 nM zu einer signifikanten Reduktion um 43 % (Figure S2h aus Braatz et al., 2023). Zugleich hatte die ASO-Therapie keine Auswirkungen auf die Zellviabilität. Dies manifestierte sich bei der Behandlung mit ASO 3 in einer unveränderten Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH) im Vergleich zu den Kontrollversuchen (Figure S2j aus Braatz et al., 2023).

Nach der erfolgreichen Anwendung im Mausmodell wurde die ASO-Therapie in einem humanen Modell der Neuroinflammation evaluiert. Hierfür konzipierten wir, analog zum Mausmodell, für die humane NLRP3 mRNA sequenzspezifische Oligonukleotide (Tabelle 1, Figure 3a aus Braatz et al., 2023). Als möglichst adäquates *in-vitro*-Modell für menschliche Mikroglia wählten wir THP-1 Zellen, die mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) zur Differenzierung in makrophagenähnliche Zellen angeregt wurden (Balon und Wiatrak, 2021). Diese wurden jeweils mit einem von drei verschiedenen gegen NLRP3 gerichteten ASOs in Endkonzentrationen von 0 bis 300 nM transfiziert. In explorativen Experimenten erwies sich eine Inkubationszeit von 48 Stunden als optimal, um den NLRP3-Signalweg effektiv zu modulieren.

Im humanen Modell untersuchten wir mittels RT-PCR erneut die Auswirkungen der ASO-Therapie auf die Expression von NLRP3. Interessanterweise zeigte die Behandlung mit allen drei ASOs eine dosisabhängige Reduktion der NLRP3 mRNA (Figure 3c-e aus Braatz et al., 2023). Betrachtete man jedoch die anschließende Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, ließ sich dieses Ergebnis nicht reproduzieren. Hier zeigte sich ausschließlich bei der Behandlung mit ASO 2 in Konzentrationen von 100 und 30 nM eine deutlich signifikante Reduktion der IL-1 $\beta$ -Spiegel im Zellüberstand (Figure S3a-d aus Braatz et al., 2023).

Entsprechend wurden – wie im Mausmodell – „scrambled“ und „mismatched“ Oligonukleotide als Kontrolle für ASO 2 entworfen. Verglichen mit diesen Kontrollen zeigte sich in den Lysaten der THP-1 Zellen nach Behandlung mit ASO 2 weiterhin eine signifikante Reduktion der NLRP3 Proteinkonzentrationen (Figure 3f-g aus Braatz et al., 2023). Folglich ist von einer spezifischen Wirkung des zielgerichteten ASOs auszugehen. Daher wurde für alle weiteren Experimente im humanen Modell ASO 2 in einer Konzentration von 30 nM verwendet.

Um die potentiellen antiinflammatorischen Effekte der ASO-Therapie weiter zu beleuchten, wurde auch in den THP-1 Zellen die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms mit LPS und Nigericin induziert (Figure 4a aus Braatz et al., 2023). Durch die Behandlung mit ASO 2 war die Konzentration von NLRP3 auch nach Stimulation in den Zelllysaten im Vergleich zu den Kontrollexperimenten signifikant reduziert (Figure 4b-c aus Braatz et al., 2023). Damit einhergehend war die nachfolgende Spaltung von Pro-

Caspase-1 in seine aktive Form ebenfalls vermindert (Figure 4b,d aus Braatz et al., 2023). Zudem wirkte sich die ASO-Behandlung auf die extrazelluläre Freisetzung von Inflammasom-Komponenten und proinflammatorischen Zytokinen aus: In den Überständen wurden nach der Inkubation mit ASO 2 im Vergleich zu den Kontrollexperimenten signifikant reduzierte NLRP3-, Caspase-1- und IL-1 $\beta$ -Spiegel gemessen (Figure 4e-h aus Braatz et al., 2023). Diese Ergebnisse wurden zusätzlich mittels ELISA quantifiziert, wobei sich eine dosisabhängige Wirkung von ASO 2 zeigte: Bei Konzentrationen von 100 bzw. 30 nM wurden die extrazellulären IL-1 $\beta$ -Spiegel um 69 % und 64 % verringert (Figure S3l aus Braatz et al., 2023). Interessanterweise hatte die ASO-Therapie im humanen Modell im Vergleich zu den Kontrollexperimenten zusätzlich einen positiven Einfluss auf die Viabilität der THP-1 Zellen (Figure S3n aus Braatz et al., 2023).

Schließlich war unser Ziel, die protektiven Effekte einer ASO-Therapie noch präziser im Kontext der Alzheimer-Erkrankung darzustellen. Hierfür wurden primäre murine Mikroglia und THP-1 Zellen zunächst mit den jeweils spezifischen ASOs und den zugehörigen Kontrollen transfiziert. Es folgte eine dreistündige Behandlung mit LPS, bis schließlich das NLRP3-Inflammasom durch eine 24-stündige Exposition gegenüber A $\beta$ 1-42 stimuliert wurde (Figure 5a aus Braatz et al., 2023). Sowohl im Maus- als auch im humanen Modell zeigte sich hiernach eine gesteigerte extrazelluläre Freisetzung von IL-1 $\beta$ . Dies konnte durch die vorherige Behandlung mit dem jeweils spezifischen gegen NLRP3 gerichteten ASO erfolgreich verhindert werden (Figure 5b-c aus Braatz et al., 2023). Um die Auswirkungen auf den NLRP3-Signalweg im Mausmodell detailliert darzustellen, wurden zusätzlich Immunoblots durchgeführt. Dabei konnte nach der Behandlung mit ASO 3 verglichen mit Kontrollexperimenten erneut eine signifikante Reduktion der NLRP3-Konzentrationen in den Lysaten primärer muriner Mikrogliazellen beobachtet werden (Figure 5d-e aus Braatz et al., 2023). Darüber hinaus spiegelte sich die erfolgreiche Herunterregulation des NLRP3-Signalweges in einer verminderten extrazellulären Freisetzung von Caspase-1 und IL-1 $\beta$  wider (Figure 5f-i aus Braatz et al., 2023).

Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, dass der Abbau der NLRP3 mRNA durch eine Behandlung mit spezifischen ASOs induziert wird. Dies wiederum trägt zur

deutlichen Eindämmung neuroinflammatorischer Prozesse bei. Die Auswirkungen dieser Art der NLRP3-Inhibition wollten wir schließlich auf zellulärer Ebene genauer charakterisieren. Daher untersuchten wir die Aktivierungszustände der primären murinen Mikroglia und der makrophagenähnlich differenzierten THP-1 Zellen. Mikrogliazellen oder Makrophagen durchlaufen bei Aktivierung eine phänotypische Polarisierung. Am Ende dieses Prozesses zeigen die Zellen entweder eine proinflammatorische oder eine antiinflammatorische Ausrichtung (Heneka, Carson, et al., 2015; Mantovani et al., 2004). Was lange als dichotomes Modell galt, wird mittlerweile jedoch als Kontinuum betrachtet (Paolicelli et al., 2022; Ransohoff, 2016; Tang, 2018). Dabei lässt sich der jeweilige Aktivierungszustand anhand verschiedener Marker definieren. Während eine gesteigerte Expression von Stickstoffmonoxid-Synthase-2 (NOS2) für einen proinflammatorischen Phänotyp spricht, stellt Arginase-1 einen Marker für die antiinflammatorische Aktivierung der Immunzellen dar (Heneka et al., 2013; Kummer et al., 2011). Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass ein NLRP3-Knockout bei transgenen APP/PS1 Mäusen zu einer phänotypischen Verlagerung in Richtung eines antiinflammatorischen Zustands führt (Heneka et al., 2013). In unserer Studie konnte dieses Erkenntnis erfolgreich auf die ASO-Therapie übertragen werden. Durch die Behandlung mit einem gegen NLRP3 gerichteten ASO zeigte sich in primärer muriner Mikroglia eine deutliche Herunterregulation der NOS2-Expression (Figure 6b aus Braatz et al., 2023). Gleichzeitig war die Expression von Arginase-1 signifikant gesteigert, was sich auch auf Proteinebene beobachten ließ (Figure 6c-e aus Braatz et al., 2023). Im humanen Modell führte die Behandlung mit einem NLRP3-spezifischen ASO ebenfalls zu einer deutlichen Verringerung der NOS2 mRNA-Spiegel (Figure 6g aus Braatz et al., 2023). Eine Auswirkung auf die Expression von Arginase-1 konnte allerdings nicht festgestellt werden (Figure 6h aus Braatz et al., 2023).

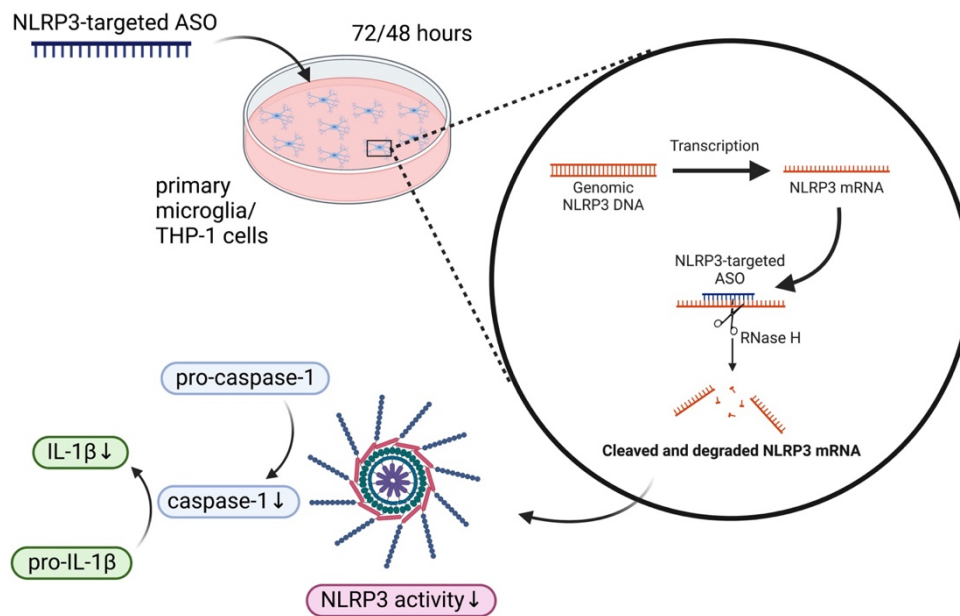
Abschließend untersuchten wir den Einfluss dieser phänotypischen Veränderungen auf die Phagozytosekapazität der Immunzellen. Hierfür wurden zunächst die mRNA-Spiegel von CD68, einem Zelladhäsionsprotein, das bei der Phagozytose eine zentrale Rolle spielt, gemessen. Sowohl im Maus- als auch im humanen Modell konnte nach der Behandlung mit NLRP3-spezifischen ASOs eine signifikant gesteigerte Expression von CD68 festgestellt werden (Figure 6a,f aus Braatz et al., 2023). Zur genaueren Untersuchung dieser Veränderungen im humanen Modell, wurde daraufhin die

Phagozytose von TAMRA-markiertem A $\beta$  durch die THP-1 Zellen mittels eines speziellen Assays direkt gemessen (Figure 6i aus Braatz et al., 2023). Dabei zeigte sich im Vergleich zu Kontrollexperimenten eine moderate, jedoch signifikant gesteigerte A $\beta$ -Phagozytose nach der Behandlung mit ASO 2 (Figure 6j aus Braatz et al., 2023).

#### 1.4 Diskussion

Neuroinflammatorische Prozesse spielen bei der Pathogenese einer Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen eine bedeutende Rolle. Im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung kommt es unter anderem durch die Akkumulation von A $\beta$  zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms. Dies wird überwiegend in Mikroglia, den hirneigenen Immunzellen, exprimiert, welche anschließend proinflammatorische Zytokine freisetzen (Yao et al., 2023). Interessanterweise konnte in einem Mausmodell der Alzheimer-Erkrankung durch einen NLRP3-Knockout dem charakteristischen Gedächtnisverlust vorgebeugt werden (Heneka et al., 2013). Dennoch stehen bis heute weder kurative, noch hinreichende symptomatische Therapieansätze zur Verfügung. Ziel der Studie war es daher, unter Verwendung primärer muriner Mikroglia sowie humaner THP-1 Zellen die direkte Beeinflussung des NLRP3-Signalweges durch zielgerichtete ASOs *in vitro* zu evaluieren.

Im Mausmodell konnte durch die Behandlung mit einem sequenzspezifischen ASO über 72 Stunden der Abbau der NLRP3 mRNA erfolgreich induziert werden (Abb. 1, Figure 1 aus Braatz et al., 2023). Der expressionsregulierende Effekt hielt auch nach der Aktivierung des Inflammasoms mit LPS und Nigericin an (Pétrilli et al., 2007). Dies spiegelte sich in bedeutenden Auswirkungen auf den NLRP3-Signalweg wider: Sowohl die Spaltung von Pro-Caspase-1 in ihre aktive Form als auch die extrazelluläre Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$  waren signifikant reduziert (Abb. 1, Figure 2 aus Braatz et al., 2023). Im humanen Modell der THP-1 Zellen zeigten sich vergleichbare Effekte nach einer 48-stündigen Behandlung mit einem NLRP3-spezifischen ASO (Abb. 1, Figure 3-4 aus Braatz et al., 2023).



**Abb. 1:** Visuelle Zusammenfassung des Studiendesigns. Modifiziert nach der Originalpublikation (Braatz et al., 2023)

Diese Ergebnisse konnten im Kontext der Alzheimer-Erkrankung reproduziert werden. Bei Stimulation der primären murinen Mikroglia sowie der humanen THP-1 Zellen mit LPS und A $\beta$ , konnte der NLRP3-Signalweg durch die vorherige Behandlung mit einem spezifischen ASO ebenfalls erfolgreich herunterreguliert werden (Figure 5 aus Braatz et al., 2023). Folglich werden neuroinflammatorische Prozesse in verschiedenen *in vitro* Modellen der Alzheimer-Erkrankung durch eine ASO-Therapie signifikant verlangsamt.

Neben den direkten Auswirkungen auf neuroinflammatorische Prozesse ist anzunehmen, dass eine ASO-Therapie zusätzlich protektive Effekte auf weitere mit dem NLRP3-Signalweg assoziierte Veränderungen im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung hat. Ein zentraler Baustein des NLRP3-Inflammasoms ist das Adaptorprotein ASC. Bei der Aktivierung des Inflammasoms, wird ASC von Makrophagen oder Mikrogliazellen in aggregierter Form als sogenannte „ASC specks“ freigesetzt (Baroja-Mazo et al., 2014; Franklin et al., 2014). Diese extrazellulären ASC specks wiederum begünstigen die für Alzheimer charakteristische Ausbreitung von A $\beta$  (Venegas et al., 2017). In unserem Mausmodell konnte durch die Behandlung mit einem gegen NLRP3 gerichteten ASO die extrazelluläre Freisetzung von ASC erfolgreich verhindert werden (Figure 2f aus Braatz

et al., 2023). Eine zielgerichtete ASO-Therapie könnte folglich auch die progrediente Aggregation von pathologischem A $\beta$  modulieren und verlangsamen.

Zusätzlich konnten Ising et al. (2019) zeigen, dass das NLRP3-Inflammasom eine bedeutende Rolle bei der Tau-Pathologie spielt: In NLRP3-defizienten Mäusen waren die pathologische Hyperphosphorylierung von Tau-Proteinen sowie die nachfolgende enzymatisch regulierte intraneuronale Aggregation signifikant reduziert. Gleichzeitig kann pathologisches Tau interneuronal übertragen werden, was wiederum die NLRP3-abhängige Pyroptose vorantreibt (Gibbons et al., 2019; Van Zeller et al., 2021). Eine gezielte, gegen NLRP3 gerichtete ASO-Therapie birgt daher das Potential, die intraneuronale Aggregation hyperphosphorylierter Tau-Proteine unmittelbar zu beeinflussen. Ferner könnte sie das Fortschreiten Tau-abhängiger neuroinflammatorischer Prozesse entscheidend eindämmen.

Aktivierte Makrophagen und Mikrogliazellen durchlaufen eine phänotypische Polarisierung. Am Ende dieses Prozesses stehen eine pro- oder eine antiinflammatorische Ausrichtung der Immunzellen. Während proinflammatorisch polarisierte Immunzellen insbesondere die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 und IL-18 sezernieren, ist der antiinflammatorische Phänotyp mit der Freisetzung von IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- $\beta$  sowie einer gesteigerten Phagozytosekapazität assoziiert (Heneka, Carson, et al., 2015; Mantovani et al., 2004; Paolicelli et al., 2022). In Mausmodellen führte eine NLRP3-Defizienz zu einer antiinflammatorischen Ausrichtung von Mikrogliazellen (Heneka et al., 2013). Dieses Phänomen konnte auch im Rahmen der ASO-Therapie beobachtet werden: Die Behandlung mit einem gegen NLRP3 gerichteten ASO resultierte in einer Polarisierung hin zu einem antiinflammatorischen Phänotyp. Sowohl in primärer muriner Mikroglia als auch in humanen THP-1 Zellen spiegelte sich dies in einer signifikanten Herunterregulation der NOS2-Expression wider (Figure 6b aus Braatz et al., 2023). Diese phänotypischen Veränderungen werden mit neuroprotektiven Effekten in Verbindung gebracht, sodass eine ASO-Therapie den fortschreitenden neuronalen Zelltod bei der Alzheimer-Erkrankung entscheidend bremsen könnte (Colonna und Butovsky, 2017; Guo et al., 2022; Tang und Le, 2016).

Im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung spielen die Mikrogliazellen als Immuneffektorzellen des zentralen Nervensystems eine bedeutende Rolle bei der Detektion und Elimination von A $\beta$  (Lee und Landreth, 2010). Hierbei sind zwei Mechanismen von besonderer Relevanz: Einerseits führt die Bindung von A $\beta$  an den Oberflächenrezeptor CD36 sowie die Toll-like Rezeptoren (TLR) 4 und 6 zur Aktivierung der Mikroglia und anschließenden Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (El Khoury et al., 2003; Stewart et al., 2010). Andererseits wird über die PPAR- $\gamma$ -abhängige Expressionsregulierung von CD36 die Phagozytose von A $\beta$  gesteigert (Yamanaka et al., 2012). Insbesondere konnte in Hirnschnitten gezeigt werden, dass sich CD68-positive Mikrogliazellen gezielt um A $\beta$ -Plaques anordnen und diese phagozytieren (Daria et al., 2017). Interessanterweise zeigte sich nach der Behandlung mit einem gegen NLRP3 gerichteten ASO sowohl in primärer muriner Mikroglia als auch in makrophagenähnlich differenzierten THP-1 Zellen eine signifikant gesteigerte Expression von CD68 (Figure 6a,f aus Braatz et al., 2023). Im humanen Modell spiegelte sich dies zudem in einer vermehrten Phagozytose von TAMRA-markiertem A $\beta$  wider (Figure 6j aus Braatz et al., 2023). Folglich kann eine spezifische ASO-Therapie die Phagozytosekapazität von Makrophagen und Mikrogliazellen maßgeblich beeinflussen und so der Akkumulation von pathologischem A $\beta$  entgegenwirken.

Dem potentiellen Nutzen einer ASO-Therapie steht jedoch die erschwerte frühzeitige Diagnosestellung der Alzheimer-Erkrankung gegenüber. Bis heute kann eine definitive Diagnosesicherung nur post mortem durch histopathologische Gewebeanalysen erfolgen (DeTure und Dickson, 2019). Obwohl es wesentliche Fortschritte in der A $\beta$ -PET-Bildgebung gibt, können kleine Mengen von pathologisch relevantem aberrantem A $\beta$  unterhalb der Nachweisgrenze der jeweiligen Methode verbleiben. Darüber hinaus kann bilddiagnostisch bislang nur unzureichend zwischen vaskulärem und parenchymalem Amyloid unterschieden werden (Jucker und Walker, 2023). Über verschiedene Biomarker in Blut und Liquor – insbesondere die Messung von Tau – können bislang vor allem Folgeerscheinungen der A $\beta$ -Akkumulation erfasst werden (Ashton et al., 2022; Barthélemy et al., 2020; Ossenkoppele et al., 2022). Entscheidend ist daher neben der Identifizierung der optimalen molekularen Zielstrukturen und

entsprechender Gensequenzen die Etablierung weiterer präziser und insbesondere früher biologischer Indikatoren der Alzheimer-Erkrankung (Jucker und Walker, 2023).

Bislang sind ASO-Therapien von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) und der US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (FDA) unter anderem für die Behandlung der spinalen Muskelatrophie sowie der familiären Amyloid-Polyneuropathie zugelassen worden (Pulst, 2019). Die Präparate – Nusinersen und Inotersen – weisen identische chemische Modifikationen auf wie die hier verwendeten, gegen NLRP3 gerichteten ASOs. Folglich kann bei den sogenannten Gapmer-Oligonukleotiden bereits von einer ausreichenden pharmakologischen Sicherheit ausgegangen werden (Bennett et al., 2021; Rinaldi und Wood, 2018). Dennoch könnte die Effizienz der NLRP3-spezifischen ASOs durch weitere, innovative chemische Modifikationen wie den Einbau verbrückter Nukleinsäuren gesteigert werden. Überdies stellt die Blut-Hirn-Schranke eine wesentliche Hürde bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen dar. ASOs können sie aufgrund ihrer Größe und Ladung nicht ausreichend passieren (Mangan et al., 2018; Pulst, 2019). Für Nusinersen hat sich jedoch die intrathekale Injektion als klinisch wirksam erwiesen (Haché et al., 2016). Dennoch gilt es, alternative Strategien für eine weniger invasive Applikation zu entwickeln.

Das NLRP3-Inflammasom spielt eine Schlüsselrolle bei neuroinflammatorischen Prozessen, insbesondere im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung. Darüber hinaus ist es bei einer Vielzahl von Erkrankungen maßgeblich an der Entstehung chronischer Entzündungszustände beteiligt, wobei etliche zu den zehn häufigsten Todesursachen weltweit zählen (Mangan et al., 2018; WHO, 2020). Insbesondere für Atherosklerose, die nichtalkoholische Steatohepatitis, Typ-I-Diabetes, Herzinfarkte und Schlaganfälle konnte die protektive Wirkung einer NLRP3-Defizienz oder -Inhibierung nachgewiesen werden (Hu et al., 2015; Mridha et al., 2017; van der Heijden et al., 2017; van Hout et al., 2016; Yang et al., 2014). Unsere Daten zeigen, dass durch spezifische ASOs die Expression von NLRP3 erfolgreich herunterreguliert werden und der nachfolgende proinflammatorische Signalweg so supprimiert werden kann. Daher ist anzunehmen, dass eine NLRP3-spezifische ASO-Therapie nicht nur im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung protektiv wirken kann. Sie repräsentiert vielmehr einen innovativen

therapeutischen Ansatz für zahlreiche bedeutende Erkrankungen, die mit dem NLRP3-Signalweg assoziiert sind.

### 1.5 Zusammenfassung

Die Alzheimer-Erkrankung ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung und zugleich die am weitesten verbreitete Form der Demenz. Bis zum Jahr 2050 werden Schätzungen zufolge rund 152,8 Millionen Menschen weltweit davon betroffen sein. Die Erkrankung stellt damit eine enorme gesellschaftliche wie auch finanzielle Herausforderung dar.

Ein wesentliches histopathologisches Korrelat der Alzheimer-Erkrankung ist die Ablagerung von Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) im Gehirn. Dies wiederum setzt durch die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms (engl.: *NOD-, LRR-, and pyrin domain-containing protein 3*) neuroinflammatorische Prozesse in Gang. Insbesondere kommt es zur Aktivierung von Caspase-1 und zur anschließenden Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Interleukin-18 (IL-18). Am Ende der Signalkaskade steht der progrediente neuronale Zelltod. In Mausmodellen der Alzheimer-Erkrankung konnte allerdings gezeigt werden, dass sich ein NLRP3-Knockout protektiv auf den Gedächtnisverlust auswirkt.

Dennoch gibt es bis heute weder kurative noch krankheitsmodulierende Behandlungsmöglichkeiten. Antisense-Oligonukleotide (ASO) bedingen durch komplementäre Basenpaarung den spezifischen, RNase-H-abhängigen Abbau von mRNA. Die Effekte gegen NLRP3 gerichteter ASOs wurden bislang noch nicht untersucht. Folglich stellen sie eine innovative Strategie zur Prävention neuroinflammatorischer Prozesse dar.

Ziel der Studie war es, potentielle antiinflammatorische Effekte NLRP3-spezifischer ASOs *in vitro* zu evaluieren. Hierfür wurden sowohl primäre, murine Mikrogliazellen als auch makrophagenähnlich differenzierte, humane THP-1 Zellen mit selbst-designten ASOs behandelt. Um etwaige unspezifische Effekte der ASOs eliminieren zu können,

wurden Kontrollexperimente mit sogenannten „scrambled“ und „mismatched“ ASOs durchgeführt.

Im Mausmodell konnte nach einer 72-stündigen Behandlung mit einem spezifischen ASO der erfolgreiche Abbau der NLRP3 mRNA beobachtet werden. Infolgedessen waren die Konzentration von aktiver Caspase-1 sowie die extrazelluläre Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  sowohl bei Nigericin- als auch bei A $\beta$ -abhängiger Stimulation des NLRP3-Inflammasoms signifikant reduziert. Im humanen Modell konnten nach der Behandlung mit einem NLRP3-spezifischen ASO für 48 Stunden vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Zudem konnte durch die ASO-Therapie eine phänotypische Polarisierung der primären murinen Mikroglia und der THP-1 Zellen hin zu einem antiinflammatorischen Zustand induziert werden. Dies spiegelte sich insbesondere im humanen Modell in einer gesteigerten A $\beta$ -Phagozytosekapazität der THP-1 Zellen wider.

Zusammenfassend legen diese Daten nahe, dass neuroinflammatorische Prozesse im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung durch eine NLRP3-spezifische ASO-Therapie *in vitro* signifikant verlangsamt werden. Folglich bergen ASOs das Potential, grundlegend neue und innovative Optionen für die Behandlung NLRP3-abhängiger Erkrankungen zu eröffnen.

## 1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Andreeva L, David L, Rawson S, Shen, C, Pasricha, T, Pelegrin, P, Wu, H. NLRP3 cages revealed by full-length mouse NLRP3 structure control pathway activation. *Cell* 2021; 184: 6299-6312.e22

Arvanitakis Z, Shah RC, Bennett DA. Diagnosis and Management of Dementia: Review. *JAMA* 2019; 322: 1589

Ashton NJ, Janelidze S, Mattsson-Carlgrén N, Binette AP, Strandberg O, Brum WS, Karikari TK, González-Ortiz F, Di Molfetta G, Meda FJ, Jonaitis EM, Kosciuk RL, Cody K, Betthausen TJ, Li Y, Vanmechelen E, Palmqvist S, Stomrud E, Bateman RJ, Zetterberg

H, Johnson SC, Blennow K, Hansson O. Differential roles of A $\beta$ 42/40, p-tau231 and p-tau217 for Alzheimer's trial selection and disease monitoring. *Nat Med* 2022; 28: 2555–2562

Atri A. The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum. *Med Clin North Am* 2019; 103: 263–293

Balon K, Wiatrak B. PC12 and THP-1 Cell Lines as Neuronal and Microglia Model in Neurobiological Research. *Appl Sci* 2021; 11: 3729

Baroja-Mazo A, Martín-Sánchez F, Gomez AI, Martínez CM, Amores-Iniesta J, Compan V, Barberà-Cremades M, Yagüe J, Ruiz-Ortiz E, Antón J, Buján S, Couillin I, Brough D, Arostegui JI, Pelegrín P. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat Immunol* 2014; 15: 738–748

Bartels T, De Schepper S, Hong S. Microglia modulate neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Science* 2020; 370: 66–69

Barthélemy NR, Li Y, Joseph-Mathurin N, Gordon BA, Hassenstab J, Benzinger TLS, Buckles V, Fagan AM, Perrin RJ, Goate AM, Morris JC, Karch CM, Xiong C, Allegri R, Mendez PC, Berman SB, Ikeuchi T, Mori H, Shimada H, Shoji M, Suzuki K, Noble J, Farlow M, Chhatwal J, Graff-Radford NR, Salloway S, Schofield PR, Masters CL, Martins RN, O'Connor A, Fox NC, Levin J, Jucker M, Gabelle A, Lehmann S, Sato C, Bateman RJ, McDade E. A soluble phosphorylated tau signature links tau, amyloid and the evolution of stages of dominantly inherited Alzheimer's disease. *Nat Med* 2020; 26: 398–407

Bennett CF, Kordasiewicz HB, Cleveland DW. Antisense Drugs Make Sense for Neurological Diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2021; 61: 831–852

Bennett CF, Swayze EE. RNA Targeting Therapeutics: Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50: 259–293

Blotenberg I, Hoffmann W, Thyrian JR. Dementia in Germany: epidemiology and prevention potential. *Dtsch Arztebl Int* 2023

Boucher D, Monteleone M, Coll RC, Chen KW, Ross CM, Teo JL, Gomez GA, Holley CL, Bierschenk D, Stacey KJ, Yap AS, Bezbradica JS, Schroder K. Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *J Exp Med* 2018; 215: 827–840

Braatz C, Komes MP, Ravichandran KA, de Fragas MG, Griep A, Schwartz S, McManus RM, Heneka MT. NLRP3 -directed antisense oligonucleotides reduce microglial immunoactivities in vitro. *J Neurochem* 2023; 00: 1–15

Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) unter Beteiligung der Arbeitsgruppe ICD des Kuratoriums für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen (KKG) (Hrsg.), 2023: ICD-10-GM Version 2024, Systematisches Verzeichnis, Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision, German Modification.

[https://www.bfarm.de/SharedDocs/Downloads/DE/Kodiersysteme/klassifikationen/icd-10-gm/version2024/icd10gm2024syst-pdf\\_zip.html?nn=841246&cms\\_dlConfirm=true&cms\\_calledFromDoc=841246](https://www.bfarm.de/SharedDocs/Downloads/DE/Kodiersysteme/klassifikationen/icd-10-gm/version2024/icd10gm2024syst-pdf_zip.html?nn=841246&cms_dlConfirm=true&cms_calledFromDoc=841246)  
(Zugriffsdatum: 08.01.2024)

Caselli RJ, Beach TG, Knopman DS, Graff-Radford NR. Alzheimer Disease: Scientific Breakthroughs and Translational Challenges. *Mayo Clin Proc* 2017; 92: 978–994

Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol* 2017; 35: 441–468

Crooke ST, Wang S, Vickers TA, Shen W, Liang XH. Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol* 2017; 35: 230–237

Daria A, Colombo A, Llovera G, Hampel H, Willem M, Liesz A, Haass C, Tahirovic S. Young microglia restore amyloid plaque clearance of aged microglia. *EMBO J* 2017; 36: 583–603

DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegeneration* 2019; 14: 32

DeVos SL, Miller RL, Schoch KM, Holmes BB, Kebodeaux CS, Wegener AJ, Chen G, Shen T, Tran H, Nichols B, Zanardi TA, Kordasiewicz HB, Swayze EE, Bennett CF, Diamond MI, Miller TM. Tau reduction prevents neuronal loss and reverses pathological tau deposition and seeding in mice with tauopathy. *Sci Transl Med* 2017; 9: eaag0481

Dinarello CA, Simon A, van der Meer JWM. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11: 633–652

Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Hampel H, Molinuevo JL, Blennow K, DeKosky ST, Gauthier S, Selkoe D, Bateman R, Cappa S, Crutch S, Engelborghs S, Frisoni GB, Fox NC, Galasko D, Habert MO, Jicha GA, Nordberg A, Pasquier F, Rabinovici G, Robert P, Rowe C, Salloway S, Sarazin M, Epelbaum S, de Souza LC, Vellas B, Visser PJ, Schneider L, Stern Y, Scheltens P, Cummings JL. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol* 2014; 13: 614–629

El Khoury JB, Moore KJ, Means TK, Leung J, Terada K, Toft M, Freeman MW, Luster AD. CD36 Mediates the Innate Host Response to  $\beta$ -Amyloid. *J Exp Med* 2003; 197: 1657–1666

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

GBD 2019 Dementia Forecasting Collaborators. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Public Health* 2022; 7: e105–e125

Gibbons GS, Lee VMY, Trojanowski JQ. Mechanisms of Cell-to-Cell Transmission of Pathological Tau: A Review. *JAMA Neurol* 2019; 76: 101

Guo S, Wang H, Yin Y. Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci* 2022; 14: 815347

Haché M, Swoboda KJ, Sethna N, Farrow-Gillespie A, Khandji A, Xia S, Bishop KM. Intrathecal Injections in Children With Spinal Muscular Atrophy: Nusinersen Clinical Trial Experience. *J Child Neurol* 2016; 31: 899–906

Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- $\beta$ . *Nat Immunol* 2008; 9: 857–865

Hansen DV, Hanson JE, Sheng M. Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 2018; 217: 459–472

Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseon 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

Heneka MT, Golenbock DT, Latz E. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Immunol* 2015; 16: 229–236

Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 463–477

Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, Griep A, Axt D, Remus A, Tzeng TC, 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

Heneka MT, McManus RM, Latz E. Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 2018; 19: 610–621

Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 2018; 21: 1359–1369

Hochheiser IV, Pils M, Hagelueken G, Moecking J, Marleaux M, Brinkschulte R, Latz E, Engel C, Geyer M. Structure of the NLRP3 decamer bound to the cytokine release inhibitor CRID3. *Nature* 2022; 604: 184–189

Hu C, Ding H, Li Y, Pearson JA, Zhang X, Flavell RA, Wong FS, Wen L. NLRP3 deficiency protects from type 1 diabetes through the regulation of chemotaxis into the pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112: 11318–11323

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, Kayed R, Golenbock DT, Blum D, Latz E, Buée L, Heneka MT. NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. *Nature* 2019; 575: 669-673

Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, Jenkins NA, Copeland NG, Borchelt DR. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol Eng* 2001; 17: 157–165

Jorfi M, Maaser-Hecker A, Tanzi RE. The neuroimmune axis of Alzheimer's disease. *Genome Med* 2023; 15: 6

Jucker M, Walker LC. Alzheimer's disease: From immunotherapy to immunoprevention. *Cell* 2023; 186: 4260–4270

Klotz S, Gelpi E. Neuropathologie der Demenzen. *Wien Med Wochenschr* 2021; 171: 257–273

Kummer MP, Hermes M, Delekarte A, Hammerschmidt T, Kumar S, Terwel D, Walter J, Pape HC, König S, Roeber S, Jessen F, Klockgether T, Korte M, Heneka MT. Nitration of Tyrosine 10 Critically Enhances Amyloid  $\beta$  Aggregation and Plaque Formation. *Neuron* 2011; 71: 833–844

Lee CYD, Landreth GE. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm* 2010; 117: 949–960

Liu J, Chang L, Song Y, Li H, Wu Y. The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci* 2019; 13: 43

Liu X, Zhang Z, Ruan J, Pan Y, Magupalli VG, Wu H, Lieberman J. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* 2016; 535: 153–158

Lučiūnaitė A, McManus RM, Jankunec M, Rácz I, Dansokho C, Dalgėdienė I, Schwartz S, Brosseon F, Heneka MT. Soluble A $\beta$  oligomers and protofibrils induce NLRP3 inflammasome activation in microglia. *J Neurochem* 2020; 155: 650-661

Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2018; 17: 588–606

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; 25: 677–686

Marucci G, Buccioni M, Ben DD, Lambertucci C, Volpini R, Amenta F. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 2021; 190: 108352

Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ. Decreased Clearance of CNS  $\beta$ -Amyloid in Alzheimer's Disease. *Science* 2010; 330: 1774

McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011; 7: 263–269

Michalowsky B, Kaczynski A, Hoffmann W. Ökonomische und gesellschaftliche Herausforderungen der Demenz in Deutschland – Eine Metaanalyse. *Bundesgesundheitsbl* 2019; 62: 981–992

Mridha AR, Wree A, Robertson AAB, Yeh MM, Johnson CD, Van Rooyen DM, Haczeyni F, Teoh NC, Savard C, Ioannou GN, Masters SL, Schroder K, Cooper MA, Feldstein AE, Farrell GC. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice. *J Hepatol* 2017; 66: 1037–1046

Ossenkoppele R, Van Der Kant R, Hansson O. Tau biomarkers in Alzheimer's disease: towards implementation in clinical practice and trials. *Lancet Neurol* 2022; 21: 726–734

Paolicelli RC, Sierra A, Stevens B, Tremblay ME, Aguzzi A, Ajami B, Amit I, Audinat E, Bechmann I, Bennett M, Bennett F, Bessis A, Biber K, Bilbo S, Blurton-Jones M, Boddeke E, Brites D, Brône B, Brown GC, Butovsky O, Carson MJ, Castellano B, Colonna M, Cowley SA, Cunningham C, Davalos D, De Jager PL, de Strooper B, Denes A, Eggen BJL, Eyo U, Galea E, Garel S, Ginhoux F, Glass CK, Gokce O, Gomez-Nicola D, González B, Gordon S, Graeber MB, Greenhalgh AD, Gressens P, Greter M, Gutmann DH, Haass C, Heneka MT, Heppner FL, Hong S, Hume DA, Jung S, Kettenmann H, Kipnis J, Koyama R, Lemke G, Lynch M, Majewska A, Malcangio M, Malm T, Mancuso R, Masuda T, Matteoli M, McColl BW, Miron VE, Molofsky AV, Monje M, Mracsko E, Nadjar A, Neher JJ, Neniskyte U, Neumann H, Noda M, Peng B, Peri F, Perry VH, Popovich PG, Pridans C, Priller J, Prinz M, Ragozzino D, Ransohoff RM, Salter MW, Schaefer A, Schafer DP, Schwartz M, Simons M, Smith CJ, Streit WJ, Tay TL, Tsai LH, Verkhratsky A, von Bernhardi R, Wake H, Wittamer V, Wolf SA, Wu LJ, Wyss-Coray T. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron* 2022; 110: 3458–3483

Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: A comprehensive review. *AAPS J* 2005; 7: E61–E77

Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1583–1589

Pulst S. Antisense-Therapie neurologischer Erkrankungen. *Nervenarzt* 2019; 90: 781–786

Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* 2010; 362: 329–344

- Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci* 2016; 19: 987–991
- Rathinam VAK, Zhao Y, Shao F. Innate immunity to intracellular LPS. *Nat Immunol* 2019; 20: 527–533
- Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol* 2014; 88: 640–651
- Rinaldi C, Wood MJA. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders. *Nat Rev Neurol* 2018; 14: 9–21
- Sarlus H, Heneka MT. Microglia in Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 2017; 127: 3240–3249
- Scharner J, Aznarez I. Clinical Applications of Single-Stranded Oligonucleotides: Current Landscape of Approved and In-Development Therapeutics. *Mol Ther* 2021; 29: 540–554
- Schoch KM, DeVos SL, Miller RL, Chun SJ, Norrbom M, Wozniak DF, Dawson HN, Bennett CF, Rigo F, Miller TM. Increased 4R-Tau Induces Pathological Changes in a Human-Tau Mouse Model. *Neuron* 2016; 90: 941–947
- Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, Rayner KJ, Boyer L, Zhong R, Frazier WA, Lacy-Hulbert A, El Khoury J, Golenbock DT, Moore KJ. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* 2010; 11: 155–161
- Sud R, Geller ET, Schellenberg GD. Antisense-mediated Exon Skipping Decreases Tau Protein Expression: A Potential Therapy For Tauopathies. *Mol Ther Nucleic Acids* 2014; 3: e180
- Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 2016; 53: 1181–1194
- Tang Y. Editorial: Microglial Polarization in the Pathogenesis and Therapeutics of Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci* 2018; 10: 154

Trejo-Lopez JA, Yachnis AT, Prokop S. Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics* 2022; 19: 173–185

van der Heijden T, Kritikou E, Venema W, van Duijn J, van Santbrink PJ, Slütter B, Foks AC, Bot I, Kuiper J. NLRP3 Inflammasome Inhibition by MCC950 Reduces Atherosclerotic Lesion Development in Apolipoprotein E-Deficient Mice-Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017; 37: 1457–1461

van Hout GP, Bosch L, Ellenbroek GH, de Haan JJ, van Solinge WW, Cooper MA, Arslan F, de Jager SC, Robertson AA, Pasterkamp G, Hoefer IE. The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces infarct size and preserves cardiac function in a pig model of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2016; 38: 828-836

Van Zeller M, Dias D, Sebastião AM, Valente CA. NLRP3 Inflammasome: A Starring Role in Amyloid- $\beta$ - and Tau-Driven Pathological Events in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2021; 83: 939–961

Venegas C, Heneka MT. Danger-associated molecular patterns in Alzheimer's disease. *J Leukoc Biol* 2017; 101: 87–98

Venegas C, Kumar S, Franklin BS, Dierkes T, Brinkschulte R, Tejera D, Vieira-Saecker A, Schwartz S, Santarelli F, Kummer MP, Griep A, Gelpi E, Beilharz M, Riedel D, Golenbock DT, Geyer M, Walter J, Latz E, Heneka MT. Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. *Nature* 2017; 552: 355–361

Weiner GJ, Liu HM, Wooldridge JE, Dahle CE, Krieg AM. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10833–10837

Weiner HL, Frenkel D. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 404–416

World Health Organization (WHO), 2020: The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>  
(Zugriffsdatum: 08.01.2024)

World Health Organization (WHO), 2017: Global action plan on the public health response to dementia 2017–2025. <https://www.who.int/publications/i/item/global-action-plan-on-the-public-health-response-to-dementia-2017---2025> (Zugriffsdatum: 08.01.2024)

Yamanaka M, Ishikawa T, Griep A, Axt D, Kummer MP, Heneka MT. PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$ -induced and CD36-mediated microglial amyloid- $\beta$  phagocytosis results in cognitive improvement in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice. *J Neurosci* 2012; 32: 17321–17331

Yang F, Wang Z, Wei X, Han H, Meng X, Zhang Y, Shi W, Li F, Xin T, Pang Q, Yi F. NLRP3 deficiency ameliorates neurovascular damage in experimental ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014; 34: 660–667

Yao J, Wang Z, Song W, Zhang Y. Targeting NLRP3 inflammasome for neurodegenerative disorders. *Mol Psychiatry* 2023

Zvěřová M. Clinical aspects of Alzheimer's disease. *Clin Biochem* 2019; 72: 3–6

## 2. Veröffentlichung



Received: 19 October 2022 | Revised: 20 January 2023 | Accepted: 2 February 2023  
DOI: 10.1111/jnc.15778

### ORIGINAL ARTICLE



# NLRP3-directed antisense oligonucleotides reduce microglial immunoactivities in vitro

Charlotte Braatz<sup>1</sup> | Max P. Komes<sup>1</sup> | Kishore Aravind Ravichandran<sup>1,2</sup> |  
Matheus Garcia de Fragas<sup>1,2,3</sup> | Angelika Griep<sup>1,2</sup> | Stephanie Schwartz<sup>1</sup> |  
Róisín M. McManus<sup>1,2</sup> | Michael T. Heneka<sup>1,4,5</sup>

<sup>1</sup>Institute for Innate Immunity, University of Bonn, Bonn, Germany

<sup>2</sup>German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Bonn, Germany

<sup>3</sup>Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>4</sup>Department of Infectious Diseases and Immunology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, USA

<sup>5</sup>Luxembourg Centre for Systems Biomedicine, University of Luxembourg, Belvaux, Luxembourg

#### Correspondence

Michael T. Heneka, Luxembourg Centre for Systems Biomedicine (LCSB), University of Luxembourg, 6, Avenue du Swing, L-4367 Belvaux, Luxembourg.  
Email: [michael.heneka@uni.lu](mailto:michael.heneka@uni.lu)

#### Funding information

Alzheimer Forschung Initiative, Grant/Award Number: 20043; BONFOR research commission of the medical faculty of the University of Bonn, Grant/Award Number: 2021-4-06; Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grant/Award Number: EXC2151 - 390873048; Deutscher Akademischer Austauschdienst, Grant/Award Number: scholarship

#### Abstract

Alzheimer's disease (AD) is associated with the cerebral deposition of Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptide, which leads to NLRP3 inflammasome activation and subsequent release of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-18 (IL-18). NLRP3 reduction has been found to increase microglial clearance, protect from synapse loss, and suppress both the changes to synaptic plasticity and spatial memory dysfunction observed in murine AD models. Here, we test whether NLRP3-directed antisense oligonucleotides (ASOs) can be harnessed as immune modulators in primary murine microglia and human THP-1 cells. NLRP3 mRNA degradation was achieved at 72 h of ASO treatment in primary murine microglia. Consequently, NLRP3-directed ASOs significantly reduced the levels of cleaved caspase-1 and mature IL-1 $\beta$  when microglia were either activated by LPS and nigericin or LPS and A $\beta$ . In human THP-1 cells NLRP3-targeted ASOs also significantly reduced the LPS plus nigericin- or LPS plus A $\beta$ -induced release of mature IL-1 $\beta$ . Together, NLRP3-directed ASOs can suppress NLRP3 inflammasome activity and subsequent release of IL-1 $\beta$  in primary murine microglia and THP-1 cells. ASOs may represent a new and alternative approach to modulate NLRP3 inflammasome activation in neurodegenerative diseases, in addition to attempts to inhibit the complex pharmacologically.

#### KEYWORDS

Alzheimer's disease, antisense oligonucleotides, A $\beta$ , innate immunity, microglia, neuroinflammation, NLRP3 inflammasome

**Abbreviations:** AD, Alzheimer's disease; APP, amyloid precursor protein; Arg-1, arginase-1; ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD; ASO, antisense oligonucleotide; A $\beta$ , amyloid beta; BCA, bicinchoninic acid; CSF, cerebrospinal fluid; DAMP, damage-associated molecular pattern; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DMSO, dimethyl sulfoxide; DPBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; EMA, European Medicines Agency; FBS, fetal bovine serum; FDA, Food and Drug Administration; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 beta; IL-18, interleukin-18; LDH, lactate dehydrogenase; LPS, lipopolysaccharide; MM Con., mismatched control; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; NF- $\kappa$ B, nuclear factor- $\kappa$ B; Nig., nigericin; NLRP3, NOD-, and pyrin domain-containing 3; NOS2, nitric oxide synthase 2; NT Con., non-targeted control; PLL, poly-L-lysine; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; PMO, phosphorodiamidate morpholino oligomers; PS, phosphorothioate; PS1, presenilin-1; P/S, penicillin/streptomycin; RIPA, ristocetin-induced platelet agglutination; RPMI, Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium; RRID, Research Resource Identifier; Scr. Con., scrambled control; SMA, spinal muscular atrophy; TLR, toll-like receptor; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ .

Róisín M. McManus and Michael T. Heneka contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2023 The Authors. *Journal of Neurochemistry* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of International Society for Neurochemistry.

## 1 | INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder and cause of dementia, clinically characterized by the progressive loss of cognitive function and by behavioral changes (Reitz & Mayeux, 2014). It currently affects about 55 million individuals worldwide, likely increasing to 78 million by 2030 (Gauthier et al., 2021). The histopathological hallmarks of AD include the extracellular deposition of amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptides, the intraneuronal formation of neurofibrillary tangles, and a concomitant innate immune activation. A $\beta$  is cleaved from amyloid precursor protein (APP) by two proteases,  $\gamma$ -secretase and  $\beta$ -secretase (Heneka et al., 2014). A $\beta$  can be removed from the brain via export into the cerebrospinal fluid (CSF), known as glymphatic drainage, and is degraded by microglia (Heneka, Golenbock, & Latz, 2015) the major component of the brain's innate immune defense. Impaired clearance of A $\beta$  can contribute to the development of sporadic AD (Mawuenyega et al., 2010).

A $\beta$  is a danger-associated molecular pattern (DAMP), triggering neuroinflammation through the activation of pattern recognition receptors (PRRs) on microglia (Venegas et al., 2017; Weiner & Frenkel, 2006), which are heterogenous and may react in different ways to this challenge (Paolicelli et al., 2022). Mostly, however, the binding of a DAMP to a PRR activates the myeloid differentiation primary response protein MyD88 (MYD88)-nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway. As a result, the expression of the NOD-, LRR-, and pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) and the pro-form of the inflammatory cytokine interleukin-1 $\beta$  (pro-IL-1 $\beta$ ) are upregulated (Halle et al., 2008; Heneka et al., 2018). A second signal is required to fully activate the NLRP3 inflammasome, where it undergoes a conformational change allowing the helical fibrillar assembly of an adaptor protein called apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) (Andreeva et al., 2021; Heneka et al., 2018; Hochheiser et al., 2022). Fibrillar ASC recruits caspase-1, which is then activated by autocatalysis and, in turn, cleaves and activates the pro-forms of IL-1 $\beta$ , IL-18, and gasdermin D (Boucher et al., 2018). Cleaved gasdermin D forms a pore in the outer cellular membrane, allowing movement of mature or active IL-1 $\beta$  and IL-18 to the extracellular space (Rathinam et al., 2019).

Protofibrils, oligomeric, and fibrillar A $\beta$  all trigger NLRP3 inflammasome activation leading to significant release of mature IL-1 $\beta$  into the supernatant of primary murine microglia (Lučičunaitė et al., 2020). In contrast, cells deficient for NLRP3 (Halle et al., 2008) or use of the NLRP3-specific inhibitor CRID3 (Lučičunaitė et al., 2020) protects microglia from the A $\beta$ -induced production of cleaved caspase-1 and release of mature IL-1 $\beta$ . In vivo, NLRP3 knockout mice carrying APP/PS1 mutations were largely protected from A $\beta$  deposition, immune activation of microglia, reduction in synaptic spines, and consequently spatial memory dysfunction (Heneka et al., 2013). The levels of cleaved caspase-1 and total IL-1 $\beta$  were significantly reduced in the brains of APP/PS1.NLRP3<sup>-/-</sup> mice in comparison with APP/PS1 mice and were instead on a par with age-matched wild-type controls (Heneka et al., 2013; Jankowsky et al., 2001).

As a result of these in vitro and in vivo findings, NLRP3 inflammasome inhibition is a promising therapeutic target for AD (Heneka et al., 2013). Indeed, a number of NLRP3 inhibitors are currently undergoing clinical trials for individuals with cryopyrin-associated autoinflammatory syndrome (CAPS), who have an overactive NLRP3 inflammasome. The results of these investigations will be relevant for all conditions where there is a NLRP3 inflammasome involvement, including AD. To date, IL-1 $\beta$ -pathway inhibitors such as anakinra or canakinumab are approved for therapeutic use (Dinarello et al., 2012), although their use in AD patients is not yet examined.

In contrast to pharmacological inhibition, protein expression can be modulated by antisense oligonucleotides (ASO). ASOs are short, synthetic, and single-stranded oligodeoxynucleotides that bind via complementary base pairing to their target mRNA. These RNA-DNA hybrids become substrates for RNase H, resulting in rapid mRNA degradation (Rinaldi & Wood, 2018).

Therapies with ASOs have been approved for neurological diseases including spinal muscular atrophy and Duchenne muscular dystrophy (Bennett et al., 2021). Indeed, there are a growing number of clinical trials examining the protectiveness of ASOs across a range of neurological diseases from amyotrophic lateral sclerosis, Huntington's disease, Parkinson's disease, and Angelman syndrome (Bennett et al., 2021; Scharner & Aznarez, 2021). In AD, ASOs that influence tauopathies by either blocking the synthesis of tau, or introducing alternative splicing to produce a less pathogenic tau protein are being investigated (DeVos et al., 2017; Schoch et al., 2016; Sud et al., 2014). Indeed, an ASO causing a RNaseH-mediated reduction in tau synthesis is already in a phase I/II clinical trial for patients with early-onset AD (Bennett et al., 2021).

In this current study, we investigate the effects of multiple self-designed NLRP3-directed ASOs in models of brain inflammation using primary murine microglia and human THP-1 cells. In both murine and human cells, we found that NLRP3-targeted ASOs successfully reduced the protein levels of NLRP3, thereby suppressing NLRP3 inflammasome activation and consequently IL-1 $\beta$  generation. Given the protective effect of silencing NLRP3 in models of AD (Heneka et al., 2013), together these findings highlight NLRP3-directed ASOs as a novel approach to reduce NLRP3 inflammasome signaling and prevent neuroinflammation in AD.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Animals

All animals used for microglial cell isolation were treated according to the legal and ethical requirements of the University of Bonn—Medical Center (Germany). Mouse breeding and husbandry were approved by the veterinary office (Bonn, Germany) according to the German Animal Welfare Act. Adult mice were mated and pups of either sex were used for primary microglial

cell preparation. No ethics approval number was required or assigned by the institutional board for this kind of lethal experiments. Mice were housed at 22°C and with a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. The procedures complied with the guidelines of animal welfare as laid down by the German Research Council (DFG). For this study, the brains of 287 P0 P0–P2, mixed-sex C57BL/6 N wild-type mice were used. The pups were sacrificed by decapitation.

## 2.2 | Oligonucleotide design, synthesis, and preparation

Folding of the homo sapiens and mus musculus NLRP3 mRNA into secondary or tertiary structures was analyzed by minimum free energy prediction using a tool of the ViennaRNA Web Services (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>). Subsequently, a number of possible target sites were chosen that were predicted to be open and accessible for ASO binding (Table 1). The specific ASOs were analyzed for CpG motifs, secondary structure, and oligonucleotide dimer formation with the sequence calculator called OligoEvaluator™ provided by Sigma-Aldrich (<http://oligoevaluator.com>). Furthermore, all ASOs were checked for off-target hybridization by BLAST analysis. All ASOs were synthesized by Sigma-Aldrich. The ASOs used in this study were between 18 and 21 nucleotides in length, which are linked through a phosphorothioate (PS) backbone. The 5'- and 3' ends consist of five 2'-O-(2-methoxy)ethyl-modified nucleotides. To eliminate ASO-specific effects scrambled (Scr. Con.) and mismatched (MM Con.), ASOs were used as controls. Oligonucleotide sequences were as follows. Underlined parts correspond to 2'-O-(2-methoxy) ethyl modifications.

TABLE 1 Sequence of human and mouse ASOs.

| Oligo name        | ASO sequence (5'-3')       |
|-------------------|----------------------------|
| human ASO 1       | GAUGCCATCTTGACCCA <u>U</u> |
| human ASO 2       | GCUCCGGTGCTCCTTGAUGA       |
| human ASO 3       | CCCAGGCTCCTCTGUGCA         |
| human Scr. Con. 2 | GUCUATCTCAGGTGGUCGCC       |
| human MM Con. 2   | GCUCCGGTATGAATTGAUGA       |
| mouse ASO 1       | ACUCUGGCTGGTCTCUUA         |
| mouse ASO 2       | AUCCACTCTTCTCAAGGC         |
| mouse ASO 3       | UCCCACTGCCCAGTCCAAC        |
| mouse ASO 4       | UCACUTCAATCCACUUA          |
| mouse Scr. Con. 3 | AGCUCGCGACTCCUACCA         |
| mouse MM Con. 3   | UCCCACTATATCGTCCAAC        |
| mouse Scr. Con. 4 | ACCUCACACTATACUUAU         |
| mouse MM Con. 4   | UCACUTCCGATAACUUA          |
| NT Con.           | CCUCUTACCTCAGTTACAATUUUAU  |

## 2.3 | Study design

No randomization procedures were applied to this study. No preliminary sample calculation was performed. The sample size was estimated based on similar studies previously carried out in the laboratory (Lučiūnaitė et al., 2020). There were no pre-determined exclusion criteria. No blinding was applied in the cell culture treatment, or to the analysis.

## 2.4 | Cell culture

### 2.4.1 | Primary murine microglia

For this experiment, mice were housed for primary microglia cell preparation only which did not require further approval. Primary murine microglia were prepared from P0–P2, mixed-gender mouse pups. After removing the meninges, cells were separated with 0.25% trypsin and by mechanical shearing. Afterward, pooled cells were transferred into T75 culture flasks coated with Poly-L-Lysine (PLL). Primary murine microglia cells were cultured under standard conditions at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> (1–2 brains per flask) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO) containing 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (iFBS, GIBCO), 1% Penicillin/Streptomycin (P/S, GIBCO), and 1 mL of filtered L929 cell supernatant as a source for growth factors. After 24 h, flasks were washed three times with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, GIBCO) and cultured for additional 7–10 days. When confluent, microglia were shaken off from the astrocyte monolayer. This was followed by two more shake cycles every second to third day.

### 2.4.2 | THP-1 cells

$4 \times 10^6$  cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (GIBCO) containing 10% iFBS and 1% P/S at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. THP-1 cells were passaged every 3–4 days, and  $4 \times 10^6$  cells were cultured again. Passages ranged from p7 to p23.

## 2.5 | Cell transfection

For transfection, appropriate ASO concentrations from 1 to 300 nM were prepared. The ASOs (at various concentrations) or Dextran-488 (Invitrogen, 0.1 mg/mL final concentration) were mixed with lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, final concentration, 0.3 µL/mL) and incubated at room temperature for 20 min. Subsequently, serum-free DMEM or RPMI medium was added to achieve the correct final concentration and volume. The ASOs were then added to the cells.

## 2.6 | Flow cytometry

Primary murine microglia or THP-1 cells were plated at  $5 \times 10^5$  cells/well in a 12-well plate, in DMEM containing 1% P/S, 1% N-2 supplement (GIBCO) or in RPMI-1640 containing 1% P/S and 50nM PMA, respectively. After 4–6 h the dextran/lipofectamine complexes were added to reach a final concentration of 0.1 mg/mL. Cells were incubated at 37°C for 3 h. The cells were gently scraped and incubated with LIVE/DEAD Aqua (Invitrogen). Fluorescence minus one served as controls. Flow cytometric analysis was performed on a BD FACSCanto II, and the data were acquired using Diva software (BD Biosciences). The flow cytometry results were analyzed using FlowJo software (TreeStar).

## 2.7 | Immunostaining and confocal microscopy

Primary microglia were plated onto PLL-coated coverslips at  $3 \times 10^5$  cells/well and allowed to adhere overnight. The dextran/lipofectamine complexes were prepared as described above and added to the cells at a final concentration of 0.1 mg/mL. After 3 h, the cells were washed three times with PBS and then were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 15 min at room temperature. The cells were then washed again with PBS followed by nuclear counter-staining using Hoescht 33342 (1:1000) in PBS + 0.1% Triton X100 for 15 min at room temperature. The coverslips containing the cells were washed with deionized water and were mounted onto glass slides using ProLong Gold Antifade reagent. Samples were dried in a cool dark place overnight. All the images were taken using 20X (air) objectives with the Zeiss LSM800 confocal microscope. Briefly, three regions of interest (ROIs) were imaged as a Z-stack per group. For the quantification and analysis, the maximum intensity Z-projections were used, all of which had undergone uniform brightness and contrast adjustments.

## 2.8 | Protein determination

To determine protein concentrations of cell lysates, a bicinchoninic acid (BCA) assay was performed using Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientific) according to the manufacturer's protocol.

## 2.9 | Quantitative RT-PCR

Primary murine microglia were seeded at a density of  $3 \times 10^5$  cells/well DMEM containing 1% P/S, 1% N-2 supplement in a 24-well plate. After 4–6 h the ASO/lipofectamine complexes were added to reach a final concentration between 1 and 300nM. Cells were incubated at 37°C for 72h with the ASOs.

THP-1 cells were seeded at a density of  $6 \times 10^5$  cells/well in RPMI-1640 containing 1% P/S and 50nM PMA in a 24-well plate, which was coated with Poly-L-Lysine (PLL). Again, after 4–6 h, the ASO/lipofectamine complexes were added to reach a final concentration between 1 and 300nM. Cells were incubated at 37°C for 48h with the ASOs.

RNA was extracted from the cells using miRNeasy Micro Kit following the manufacturers protocol (Qiagen). Total RNA was quantified spectrophotometrically, and 500ng was reverse transcribed into complementary DNA using the High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Applied Biosystems™) according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative PCR was performed using the StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The TaqMan gene expression assay and TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) were used for PCR amplification and real-time detection of PCR products. PCRs were performed in 20  $\mu$ L with 2  $\mu$ L of cDNA, 1  $\mu$ L of each taqman probe, 10  $\mu$ L of the master mix, and 6  $\mu$ L of nuclease-free H<sub>2</sub>O with the following temperature profile: 95°C for 10 min and 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 30s. mRNA expression values were normalized to the internal level of 18S expression.

The following probes from LifeTechnologies were used: NLRP3 (Mm00840904\_m1, Hs00918082\_m1), PYCARD (Mm00445747\_g1, Hs01547324\_gH), Caspase-1 (Mm00438023\_m1, Hs00354836\_m1), IL-1 $\beta$  (Mm00434228\_m1, Hs01555410\_m1), TNF $\alpha$  (Mm00443258\_m1, Hs00174128\_m1), CD36 (Mm00432403\_m1, Hs00354519\_m1), CD68 (Mm03047343\_m1, Hs00154355\_m1), TLR2 (Mm00442346\_m1, Hs00610101\_m1), TLR4 (Mm00445273\_m1, Hs00152939\_m1), NOS-2 (Mm00440485\_m1, Hs01075529\_m1), Arginase-1 (Mm00475988\_m1, Hs00163660\_m1), IL-4 (Mm00445259\_m1, Hs00174122\_m1), IL-12 (Mm00434169\_m1, Hs01073447\_m1) and Gasdermin D (Mm00509957\_m1, Hs00986748\_g1).

Analysis of the expression of the genes was performed using StepOne 2.2 software provided by Applied Biosystems.

## 2.10 | Measurement of cytokine secretion

For cytokine secretion experiments, primary murine microglia were seeded at a density of  $5 \times 10^4$  cells/well in DMEM containing 1% P/S, 1% N-2 supplement in a 96-well plate. After 4–6 h, the ASO/lipofectamine complexes were added to reach a final concentration of 30nM. Cells were incubated at 37°C for 72h with the ASOs.

THP-1 cells were seeded at a density of  $8 \times 10^4$  cells/well in RPMI-1640 containing 1% P/S and 50nM PMA in a 96-well plate, which was coated with PLL. Again, after 4–6 h the ASO/lipofectamine complexes were added to reach a final concentration of 30nM. Cells were incubated at 37°C for 48h with the ASOs.

After incubation with the ASOs, cells were primed with 100ng/mL lipopolysaccharide (LPS) (InvivoGen) for 3 h. Subsequently, they were treated with either 10  $\mu$ M nigericin (InvivoGen) for 45min or 5  $\mu$ M A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Bachem) or its buffer controls (DMSO) for 24h. Afterward, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  secretion was measured in cell supernatants using the mouse and human IL-1 $\beta$ /IL-1F2 and TNF- $\alpha$  DuoSet ELISA (R&D Systems) according to the manufacturer's protocols. The reaction was terminated by adding 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the optical density was measured at 450nm with a microplate reader (Infinite M200; Tecan). To determine cytokine concentrations, values were interpolated into the standard curve by linear regression using GraphPad Prism 9 (GraphPad Software).

## 2.11 | Cytotoxicity and cell viability assays

For cytotoxicity experiments, *primary microglia* and *THP-1 cells* were treated as described above. LDH release was measured in 50  $\mu$ L supernatant using a cytotoxicity detection kit (Roche) according to the manufacturer's protocol. The reaction was stopped with 1 N HCl and absorbance was measured at 490 and 680 nm using a microplate reader (Infinite M200; Tecan).

## 2.12 | Immunoblotting

*Primary murine microglia* were seeded at a density of  $1 \times 10^6$  cells/well in serum-free DMEM in a 6-well plate. After 4–6 h, the ASO/lipofectamine complexes at 30 nM were added. Cells were incubated at 37°C for 72 h with the ASOs.

*THP-1 cells* were seeded at a density of  $2 \times 10^6$  cells/well in serum-free RPMI-1640 containing 50 nM PMA in a 6-well plate, which was coated with PLL. Again, after 4–6 h, the ASO/lipofectamine complexes at 30 nM 10X were added. Cells were incubated at 37°C for 48 h with the ASOs.

For inflammasome activation, cells were treated with LPS and nigericin or A $\beta$  as described above. Subsequently, supernatants were collected for protein precipitation. Therefore, 500  $\mu$ L methanol and 125  $\mu$ L chloroform were added to 500  $\mu$ L supernatant and vortexed briefly. After 5 min centrifugation at 15000 g, the upper aqueous phase was removed and 500  $\mu$ L methanol was added to the remainder. Again, samples were vortexed briefly and centrifuged at 15000 g for 5 min. Supernatants were removed and pellets were dried for 20 min at room temperature. The pellets were then resuspended in 20  $\mu$ L 2X loading buffer (106 mM Tris-HCl, 141 mM Tris base, 2% LDS, 10% glycerol, 0.51 mM EDTA (pH 8.5), 360 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT), and 5 mg/mL Orange G) and denatured at 95°C for 5 min in a thermocycler.

For lysate collection, cells were washed with PBS and 150  $\mu$ L 1X ristocetin-induced platelet agglutination (RIPA) buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5% sodium desoxycholate, 1% NP-40, and 0.1% SDS) supplemented with 1X Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail (Cell Signaling Technology) were added for 20 min. Cells were then scraped of the well plate and centrifuged at 21000 g at 4°C for 15 min. Cell lysates were also denatured at 95°C for 5 min in a thermocycler.

Samples were separated on a NuPAGE 4%–12% Bis-Tris Gel (Invitrogen) in NuPAGE MES or MOPS SDS Running Buffer (NP0002). The Trans-Blot Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories) was used to blot the proteins on a 0.2 mm nitrocellulose membrane (Trans-Blot Turbo™ Transfer Pack, Bio-Rad Laboratories). Thereafter, membranes were blocked with 3% fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) (Millipore) in Tris-buffered saline supplemented with Tween-20 (TBST) (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 8.0) for 30 min at RT.

NLRP3 was detected using antibody anti-NLRP3/NALP3 Cryo-2 (AdipoGen, RRID:AB\_2490202), ASC using Anti-Asc AL177 (AdipoGen, RRID:AB\_2490440), caspase-1 using antibodies Casp1 clone 4B4.2.1 (Genentech, gift from Genentech), and anti-caspase-1

(human) Bally-1 (AdipoGen, RRID:AB\_2490257), IL-1 $\beta$  using GTX74034 (Genentech, RRID:AB\_378141), Human IL-1 beta /IL-1F2 Antibody AF-201-NA (R&D Systems, RRID:AB\_354387), and Mouse IL-1 $\beta$ /IL-1F2 AF-401-NA (R&D Systems, RRID:AB\_416684), NOS-2 using antibody 610329 (BD Transduction Laboratories, RRID:AB\_397719) and  $\alpha$ -Tubulin using antibody 62204 (Invitrogen, RRID:AB\_1965960). All primary antibodies were used at a dilution of 1:1000 in 3% BSA in TBST. Primary antibody signal was detected by secondary IRDye IgG (H+L) antibodies (1:10000, LI-COR Biotechnology, RRID:AB\_2687553, RRID:AB\_2651127, RRID:AB\_2687825, RRID:AB\_2651128, RRID:AB\_2650427, RRID:AB\_2814913). Proteins were then visualized with the Odyssey CLx Imaging System (LI-COR Biosciences) and quantified using Image Studio (LI-COR Biosciences).

## 2.13 | Phagocytosis of amyloid- $\beta$

For phagocytosis assay, *THP-1 cells* were seeded and treated with the ASOs in a black 96-well plate as described above. After 48 h of ASO treatment, fresh medium was added to the cells containing 0.25  $\mu$ M TAMRA-A $\beta$  (Eurogentec). After 4 h, medium was removed and absorbance was measured at 540 nm excitation and 585 nm emission using a microplate reader (Infinite M200; Tecan). Subsequently, Trypan blue 0.2% was added to extinguish any extracellular TAMRA signal and absorbance was again measured at 540 nm and 585 nm. Finally, nuclear stain was performed using H33342 and absorbance was measured at 360 nm excitation and 418 nm emission.

## 2.14 | Statistics

Data evaluation was performed using Graph Pad Prism 9 (Graph Pad Software). Data are presented as Mean  $\pm$  SEM. In all displayed diagrams. All data points refer to independent experiments where n indicates an independent cell culture preparation. For grouped datasets, one-way ANOVA was performed followed by a post hoc Tukey test. When only two groups were statistically analyzed, a two-tailed t-test was performed. Kolmogorov–Smirnov normality test was carried out to test whether the values come from a Gaussian distribution. In addition, Grubbs' test (alpha of 0.05) was performed to remove any significant outliers. Levels of significance are indicated as \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01; \*\*\* $p$  < 0.001; \*\*\*\* $p$  < 0.0001. Full statistical reports are provided in Supporting Information (Table S1).

# 3 | RESULTS

## 3.1 | ASOs reduce expression of NLRP3 by murine microglia

To determine the effects of targeted ASOs on the expression of NLRP3, we set out to design NLRP3-targeted ASOs that were likely to bind to NLRP3 mRNA. First, we examined the regions of NLRP3

that were predicted to be in an open, as opposed to folded, conformation based on their minimum free energy prediction (Figure 1a). Focusing on the open regions, we designed four NLRP3-targeting ASOs complementary to different regions of NLRP3 mRNA (Table 1). Native oligonucleotides are very susceptible to degradation by endo- and exonucleases, but various chemical modifications to the backbone can substantially improve oligonucleotide stability (Bennett & Swayze, 2010; Crooke et al., 2017; Patil et al., 2005; Rinaldi & Wood, 2018). To enhance our ASO stability, we used phosphorothioate (PS) modified antisense oligonucleotides containing five 2'-O-(2-methoxy)ethyl-modified nucleotides on the 5'- and 3' ends. Murine microglia were transfected with one of four different ASOs in lipofectamine RNAiMax at concentrations ranging from 0 to 300 nM for 72 h (Figure 1a,b).

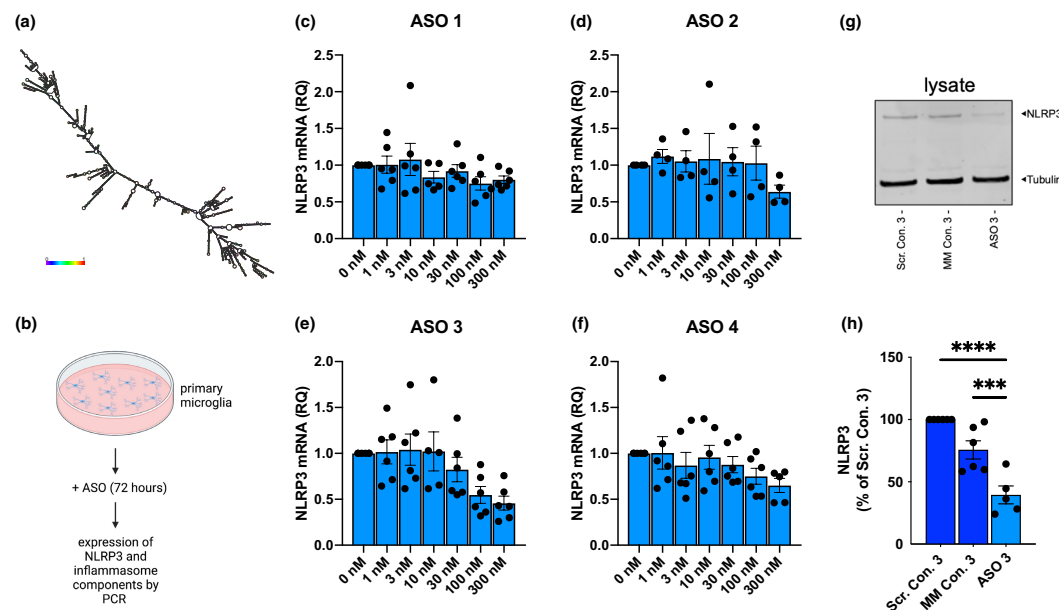
ASO 1 and ASO 2 did not significantly affect the levels of NLRP3 mRNA in microglial cells (Figure 1c,d). In contrast, compared with untreated cells, ASO 3 and ASO 4 reduced mRNA levels in a dose-dependent manner, starting at concentrations of 30 nM (Figure 1e,f). Indeed when treated with ASO 3, NLRP3 mRNA expression was reduced by up to 50% (Figure 1e). At a protein level, ASO 3 reduced the amount of NLRP3 by over 60% (Figure 1g,h). To determine the microglial transfection efficiency, we used labeled dextran as a control, similar to that described before (Raes et al., 2021) (Figure S1a–e). We

combined the dextran-488 with lipofectamine and treated the cells with these complexes for 3 h. Interestingly, 50–82% of microglial cells had taken up the labeled liposomes, as detected by flow cytometry (Figure S1a,b) or by immunocytochemistry (Figure S1e).

In order to account for off-target effects triggered by the ASOs, we designed scrambled (Scr. Con.) and mismatched (MM Con.) sequences of ASO 3 (Gagnon & Corey, 2019). These controls have the same nucleotide composition, but critically, the order of the nucleotides differs. Again, the ASOs were administered at 30 nM for a period of 72 h. Compared with the scrambled and mismatched controls, the NLRP3-targeted ASO 3 significantly reduced the protein levels of NLRP3 in microglia (Figure 1g,h). Together, the data suggest that ASO 3 functions to inhibit the mRNA levels of NLRP3 in a sequence-specific manner. For all subsequent studies in murine cells, ASO 3 was used at a concentration of 30 nM.

### 3.2 | NLRP3-directed ASOs successfully reduce the cleavage of both caspase-1 and IL-1 $\beta$ in primary murine microglia

We next asked whether the ASO-induced downregulation of NLRP3 persists when assembly of the inflammasome is triggered. To this



**FIGURE 1** Development and characterization of murine NLRP3-targeted ASOs. (a) Minimum free energy prediction for mus musculus NLRP3 mRNA secondary structure colored by base-pairing probabilities. (b) Schematic of experimental setup. Microglia were treated with targeted or control ASOs for 72 h and subsequently harvested to detect the levels of NLRP3 mRNA and protein. (c–f) Transcription levels of NLRP3 in primary murine microglia treated with targeted ASOs for 72 h ( $n = 6$  independent biological replicates, Mean  $\pm$  SEM). (g and h) Western blot detection and quantification of NLRP3 in cell lysates of primary murine microglia treated with mouse ASO 3 and matching scrambled and mismatched controls at 30 nM for 72 h ( $n = 6$  independent biological replicates, Mean  $\pm$  SEM, one-way ANOVA, Tukey's post hoc test, \*\*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). (Scr. Con. 3, scrambled control 3; MM Con. 3, mismatched control 3).

end, primary murine microglia cells were primed with lipopolysaccharide (LPS) and subsequently treated with nigericin (Figure 2a), which is an ionophore that permeabilizes the cell membrane to potassium and a well-known NLRP3-inflammasome activator (Mangan et al., 2018). Once the NLRP3 inflammasome is assembled, caspase-1 is recruited and undergoes autocatalysis, thus allowing it to cleave pro-IL-1 $\beta$  into active IL-1 $\beta$  (Heneka et al., 2018; Latz et al., 2013; Martinon et al., 2002). As expected, treatment with LPS and nigericin increased the expression of NLRP3 and pro-IL-1 $\beta$  in the cell lysates compared with an untreated control (Con) (Figure 2b,c, S2d), while the levels of pro-caspase-1 and ASC remained unchanged (Figure 2b, Figures S2a,c). Interestingly, prior treatment with NLRP3-targeted ASO 3, for 72 h, reduced the protein levels of NLRP3 and thus prevented inflammasome assembly (Figure 2b,c). In comparison, cells treated with the scrambled or mismatched ASO control maintained high levels of NLRP3 (Figure 2b-d, Figure S2b).

To determine the extent of inflammasome components released into the extracellular space, the cell supernatants were collected for ELISA and western blot analysis. As expected, all downstream NLRP3 inflammasome components including cleaved-IL-1 $\beta$ , cleaved caspase-1, and ASC were increased in the supernatant after stimulation with LPS and nigericin (Figure 2e-h, Figure S2e-g). Levels of pro-caspase-1 and pro-IL-1 $\beta$  released into the supernatant were reduced in tendency when compared to scrambled and mismatched controls. This phenomenon did not reach the level of statistical significance across all experiments, but nevertheless may indicate that because of the inhibition of the NLRP3 inflammasome, less microglial pyroptosis caused those reduced levels in the supernatant. (Figure 2e, Figure S2f,g). In contrast, NLRP3-directed ASO 3 significantly reduced the release of ASC, cleaved caspase-1, and mature IL-1 $\beta$  in comparison with cells that received the scrambled control (Figure 2e-h). ASO 3 also reduced the production of IL-1 $\beta$  in a concentration-dependent manner (Figure S1h). Compared with a matching scrambled control, 100 nM of targeted ASO treatment decreased extracellular IL-1 $\beta$  by 62%, whereas 30 nM still led to a significant reduction by 43% (Figure S1h). Indeed, the pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  remained unaffected by ASO treatment, confirming that identified changes were NLRP3-pathway specific (Figure S1i). To analyze the effects of ASOs on the viability of primary murine microglia, the release of lactate dehydrogenase (LDH) was measured as an indicator of cell death (Giordano et al., 2011). Compared with the scrambled control, there was no significant difference with ASO treatment, indicating that ASOs are not affecting cell viability (Figure S2j).

### 3.3 | NLRP3 expression is reduced after 48 h of NLRP3-targeted ASO treatment in THP-1 cells

To investigate the effects of targeted ASOs in human immune cells, we designed three ASOs complementary to different, open regions of human NLRP3 mRNA (Table 1, Figure 3a). The ASOs were tested in THP-1 cells, a human monocyte cell line, to model a human

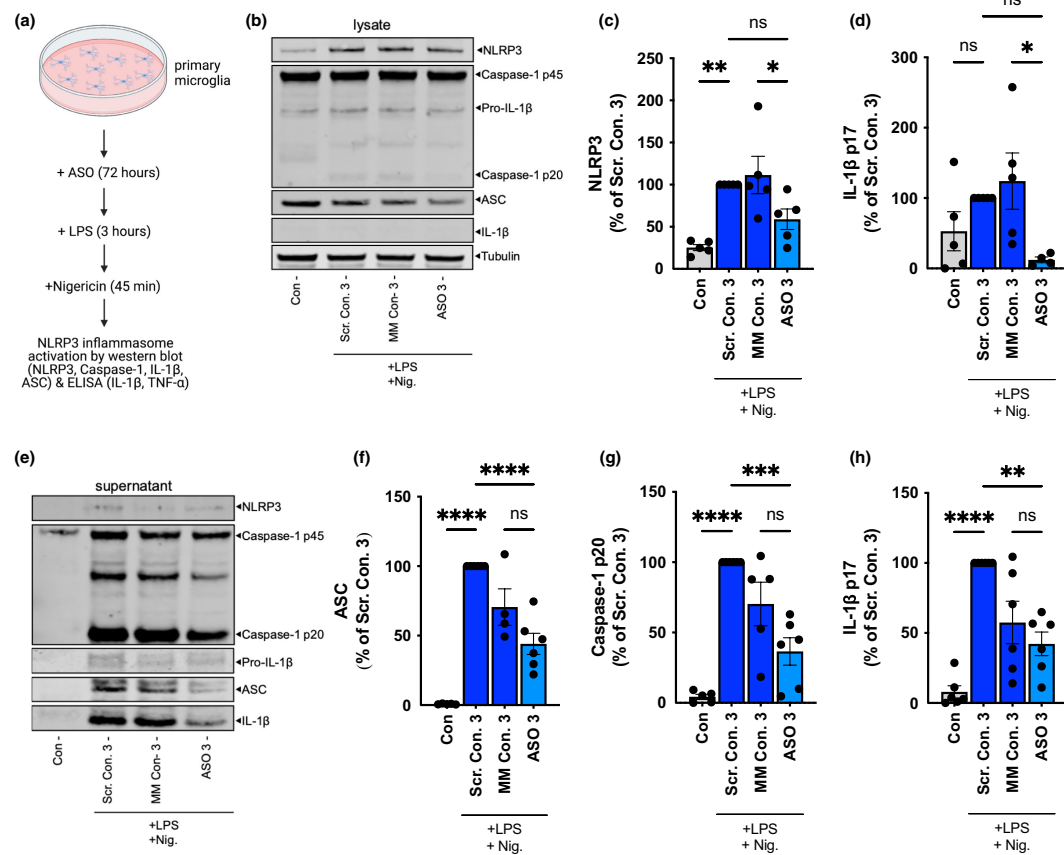
system in vitro. To create an experimental setup more similar to human microglia, the THP-1 cells were differentiated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) into macrophage cells (Balon & Wiatrak, 2021). The human NLRP3-targeted ASOs contained the same chemical modifications to the backbone as the murine-specific ASOs mentioned above in order to provide nuclease resistance. Again, to determine the extent of NLRP3 mRNA degradation, ASOs were administered at multiple concentrations ranging from 0 to 300 nM for 48 h (Figure 3b).

Similar to that observed in microglia, THP-1 cells rapidly took up the liposomes and approximately 50% of cells were transfected after just 3 h (Figure S1c,d). Treatment with all three ASOs led to a concentration-dependent reduction in NLRP3 mRNA expression at 48 h, compared with untreated cells (Figure 3c-e). However, this effect was not observed in ELISAs for the release of IL-1 $\beta$ . Compared with the non-targeted control (NT Con.), which was not specific for any of the three ASOs, only ASO 2 at 100 and 30 nM significantly reduced the IL-1 $\beta$  release that was triggered on exposure to LPS and nigericin (Figure S3a-d). This effect was concentration dependent, as 1 nM of ASO 2 did not affect cytokine release (Figure S3d). Therefore, as in primary microglia, a concentration of 30 nM was used for all subsequent studies. To confirm the effect of ASO 2 on NLRP3 expression, scrambled and mismatched sequences of ASO 2 were designed and used as controls. In comparison with the scrambled control, the NLRP3-targeted ASO 2 significantly reduced NLRP3 levels in cell lysates (Figure 3f,g).

### 3.4 | Targeted ASOs affect downstream activation of the NLRP3 inflammasome in human THP-1 cells after stimulation with LPS and Nigericin

To further assess the effects of NLRP3-directed ASOs in THP-1 cells, the NLRP3 inflammasome was primed and activated by incubating the cells with LPS and nigericin (Figure 4a). Treatment with a NLRP3-targeted ASO for 48 h prior to the immune stimulus significantly reduced NLRP3 inflammasome expression and subsequent caspase-1 cleavage in cell lysates compared with scrambled and mismatched ASO controls (Figure 4b-d). In contrast, levels of pro-caspase-1, ASC, pro-IL-1 $\beta$ , and IL-1 $\beta$  in the lysate remained unaffected (Figure 4b, S3e-h).

Stimulation with LPS and nigericin led to a significant release of all downstream inflammasome components, that is, active IL-1 $\beta$ , cleaved caspase-1, and ASC, into the extracellular space when compared to untreated controls (Figure 4e-h, Figure S3i,k). Interestingly, compared with matching scrambled and mismatched ASO controls, 48 h of targeted ASO treatment prior to inflammasome activation attenuated the release of NLRP3, cleaved caspase-1, and mature IL-1 $\beta$  to the supernatant (Figure 4e-h). In contrast, the amount of pro-caspase-1, pro-IL-1 $\beta$ , and ASC in the supernatant remained unchanged (Figure 4e, Figure S3i,k). These data indicate that NLRP3 mRNA degradation by targeted ASOs also decreases NLRP3-dependent recruitment and activation of caspase-1 in THP-1 cells,

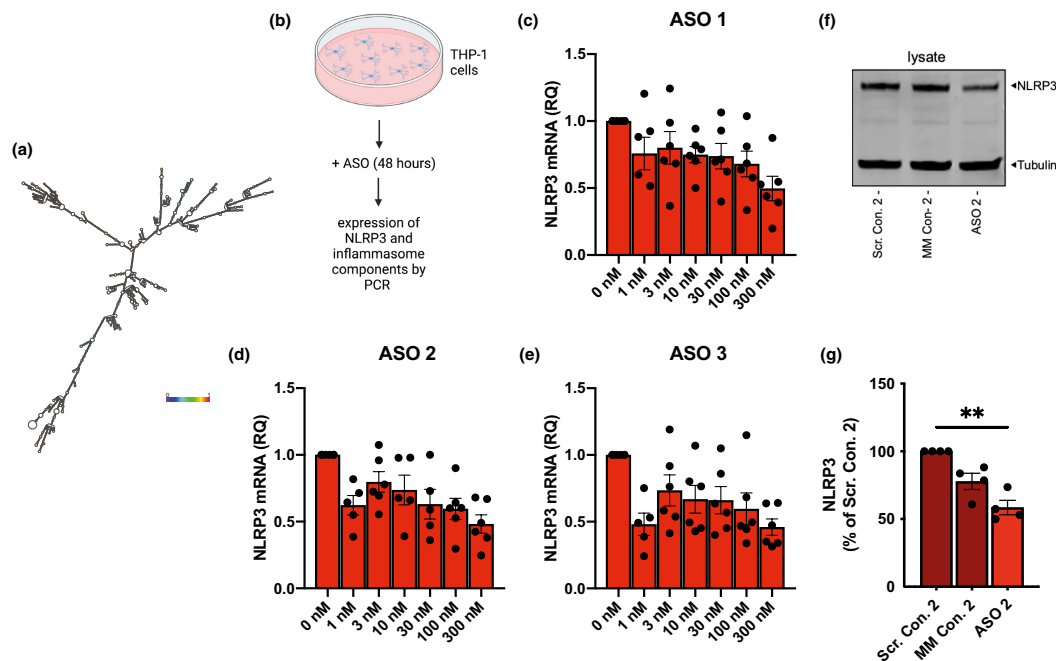


**FIGURE 2** NLRP3-targeted ASOs protect against inflammasome activation and downstream release of cleaved caspase-1 and IL-1β in murine microglia. (a) Schematic of experimental setup. Microglia were treated with targeted or control ASOs for 72 h. Following this, the cells were incubated with LPS (100 ng/mL for 3 h) and then nigericin (10 μM for 45 min) and harvested to detect the levels of NLRP3 inflammasome-related components. (b–d) Western blot detection and quantification of NLRP3, caspase-1, ASC, and IL-1β in cell lysates of primary murine microglia that were treated with mouse ASO 3 and matching scrambled and mismatched controls at 30 nM for 72 h before stimulation with LPS and nigericin ( $n = 5$  independent biological replicates, Mean  $\pm$  SEM, one-way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $^*p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ ). (e–h) Western blot detection and quantification of NLRP3, caspase-1, ASC, and IL-1β in cell supernatants of primary murine microglia treated with mouse ASO 3 and matching scrambled and mismatched controls at 30 nM for 72 h before stimulation with LPS and nigericin ( $n = 6$  independent biological replicates, Mean  $\pm$  SEM, one-way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $^*p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ ,  $^{***}p < 0.001$ ,  $^{****}p < 0.0001$ ). (LPS, lipopolysaccharide; Nig., nigericin; Scr. Con. 3, scrambled control 3; MM Con. 3, mismatched control 3).

and consequently less IL-1β is released. This finding was further confirmed by ELISA, where the targeted ASO treatment reduced the extracellular levels of IL-1β compared with the matching scrambled control at all concentrations examined (Figure S3l). Indeed, 100 nM or 30 nM of NLRP3-targeted ASO 2 treatment significantly decreased extracellular IL-1β by 69% and 64% respectively (Figure S3l). TNF-α was undetectable in cell supernatants, which confirms NLRP3-dependency (Figure S3m). However, based on LDH release, targeted ASO treatment significantly reduced the LPS plus nigericin-induced cell toxicity (Figure S3n).

### 3.5 | ASO treatment significantly reduces IL-1β release in models of Aβ-induced inflammasome stimulation

To further study the protective effect of ASOs in the context of AD, we set up experimental paradigms using Aβ for inflammasome activation. Primary murine microglia and PMA-differentiated THP-1 cells received either murine- or human-specific NLRP3-directed ASOs and respective controls for up to 72 h. Subsequently, cells were primed with LPS for 3 h and inflammasome activation was

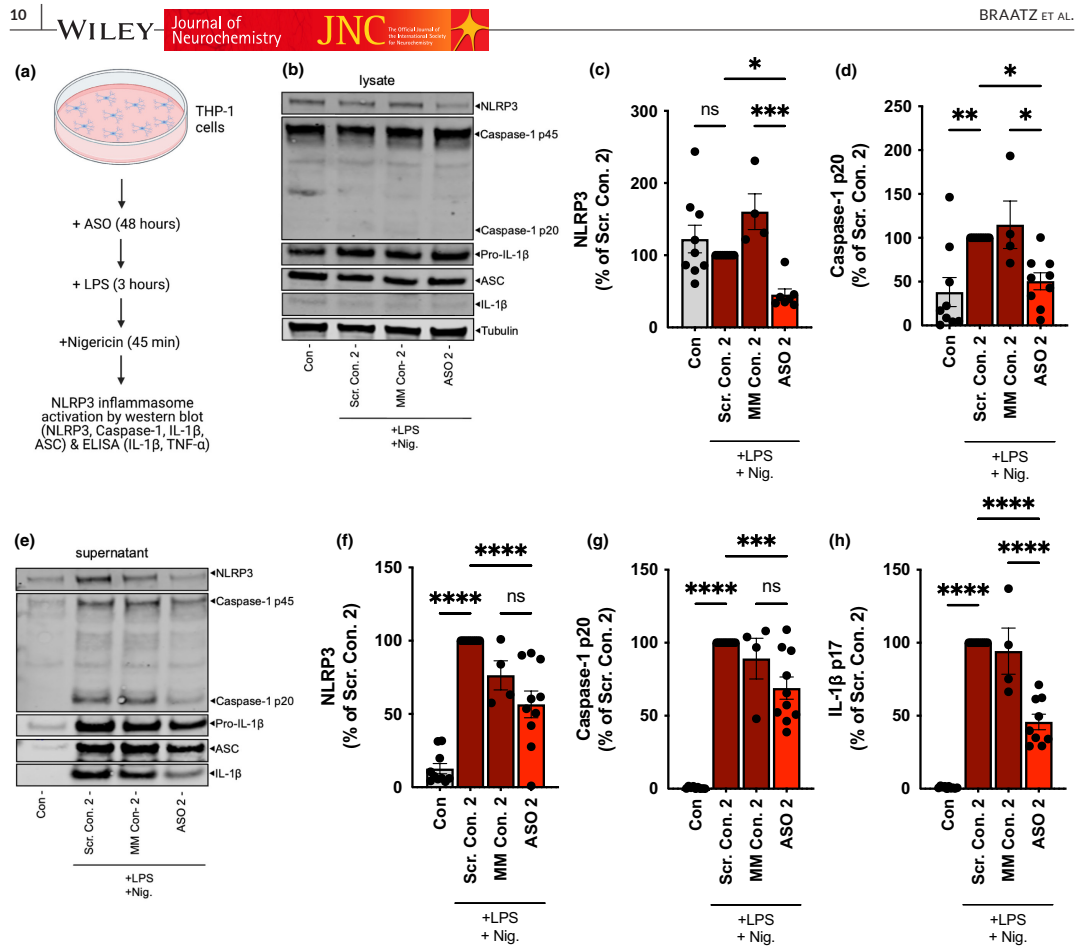


**FIGURE 3** Characterization of human NLRP3-targeted ASOs. (a) Minimum free energy prediction for homo sapiens NLRP3 mRNA secondary structure colored by base-pairing probabilities. (b) Schematic of experimental setup. PMA-differentiated THP-1 cells were treated with targeted or control ASOs for 48 h and subsequently harvested to detect the levels of NLRP3 mRNA and protein. (c–e) Transcription levels of NLRP3 in THP-1 cells treated with targeted ASOs for 48 h ( $n = 6$  independent biological replicates, Mean  $\pm$  SEM one-way ANOVA, Tukey's post hoc test). (f and g) Western blot detection and quantification of NLRP3 in cell lysates of THP-1 cells treated with human ASO 2 and matching scrambled and mismatched controls at 30 nM for 48 h ( $n = 4$  independent biological replicates, Mean  $\pm$  SEM, one-way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $**p < 0.01$ ). (Scr. Con. 2, scrambled control 2; MM Con. 2, mismatched control 2).

triggered by 24 h of A $\beta$  exposure (Figure 5a). In primary murine microglia, A $\beta$  increased IL-1 $\beta$  release compared with the DMSO control, which was used as a solvent (Figure 5b). This phenomenon was prevented by targeted ASO treatment and reduced IL-1 $\beta$  release from primary murine microglia by 68% (Figure 5b). TNF- $\alpha$  and LDH levels remained unaffected (Figure S4a,b). In our human model, NLRP3-targeted ASO 2 was similarly able to attenuate the A $\beta$ -induced IL-1 $\beta$  release in THP-1 cells (Figure 5c). ASO 2 did not affect TNF- $\alpha$  and LDH release from these cells (Figure S4c,d). To further investigate the A $\beta$ -induced recruitment and extracellular release of inflammasome components in primary murine microglia, immunoblot detection was performed. Treatment with a NLRP3-targeted ASO for 72 h decreased NLRP3 levels in cell lysates compared with the scrambled and mismatched control ASOs (Figure 5d,e). In contrast, the expression levels of ASC, pro-caspase-1, and pro-IL-1 $\beta$  remained unchanged (Figure 5d, Figure S4e–g). Additionally, immunoblot detection of cell supernatants revealed a significant reduction in cleaved caspase-1 and mature IL-1 $\beta$  in response to targeted ASO treatment (Figure 5f–i), while the release of NLRP3, ASC, pro-caspase-1, and pro-IL-1 $\beta$  were not affected (Figure 5f,g, Figure S4h–j).

### 3.6 | ASO treatment shifts murine microglia and human THP-1 cells toward an anti-inflammatory state

Microglial activation by pro-inflammatory stimuli causes a wide range of phenotypic changes that include increased expression of the inducible nitric oxide synthase 2 (NOS2). NOS2 is a hallmark of the classically activated pro-inflammatory phenotype, where it has previously been documented in the context of AD and linked to accelerated A $\beta$  aggregation (Kummer et al., 2011). In contrast, arginase-1 represents a marker of an anti-inflammatory microglial phenotype (Heneka et al., 2013). Based on these markers, it has been shown that NLRP3-deficiency in APP/PS1 mice results in a phenotype shift toward an anti-inflammatory state (Heneka et al., 2013). In the present experiments, 72 h of NLRP3-targeted ASO treatment significantly down-regulated NOS2 mRNA levels in murine microglia, whereas arginase-1 mRNA was upregulated compared with untreated controls (Figure 6b,c). A trend toward increased arginase-1 expression was also observed in ASO 3 treated cells, in comparison with scrambled and mismatched ASOs (Figure 6d,e). Similarly, NOS2 mRNA was decreased by NLRP3-targeted ASO treatment in PMA-differentiated



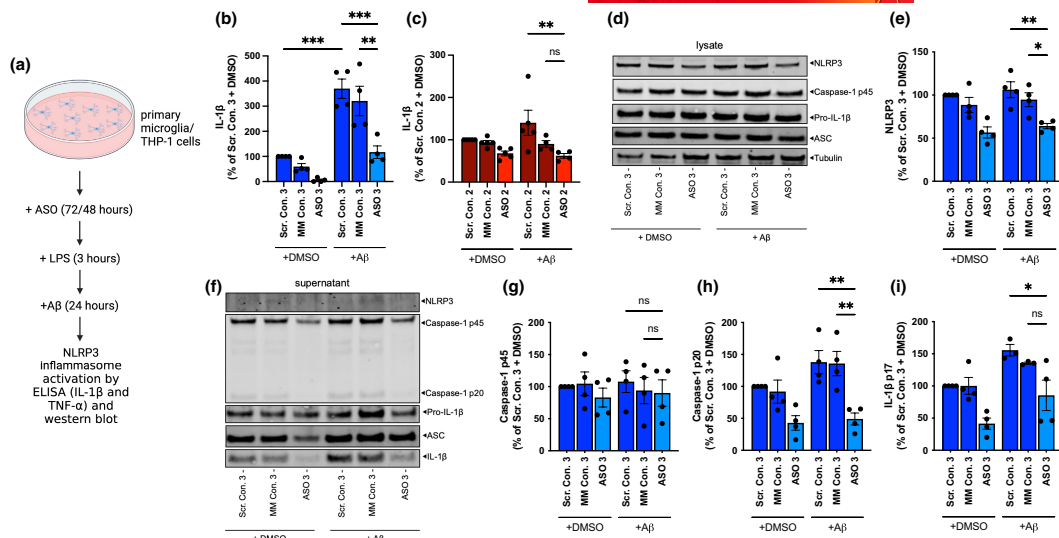
**FIGURE 4** NLRP3-targeted ASOs prevent the LPS and nigericin-induced inflammasome activation in human cells. (a) Schematic of experimental setup. PMA-differentiated THP-1 cells were treated with targeted or control ASOs for 48 h. Following this, the cells were incubated with LPS (100 ng/mL for 3 h) and then nigericin (10  $\mu$ M for 45 min) and harvested to detect the levels of NLRP3 inflammasome-related components. (b–d) Western blot detection and quantification of NLRP3, caspase-1, ASC, and IL-1 $\beta$  in cell lysates of THP-1 cells that were treated with human ASO 2 and matching scrambled and mismatched controls at 30 nM for 48 h before stimulation with LPS and nigericin ( $n = 5$  independent biological replicates, Mean  $\pm$  SEM, one-way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ). (e–h) Western blot detection and quantification of NLRP3, caspase-1, ASC, and IL-1 $\beta$  in cell supernatants of THP-1 cells treated with human ASO 2 and matching scrambled and mismatched controls at 30 nM for 48 h before stimulation with LPS and nigericin ( $n = 6$  independent biological replicates, Mean  $\pm$  SEM, one-way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ,  $****p < 0.0001$ ). (LPS, lipopolysaccharide; Nig., nigericin; Scr. Con. 2, scrambled control 2; MM Con. 2, mismatched control 2).

THP-1 cells, whereas arginase-1 levels were elevated although not significantly (Figure 6g,h). These experiments suggest that NLRP3 inflammasome activation and subsequent release of IL-1 $\beta$  act upstream of NOS2 expression. Consequently, mRNA degradation by NLRP3-directed ASOs reduces the expression of this pro-inflammatory enzyme. We next asked whether the suggested phenotype shift by NLRP3-directed ASOs also modifies microglial clearance capacity. The mRNA levels of CD68, which plays a key role in A $\beta$  phagocytosis, were measured (Daria et al., 2017; Yamanaka et al., 2012). In both models, NLRP3-targeted ASO treatment significantly increased the

amount of CD68 mRNA (Figure 6a,f). This was mirrored by a modest, but significant, increase in phagocytosis of TAMRA-labeled A $\beta$  by ASO 2-treated THP-1 cells (Figure 6i,j).

#### 4 | DISCUSSION

A $\beta$ -triggered activation of the microglial NLRP3 inflammasome is a key driver of AD pathogenesis, where NLRP3 deficiency in APP/PS1 mice almost completely prevented the development of spatial memory



**FIGURE 5** NLRP3-targeted ASOs attenuate Aβ-induced inflammasome activation, reducing IL-1β release. (a) Schematic of experimental setup. Microglia or THP-1 cells were treated with targeted or control ASOs for 72 or 48h, respectively. Following this, the cells were incubated with LPS (100ng/mL for 3 h) and then Amyloid-β (Aβ, 5 μM for 24h). Following this, the cells were harvested to detect the levels of NLRP3 inflammasome-related components. (b) ELISA detection of IL-1β in cell supernatants of primary murine microglia that were treated with mouse ASO 3 and matching scrambled and mismatched controls at 30nM for 72h and then stimulated with LPS and Aβ ( $n = 4$  independent biological replicates, Mean  $\pm$  SEM, one-way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $^*p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ ,  $^{***}p < 0.001$ ). (c) ELISA detection of IL-1β in cell supernatants of THP-1 cells treated with human ASO 2 and matching scrambled and mismatched controls at 30nM for 48h before stimulation with LPS and Aβ ( $n = 4$  independent biological replicates, Mean  $\pm$  SEM, one-way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $^*p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ ). (d–e), Western blot detection and quantification of NLRP3, pro-caspase-1, ASC, and pro-IL-1β in cell lysates of primary murine microglia treated with mouse ASO 3 and matching scrambled and mismatched controls at 30nM for 72h and then stimulated with LPS and Aβ ( $n = 4$  independent biological replicates, Mean  $\pm$  SEM, one-way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $^*p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ ). (f–i) Western blot detection and quantification of NLRP3, caspase-1, ASC, and IL-1β in cell supernatants of primary murine microglia treated with mouse ASO 3 and matching scrambled and mismatched controls at 30nM for 72h and then stimulated with LPS and Aβ ( $n = 4$  independent biological replicates, Mean  $\pm$  SEM, one-way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $^*p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ ). (Aβ, amyloid-β; LPS, lipopolysaccharide; DMSO, dimethyl sulfoxide; Scr. Con. 3, scrambled control 3; MM Con. 3, mismatched control 3; Scr. Con. 2, scrambled control 2; MM Con. 2, mismatched control 2).

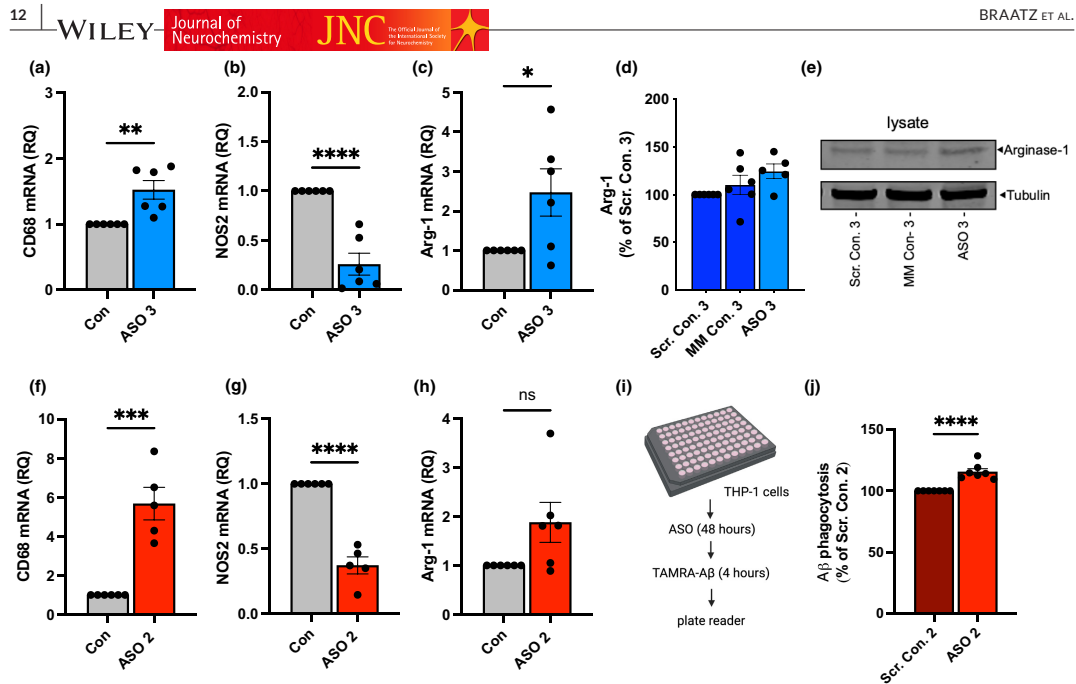
deficits (Heneka et al., 2013). Here, using primary murine microglia cells and human THP-1 cells, we tested whether ASOs would be able to directly target this inflammatory pathway *in vitro* under different protocols of NLRP3 inflammasome stimulation. After 72h of targeted ASO treatment, NLRP3 mRNA degradation was successfully observed in primary murine microglia, and this downregulation persisted even when assembly of the inflammasome was triggered with LPS and nigericin (Pétrilli et al., 2007). Treatment with NLRP3-targeted ASOs resulted in a significant reduction in caspase-1 cleavage and IL-1β maturation, and prevented subsequent extracellular release of IL-1β compared with controls. Together, these data suggest that NLRP3-targeted ASOs *in vitro* can mimic the overall effects of a genetic NLRP3 knockout.

To further confirm the effects of NLRP3-targeted ASOs in the context of AD, we subsequently tested them using *in vitro* models of Aβ-induced inflammasome stimulation (Schnaars et al., 2013). In primary murine microglia, the Aβ-induced NLRP3 inflammasome activation and subsequent release of cleaved caspase-1 and mature IL-1β were prevented by targeted ASO treatment. In the human THP-1

cell model, reduced release of mature IL-1β was also observed with NLRP3-ASOs. Together, these data indicate that NLRP3 mRNA degradation by targeted ASO treatment reduces microglial inflammation *in vitro* models.

As the progression of AD is not only based on Aβ pathology, the ASO-mediated effects might be because of other mechanisms not described here. Inflammasome-dependent formation and extracellular release of ASC specks also results in spreading of Aβ pathology in APP/PS1 mice (Venegas et al., 2017). In our *in vitro* murine model, NLRP3-targeted ASO treatment was shown to suppress the extracellular release of ASC specks (Figure 2f), which may also reduce or even prevent the subsequent ASC-dependent progression of Aβ plaque formation. Furthermore, deficiency of NLRP3 in Tau22 mice reduces tau hyperphosphorylation and aggregation by regulating tau kinases and phosphatases (Ising et al., 2019). Therefore, tau pathology could also potentially benefit from a NLRP3-targeted ASO therapy.

Previous studies have shown that NLRP3-deficiency in mice results in a microglial phenotype shift toward an anti-inflammatory



**FIGURE 6** Transcriptional levels of anti-inflammatory and phagocytic genes increase after exposure to NLRP3-targeted ASOs. (a–c) Transcription levels of CD68, NOS2, and Arg-1 in primary murine microglia after 72h of targeted ASO treatment at 30nM ( $n = 6$  independent biological replicates, Mean  $\pm$  SEM, unpaired t-test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). (d and e) Western blot detection and quantification of arginase-1 in cell lysates of primary murine microglia that were treated with mouse ASO 3 and matching scrambled and mismatched controls at 30nM for 72h ( $n = 6$  independent biological replicates, Mean  $\pm$  SEM). (f–h) Transcription levels of CD68, NOS2, and Arg-1 in THP-1 cells after 48h of targeted ASO treatment at 30nM ( $n = 6$  independent biological replicates, Mean  $\pm$  SEM, unpaired t-test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). (i) Experimental setup phagocytosis assay. (j) Phagocytosis of TAMRA-labeled Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) by THP-1 cells that were treated with human ASO2 or a matching scrambled control at 30nM for 48h ( $n = 7$  independent biological replicates, Mean  $\pm$  SEM, unpaired t-test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). (NOS2, nitric oxide synthase 2; Arg-1, arginase-1; Scr. Con. 3, scrambled control 3; MM Con. 3, mismatched control 3; Scr. Con. 2, scrambled control 2).

state (Heneka et al., 2013). Microglial immune activation is associated with an increased release of pro-inflammatory cytokines including TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, and IL-18. In contrast, the anti-inflammatory phenotypes of microglia are associated with the release of IL-4, IL-10, IL-13, and TGF- $\beta$ , and an increased phagocytic capacity (Heneka, Carson, et al., 2015; Mantovani et al., 2004). Our work reveals that NLRP3-targeted ASO treatment in primary murine microglia and human THP-1 cells can shift the cellular phenotypes toward a more anti-inflammatory state, as reflected by a downregulation of NOS2 and upregulation of arginase-1 mRNA levels.

In the brain, microglial cells play a major role in the detection, internalization, and degradation of A $\beta$  (Lee & Landreth, 2010). This process is mediated by cell-surface receptors including CD36, CD14,  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 integrin, CD47, scavenger, and toll-like receptors (TLRs) (Bamberger et al., 2003; Heneka, Carson, et al., 2015; Liu et al., 2005; Paresce et al., 1996). However, binding of A $\beta$  to CD36, TLR4, and TLR6 activates microglia, leading to the release of pro-inflammatory cytokines (El Khoury et al., 2003; Stewart et al., 2010). A co-culturing model of brain slices from APP/PS1 and wild-type

mice has highlighted the role of CD68-positive microglial cells that clustered around amyloid plaques, and reduced the amyloid burden by phagocytosis of fibrillar A $\beta$  deposits (Daria et al., 2017). Indeed, we were able to show that NLRP3-targeted ASO treatment increased the phagocytic profile of murine microglia or differentiated THP-1 cells, which was investigated using the mRNA levels of CD68 as a cellular marker. In both models, NLRP3-targeted ASO treatment significantly increased CD68 mRNA (Figure 6a,f). In the THP-1 cells, these mRNA changes were paralleled by a modest, but consistent, increase in A $\beta$  phagocytosis (Figure 6j).

If the ASO-induced NLRP3 reduction can maintain increased A $\beta$  clearance over longer periods of time, this may be harnessed to limit A $\beta$  pathology in vivo. ASO-based approaches have already been approved for clinical use by both the European Medicines Agency (EMA) and the US Food and Drug Administration (FDA) for two drugs—nusinersen and inotersen—to treat the neurodegenerative diseases spinal muscular atrophy (SMA) and familial amyloid polyneuropathy and cardiomyopathy. These two ASOs contain the same chemical backbone modifications as used in our current study,

so the safety of such 'gapmer' oligonucleotides in patients is already well established (Bennett et al., 2021; Rinaldi & Wood, 2018). Nevertheless, there is still potential to improve the efficacy of the ASOs used in the present experiments. Key factors affecting ASO efficiency include degradation by nucleases, poor cellular uptake, and mRNA binding affinity (Shen & Corey, 2018). To improve these, other chemical modifications of the backbone may be required, such as phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMO), which are resistant to nuclease and protease degradation (Bennett et al., 2021; Rinaldi & Wood, 2018). ASOs can also be designed to have an intrinsic enzymatic activity and directly cleave the target RNA after hybridization or they can prevent mRNA translation by altering ribosome recruitment (Rinaldi & Wood, 2018). In addition to these, passing the blood-brain barrier remains a major challenge of many therapies for neurodegenerative diseases (Mangan et al., 2018), but as shown for nusinersen, intrathecal injection of ASOs is a promising and effective route of administration (Haché et al., 2016).

The NLRP3 inflammasome acts as a key driver of chronic inflammatory conditions in a variety of diseases besides AD. These can be classified in four broad categories: first, genetic NLRP3-dependent autoinflammatory diseases; second, diseases driven by metabolic dysfunction; third, those driven by formation of crystals or aggregates; and fourth, fibrosis following either acute tissue injury or chronic inflammation (Mangan et al., 2018). These diseases include atherosclerosis, non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis (NASH), type 1 diabetes, myocardial infarction, and stroke (Düwell et al., 2010; Ito et al., 2015; Sandanger et al., 2013; Wree et al., 2014), and are among the top 10 causes of death worldwide (WHO, 2020). For all these conditions, it has been shown that NLRP3 deficiency or inhibition leads to an improvement in the respective pathology (Hu et al., 2015; Mridha et al., 2017; van der Heijden et al., 2017; van Hout et al., 2017; Yang et al., 2014). Together, our data shows that NLRP3-directed ASOs successfully suppresses the mRNA and protein levels of NLRP3, thus preventing assembly of the NLRP3 inflammasome and subsequent pro-inflammatory reactions. ASOs thus represent a fundamentally novel therapeutic strategy, not only for AD, but for multiple diseases associated with the NLRP3 inflammasome.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

R.M.M. and M.T.H. contributed to the conceptualization and supervision. C.B., R.M.M., and M.T.H. contributed to the methodology. R.M.M. and C.B. contributed to the ASO design. C.B., M.P.K., K.A.R., M.G.d.F., A.G., S.S., and R.M.M. contributed to the investigation. C.B. and R.M.M. analyzed the data. C.B. and M.T.H. contributed to the writing—original draft. R.M.M. contributed to the writing—review and editing. R.M.M., M.T.H., C.B., and M.G.d.F. contributed to the funding acquisition.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank I. Rácz for help with laboratory administration and S. Opitz and F. Santarelli for technical assistance. This work was funded by Deutscher Akademischer Austauschdienst, (Grant / Award Number: 'scholarship') Alzheimer Forschung Initiative, (Grant / Award Number: '20043') Deutsche Forschungsgemeinschaft, (Grant / Award Number: 'EXC2151 – 390873048') BONFOR research commission of the medical faculty

of the University of Bonn, (Grant / Award Number: '2021-4-06'). Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

#### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

MTH is a former Editor for the Journal of Neurochemistry, and a clinical advisory board member at IFM Therapeutics, scientific advisory board member at Alector, honoraria for oral presentations from Pfizer, Novartis, Roche, Abbvie, NovoNordisk and Biogen. All other authors declare that they have no competing interests.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

#### ORCID

Charlotte Braatz  <https://orcid.org/0000-0001-8490-5322>

Kishore Aravind Ravichandran  <https://orcid.org/0000-0002-2429-5988>

Matheus Garcia de Fragas  <https://orcid.org/0000-0002-5854-724X>

Angelika Griep  <https://orcid.org/0000-0003-2568-9222>

Róisín M. McManus  <https://orcid.org/0000-0002-6896-0302>

Michael T. Heneka  <https://orcid.org/0000-0003-4996-1630>

#### REFERENCES

- Andreeva, L., David, L., Rawson, S., Shen, C., Pasricha, T., Pelegrin, P., & Wu, H. (2021). NLRP3 cages revealed by full-length mouse NLRP3 structure control pathway activation. *Cell*, 184(26), 6299–6312. e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.11.011>
- Balon, K., & Wiatrak, B. (2021). PC12 and THP-1 cell lines as neuronal and microglia model in neurobiological research. *Applied Sciences*, 11(9), 3729. <https://doi.org/10.3390/app11093729>
- Bamberger, M. E., Harris, M. E., McDonald, D. R., Husemann, J., & Landreth, G. E. (2003). A cell surface receptor complex for Fibrillar  $\beta$ -amyloid mediates microglial activation. *The Journal of Neuroscience*, 23(7), 2665–2674. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-07-02665.2003>
- Bennett, C. F., Kordasiewicz, H. B., & Cleveland, D. W. (2021). Antisense drugs make sense for neurological diseases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 61(1), 831–852. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010919-023738>
- Bennett, C. F., & Swayze, E. E. (2010). RNA targeting therapeutics: Molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50(1), 259–293. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox.010909.105654>
- Boucher, D., Monteleone, M., Coll, R. C., Chen, K. W., Ross, C. M., Teo, J. L., Gomez, G. A., Holley, C. L., Bierschen, D., Stacey, K. J., Yap, A. S., Bezbradica, J. S., & Schroder, K. (2018). Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *Journal of Experimental Medicine*, 215(3), 827–840. <https://doi.org/10.1084/jem.20172222>
- Crooke, S. T., Wang, S., Vickers, T. A., Shen, W., & Liang, X. (2017). Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides. *Nature Biotechnology*, 35(3), 230–237. <https://doi.org/10.1038/nbt.3779>
- Daria, A., Colombo, A., Llovera, G., Hampel, H., Willem, M., Liesz, A., Haass, C., & Tahirovic, S. (2017). Young microglia restore amyloid plaque clearance of aged microglia. *The EMBO Journal*, 36(5), 583–603. <https://doi.org/10.15252/embj.201694591>

- DeVos, S. L., Miller, R. L., Schoch, K. M., Holmes, B. B., Kebodeaux, C. S., Wegener, A. J., Chen, G., Shen, T., Tran, H., Nichols, B., Zanardi, T. A., Kordasiewicz, H. B., Swayze, E. E., Bennett, C. F., Diamond, M. I., & Miller, T. M. (2017). Tau reduction prevents neuronal loss and reverses pathological tau deposition and seeding in mice with tauopathy. *Science Translational Medicine*, 9(374), eaag0481. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag0481>
- Dinarello, C. A., Simon, A., & van der Meer, J. W. M. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(8), 633–652. <https://doi.org/10.1038/nrd3800>
- Duewell, P., Kono, H., Rayner, K. J., Sirois, C. M., Vladimer, G., Bauernfeind, F. G., Abela, G. S., Franchi, L., Nuñez, G., Schnurr, M., Espevik, T., Lien, E., Fitzgerald, K. A., Rock, K. L., Moore, K. J., Wright, S. D., Hornung, V., & Latz, E. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, 464(7293), 1357–1361. <https://doi.org/10.1038/nature08938>
- El Khoury, J. B., Moore, K. J., Means, T. K., Leung, J., Terada, K., Toft, M., Freeman, M. W., & Luster, A. D. (2003). CD36 mediates the innate host response to  $\beta$ -amyloid. *Journal of Experimental Medicine*, 197(12), 1657–1666. <https://doi.org/10.1084/jem.20021546>
- Gagnon, K. T., & Corey, D. R. (2019). Guidelines for experiments using antisense oligonucleotides and double-stranded RNAs. *Nucleic Acid Therapeutics*, 29(3), 116–122. <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0772>
- Gauthier, S., Rosa-Neto, P., Morais, J. A., & Webster, C. (2021). *World Alzheimer report 2021: Journey through the diagnosis of dementia*. Alzheimer's Disease International. <https://www.alzint.org/u/World-Alzheimer-Report-2021.pdf>
- Giordano, G., Hong, S., Faustman, E. M., & Costa, L. G. (2011). Measurements of cell death in neuronal and glial cells. In L. G. Costa, G. Giordano, & M. Guizzetti (Eds.), (Hrsg.) *Vitro Neurotoxicology* (Vol. Bd. 758, pp. 171–178). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-170-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-170-3_11)
- Haché, M., Swoboda, K. J., Sethna, N., Farrow-Gillespie, A., Khandji, A., Xia, S., & Bishop, K. M. (2016). Intrathecal injections in children with spinal muscular atrophy: Nusinersen clinical trial experience. *Journal of Child Neurology*, 31(7), 899–906. <https://doi.org/10.1177/0883073815627882>
- Halle, A., Hornung, V., Petzold, G. C., Stewart, C. R., Monks, B. G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K. A., Latz, E., Moore, K. J., & Golenbock, D. T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- $\beta$ . *Nature Immunology*, 9(8), Art. 8–Art. 865. <https://doi.org/10.1038/ni.1636>
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. E., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14(4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Heneka, M. T., Golenbock, D. T., & Latz, E. (2015). Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nature Immunology*, 16(3), 229–236. <https://doi.org/10.1038/ni.3102>
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., & Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Immunology*, 14(7), 7. <https://doi.org/10.1038/nri3705>
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T.-C., Gelpi, E., Halle, A., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*, 493(7434), 678. <https://doi.org/10.1038/nature11729>
- Heneka, M. T., McManus, R. M., & Latz, E. (2018). Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(10), 610–621. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0055-7>
- Hochheiser, I. V., Pils, M., Hagelueken, G., Moeking, J., Marleaux, M., Brinkschulte, R., Latz, E., Engel, C., & Geyer, M. (2022). Structure of the NLRP3 decamer bound to the cytokine release inhibitor CRID3. *Nature*, 604(7904), 184–189. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04467-w>
- Hu, C., Ding, H., Li, Y., Pearson, J. A., Zhang, X., Flavell, R. A., Wong, F. S., & Wen, L. (2015). NLRP3 deficiency protects from type 1 diabetes through the regulation of chemotaxis into the pancreatic islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 11318–11323. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513509112>
- Ising, C., Venegas, C., Zhang, S., Scheiblich, H., Schmidt, S. V., Vieira-Saecker, A., Schwartz, S., Albasset, S., McManus, R. M., Tejera, D., Griep, A., Santarelli, F., Brosseron, F., Opitz, S., Stunden, J., Merten, M., Kaye, R., Golenbock, D. T., Blum, D., ... Heneka, M. T. (2019). NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. *Nature*, 575(7784), 669–673. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1769-z>
- Ito, M., Shichita, T., Okada, M., Komine, R., Noguchi, Y., Yoshimura, A., & Morita, R. (2015). Bruton's tyrosine kinase is essential for NLRP3 inflammasome activation and contributes to ischaemic brain injury. *Nature Communications*, 6(1), 7360. <https://doi.org/10.1038/ncomms8360>
- Jankowsky, J. L., Slunt, H. H., Ratovitski, T., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., & Borchelt, D. R. (2001). Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: A comparison of strategies. *Biomolecular Engineering*, 17(6), 157–165. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(01\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(01)00067-3)
- Kummer, M. P., Hermes, M., Delekarte, A., Hammerschmidt, T., Kumar, S., Terwel, D., Walter, J., Pape, H.-C., König, S., Roeder, S., Jessen, F., Klockgether, T., Korte, M., & Heneka, M. T. (2011). Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid  $\beta$  aggregation and plaque formation. *Neuron*, 71(5), 833–844. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.001>
- Latz, E., Xiao, T. S., & Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews Immunology*, 13(6), 397–411. <https://doi.org/10.1038/nri3452>
- Lee, C. Y. D., & Landreth, G. E. (2010). The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *Journal of Neural Transmission*, 117(8), 949–960. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0433-4>
- Liu, Y., Walter, S., Stagi, M., Cherny, D., Letiembre, M., Schulz-Schaeffer, W., Heine, H., Penke, B., Neumann, H., & Fassbender, K. (2005). LPS receptor (CD14): A receptor for phagocytosis of Alzheimer's amyloid peptide. *Brain*, 128(8), 1778–1789. <https://doi.org/10.1093/brain/awh531>
- Lučičunaitė, A., McManus, R. M., Jankunec, M., Rácz, I., Dansokho, C., Dalgėdienė, I., Schwartz, S., Brosseron, F., & Heneka, M. T. (2020). Soluble A $\beta$  oligomers and protofibrils induce NLRP3 inflammasome activation in microglia. *Journal of Neurochemistry*, 155(6), 650–661. <https://doi.org/10.1111/jnc.14945>
- Mangan, M. S. J., Olhava, E. J., Roush, W. R., Seidel, H. M., Glick, G. D., & Latz, E. (2018). Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(8), 588–606. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.97>
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25(12), 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
- Martinon, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The inflammasome. *Molecular Cell*, 10(2), 417–426. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00599-3)
- Mawuenyega, K. G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J. C., Yarasheski, K. E., & Bateman, R. J. (2010). Decreased clearance of CNS  $\beta$ -amyloid in Alzheimer's disease. *Science*, 330(6012), 1774. <https://doi.org/10.1126/science.1197623>
- Mridha, A. R., Wree, A., Robertson, A. A. B., Yeh, M. M., Johnson, C. D., Van Rooyen, D. M., Haczezy, F., Teoh, N. C.-H., Savard, C., Ioannou, G. N., Masters, S. L., Schroder, K., Cooper, M. A., Feldstein, A. E., & Farrell, G. C. (2017). NLRP3 inflammasome blockade reduces

- liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice. *Journal of Hepatology*, 66(5), 1037–1046. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.01.022>
- Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Tremblay, M. E., Aguzzi, A., Ajami, B., Amit, I., Audinat, E., Bechmann, I., Bennett, M., Bennett, F., Bessis, A., Biber, K., Bilbo, S., Blurton-Jones, M., Boddeke, E., Brites, D., Br ne, B., Brown, G. C., ... Wyss-Coray, T. (2022). Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*, 110, 3458–3483.
- Paresce, D. M., Ghosh, R. N., & Maxfield, F. R. (1996). Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid  $\beta$ -protein via a scavenger receptor. *Neuron*, 17(3), 553–565. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80187-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80187-7)
- Patil, S. D., Rhodes, D. G., & Burgess, D. J. (2005). DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: A comprehensive review. *The AAPS Journal*, 7(1), E61–E77. <https://doi.org/10.1208/aapsj070109>
- Pétrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., & Tschopp, J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death & Differentiation*, 14(9), 1583–1589. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402195>
- Raes, L., Pille, M., Harizaj, A., Goetgeluk, G., Van Hoeck, J., Stremersch, S., Fraire, J. C., Brans, T., de Jong, O. G., Maas-Bakker, R., Mastrobattista, E., Vader, P., De Smedt, S. C., Vandekerckhove, B., Raemdonck, K., & Braeckmans, K. (2021). Cas9 RNP transfection by vapor nanobubble photoporation for ex vivo cell engineering. *Molecular Therapy—Nucleic Acids*, 25, 696–707. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.08.014>
- Rathinam, V. A. K., Zhao, Y., & Shao, F. (2019). Innate immunity to intracellular LPS. *Nature Immunology*, 20(5), 527–533. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0368-3>
- Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 640–651. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024>
- Rinaldi, C., & Wood, M. J. A. (2018). Antisense oligonucleotides: The next frontier for treatment of neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*, 14(1), 1. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.148>
- Sandanger, O., Ranheim, T., Vinge, L. E., Bliks en, M., Alfsnes, K., Finsen, A. V., Dahl, C. P., Askevold, E. T., Florholmen, G., Christensen, G., Fitzgerald, K. A., Lien, E., Valen, G., Espevik, T., Aukrust, P., & Yndestad, A. (2013). The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 99(1), 164–174. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt091>
- Scharner, J., & Aznarez, I. (2021). Clinical applications of single-stranded oligonucleotides: Current landscape of approved and in-development therapeutics. *Molecular Therapy*, 29(2), 540–554. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.12.022>
- Schnaars, M., Beckert, H., & Halle, A. (2013). Assessing  $\beta$ -amyloid-induced NLRP3 Inflammasome activation in primary microglia. In De Nardo C. M. & E. Latz (Hrsg.), *The Inflammasome* (Bd. 1040, 1–8). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-523-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-523-1_1)
- Schoch, K. M., DeVos, S. L., Miller, R. L., Chun, S. J., Norrbom, M., Wozniak, D. F., Dawson, H. N., Bennett, C. F., Rigo, F., & Miller, T. M. (2016). Increased 4R-tau induces pathological changes in a human-tau mouse model. *Neuron*, 90(5), 941–947. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.042>
- Shen, X., & Corey, D. R. (2018). Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Research*, 46(4), 1584–1600. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1239>
- Stewart, C. R., Stuart, L. M., Wilkinson, K., van Gils, J. M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K. J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W. A., Lacy-Hulbert, A., Khoury, J. E., Golenbock, D. T., & Moore, K. J. (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature Immunology*, 11(2), 155–161. <https://doi.org/10.1038/ni.1836>
- Sud, R., Geller, E. T., & Schellenberg, G. D. (2014). Antisense-mediated exon skipping decreases tau protein expression: A potential therapy for Tauopathies. *Molecular Therapy—Nucleic Acids*, 3, e180. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.30>
- van der Heijden, T., Kritikou, E., Venema, W., van Duijn, J., van Santbrink, P. J., Sl tter, B., Foks, A. C., Bot, I., & Kuiper, J. (2017). NLRP3 Inflammasome Inhibition by MCC950 Reduces Atherosclerotic Lesion Development in Apolipoprotein E-Deficient Mice—Brief Report. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(8), 1457–1461. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309575>
- van Hout, G. P. J., Bosch, L., Ellenbroek, G. H. J. M., de Haan, J. J., van Solinge, W. W., Cooper, M. A., Arslan, F., de Jager, S. C. A., Robertson, A. A. B., Pasterkamp, G., & Hoefer, I. E. (2017). The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces infarct size and preserves cardiac function in a pig model of myocardial infarction. *European Heart Journal*, 38(11), 828–836. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw247>
- Venegas, C., Kumar, S., Franklin, B. S., Dierkes, T., Brinkschulte, R., Tejera, D., Vieira-Saecker, A., Schwartz, S., Santarelli, F., Kummer, M. P., Griep, A., Gelpi, E., Beilharz, M., Riedel, D., Golenbock, D. T., Geyer, M., Walter, J., Latz, E., & Heneka, M. T. (2017). Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. *Nature*, 552(7685), 355–361. <https://doi.org/10.1038/nature25158>
- Weiner, H. L., & Frenkel, D. (2006). Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nature Reviews Immunology*, 6(5), 5. <https://doi.org/10.1038/nri1843>
- WHO. (2020). *The top 10 causes of death*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- Wree, A., McGeough, M. D., Peña, C. A., Schlattjan, M., Li, H., Inzaugarat, M. E., Messer, K., Canbay, A., Hoffman, H. M., & Feldstein, A. E. (2014). NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *Journal of Molecular Medicine*, 92(10), 1069–1082. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1170-1>
- Yamanaka, M., Ishikawa, T., Griep, A., Axt, D., Kummer, M. P., & Heneka, M. T. (2012). PPAR/RXR-induced and CD36-mediated microglial amyloid-phagocytosis results in cognitive improvement in amyloid precursor protein/Presenilin 1 mice. *Journal of Neuroscience*, 32(48), 17321–17331. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1569-12.2012>
- Yang, F., Wang, Z., Wei, X., Han, H., Meng, X., Zhang, Y., Shi, W., Li, F., Xin, T., Pang, Q., & Yi, F. (2014). NLRP3 deficiency ameliorates neurovascular damage in experimental ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 34(4), 660–667. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.242>

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Braatz, C., Komes, M. P., Ravichandran, K. A., de Fragas, M. G., Griep, A., Schwartz, S., McManus, R. M., & Heneka, M. T. (2023). NLRP3-directed antisense oligonucleotides reduce microglial immunoactivities in vitro. *Journal of Neurochemistry*, 00, 1–15. <https://doi.org/10.1111/jnc.15778>

### **3. Danksagung**

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Michael T. Heneka, meinen Dank aussprechen. Seine umfassende und zuverlässige fachliche Betreuung sowie persönliche Unterstützung wusste ich sehr zu schätzen. Seine Leidenschaft für die Forschung, seine langjährige Erfahrung und Expertise empfand ich stets als äußerst inspirierend.

Des Weiteren möchte ich den Kolleginnen und Kollegen aus den Arbeitsgruppen um Prof. Dr. med. Michael T. Heneka am Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, am Institut für Angeborene Immunität am Universitätsklinikum Bonn sowie am Luxembourg Centre for Systems Biomedicine für die konstruktive Zusammenarbeit und ihre Unterstützung sowohl während meiner experimentellen Arbeit als auch bei der Publikation der Forschungsergebnisse danken.

Ein besonderer Dank gilt auch der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn für die finanzielle Förderung meiner Forschungsarbeit durch das BONFOR SciMed-Promotionsstipendium.

Abschließend möchte ich meiner Familie meinen tiefsten Dank aussprechen, die mir mein Medizinstudium ermöglicht hat. Ihr Vertrauen und ihre Unterstützung haben mich stets ermutigt und gestärkt.