

Immunostimulation of Microglia by ASC Specks and ASC Specks Amyloid β Composites

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Lea Lydia Magdalena Friker

aus Bonn

2021

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael T. Heneka
2. Gutachter: Prof. Dr. Bernardo S. Franklin

Tag der Mündlichen Prüfung: 06. Oktober 2021

Aus der Klinik für Neurodegenerative Erkrankungen und Gerontopsychiatrie
Direktor Neurodegeneration: Prof. Dr. Michael T. Heneka
Direktorin Gerontopsychiatrie: Prof. Dr. Anja Schneider

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Deutsche Zusammenfassung	7
1.1	Einleitung	7
1.2	Material und Methoden	9
1.3	Ergebnisse	15
1.4	Diskussion	20
1.5	Zusammenfassung	25
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	26
2.	Veröffentlichung	36
	Summary	37
	Introduction	37
	Results	38
	Discussion	43
	Conclusions	46
	References	47
	Materials and Methods	47
	Supplemental Information	55
3.	Danksagung	57

Abkürzungsverzeichnis

A β	β -Amyloid
AD	Alzheimer-Krankheit, engl.: <i>Alzheimer's disease</i>
AIM2	Engl.: <i>absent in melanoma 2</i>
ANOVA	Varianzanalyse, engl.: <i>analysis of variance</i>
ASC	Engl.: <i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATP	Adenosintriphosphat
CARD	Engl.: <i>caspase (activation and) recruitment domain</i>
CD36	Engl.: <i>cluster of differentiation 36</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Engl.: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAM	Fluorescein Amidite
GSDMD	Gasdermin D
IL	Interleukin
Ig / IgG	Immunglobulin / Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
NLR4	Engl.: <i>NOD-like receptor family CARD domain-containing protein 4</i>
NLRP3	Engl.: <i>NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3</i>
NOD	Engl.: <i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PYD	Pyrin-Domäne
RIPA	Engl.: <i>radioimmunoprecipitation assay</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TREM2	Engl.: <i>triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
UT	Unbehandelte Kontrollgruppe, engl.: <i>untreated control</i>
WT	Wildtyp

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Auf Grund des demographischen Wandels gewinnen Erkrankungen der älteren Bevölkerung, zu denen auch die meisten neurodegenerativen Erkrankungen zählen, immer mehr an Bedeutung (Hou et al., 2019). Das Verstehen ihrer Genese ist für die Entwicklung von Therapieansätzen zwingend notwendig. Unter dem Überbegriff der neurodegenerativen Erkrankungen werden u. a. die Parkinson-Krankheit, die Amyotrophe Lateralsklerose, Chorea Huntington sowie multiple Formen der Demenz zusammengefasst (Tian et al., 2020). Für das Jahr 2019 wird die Zahl der weltweit an Demenz Erkrankten auf über 50 Millionen geschätzt, und bis zum Jahr 2050 ist eine Verdreifachung dieser Zahl zu erwarten (Alzheimer's Disease International, 2019). Nach aktuellem Kenntnisstand stellt die Alzheimer-Krankheit (AD) die häufigste Form der Demenz dar (Tian et al., 2020).

Klinisch charakteristisch für die AD sind fortschreitende Gedächtnisstörungen sowie Orientierungs- und Wortfindungsstörungen, welche in späteren Stadien häufig von neuromotorischen, -psychiatrischen und -vegetativen Symptomen begleitet werden (Zvěřová, 2019). Für die Entstehung der AD werden zahlreiche Risikofaktoren diskutiert. Neben steigendem Alter und einer familiären Disposition gehen z. B. auch Bluthochdruck, Diabetes Mellitus, eine reduzierte körperliche Aktivität, bestimmte Ernährungsformen, eine Schwermetallbelastung, Schädel-Hirn-Traumata und systemische Infektionen in der Patienten-Vorgeschichte mit einem erhöhten Risiko einher, an Alzheimer zu erkranken (Armstrong, 2019; Paouri und Georgopoulos, 2019).

Pathophysiologische Merkmale der Erkrankung sind v. a. intrazelluläre Konglomerate aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein und extrazelluläre Ablagerungen von β -Amyloid (A β) in Form von sogenannten Alzheimer-Plaques (Espay et al., 2019; Nelson et al., 2012). Verantwortlich für den Abbau von A β im zentralen Nervensystem sind die hirneigenen Immunzellen, die Mikroglia (Hansen et al., 2018; Sarlus und Heneka, 2017). Mikroglia detektieren ein breites Spektrum an Pathogenen und sorgen durch deren Abbau für eine Erhaltung der Homöostase, also konstanter Verhältnisse, innerhalb des

Gehirns (Clayton et al., 2017; Hanisch und Kettenmann, 2007). Wie es dazu kommt, dass Abbau und Ablagerung im Falle der AD aus dem Gleichgewicht geraten, ist nach wie vor unklar und stellt eine zentrale Frage der aktuellen Forschung dar (Hickman et al., 2018; McQuade und Blurton-Jones, 2019; Sala Frigerio et al., 2019).

A β weist eine β -Faltblattstruktur auf. Wie von bakteriellen β -Faltblattstrukturen geht auch von A β ein pro-inflammatorischer Reiz aus (Terrill-Usery et al., 2014; Venegas und Heneka, 2019). Die Erkennung von extrazellulären A β -Aggregaten durch Toll-like-Rezeptoren (TLRs) an der Oberfläche der Mikrogliazellen führt als eine Reaktion des angeborenen Immunsystems zu einer raschen Aktivierung und Formierung eines zytosolischen Multiproteinkomplexes, des sogenannten NLRP3-Inflammasoms (engl.: *NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3*), (Halle et al., 2008; Kinney et al., 2018). Innerhalb des NLRP3-Inflammasom-Komplexes rekrutiert zunächst das Adapterprotein ASC (engl.: *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) über seine caspase-bindende Domäne (engl.: *caspase (activation and) recruitment domain (CARD)*) Pro-Caspase-1 (Fernandes-Alnemri et al., 2007), wodurch es zu einer auto-proteolytischen Aktivierung kommt, so dass aktive Caspase-1 aus dem Vorläuferprotein Pro-Caspase-1 abspalten wird (Boucher et al., 2018). Aktive Caspase-1 wiederum katalysiert die Reifung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und IL-18 (Kelley et al., 2019). Zudem induziert Caspase-1 die Spaltung von Gasdermin D (GSDMD), welches als ein Effektormolekül des inflammasom-vermittelten Zelltodes, genannt Pyroptose, fungiert (Bergsbaken et al., 2009; Liu et al., 2016). Durch Einbau von Membran-Poren trägt GSDMD ebenfalls zur Ausschüttung der Zytokine bei (Rathinam et al., 2019).

Näher betrachtet weist das Adapterprotein ASC zwei für seine Funktion essentielle Endungen auf: Während ASC über seinen C-Terminus Caspase-1 bindet, dient seine N-terminale Pyrin-Domäne (PYD) dazu, weitere ASC-Moleküle anzulagern, so dass helikal aufgebaute ASC-Fibrillen entstehen (Franklin et al., 2018). Im Anschluss an die Aktivierung des Inflammasoms erfolgt die Zusammenlagerung aller, sich jeweils innerhalb einer Zelle befindlichen, ASC-Moleküle zu einem ca. 1 μ m großen Aggregat, dem sogenannten „speck“ (Latz et al., 2013). Im Zuge der Pyroptose können die specks

in den Extrazellulärraum gelangen und auch hier die Aktivierung freier Caspase-1 und folglich pro-inflammatorischer Zytokine induzieren (Franklin et al., 2014).

Extrazellulär binden ASC specks zudem an A β -Ablagerungen (Venegas et al., 2017). Im Falle der AD ist neben der Expression von ASC auch die Bindungstendenz von ASC und A β amplifiziert (Venegas et al., 2017). Des Weiteren beschleunigt das extrazelluläre Vorkommen von ASC PYD-abhängig die Oligomerisierung von A β (Venegas et al., 2017). Dieses Phänomen ist schon in frühen Phasen der AD zu beobachten (Venegas et al., 2017). Da der Nachweis von A β -Ablagerungen dem Auftreten klinischer Symptome Jahrzehnte vorausgehen kann (Jack et al., 2013), stellen diese frühen Prozesse wichtige potentielle Angriffsziele neuer Therapien dar.

Basierend auf diesen Erkenntnissen stellten wir, die Autoren der Publikation uns die Frage, welche Auswirkungen die Anlagerung von A β an ASC auf die Mikroglia-Funktion hat. Dazu stimulierten wir in unserer Studie primäre Maus-Mikroglia mit A β , ASC oder ASC-A β -Aggregaten. Wir konnten zeigen, dass die Bindung von ASC und A β sowohl die Immunantwort als auch den Abbau von A β durch Mikroglia entscheidend beeinflusst.

1.2 Material und Methoden

Detaillierte Beschreibungen verwendeter Produkte und Herstellerangaben sind der Originalpublikation, v. a. den Abschnitten „*Star*Methods*“ und „*Method Details*“ zu entnehmen. Die Abbildungs-Verweise (Abb. 1–6, S1–2 aus Friker et al., 2020) beziehen sich auf die Darstellungen in der Originalpublikation.

Mikroglia-Gewinnung und -Zellkultur

In der Studie extrahierten wir Mikroglia aus 0 bis 2 Tage alten Wildtyp- (WT) bzw. ASC-defizienten Mäusen nach der Methode von Giulian und Baker (1986). Dazu wurden die Gehirngewebe nach Entfernung der Meningen in ihre zellulären Bestandteile aufgespalten und zunächst gemischtzellige Kulturen angelegt. Diese wurden unter standardisierten Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach einer 7- bis 10-tägigen Inkubation konnten die ersten Mikroglia durch vorsichtiges Klopfen vom Astrozyten-Zellteppich gelöst werden.

Alle Versuchstiere wurden stets entsprechend den Vorschriften der Universität Bonn, des Veterinäramtes Bonn und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gehalten und behandelt.

ASC- und A β -Präparation

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn M. Geyer, PhD (Institut für strukturelle Biologie, Universitätsklinikum Bonn, Bonn) haben Frau I. V. Hochheiser und Frau Dr. R. Brinkschulte die Extraktion rekombinanten humanen ASC-Proteins durchgeführt, wie in Venegas et al. (2017) beschrieben. Eine detaillierte Beschreibung dieser Vorgehensweise findet sich in der Originalpublikation („*Method Details*“ → „*Preparation of Recombinant ASC*“). Zur Induktion der ASC-Fibrillen-Bildung wurden die gewonnenen ASC-Monomere bei 37 °C für 1 h inkubiert. Im Anschluss konnte die Konzentration der jeweiligen Charge mit einem Mikrovolumen-Spektralphotometer/-Fluorometer (NanoDrop) bestimmt werden. Die ASC-Fibrillen wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C und nicht länger als 3 Wochen gelagert. Neben WT-ASC wurde auch eine, nach dem gleichen Protokoll extrahierte, in ihrer PYD (Lu et al., 2014) und CARD (Li et al., 2018) veränderte Mutante verwendet. WT-ASC und mutiertes ASC verfügten über eine Markierung durch den Fluoreszenzfarbstoff mCherry.

Mit 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol vorbehandeltes, 42 Aminosäuren langes und in physiologischer Basenfolge (1-42) synthetisiertes A β -Protein, genannt A β ₁₋₄₂, wurde, wie in Götz et al. (2001) beschrieben, gelöst und inkubiert. Wenn nicht anders angegeben, steht im folgenden A β für A β ₁₋₄₂. Für Phagozytose- und Proteinabbau-Analysen wurde ein fluoreszenzfarbstoff-markiertes A β ₁₋₄₂ (Fluorescein Amidite (FAM)-A β ₁₋₄₂) gewählt.

Zur Induktion der Aggregat-Bildung wurde A β (5 μ M) zusammen mit fibrillärem ASC (1,75 μ M) in einem serum-freien Zellkultur-Medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)) bei 37 °C über Nacht inkubiert (Abb. 1A aus Friker et al., 2020).

Mikroglia-Stimulation

Für alle Experimente zur Bestimmung der Zytotoxizität und Zellviabilität sowie zur Untersuchung der NLRP3-Inflammasom-Aktivierung mittels Immunoblot, ELISA (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*) und Immunzytochemie wurden die Zellen in

entsprechende Lochplatten ausgesät und über Nacht inkubiert, wie in den nachfolgenden Abschnitten jeweils im Detail erläutert. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung der Zellen. Dazu wurden die Vertiefungen der Lochplatten jeweils einer von sechs Gruppen zugeteilt. Die erste Gruppe (genannt „*untreated control*“ (UT)) wurde über die gesamte Versuchsdauer nur serum-freiem DMEM ausgesetzt. Alle anderen Gruppen wurden zunächst für 3 h mit 100 ng/ml Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert (primäre Stimulation). Nach Ablauf dieser 3 h wurden alle Vertiefungen einmalig mit DMEM ausgewaschen. Für die zweite Gruppe (genannt „*LPS control*“) erfolgte daraufhin keine weitere Stimulation, die Zellen dieser Gruppe wurden für die verbleibende Versuchsdauer lediglich DMEM ausgesetzt. Die anderen vier Gruppen wurden mit verschiedenen sogenannten sekundären Stimuli behandelt: Für die dritte Gruppe (genannt „ASC“) erfolgte die sekundäre Stimulation mit ASC (1,75 μ M), für die vierte Gruppe (genannt „ASC-A β “) mit ASC-A β -Aggregaten (siehe Abschnitt „ASC- und A β -Präparation“), für die fünfte Gruppe (genannt „A β “) mit A β (5 μ M) und für die sechste Gruppe (genannt „*buffer control*“) nur mit entsprechenden Pufferlösungen. Für diese Puffer-Kontrolle wurden volumen-gleiche Proben der jeweils zur Lösung von ASC und A β benutzen Puffer (Götz et al., 2001; Venegas et al., 2017) verwendet. Die Applikation der sekundären Stimuli erfolgte für 12 h bzw. 24 h, wie in den nachfolgenden Abschnitten jeweils beschrieben.

Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Die Immunpräzipitation (IP) stellt eine Methode zur Konzentrierung einzelner Proteine aus einer Multiprotein-Lösung dar. Die Gewinnung des Zielproteins erfolgt mit Hilfe spezifischer Antikörper, welche wiederum an magnetische Mikropartikel gekoppelt werden. Mithilfe eines Magneten können so die Antikörper-Protein-Komplexe aus dem Proteingemisch extrahiert werden. Zuletzt wird das Zielprotein durch Denaturierung wieder von den Mikropartikeln getrennt. Liegen Proteine innerhalb der Lösung gebunden vor, kann das gesuchte Protein auch über Antikörper gegen das jeweils andere Protein extrahiert werden, man spricht dann von einer sogenannten Co-IP. Zur Durchführung der Co-IP wurde ein in Venegas et al. (2017) beschriebenes Protokoll unter Verwendung von Anti-ASC- und Anti-A β -Antikörpern herangezogen. Um das mögliche intrazelluläre Fortbestehen der ASC-A β -Proteinbindung nach Phagozytose der Aggregate zu

untersuchen, verwendeten wir Lysate ASC-defizienter Mikroglia mit einem Gesamtproteingehalt von 35 mg. Die Quantifizierung des Proteingehalts erfolgte mittels Bicinchoninsäure-Test. Die Auswertung der Co-IP wurde anschließend anhand von Western Blots, wie unter „Immunoblot“ im Detail beschrieben, vorgenommen.

Transmissionselektronenmikroskopie

Die Untersuchung der Proteine unter dem Elektronenmikroskop und die Vorbereitung der dazu verwendeten Proben wurden maßgeblich von Frau I. V. Hochheiser aus der Arbeitsgruppe von Herrn M. Geyer, PhD (Institut für strukturelle Biologie, Universitätsklinikum Bonn, Bonn) durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise ist in der Originalpublikation („*Method Details*“ → „*Electron Microscopy*“) zu finden.

Zytotoxizität und Zellviabilität

Hierzu wurden 75.000 primäre Mikroglia pro Vertiefung einer 96-Lochplatte ausgesät und unter den o. g. standardisierten Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂) über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen, wie unter „Mikroglia Stimulation“ beschrieben, behandelt. Die sekundäre Stimulation erfolgte sowohl für 12 h als auch für 24 h. Zur Zytotoxizitäts-Analyse wurden jeweils 50 µl der Überstände einem Detektions-Kit der Firma Roche hinzugefügt, entsprechend dem Herstellerprotokoll. Die Zellviabilität der in den Vertiefungen anheftenden Mikroglia wurde anschließend unter Verwendung eines entsprechenden Detektions-Kits der Firma Cell Signaling Technology bestimmt. Die Auswertung beider Untersuchungen erfolgte photometrisch.

Immunoblot

Hierzu wurden 1,5 Mio. primäre Mikroglia pro Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät, unter o. g. standardisierten Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂) über Nacht inkubiert und anschließend behandelt wie unter „Mikroglia-Stimulation“ beschrieben. Die Applikation der sekundären Stimuli erfolgte für diese Versuche über einen Zeitraum von 12 h. Im Anschluss wurden die Überstände zunächst einem Protokoll zur Protein-Präzipitation unterzogen, wie in Scheiblich et al. (2017) beschrieben. Zur Gewinnung der Zelllysate wurden die Mikroglia mit einem Spatel vom Plattenboden gelöst und in RIPA-Puffer (engl.: *radioimmunoprecipitation assay*) lysiert. Die ausgefällten Proteinpellets der

Überstände und Lysate wurden anschließend in Ladepuffer suspendiert, denaturiert und mittels Western Blot unter Verwendung eines 4- bis 12-prozentigen Bis-Tris-Gels analysiert. Den Laufpuffer wählten wir entsprechend der Größe der gesuchten Proteine. Die Übertragung der Proteinbanden auf eine Nitrozellulose-Membran mit 0,2 µm Porengröße fand mit Hilfe eines Transfer-Systems der Firma Bio-Rad Laboratories statt. Nach Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen durch Inkubation in gelöstem bovinem Serumalbumin erfolgte die Benetzung der Membranen mit einem primären, spezifischen Antikörper bei 4 °C über Nacht. Nach dreifachem Waschen wurden die Membranen am nächsten Tag für 1 h bei Raumtemperatur zusammen mit entsprechenden sekundären Immunglobulin G (IgG)-Antikörpern inkubiert und anschließend gescannt. Zur Quantifizierung verwendeten wir die Software Image Studio.

Bestimmung der Zytokin-Sekretion mittels ELISA

Primäre Mikroglia wurden ausgesät, wie unter „Zytotoxizität und Zellviabilität“ beschrieben, und anschließend behandelt, wie unter „Mikroglia-Stimulation“ beschrieben. Die Applikation der sekundären Stimuli erfolgte sowohl für 12 h als auch für 24 h. Anschließend bestimmten wir die IL-1β-Konzentration in den Zellüberständen unter Zuhilfenahme eines ELISA-Kits der Firma R&D Systems, wie im Protokoll des Herstellers beschrieben. Durch lineare Regression wurden die photometrisch gemessenen Zytokin-Werte in die zugehörigen Standardkurven interpoliert unter Verwendung der Software GraphPad Prism 7. Für Experimente unter NLRP3- und TLR-Inhibition wurden Mikroglia gleichzeitig zu den sekundären Stimuli mit entsprechenden Inhibitoren behandelt. Daneben wurden zugehörige volumen-gleiche IgG- und Dimethylsulfoxid (DMSO)-Kontrollen getestet.

Immunzytochemie

Für immunzytochemische Untersuchungen wurden sowohl primäre Mikroglia, als auch ASC-defiziente Makrophagen gewählt. Pro Vertiefung einer 24-Lochplatte mit eingelegten Deckgläschen wurden 200.000 Zellen ausgesät und unter o. g. standardisierten Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂) über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag behandelten wir die Zellen, wie unter „Mikroglia-Stimulation“ beschrieben und setzten sie für 12 h den sekundären Stimuli aus. Anschließend wurden

die Zellen durch Zugabe von Paraformaldehyd fixiert. Unter Verwendung von 0,1 % Triton X-100, gelöst in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), erfolgte anschließend die Permeabilisierung der Zellmembranen. Nach Blockade unspezifischer Antikörper-Bindungen mittels Ziegen-Serum wurden primäre Antikörper (siehe Originalpublikation „*Star*Methods*“ und „*Method Details*“ → „*Immunocytochemistry*“) für 30 min bei Raumtemperatur appliziert. Im Anschluss an mehrfache Wasch-Schritte fügten wir die entsprechenden sekundären Antikörper für weitere 30 min hinzu. Dann erfolgte die Färbung der Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und die Übertragung der zellbesetzten Deckgläschen auf Objektträger. Färbungen zur Visualisierung aktiver Caspase-1 wurden unter Verwendung eines Detektions-Kits der Firma ImmunoChemistry Technologies, entsprechend dem Herstellerprotokoll, durchgeführt. Zur Darstellung und Messung verwendeten wir schließlich ein hochauflösendes Fluoreszenzmikroskop. Die Abbildungen der Originalpublikation wurden unter Benutzung der 40 × und 60 × Objektive aufgenommen und mit Hilfe der Software NIS-elements 4 und Fiji ImageJ ausgewertet.

A β -Phagozytose und -Abbau

Hierzu wurden 350.000 primäre Mikroglia pro Vertiefung einer 24-Lochplatte ausgesät. Gleichzeitig wurden FAM-A β (0,5 μ M) zusammen mit ASC (0,66 μ M) bei o. g. standardisierten Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂) über Nacht inkubiert.

Zur Untersuchung der A β -Phagozytose behandelten wir am darauffolgenden Tag die Zellen mit dem o. g. ASC-FAM-A β -Gemisch oder FAM-A β in gleicher Konzentration für jeweils 15, 30 und 60 min. Anschließend wurden die Überstände verworfen und die anhaftenden Zellen mit 0,5-prozentiger Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure vom Boden der Vertiefungen gelöst. Durch Zugabe von bovinem Serumalbumin erfolgte anschließend die Blockade unspezifischer Antikörperbindungen. Als nächstes applizierten wir spezifische Antikörper zur Mikroglia-Markierung. Abschließend erfolgte die Analyse der Proben per Durchflusszytometrie. Nach dem Ablösen der Mikroglia von der Lochplatte wurden die Proben zwischen allen folgenden Schritten jeweils bei 300 × g (Erdbeschleunigung g) für 5 min zentrifugiert und ihre Überstände verworfen. Zuletzt erfolgte die Auswertung der Ergebnisse unter Zuhilfenahme der Software FlowJo.

Zur Untersuchung des A β -Abbaus behandelten wir primäre Mikroglia mit den gleichen, auch für die Phagozytose-Untersuchung verwendeten Konzentrationen für insgesamt 1 h. Danach wurden die Zellen dreimal in sterilem PBS gewaschen und anschließend für entweder 0, 1, 2, 3 oder 4 h in ASC- und A β -freiem DMEM inkubiert. Daraufgehend wurden die Zellen, wie vorstehend beschrieben, gesammelt, gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Statistik

Alle Datensätze dieser Studie umfassen mindestens drei voneinander unabhängige Experimente, welche jede Gruppe (siehe „Mikroglia-Stimulation“) in doppelter bis dreifacher Ausführung einschließen. Zur Auswertung der Daten wurde, wenn nicht anders angegeben, die Software GraphPad Prism 7 verwendet. Vor Durchführung der Varianzanalyse (ANOVA) wurden alle Datensätze bezüglich des Vorliegens einer Gauß'schen-Verteilung untersucht. Normalverteilte Datensätze wurden mittels Einweg-ANOVA und anschließendem Tukey-Post-hoc-Test analysiert. Zweiweg-ANOVA benutzten wir für gruppierte Faktoren. Für verteilungsfreie Datensätze wurde hingegen der Kruskal–Wallis-Test in Kombination mit einem Dunn's-Post-hoc-Test angewandt. Zum Vergleich zweier normalverteilter Gruppen wurden t-Tests verwendet. Bei verteilungsfreien, ausschließlich zwei Gruppen vergleichenden Analysen kam der Mann-Whitney-Test zum Einsatz. Eine genaue Zuordnung der angewandten statistischen Tests ist in den jeweiligen Bildunterschriften der Originalpublikation zu finden. Ebenfalls sind dort die Legenden der Überschreitungswahrscheinlichkeiten (p) aufgeführt. In allen graphischen Abbildungen der Originalpublikation stellen die Fehlerbalken die Standardabweichung vom Mittelwert dar.

1.3 Ergebnisse

Venegas et al. (2017) haben gezeigt, dass ASC specks und A β extrazellulär Bindungen eingehen. Da unsere Forschungsidee maßgeblich auf dieser Erkenntnis basiert, reproduzierten wir zunächst repräsentative Experimente dieser vorausgegangenen Studie unter Verwendung an unsere Bedingungen angepasster Puffer und Proteinkonzentrationen (Abb. 1A–E aus Friker et al., 2020). Die von Co-Autoren aus dem

Institut für strukturelle Biologie des Universitätsklinikums Bonn durchgeführte Transmissionselektronenmikroskopie konnte, wie in Venegas et al. (2017) gezeigt, Anlagerungen der A β -Oligomere entlang helixförmiger ASC-Fibrillen zur Darstellung bringen (Abb. 1B–D aus Friker et al., 2020). Mittels Co-IP konnten wir diese Anlagerung schließlich als feste Bindung identifizieren, indem wir mit Antikörpern gegen ASC bzw. A β erfolgreich auch das jeweils andere Protein extrahierten (Abb. 1E aus Friker et al., 2020).

Zunächst stellten wir uns die Frage, ob von den gewählten Stimuli, ASC, A β und ASC-A β -Aggregaten, eine Toxizität für Mikroglia ausgeht. Dazu bestimmten wir nach dreistündiger LPS-Behandlung und anschließender 12- bzw. 24-stündiger Stimulation mit den o. g. Stimuli und entsprechenden Kontrollen (Abb. 1F aus Friker et al., 2020) die Konzentration der Lactatdehydrogenase (LDH) in den Mikroglia-Überständen (Abb. 1G aus Friker et al., 2020). Extrazelluläre LDH stellt einen gängigen diagnostischen Parameter zur Detektion von Zellschäden dar (Giordano et al., 2011). Im Vergleich zu den einzeln vorliegenden Proteinen induzierten ASC-A β -Aggregate zu beiden Zeitpunkten eine deutlich höhere LDH-Freisetzung. Eine signifikante Reduktion der metabolischen Aktivität durch ASC-A β -Aggregate konnte jedoch erst nach 24 h festgestellt werden (Abb. 1H aus Friker et al., 2020). Anschließend stellten wir uns die Frage, ob es sich bei dem beobachteten Zelluntergang um Pyroptose handelt. Hierzu untersuchten wir die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms mittels Western Blot. Wie allgemein angenommen, werden hierzu zwei verschiedene Impulse benötigt, ein Bahnungs-Impuls, z. B. in Form von LPS, welcher die Expression der Inflammasom-Komponenten induziert, und ein darauffolgender Aktivierungs-Impuls z. B. in Form von Adenosintriphosphat (ATP), welcher die Zusammenlagerung der NLRP3-Inflammasom-Komponenten initiiert (Bauernfeind et al., 2009; Lamkanfi und Dixit, 2014). Dementsprechend induzierten LPS, wie erwartet, die Expression des NLRP3-Rezeptors (Latz et al., 2013) (Abb. 2A, D aus Friker et al., 2020). Im Gegensatz zu Pro-Caspase-1, welche in allen Gruppen ohne signifikante Unterschiede exprimiert wurde (Abb. 2B, D aus Friker et al., 2020), zeigte sich eine deutlich gesteigerte Akkumulation ihres aktiven Spaltproduktes P20 nach Behandlung mit ASC-A β -Aggregaten. P20 wurde in dieser Gruppe sowohl in den Mikroglia-Lysaten (Abb. 2C, D aus Friker et al., 2020) als auch in ihren Überständen (Abb. 2K, L aus Friker et al., 2020) deutlich vermehrt detektiert.

Zudem wurden in Lysaten von mit ASC-A β -Aggregaten behandelten Zellen ein deutlich höheres Vorkommen aller auf den Blot-Membranen detektierten ASC-Molekülverbände (ASC-Dimere, -Monomere und ASC-mCherry) nachgewiesen (Abb. 2E–H aus Friker et al., 2020). In den Überständen wurden hingegen ausschließlich für die Monomere signifikant erhöhte Werte gemessen (Abb. 2I, J, L aus Friker et al., 2020). Die Detektion von ASC specks ist als Nachweis der NLRP3-Aktivierung allgemein anerkannt (Stutz et al., 2013). Zur Unterscheidung des maus-mikroglia-eigenen ASC von exogen zugefügtem, rekombinantem humanem ASC, wählten wir einen maus-spezifischen Antikörper für immunzytologische Färbungen (Abb. S1 aus Friker et al., 2020). So konnten wir die Formierung und Freisetzung zelleigener ASC specks und gleichzeitig morphologische Veränderungen der aktivierten Mikroglia unter ASC speck-Bildung beobachten.

Orientierend am Ablauf der NLRP3-Inflammasom-Kaskade, betrachteten wir als Nächstes die Zytokin-Ausschüttung mittels ELISA (Abb. 3A aus Friker et al., 2020). Sowohl ASC als auch ASC-A β -Aggregate induzierten eine gesteigerte IL-1 β -Freisetzung, wobei in der mit Aggregaten behandelten Gruppe noch höhere IL-1 β -Konzentrationen in den Überständen gemessen wurden. Da sich nach einer sekundären Stimulation von 12 h die absolut höchsten Werte zeigten, wählten wir diese Zeitdauer für die nachfolgenden Experimente. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der IL-1 β -Detektion stellten wir eine besonders hohe Expression des amino-terminalen, aktiven Spaltproduktes des Pyroptose-Effektor-Proteins GSDMD nach Behandlung mit ASC-A β -Aggregaten fest (Abb. 3B–D aus Friker et al., 2020). Hingegen fanden sich keine Unterschiede auf Ebene des GSDMD-Vorläuferproteins.

Die Erkennung der das NLRP3-Inflammasom aktivierenden Substanzen erfolgt über Toll-like-Rezeptoren (TLRs) an der Mikroglia-Oberfläche (Kumar, 2019). Um herauszufinden, welche TLRs bei der beobachteten Immunantwort auf ASC-A β -Aggregate involviert sind, wiederholten wir die Experimente zur IL-1 β -Ausschüttung mit gleichzeitiger Zugabe von neutralisierenden Anti-TLR-Antikörpern (Abb. 3E aus Friker et al., 2020). Es zeigte sich eine signifikant reduzierte IL-1 β -Konzentration bei Inhibition von TLR2 und TLR4. Dahingegen erzielte die simultane Behandlung mit Antikörpern gegen TLR5 eine leichte, jedoch signifikante Steigerung der IL-1 β -Werte. Die jeweiligen

IgG-Kontrollen zeigten, wie erwartet, keine Beeinflussung. Durch Inhibition von NLRP3 konnten wir zudem beweisen, dass es sich bei der gesteigerten IL-1 β -Freisetzung nach ASC-A β -Stimulation um einen NLRP3-abhängigen Vorgang handelt (Abb. 3F, S2E aus Friker et al., 2020).

Um herauszufinden, welche Rolle die helikale Struktur von WT-ASC für den proinflammatorischen Effekt der ASC-A β -Aggregate spielt, verwendeten wir neben WT-ASC auch eine ASC-Variante, welche durch Mutationen in ihrer CARD und PYD nicht die Fähigkeit zur Filament-Bildung besitzt (Abb. 3G aus Friker et al., 2020). Das Produkt der Co-Inkubation von mutiertem ASC und A β induzierte schließlich nur ca. die Hälfte der durch WT-ASC-A β ausgelösten IL-1 β -Freisetzung (Abb. 3H aus Friker et al., 2020).

Zuvor konnte gezeigt werden, dass ASC, welches aus Makrophagen im Rahmen der Pyroptose in den Extrazellulärraum gelangt, sowohl extrazellulär als auch nach Aufnahme durch umliegende Makrophagen, Caspase-1 aktivieren und dadurch die Spaltung von IL-1 β induzieren kann (Franklin et al., 2014). Wir fragten uns, ob diese Eigenschaften von ASC auch in Mikroglia zu beobachten seien und somit möglicherweise zu ihrer ausgeprägten Immunantwort auf exogenes ASC beitragen. Hierzu behandelten wir ASC-defiziente Makrophagen und ASC-defiziente Mikroglia mit den o. g. sekundären Stimuli (Abb. 4 aus Friker et al., 2020). Zusätzlich verwendeten wir als Positivkontrolle Adenosintriphosphat (ATP), einen in der Literatur geläufigen zweiten Stimulus des NLRP3-Inflammasoms (Karmakar et al., 2016). Im Gegensatz zu WT-Makrophagen wiesen ASC-defiziente Makrophagen nach LPS- und anschließender ATP-Behandlung, wie erwartet, keine aktiven Spaltprodukte der Caspase-1 auf (Abb. 4A, B aus Friker et al., 2020). Unter Zugabe von rekombinantem exogenem ASC konnten wir jedoch erfolgreich die Aktivierung von Caspase-1 in ASC-defizienten Makrophagen induzieren. ASC-defiziente Mikroglia zeigten passend dazu eine deutliche P20-Bande im Caspase-1-Western Blot nach Behandlung mit rekombinantem ASC (Abb. 4C aus Friker et al., 2020). In beiden Experimenten wurden die höchsten P20-Werte, entsprechend den Ergebnissen in WT-Mikroglia (Abb. 2K, L aus Friker et al., 2020), nach Stimulation mit ASC-A β -Aggregaten gemessen. Ebenfalls beobachteten wir, dass die Freisetzung von IL-1 β sowohl einem zeitlich- als auch einem konzentrations-abhängigen Verlauf unterlag (Abb. 4D aus Friker et al., 2020). Vergleich

man die IL-1 β -Werte in den Überständen ASC-defizienter Mikroglia nach 12-stündiger Behandlung, zeigte sich die gleiche, im WT beobachtete Tendenz zwischen der ASC- und ASC-A β -stimulierten Gruppe, wohingegen nach 24 h kein signifikanter Unterschied mehr bestand (Abb. 4E aus Friker et al., 2020). Insgesamt machten die in ASC-defizienten Mikroglia gemessenen Konzentrationen ca. 10 % der IL-1 β -Freisetzung in WT-Mikroglia aus (Abb. 4F aus Friker et al., 2020).

Auch in ASC-defizienten Mikroglia wiesen die Zelllysate nach Behandlung mit ASC-A β -Aggregaten höhere Gesamt-ASC-Mengen auf als die mit gleichkonzentriertem ASC stimulierten Zellen (Abb. 4G, H aus Friker et al., 2020). Zusätzlich induzierte exogenes ASC nach Aufnahme ins Zellinnere die Bildung von ASC specks, welche besonders zahlreich in der ASC-A β -behandelten Gruppe zu finden waren (Abb. 4I aus Friker et al., 2020). Mittels Co-IP konnten wir auch das intrazelluläre Fortbestehen der ASC-A β -Bindung nachweisen (Abb. 4J, K aus Friker et al., 2020).

Eine wichtige Aufgabe von Mikroglia ist der Abbau von A β -Ablagerungen, welcher im Falle der AD aus dem Gleichgewicht gerät (Baik et al., 2016; Cho et al., 2014). Um zu untersuchen, inwiefern die Anlagerung von A β entlang von ASC-Fibrillen die Phagozytose durch Mikroglia beeinflusst, wählten wir ein fluoreszenzfarbstoff-markiertes A β (FAM-A β). Nach einstündiger Behandlung primärer Mikroglia mit FAM-A β oder ASC-FAM-A β -Aggregaten nahmen wir die Messung der Zellsuspensionen mittels Durchflusszytometrie vor. Im Vergleich zur ausschließlich FAM-A β -ausgesetzten Gruppe zeigte sich bei gleichzeitigem Vorliegen von ASC eine Reduktion der FAM-A β -Aufnahme um ca. 35 % (Abb. 5A–C aus Friker et al., 2020). Während von Mikroglia aufgenommenes FAM-A β schließlich kontinuierlich mit einer Rate von 20 bis 25 % pro Stunde eliminiert wurde, konnte über einen Versuchszeitraum von 4 h kein signifikanter intrazellulärer Abbau des an ASC haftenden FAM-A β beobachtet werden (Abb. 5D–E aus Friker et al., 2020). Auch nach 12-stündiger Behandlung bestand im Western Blot der Lysate noch ein deutlicher Unterschied der A β -Signale: A β -behandelte Mikroglia zeigten, im Sinne einer erfolgreichen intrazellulären Elimination, eine deutliche schwächere Bandenintensität als ASC-A β -behandelte Mikroglia (Abb. S2B aus Friker et al., 2020).

Zuletzt untersuchten wir die Expression von TREM2 (engl.: *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*), einem Rezeptor, der sowohl in der Regulierung pro-

inflammatorischer Zytokine als auch für die Phagozytose eine wichtige Rolle spielt (Ulrich und Holtzman, 2016). Im Vergleich zu den anderen Gruppen zeigte sich in Lysaten der mit ASC-A β -Aggregaten behandelten Mikroglia eine signifikante TREM2-Reduktion (Abb. S2C, D aus Friker et al., 2020).

1.4 Diskussion

Der Zusammenhang zwischen A β -Ablagerungen und einer Fehlfunktion auf Seiten der Mikroglia ist bis heute Forschungsinhalt zahlreicher Studien (Cai et al., 2014; Casali et al., 2020; Sarlus und Heneka, 2017; Sebastian Monasor et al., 2020). Venegas et al. (2017) stellten dabei erstmalig die Rolle des Adapterproteins ASC in den Fokus. Sie konnten u. a. zeigen, dass ASC im AD-Mausmodell im Vergleich zum WT gesteigert exprimiert wird. Darüber hinaus haben sie eine Anlagerung von A β entlang der ASC-Fibrillen und damit die Entstehung von ASC-A β -Aggregaten beobachtet. Welchen Einfluss diese ASC-A β -Aggregate wiederum auf Mikroglia haben, war zu diesem Zeitpunkt noch unerforscht. Wir konnten herausfinden, dass die Aggregate im Vergleich zu den einzeln vorliegenden Proteinen einen toxischen, pro-inflammatorischen Stimulus für die hirneigene Immunabwehr darstellen. Mikroglia, die den Aggregaten ausgesetzt waren, wiesen eine vermehrte Zellschädigung in Form einer gesteigerten LDH-Freisetzung (Abb. 1G aus Friker et al., 2020) sowie eine verminderte metabolische Aktivität auf (Abb. 1H aus Friker et al., 2020). Ebenso induzierten die Aggregate eine massive Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms auf allen Ebenen der Kaskade von der ASC-Expression (Abb. 2E–H aus Friker et al., 2020), speck-Formierung (Abb. S1 aus Friker et al., 2020) und -Freisetzung (Abb. 2J, L aus Friker et al., 2020) über die Spaltung von Pro-Caspase-1 (Abb. 2 C, D, K, L aus Friker et al., 2020) und GSDMD (Abb. 3C, D aus Friker et al., 2020) bis hin zur Reifung und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine (Abb. 3A aus Friker et al., 2020). In Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich die beobachtete Zellschädigung bei gleichzeitiger Inflammasom-Aktivierung mit GSDMD-Spaltung als Pyroptose identifizieren (Shi et al., 2015). Monteleone et al. (2018) haben beschrieben, wie die Caspase-1-Aktivität über eine schnelle GSDMD-abhängige Membranporen-Bildung zu einer beschleunigten IL-1 β -Freisetzung führt. Dieser Mechanismus könnte hier die sehr hohen IL-1 β -

Konzentrationen (Abb. 3A aus Friker et al., 2020) bei gleichzeitiger Detektion des aminoterminalen aktiven Spaltproduktes von GSDMD (Abb. 3C, D aus Friker et al., 2020) erklären. Indem wir spezifische NLRP3-Inhibitoren einsetzten, konnten wir feststellen, dass ca. 40 % der beobachteten IL-1 β -Ausschüttung von diesem Inflammasom-Typ abhängen (Abb. 3F, S2E aus Friker et al., 2020). Es ist zu vermuten, dass die verbleibenden 60 % durch weitere involvierte ASC-abhängige Inflammasome vom AIM2-Typ (engl.: *absent in melanoma 2*) oder NLRC4-Typ (engl.: *NOD-like receptor family CARD domain-containing protein 4*) zustande kommen (Freeman et al., 2017; Saadi et al., 2020; Wang et al., 2020).

Im Zuge der ASC-Fibrillen-Bildung lagern sich die PYD homonym im Zentrum der Helix zusammen, während die CARD an ihrer Oberfläche zur Aktivierung von Pro-Caspase-1 bereitstehen (Moretti und Blander, 2020). Ergänzend vermittelt die CARD die Zusammenlagerung von kleineren ASC-Aggregaten zu einem oder mehreren ASC specks pro Zelle (Hoss et al., 2017). In der aktuellen Forschung kommen immer wieder ASC-Mutanten zum Einsatz (Li et al., 2018; Lu et al., 2014; Venegas et al., 2017). In unserer Studie entschieden wir uns, orientiert an der Literatur (Li et al., 2018; Lu et al., 2014), für eine ASC-Variante, die sowohl im Typ I Interface der PYD (K21A, K22A, K26A) als auch in der CARD (D134R, Y187E) mehrere Mutationen aufweist. Die jeweilige Mutations-Kombination in einer der Domänen reicht bereits aus, um die Fibrillen-Bildung von ASC zu unterbinden (Li et al., 2018; Lu et al., 2014). Entsprechend konnten wir nach 23-stündiger Inkubation mittels Transmissionselektronenmikroskopie keine fibrillären Strukturen detektieren (Abb. 3G aus Friker et al., 2020). Zudem beobachteten wir unter Verwendung der gewählten ASC-Variante eine deutlich reduzierte IL-1 β -Freisetzung im Vergleich zur Behandlung mit A β -bindendem WT-ASC (Abb. 3H aus Friker et al., 2020). In einer vorausgehenden Studie induzierte mutiertes ASC, welches ebenso nicht die Fähigkeit besitzt, eine speck-Formation einzunehmen, nur eine ineffiziente Reifung von IL-1 β (Dick et al., 2016). In Zusammenschau lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die filamentäre Struktur von ASC für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms von essentieller Bedeutung ist. Während WT-ASC die Oligomerisation von A β ₁₋₄₀ beschleunigte, blieb dieser Effekt unter Verwendung einer, die gleichen K-zu-A-Mutationen innerhalb der PYD aufweisenden, ASC-Mutante aus

(Venegas et al., 2017). Dieses lässt auch eine veränderte Interaktion von mutiertem ASC und A β vermuten.

Für die Induktion des Inflammasoms vom NLRP3-Typ ist die Aggregation von ASC zu specks wesentlich (Latz et al., 2013; Stutz et al., 2013). Diese Aussage unterstreichend, konnten wir sowohl die Ausbildung von mikroglia-eigenen ASC specks als Reaktion auf exogenes ASC (Abb. S1 aus Friker et al., 2020), als auch die Zusammenlagerung von rekombinantem ASC zu ASC specks im Zytosol ASC-defizienter Zellen nachweisen (Abb. 4I aus Friker et al., 2020). ASC specks gelten zudem als exogenes Gefahrensignal (Franklin et al., 2014). So löste die Injektion von ASC specks eine akute Entzündungsreaktion in WT-Mäusen aus (Franklin et al., 2014). In Makrophagen, welche exogenes ASC phagozytiert hatten, konnten Franklin et al. (2014) zudem eine lysosomale Schädigung nachweisen.

Befinden sich Pathogene oder andere pro-inflammatorische Substanzen in der Umgebung, kommt es zu einer gesteigerten Expression von TLRs an der Mikroglia-Oberfläche (Olson und Miller, 2004). Die Inhibition von TLR2 und TLR4 während der Behandlung mit ASC-A β -Aggregaten führte zu einer signifikanten Reduktion der IL-1 β -Freisetzung (Abb. 3E aus Friker et al., 2020). Unser Ergebnis steht in Einklang mit der aktuellen Literatur, denn A β ist als Ligand beider Rezeptoren bekannt (Letiembre et al., 2009) und induziert über seine Bindung an TLRs die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms (Liu et al., 2012; Walter et al., 2007). Neben TLR2 und TLR4 wird eine Interaktion von A β mit zahlreichen weiteren Rezeptoren an der Zelloberfläche wie TLR6 und CD36 (engl.: *cluster of differentiation 36*) diskutiert (Doens und Fernández, 2014; Sheedy et al., 2013; Stewart et al., 2010). Durch seine Anlagerung entlang der ASC-Fibrillen-Oberfläche, könnte A β einigen dieser Rezeptoren gleichzeitig präsentiert werden und so den pro-inflammatorischen Impuls, welcher von freiem A β ausgeht (Lučiūnaitė et al., 2019; Nakanishi et al., 2018), amplifizieren. Die Hemmung von TLR5 unter Verwendung spezifischer Antikörper hingegen führte zu einer signifikanten Steigerung der IL-1 β -Werte in den Zellüberständen (Abb. 3E aus Friker et al., 2020). Dieses lässt an eine protektive Eigenschaft von TLR5 in Bezug auf die A β -induzierte Immunreaktion denken. Tatsächlich konnte zuvor gezeigt werden, dass A β an das gelöste Fragment von TLR5 bindet und die davon ausgehende Toxizität reduziert

(Chakrabarty et al., 2018). Auch die flagellin-assoziierte Aktivierung von TLR5 wurde von A β beeinflusst, wohingegen A β allein keine Aktivierung des TLR5-vermittelten Signalwegs induzierte (Chakrabarty et al., 2018).

Franklin et al. (2014) beschrieben *in vitro*, wie freies ASC extrazellulär akkumuliert, von umliegenden Makrophagen phagozytiert und anschließend in seiner uneingeschränkten Funktionalität in das Inflammasom der aufnehmenden Zelle integriert wird. Zudem konnten sie in zellfreien Überständen von Makrophagen auch eine primär extrazelluläre speck-Formierung beobachten. Sowohl extra- als auch intrazellulär führten exogene ASC specks zur Reifung von IL-1 β . In unserer Studie konnten wir unter Verwendung eines ASC-defizienten Genotypen zeigen, dass exogenes ASC nicht nur in Makrophagen, sondern auch in Mikroglia die Spaltung von Pro-Caspase-1 induziert (Abb. 4A–C aus Friker et al., 2020) und die Freisetzung von IL-1 β fördert (Abb. 4D, E aus Friker et al., 2020). Wie in WT-Mikroglia wurden auch in ASC-defizienten Mikroglia die höchsten P20- und IL-1 β -Werte nach der Behandlung mit ASC-A β -Aggregaten gemessen (Abb. 4F aus Friker et al., 2020). Allerdings betragen die absoluten IL-1 β -Werte nur ca. 10 % der im WT detektierten Spiegel. Das lässt vermuten, dass zelleigenes ASC eine bedeutende Rolle für den beobachteten Verstärkermechanismus des NLRP3-Inflammasoms spielt. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass auch dieses zelleigene ASC als Reaktion auf ASC-A β verstärkt exprimiert wird (Abb. 2E–H aus Friker et al., 2020) und ebenfalls zu ASC specks akkumuliert (Abb. S1 aus Friker et al., 2020). Zudem konnten wir in Lysaten ASC-defizienter Mikroglia höhere ASC-Spiegel nachweisen, wenn die Zellen zuvor ASC-A β -Aggregaten ausgesetzt waren, als nach alleiniger Behandlung mit ASC (Abb. 4G, H aus Friker et al., 2020). Dies deutete auf eine gesteigerte Aufnahme von ASC bei Bindung mit A β hin. Bei weiterer Untersuchung dieser Zelllysate konnten wir eine beständige intrazelluläre Bindung von ASC und A β beobachten (Abb. 4J, K aus Friker et al., 2020). Eine mögliche Begründung für die Verstärkung der NLRP3-Inflammasom-Kaskade, aber auch für die beeinträchtigte Phagozytose von A β , könnte eine Stabilisierung der ASC-Fibrille durch angelagertes A β sein.

Die Expression des TREM2-Rezeptors steht sowohl mit der A β -induzierten Neuroinflammation als auch mit der Phagozytose-Kapazität unterschiedlicher Zelltypen

in Zusammenhang (Jiang et al., 2016; Kleinberger et al., 2014; N'Diaye et al., 2009; Xiang et al., 2016). A β -stimulierte TREM2-überexprimierende Zellen der sogenannten BV-2-Linie, einer von Maus-Mikroglia abgeleiteten Kultur (Blasi et al., 1990), wiesen eine Reduktion der TLR-Expression und folglich einen Erhalt der Zellvitalität auf (Long et al., 2019). Die Überexpression von TREM2 begünstigte ebenfalls den Abbau von A β ₁₋₄₂ durch BV-2. In Mikroglia unterstützt TREM2-Protein den Abbau von A β -Plaques, indem es zur Aufrechterhaltung des Energie- und Biosynthese-Metabolismus der Zellen beiträgt (Ulland et al., 2017). Bestimmte *missense*-Mutationen des TREM2-Rezeptors sind sogar mit einem 2- bis 4-fach erhöhten Risiko für die Entwicklung einer AD assoziiert (Guerreiro et al., 2013; Jonsson et al., 2013). Diskrepanz verhalten sich allerdings die Ergebnisse verschiedener Studien im Bezug auf die Beeinflussung der TREM2-Expression durch pro-inflammatorische Stimuli. Während *in vitro* meist eine verminderte Expression beschrieben wurde, zeigten *in vivo*-Experimente eine Hochregulierung des Rezeptors (Jay et al., 2017). In unserer Studie führte die Behandlung mit ASC-A β -Aggregaten, passend zu den vorausgehenden Erkenntnissen *in vitro*, zu einer erniedrigten TREM2-Detektion (Abb. S2C, D aus Friker et al., 2020). Unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur vermuten wir einen Zusammenhang zwischen der von uns beobachteten TLR2-, TLR4- und TLR5-abhängigen Zytokin-Ausschüttung (Abb. 3A, E aus Friker et al., 2020), der eingeschränkten Phagozytose von A β (Abb. 5A–C aus Friker et al., 2020) und der Reduktion der TREM2-Expression als Reaktion auf ASC-A β -Aggregate (Abb. S2C, D aus Friker et al., 2020). Neben der Phagozytose wurde auch der Abbau von A β durch seine Anlagerung an exogenes ASC beeinflusst. Über den beobachteten Zeitraum blieb eine Reduktion der intrazellulären Konzentration von an ASC gebundenem A β aus, während einzeln vorliegendes A β kontinuierlich von den Mikroglia-Zellen abgebaut wurde (Abb. 5D, E, S2B aus Friker et al., 2020). Mögliche Gründe hierfür könnten zum einen die Aggregatgröße und zum anderen die Belegung von für die Phagozytose bzw. den Abbau wichtigen Bindungsstellen durch Interaktion der beiden Proteine sein. Auch die gesteigerte pro-inflammatorische Reaktion ist als Ursache zu diskutieren, da zuvor gezeigt werden konnte, dass eine systemische Infektion, in dieser Studie durch LPS-Injektionen hervorgerufen, den Abbau von A β durch Mikroglia im AD-Maus-Modell einschränkt (Tejera et al., 2019).

Die von A β ausgehende Neuroinflammation wird immer häufiger als Angriffspunkt neuer AD-Therapeutika diskutiert (Ahmad et al., 2019; Dong et al., 2019; Mangan et al., 2018). Zuvor zeigten sich unter Einsatz eines NLRP3-Inhibitors sowohl reduzierte Konzentrationen gelösten A β_{1-42} als auch eine verminderte Ablagerungs-Tendenz von A β im AD-Maus-Modell (Yin et al., 2018). Des Weiteren förderte eine NLRP3-Inhibition die A β -Phagozytose durch Mikroglia *in vitro* und verbesserte die kognitive Funktion in Verhaltensexperimenten (Dempsey et al., 2017; Heneka et al., 2013). Diese Ergebnisse weisen auf einen neuroprotektiven Effekt der NLRP3-Blockade hin. Auch bezogen auf die AD-Tauopathie bewirkte der Verlust von NLRP3 eine Reduktion der pathologischen Hyperphosphorylierung und Tau-Aggregation (Ising et al., 2019). Ausblickend wäre es deshalb von Interesse, unsere Experimente zu A β -Phagozytose und -Abbau unter NLRP3-Inflammasom-Inhibition zu wiederholen. Eine verbesserte A β -Phagozytose trotz ASC-Bindung könnte dabei ein mögliches Ergebnis darstellen. Ebenfalls interessant wäre es, das Bindungsverhalten von ASC-A β im AD-Maus-Modell zu studieren und die von uns *in vitro* durchgeführten Experimente mit *in vivo*-Versuchen zu korrelieren. Auch eine Unterbrechung der ASC-A β -Bindung könnte einen positiven Einfluss auf den Verlauf der AD bewirken, jedoch müssen zunächst weitere Untersuchungen erfolgen, bei denen die Interaktion beider Proteine näher entschlüsselt wird, um Angriffspunkte für potentielle Antikörper zu identifizieren.

1.5 Zusammenfassung

Exogenes ASC konnte nicht nur, wie zuvor gezeigt, von Makrophagen, sondern auch von Mikroglia in das zelleigene NLRP3-Inflammasom integriert werden und dort in seiner vollen Funktionalität Caspase-1 aktivieren. Im Rahmen dessen induzierte exogenes ASC ebenfalls die Formierung und Freisetzung mikroglia-eigener ASC specks. Extrazellulär lagerte sich A β entlang der ASC-Fibrillen an. Mikroglia reagierten auf diese ASC-A β -Aggregate mit einer massiven, TLR-abhängigen Stimulation der NLRP3-Kaskade bis hin zur Pyroptose. Im Rahmen der Pyroptose kam es wiederum zu einer Freisetzung von ASC specks, welche folglich durch Aktivierung umliegender Mikroglia einen schädigenden Kreislauf induzierten und amplifizierten (Abb. 6 aus Friker et al., 2020). Mikroglia nahmen sogar höhere Konzentrationen von exogenem ASC auf, wenn

dieses an A β gebunden war, und bildeten schneller ASC specks aus. Auch intrazellulär blieb die Bindung von ASC und A β bestehen. Wir vermuten deshalb eine Stabilisierung der ASC-Fibrille durch A β und somit eine Verstärkung des von A β ausgehenden proinflammatorischen Stimulus. Zudem wurde an ASC gebundenes A β deutlich langsamer phagozytiert und abgebaut. Es entstand ein Ungleichgewicht zwischen A β -Ablagerung und –Abbau durch inflammasom-aktivierte, schließlich durch Pyroptose untergehende Mikroglia. Unsere Ergebnisse repräsentieren einen weiteren Baustein zum Verständnis des Zusammenspiels von Mikroglia und A β in der Alzheimer-Pathologie. Das extrazelluläre Vorliegen von ASC durch eine vorausgegangene systemische Inflammation könnte durch die von uns beobachteten Mechanismen das Fortschreiten einer AD beschleunigen.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Ahmad MH, Fatima M, Mondal AC. Influence of microglia and astrocyte activation in the neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease: Rational insights for the therapeutic approaches. *J Clin Neurosci* 2019; 59: 6–11

Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia. London: Alzheimer's Disease International, 2019

Armstrong RA. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* 2019; 57: 87–105

Baik SH, Kang S, Son SM, Mook-Jung I. Microglia contributes to plaque growth by cell death due to uptake of amyloid β in the brain of Alzheimer's disease mouse model. *Glia* 2016; 64: 2274–2290

Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V, Latz E. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 2009; 183: 787-791

Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 99–109

Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* 1990; 27: 229-237

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

Cai Z, Hussain MD, Yan L-J. Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci* 2014; 124: 307–321

Casali BT, MacPherson KP, Reed-Geaghan EG, Landreth GE. Microglia depletion rapidly and reversibly alters amyloid pathology by modification of plaque compaction and morphologies. *Neurobiol Dis* 2020; 142: 104956

Chakrabarty P, Li A, Ladd TB, Strickland MR, Koller EJ, Burgess JD, Funk CC, Cruz PE, Allen M, Yaroshenko M, Wang X, Younkin C, Reddy J, Lohrer B, Mehrke L, Moore BD, Liu X, Ceballos-Diaz C, Rosario AM, Medway C, Janus C, Li HD, Dickson DW, Giasson BI, Price ND, Younkin SG, Ertekin-Taner N, Golde TE. TLR5 decoy receptor as a novel anti-amyloid therapeutic for Alzheimer's disease. *J Exp Med* 2018; 215: 2247–2264

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

Clayton KA, Van Enoo AA, Ikezu T. Alzheimer's Disease: The Role of Microglia in Brain Homeostasis and Proteopathy. *Front Neurosci* 2017; 11: 680

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

Dick MS, Sborgi L, Rühl S, Hiller S, Broz P. ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes. *Nat Commun* 2016; 7: 11929–11929

Doens D, Fernández PL. Microglia receptors and their implications in the response to amyloid β for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation* 2014; 11: 48–48

Dong Y, Li X, Cheng J, Hou L. Drug Development for Alzheimer's Disease: Microglia Induced Neuroinflammation as a Target? *Int J Mol Sci* 2019; 20: 558

Espay AJ, Vizcarra JA, Marsili L, Lang AE, Simon DK, Merola A, Josephs KA, Fasano A, Morgante F, Savica R, Greenamyre JT, Cambi F, Yamasaki TR, Tanner CM, Gan-Or Z, Litvan I, Mata IF, Zabetian CP, Brundin P, Fernandez HH, Standaert DG, Kauffman MA, Schwarzschild MA, Sardi SP, Sherer T, Perry G, Leverenz JB. Revisiting protein aggregation as pathogenic in sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. *Neurology* 2019; 92: 329–337

Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu J-W, Datta P, Miller B, Jankowski W, Rosenberg S, Zhang J, Alnemri ES. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1590–1604

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

Franklin BS, Latz E, Schmidt FI. The intra- and extracellular functions of ASC specks. *Immunol Rev* 2018; 281: 74–87

Freeman L, Guo H, David CN, Brickey WJ, Jha S, Ting JP-Y. NLR members NLRC4 and NLRP3 mediate sterile inflammasome activation in microglia and astrocytes. *J Exp Med* 2017; 214: 1351–1370

Giordano G, Hong S, Faustman EM, Costa LG. Measurements of Cell Death in Neuronal and Glial Cells. In: Costa LG, Giordano G, Guizzetti M, eds. *In Vitro Neurotoxicology: Methods and Protocols*. Totowa – New Jersey: Humana Press, 2011: 171–178

Giulian D, Baker T. Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci* 1986; 6: 2163

Götz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM. Formation of Neurofibrillary Tangles in P301L Tau Transgenic Mice Induced by A β 42 Fibrils. *Science* 2001; 293: 1491–1495

Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeva E, Majounie E, Cruchaga C, Sassi C, Kauwe JSK, Younkin S, Hazrati L, Collinge J, Pocock J, Lashley T, Williams J, Lambert JC, Amouyel P, Goate A, Rademakers R, Morgan K, Powell J, St George-Hyslop P, Singleton A, Hardy J. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2013; 368: 117–127

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

Hanisch U, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 2007; 10: 1387–1394

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

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

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

Hoss F, Rodriguez-Alcazar JF, Latz E. Assembly and regulation of ASC specks. *Cell Mol Life Sci* 2017; 74: 1211–1229

Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, Bohr VA. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 2019; 15: 565–581

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

Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, Shaw LM, Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD, Lesnick TG, Pankratz VS, Donohue MC, Trojanowski JQ. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol* 2013; 12: 207-216

Jay TR, von Saucken VE, Landreth GE. TREM2 in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurodegener* 2017; 12: 56–56

Jiang T, Zhang Y-D, Gao Q, Zhou J-S, Zhu X-C, Lu H, Shi J-Q, Tan L, Chen Q, Yu J-T. TREM1 facilitates microglial phagocytosis of amyloid beta. *Acta Neuropathol* 2016; 132: 667–683

Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, Jonsdottir I, Jonsson PV, Snaedal J, Bjornsson S, Huttenlocher J, Levey AI, Lah JJ, et al. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2013; 368: 107–116

Karmakar M, Katsnelson MA, Dubyak GR, Pearlman E. Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP. *Nat Commun* 2016; 7: 10555

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

Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM, Lamb BT. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)* 2018; 4: 575–590

Kleinberger G, Yamanishi Y, Suárez-Calvet M, Czirr E, Lohmann E, Cuyvers E, Struyfs H, Pettkus N, Wenninger-Weinzierl A, Mazaheri F, Tahirovic S, Lleó A, Alcolea D, Fortea J, Willem M, Lammich S, Molinuevo JL, Sánchez-Valle R, Antonell A, Ramirez A, Heneka MT, Sleegers K, van der Zee J, Martin JJ, Engelborghs S, Demirtas-Tatlidede A, Zetterberg H, Van Broeckhoven C, Gurvit H, Wyss-Coray T, Hardy J, Colonna M, Haass C. TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis. *Sci Transl Med* 2014; 6: 243ra86

Kumar V. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. *J Neuroimmunol* 2019; 332: 16-30

- Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 2014; 157: 1013-1022
- Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 397–411
- Letiembre M, Liu Y, Walter S, Hao W, Pfander T, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Fassbender K. Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: A similar pattern. *Neurobiol Aging* 2009; 30: 759–768
- Li Y, Fu T-M, Lu A, Witt K, Ruan J, Shen C, Wu H. Cryo-EM structures of ASC and NLRC4 CARD filaments reveal a unified mechanism of nucleation and activation of caspase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; 115: 10845–10852
- Liu S, Liu Y, Hao W, Wolf L, Kiliaan AJ, Penke B, Rube CE, Walter J, Heneka MT, Hartmann T, Menger MD, Fassbender K. TLR2 Is a Primary Receptor for Alzheimer's Amyloid β Peptide To Trigger Neuroinflammatory Activation. *J Immunol* 2012; 188: 1098-1107
- 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
- Long H, Zhong G, Wang C, Zhang J, Zhang Y, Luo J, Shi S. TREM2 Attenuates A β 1-42-Mediated Neuroinflammation in BV-2 Cells by Downregulating TLR Signaling. *Neurochemical Research* 2019; 44:1830-1839
- Lu A, Magupalli VG, Ruan J, Yin Q, Atianand MK, Vos MR, Schröder GF, Fitzgerald, KA, Wu, H, Egelman EH. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell* 2014; 156: 1193–1206
- Lučiūnaitė A, McManus RM, Jankunec M, Rácz I, Dansokho C, Dalgėdienė I, Schwartz S, Brosseron F, Heneka MT. Soluble A β oligomers and protofibrils induce NLRP3 inflammasome activation in microglia. *J Neurochem* 2020; e14945
- 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

McQuade A, Blurton-Jones M. Microglia in Alzheimer's Disease: Exploring How Genetics and Phenotype Influence Risk. *J Mol Biol* 2019; 431: 1805–1817

Monteleone M, Stanley AC, Chen KW, Brown DL, Bezbradica JS, von Pein JB, Holley, CL, Boucher D, Shakespear MR, Kapetanovic R, Rolfes V, Sweet MJ, Stow JL, Schroder K. Interleukin-1 β Maturation Triggers Its Relocation to the Plasma Membrane for Gasdermin-D-Dependent and -Independent Secretion. *Cell Rep* 2018; 24, 1425–1433

Moretti J, Blander JM. Increasing complexity of NLRP3 inflammasome regulation. *J Leukoc Biol* 2020; 1–11

Nakanishi A, Kaneko N, Takeda H, Sawasaki T, Morikawa S, Zhou W, Kurata M, Yamamoto T, Akbar SMF, Zako T, Masumoto J. Amyloid β directly interacts with NLRP3 to initiate inflammasome activation: identification of an intrinsic NLRP3 ligand in a cell-free system. *Inflamm Regen* 2018; 38: 27

N'Diaye E-N, Branda CS, Branda SS, Nevarez L, Colonna M, Lowell C, Hamerman JA, Seaman WE. TREM-2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) is a phagocytic receptor for bacteria. *J Cell Biol* 2009; 184: 215–223

Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Del Tredici K, Duyckaerts C, Frosch MP, Haroutunian V, Hof PR, Hulette CM, Hyman BT, Iwatsubo T, Jellinger KA, Jicha GA, Kövari E, Kukull WA, Leverenz JB, Love S, Mackenzie IR, Mann DM, Masliah E, McKee AC, Montine TJ, Morris JC, Schneider JA, Sonnen JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Wisniewski T, Woltjer RL, Beach TG. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012; 71: 362–381

Olson JK, Miller SD. Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs. *J Immunol* 2004; 173: 3916–3924

Paouri E, Georgopoulos S. Systemic and CNS Inflammation Crosstalk: Implications for Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 2019; 16: 559–574

Rathinam VAK, Zhao Y, Shao F. Innate immunity to intracellular LPS. *Nat Immunol* 2019; 205: 527–533

Saadi M, Karkhah A, Pourabdolhossein F, Ataie A, Monif M, Nouri HR. Involvement of NLRC4 inflammasome through caspase-1 and IL-1 β augments neuroinflammation and contributes to memory impairment in an experimental model of Alzheimer's like disease. *Brain Res Bull* 2020; 154: 81-90

Sala Frigerio C, Wolfs L, Fattorelli N, Thrupp N, Voytyuk I, Schmidt I, Mancuso R, Chen W-T, Woodbury ME, Srivastava G, Möller T, Hudry E, Das S, Saido T, Karran E, Hyman B, Perry VH, Fiers M, De Strooper B. The Major Risk Factors for Alzheimer's Disease: Age, Sex, and Genes Modulate the Microglia Response to A β Plaques. *Cell Rep* 2019; 27: 1293-1306

Sarlus H, Heneka MT. Microglia in Alzheimer's disease. *J Clin Investig* 2017; 127: 3240–3249

Scheiblich H, Schlütter A, Golenbock DT, Latz E, Martinez-Martinez P, Heneka MT. Activation of the NLRP3 inflammasome in microglia: the role of ceramide. *J Neurochem* 2017; 143: 534–550

Sebastian Monasor L, Müller SA, Colombo AV, Tanrioever G, König J, Roth S, Liesz A, Berghofer A, Piechotta A, Prestel M, Saito T, Saido TC, Herms J, Willem M, Haass C, Lichtenthaler SF, Tahirovic S. Fibrillar A β triggers microglial proteome alterations and dysfunction in Alzheimer mouse models. *eLife* 2020; 9: e54083

Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, Kalantari P, Ramkhelawon B, Carpenter SB, Becker CE, Ediriweera HN, Mullick AE, Golenbock DT, Stuart LM, Latz E, Fitzgerald KA, Moore KJ. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol* 2013; 14: 812–820

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

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

Stutz A, Horvath GL, Monks BG, Latz E. (2013). ASC Speck Formation as a Readout for Inflammasome Activation. In: De Nardo CM, Latz E, eds. *The Inflammasome: Methods and Protocols*. Totowa – New Jersey: Humana Press 2013: 91–101

Tejera D, Mercan D, Sanchez-Caro JM, Hanan M, Greenberg D, Soreq H, Latz E, Golenbock D, Heneka MT. Systemic inflammation impairs microglial A β clearance through NLRP3 inflammasome. *EMBO J* 2019; 38: e101064

Terrill-Usery SE, Mohan MJ, Nichols MR. Amyloid- β (1-42) protofibrils stimulate a quantum of secreted IL-1 β despite significant intracellular IL-1 β accumulation in microglia. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842: 2276–2285

Tian Y, Meng L, Zhang Z. What is strain in neurodegenerative diseases? *Cell Mol Life Sci* 2020; 77: 665–676

Ulland TK, Song WM, Huang SC, Ulrich JD, Sergushichev A, Beatty WL, Loboda AA, Zhou Y, Cairns NJ, Kambal A, Loginicheva E, Gilfillan S, Cella M, Virgin HW, Unanue ER, Wang Y, Artyomov MN, Holtzman DM, Colonna M. TREM2 Maintains Microglial Metabolic Fitness in Alzheimer's Disease. *Cell* 2017; 170: 649-663

Ulrich JD, Holtzman DM. TREM2 Function in Alzheimer's Disease and Neurodegeneration. *ACS Chem Neurosci* 2016; 7: 420–427

Venegas C, Heneka MT. Inflammasome-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *FASEB J* 2019; 33: 13075–13084

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- β in Alzheimer's disease. *Nature* 2017; 552: 355-361

Walter S, Letiembre M, Liu Y, Heine H, Penke B, Hao W, Bode B, Manietta N, Walter J, Schulz-Schüffer W, Fassbender K. Role of the Toll-Like Receptor 4 in Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Cell Physiol Biochem* 2007; 20: 947–956

Wang B, Bhattacharya M, Roy S, Tian Y, Yin Q. Immunobiology and structural biology of AIM2 inflammasome. *Mol Aspects Med* 2020; 100869

Xiang X, Werner G, Bohrmann B, Liesz A, Mazaheri F, Capell A, Feederle R, Knuesel I, Kleinberger G, Haass C. TREM2 deficiency reduces the efficacy of immunotherapeutic amyloid clearance. *EMBO Mol Med* 2016; 8: 992–1004

Yin J, Zhao F, Chojnacki JE, Fulp J, Klein WL, Zhang S, Zhu X. NLRP3 Inflammasome Inhibitor Ameliorates Amyloid Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 2018; 55: 1977-1987

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

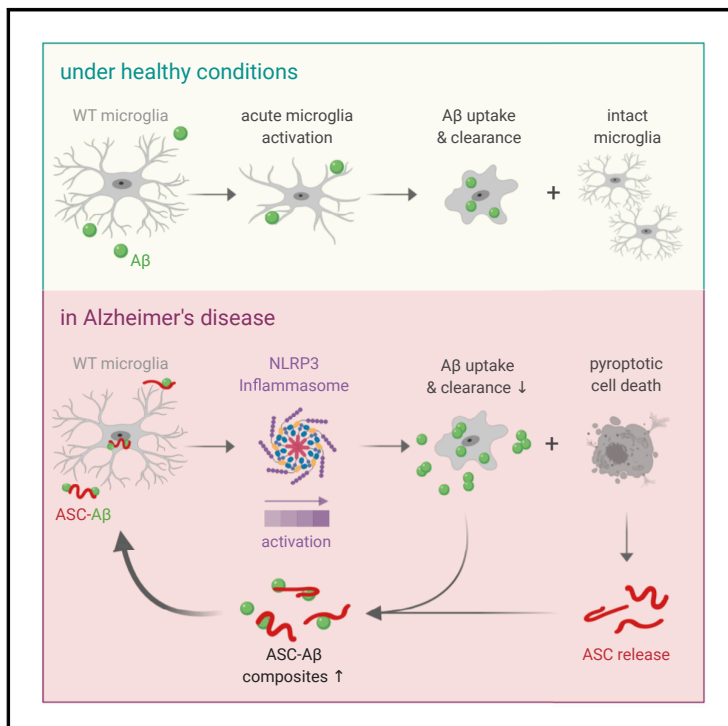
2. Veröffentlichung

Article

Cell Reports

 β -Amyloid Clustering around ASC Fibrils Boosts Its Toxicity in Microglia

Graphical Abstract



Authors

Lea L. Friker, Hannah Scheiblich,
Inga V. Hochheiser, ..., Eicke Latz,
Matthias Geyer, Michael T. Heneka

Correspondence

michael.heneka@ukbonn.de

In Brief

Friker et al. investigate the reaction of primary microglia to exogenous ASC and ASC-A β composites. They uncover a vicious circle involving amplified NLRP3 inflammasome activity and reduced A β clearance in the presence of ASC that might play a key role in Alzheimer's disease progression.

Highlights

- Exogenous ASC can be incorporated by the NLRP3 inflammasome of the recipient microglia
- A β binding to ASC fibrils amplifies NLRP3 inflammasome activity
- Microglia exposed to ASC-A β composites undergo pyroptotic cell death
- Intra- and extracellular ASC-A β binding impairs A β clearance by microglia

Friker et al., 2020, Cell Reports 30, 3743–3754
March 17, 2020 © 2020 The Author(s).
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.025>

CellPress

β -Amyloid Clustering around ASC Fibrils Boosts Its Toxicity in Microglia

Lea L. Friker,¹ Hannah Scheiblich,¹ Inga V. Hochheiser,⁴ Rebecca Brinkschulte,⁴ Dietmar Riedel,⁵ Eicke Latz,⁶ Matthias Geyer,⁴ and Michael T. Heneka^{1,2,3,7,*}

¹Department of Neurodegenerative Disease and Gerontopsychiatry/Neurology, University of Bonn Medical Center, 53127 Bonn, Germany

²German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), 53127 Bonn, Germany

³Department of Infectious Diseases and Immunology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01655, USA

⁴Institute of Structural Biology, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany

⁵Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Department of Structural Dynamics, 37077 Göttingen, Germany

⁶Institute of Innate Immunity, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany

⁷Lead Contact

*Correspondence: michael.heneka@ukbonn.de

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.025>

SUMMARY

Alzheimer's disease is the world's most common neurodegenerative disorder. It is associated with neuroinflammation involving activation of microglia by β -amyloid (A β) deposits. Based on previous studies showing apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) binding and cross-seeding extracellular A β , we investigate the propagation of ASC between primary microglia and the effects of ASC-A β composites on microglial inflammasomes and function. Indeed, ASC released by a pyroptotic cell can be functionally built into the neighboring microglia NOD-like receptor protein (NLRP3) inflammasome. Compared with protein-only application, exposure to ASC-A β composites amplifies the proinflammatory response, resulting in pyroptotic cell death, setting free functional ASC and inducing a feedforward stimulating vicious cycle. Clustering around ASC fibrils also compromises clearance of A β by microglia. Together, these data enable a closer look at the turning point from acute to chronic A β -related neuroinflammation through formation of ASC-A β composites.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most common dementing illness, characterized by progressive memory decline and cognitive dysfunction (Zvěřová, 2019). The pathological hallmarks of AD are deposition of extracellular β -amyloid (A β) and intraneuronal aggregation of neurofibrillary tangles composed of the microtubule-associated protein tau (Nelson et al., 2012). Under healthy conditions, the balance of A β and tau deposition and clearance is maintained by brain-resident microglia. However, in the AD brain, this equilibrium is shifted toward protein deposition (Sarlus and Heneka 2017; Heneka et al. 2015).

As resident immune effector cells of the CNS, microglia play a crucial role in mediating brain homeostasis and the innate

immune response against a wide range of pathogenic factors (Clayton et al., 2017; Hanisch and Kettenmann, 2007). Microglia sense a variety of microbial molecules called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) but also host-derived danger-associated molecular patterns (DAMPs) by pattern recognition receptors (PRRs). PRR ligation then fuels signaling transduction pathways that induce an inflammatory response and also lead to clearance of debris by phagocytosis (Heneka et al., 2014). Recognition of oligomeric of fibrillar A β , which either serves as a PAMP or a DAMP (Terrill-Usery et al., 2014), rapidly triggers NLRP3 inflammasome activation (Halle et al., 2008; Kinney et al., 2018). Furthermore, NLRP3 inflammasome activation relies on two signals: transcriptional upregulation of inflammasome components via the transcription factor nuclear factor κ B (NF- κ B) (Kawai and Akira, 2010) and a second signal generated by DAMP-induced ion fluxes, mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production, or lysosomal destabilization, which, in turn, leads to assembly and activation of the inflammasome (Yang et al., 2019).

The NLRP3 inflammasome is a multiprotein complex in which the receptor protein NLRP3 is bridged to the zymogen pro-caspase-1 via the adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC). Upon dimerization, caspase-1 becomes activated by auto-processing, which, in turn, leads to cleavage of pro-inflammatory cytokines such as pro-interleukin-1 β (pro-IL-1 β) and pro-IL-18 (Boucher et al., 2018). In addition, caspase-1 cleaves Gasdermin D (GSDMD), a pyroptosis executioner protein (Bergsbaken et al., 2009), resulting in formation of pores in the plasma membrane and leading to cell lysis because of ion flux and subsequent cytosolic swelling (Liu et al., 2016). Moreover, GSDMD-induced pore-formation results in release of IL-1 β into the extracellular space (Rathinam et al., 2019).

The adaptor protein ASC is composed of a N-terminal pyrin domain (PYD) and a C-terminal caspase recruitment domain (CARD) (Franklin et al., 2018). Homotypic intramolecular PYD-PYD interactions initiate formation of a helical filament, which allows intermolecular CARD-CARD interactions with the CARD domain of pro-caspase-1, causing its activation to form mature caspase-1 (Fernandes-Alnemri et al., 2007). Moreover, it has been demonstrated previously that ASC accumulates in

cell-free supernatants of inflammasome-activated macrophages and build up ASC aggregates called ASC specks. Extracellular ASC specks have the ability to recruit and activate pro-caspase-1 and pro-IL-1 β in cell cytosol or cell-free supernatant, further referred to as “prion-like” activities of ASC (Franklin et al., 2014). In Alzheimer’s pathology, rapidly after being released, A β_{1-42} binds ASC specks and accelerates its oligomerization, indicating cross-seeding activity of ASC in A β aggregation (Venegas et al., 2017).

Here we aimed to investigate the effects of ASC-A β composites on NLRP3 inflammasome activation in primary mouse microglia. We show that exogenous ASC induces ASC-dependent mechanisms in otherwise ASC-deficient microglia. Moreover, ASC-A β composites amplified NLRP3 inflammasome activation in comparison with ASC only or A β , resulting in pyroptotic cell death. In addition, we show that A β clearance by microglia is impaired in the presence of extracellular ASC aggregates, suggesting a possible mechanism involved in A β deposition in AD. Taken together, our findings indicate that A β clustering around ASC fibrils boosts its toxicity in microglia.

RESULTS

A β monomers have been shown to associate and cluster onto ASC specks in the extracellular space (Venegas et al., 2017). To reproduce previous findings in our experimental setup, we co-incubated ASC with an about 3-fold molar excess of A β in serum-free medium or buffer (Figure 1A). Binding of both proteins was confirmed by transmission electron microscopy (TEM) (Figures 1B–1D) and co-immunoprecipitation (coIP) (Figure 1E).

In electron microscopy (EM), ASC was seen to arrange into long, slightly twisted helical filaments showing a uniform surface (Figure 1B). In contrast, A β formed oligomeric complexes (Figure 1C) that were found in close association with ASC fibrils when co-incubated (Figure 1D). These data were confirmed by coIP analysis using anti-ASC and anti-A β specific antibodies, respectively, indicating interaction of ASC and A β in a cell-free environment (Figure 1E).

To analyze the effect of these ASC-A β composites on cell survival in primary microglia, lipopolysaccharide (LPS)-primed cells were treated with ASC $_{1.75\mu\text{M}}$, A $\beta_{5\mu\text{M}}$, or ASC $_{1.75\mu\text{M}}$ -A $\beta_{5\mu\text{M}}$ composites for 12 h and 24 h, respectively (Figure 1F). Release of lactate dehydrogenase (LDH) in response to ASC-A β treatment was used as an indicator of cell death (Giordano et al., 2011). Irrespective of LPS priming, microglia exposed to ASC-A β composites showed a significant increase in LDH release compared with ASC or A β alone (Figure 1G). Interestingly, the metabolic activity in microglia treated with ASC-A β composites did not change within 12 h but was significantly reduced after 24 h compared with ASC- or A β -treated cells (Figure 1H).

ASC-A β Composites Activate the NLRP3 Inflammasome and Induce Pyroptotic Cell Death in Microglia

To study whether the observed cell death of microglia in response to ASC-A β composite treatment originates from pyroptosis, we correlated NLRP3 inflammasome activation. As expected, LPS treatment of microglia induced priming of the

inflammasome, as shown by an increased expression level of the receptor protein NLRP3 in the cell lysate, whereas the levels of pro-caspase-1 remained unaltered (Figures 2A, 2B, and 2D). Interestingly, caspase-1 cleavage was significantly increased in response to ASC-A β composite treatment in both cell lysates (Figures 2C and 2D) and supernatants (Figures 2K and 2L). Moreover, significantly higher levels of ASC were detected in cell lysates of the composite-treated group in comparison with ASC only, occurring with all detected ASC aggregates: ASC-mCherry, ASC dimers, and ASC monomers (Figures 2E–2H). In contrast, microglia supernatants showed higher levels of ASC monomer after composite treatment (Figures 2J and 2L), whereas dimers stayed constant (Figures 2I and 2L).

To discriminate between cell-derived and recombinant human ASC used for cell treatment, a mouse-specific anti-ASC antibody was applied to visualize ASC aggregation and speck release into the extracellular environment (Figure S1). In addition to ASC speck formation, we observed morphological changes in microglia in the course of ASC speck formation. ASC-expressing microglia displayed a ramified shape, whereas microglia retracted their processes, resulting in a more activated phenotype during ASC speck formation. ASC speck-releasing cells were further found to undergo transformation, resulting in a highly activated phenotype, potentially indicating pyroptosis.

To monitor the release of IL-1 β into the extracellular space as a consequence of ASC speck formation and subsequent caspase-1 maturation, we performed ELISA experiments after 12 and 24 h of treatment (Figure 3A). ASC only as well as ASC-A β composites led to a significant increase in IL-1 β release after both time points compared with A β alone. Interestingly, ASC-A β composites significantly augmented IL-1 β levels compared with ASC only (\sim 2.6-fold after 12 h and \sim 1.8-fold after 24 h). The highest absolute IL-1 β levels were determined after 12 h of treatment; hence, the following experiments were performed using this time point only.

Besides cleavage of pro-IL1 β and pro-IL-18, caspase-1 also cleaves GSDMD, which subsequently forms GSDMD pores that facilitate secretion of mature IL-1 β into the supernatant (Rathinam et al., 2019). To monitor the effect of ASC-A β composites on cleavage of GSDMD, the levels of full-length and amino-terminal GSDMD (NTD) in response to the respective treatment were determined by western blotting (Figures 3B–3D). Interestingly, treating the cell with ASC-A β composites largely induced GSDMD cleavage in microglia (Figures 3C and 3D), which is in line with the IL-1 β release we detected by ELISA readings (Figure 3A).

To elucidate the underlying mechanism by which ASC-A β composites activate the NLRP3 inflammasome, we tested for involvement of Toll-like receptors (TLRs) because these receptors have been found to play a key role in neuroinflammation (Kumar, 2019). To analyze the effect of TLR2, TLR4, and TLR5, release of IL-1 β was determined in LPS-primed microglia exposed to ASC-A β composites in the presence or absence of TLR-neutralizing antibodies (Figure 3E). Here we show that TLR2 and TLR4 neutralization significantly decreased release of IL-1 β . In contrast, inhibition of TLR5 slightly increased IL-1 β levels in the supernatant. The corresponding immunoglobulin G (IgG) isotype controls did not have any effect.

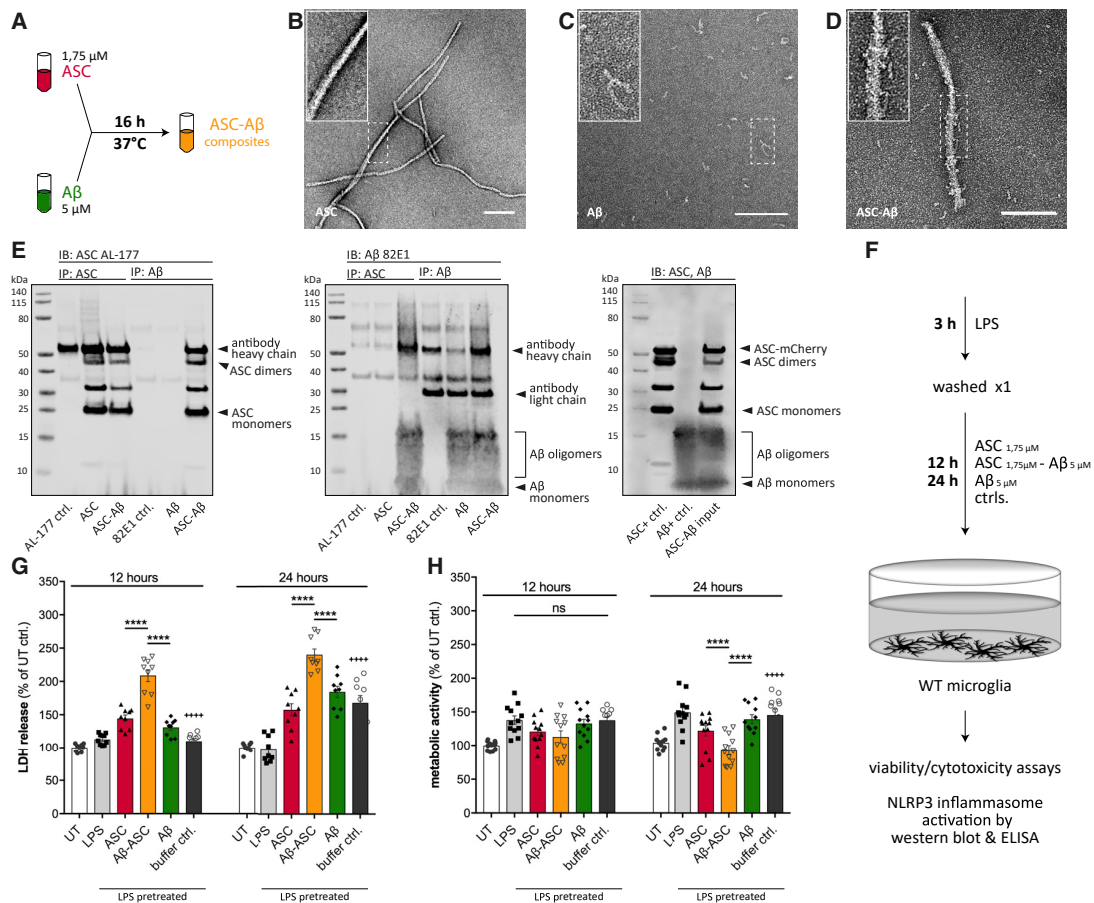


Figure 1. A β Clusters around ASC Fibrils, Forming ASC-A β Composites that Induce Cell Death

(A) Schematic drawing of the ASC-A β composite-building protocol.

(B–D) EM of ASC fibrils (B), A β (C), and ASC-A β composites (D).

(E) colIP of pre-incubated ASC and A β , confirming binding of ASC to A β and formation of composites. Left: immunoblot (IB), ASC (AL-177). Center: IB, A β (82E1). Right: IB input control.

(F) Schematic drawing of the experimental setup used in this study.

(G and H) LDH release (G) and metabolic activity (H) measurements after 12 and 24 h of treatment with different components.

Data were collected from three independent experiments ($n = 3$) with three technical replicates per assay ($N = 9$). All graphs are presented as mean \pm SEM and were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Levels of significance are indicated as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Asterisks indicate significance between groups connected by lines; plus symbols indicate significance between ASC-A β composites and volume-equal buffer control-treated groups.

Scale bars, 200 nm (B–D).

To determine whether release of IL-1 β in response to ASC-A β composites is NLRP3 dependent, we again co-treated microglia with ASC-A β composites and the specific NLRP3 inhibitors CRID3 (MCC950) and IFM-2384 (Figure 3F). As expected, co-treatment with both inhibitors led to a significant reduction in IL-1 β release by about 40%. To determine whether IL-1 β (Figure 3F) was processed, we performed an immunoblot analysis of supernatants (Figure S2E). We found that CRID3 and IFM-2384 treatment decreased the release of mature IL-1 β from microglia but detected continuously high amounts of pro-IL-1 β in the supernatants. In addition, immunoblot analysis consistently detected an additional unconventional precursor form of pro-IL-1 β at around 25 kDa (p25) besides the conventional

31 kDa (p31) form. These data confirm that high amounts of pro-IL-1 β were released and detected by our ELISAs.

IL-1 β Release Induced by ASC-A β Composites Depends on ASC's Fibrillation Ability

To determine whether activation of the NLRP3 inflammasome and the subsequent increase in IL-1 β release is dependent on the fibrillation potential of ASC, we generated an ASC variant incapable of filament formation. Indeed, TEM revealed that mutant ASC carrying three mutations within the PYD interface (K21E, K22E, and K26E) and two mutations within the CARD domain (D134R and Y187E) lacks filament formation (Figure 3G). Interestingly, ASC-A β composites containing mutated ASC

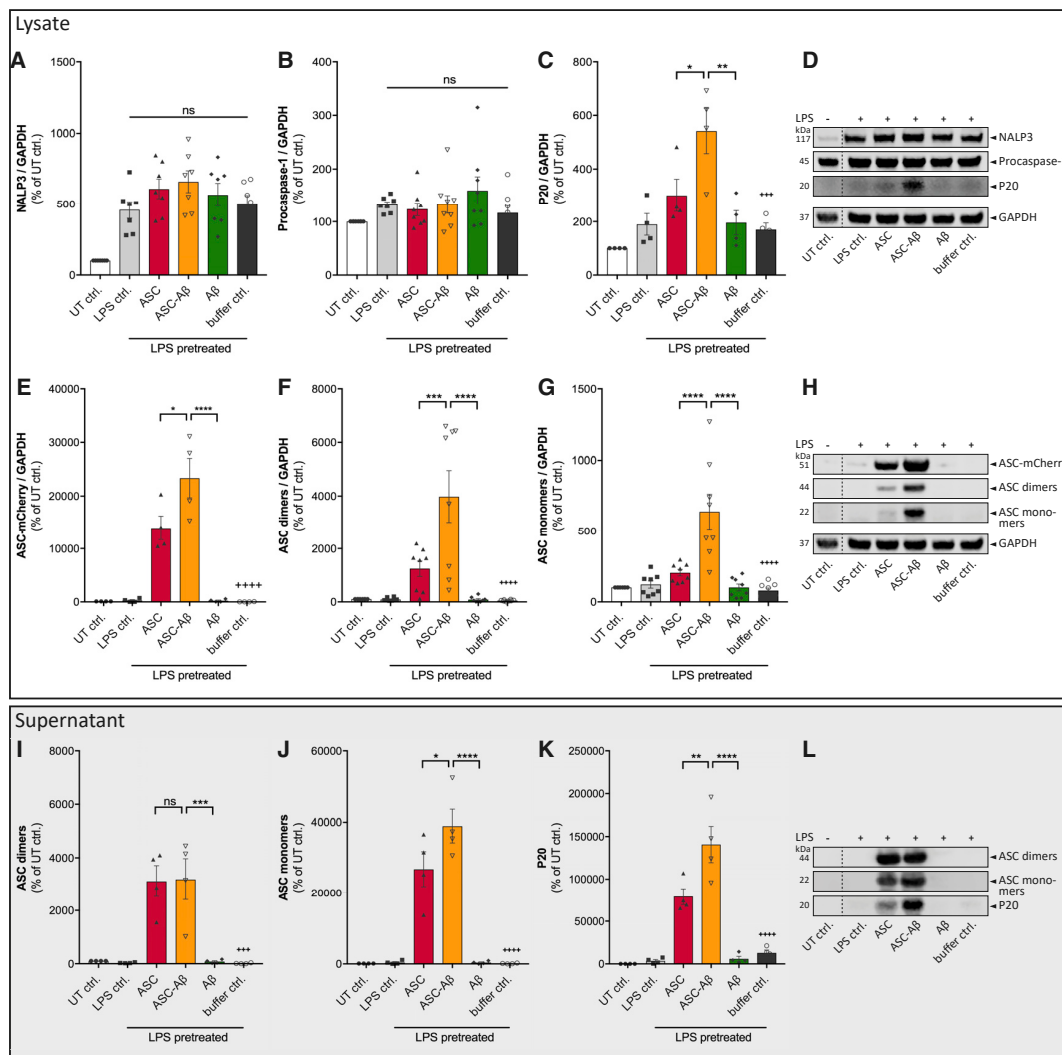


Figure 2. ASC-A β Composites Induce Caspase-1 Cleavage to a Greater Extent Than ASC or A β Alone

(A–C and E–G) IB analysis and quantification of cell lysates of primary WT microglia primed for 3 h with 100 ng/mL LPS and exposed to ASC, A β , or ASC-A β composites for 12 h. Blots of cell lysates of primary WT microglia (D and H) were stained for NLRP3 (A), caspase-1 (B and C), different conformations of ASC (E–G), and GAPDH.

(I–K) IB analysis using precipitated supernatants (L) were stained for ASC dimers (I), ASC monomers (J), and cleaved caspase-1 subunit p20 (K).

Empty wells and wells containing experimental samples that are not part of this study are not displayed. Vertical lines in blots indicate spliced sections (D, H, and L). For better reader convenience, the GAPDH signal, which belongs to the same original blot, has been separated in (D) and (H). Data were collected from four (C, E, I, J, and K) or eight (A, B, F, and G) independent experiments ($n = 4$ or 8). All graphs are presented as mean \pm SEM and were analyzed by one-way ANOVA in conjunction with Tukey's test (A, B, E–G, and I–K) and Kruskal-Wallis test combined with a Dunn's post hoc test (C). Levels of significance are indicated as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Asterisks indicate significance between groups connected by lines; plus symbols indicate significance between ASC-A β composites and volume-equal buffer control-treated groups.

See also Figure S1.

induced only half of the IL-1 β release measured after treating the cells with non-mutated ASC-A β composites (Figure 3H).

Exogenous ASC Induces Caspase-1 Cleavage and IL-1 β Release in ASC-Deficient Microglia

ASC is known to possess prion-like activity as it propagates from a pyroptotic macrophage to another recipient cell while preser-

ving its activity. Moreover, accumulation of extracellular ASC specks has been shown to induce IL-1 β maturation in bone marrow-derived macrophages (Franklin et al., 2014). To investigate whether similar prion-like activity of ASC can be observed in microglia, we treated ASC-deficient macrophages and ASC-deficient primary microglia with exogenously applied recombinant ASC (Figure 4). To mimic a second stimulus for NLRP3

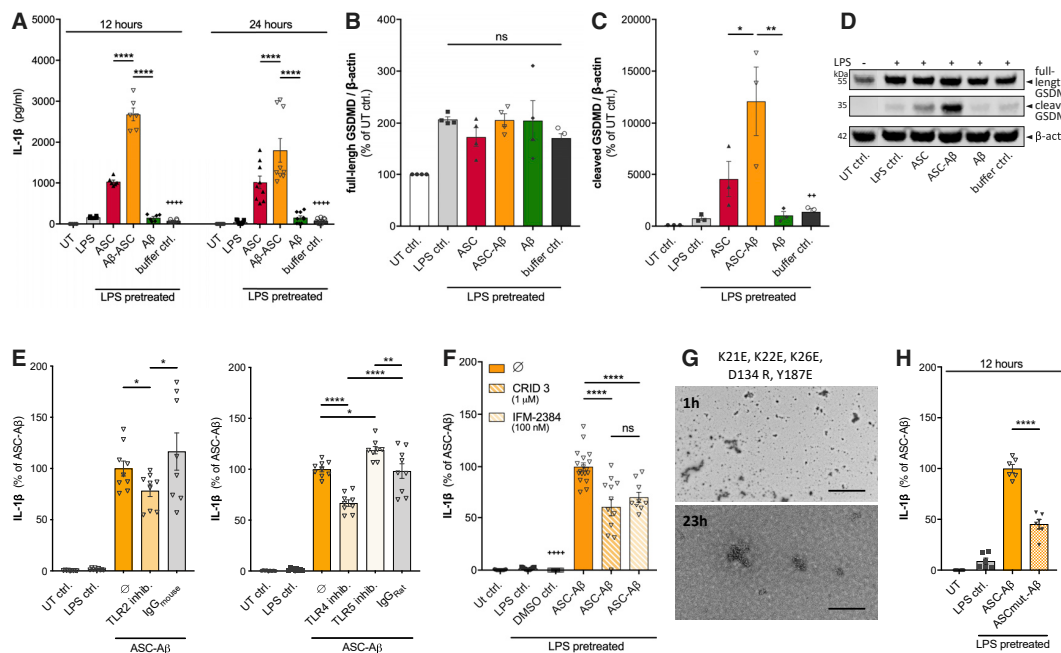


Figure 3. ASC-A β Composites Induce IL-1 β by TLR2 and TLR4 Ligation, a Process Dependent on ASC's Fibrillation Ability

(A) IL-1 β levels in conditioned medium of primary microglia after 12 and 24 h of exposure to ASC, A β , or ASC-A β composites ($n = 3$ independent experiments with triplicate treatments for all conditions).

(B–D) IB analysis and quantification of full-length Gasdermin D (GSDMD; $n = 3$; B and D) and cleaved NTD ($n = 4$; C and D). Empty wells and wells containing experimental samples, which are not part of this study are not displayed. Vertical lines in blots indicate spliced sections (D).

(E) IL-1 β levels in conditioned medium of primary microglia treated for 12 h with TLR2-, TLR4-, and TLR5-neutralizing antibodies as well as the respective IgG isotype controls in parallel to stimulation with ASC, A β , or ASC-A β composites ($n = 3$ independent experiments with triplicate treatments for all conditions).

(F) IL-1 β levels in conditioned medium of primary microglia after NALP3 inflammasome inhibition using CRID3 or IFM-2384 ($n = 3$ independent experiments with triplicate treatments for all conditions).

(G) EM of ASC carrying PYD (K21E, K22E, and K26E) and CARD (D134R and Y187E) mutations after 1 and 23 h of incubation at 37°C.

(H) IL-1 β levels in conditioned medium of primary microglia treated with ASC-A β composites or mutated ASC pre-incubated with A β ($n = 3$ independent experiments with duplicate treatments for all conditions).

All graphs are presented as mean \pm SEM and were analyzed by two-way ANOVA (A) or one-way ANOVA (B–H) in conjunction with Tukey's test. Levels of significance are indicated as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Asterisks indicate significance between groups connected by lines; plus symbol indicate significance between ASC-A β composites and volume-equal buffer control-treated groups. Scale bar, 2 μ m (G, upper panel) and 200 nm (G, lower panel).

See also [Figures S1](#) and [S2](#).

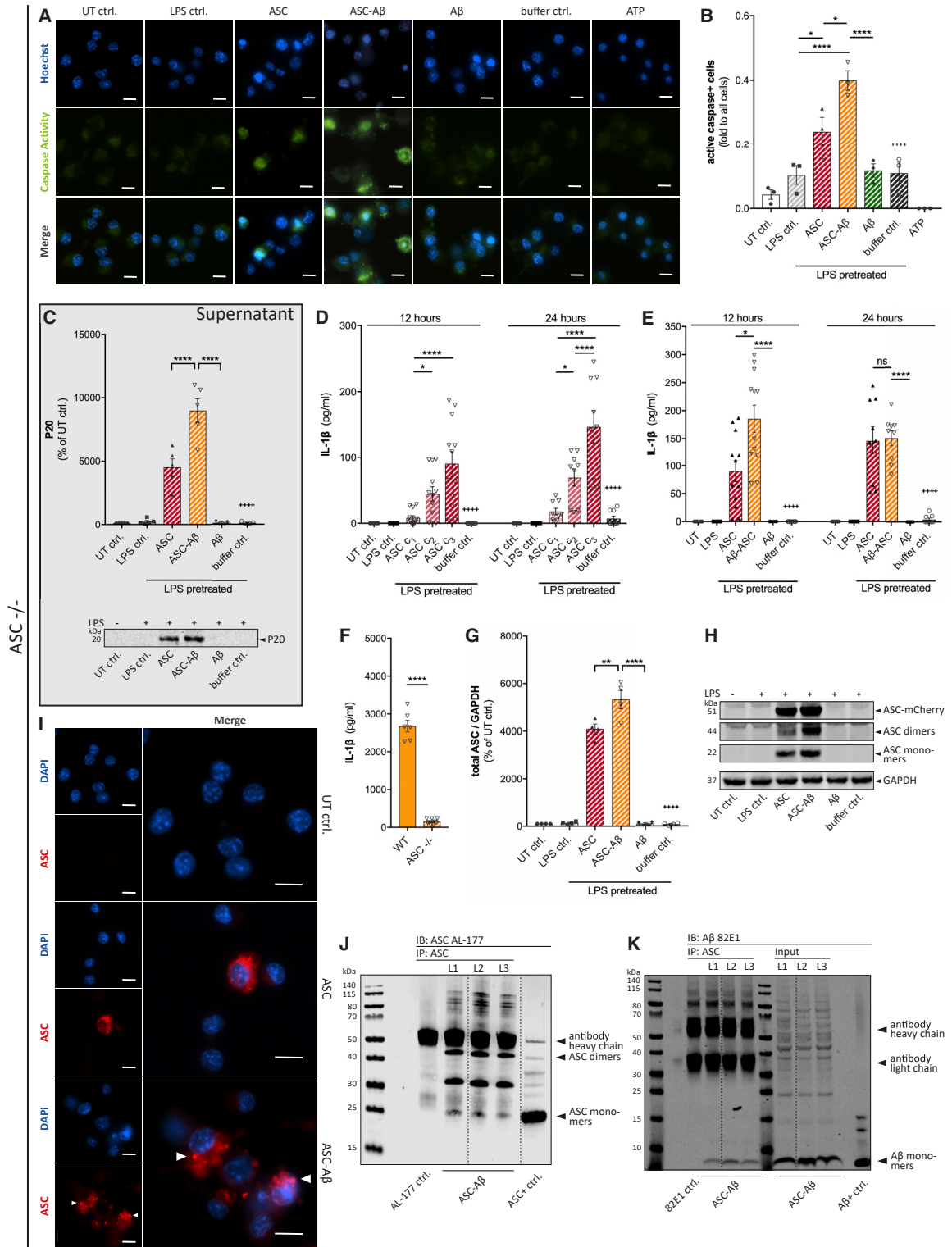
inflammasome activation, adenosine triphosphate (ATP) was used as a positive control ([Karmakar et al., 2016](#)). As expected, ATP induced caspase-1 activation in wild-type (WT) cells (data not shown) but not in ASC-deficient macrophages ([Figures 4A](#) and [4B](#)). Interestingly, exogenously applied ASC largely induced caspase-1 activity. In line with our data, we detected the highest levels of caspase-1 activity in macrophages that were exposed to ASC-A β composites ([Figure 3B](#)). Using ASC-deficient microglia, we measured significantly increased levels of the auto-processed caspase-1 fragment p20 in cell supernatants of cells treated with ASC and ASC-A β composites ([Figure 4C](#)). Again, treatment with ASC-A β composites amplified caspase-1 cleavage by about 2-fold compared with ASC treatment alone.

Most importantly, exogenously applied ASC induced IL-1 β release in ASC-deficient microglia in a dose- and time-dependent manner ([Figure 4D](#)). After 12 h, ASC-A β composites elevated IL-1 β release nearly 2-fold compared with ASC only.

However, there was no significant difference remaining after 24 h ([Figure 4E](#)). When comparing the total extent of IL-1 β measured in ASC-deficient versus WT microglia, is noticeable that the tendencies of differently treated groups are similar in both genotypes, although total IL-1 β levels are reduced to approximately 10% in ASC-deficient cells ([Figure 4F](#)).

As expected, cell lysates of ASC-deficient microglia exposed to exogenous ASC showed high total ASC levels ([Figures 4G](#) and [4H](#)). Interestingly, microglia treated with ASC-A β composites contained significantly more ASC compared with ASC-only-treated cells.

Next we aimed to investigate whether exogenously applied ASC, when taken up by ASC-deficient cells, still possesses the ability to form intracellular ASC specks. Indeed, exposure of macrophages to ASC increased the number of ASC-positive cells, which was further enhanced in the ASC-A β composite-treated group ([Figure 4I](#)). Moreover, by visualization of



(legend on next page)

internalized ASC, we saw that speck formation was further amplified when cells were treated with ASC-A β composites (Figure 4 I, bottom panel).

The interaction of ASC and A β in cell lysates of ASC-deficient microglia was still preserved, as shown in colP experiments (Figures 4 J and 4 K). Interestingly, higher quantities of ASC dimers than ASC monomers were detected in lysates of cells treated with ASC-A β composites (Figure 4 J).

ASC Binding Exacerbates Uptake of A β and Decelerates Its Degradation

Microglia play an outstanding role in amyloid clearance in the healthy brain but also during AD progression (Baik et al., 2016; Cho et al., 2014). Thus, we analyzed the potential effect of ASC-A β binding on phagocytic clearance of A β by primary microglia. To quantify the engulfment of A β , we treated microglia either with fluorescein (FAM)-labeled A β or ASC-FAM-A β composites and assessed the uptake of A β using fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis (Figure S2A). Interestingly, in the presence of ASC-A β composites, uptake of A β was decreased by about 35% after 1 h compared with primary microglia treated with A β only (Figures 5A–5C).

In addition to phagocytic uptake, we determined the degradation capacity of microglia to prove an imbalance in uptake and degradation. We found that microglia constantly degrade A β in a time-dependent manner with a degradation rate of about 20%–25% per hour (Figures 5D and 5E). In contrast, when microglia were exposed to ASC-FAM-A β composites, uptake was largely diminished, and degradation was fully blocked (Figures 5D and 5E). We confirmed these findings using immunoblot analysis of cell lysates collected after an allowed degradation time of 12 h (Figure S2B).

A common factor implicated in a number of cellular processes, including phagocytosis, proliferation, survival, and regulation of inflammatory cytokine production, is the receptor TREM2 (Ulrich and Holtzman, 2016). Consequently, we checked for changes in TREM2 expression levels by western blot (Figures S2C and S2D). Interestingly, TREM2 expression was decreased in cells treated with ASC-A β , indicative of a modulatory effect of ASC-A β composites on TREM2 activity. Our data indicate an ASC-A β -induced imbalance between uptake and degradation, resulting in deposition of cytotoxic protein accumulation intra- and extracellularly.

DISCUSSION

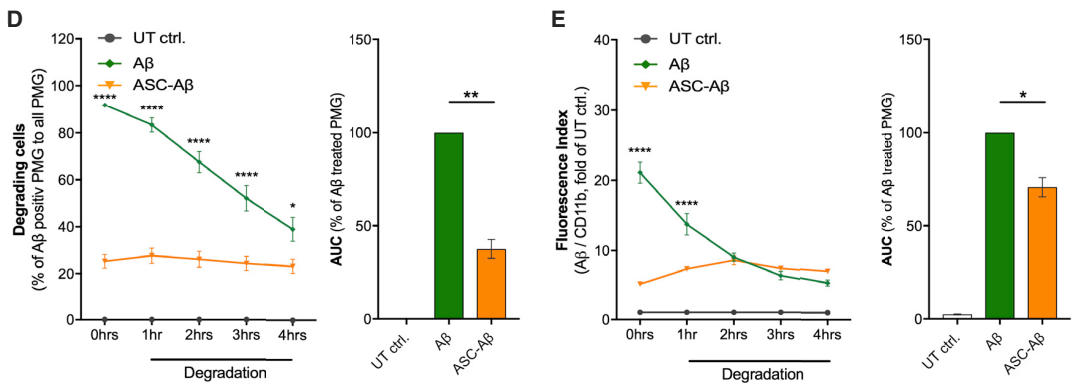
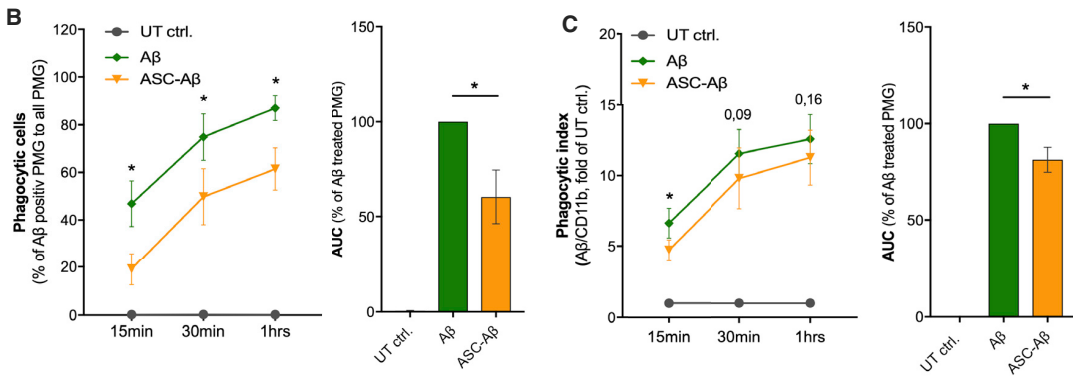
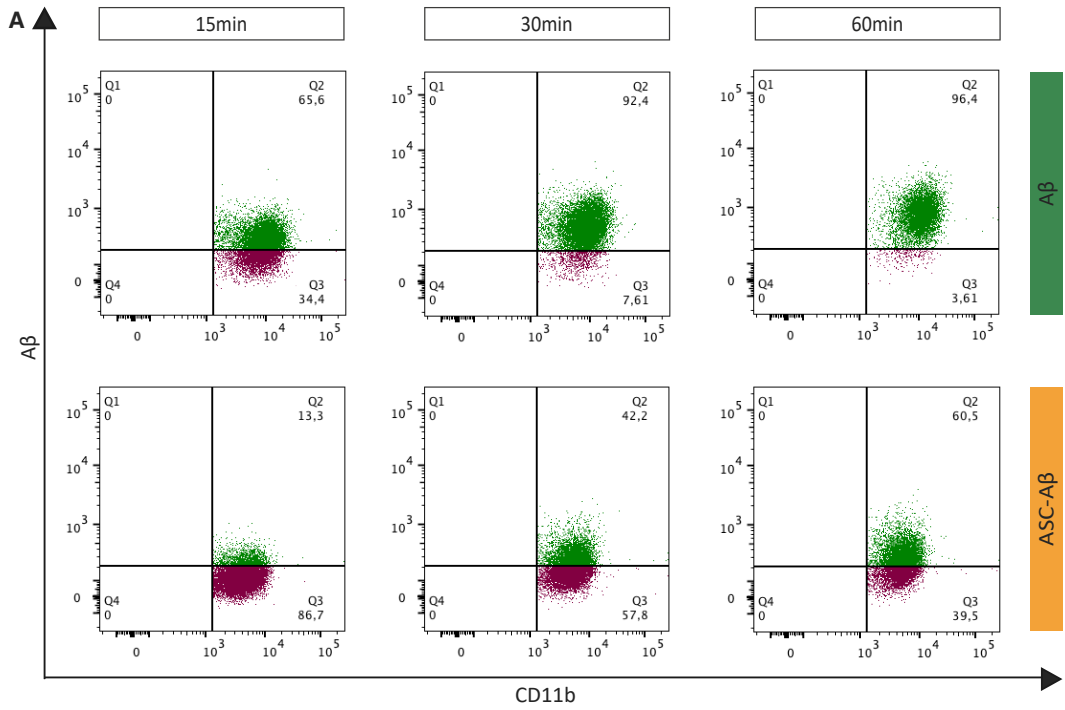
The link between A β deposition and microglial dysfunction has already been studied extensively (Cai et al., 2014; Sarlus and Heneka, 2017). Unravelling the underlying pathway, we identified ASC as a key player (Venegas et al., 2017). Our previous study found expression of ASC to be increased in an Alzheimer's disease mouse model compared with a WT control. Moreover, ASC was shown to rapidly interact with pathogenic A β _{1–42} extracellularly, suggested to underlie microglial dysfunction. Data showing a direct connection between ASC-A β composites leading to microglial dysfunction are still pending; hence, we aimed to unravel the resulting cellular effects on microglia exposed to A β -ASC composites. Indeed, our present study revealed severe toxicity emanating from ASC-A β composites compared ASC only or A β . Microglia exposed to ASC-A β subsequently underwent cell death, displaying increased LDH release (Figure 1G) and reduced metabolic activity (Figure 1H). In addition, composite-treated microglia showed ASC speckling (Figure S1), caspase-1 cleavage (Figures 2C and 2D) and release of its active fraction (Figures 2K and 2L), pro-inflammatory cytokine maturation (Figure 3A), as well as highly elevated levels of the pore-forming NTD (Figures 3C and 3D). Thus, we considered the observed cell death to be pyroptotic. Caspase-1 activity has been shown to accelerate IL-1 β secretion via rapid GSDMD-dependent pathways (Monteleone et al., 2018). This mechanism could possibly also underlie the pyroptotic cell fate detected here.

To confirm NLRP3 dependency of the observed IL-1 β release, we used different modulators to inhibit the NLRP3-initiated ASC assembly. The resulting total IL-1 β levels were reduced by approximately 40% (Figure 3F), possibly because of decreased cleavage and impaired release of its mature form (Figure S2E), also considering further ASC-dependent inflammasomes such as the AIM or NLRC4 inflammasome (Freeman et al., 2017) to mediate generation of the remaining IL-1 β levels.

Mutagenesis studies showed that clustering of ASC^{PYD} filaments and their condensation into ASC specks is mediated by the ASC^{CARD} exposed to the surface of the ASC^{PYD}-initiated filament (Hoss et al., 2017). Furthermore, filament formation served as an amplification mechanism in inflammasome signaling, resulting in cytokine maturation (Dick et al., 2016). By mutating D134 and Y187 within the ASC^{CARD} domain, filament formation

Figure 4. Exogenous ASC Can Replace Endogenous ASC in ASC-Deficient Cells and Induce ASC-Dependent Signaling Pathways

(A and B) Immunocytochemical detection (A) and quantification (B) of caspase-1 activity in ASC-deficient macrophages treated with or without exogenous ASC. (C) The caspase-1 subunit p20 was detected by IB analysis in precipitated supernatants from ASC-deficient microglia. (D–F) IL-1 β levels in conditioned medium of ASC-deficient primary microglia after exposure to different concentrations of exogenous ASC: c₁ = 0.22 μ M, c₂ = 0.66 μ M, c₃ = 1.75 μ M (D); IL-1 β levels in conditioned medium of ASC-deficient primary microglia treated with ASC, A β , or ASC-A β composites for 12 and 24 h (E); and IL-1 β levels in conditioned medium of primary WT microglia and ASC-deficient microglia treated with ASC-A β composites for 12 h (F). (G and H) IB analysis and quantification (G) of ASC monomers, dimers, and ASC-mCherry in ASC-deficient microglia cell lysates (H) (n = 4). (I) Immunostaining of ASC-deficient macrophages treated with exogenous ASC and stained for ASC internalization and ASC speck formation after ASC-A β composites treatment (arrowheads). (J and K) ColP of ASC and A β in ASC-deficient microglia cell lysates. IP: ASC. IB: ASC (AL-177) (J), IB: A β (82E1) and input controls (K). Empty wells and wells containing a lysate control negative for both proteins are not displayed. Vertical lines in blots indicate spliced sections. Data were collected from three independent experiments (n = 3) with three technical replicates per assay (N = 9) (D–F). All graphs are presented as mean \pm SEM and were analyzed by two-way ANOVA (D and E), one-way ANOVA in conjunction with Tukey's test (B, C, and G), or unpaired t test (F). Levels of significance are indicated as follows: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. Asterisks indicate significance between groups connected by lines; plus symbols indicate significance between ASC-A β composites and volume-equal buffer control-treated groups. Images were taken at 40 \times magnification. Scale bars, 10 μ m (A and I).



(legend on next page)

of the CARD domain only is almost completely disrupted (Li et al., 2018). Particular mutations of the type I interface mediating PYD-PYD interactions, such as K21Q, K21E/K22E, and K26E, also abolish formation of the ASC^{PYD} filament (Lu et al., 2014). Recently, we showed that full-length human ASC carrying three K-to-A mutations within the above mentioned PYD-PYD interface (K21A, K22A, and K26A) does not cross-seed A β ₁₋₄₀ aggregation (Venegas et al., 2017). Using an ASC variant deficient in PYD as well as CARD-mediated filament formation (K21E, K22E, K26E, D134 R, and Y187E), release of proinflammatory cytokines decreased tremendously, suggesting that the filamentary structure of ASC is mandatory for NLRP3 inflammasome activation in response to ASC-A β composites (Figures 3G and 3H).

Here we observed that exogenous ASC induces speck formation of cell-intrinsic ASC in WT microglia (Figure S1) and itself formed speck-like aggregates in the cytosol of ASC-deficient cells (Figure 4I). These findings underline the importance of ASC aggregation in inducing the NLRP3 inflammasome pathway (Latz et al., 2013; Stutz et al., 2013). ASC specks have been identified previously as an endogenous danger signal because injection of ASC specks caused acute inflammatory reactions in WT mice (Franklin et al., 2014). *In vitro*, ASC specks were shown to accumulate in the extracellular space but still retained the ability to mature pro-IL-1 β . Moreover, it was shown that phagocytosed ASC specks still induced lysosomal damage and IL-1 β production in macrophages.

Activation of the NLRP3 inflammasome by ASC-A β composites is thought to be transferred via a still unknown mediator. Because the expression of multiple TLRs on the microglia surface increases with the presence of pathogens or other pro-inflammatory stimuli (Olson and Miller, 2004), we examined the effect of TLRs. Inhibiting TLR2 and TLR4 significantly decreased release of IL-1 β in response to ASC-A β treatment (Figure 3E), supporting the commonly accepted knowledge of A β being a target of both cell surface receptors (Letiembre et al., 2009) and inducing NLRP3 inflammasome activation (Liu et al., 2012; Walter et al., 2007).

It is speculated that, besides the interaction of A β with TLR2 and TLR4, multiple cell surface receptors could also be targeted, including CD36 and TLR6 (Doens and Fernández, 2014; Sheedy et al., 2013; Stewart et al., 2010). A β clustering around the ASC fibril might enable A β to interact with various cell surface receptors simultaneously, presumably boosting intracellular inflammatory cascade activation, revealing the toxicity of ASC-A β composites.

It has been shown recently that the soluble TLR5 Fc-fragment binds to oligomeric as well as fibrillar A β with high affinity and blocks its toxicity. Moreover, A β has been shown to modulate flagellin-mediated activation but does not by itself activate TLR5 signaling (Chakrabarty et al., 2018). Supporting the hypothesis of a protective role of TLR5, we showed that an increase in IL-1 β levels in response to ASC-A β exposure is determined only in presence of a specific TLR5 inhibitor (Figure 3E).

Here, we present evidence that exogenous ASC has the ability to induce caspase-1 cleavage (Figures 4A–4C) and IL-1 β maturation (Figures 4D and 4E) not only in peripheral macrophages but also in microglia, using an ASC-deficient genotype. ASC-A β composites induced higher p20 and IL-1 β levels than ASC alone, showing the same tendencies as in the WT but reaching lower absolute values (Figure 4F), suggesting that cell-intrinsic ASC speck formation, which is also induced by ASC-A β composites (Figure S1), plays an important role in exogenous ASC-A β toxicity. Indeed, we detected higher levels of ASC in microglia lysates after ASC-A β composite treatment compared with ASC-only exposure, assuming that the increased uptake of ASC is composite mediated, which, in turn, leads to increased NLRP3 inflammasome activity (Figures 4G and 4H).

Of note, a stable interaction of ASC and A β is assumed because both proteins stay bound within the cell lysates (Figures 4J and 4K). Thus, it is hypothesized that A β stabilizes the ASC fibril intracellularly and possibly extends its time of availability and/or accelerates the pro-inflammatory cascade.

As described previously, missense variants in the TREM2 receptor are associated with a 2- to 4-fold increased risk of developing AD (Guerreiro et al., 2013; Jonsson et al., 2013). Moreover, it has been shown that exogenous expression of TREM2 in Chinese hamster ovary (CHO) or HEK293 cells increases phagocytic activity (Kleinberger et al., 2014; N'Diaye et al., 2009). Furthermore, TREM2 overexpression promotes clearance of A β ₁₋₄₂ by BV-2 cells and restored cell viability from A β -mediated neuroinflammation by downregulating TLRs (Long et al., 2019). However, inflammatory stimuli decrease TREM2 expression *in vitro* but increase TREM2 expression *in vivo* (Jay et al., 2017).

Our findings revealed increased pro-inflammatory cytokine levels (Figure 3A) in a TLR2-, TLR4-, and TLR5-dependent manner (Figure 3E). Moreover, a decrease in phagocytic activity (Figures 5A–5C) as well as a reduction in TREM2 expression (Figures S2C and 2D) in response to exposure of ASC-A β

Figure 5. A β Clearance by Microglia Is Affected When Bound to ASC

- (A) Representative FACS graphics demonstrating the engulfment of A β by microglia upon treatment with A β only or ASC-A β composites for 15, 30, and 60 min.
 (B) Quantification of microglia engulfing A β over time.
 (C) Phagocytic index of microglia engulfing A β over time.
 (D and E) Quantification and comparison of relative A β degradation by WT microglia over 1, 2, 3, and 4 h in the presence or absence of ASC, measured after 1 h of A β phagocytosis.
 (D) Quantification of A β -positive microglia over time.
 (E) Fluorescence index of microglia degrading A β over time.

Data were collected from three independent experiments (n = 3) with two technical replicates per assay (N = 6). All graphs are presented as mean \pm SEM and were analyzed by paired t test for phagocytic cells and index (B and C) as well as two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test for degradation analysis (D and E) and unpaired t test for area under the curve (AUC; percentage of A β -treated primary microglia [PMG]; B–E). Levels of significance are indicated as follows: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

See also Figure S2.

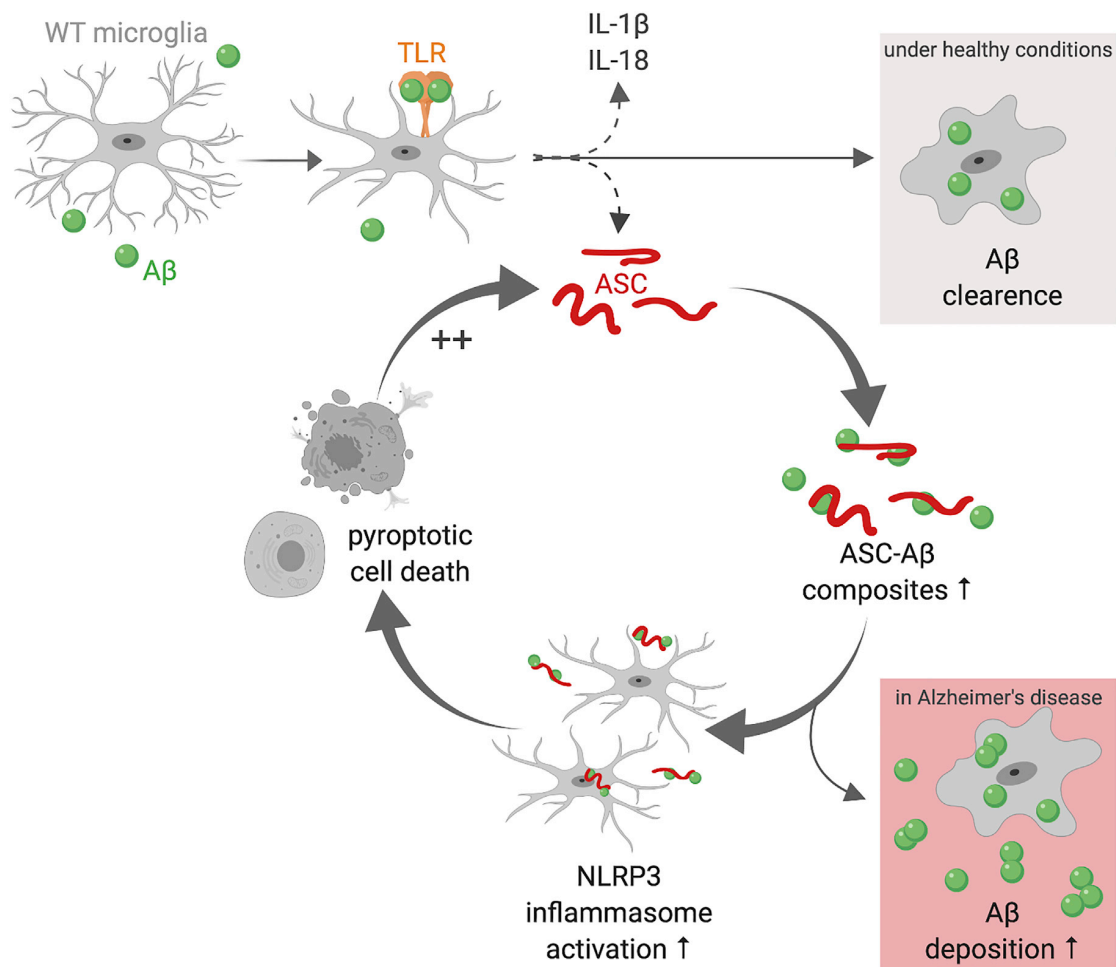


Figure 6. ASC-A β Binding Induces a Vicious Cycle in Microglia

The schematic was created with BioRender (<https://biorender.com>). A β induces microglia activation via multiple cell surface receptors. Here we display TLRs as an example. Under healthy conditions, microglia activation leads to engulfment and clearance of A β . During microglia activation, NLRP3 inflammasome components, such as the adaptor protein ASC and the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18, are released to the extracellular space. There, A β clusters around ASC fibrils, resulting in ASC-A β composite formation. ASC-A β composites themselves boost NLRP3 inflammasome activation in the surrounding microglia, reducing microglia A β clearance ability and resulting in pyroptotic cell death. During pyroptosis, vast quantities of ASC are set free, starting the vicious cycle of ASC-A β composites all over. In the AD brain, this might be a reason for increased A β deposition.

composites suggests a connection between these findings. We could also show that clustering of microglia to ASC fibrils resulted in impaired A β uptake (Figures 5A–5C). Further studies might consider the effect of TREM1 and TREM2 on ASC-A β phagocytosis because there is growing evidence that their over-expression increases A β clearance by microglia (Jiang et al., 2016; Xiang et al., 2016). In addition, microglia exposed to ASC-A β composites lost their ability to degrade A β compared with microglia exposed to A β only (Figures 5D and 5E; Figure S2B). Aggregate size as well as the interaction of ASC and A β itself might underlie the altered phagocytosis. Altogether, these findings reveal a possible mechanism involved in AD progression because A β plaque clearance by microglia is essentially important in the disease context (Hansen et al., 2018; Sarlus and Heneka, 2017).

Conclusions

Taken together, ASC contributes prion-like activities in microglia as in macrophages. Cells undergoing pyroptosis set free fully functional ASC that can be built into the NLRP3 inflammasome of the recipient cell. Even ASC-deficient cells were shown to induce caspase-1 cleavage and pro-inflammatory cytokine maturation mediated by exogenous ASC. In WT microglia, ASC induced cell-intrinsic ASC speck formation and release. Furthermore, exogenous ASC itself also formed speck-like aggregates inside the cell. Clustering of A β onto ASC fibrils led to multiple cellular responses, such as an increase in caspase-1 activation, IL-1 β maturation, and cleavage of GSDMD. Moreover, ASC specks were found to be formed faster, and ASC was taken up in higher quantities. ASC and A β remained bound in the cell lysates, assuming A β to stabilize the ASC fibril and thereby

boosting its toxicity. Thus, cells exposed to ASC-A β subsequently underwent pyroptosis, setting free ASC and leading to activation of the surrounding cells, inducing a vicious circle (Figure 6). Furthermore, ASC-A β binding was shown to prevent A β clearance by microglia *in vitro*, which might play a role in AD progression *in vivo*.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY
- EXPERIMENTAL MODELS AND SUBJECT DETAILS
 - Animals
- METHOD DETAILS
 - Cell Culture
 - Preparation of Recombinant ASC
 - Preparation of Amyloid β
 - Building ASC-A β Composites
 - Protein Determination
 - Co-Immunoprecipitation (Co-IP)
 - Electron Microscopy
 - Cytotoxicity and Cell Viability Assays
 - Immunoblotting (IB)
 - Measurement of Cytokine Secretion
 - Immunocytochemistry (ICC)
 - Phagocytosis and Degradation of Amyloid β
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
- DATA AND CODE AVAILABILITY

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.025>.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) under Germany's Excellence Strategy – EXC2151 – 390873048. M.T.H. received further funding from the NIH grant (R01 AG059752-02). The authors thank Tobias Dierkes for chemical compound and cell line exchange between the groups. We would particularly like to thank the German Center for Neurodegenerative Disease within the Helmholtz Association (DZNE) in Bonn, Germany for providing laboratory premises and facilities.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, L.L.F. and M.T.H.; Methodology, L.L.F., H.S., and M.T.H.; Investigation, L.L.F., H.S., I.V.H., R.B., and D.R.; Writing – Original Draft, L.L.F., H.S., R.B., and M.T.H.; Writing – Review & Editing, L.L.F., H.S., and M.T.H.; Funding Acquisition, M.T.H.; Resources, D.R., E.L., M.G., and M.T.H.; Supervision, M.T.H.

DECLARATION OF INTERESTS

Michael T. Heneka serves as an advisory board member at IFM Therapeutics, Alecto, and Tiaki. He received honoraria for oral presentations from Novartis, Roche, and Biogen. The authors declare that there is no conflict of interest with regard to the experimental part of this study.

Received: October 9, 2019
 Revised: December 20, 2019
 Accepted: February 6, 2020
 Published: March 17, 2020

REFERENCES

- Baik, S.H., Kang, S., Son, S.M., and Mook-Jung, I. (2016). Microglia contributes to plaque growth by cell death due to uptake of amyloid β in the brain of Alzheimer's disease mouse model. *Glia* 64, 2274–2290.
- Bergsbaken, T., Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 99–109.
- Boucher, D., Monteleone, M., Coll, R.C., Chen, K.W., Ross, C.M., Teo, J.L., Gomez, G.A., Holley, C.L., Bierschenk, D., Stacey, K.J., et al. (2018). Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *J. Exp. Med.* 215, 827–840.
- Cai, Z., Hussain, M.D., and Yan, L.-J. (2014). Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int. J. Neurosci.* 124, 307–321.
- Chakrabarty, P., Li, A., Ladd, T.B., Strickland, M.R., Koller, E.J., Burgess, J.D., Funk, C.C., Cruz, P.E., Allen, M., Yaroshenko, M., et al. (2018). TLR5 decoy receptor as a novel anti-amyloid therapeutic for Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* 215, 2247–2264.
- Cho, M.-H., Cho, K., Kang, H.-J., Jeon, E.-Y., Kim, H.-S., Kwon, H.-J., Kim, H.-M., Kim, D.-H., and Yoon, S.-Y. (2014). Autophagy in microglia degrades extracellular β -amyloid fibrils and regulates the NLRP3 inflammasome. *Autophagy* 10, 1761–1775.
- Clayton, K.A., Van Enoo, A.A., and Ikezu, T. (2017). Alzheimer's Disease: The Role of Microglia in Brain Homeostasis and Proteopathy. *Front. Neurosci.* 11, 680.
- Dick, M.S., Sborgi, L., Rühl, S., Hiller, S., and Broz, P. (2016). ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes. *Nat. Commun.* 7, 11929.
- Doens, D., and Fernández, P.L. (2014). Microglia receptors and their implications in the response to amyloid β for Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Neuroinflammation* 11, 48.
- Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Yu, J.-W., Datta, P., Miller, B., Jankowski, W., Rosenberg, S., Zhang, J., and Alnemri, E.S. (2007). The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ.* 14, 1590–1604.
- Franklin, B.S., Bossaller, L., De Nardo, D., Ratter, J.M., Stutz, A., Engels, G., Brenker, C., Nordhoff, M., Mirandola, S.R., Al-Amoudi, A., et al. (2014). The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. *Nat. Immunol.* 15, 727–737.
- Franklin, B.S., Latz, E., and Schmidt, F.I. (2018). The intra- and extracellular functions of ASC specks. *Immunol. Rev.* 281, 74–87.
- Freeman, L., Guo, H., David, C.N., Brickey, W.J., Jha, S., and Ting, J.P.-Y. (2017). NLR members NLRC4 and NLRP3 mediate sterile inflammasome activation in microglia and astrocytes. *J. Exp. Med.* 214, 1351–1370.
- Giordano, G., Hong, S., Faustman, E.M., and Costa, L.G. (2011). Measurements of Cell Death in Neuronal and Glial Cells. In *In Vitro Neurotoxicology: Methods and Protocols*, L.G. Costa, G. Giordano, and M. Guizzetti, eds. (Humana Press), pp. 171–178.
- Giuliani, D., and Baker, T.J. (1986). Characterization of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J. Neurosci.* 6, 2163–2178.
- Götz, J., Chen, F., van Dorpe, J., and Nitsch, R.M. (2001). Formation of neurofibrillary tangles in P301 tau transgenic mice induced by A β 42 fibrils. *Science* 293, 1491–1495.
- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J.S.K., Younkin, S., et al.; Alzheimer Genetic Analysis Group (2013). TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 117–127.

- Halle, A., Hornung, V., Petzold, G.C., Stewart, C.R., Monks, B.G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Moore, K.J., and Golenbock, D.T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat. Immunol.* 9, 857–865.
- Hanisch, U.-K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387–1394.
- Hansen, D.V., Hanson, J.E., and Sheng, M. (2018). Microglia in Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* 217, 459–472.
- Heneka, M.T., Kummer, M.P., and Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 463–477.
- Heneka, M.T., Golenbock, D.T., and Latz, E. (2015). Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat. Immunol.* 16, 229–236.
- Hoss, F., Rodriguez-Alcázar, J.F., and Latz, E. (2017). Assembly and regulation of ASC specks. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 1211–1229.
- Jay, T.R., von Saucken, V.E., and Landreth, G.E. (2017). TREM2 in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurodegener.* 12, 56.
- Jiang, T., Zhang, Y.-D., Gao, Q., Zhou, J.-S., Zhu, X.-C., Lu, H., Shi, J.-Q., Tan, L., Chen, Q., and Yu, J.-T. (2016). TREM1 facilitates microglial phagocytosis of amyloid beta. *Acta Neuropathol.* 132, 667–683.
- Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P.V., Snaedal, J., Bjornsson, S., Huttenlocher, J., Levey, A.I., Lah, J.J., et al. (2013). Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 107–116.
- Karmakar, M., Katsnelson, M.A., Dubyak, G.R., and Pearlman, E. (2016). Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP. *Nat. Commun.* 7, 10555.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11, 373–384.
- Kinney, J.W., Bemiller, S.M., Murtishaw, A.S., Leisgang, A.M., Salazar, A.M., and Lamb, B.T. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. (N. Y.)* 4, 575–590.
- Kleinberger, G., Yamanishi, Y., Suárez-Calvet, M., Czirr, E., Lohmann, E., Cuyvers, E., Struyfs, H., Pettkus, N., Wenninger-Weinzierl, A., Mazaheri, F., et al. (2014). TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis. *Sci. Transl. Med.* 6, 243ra86.
- Kumar, V. (2019). Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. *J. Neuroimmunol.* 332, 16–30.
- Latz, E., Xiao, T.S., and Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 397–411.
- Letiembre, M., Liu, Y., Walter, S., Hao, W., Pfander, T., Wrede, A., Schulz-Schaeffer, W., and Fassbender, K. (2009). Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: a similar pattern. *Neurobiol. Aging* 30, 759–768.
- Li, Y., Fu, T.-M., Lu, A., Witt, K., Ruan, J., Shen, C., and Wu, H. (2018). Cryo-EM structures of ASC and NLRC4 CARD filaments reveal a unified mechanism of nucleation and activation of caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 10845–10852.
- Liu, S., Liu, Y., Hao, W., Wolf, L., Kilian, A.J., Penke, B., Rube, C.E., Walter, J., Heneka, M.T., Hartmann, T., et al. (2012). TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid β peptide to trigger neuroinflammatory activation. *J. Immunol.* 188, 1098–1107.
- Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V.G., Wu, H., and Lieberman, J. (2016). Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* 535, 153–158.
- Long, H., Zhong, G., Wang, C., Zhang, J., Zhang, Y., Luo, J., and Shi, S. (2019). TREM2 Attenuates A β 1-42-Mediated Neuroinflammation in BV-2 Cells by Downregulating TLR Signaling. *Neurochem. Res.* 44, 1830–1839.
- Lu, A., Magupalli, V.G., Ruan, J., Yin, Q., Atianand, M.K., Vos, M.R., Schröder, G.F., Fitzgerald, K.A., Wu, H., and Egelman, E.H. (2014). Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell* 156, 1193–1206.
- Monteleone, M., Stanley, A.C., Chen, K.W., Brown, D.L., Bezbradica, J.S., von Pein, J.B., Holley, C.L., Boucher, D., Shakespear, M.R., Kapetanovic, R., et al. (2018). Interleukin-1 β Maturation Triggers Its Relocation to the Plasma Membrane for Gasdermin-D-Dependent and -Independent Secretion. *Cell Rep.* 24, 1425–1433.
- N'Diaye, E.-N., Branda, C.S., Branda, S.S., Nevarez, L., Colonna, M., Lowell, C., Hamerman, J.A., and Seaman, W.E. (2009). TREM-2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) is a phagocytic receptor for bacteria. *J. Cell Biol.* 184, 215–223.
- Nelson, P.T., Alafuzoff, I., Bigio, E.H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N.J., Castellani, R.J., Crain, B.J., Davies, P., Del Tredici, K., et al. (2012). Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 362–381.
- Olson, J.K., and Miller, S.D. (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J. Immunol.* 173, 3916–3924.
- Rathinam, V.A.K., Zhao, Y., and Shao, F. (2019). Innate immunity to intracellular LPS. *Nat. Immunol.* 20, 527–533.
- Sarlus, H., and Heneka, M.T. (2017). Microglia in Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.* 127, 3240–3249.
- Scheiblich, H., Schlütter, A., Golenbock, D.T., Latz, E., Martinez-Martinez, P., and Heneka, M.T. (2017). Activation of the NLRP3 inflammasome in microglia: the role of ceramide. *J. Neurochem.* 143, 534–550.
- Sheedy, F.J., Grebe, A., Rayner, K.J., Kalantari, P., Ramkhalawon, B., Carpenter, S.B., Becker, C.E., Ediriweera, H.N., Mullick, A.E., Golenbock, D.T., et al. (2013). CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat. Immunol.* 14, 812–820.
- 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., et al. (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat. Immunol.* 11, 155–161.
- Stutz, A., Horvath, G.L., Monks, B.G., and Latz, E. (2013). ASC Speck Formation as a Readout for Inflammasome Activation. In *The Inflammasome: Methods and Protocols*, C.M. De Nardo and E. Latz, eds. (Humana Press), pp. 91–101.
- Terrill-Usery, S.E., Mohan, M.J., and Nichols, M.R. (2014). Amyloid- β (1-42) protofibrils stimulate a quantum of secreted IL-1 β despite significant intracellular IL-1 β accumulation in microglia. *Biochim. Biophys. Acta.* 1842, 2276–2285.
- Ulrich, J.D., and Holtzman, D.M. (2016). TREM2 Function in Alzheimer's Disease and Neurodegeneration. *ACS Chem. Neurosci.* 7, 420–427.
- Venegas, C., Kumar, S., Franklin, B.S., Dierkes, T., Brinkschulte, R., Tejera, D., Vieira-Saecker, A., Schwartz, S., Santarelli, F., Kummer, M.P., et al. (2017). Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature* 552, 355–361.
- Walter, S., Letiembre, M., Liu, Y., Heine, H., Penke, B., Hao, W., Bode, B., Manietta, N., Walter, J., Schulz-Schaeffer, W., and Fassbender, K. (2007). Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell. Physiol. Biochem.* 20, 947–956.
- Xiang, X., Werner, G., Bohrmann, B., Liesz, A., Mazaheri, F., Capell, A., Feederle, R., Knuesel, I., Kleinberger, G., and Haass, C. (2016). TREM2 deficiency reduces the efficacy of immunotherapeutic amyloid clearance. *EMBO Mol. Med.* 8, 992–1004.
- Yang, Y., Wang, H., Kouadir, M., Song, H., and Shi, F. (2019). Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis.* 10, 128.
- Zvěřová, M. (2019). Clinical aspects of Alzheimer's disease. *Clin. Biochem.* 72, 3–6.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Rabbit anti-Asc (AL177) antibody	AdipoGen	Cat# AG-25B-0006; RRID: AB_2490440
Rat anti-Caspase-1 (clone 4B4) antibody	Genentech	Cat# CASP-1(mu):4175
Rabbit anti-GAPDH antibody	Sigma-Aldrich	Cat# G9545; RRID: AB_796208
Rabbit anti-GSDMD antibody [EPR19828]	Abcam	Cat# ab209845; RRID: AB_2783550
Mouse anti-NLRP3/NALP3 (Cryo-2) antibody	AdipoGen	Cat# AG-20B-0014-C100; RRID: AB_2490202
APC rat anti-mouse/human CD11b antibody	Bio Legend	Cat# 101212; RRID: AB_312795
Mouse specific rabbit anti-ASC/TMS1 (D2W8U) antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 67824; RRID: AB_2799736
Rabbit anti- β -actin antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 4967; RRID: AB_330288
Goat anti-rabbit-AlexaFluor488 (H+L) antibody	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-11008; RRID: AB_143165
Goat anti-rat-AlexaFluor594 antibody	Invitrogen	Cat# A11007; RRID: AB_141374
Rabbit anti-IL-1 β antibody	GeneTex	Cat# GTX74034; RRID: AB_378141
IRDye® 680LT donkey anti-mouse IgG (H+L) antibody	LI-COR Biotechnology	Cat# 926-68022; RRID: AB_10715072
IRDye® 800CW goat anti-rat IgG (H+L) antibody	LI-COR Biotechnology	Cat# 926-32219; RRID: AB_1850025
Mouse anti-A β (82E1) antibody	IBL America	Cat# 10323; RRID: AB_1630806
Mouse IgG Isotype Control antibody	Thermo Fisher Scientific	Cat# 10400C; RRID: AB_2532980
Mouse TLR2 neutralizing antibody (C9A12)	InvivoGen	Cat# mabg-mtlr2; RRID: AB_11125339
Mouse TLR5 neutralizing antibody (Q23D11)	InvivoGen	Cat# mabg-mtlr5; RRID: AB_11124926
Rat anti-mouse CD11b antibody	Serotec by Bio-Rad	Cat# MCA711; RRID: AB_321292
Rat IgG Isotype Control antibody	Thermo Fisher Scientific	Cat# 10700; RRID: AB_2610661
TLR4/MD-2 Complex Monoclonal Antibody (MTS510)	Invitrogen	Cat# 14-9924-82; RRID: AB_468617
Goat anti-Trem2 antibody	GeneTex	Cat# GTX47596; RRID: AB_10618011
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Ampicillin sodium salt	Carl Roth	Cat# K029.1
4',6-Diamidino-2'-phenylindol-dihydrochloride (DAPI)	Thermo Fisher Scientific	Cat# 62247
Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate	Sigma-Aldrich	Cat# A2383
Amyloid β -Protein (1-42) (HFIP-treated)	Bachem AG	Cat# 4090148
Bovine Serum Albumin - Fraction V	Rockland Immunochemicals, Inc.	Cat# BSA-1000
FAM-labeled Amyloid β	Peptide Specialty Laboratories GmbH (PSL)	ID# CEM112812FL
Fetal Bovine Serum	LIFE Technologies	Cat# 10270106
Guanidine hydrochloride	Carl Roth	Cat# 6069.3
HisTrap™ FF crude	GE Healthcare	Cat# 17528601
IFM-2384	IFM Therapeutics	gift from IFM
Lipopolysaccharide from <i>Escherichia coli</i> K12	InvivoGen	Cat# tlrl-eklps
MCC950 (CRID3)	InvivoGen	Cat# inh-mcc
N2-Supplement	GIBCO by Thermo Fisher Scientific	Cat# 17502048
Ndel	New England Biolabs	Cat# R0111S
Normal Goat Serum	Abcam	Cat# ab7481
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris gel	Invitrogen	Cat# NP0323BOX
NuPAGE MES SDS Running Buffer (20X)	Thermo Fisher Scientific	Cat# NP0002
Orange G	Carl Roth	Cat# 0318.2
Paraformaldehyde	Sigma-Aldrich	Cat# P6148
pET23a	Novagen	Cat# 69745

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
pET23a-ASC-tev-mCherry	Venegas et al., 2017	N/A
Poly-L-Lysine Hybridomide	Sigma-Aldrich	Cat# P1524
Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Cell Signaling Technology	Cat# 5872
Protein LoBind Tubes	Eppendorf	0030108116
Q5 High Fidelity DNA polymerase	New England Biolabs	Cat# M0491S
SureBeads™ Protein G Magnetic beads	Bio-Rad Laboratories	Cat# 1614023
T4 DNA Ligase	New England Biolabs	Cat# M0202S
Trans-Blot® Turbo Mini Nitrocellulose Transfer Packs	Bio-Rad Laboratories	Cat# 1704158
Critical Commercial Assays		
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche	Cat# 11644793001
FAM-FLICA® Caspase-1 Assay Kit	ImmunoChemistry Technologies	Cat# 98
Mouse IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA	R&D Systems	Cat# DY401
Pierce™ BCA Protein Assay kit	Thermo Fischer Scientific	Cat# 23225
Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit	Thermo Fischer Scientific	Cat# 88282
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN	Cat# 27104
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN	Cat# 28704
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN	Cat# 28104
XTT Cell Viability Kit	Cell Signaling Technology	Cat# 9095
Experimental Models		
NCTC clone 929 (L929 cells), strain: C3H/An	ATCC	Cat# CCL-1; RRID: CVCL_0462
Primary microglia isolated from C57BL/6 mice	Charles River Laboratories	RRID: IMSR_JAX:000664
Primary microglia isolated from C57BL/6 ASC ^{-/-} mice	Millenium Pharmaceuticals	N/A
<i>E. coli</i> BL21 (DE3), genotype: F- ompT hsdSB (rB-, mB-) gal dcm (DE3)	Merck	Cat#69450.
Software and Algorithms		
FACSDIVA software	Becton Dickinson	N/A
Fiji ImageJ	Wayne Rusband	v2.0.0-rc-69/1.52n
FlowJo	FlowJo, LLC	v3.05470
Graph Pad Prism	GraphPad Software Inc.	v7.0e
Image Studio	LI-COR Biosciences	v5.2
NIS-Elements	Nikon	v4.0
Other		
Avanti J265 XP centrifuge	Beckmann Coulter	equipment
ÄKTAprime plus FPLC system	GE Healthcare	equipment
BD FACSCanto™ II	BD Biosciences	equipment
Eppendorf BioPhotometer D30	Eppendorf	equipment
Infinite M200 Pro	TECAN	equipment
JA-25.50 Fixed-Angle Rotor	Beckmann Coulter	equipment
JEOL JEM-2200FS Field Emission Transmission Electron Microscope equipped with a CMOS-Camera	JEOL GmbH	equipment
JLA-8.1000 Fixed-Angle Rotor	Beckmann Coulter	equipment
JULABO 5 water bath	JULABO GmbH	equipment
Lab 850 pH-Meter	Schott Instruments	equipment
Multitron pro	Infors HT	equipment
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Scientific	equipment
Nikon Eclipse Ti Fluorescence Microscope	Nikon	equipment
ODYSSEY CLx Imaging System	LI-COR Biotechnology	equipment
Optima TLX ultracentrifuge	Beckmann Coulter	equipment
TLA-120.2 Fixed-Angle Rotor	Beckmann Coulter	equipment

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories	equipment
Vibra-Cell ultrasonic liquid processor	Sonics	equipment

LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Michael T. Heneka (michael.heneka@ukbonn.de).

This study did not generate new unique reagents.

EXPERIMENTAL MODELS AND SUBJECT DETAILS**Animals**

All animals used for 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. The procedures complied with the guidelines of animal welfare as laid down by the German Research Council (DFG). For this study brains of P0–P2, mixed gender C57BL/6 WT (purchased from Charles River Laboratories Inc.) and ASC-deficient (purchased from Millenium Pharmaceuticals) mice were used.

METHOD DETAILS**Cell Culture**

Primary microglia were isolated according to the method of [Giulian and Baker \(1986\)](#). After removing the meninges, cells were separated using mechanical shearing and 0,25% trypsin (GIBCO by lifeTechnologies™). Subsequently, cells were transferred into Poly-L-Lysine (PLL) (Sigma-Aldrich) coated T75 culture flasks (Greiner Bio-One) and cultured under standard conditions at 37°C and 5% CO₂ (1-2 brains per flask). On the next day, flasks were washed three times with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (GIBCO) and cultured for an additional 7-10 days 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. Cultures were regularly checked for loosely attached mature microglia. Finally, microglia were shaken off from the astrocyte monolayer after 7-10 days followed by two more shake off cycles every second to third day.

Preparation of Recombinant ASC

Full-length human ASC, followed by a TEV protease cleavage site and mCherry, was cloned in NdeI/XhoI sites of a pET-23a expression vector providing a C-terminal hexa-histidine tag. This construct was transformed and expressed in *E. coli* cells (strain BL21(DE3)) by growing the culture at 37°C to an OD₆₀₀ of 0.8 and induced with 0.1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside for 4 h at 37°C. Cells were collected by centrifugation and lysed by sonication in a lysis buffer A containing 20 mM Tris (pH 8.0), 500 mM NaCl and 5 mM imidazole. Cell lysates were then centrifuged at 20,000 x g for 30 min and the pellet was dissolved in buffer A supplemented with 2 M Gdn-HCl for 1 h at 4°C. Subsequently, the suspension was again centrifuged at 20,000 x g for 30 min and the supernatant was dialysed against buffer A O/N at 4°C, while continuously stirring. On the next day, the sample was centrifuged as described above and the supernatant was administered to a pre-equilibrated HisTrap™ column using an Äkta Prime FPLC system (GE Healthcare). The column was washed with 10 column volumes of lysis buffer A and the protein was eluted in the same buffer supplemented with 200 mM imidazole. Subsequently, the purified protein was dialysed against buffer B containing 20 mM Tris (pH 8.0) and 300 mM NaCl O/N at 4°C, while continuously stirring. Finally, endotoxin concentration was controlled using the Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantification Kit (Thermo Fischer Scientific) according to the manufacturers protocol. In order to separate soluble ASC monomers from insoluble aggregated forms the solution was centrifuged for 30 min at 100.000 x g in a TLA-120.2 rotor or equivalent in a Beckman Optima TLX benchtop ultracentrifuge. To induce fibrillation the ASC-containing solution was transformed to LoBind Tubes (Eppendorf) and incubated for 1 h at 37°C. The final concentration of ASC was quantified by NanoDrop using the extinction coefficient $\epsilon = 61.31$. ASC fibrils were kept at 4°C for no longer than 3 weeks.

In addition to WT ASC, a mutated ASC was generated, carrying mutations in the PYD-PYD assembly interface (K21E, K22E, K26E) ([Lu et al., 2014](#)) and in the caspase-recruitment domain (CARD) (D134R, Y187E) ([Li et al., 2018](#)). Mutated ASC was generated following the same procedure as WT ASC.

Preparation of Amyloid β

Amyloid β (Aβ) protein (1-42) was ordered 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP)-treated (Bachem AG), dissolved in sterile Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (GIBCO) and stored at –80°C ([Götz et al., 2001](#)). As a working concentration, 5 μM was used for cytotoxicity and cell viability assays, immunoblotting and ELISA.

For phagocytosis and degradation assays as well as for immunocytochemistry (ICC) FAM-labeled A β ₁₋₄₂ (Peptide Specialty Laboratories GmbH) was solved in 40 mM NaOH at 4 mg/ml, diluted in Tris-HCL (pH 7.4) to 1 mg/mL (221 μ M), incubated for 1 day at 37°C and finally stored at -80°C.

Building ASC-A β Composites

Fibrillary ASC (1.75 μ M) and A β ₁₋₄₂ monomers (5 μ M) were incubated in serum-free DMEM containing 1% P/S and 1% N-2 supplement in LoBind Tubes (Eppendorf) at 37°C, O/N. The same culture procedure was applied to single protein treatments and the volume equal buffer controls.

Protein Determination

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

Co-Immunoprecipitation (Co-IP)

For Co-IP experiments, 50 μ L of SureBeads™ Protein G Magnetic beads (Bio-Rad Laboratories) were magnetized and washed with PBS (Dulbecco) supplemented with 0.1% Tween-20 (PBST) for three times. Thereafter, beads were incubated with either 2 μ g of rabbit anti-ASC (clone AL177, AdipoGen) or 0.3 μ g of mouse anti-A β (82E1) (IBL America) in a total volume of 200 μ L PBST for 10 min at RT on a rotator. After that, beads were magnetized and washed three times with PBST. The antigen-containing solutions were added and incubated again for 1 h at RT on a rotator. For ASC-A β Co-IP's 1.75 μ M ASC and 5 μ M A β were pre-incubated in serum-free medium O/N before co-culturing them with beads. For studying the intracellular bonding state of ASC and A β , ASC-deficient microglia lysates containing 35 μ g total protein were added to a total volume of 200 μ L PBST. Cell seeding, treatments and lysate collection were performed as explained in the "Immunoblotting (IB)" section. Antibody controls were incubated with 200 μ L PBST in parallel. Subsequently, beads were magnetized and washed three times with PBST. To separate the antibody-bead binding, beads were resuspended in 40 μ L 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 heated at 70°C, 600 rpm for 10 min. For immunoblotting, every vial was divided equally into two wells. Immunoblotting was then performed as described below.

Electron Microscopy

Fibrillary ASC (1.75 μ M) and A β ₁₋₄₂ monomers (5 μ M) were pre-incubated in buffer B (see above) O/N at 37°C. For negative staining electron microscopy, 4 μ L of the protein sample was applied to a glow discharged copper grid and incubated for 1 min. Samples were washed three times by dipping the sample side into a drop of protein buffer before fluids were removed by the aid of a filter paper. Then samples were negatively stained by dipping them twice into a drop of 2% uranyl acetate following a 30 s incubation step and finally removing residual fluids using a filter paper. Afterward, the EM grid was air-dried and immediately processed. Samples were imaged using a JEOL JEM-2200FS 200 kV Transmission Electron Microscope (TEM) equipped with a CMOS-Camera (TemCam-F416, TVIPS).

Cytotoxicity and Cell Viability Assays

For viability and cytotoxicity experiments, primary microglia were seeded at a density of 7.5×10^4 cells/well in 150 μ L DMEM containing 1% P/S and 1% N-2 supplement (GIBCO) in a 96-well plate and allowed to attach O/N. After pre-simulation with 100 ng/mL lipopolysaccharide (LPS) (InvivoGen) for 3 h, wells were washed once with DMEM and treated with either 1.75 μ M ASC, 5 μ M A β , ASC-A β composites (containing 1.75 μ M ASC and 5 μ M A β) or its buffer controls (20 mM Tris (pH 8.0) and 300 mM NaCl ("buffer B") for ASC and DPBS for A β) for 12 and 24 h. Subsequently, LDH release was measured using 50 μ L supernatant and 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).

To determine cell viability, the XTT Cell Viability Kit (Cell Signaling Technology®) was used according to the manufacturer's protocol. In brief, 150 μ L phenol red-free DMEM (GIBCO) per well was mixed with 50 μ L of XTT Reagent and 1 μ L Electron Coupling Solution and added to the microglia. After 1 h the absorbance was measured at 450 nm with a TECAN microplate reader.

Immunoblotting (IB)

Primary microglia were seeded at a density of 1.5×10^6 cells/well in 2 mL serum free DMEM in a 6-well plate. After pre-stimulating the microglia with 100 ng/mL LPS, cells were treated as mentioned in the "Cytotoxicity and Cell Viability Assays" section above. After 12 h of treatment, supernatants were collected, centrifuged at 15,000 x g for 5 min to remove cell debris, and stored at -20°C for protein precipitation.

For protein precipitation (Scheiblich et al., 2017), 500 mL methanol and 125 mL chloroform were added to 500 mL supernatant and vortex vigorously. Supernatants and used solutions were therefor kept on ice continuously. After 5 min centrifugation at 15,000 x g at 4°C the upper aqueous phase was removed carefully and again 500 mL ice-cold methanol were added to the remaining liquid. Samples were then vortexed vigorously and repeatedly centrifuged for 5 min at 13,000 x g at 4°C. Supernatants were removed and pellets were dried for 5 min in a vacuum dryer. The pellets were then resuspended in 10 μ L 2 X loading buffer (see above) and denaturated (see below). Subsequently, samples were subjected to western blot analysis.

For lysate collection, cells were scraped of the well plate, centrifuged at 15,000 x g for 5 min and pellets were lysed using 1 X 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 1 X Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail (Cell Signaling Technology®). Cell lysates and precipitated supernatants were denatured in loading buffer at 95°C and 360 rpm for 5 min in a thermo cycler. Samples were separated on a NuPAGE® 4%–12% Bis-Tris Gel (Invitrogen) in NuPAGE MES or MOPS SDS Running Buffer (NP0002) depending on the size of the respective protein of interest. The Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories) was used to blot the proteins on a 0.2 µm 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 1 h at RT, followed by incubation with the primary antibodies mouse anti-NLRP3 (1:1000, AdipoGen), rat anti-caspase-1 (1:1000, clone 4B4, Genentech), rabbit anti-ASC (1:1000; clone AL177, AdipoGen), rabbit anti-GSDMD (1:1000, Abcam), goat anti-TREM2 (1:1000, GeneTex), mouse anti-Aβ (82E1) (1:1000, IBL America), rabbit-anti-IL-1β (1:500, GeneTex), rabbit anti-GAPDH (1:1000, Sigma-Aldrich) and rabbit anti-β-actin (1:1000, Cell Signaling Technology®), O/N at 4°C, respectively. On the next day, membranes were washed three times in TBST and incubated with the respective secondary IRDye® IgG (H + L) antibodies (1:10 000, LI-COR Biotechnology) for 1 h at RT. Proteins were then visualized with the Odyssey Fc or CLx Imaging System (LI-COR Biosciences) and quantified using Image Studio (LI-COR Biosciences).

Measurement of Cytokine Secretion

Primary microglia were treated as described above in the “Cytotoxicity and Cell Viability Assays” section. Microglial IL-1β secretion was measured in cell supernatants using the mouse IL-1β/IL-1F2 DuoSet ELISA (R&D Systems) according to the manufacturer’s protocols. The reaction was terminated by adding 2 N H₂SO₄, and the optical density was measured at OD₄₅₀ with a microplate reader. To determine cytokine concentrations, values were interpolated into the standard curve by linear regression using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software).

For Toll-like receptor (TLR) neutralization experiments, cells were co-treated with anti-mouse TLR4/MD-2 Complex (clone: MTS510, Invitrogen), Mab-mTLR2 and anti-mouse TLR5 IgG (InvivoGen), as well as the mouse IgG (Invitrogen) and rat IgG (Invitrogen) isotype controls at a final concentration of 5 µg/mL. For NLRP3 inflammasome inhibition, cells were co-treated with 1 µM MCC950 (CRID3) (InvivoGen) or 100 nM IFM-2384 (IFM Therapeutics), respectively. A volume equal dimethylsulfoxid (DMSO) control, containing 0.005% DMSO was performed additionally.

Immunocytochemistry (ICC)

Primary microglia or ASC-deficient macrophages were seeded at a density of 2 × 10⁵ cells/well in 1 mL serum free DMEM in a 24-well plate containing PLL coated coverslips. Treatments were performed as described above. After 12 h, cells were washed once with PBS (Dulbecco) and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) dissolved in PBS for 15 min. For permeabilization, cells were washed three times with PBS containing 0.1% Triton X-100 (PTX) for 5 min. Thereafter, cells were blocked using 5% normal goat serum (Vector Laboratories) in PTX for 20 min and primary antibodies were added for another 30 min. To check for ASC speck formation, the rabbit anti-ASC (1:250; clone AL177, AdipoGen) or mouse-specific rabbit anti-ASC/TMS1 (1:250, D2W8U, Cell Signaling Technology®) and rat anti-CD11b (1:250; Serotec by Bio-Rad) were used. After three more washing steps in PTX, the secondary antibodies goat anti-rabbit (1:250; Invitrogen) and goat anti-rat (1:250; Invitrogen) were applied for 30 min followed by three washing steps. 4',6-Diamidino-2'-phenylindol-dihydrochloride (DAPI) was used as a counterstain at 0.1 mg/mL for 20 min in PBS before coverslips were mounted. Images were taken using a 40 X or 60 X objective. To visualize caspase-1 activity, we used the FAM-FLICA® Caspase-1 Assay Kit ImmunoChemistry Technologies LLC) according to the manufacturer’s protocol. All images were acquired using a Nikon Eclipse Ti fluorescence 2 X microscope (Nikon). Image processing was accomplished using NIS-elements 4 (Nikon) and Fiji ImageJ (Wayne Rusband; National Institute of Health).

Phagocytosis and Degradation of Amyloid β

Primary microglia were seeded at 3.5 × 10⁵ cells/well in 1 mL serum free DMEM in a 24-well plate. Previously, 0.5 µM FAM-labeled Aβ (FI-Aβ) (1-42) (Peptide Specialty Laboratories GmbH (PSL)) and 0.66 µM ASC were co-incubated in DMEM and kept in an incubator under standard conditions. For phagocytosis experiments, microglia were treated with either 0.5 µM FAM-Aβ or ASC-FAM-Aβ composites also containing 0.5 µM FAM-Aβ for 15, 30 and 60 min. For cell collection, supernatants were discarded, cells were washed with DPBS (GIBCO) and detached using 0.5% Trypsin-EDTA (GIBCO). Collected cells then were centrifuged at 300 x g for 5 min at 4°C. Supernatants were again discarded and cells were blocked in 50% iFBS diluted in DPBS for 10 min on ice. Subsequently, cells were centrifuged and pellets were resuspended in DPBS containing 2% iFBS and APC/CD11b antibody (1:100, clone M1/70, BioLegend) for 30 min on ice. After another centrifugation step, pellets were resuspended in DBPS containing 2% iFBS, and measured using the BD FACSCanto™ II Flow Cytometer. Detailed analysis was performed using FlowJo (FlowJo LLC/Becton Dickinson & Company).

For Aβ degradation experiments, microglia were exposed to FAM-labeled Aβ or ASC-FAM-Aβ composites concentrated as explained above for 1 h. Microglia were washed three times in PBS and subsequently incubated for 0, 1, 2, 3 or 4 h in fresh,

FAM-A β -free or FAM-A β -ASC-composite-free medium. Thereafter, cells were collected and stained as described above. Degradation after 0, 1, 2, 3, and 4 h was measured using the BD FACSCanto™ II Flow Cytometer. Detailed analysis was performed using FlowJo.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Data evaluation was performed using Graph Pad Prism 7 (GraphPad Software). Data are presented as mean \pm SEM in all displayed diagrams. Every dataset is accrued from at least three independent experiments (n), containing at least two to three replicates (N). Each dataset was analyzed for Gaussian distribution. In case of passing the normality test, one-way ANOVA or tow-way ANOVA, for grouped datasets, were performed followed by a post hoc analysis with a Tukey test. Otherwise, non-parametric data was analyzed using the Kruskal–Wallis test combined with a Dunn’s post hoc test. When only two groups were statistically analyzed, a t test was performed. For non-parametric data the Mann-Whitney test was applied. For each individual experiment the statistical details can be found in the corresponding figure legends. Levels of significance are indicated as *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

DATA AND CODE AVAILABILITY

This study did not generate/analyze any unique datasets or codes.

Supplemental Information

 β -Amyloid Clustering around ASC Fibrils

Boosts Its Toxicity in Microglia

Lea L. Friker, Hannah Scheiblich, Inga V. Hochheiser, Rebecca Brinkschulte, Dietmar Riedel, Eicke Latz, Matthias Geyer, and Michael T. Heneka

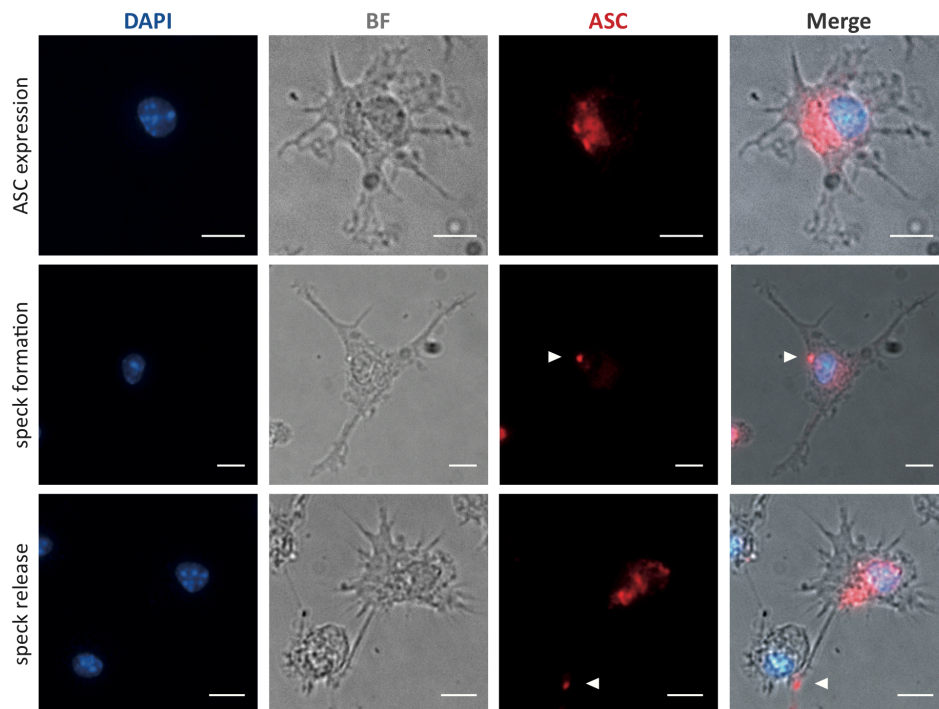


Fig. S1 | Exogenous ASC induces expression and specking of endogenous ASC. Related to Fig. 2 and Fig. 3. Immunocytochemical staining of ASC using a mouse-specific antibody (D2W8U). Top row: ASC expression, middle row: ASC speck formation, bottom row: ASC speck release. Bright-field (BF). Images were taken at 60 X magnification. Scale bar, 10 μ m.

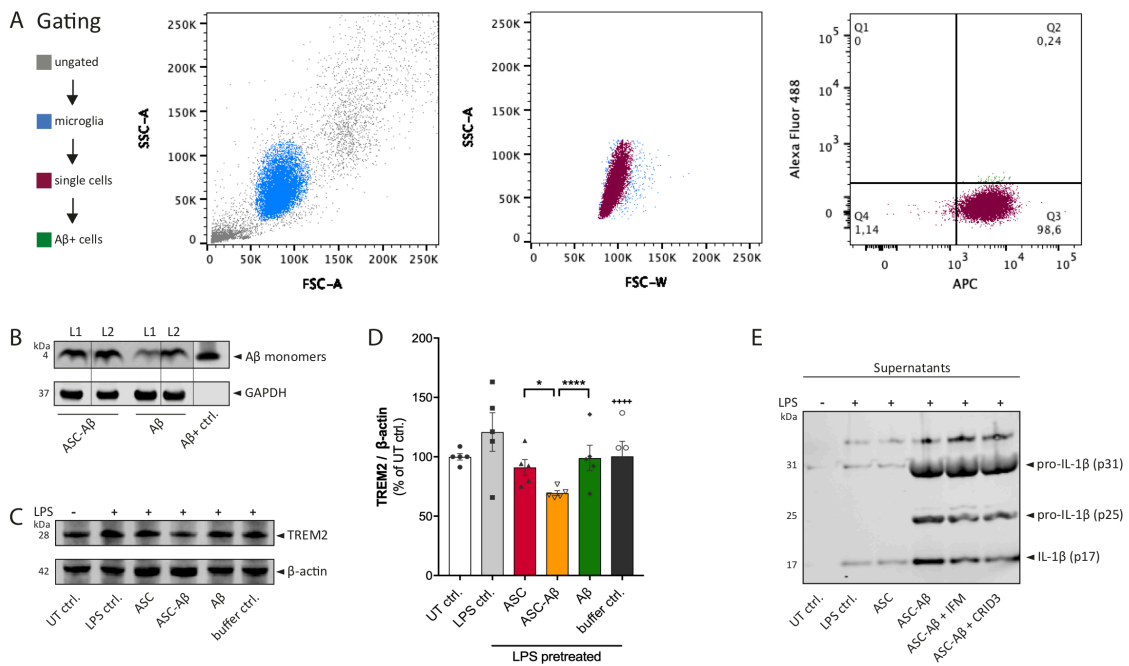


Fig. S2 | FACS gating. Treatment with ASC-Aβ composites reduces TREM2 expression in primary microglia. Related to Fig. 3 and Fig. 5.

All experiments displayed were performed using primary WT microglia. **A** FACS gating. Ungated (grey) → CD11b⁺ population, considered microglia (blue) → singlets (purple) → Aβ⁺ single microglia in Q2 (green). **B** Western blot of microglia cell lysates primed for 3 h with 100 ng/ml LPS and exposed to Aβ alone or ASC-Aβ composites for 12 h, stained for Aβ (82E1). **C**, **D** TREM2 expression detected in microglia lysates by western blot after 12 h of treatment post LPS-priming. Data were collected from two (**B**) or five (**C**, **D**) independent experiments (n = 2, n = 5). **(E)** Representative immunoblot for IL-1β in microglia supernatants treated with ASC-Aβ without or with co-application of the NLRP3 inflammasome inhibitors IFM-2384 or CRID3. All graphs are presented as mean ± SEM and were analysed by unpaired t-test. Levels of significance are indicated as *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001. Star-symbol indicates significance between groups connected by lines; plus-symbol indicates significance between ASC-Aβ composites and volume equal buffer ctrl. treated groups.

3. Danksagung

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael T. Heneka bedanke ich mich für seine ausgiebige Betreuung und Unterstützung. Er konnte mir großes Interesse und Freude an der experimentellen Forschung vermitteln, so dass ich diesen Weg in meinem zukünftigen Berufsleben weiterverfolgen möchte.

Mein großer Dank gilt auch den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe, die mir im Labor stets zur Seite standen, von denen ich zahlreiche Methoden sowie wissenschaftliches Arbeiten erlernen konnte und die diese Zeit unvergesslich machten.

Besonders möchte ich mich bei Matthias Geyer, PhD und seiner Arbeitsgruppe für die herausragende Kooperation bedanken. Ich habe mich in seinem Team vom ersten Tag an aufgenommen gefühlt und fand es sehr spannend, einen Einblick in seine Forschung zu bekommen.

Von Herzen möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die meine Entscheidung, eine umfangreiche medizinische Promotion anzustreben, immer mitgetragen und mich durch die Berg- und Tal-Fahrt der experimentellen Forschung begleitet hat.