

---

# Aktive und passive anti-GA Immuntherapie für C9orf72 ALS/FTD im Mausmodell

Mareljic Nikola

---



München 2023

Aus dem  
Deutschen Zentrum für neurodegenerative Erkrankungen (DZNE),  
Kooperationspartner der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. Christian Haass

***Aktive und passive anti-GA Immuntherapie für C9orf72  
ALS/FTD im Mausmodell***

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Mareljic Nikola

aus

München

Jahr

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Dieter Edbauer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Frank Weber
	Prof. Dr. Barbara Schraml-Schotta
	PD Dr. Joachim Havla
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat Qihui Zhou
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	23.11.2023

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Originalpublikation veröffentlicht:

**Active poly-GA vaccination prevents microglia activation and motor deficits in a C9orf72 mouse model** (Zhou Q, Mareljic N, Michaelsen M, Parhizkar S, Heindl S, Nuscher B, et al. EMBO Molecular Medicine. 2019:e10919)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XIV</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Frontotemporale Demenz (FTD)/Amyotrophe Lateralsklerose (ALS).....	1
1.1.1 Frontotemporale Demenz (FTD) .....	1
1.1.2 Amyotrophe Lateralsklerose (ALS).....	3
1.1.3 Das klinische Syndrom FTD/ALS .....	4
1.2 Mögliche Pathomechanismen der C9orf72-Mutation.....	7
1.2.1 C9orf72 Haploinsuffizienz.....	9
1.2.2 RNA Toxizität.....	11
1.2.3 DPR Protein Toxizität .....	13
1.3 Gegenüberstellung der C9orf72 Mausmodelle .....	16
1.3.1 C9orf72 <i>knock-out</i> Mäuse .....	16
1.3.2 Transgene und virale C9orf72 Mausmodelle ( <i>knock-in</i> Mausmodelle) .....	18
1.4 Therapeutische Ansätze .....	22
1.4.1 Antisense Oligonukleotid Therapie.....	22
1.4.2 RNA Interferenz.....	24
1.4.3 CRISPR .....	25
1.4.4 Niedermolekulare Verbindungen .....	26
1.4.5 Aktive und passive Impfung.....	28
1.5 Steigerung der AK-Konzentration im ZNS mittels AAV vs Transferrin-Shuttle System.....	30
1.6 Ziel der Arbeit .....	34

<b>2</b>	<b>Materialien &amp; Methoden</b> .....	<b>36</b>
2.1	Materialien .....	36
2.1.1	Instrumente und Geräte.....	36
2.1.2	Verbrauchsmittel.....	37
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	38
2.1.4	Antikörper .....	40
2.1.5	Kits.....	41
2.1.6	Puffer .....	41
2.1.7	Bakterienstämme, Zelllinien und primäre Neuronen .....	43
2.1.8	Primer .....	43
2.1.9	Plasmide.....	43
2.1.10	Software .....	44
2.1.11	Services.....	44
2.2	Methoden.....	45
2.2.1	Maushaltung und Methodik .....	45
2.2.2	Molekularbiologie.....	51
2.2.3	Zellbiologie .....	57
2.2.4	Proteinbiochemie.....	63
2.2.5	Bildgebung.....	67
2.2.6	Aufnahme und Bearbeitung von Mikroskopie-Bildern.....	71
2.2.7	Statistische Analysen .....	72
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>73</b>
3.1	Klonierung und AAV-Verpackung .....	73
3.1.1	AAV Transduktion erlaubt monocistronische Expression der Anti-DPR Antikörper mit Epitop Tags.....	75
3.2	Etablierung der intracerebroventrikulären Injektion von AAV .....	78
3.2.1	ICV-Injektion mit AAV9 führt zu effizienter Expression.....	78

3.3	Aktive Immunisierung gegen poly-GA reduziert Symptome im Mausmodell	81
3.3.1	Genotypisierung .....	82
3.3.2	Immunisierung mit (Ova-GA <sub>10</sub> ) aber nicht (GA) <sub>15</sub> induziert hohe Anti-GA Titer	84
3.3.3	Minimierung motorischer Defizite nach Impfung mit Ova-(GA) <sub>10</sub> .....	90
3.3.4	Reduktion der poly-GA Aggregate nach Impfung mit Ova-(GA) <sub>10</sub> .....	92
3.3.5	OVA-(GA) <sub>10</sub> reduziert Mikroglia-Aktivierung.....	94
3.3.6	OVA-(GA) <sub>10</sub> reduziert TDP-43 Mislokalisierung .....	96
3.3.7	Impfung rief keine Nebenwirkungen hervor.....	98
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>100</b>
4.1	Hohe Antikörper-Titer als entscheidender Faktor für positive Ergebnisse der aktiven Impfung .....	101
4.2	Verstärkung der Immunantwort mit Hilfe von Trägermolekül und Adjuvantien	107
4.3	Impfung als primär, sekundär oder tertiär Prävention?.....	109
4.4	Wirkungsweise der Antikörperantwort .....	113
4.5	Ausblick .....	116
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>118</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>143</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>144</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>Aus</b>
	<b>Datenschutzgründen sind keine privaten Informationen hinterlegt. ....</b>	<b>Fehler!</b>
	Textmarke nicht definiert.	
	<b>Publikationsliste.....</b>	<b>149</b>

## Zusammenfassung

Frontotemporale Demenz (FTD) und Amyotrophe lateral Sklerose (ALS) sind neurodegenerative Erkrankungen, die sowohl klinisch als auch pathologisch und genetisch große Gemeinsamkeiten aufweisen (1). Es scheint, dass diese Erkrankungen die beiden Enden eines komplexen Krankheitsspektrums darstellen. Die häufigste bekannte genetische Ursache für ALS/FTD ist eine autosomal dominante  $(G_4C_2)_n$ -Hexanukleotid-Sequenz Verlängerung im nicht-kodierenden Bereich des *C9orf72* Gens (2, 3). Bislang werden vor allem drei Pathomechanismen als Ursache der *C9orf72* FTD und ALS diskutiert. Eine reduzierte Expression des mutierten *C9orf72* Allels könnte durch Haploinsuffizienz eine Beeinträchtigung der Autophagie und eine gesteigerte Inflammation durch Typ-I-Interferone verursachen (4, 5, 6, 7). Außerdem bilden die Transkripte der  $(G_4C_2)_n$ -Hexanukleotid-Expansion im Zellkern RNA Foci, die wichtige RNA-bindende-Proteine sequestrieren könnten (8, 9, 10). Zudem werden Strang- und Gegenstrang-Transkripte via *repeat-associated non-ATG* (RAN) Translation in fünf verschiedene *DiPeptid-Repeat* (DPR) Proteine translatiert (1, 8, 11, 12). Die DPRs koaggregieren in neuronalen zyttoplasmatischen Einschlusskörperchen und sequestrieren dabei andere Proteine und stören so die Zellhomöostase (13, 14, 15, 16). Dabei spielen vor allem poly-GA, poly-GR und poly-PR aufgrund ihrer toxischen Eigenschaft eine entscheidende Rolle für die Krankheitsentstehung (13, 17, 18, 19, 20, 21, 22). Poly-GA ist das am häufigsten vorkommende DPR Protein. Aufgrund seines hydrophoben Charakters hat es eine hohe Aggregationsneigung und begünstigt so die Koaggregation anderer DPR Proteine. Darüber hinaus wird poly-GA von Zelle zu Zelle übertragen und verstärkt positiv rückgekoppelt die RNA Foci- und DPR Aggregat-Bildung in Akzeptor-Zellen (23). Die alleinige Expression von poly-GA resultiert in einer moderaten TDP-43 Pathologie in vitro (17, 24). Bereits in Zellkultur konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit anti-GA Antikörpern die Aggregat-Bildung und interzelluläre Transmission reduziert werden kann (23).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu testen, ob anti-GA Antikörper auch im Mausmodell therapeutisch wirksam sind. Hierfür wurde eine etablierte Linie mit neuronaler Expression eines  $(GA)_{149}$ -CFP Transgen verwendet, die im Alter von ca. vier Monaten motorische Defizite, Mikroglia-Aktivierung und Astrozytose ausbildet (19). Es erfolgte eine präsymptomatische Immunisierung mit zwei verschiedenen

poly-GA Antigenen. Zur Beurteilung der Wirksamkeit wurden Antikörpertiter, Neuropathologie und motorischer Funktion untersucht. Weil Antikörper die Bluthirnschranke nur schlecht passieren können, sollte im zweiten Teil der Arbeit, für eine modifizierte passive Antikörpertherapie gegen das poly-GA, ein Protokoll zur intracerebroventrikulären (ICV) Injektion von Adeno-assoziierten Viren in neugeborenen Mäusen etabliert werden, um einen rekombinanten anti-GA Antikörper direkt im Gehirn zu exprimieren.

Für die aktive Immunisierung wurden die (GA)<sub>149</sub>-CFP Mäuse und Wildtyp Wurfgeschwister ab der 8. Woche monatlich subkutan und intraperitoneal mit Antigen in Adjuvans immunisiert und mit einer PBS-Gruppe verglichen. Eine Gruppe erhielt (GA)<sub>10</sub> konjugiert mit dem immunogenen Träger Ovalbumin, eine andere Gruppe unkonjugiertes (GA)<sub>15</sub>. Es galt herauszufinden, ob unkonjugiertes poly-GA in Form von (GA)<sub>15</sub>-Aggregaten allein bereits immunogen genug ist, oder ob ein immunogenes Fremdantigen wie Ovalbumin als Trägermolekül benötigt wird, um eine ausreichende Immunantwort zu erreichen. Zur Überprüfung der Immunantwort wurde der anti-GA Titer ebenfalls monatlich bestimmt. Zudem wurde die Motorik der Mäuse wöchentlich mit Hilfe des Beam Walk Verhaltenstests analysiert. Nach 7 Monaten wurden die Mäuse euthanasiert und das Rückenmark mit Hilfe von Immunohistochemie- und Immunofluoreszenz-Färbungen untersucht. Erstaunlicherweise löste unkonjugiertes (GA)<sub>15</sub> keine messbare IgG Antikörperantwort aus, was die vorhergesagte geringe Immunogenität der Peptidsequenz bestätigte. Jedoch zeigten die mit Ova-(GA)<sub>10</sub> geimpften Mäuse eine überraschend starke anti-GA Antwort im Serum (bis 400 µg/ml). Die Antiseren der geimpften Mäuse konnten hochspezifisch poly-GA Aggregate in Zellkulturen und Gewebeschnitten von *C9orf72* Patienten nachweisen. Ova-(GA)<sub>10</sub>-Immunisierung führte in den transgenen Tieren zu einer Reduktion der poly-GA Aggregate, der Mikroglia-Aktivierung und der TDP-43 Mislokalisierung. Außerdem zeigten die Tiere eine deutliche Verbesserung der motorischen Fähigkeiten im Beam-Walk Test im Vergleich zur PBS-Gruppe.

Diese vielversprechenden Ergebnisse der aktiven Impfung in der prodromalen Phase legen die Grundlage für zukünftige Projekte. Wenn gezeigt werden kann, dass die Impfung auch nach Auftritt der motorischen Defizite noch erfolgreich verläuft, wäre eine klinische Patientenstudie der nächste Schritt. Zudem wäre es interessant die

Wirksamkeit in C9orf72 Mausmodellen zu untersuchen, die weitere Aspekte der Krankheit (z.B. RNA-Toxizität) nachbilden, um die dominante Rolle von poly-GA zu unterstützen.

Für den passiven Immunisierungsansatz mit viraler Antikörperexpression wurde die ICV-Injektions-Technik in das Ventrikelsystem neugeborener Mäuse zunächst mit dem Farbstoff Trypanblau etabliert. Im nächsten Schritt wurde dann GFP-exprimierender Adeno-assoziiertes Virus (AAV) mit verschiedenen pseudotypisierten Kapsiden verwendet, um die Expression im ZNS zu optimieren. Für die Antikörper-Expression wurde zunächst die cDNA von schwerer und leichter Antikörper-Kette zum besseren Nachweis mit HA und myc Epitopen gekoppelt, mit einem P2A Peptid fusioniert, in einen viralen Vektor kloniert und abschließend in AAV verpackt. Die Expression von intakten anti-GA Antikörpern wurde in Zellkultur bestätigt. Die beste Distribution und Expression von GFP in der Maus konnte mit AAV9 Pseudotypisierung erreicht werden. Die Wirksamkeit der intrazerebralen Antikörperexpression soll im nächsten Schritt von einem anderen Doktoranden in einem geeigneten Mausmodell getestet werden.

Diese Arbeit etabliert aktive Immunisierung gegen poly-GA als vielversprechenden Therapieansatz zur Behandlung der C9orf72 FTD und ALS und legt die Grundlage für weiterführende Experimente zur passiven Immunisierung. Weitere Validierung in anderen Modellsystemen und die Optimierung des Antigens für eine GMP-konforme Produktion können auf Basis der hier beschriebenen Ergebnisse zukünftige Patientenstudien ermöglichen.

## **Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1: Genetische Ursachen der vererbten FTD, ALS und FTD/ALS (Quelle: modifiziert nach (76))</b> .....	<b>6</b>
<b>Abbildung 2: Pathomechanismen der C9orf72 FTD/ALS (Quelle: modifiziert nach (76))</b> .....	<b>8</b>
<b>Abbildung 3: Zeitstrahl aktive Impfung (Quelle: Nikola Mareljic)</b> .....	<b>48</b>
<b>Abbildung 4: Intracerebroventrikuläre Injektion (Quelle: Nikola Mareljic)</b> .....	<b>49</b>
<b>Abbildung 5: PCR Cloning (Quelle: Dieter Edbauer)</b> .....	<b>52</b>
<b>Abbildung 6: Transfektionslösung und AAV Helper-free-System (Quelle: Nikola Mareljic; Cell Biolabs)</b> .....	<b>61</b>
<b>Abbildung 7: Herstellung einer monocistronischen Expressionskassette (Quelle: Nikola Mareljic)</b> .....	<b>74</b>
<b>Abbildung 8: Monocistronische Expression der Antikörper 1A12 und 32B3 (Quelle: Nikola Mareljic)</b> .....	<b>76</b>
<b>Abbildung 9: Optimierung der stereotaktischen ICV-Injektion, breite Genexpression mit AAV9 (Quelle: Nikola Mareljic)</b> .....	<b>80</b>
<b>Abbildung 10: Genotypisierung erlaubt Gruppenzuordnung der Mäuse (Quelle: Nikola Mareljic)</b> .....	<b>83</b>
<b>Abbildung 11: Ova-(GA)<sub>10</sub> induziert hohe Anti-GA Titer (Quelle: (277))</b> .....	<b>85</b>
<b>Abbildung 12: TG-Ova-(GA)<sub>10</sub> Serum detektiert poly-GA Aggregate in Zellkultur (Quelle: (277))</b> .....	<b>86</b>
<b>Abbildung 13: TG-Ova-(GA)<sub>10</sub> Serum detektiert poly-GA Aggregate im Gewebe (modifiziert nach (277))</b> .....	<b>87</b>
<b>Abbildung 14: TG-Ova-(GA)<sub>10</sub> Seren detektieren spezifisch poly-GA (Quelle: Nikola Mareljic)</b> .....	<b>89</b>
<b>Abbildung 15: Impfung mit Ova-(GA)<sub>10</sub> verbessert die Motorik (Quelle: (277))</b> ..	<b>91</b>
<b>Abbildung 16: Impfung mit Ova-(GA)<sub>10</sub> reduziert poly-GA Aggregate (Quelle: (277))</b> .....	<b>93</b>

<b>Abbildung 17: Reduktion der Mikroglia-Aktivierung mit Ova-(GA)<sub>10</sub> (Quelle: (277))</b> .....	95
<b>Abbildung 18: Reduktion der TDP-43-Mislokalisierung mit Ova-(GA)<sub>10</sub> (Quelle: (277))</b> .....	97
<b>Abbildung 19: Mäuse zeigten keine pathologischen Auffälligkeiten (Quelle: Abbildung 19A: (277), Abbildung 19B, C: Nikola Mareljic)</b> .....	99
<b>Abbildung 20: Mikroglia/Makrophagen-Aktivierung (Quelle: Nikola Mareljic)</b> .	102
<b>Abbildung 21: RNA Sequenzierung (Quelle: Nikola Mareljic)</b> .....	104
<b>Abbildung 22: NFL Konzentration im Liquor (Quelle: Nikola Mareljic)</b> .....	106
<b>Abbildung 23: Möglicher Mechanismus der anti-GA Antikörper (Quelle: Nikola Mareljic)</b> .....	115

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1: Knock-in Mausmodelle (Quelle: modifiziert nach (76))</b> .....	<b>20</b>
<b>Tabelle 2: Impfgruppenzuteilung (Quelle: Nikola Mareljic)</b> .....	<b>46</b>
<b>Tabelle 3: PCR Standardprotokoll (Quelle: Eddie-Lab)</b> .....	<b>53</b>
<b>Tabelle 4: CFP-Genotypisierung-Standardprotokoll (Quelle: Eddie-Lab)</b> .....	<b>55</b>
<b>Tabelle 5: Transfektionslösung für HEK293 Zellen (Quelle: Eddie-Lab)</b> .....	<b>58</b>
<b>Tabelle 6: Transfektionslösung für Neuronen (Quelle: Eddie-Lab)</b> .....	<b>59</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
ADARB2	adenosine deaminase RNA specific B2
ALS	Amyotrophe laterale Sklerose
ALYREF	Aly/REF Export Faktor
ASO	Antisense Oligonukleotide
ATG101	Autophagie-related Protein 101
BAC	Bacterial-artificial-chromosome
bvFTD	Wesensverändernde FTD
cDNA	Komplementäre DNA
CFP	Cyan-fluoreszenz Protein
CHCHD10	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix Domäne 10
CHMP2B	Charged multivesicular body protein 2b
cm	Zentimeter
CS	Cover Slips / Deckgläser
CT	Computertomographie
DNA	Desoxy-ribonukleinsäure
DPR	DiPeptid-repeat
ECL	chemiluminescence Substrat
FCS	Fötale Kälberserum
FTD	Frontotemporale Demenz
FUS	Fused in sarcoma
g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
G3BP1	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1
GDP	Guanosin-diphosphat
GEF	GTP-Austauschfaktor
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GRN	Progranulin
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-triphosphat
GTPase	Guanosin-triphosphat Phosphatase
HA	Hemagglutinin-tag
hnRNP	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein
i.p.	intraperitoneal
ICV	Intracerebroventrikular
IF	Immunofluoreszenz
IHC	Immunohistochemie
kDa	Kilo Dalton
M	Molar
mA	Milliampere
MAPT	Mikrotubuli-assoziiertes Protein TAU
MBNL1	Muscleblind-Like Protein 1
min	Minute

ml	Milliliter
Mlf2	Myeloid Leukemia Factor 2
mm	Millimeter
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NCL	Nucleolin
NEAA	Nicht essentielle Aminosäuren
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NPM1	Nucleophosmin
OPTN	Optineurin
OVA	Ovalbumin
p62	Ubiquitin Bindungsprotein
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDL	
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PLS	Primäre Lateralsklerose
PMA	Progressive Muskelatrophie
Poly-GA	Poly Glycin/Alanin
Poly-GP	Poly Glycin/Prolin
Poly-GR	Poly Glycin/Arginin
Poly-PA	Poly Prolin/Alanin
Poly-PR	Poly Prolin/Arginin
Pom121	Nuclear pore Membran Protein 121 kDa
PPA	Primär progressive Aphasie
Pur- $\alpha$	purine-rich element binding protein A
PVDF	polyvinylidene difluorid
Rab39b	Ras-verwandtes Protein 39b
Rab8	Ras-verwandtes Protein 8
RAD23	radiation 23 homolog A
RAN	repeat-associated non-ATG
RanGAP1	Ran GTPase-activating protein 1
RBP	RNA bindende-Proteine
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungsgeschwindigkeit
s.c.	subcutan
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese
sec	Sekunde
SF3a	Splicing Faktor 3a
SMCR8	Smith-Magenis Syndrom Chromosom Region 8
SNRBP2	U2 small nuclear ribonucleoprotein B

SOD1	Superoxid Dismutase 1
SPECT	Einzelphotonen- Emissionscomputertomographie
SQSTM1	Sequestom 1
SRSF1	Serin/Arginin-reicher Spleißfaktor 1
TBK1	TANK-Bindungskinase 1
TDP-43	Transactive response DNA binding protein 43 kDa
Tg	Transgen
TIA1	T-cell-restricted intracellular antigen-1
TMB	Tetramethylbenzidin
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
UBQLN2	Ubiquilin 2
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ULK1	Autophagie-Initiationskomplex
µm	Mikrometer
Unc119	uncoordinated 119
V	Volt
VCP	Valosin-containing Protein
WDR41	WD repeat-containing protein 41
WT	Wildtyp
Zfp106	Zinkfinger Protein 106
ZNS	Zentrale Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Frontotemporale Demenz (FTD)/Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)

Ursächlich liegt den meisten neurodegenerativen Erkrankungen eine Akkumulation und Aggregation von Proteinen im ZNS zugrunde, wodurch fortwährend Neurone geschädigt werden. Dabei kommt es sukzessiv zu einer Degeneration neuronaler Schaltkreise des zentralen und teilweise auch des peripheren Nervensystems. Frontotemporale Demenz (FTD) und Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) sind zwei neurodegenerative Erkrankungen, die wegen zahlreicher klinischer, pathologischer und genetischer Gemeinsamkeiten inzwischen als zwei Extreme eines komplexen Krankheitsspektrums gesehen werden.

### 1.1.1 Frontotemporale Demenz (FTD)

Im Zuge der demografischen Veränderung stellen uns die zahlreichen Formen der Demenz vor medizinische, gesellschaftliche und ökonomische Herausforderungen. Eine Diagnose kann gemäß der „Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10.Revision“ (ICD 10) mit Hilfe der folgenden Kriterien gestellt werden: 1) Irreversible progrediente alltagsrelevante kognitive Störung 2) Symptomatik seit mindestens 6 Monaten 3) Ausschluss von Arzneimittelnebenwirkungen als Ursache (25). Wie bei allen Formen der Demenz müssen auch bei der FTD zunächst die Diagnosekriterien für ein Demenzsyndrom erfüllt sein. Darüber hinaus gibt es für diese Erkrankung weitere spezifische Kriterien, auf die im Folgenden genauer eingegangen werden soll. Die FTD wird unterteilt in die wesensverändernde frontotemporale Demenz (*behavioral variant FTD*, bvFTD) und die primär progressive Aphasie (PPA). Diese wird wiederum in drei Subtypen, die nicht-flüssige agrammatische PPA, die semantische PPA, und die logopenische PPA gegliedert (26, 27, 28, 29). Bildgebende Verfahren oder auch die Autopsie bestätigen eine Atrophie des Frontal- und/oder Temporal-Lappens. Je nach fokalem Beginn der Degeneration unterscheidet sich in der Anfangsphase das klinische Erscheinungsbild der vier Subtypen. Die Sicherung der Diagnose bedarf deshalb eine Kombination aus einer umfassenden Anamnese, körperlicher Untersuchung, psychischer Tests und bildgebender Verfahren (27, 29, 30).

Mehr als die Hälfte aller FTD Patienten leiden an der bvFTD (28). Hierbei kommt es zur Atrophie des frontalen und anterior-temporalen Kortex. Zu den Hauptsymptomen zählen Verhaltensenthemmung, Apathie, Verlust von Sympathie oder Empathie, zwanghaftes Verhalten oder auch Esssucht (27, 31). Bei der nicht-flüssigen, agrammatischen PPA imponiert das Bild einer Atrophie des linken posterior, fronto-insulären Kortex. Bei diesen Patienten steht die Beeinträchtigung der Sprachproduktion im Vordergrund. Dies äußert sich in Form von Agrammatismus oder Sprechapraxie. Kennzeichnend für die semantische PPA ist eine Atrophie des anterior-temporalen Kortex. Charakteristisch hierfür ist der Verlust des Sprachverständnisses, bei gleichzeitig intakter Sprachmotorik. Patienten sind nicht mehr in der Lage einzelnen Worten ihre Bedeutungen zuzuordnen. Die logopenische PPA wird durch eine Atrophie des linken posterior-perisylvischen oder parietalen Kortex definiert. Ein typisches Merkmal hierfür ist die Schwierigkeit Gesagtes zu wiederholen. Zudem entwickeln diese Patienten eine phonematische Paraphasie. Hierbei kommt es zu lautlichen Veränderungen einzelner Worte (27, 32).

Mit fortschreitender Erkrankung gehen die einzelnen Subtypen ineinander über (26, 27). Der Krankheitsbeginn liegt im Durchschnitt bei ca. 59 Jahren (33). Die Inzidenz liegt bei 2,7-4,1/100.000. Neben der Alzheimer und der Lewy-Body-Demenz ist die FTD damit die dritthäufigste Demenzform (26, 34, 35). Die durchschnittliche Überlebenszeit nach Manifestierung erster klinischer Symptome beträgt ca. 8 Jahre. Dabei kommt es zu einem fortschreitenden Verlust der kognitiven Fähigkeiten, über den graduellen Abbau der körperlichen Leistungsfähigkeit bis hin zum Tod. Die bettlägerigen Patienten versterben meist an einer Pneumonie oder anderen Infektionskrankheiten (26). Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine kausale Behandlungsmöglichkeit.

### 1.1.2 Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)

Bei der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) handelt es sich um eine der häufigsten Motoneuronenerkrankungen. Die Symptomatik ergibt sich aus dem Untergang primärer und sekundärer Motoneurone des bulbären und spinalen Trakts. Davon zu unterscheiden ist die Primäre Lateralsklerose (PLS), bei der es zur Schädigung der primären Motoneurone kommt, und die Progressive Muskelatrophie (PMA), welche durch den Untergang sekundärer Motoneurone gekennzeichnet ist (36, 37, 38). Hierbei ist es jedoch nicht möglich, die Krankheiten strikt voneinander abzugrenzen. Vielmehr sind die klinischen Symptome Teil eines Kontinuums, welchem die Degeneration des motorischen Systems übergeordnet steht (39, 40).

Die Erstmanifestation der klinischen Symptome ist abhängig von der primär betroffenen ZNS-Region. So äußert sich eine Läsion des spinalen Trakts in der Anfangsphase als Schwäche in den Beinen, mit Krämpfen und Faszikulationen, oder als Schwäche in den oberen Extremitäten, vor allem der Extensoren. Im weiteren Verlauf überwiegen Hyperreflexie und Spastik. Demgegenüber stehen Störungen des bulbären Trakts, die initial mit Kau- und Schluck-Beschwerden, beeinträchtigter Mimik und geschwächter Zungenmuskulatur einhergehen. Diese Patienten entwickeln zudem Dysarthrie und pseudobulbäre Affektstörungen (36, 37, 38). Nach meist fokalem Beginn breitet sich die Degeneration generalisiert aus und führt zur progressiven Paralyse.

Das Erkrankungsalter liegt im Durchschnitt bei 62 Jahren. In Europa wird eine Inzidenz von 5,4/100.000 beschrieben (41). Die mittlere Lebenserwartung nach Krankheitsbeginn beträgt in etwa 2 bis 4 Jahre. Im Zuge des sukzessiven Verlustes motorischer Neurone versterben die Patienten meist an einer respiratorischen Insuffizienz durch Versagen der Atemmuskulatur (42). Mit Riluzol ist ein Medikament verfügbar, das eine 3-6-monatige Lebensverlängerung ermöglicht (43). Daneben sind in den USA auch Radicava und Relyvrio zugelassen, die eine Verlangsamung des Krankheitsprogresses bewirken (44, 45). Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es jedoch keine weiteren evidenzbasierten Therapiemöglichkeiten. Aus diesem Grund werden Patienten vor allem symptomatisch therapiert (37). Dabei ist es von eminenter Bedeutung den Patienten in einem multidisziplinären Team mit Zugang zu Logopädie, Physiotherapie, Ergotherapie, Psychologie, Diätberatung, Gastroenterologie und Pneumologie zu betreuen. Hierfür bietet sich die Anbindung

der Patienten an ALS-Zentren an. Dadurch wird eine Linderung der Beschwerden und Verbesserung der Lebensqualität gewährleistet (46).

### 1.1.3 Das klinische Syndrom FTD/ALS

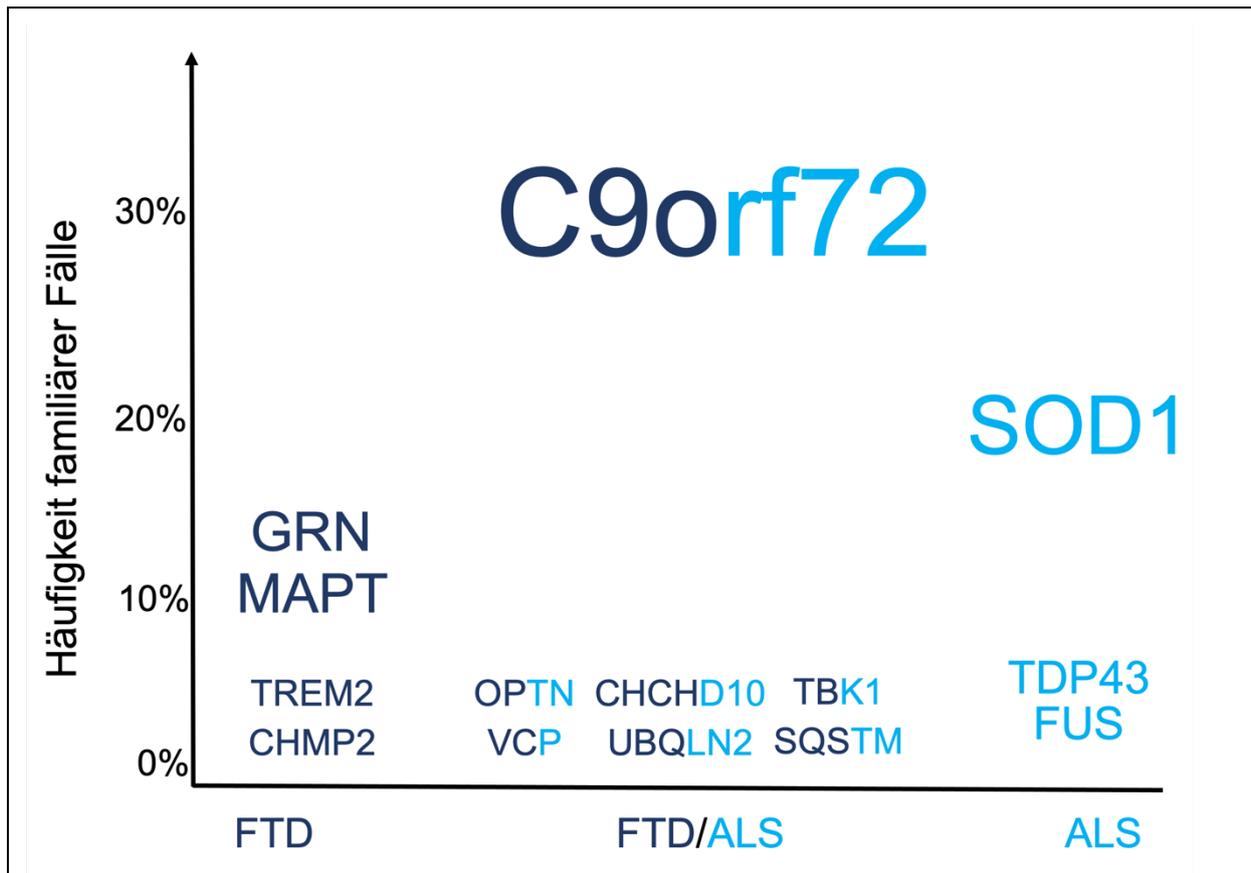
Mit voranschreitendem Krankheitsverlauf entwickeln 5-15% der FTD Patienten ALS-typische, motorische Defizite (28, 47). Auf der anderen Seite präsentieren 8-15% der ALS Patienten kognitive Defizite und Verhaltensauffälligkeiten, die mit dem klinischen Bild der FTD übereinstimmen (48). Patienten mit der Mischform FTD/ALS weisen einen rascheren Krankheitsverlauf auf als Patienten mit reiner FTD oder ALS. Kennzeichnend für viele neurodegenerative Erkrankungen sind pathologische Protein-Einschlüsse im ZNS. Bei ALS und FTD findet man zum Teil phosphorylierte, zytoplasmatische TDP-43-Aggregate. Diese wurden sowohl im Neokortex, Hippocampus als auch in spinalen Motoneuronen nachgewiesen (2). TDP-43 ist ein hochkonserviertes Protein, welches an der Prozessierung der RNA beteiligt ist (49). Hierbei scheint es insbesondere das aberrante Spleißen nichtkonservierter, „kryptischer Exons“ zu unterdrücken. In gesunden Zellen ist TDP-43 überwiegend im Nukleus lokalisiert. In Zellen mit zytoplasmatischen TDP-43 Aggregaten findet sich im Kern meist kaum noch TDP-43. Dies könnte beispielsweise auf einen gestörten nukleo-zytoplasmatischen Transport zurückzuführen sein (50). Durch Mislokalisierung kommt es zum Funktionsverlust und dadurch zum Einbau „kryptischer Exons“ in die Ziel-mRNA. Dies führt meist durch Leserasterverschiebung zum sogenannten Nonsense-vermittelten Abbau (NMD) der fehlerhaften mRNA. Bisher sind vor allem Stathmin2 und Unc13a als humanspezifische Zielgene von TDP-43 untersucht worden (51, 52, 53, 54, 55). Es wurde gezeigt, dass Bereiche des zentralen Nervensystems, in welchen es zur Degeneration von Neuronen kommt, sehr stark mit TDP-43-Aggregaten korrelieren (56).

Sowohl FTD als auch ALS treten meist sporadisch auf. Mittlerweile sind jedoch auch viele genetische Ursachen bekannt (siehe Abbildung 1). 10-27% aller FTD Fälle (57) und 5-10% aller ALS Fälle (38) zeigen eine autosomal dominante Vererbung. Neben den bereits erwähnten klinischen und pathologischen Überschneidungen zeigten genetische Analysen eine klare Verbindung zwischen den beiden Erkrankungen. So wurden Genmutationen identifiziert, die eine reine FTD oder ALS auslösen können. Zudem gibt es Mutationen, welche sowohl eine reine FTD oder ALS, als auch die

Mischform FTD/ALS hervorrufen können. Mutationen, die eine reine FTD verursachen, betreffen beispielsweise das Mikrotubuli-assoziierte Protein TAU (MAPT), das Progranulin (GRN), das *Charged multivesicular body protein 2b* (CHMP2B) oder das *Triggering receptor expressed on myeloid cells 2* (TREM2)-Gen (58, 59, 60, 61, 62). Mutationen, die überwiegend ALS auslösen, betreffen zum Beispiel die Superoxid Dismutase 1 (SOD1), das TAR DNA-Bindungsprotein 43 (TDP-43) oder das *Fused in sarcoma* (FUS)-Gen (63, 64, 65, 66). Mutationen in den folgenden Genen können sowohl ALS oder FTD auslösen, als auch in manchen Fällen zur Mischform FTD/ALS führen: *coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain 10* (CHCHD10), Optineurin (OPTN), Sequestom 1 (SQSTM1), TANK-Bindungsinkinase 1 (TBK1), Ubiquilin 2 (UBQLN 2), *Valosin-containing Protein* (VCP) oder C9orf72 (67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76).

Die häufigste bekannte genetische Ursache von FTD und ALS, ist eine massive  $(G_4C_2)_n$ -Hexanukleotid-Sequenz Verlängerung im nicht-codierenden Bereich des C9orf72 Gens (2, 3). In gesunden Individuen liegt die Wiederholungsrate für die  $(G_4C_2)_n$ -Hexanukleotid-Sequenz Verlängerung bei unter 24 (meist 2-3), wohingegen sie in Mutationsträgern oft 500-1000 und teils bis zu 10000 Wiederholungen betragen kann (77). Die Prävalenz für diese Mutation in Europa liegt für die vererbte FTD bei 25%, für die vererbte ALS bei 34% und für FTD und ALS Fälle ohne positive Familienanamnese bei 5% (78, 79). Untersuchungen von präsymptomatischen C9orf72 Mutationsträgern haben ergeben, dass DiPeptid-Repeat (DPR) Proteine schon viele Jahre vor TDP-43 Pathologie und Symptombeginn nachweisbar sind (80, 81, 82). Die Akkumulation und Aggregation der DPR Proteine scheint eine intrinsische Reaktionskaskade auszulösen, infolgedessen es zur Hyperphosphorylierung und Aggregation von TDP-43 kommt. Die Neurodegeneration und Manifestierung klinischer Symptome stellen den Endpunkt dieses komplexen Krankheitsprozesses dar (83). Etwa die Hälfte der FTD und ALS Patienten mit C9orf72 Mutation entwickeln im weiteren Krankheitsverlauf eine kombinierte FTD/ALS (84, 85). In C9orf72 Mutationsträgern tritt die Krankheit früher auf, die Verlaufsform ist deutlich aggressiver und die Patienten haben eine kürzere Lebenserwartung als Nichtmutationsträger (85, 86). C9orf72 ALS/FTD wird mit hoher Penetranz autosomal dominant vererbt. Die exakte Wiederholungslänge kann in einer Familie zwischen den Generationen stark schwanken, weil die  $(G_4C_2)_n$ -Hexanukleotid-Sequenz Verlängerung ab 20 Wiederholungen meist instabil ist (87,

88). Auch somatische Mutationen mit unterschiedlicher Wiederholungslänge in verschiedenen Geweben sind häufig. Der Krankheitsbeginn variiert zwischen dem 27. - 82. Lebensjahr, wobei ein Durchschnittsalter von 57 Jahren angenommen werden kann. Die Lebenserwartung nach Krankheitsbeginn erstreckt sich in einem Bereich zwischen 9 Monaten und 22 Jahren (84, 86, 89, 90, 91).



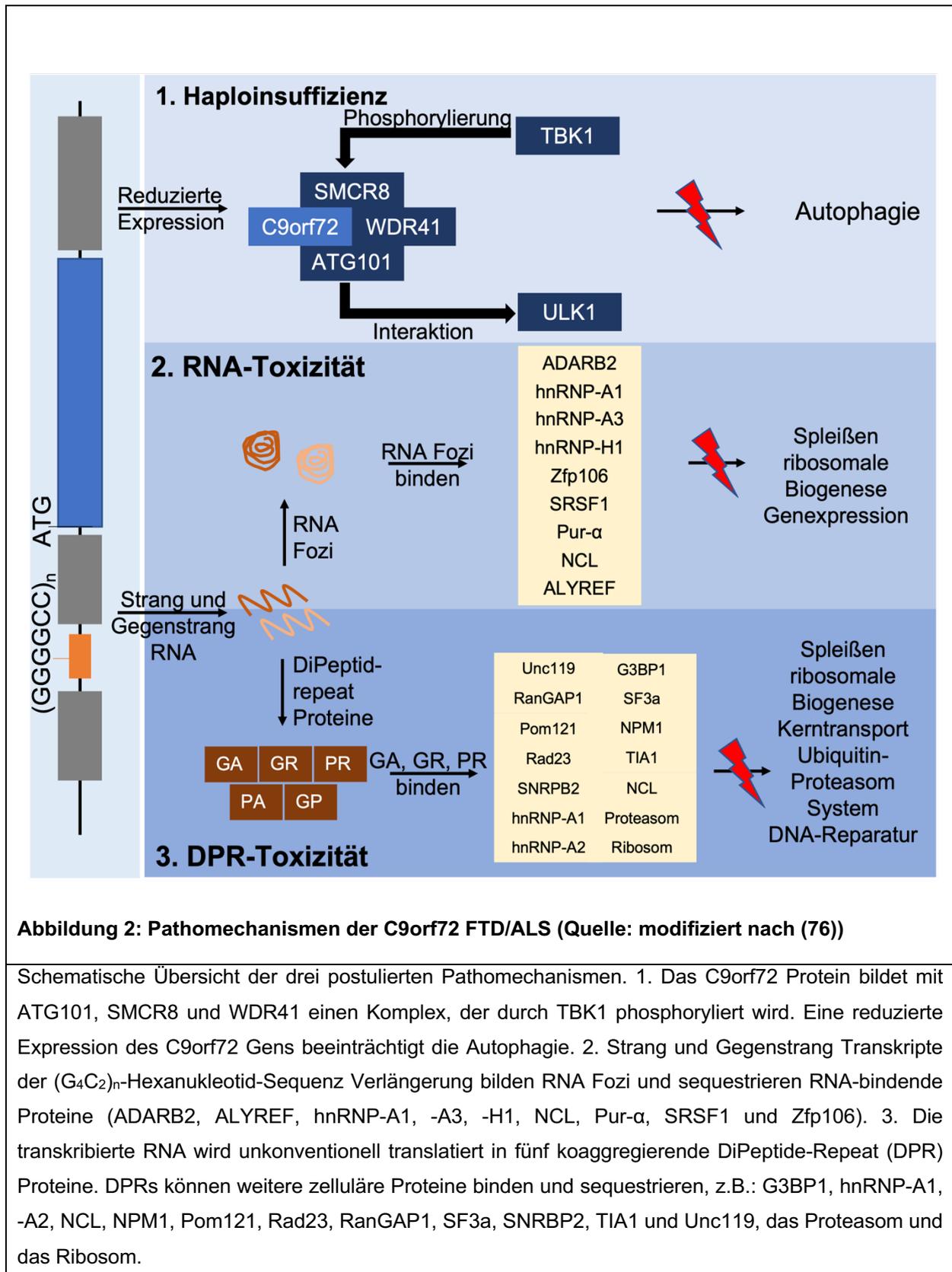
**Abbildung 1: Genetische Ursachen der vererbten FTD, ALS und FTD/ALS (Quelle: modifiziert nach (76))**

Schematische Darstellung der Gene als Wortwolke, gewichtet nach der Häufigkeit des familiären Auftretens. Die Größe der Namen entspricht der Häufigkeit familiärer Fälle in aufsteigender Reihenfolge (y-Achse). Genetische Mutationen, welche eine reine FTD auslösen können, sind in dunkelblau dargestellt. Mutationen, welche eine ALS auslösen können, sind hellblau. Mutationen, welche sowohl FTD oder ALS, als auch die Mischform auslösen können, sind dunkelblau/hellblau.

### 1.2 Mögliche Pathomechanismen der C9orf72-Mutation

Nach der Identifikation von C9orf72 als häufigste genetische Ursache für FTD und ALS, wurde weltweit intensiv die Funktion des C9orf72 Proteins und die zugrundeliegende Pathogenese genauer untersucht. Widersprüchlichen Untersuchungen zufolge ist C9orf72 entweder ein GTP-Austauschfaktor (GEF) oder ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP) (92, 93, 94). C9orf72 bildet einen Multiproteinkomplex mit SMCR8, WDR41 und ATG101, und agiert als GEF bzw. GAP für die kleinen GTPasen Rab8a und Rab39b. Diese sind wichtig für die Regulation des vesikulären Transports und für die Regulation der Autophagie. Darüber hinaus interagiert der Multiproteinkomplex, nach Phosphorylierung durch die Serin/Threonin Proteinkinase (TBK1), mit dem Autophagie-Initiationskomplex (ULK1). Zusammen zeigen diese Daten die eminente Bedeutung des C9orf72 Proteins für die Regulation der Autophagie (95, 96, 97, 98).

Noch ist nicht restlos geklärt, wie die C9orf72 Mutation FTD und ALS auslöst. Es werden jedoch drei Pathomechanismen diskutiert, die wahrscheinlich zumindest teilweise synergistisch wirken. Repeat-Verlängerung hemmt die C9orf72 Transkription. Die dadurch um ca. 40% reduzierte C9orf72 Proteinexpression könnte funktionelle Konsequenzen haben (Haploinsuffizienz). Zum anderen akkumulieren Strang- und Gegenstrang- RNA-Transkripte in sogenannten Foci im Zellkern. Sie könnten durch Sequestrierung von RNA bindende-Proteinen einen toxischen Effekt auf die Zelle haben (RNA Toxizität). Die dritte Möglichkeit beschreibt die Hypothese, dass die aus der *Repeat*-RNA unkonventionell translatierten DiPeptid-repeat Proteine (DPR Proteine) durch Aggregatbildung und Sequestrierung anderer Proteine die Zellhomöostase beeinträchtigen (DPR Protein Toxizität). Im Weiteren werden diese drei Mechanismen genauer beschrieben, wichtige Erkenntnisse aus Zellkultur-Modellen erläutert und unterschiedliche Mausmodelle gegenübergestellt.



**Abbildung 2: Pathomechanismen der C9orf72 FTD/ALS (Quelle: modifiziert nach (76))**

Schematische Übersicht der drei postulierten Pathomechanismen. 1. Das C9orf72 Protein bildet mit ATG101, SMCR8 und WDR41 einen Komplex, der durch TBK1 phosphoryliert wird. Eine reduzierte Expression des C9orf72 Gens beeinträchtigt die Autophagie. 2. Strang und Gegenstrang Transkripte der  $(G_4C_2)_n$ -Hexanukleotid-Sequenz Verlängerung bilden RNA Foci und sequestrieren RNA-bindende Proteine (ADARB2, ALYREF, hnRNP-A1, -A3, -H1, NCL, Pur-α, SRSF1 und Zfp106). 3. Die transkribierte RNA wird unkonventionell translatiert in fünf koaggregierende DiPeptide-Repeat (DPR) Proteine. DPRs können weitere zelluläre Proteine binden und sequestrieren, z.B.: G3BP1, hnRNP-A1, -A2, NCL, NPM1, Pom121, Rad23, RanGAP1, SF3a, SNRPB2, TIA1 und Unc119, das Proteasom und das Ribosom.

### 1.2.1 C9orf72 Haploinsuffizienz

Die enorme  $(G_4C_2)_n$ -Hexanukleotid-Expansion führt zu Störungen der Transkription bzw. der posttranskriptionalen Regulation, sodass die Expressionsrate des Proteins reduziert wird. Als Hauptursache wird eine epigenetische Gen-Stilllegung diskutiert. Eine Beeinträchtigung des Spleiß-Vorgangs wäre ebenfalls denkbar, erscheint jedoch als unwahrscheinlich, da der Repeat im Promotor der Haupttranskripte und nicht in der RNA liegt. Ersteres wurde schon für andere neurodegenerative Erkrankungen, wie zum Beispiel die Friedreich Ataxie oder das Fragiles-X-Syndrom, beschrieben (99, 100, 101). Somit wäre die Haploinsuffizienz des *C9orf72* Gens ein möglicher Pathomechanismus. Es wurde ein ALS Patient beschrieben, der eine loss-of-function Mutation des *C9orf72* Gens trägt (102).

Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass das mutierte Allel in Mutationsträgern stark an Histonen H3 und H4 gebunden ist, die an ihren Lysin-Resten 9, 27, 79 und 20 trimethyliert sind (103, 104). Zudem wurde festgestellt, dass CpG-Inseln im Promotorbereich des *C9orf72* Gens hypermethyliert sind (103, 105). Sowohl durch die Histon-Methylierung als auch die CpG-Hypermethylierung wird das Transkriptionslevel des Gens reduziert. Dabei scheint die Länge der  $(G_4C_2)_n$ -Hexanukleotid-Expansion mit dem Methylierungsgrad der Promotorregion positiv zu korrelieren (106). Reduzierte *C9orf72* Transkript- und Protein-Spiegel wurden in Zellkultur- und Gewebs- Untersuchungen von Mutationsträgern nachgewiesen (3, 103, 106, 107).

Es ist nicht vollständig geklärt, inwieweit die epigenetischen Modifikationen den Krankheitsverlauf positiv oder negativ beeinflussen. Einerseits könnten sie einen protektiven Mechanismus darstellen, indem sie das Expressionslevel der toxischen  $(G_4C_2)_n$ -Hexanukleotid-Expansions-RNA reduzieren (108, 109). Andererseits besteht die Möglichkeit, dass durch die verminderte Expression eine Verschlechterung des Krankheitsverlaufs eintritt. Der Arbeitsgruppe um Baloh gelang es nachzuweisen, dass ein vollständiger Verlust des *C9orf72* Proteins eine gesteigerte Interferon Typ 1 vermittelte Entzündungsreaktion in Zell- und Maus-Modellen bewirkt. Aufgrund der gestörten Autophagie kommt es zu einem verminderten Abbau des *Stimulator of interferon genes* (STING). Die Akkumulation dieses Proteins induziert eine gesteigerte Produktion von Interferon Typ 1. Folglich wird eine deutliche Zunahme an Inflammation und Mikroglia-Aktivierung beobachtet (7, 110). Gegen die

Haploinsuffizienz als Hauptursache der Erkrankung spricht allerdings, dass sich ein homozygoter Mutationsträger, welcher deutlich verminderte C9orf72 Expressionslevel aufwies, in seiner Symptomatik nicht wesentlich von heterozygoten Mutationsträgern unterschied (88). Die hier aufgeführten Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass die Haploinsuffizienz durch gestörte Autophagie eine gesteigerte Entzündungsreaktion bewirkt und es wird angenommen, dass dadurch die RNA und DPR Toxizität verstärkt werden könnten (95, 97, 98).

### 1.2.2 RNA Toxizität

In C9orf72 Mutationsträgern wird die  $(G_4C_2)_n$ -Hexanukleotid-Expansion bidirektional transkribiert. Die dadurch entstehenden RNA-Sequenzen bilden inter- und intramolekulare Strukturen, wie beispielsweise G-Quadruplexe oder Haarnadelschleifen, und reichern sich überwiegend nukleär aber auch zytoplasmatisch in Form von RNA-Fozi an (2, 8, 10, 111). RNA-Fozi sind gehäuft in Neuronen und seltener auch in Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten zu finden (112, 113).

Die Toxizität der RNA-Fozi könnte darauf zurückzuführen sein, dass sie RNA-bindende-Proteine (RBP) sequestrieren. Ähnliches wurde für die Myotone Dystrophie Typ 1 nachgewiesen. Hier akkumulieren Fozi aus  $(CTG)_n$ -RNA unter anderem mit dem *Muscleblind-Like Protein 1* (MBNL 1) und stören so das Spleißen vieler Zielgene (114). Die C9orf72 RNA-Fozi binden RBPs, die an posttranskriptionalen Modifikationen, der Transkription oder auch dem nukleozytoplasmatischen Transport beteiligt sind. Dazu gehören ALYREF (*Aly/REF export factor*), SRSF1 (Serin/Argininreicher Spleißfaktor 1), Zfp 106 (Zinkfinger Protein 106), hnRNP-A1, -H1, -A3 (*heterogenous nuclear ribonucleoprotein*), Pur- $\alpha$  (*purine-rich element binding protein A*), NCL (Nucleolin) und auch das ADARB2 (*adenosine deaminase RNA specific B2*) (9, 10, 76, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121). Bedingt durch die Aggregation der RNA-Fozi mit den RBPs kommt es zur Beeinträchtigung dieser Prozesse. Erste Hinweise, dass es auch in C9orf72 Patienten zu einer fehlregulierten posttranskriptionalen Modifikation kommt, lieferte die Identifikation akkumulierter, falsch modifizierter Proteine im Frontalkortex und Zerebellum (122). Dabei wird durch das Auslassen von Exons (*Exon-skipping*) und alternative Polyadenylierung eine große Variabilität in der Genexpression erzielt. Die somit unterschiedlich exprimierten Proteine, welche unter anderem an der Entzündungsreaktion oder dem neuronalen Wachstum beteiligt sind, verlieren dadurch zum Teil ihre Funktionalität (122, 123). Trotz der gestörten Genexpression sind die Expressionslevel der RBPs nicht verändert und eine mit MBNL1 bei der Myotonen Dystrophie Typ 1 vergleichbare, nahezu vollständige Sequestrierung in  $(G_4C_2)_n$  Fozi ist bisher für kein RBP beschrieben (117, 124). Es scheint, dass vor allem die hnRNP-H1 Sequestrierung und die Gegenstrang RNA-Fozi mit der Krankheit korrelieren (121, 123, 124). Die Arbeitsgruppe um Fen-Biao Gao konnte nachweisen, dass exonische  $(G_4C_2)_n$  RNA in

Drosophila- und Zellmodellen stark toxisch wirkt, wohingegen intronische  $(G_4C_2)_n$  RNA keine signifikanten Beeinträchtigungen verursacht (125, 126, 127). Daraus lässt sich schließen, dass der toxische Effekt der  $(G_4C_2)_n$  Expression vor allem auf die daraus resultierende, gesteigerte DPR Protein Expression zurückzuführen ist (125). Auch andere Arbeitsgruppen untermauern diese Hypothese (128). Zudem scheint es, dass Patienten, die mehr RNA-Fozi aufweisen, keine schwerwiegendere klinische Symptomatik präsentieren als Patienten mit einer geringeren RNA-Fozi Last (127, 128, 129). Wie bereits oben erwähnt ist es wichtig festzuhalten, dass die bidirektionalen Transkripte in Dipeptid-repeat (DPR) Proteine translatiert werden. Im Nachfolgenden wird genauer darauf eingegangen.

### 1.2.3 DPR Protein Toxizität

Wie eingangs erwähnt, zählen die beiden Erkrankungen ALS und FTD zum Spektrum der TDP-43 Proteinopathien. Allerdings finden sich in C9orf72 Mutationsträgern neben den TDP-43 positiven Aggregaten auch zahlreiche p62 positive und TDP-43 negative Einschlüsse (130). Charakteristisch für diese Einschlüsse ist, dass sie überwiegend aus DPR Proteinen bestehen. Diese kolokalisieren mit p62, einem Ubiquitin Bindungsprotein, das Substrate für Autophagie erkennt, in stern- und punkt- förmigen Einschlüssen im Zytoplasma und Nukleus von Neuronen und Zellen der Skelettmuskulatur. Selten finden sich auch Kolokalisationen mit phosphoryliertem TDP-43 (12, 131).

Die bidirektionalen Transkripte der  $(G_4C_2)_n$ -Hexanukleotid-Expansion werden durch die sogenannte *repeat-associated non-ATG* (RAN) Translation in repetitive Proteine übersetzt. Diese unkonventionelle Art der Translation ist inzwischen sowohl für Exons als auch in den eigentlich nicht kodierenden Introns beschrieben und erfordert kein AUG-Stratcodon. Sie ist abhängig von der Länge und der Haarnadelschleifen-Struktur der repeat RNA (132, 133). Zum ersten Mal wurde die RAN Translation für die  $(CAG)_n$ -Expansion in der Spinozerebellaren Ataxie Typ 8 und der Myotonen Dystrophie Typ 2 nachgewiesen (133). Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass RAN Translation auch in Morbus Huntington und anderen Trinukleotid-Repeat Erkrankungen auftritt (132, 134). Bei der C9orf72 FTD und ALS wird  $(G_4C_2)_n$  in die DiPeptid-Repeat Proteine poly-GA (Gly-Ala), poly-GP (Gly-Pro) und poly-GR (Gly-Arg) übersetzt. Das *Antisense*-Transkript  $(C_4G_2)_n$  wird in poly-PR (Pro-Arg), poly-PA (Pro-Ala) und weiteres poly-GP translatiert (1, 8, 11, 12). Die verschiedenen DPR Proteine koaggregieren, wobei poly-GA am häufigsten vorzukommen scheint und in fast allen TDP-43 negativen Aggregaten nachweisbar ist. Auch die beiden DPR Proteine poly-GP und poly-GR sind recht häufig. Poly-PR und poly-PA wurden nur in sehr geringen Mengen detektiert (11, 12). Das Expressionsmuster der DPR Proteine variiert in Patienten. DPR Proteine konnten im Frontalkortex, Kleinhirn und Rückenmark nachgewiesen werden. Interessanterweise findet man im Kleinhirn von FTD Patienten mehr DPR Proteine als in ALS Patienten (8, 135).

Im Weiteren werden die toxischen Effekte der DPR Proteine genauer erläutert. Mehrere Arbeitsgruppen haben bereits beschrieben, dass vor allem poly-GR, poly-

PR und poly-GA auf unterschiedliche Art und Weise die Zell-Homöostase beeinträchtigen.

Lin und Mitarbeiter lieferten entscheidende Hinweise, dass poly-PR und poly-GR mit Intermediärfilamenten interagieren und dadurch eine Veränderung der Zellmorphologie induzieren können (136). Weiterhin hat sich gezeigt, dass sie Proteine sequestrieren, die am Spleißvorgang, der Ribosomen-Biogenese, dem nukleozytoplasmatischen Transport und der Atmungskette beteiligt sind. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem hnRNP-A1, hnRNP-A2 (*heterogenous nuclear ribonucleoprotein*), NCL (Nucleolin), NPM1 (Nucleophosmin), TIA1 (*T-cell-restricted intracellular antigen-1*), SF3a (*Splicing Faktor 3a*), SNRBP2 (*U2 small nuclear ribonucleoprotein B*), G3BP1 (*Ras GTPase-activating protein-binding protein 1*) und Atp5a1 (ATP-Synthase F1-Untereinheit Alpha) (13, 76, 137, 138, 139, 140, 141, 142). In Übereinstimmung mit den vorausgegangenen Ergebnissen führte die Beeinträchtigung dieser Prozesse zu einem vermehrten Zelltod (13, 21, 22, 142). Auch wurde beschrieben, dass es durch poly-GR/PR nicht nur zu einer Beeinträchtigung der Ribosomen-Biogenese kommt, sondern auch zu einer direkten Interaktion mit Ribosomen (143). In weiteren Studien wurde beobachtet, dass poly-GR, im Gegensatz zu anderen DPR Proteinen, teilweise mit TDP-43 kolokalisiert und somit an der Induktion der TDP-43 Pathologie beteiligt ist (144, 145). Im Modellsystem ist Poly-PR ein sehr toxisches Protein. Es kommt jedoch nur in sehr geringen Mengen in C9orf72 Mutationsträgern vor. Deshalb ist davon auszugehen, dass poly-GR im Vergleich zu poly-PR den größeren Einfluss auf die Krankheitsentstehung hat.

Neben poly-PR und poly-GR wurde auch poly-GA als ein DPR Protein mit großer Bedeutung für die C9orf72 bedingte FTD und ALS beschrieben. Untersuchungen haben gezeigt, dass poly-GA von Zelle zu Zelle übertragen werden kann und positiv rückgekoppelt die RNA Foci- und DPR Aggregat-Bildung verstärkt (23, 146, 147). Poly-GA hat aufgrund seines hydrophoben Charakters eine hohe Aggregationsneigung und bildet dabei Amyloid-ähnliche Fibrillen. Diese scheinen die Koaggregation anderer DPR Proteinen zu begünstigen, welche sehr viel löslicher sind als poly-GA. Darüber hinaus sequestriert poly-GA Bestandteile des Ubiquitin-Proteasom Systems, des nukleozytoplasmatischen Transportes und des Neuriten-Wachstums. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem Unc119 (*uncoordinated*

119), RanGAP1 (*Ran GTPase-activating protein 1*), Pom121 (*Nuclear pore Membran Protein 121 kDa*) oder auch RAD23 (*radiation 23 homolog A*) (14, 15, 20, 76). Als Folge der Sequestrierung kommt es zu einer Störung der Zelldynamik. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass poly-GA Aggregate eine sehr große Anzahl von Proteasomen binden, die oft in einem sonst nur in vitro nachweisbaren Übergangszustand vorliegen, was darauf hindeutet, dass ihre Funktion beeinträchtigt ist (148). Zudem resultierte die alleinige Expression von poly-GAs in einer moderaten TDP-43 Pathologie in vitro (17, 18). Schludi und Mitarbeitern gelang der Nachweis einer positiven Korrelation zwischen erhöhten Spiegeln an poly-GA Aggregaten im Kleinhirn von FTD vs. ALS Patienten (135).

Zusammenfassend lässt sich für poly-GR, poly-PR und poly-GA ein toxischer Effekt auf zellulärer Ebene nachweisen. Jedoch bedarf es weiterer Untersuchungen, um festzustellen welches der DPR Proteine dabei den größten Einfluss hat. Zahlreiche Studien zur Analyse asymptomatischer und beginnend verhaltensauffälliger C9orf72 Mutationsträgern haben ergeben, dass es eine sehr lange prodromale Phase gibt, in der Veränderungen messbar sind. Charakteristisch hierfür ist das Vorhandensein von DPR Proteinen lange vor Krankheitsbeginn (81, 149, 150, 151, 152).

### 1.3 Gegenüberstellung der C9orf72 Mausmodelle

Um die relative Bedeutung der oben beschriebenen Pathomechanismen genauer zu untersuchen, wurden unterschiedliche, an die jeweilige Fragestellung angepassten, Mausmodelle entwickelt. Zum einen wurden C9orf72 *knock-out* Mäuse generiert, welche die Haploinsuffizienz widerspiegeln sollen. Zum anderen wurden mit transgenen Methoden und Virus-Injektionen unterschiedliche Konstrukte exprimiert, mit dem Ziel die RNA und DPR Toxizität in Mäusen zu untersuchen. Im Folgenden werden die Modelle genauer erläutert.

#### 1.3.1 C9orf72 *knock-out* Mäuse

In C9orf72 *knock-out* (KO) Mausmodellen wurde das 3110043O21RIK-Gen (das murine Äquivalent zum humanen C9orf72 und deshalb im Folgenden als C9orf72 bezeichnet) ausgeschaltet. Erste Untersuchungen konnten darlegen, dass das C9orf72 Protein sowohl im Menschen als auch in der Maus in Neuronen und Gliazellen des zentralen Nervensystems exprimiert wird (153, 154).

Heterozygote *knock-out* Mäuse haben eine um 50% reduzierte C9orf72 Protein Expression. Interessanterweise zeigen diese Mäuse weder motorische oder kognitive Defizite noch pathologische Merkmale, wie Sie für C9orf72 Mutationsträger typisch sind. Zu den phänotypischen Auffälligkeiten gehören in erster Linie eine Gewichtsreduktion, eine gestörte Phagozytose in Mikroglia und Makrophagen, sowie eine Reifungsstörung der myeloischen Zellen (6, 155, 156).

Homozygote *knock-out* Mäuse, die gar kein C9orf72 Protein bilden, entwickelten je nach Haltungsbedingungen eine rasch progrediente Lupus-artige Autoimmunerkrankung oder keine Symptome, was für eine Rolle des Mikrobioms spricht. Erkrankte Tiere wiesen diverse Symptome wie beispielsweise Splenomegalie, Lymphknotenschwellungen, Neutrophilie oder Thrombozytopenie auf. Teilweise kam es zu einer generalisierten Entzündungsreaktion mit multipler Organinfiltration, einschließlich des zentralen Nervensystems, durch Makrophagen und Lymphozyten. Zudem wurden multiple Autoantikörper detektiert. Die Mortalität war bei diesen Tieren signifikant erhöht (5, 6, 155, 157, 158). Die Arbeitsgruppe um Baloh hat in einem *knock-out* Mausmodell die Mikroglia-Aktivität genauer analysiert. Dabei wurde beobachtet, dass es durch eine verstärkte Interferon Typ 1 Antwort zu

einer pro-inflammatorischen Reaktion kommt. Zudem wurde bedingt durch eine Störung lysosomaler Prozesse eine Zunahme der Abbauprodukte beobachtet. In Anbetracht der Tatsache, dass Mikroglia für die Regulation der Synapseneliminierung relevant sind, scheint es durch die gestörte Mikroglia-Aktivität zu einem Verlust der Synapsen und somit zu einer neuronalen Dysfunktion zu kommen (110).

Es ist wichtig anzumerken, dass sowohl heterozygote als auch homozygote *knock-out* Mäuse keine neurodegenerativen Veränderungen aufweisen, wie sie für ALS und FTD typisch sind. Allerdings stützen diese Ergebnisse die Vermutung, dass Haploinsuffizienz von C9orf72 durch die dadurch gestörte Autophagie und gesteigerte Mikroglia-Aktivierung die anderen postulierten Pathomechanismen verstärkt (88, 95, 97, 98).

### 1.3.2 Transgene und virale C9orf72 Mausmodelle (*knock-in* Mausmodelle)

Im Folgenden werden Mausmodelle beschrieben, welche die durch RNA und DPR Protein verursachte Toxizität widerspiegeln sollen. In einigen Modellen exprimieren die Mäuse ein von Patienten abgeleitetes *bacterial artificial chromosome* (BAC) Konstrukt, welches Teile des humanen C9orf72-Gens mit der (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Hexanukleotid-Expansion beinhaltet (5, 159, 160, 161). Andere Modelle nutzen Adeno-assoziierte Viren (AAV) oder pCMV-Script Vektoren, mit deren Hilfe die Zielsequenz via Mikroinjektion in Oozyten bzw. Zygoten eingebracht wird (20, 142, 162, 163, 164, 165, 166, 167). In weiteren Systemen werden der Thy1.2 Vektor mit überwiegend spinaler Expression oder das Cre-LoxP System mit konditionaler Expression genutzt (19, 168, 169).

Neben klassischen transgenen Mausmodellen mit Keimbahn-Transmission, war es durch AAV-Injektion unter Verwendung Neuronen-spezifischer Konstrukte möglich, verschiedene (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>n</sub> oder DPR Konstrukte direkt im ZNS zu exprimieren.

Der große Vorteil der Mausmodelle mit Insertion eines (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>n</sub> Konstruktes ist die simultane Expression von RNA Foci und DPR Protein Pathologie, mit dem Ziel das klinische Bild bestmöglich widerspiegeln zu können. Ein Nachteil ist allerdings die fehlende Einsicht welcher Mechanismus den größeren Anteil zur Entwicklung der Erkrankung beiträgt. Außerdem zeigen die meisten BAC-transgenen Modelle nur minimale Phänotypen. Demgegenüber stehen Modelle mit Expression einzelner, spezifischer DPR Proteine. Diese Tiermodelle ermöglichen eine genaue Analyse der Bedeutung einzelner DPR Proteine für die Krankheitsentstehung. Andererseits ist es dadurch wiederum nur begrenzt möglich den Gesamtprozess wiederzugeben.

Die folgende Tabelle stellt eine Auflistung der verschiedenen publizierten Mausmodelle und ihrer wichtigsten Erkenntnisse dar:

## Einleitung

	Expression -System	Expansion	RNA Fozi	Nachweis DPR Proteine	Protein Mislokali- sation	Gliazell- Aktivierung	Neuronen- Untergang	Phenotyp	TDP-43 Pathologie
O'Rourke et al. 2015	BAC	(G <sub>4</sub> C <sub>2</sub> ) <sub>100-1000</sub>	<i>Sense</i> <i>Antisense</i>	GP	NCL	-	-	-	-
Peters et al. 2015	BAC	(G <sub>4</sub> C <sub>2</sub> ) <sub>300-500</sub>	<i>Sense</i> <i>Antisense</i>	GP		-	-	-	-
Liu et al. 2016	BAC	(G <sub>4</sub> C <sub>2</sub> ) <sub>500</sub>	<i>Sense</i> <i>Antisense</i>	GA, GP	p62/Sqstm1	Astrozyten, Microglia	ja	Motorische Defizite	ja
Jiang et al. 2016	BAC	(G <sub>4</sub> C <sub>2</sub> ) <sub>110-450</sub>	<i>Sense</i> <i>Antisense</i>	GA, GP, GR	p62/Sqstm1	-	ja	Verhaltens, kognitive Defizite	-
Chew et al. 2015	AAV	(G <sub>4</sub> C <sub>2</sub> ) <sub>66</sub>	<i>Sense</i>	GA, GP, GR	p62/Sqstm1	Astrozyten	ja	Verhaltens, motorische Defizite	ja
Chew et al. 2019	AAV	(G <sub>4</sub> C <sub>2</sub> ) <sub>149</sub>	<i>Sense</i> <i>Antisense</i>	GA, GP, GR, PA, PR	G3BP1, Ataxin-2, eIF3η, TIA-1, RanGAP1,	Astrozyten	ja	Motorische kognitive, Defizite	ja
Herranz-Martin et al. 2017	AAV	(G <sub>4</sub> C <sub>2</sub> ) <sub>102</sub>	<i>Sense</i>	GA	p62/Sqstm1	-	ja	Verhaltens, kognitive, motorische Defizite	-
Zhang et al. 2016	AAV	(GA) <sub>50</sub>	-	GA	p62/Sqstm1 RanGAP1, Pom121, Rad23	Astrozyten	ja	Verhaltens, kognitive, motorische Defizite	-
Zhang et al. 2018	AAV	GFP- (GR) <sub>100</sub>	-	GR	eIF3η, TIA-1, RPS6, RPL21, RPS25	Microglia, Astrozyten	ja	Motorische, kognitive Defizite	-
Zhang et al. 2019	AAV	GFP-(PR) <sub>50</sub>	-	PR	NPM1, H3K9me3, H3K27me3, H3K4me3, RanGAP1	Microglia, Astrozyten	ja	Motorische, kognitive Defizite	-
Choi et al. 2019	pCMV	(GR) <sub>80</sub>	-	GR	-	Microglia, Astrozyten	ja	Verhaltens Defizite	-

## Einleitung

Riemsлагh et al 2021	pCMV	(G <sub>4</sub> C <sub>2</sub> ) <sub>36</sub>	-	GA, GP, GR	-	-	-	Motorische Defizite	-
Schludi et al. 2017	Thy1.2	(GA) <sub>149</sub> -CFP	-	GA	p62/Sqstm1 Rad23b, Mlf2	Microglia	-	Motorische Defizite	ja
Hao et al. 2019	Thy1-Cre	GFP-(PR) <sub>28</sub>	-	PR	-	Microglia, Astrozyten	ja	Motorische Defizite	-
LaClair et al 2020	Nestin-Cre/loxp	GFP-(GA) <sub>175</sub>	-	GA	p62/Sqstm1 Psmc4	Microglia, Astrozyten	ja	Motorische Defizite	ja
LaClair et al 2020	Nestin-Cre/loxp	GFP-(PR) <sub>175</sub>	-	PR	Heterochromatin	Astrozyten	-	Krampf-anfälle, Ataxie	-

**Tabelle 1: Knock-in Mausmodelle (Quelle: modifiziert nach (76))**

Überblick über die verschiedenen Mausmodelle mit RNA + DPR Toxizität und reiner DPR Toxizität. Aufgeführt sind Expressions-Systeme, Expansion, RNA foci, DPR Proteine, Protein Mislokalisierung, Gliazell-Aktivierung, Neuronen-Untergang, Phenotyp und TDP-43 Pathologie.

In den Mäusen mit (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Expansion wurden vor allem die DPR Proteine poly-GA, poly-GP und zum Teil auch poly-GR detektiert. Das Expressionsmuster variiert dabei zwischen den Linien. Während in manchen Modellen vor allem Neocortex und Hippocampus betroffen waren (5, 20, 159, 162), kam es in den anderen Modellen vor allem zu einer Akkumulation im Cerebellum (160, 161, 163), Stammhirn und Rückenmark (19). Diese Beobachtungen stimmen mit histopathologischen Untersuchungen aus *C9orf72* Mutationsträgern überein. Demnach ist davon auszugehen, dass poly-GA, poly-GP und poly-GR die häufigsten DPR-Proteine sind. Ähnlich wie es in Patientengewebe verzeichnet wurde, ko-aggregieren die DPR Proteine auch in den Tierversuchen mit verschiedenen zellulären Proteinen. So konnte in vielen Modellen nachgewiesen werden, dass DPR Proteine und dabei vor allem das poly-GA mit p62/SQSTM1 aggregiert und dadurch das Ubiquitin-Proteasom System beeinträchtigt (5, 19, 20, 159, 162, 163, 169). Neben dieser Sequestrierung kommt es in manchen Modellen zur Mislokalisierung von Proteinen, die an der Ribosomen Biogenese, dem Kernporen Komplex und dem DNA-Reparatursystem beteiligt sind (20, 160, 162, 164, 165). Diese Beobachtungen untermauern die Hypothese, dass DPR Proteine durch Sequestrierung von Proteinen zellulärer Prozesse gravierend beeinträchtigen und somit zum Zelluntergang führen.

Darüber hinaus wurde in den meisten Fällen eine vermehrte Mikroglia und Astrozyten Aktivierung festgestellt, welche ebenfalls mit einem gesteigertem Neuronenuntergang assoziiert war (20, 142, 159, 162, 163, 164, 165, 166, 169, 170). Diese Vorgänge führten in manchen Mauslinien zum Verlust von Neuronen im ZNS (5, 20, 159, 162) oder zum Axonverlust an den motorischen Endplatten des PNS (159, 163). Abhängig vom Degenerationsmuster manifestierte sich auch das klinische Bild in Form von Verhaltensauffälligkeiten, kognitiven oder motorischen Defiziten (5, 19, 20, 142, 159, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 169, 170). Die Erkenntnisse dieser Versuche verdeutlichen die Zusammenhänge von ALS und FTD in Patienten mit C9orf72 Mutation. So kann es neben der für FTD typischen Degeneration des ZNS gleichzeitig zu einem Verlust motorischer Neurone des PNS kommen, wie es für ALS typisch ist. Interessanterweise konnte die TDP-43 Pathologie nur in einem Teil der Mausmodelle (und meist eingeschränkt) nachgewiesen werden, obwohl sie ein wesentliches Kennzeichen von ALS und FTD Patienten ist (5, 19, 159, 162, 164, 169). Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass die durch RNA Foci und DPR Proteine verursachte Toxizität der TDP-43 Pathologie vorausgehen und diese durch eine intrinsische Reaktionskaskade induziert (83).

Die gewonnenen Ergebnisse aus den Mausmodellen mit reiner DPR Protein Expression lassen darauf schließen, dass die DPR Protein Toxizität auch ohne RNA Foci Bildung zu pathologischen Veränderungen führt. Dies suggeriert, dass für die Krankheitsentstehung die DPR Toxizität einen größeren Einfluss hat als die RNA Foci Toxizität.

### 1.4 Therapeutische Ansätze

Die derzeitigen Behandlungsmöglichkeiten der ALS und FTD beruhen vor allem auf einer symptomatischen Therapie mit dem Ziel der Symptomlinderung. Lediglich das Medikament Riluzol führt bei ALS Patienten zu einer Verlängerung der Überlebenszeit. Die Forschung der letzten Jahre hat zu einem besseren Verständnis der Krankheitsentstehung geführt, auf dessen Grundlage verschiedene therapeutische Ansätze und potentiell wirksame Substanzen entwickelt wurden. Dabei stellt insbesondere die Reduktion der Repeat RNA- und der DPR Protein-Spiegel einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar. Die Behandlung der C9orf72 Haploinsuffizienz hat sich im Vergleich dazu als deutlich schwieriger herauskristallisiert. Im folgenden Abschnitt werden einige der sich in Erprobung befindenden Behandlungsmöglichkeiten genauer beschrieben, die sich gegenwärtig noch in der Erprobung befinden.

#### 1.4.1 Antisense Oligonukleotid Therapie

Synthetische *Antisense* Oligonukleotide (ASO) können sehr spezifisch ganz bestimmte mRNA Sequenzen binden und dadurch beeinflussen. Je nach chemischer Struktur des Rückgrats können ASOs durch Aktivierung des Enzyms Endonuklease RNase H zum Abbau der mRNA führen oder aber durch feste Bindung an die pre-mRNA die reguläre Interaktion mit RNA-bindenden-Proteinen verhindern und dadurch Spleißvorgänge beeinflussen, ohne dass die mRNA abgebaut wird (171). Die Zulassung eines solchen *Antisense* Oligonukleotids zur Behandlung der spinalen Muskelatrophie (SMA) war ein Meilenstein der neurologischen Forschung (172). Das dabei genutzte *Antisense* Oligonukleotid Nusinersen beeinflusst den Spleißvorgang des SMN2 (*survival motor neuron protein 2*) durch die Bindung der SMN2 prä-mRNA und steigert so die Expression des funktionellen SMN Proteins mit Exon 7 (173). Die Verwendung von ASOs zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen wird auch in anderen Fällen untersucht. So läuft mittlerweile nach erfolgreicher Phase 3 Studie (NCT02623699) nun eine Langzeitstudie (NCT03070119) zur Behandlung der durch eine SOD1 Mutation bedingten familiären ALS. Dabei wird das ASO Tofersen (BIIB067) verwendet. Die Phase 1 und 2 Studien wurden schon erfolgreich abgeschlossen (174, 175) und legen eine Verlangsamung des Krankheitsverlaufs nahe. Auf Grundlage der positiven Ergebnisse, läuft nun eine Phase 3 Studie in

präsymptomatischen Mutationsträgern (176). Einen weiteren ASO basierten Ansatz zur Behandlung der ALS stellt das ASO BIIB105 dar, welches gegen Ataxin-2 gerichtet ist. Die Wirksamkeit wird momentan in einer Phase 1/2 Studie evaluiert (NCT04494256). Auch in der Behandlung des Morbus Huntington wird die ASO Gentherapie untersucht. Leider wurde die Phase 3 Studie (NCT03761849) mit dem Antisense Oligonukleotid HTT<sub>Rx</sub> wegen fehlender Wirksamkeit vorzeitig abgebrochen. HTT<sub>Rx</sub> bindet die mRNA des mutierten Huntingtin-Gens und reduziert so seine Expression (177).

Auch für die Behandlung der C9orf72 Mutation laufen bereits ASO basierte Studien. Die Behandlung von Fibroblasten und aus IPS-Zellen abgeleitete Neuronen von C9orf72 Patienten mit *Antisense* Oligonukleotiden lieferten vielversprechende Ergebnisse. So konnten unter anderem die RNA Foci Bildung minimiert werden und das Überleben der Zellen gesteigert werden (112, 117, 120). In drei C9orf72 BAC transgenen Mausmodellen konnte mit Hilfe einer intraventrikulären Injektion von ASOs die Expression der RNA und DPR Proteine reduziert und die Verhaltensauffälligkeiten gebessert werden (5, 80, 178). Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse wurden klinische Studien der Phase 1 Studien zur Behandlung der C9orf72 bedingten ALS gestartet. Biogen untersuchte dabei das ASO BIIB078, welches gegen das *Sense*-Transkript der (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>n</sub> Hexanukleotid-Expansion gerichtet ist (NCT03626012). Leider wurde kein klinischer Nutzen beobachtet und die Neurofilament-Spiegel als Marker für Neurodegeneration stiegen sogar an, sodass die Studie abgebrochen wurde. Wave Life Sciences Ltd. nutzte ebenfalls ein ASO, das die Expression von C9orf72 Transkripten mit dem (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>n</sub> Intron senkt (WVE-004). Ein Problem ist dabei die fehlende Allel-Spezifität der ASO, sodass auch die Expression anderer Transkripte reduziert wird. Aktuelle Ergebnisse zu dieser Studie stehen jedoch noch aus (NCT04931862). Eine Herausforderung stellt dabei die Bestimmung einer effektiven Dosis dar. Für eine erfolgreiche Behandlung von C9orf72 Patienten muss das gesamte ZNS infiltriert werden, wohingegen bei anderen Erkrankungen, wie beispielsweise für SMA, eine Verteilung im Rückenmark ausreichend sein könnte.

### 1.4.2 RNA Interferenz

Die Antisense Oligonukleotid Therapie ist deshalb so interessant, weil sie sich gezielt gegen einzelne, sehr spezifisch definierte mRNAs richtet. RNA Interferenz ist ähnlich spezifisch. Dabei wird ein physiologischer Gen-Regulationsmechanismus verwendet. Kleine, doppelsträngige RNA Moleküle binden spezifisch an der Ziel-mRNA und sorgen durch die Aktivierung des *RNA-inducing silencing* Komplexes (RISC) für den katalytischen Abbau der mRNA (179, 180, 181). Zu diesen kleinen RNA Molekülen gehören die physiologische miRNA (*microRNA*) und synthetische siRNA (*short interfering RNA*) und shRNA (*small hairpin RNA*). Die Verwendung der RNA Interferenz als Therapieansatz wird unter anderem in der Krebsforschung, der Behandlung von viralen Infekten, kardiovaskulären Erkrankungen oder auch Diabetes mellitus untersucht (182). Mit Patisiran existiert bereits ein erprobter Vertreter dieser Wirkstoffklasse. Dabei handelt es sich um ein siRNA-Konzentrat, welches zur Behandlung der hereditären Transthyretin-Amyloidosen (ATTR) zugelassen ist (183).

Daneben wird die Effektivität der RNA Interferenz auch als Behandlungsansatz der C9orf72 bedingten FTD und ALS überprüft. Ein Problem stellt hierbei die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke dar. Die Nutzung des Adeno assoziierten Virus (AAV) als Applikationsform könnte hier eine effiziente Lösung bieten, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und eine homogene Distribution im Nervensystem zu erreichen (184). Untersuchungen an Fibroblasten von C9orf72 Mutationsträgern zeigten, dass durch siRNA die Expressionslevel der C9orf72-mRNA und zum Teil auch die RNA Foci-Bildung verringert werden konnten (112, 185, 186). In den darauffolgenden Jahren wurden weitere Erfolge erzielt. So konnte mit Hilfe einer miRNA-basierten Therapie gegen das C9orf72 Gen eine Reduktion der RNA Foci Bildung in einem aus iPS Zellen abgeleiteten Motoneuronenmodell und einem ALS Mausmodell erreicht werden (187, 188). Hierbei gelang es mit Hilfe des AAV Serotyp 5 eine homogene Distribution zu erzielen. Die Untersuchung der RNA Interferenz als therapeutischer Ansatz stellt ein neuartiges Verfahren dar, so dass es vor der klinischen Anwendung noch weiterer Untersuchungen bedarf, um eine ausreichende Effektivität und Sicherheit für Patienten gewährleisten zu können.

### 1.4.3 CRISPR

*Genom-Editing* liefert einen weiteren möglichen Angriffspunkt in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen. Im weiteren Verlauf wird hier vor allem auf die CRISPR/Cas Technologie eingegangen. Das Acronym stammt aus dem Englischen und steht für „*clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein*“. Mit Hilfe dieser Methode kann das Genom präzise geschnitten werden, um gezielt Gene zu reparieren oder auszuschalten. Als Grundlage dient die Entdeckung und Erforschung des CRISPR/Cas Systems im Immunsystem verschiedener Bakterien und Archaeen (189, 190). Die CRISPR/Cas Technologie wird momentan unter anderem zur Behandlung der Duchenne Muskeldystrophie (191), des Morbus Huntington (192) oder des Morbus Alzheimer (193) erforscht. Ihr therapeutischer Nutzen für die C9orf72 bedingte ALS und FTD wird ebenfalls untersucht. So konnte in iPS-Zellmodellen, kortikalen Neuronen und Mausmodellen mit Hilfe des CRISPR/Cas Systems eine Korrektur der C9orf72 Mutation erzielt werden (194, 195). In einem weiteren Zelllinienmodell wurde die deaktivierte Cas9 genutzt, um an der  $(G_4C_2)_n$ -Expansion direkt zu binden. Dadurch konnte die Transkription der RNA und die Translation der DPR Proteine drastisch reduziert werden (196). Es wurde auch die Entwicklung eines RNA spezifischen CRISPR/Cas9 Systems untersucht. Dabei konnte in Zelllinienmodellen eine Reduktion der RNA-Level und der DPR Protein-Konzentration erzielt werden (197). Die aufgeführten Untersuchungen zeigen, dass das CRISPR/Cas System ein breites Spektrum unterschiedlicher Ansatzmöglichkeiten bietet. Es bleiben jedoch noch einige Hürden zu überwinden, ehe diese Methode in den klinischen Alltag Einzug finden kann. Einerseits ist es essenziell, ein passendes Transportsystem ausfindig zu machen mit dem eine effiziente Aufnahme des Wirkstoffes generiert werden kann. Darüber hinaus ist es nötig auf eine zielgerichtete Distribution zu achten, damit nicht alle Zellen infiziert werden, da die zufällige Veränderung anderer Genomabschnitte ernste Nebenwirkungen, wie maligne Entartung durch Aktivierung von Proto-Onkogenen, verursachen können (198).

### 1.4.4 Niedermolekulare Verbindungen

Neben den oben beschriebenen Ansätzen, welche auf Basis genetischer Modifikationen der DNA oder RNA funktionieren, besteht auch die Möglichkeit auf niedermolekulare Verbindungen zurückzugreifen, die die Blut-Hirn-Schranke gut überwinden können. Ein Beispiel für einen solchen Stoff wäre das TMPyP4 (5,10,15,20-tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphyrin). Es interagiert mit der G-Quadruplex Formation der RNA und unterbindet dadurch die pathologische Bindung von ribosomalen Bindungsproteinen wie beispielsweise hnRNPA1 (199). Zudem konnte in einem Drosophila-Modell mittels TMPyP4 der nukleozytoplasmatische Transport und der pathologische Phänotyp der Fliegen verbessert werden. In demselben Modell wurden die Ergebnisse auch mit Hilfe eines Exportin 1 Inhibitors (KPT-276) reproduziert (200). Weitere *in-vitro* Ansätze nutzten andere, synthetisch hergestellte niedermolekulare Verbindungen, die mit der G-Quadruplex Formation interagieren. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten, dass die Menge der RNA Fozi und DPR Proteine reduziert wird (201, 202, 203). Der oben genannte Exportin 1 Inhibitor KPT-276 gehört zur Stoffklasse der selektiven Inhibitoren des nukleären Exports (SINE). In einer weiteren Untersuchung wurde ein anderer Exportin 1 Inhibitor, das KPT-350/BIIB100, getestet. Dabei konnte das Überleben neuronaler Zellen gesteigert werden und die motorischen Funktionen in einem ALS-Rattenmodell verbessert werden (204). Eine klinische Phase 1 Studie, in welcher der therapeutische Nutzen von BIIB100 zur Behandlung der ALS untersucht werden sollte (NCT03945279), lieferte allerdings keinen signifikanten Nutzen. Neben synthetisch hergestellten niedermolekularen Verbindungen werden auch endogene Substanzen untersucht. Tseng und Kollegen haben beobachtet, dass die RNA Helikase DHX36-G4R1 die  $(G_4C_2)_n$  Translation mitbeeinflusst. So führt eine Abnahme des DHX36-G4R1 zu einer verminderten RAN Translation und vice versa. Trotz vieler positiver Ergebnisse dieser Art von Therapieansätzen ist anzumerken, dass das Hauptproblem der meisten niedermolekularen Verbindungen in ihrer zum Teil erheblichen Toxizität besteht, weil oft auch die globale Translation teilweise gehemmt wird. Vielversprechende Ergebnisse in diesem Zusammenhang liefert eine neue Substanzklasse der niedermolekularen Verbindungen, sogenannte *RIBOTACs*. Dabei handelt es sich um ein synthetisches, dimeres Molekül, das aus einem Liganden zur RNA-Bindung und einem weiteren Liganden zur Bindung und Aktivierung der Ribonuklease RNase L besteht (205). Dadurch rekrutieren

RIBOTACs die aktivierte RNase L zur Ziel-RNA und sorgen so für deren Abbau. Mit Hilfe von RIBOTAC konnte in Zell- und Mausmodellen bereits eine selektive Reduktion der  $(G_4C_2)_n$ -Expansion erzielt werden (206).

Czuppa und Kollegen untersuchten zudem inwieweit bereits zugelassene Medikamente die  $(G_4C_2)_n$  Expression inhibieren. Dabei gelang es der Arbeitsgruppe unter 1430 Wirkstoffen drei Substanzen aus der Gruppe der Nukleosidanaloga als Inhibitoren der poly-GA/GP Expression zu identifizieren. Neben Entecavir und Nelarabin zeigte sich vor allem Decitabin in post-mitotischen Neuronen aus C9orf72 Patienten hoch potent (207). Leider sind Nelarabin und Decitabin für sich teilende Zellen hoch-toxisch.

### 1.4.5 Aktive und passive Impfung

Hochaffine Antikörper gegen DPR Protein-Aggregate könnten mittels aktiver oder passiver Impfung einen möglichen therapeutischen Ansatz bieten. Erste Hinweise, dass Immuntherapie bei neurodegenerativen Erkrankungen positive Ergebnisse liefert, wurden bei der Behandlung des Morbus Alzheimer beschrieben (208). Morbus Alzheimer ist die häufigste und am besten untersuchte Demenz-Erkrankung (209). Charakteristisch hierfür sind ein progressiver Gedächtnisschwund und kognitive Defizite. Neuropathologisch kommt es dabei zur Ausbildung intrazellulärer neurofibrillärer Bündel aus Tau, der extrazellulären Ablagerung von Amyloid- $\beta$  Plaques und dem Verlust von Neuronen (210). Genauere Analysen legen nahe, dass das Amyloid- $\beta$  Peptid und das Tau-Protein eine entscheidende Rolle in der Entstehung der Alzheimer-Demenz spielen (211, 212, 213, 214, 215). So kommt es während der prodromalen Phase ca. 15-20 Jahre vor dem Auftreten klinischer Symptome zur Ablagerung von Amyloid- $\beta$  Plaques, welche dann im weiteren Verlauf zur Entstehung der Tauopathie beitragen. Mit einer aktiven Impfung in der prodromalen Phase gegen das Amyloid- $\beta$  konnte in Mausmodellen die Ausbildung von Amyloid- $\beta$  Plaques im ZNS stark reduziert werden und ein positiver Effekt auf die kognitiven Defizite beobachtet werden (208, 216, 217, 218, 219, 220). Jedoch scheiterte eine klinische Phase 2a Studie, da ca. 6% der geimpften Patienten eine Meningoenzephalitis entwickelten (221). Weitere Untersuchungen dieser Fälle legten nahe, dass die Meningoenzephalitis auf eine durch die Impfung induzierte T-Zell Infiltration zurückzuführen sein könnte (222, 223, 224). Neben der aktiven Impfung, ist auch die passive Impfung Gegenstand intensiver Forschung. Dass die Antikörpertherapie einen effektiven Ansatz in der Behandlung des Morbus Alzheimer darstellt, zeigt beispielsweise Aducanumab, welches 2021 von der FDA zur Behandlung des Morbus Alzheimer zugelassen wurde. Es handelt sich dabei um einen monoklonalen Antikörper, der gegen Amyloid- $\beta$  gerichtet ist. Dabei kommt es zu einer ausgeprägten Reduktion des Peptids und zugleich zu einer leichten Verbesserung der klinischen Symptomatik (225). Sowohl bei der aktiven als auch der passiven Impfung kommt es zu einem Antikörper-vermittelten Abbau des extrazellulären Amyloid- $\beta$  durch Bindung des Antikörper-Antigen-Komplexes an den Fc-Rezeptor von Makrophagen (226, 227). Daneben wurden auch aktive Impfungen gegen das Tau-Protein getestet. Auch hier konnte man der Tau-Pathologie entgegenwirken und kognitive Defizite in Ratten verringern (228, 229, 230, 231, 232).

Klinische Studien der Phase 1 und 2 konnten zeigen, dass eine sichere und effektive Tau-Impfung in Patienten erzielt werden kann (233, 234, 235, 236). Der Antikörpervermittelte Abbau intrazellulärer Tau-Bündel unterliegt einem etwas anderen Mechanismus. Nach Internalisierung des Antikörpers und Bindung des Antigens wird der Komplex durch Bindung an den intrazellulären Fc-Rezeptor TRIM21 ubiquitiniert und so dem proteasomalen Abbau zugeführt (237, 238).

Die bisherigen Ergebnisse sprechen dafür, dass die Immuntherapie am effektivsten in der prodromalen Phase und somit vor dem Auftreten klinischer Symptome wirken würde (239), sodass die Sicherheit absolute Priorität hat.

### 1.5 Steigerung der AK-Konzentration im ZNS mittels AAV vs Transferrin-Shuttle System

Für eine wirksame Immuntherapie ist die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (BBB) der limitierende Faktor. Bei der aktiven Impfung ermöglichen hohe Antikörperkonzentrationen eine gute Penetration der BBB. Werden Antikörper direkt injiziert, können unterschiedliche Verfahren zu einer gesteigerten Distribution im ZNS beitragen. Zwei Biotechnologische Verfahren erlauben zumindest experimentell die Überwindung der Bluthirnschranke: (i) rekombinante Expression des Antikörpers mittels Adeno-assoziierten-Virus (AAV) im Gehirn und (ii) das Transferrin-Rezeptor Shuttlesystem mit dessen Hilfe modifizierte Antikörper aus dem Blut in das ZNS transportiert werden.

Die Entwicklung von optimierten AAV-Vektoren ist schon lange Gegenstand gentherapeutischer Studien. Der Virus besteht aus einem Kapsid, welches eine Einzelstrang DNA umhüllt. Er gehört zur Familie der Parvoviren und ist für seine Replikation auf die co-Infektion mit anderen Adenoviren angewiesen. Sein Genom besteht aus zwei Genen: Rep (Replikation) und Cap (Kapsid). Dieses wird von zwei ITRs (*inverted terminal repeats*) flankiert. Für die Gentherapie wird der sogenannte rekombinante AAV (rAAV) verwendet. Dabei werden die viralen Gene durch die gewünschte Zielsequenz ersetzt und von zwei viralen ITRs flankiert. Vorzugsweise werden die AAV2-ITRs verwendet, da sie für die genomische Integration sehr sicher sind. Aufgrund von Unterschieden in der Gewebe-Affinität werden für die Verpackung, je nach Zielgewebe, Kapside anderer AAV-Subtypen mit den AAV2-ITRs kombiniert („Pseudotypisierung“) (240, 241). Das wird korrekt als „AAV2/x“ beschrieben, wobei praktischer der Genom-Subtyp (hier 2) oft weggelassen wird. Die DNA gelangt mittels Transduktion des AAV in die Zelle und kann dann exprimiert werden (240, 242). AAV-Vektoren bieten viele Vorteile im Vergleich zu anderen viralen Vektoren (243), indem sie: 1) lange Zeit überdauern können (244); 2) geringe pathologische bzw. zytotoxische Eigenschaften aufweisen (245); 3) nur eine milde Immunogenität triggern (246); 4) in hohen Konzentrationen hergestellt werden können (247).

Im Bereich der Gentherapie wird die Nutzung des AAV zur Behandlung verschiedener Erkrankungen untersucht. Dabei geht es meist um monogene, vererbte Erkrankungen, mit dem Ziel das defekte Gen zu ersetzen. So wird

beispielsweise Voretigen Nepavovec, ein AAV2-Vektor mit der cDNA des humanen retinalen pigmentepithelspezifischen 65 kDa-Proteins (hRPE65) zur Behandlung der frühkindlichen Erblindung durch die RPE65-Mutation eingesetzt (248, 249). Onasemnogen-Abeparvovec (AAV9-Vektor basiert) ist ein weiteres zugelassenes Medikament zur Expression des humanen *survival-of-Motorneuron*-Proteins (SMN) bei spinaler Muskelatrophie mit SMN1-Genmutation (250). Auch die Behandlung der Hämophilie B mittels AAV-Injektion wird untersucht (251). Für Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Mukopolysaccharidose (MPS) oder auch die Duchenne Muskeldystrophie sind interessante präklinische Gentherapie-Ansätze beschrieben (240, 251, 252, 253, 254). Neben den hier erwähnten genetischen Behandlungsansätzen werden auch immuntherapeutische Verfahren mit Antikörper-exprimierenden AAV-Vektoren untersucht. So konnte in einem Mausmodell die RSV-Viruslast durch Applikation eines Palivizumab exprimierenden AAV-Vektors deutlich gesenkt werden (255). In einem weiteren Tierversuch wurde die Wirksamkeit einer anti-Phospho-Tau (pTau) Gentherapie bei chronisch traumatischer Enzephalopathie (CTE) untersucht, eine Erkrankung, die durch repetitive Schädel-Hirn-Traumata ausgelöst wird. Mittels intrazerebraler Injektion des AAV-Vektors wurde in einem Mausmodell eine suffiziente anti-pTau Expression generiert und dadurch eine Reduktion des pTau-Levels erreicht (256). In den letzten Jahren fand die Untersuchung der AAV vermittelten anti-HIV Gentherapie besonderer Beachtung. Durch die konstitutive Expression bereits etablierter und hoch potenter anti-HIV Antikörper mittels AAV-Vektor eröffnet sich die vielversprechende Möglichkeit einer zugleich präventiven sowie therapeutischen HIV-Behandlung. In klinischen Studien wird bereits die Wirksamkeit dieser Therapie evaluiert (257, 258, 259).

Neben dem AAV-System kann auch das Transferrin-Shuttle-System zur Überwindung der BBB genutzt werden. Das Transferrin-Shuttle-System funktioniert nach dem Prinzip der Rezeptor vermittelten Transzytose (RMT). Nach initialer Rezeptorbindung kommt es zur Transzytose des Rezeptor-Ligand-Komplexes mit anschließendem Transport durch das Endothel als Hauptbestandteil der BBB (241, 260). In den letzten Jahren fand die Untersuchung des Insulin- und Transferrin-Rezeptors besonderer Beachtung. Für beide Rezeptoren wurde das Prinzip der RMT beschrieben (241, 260). Da Insulin und Transferrin für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase des ZNS unabdingbar sind, werden ihre Rezeptoren ubiquitär im Endothel der BBB exprimiert (260). Es eröffnet sich somit die Interessante

Möglichkeit durch Bindung an den Rezeptor eine effizientere BBB-Penetration des Zielantikörpers zu erreichen. Eine Besetzung der Antigen-Bindungsstelle könnte jedoch zu einer Störung des Insulin- und Transferrin-Transports führen. Um diesem Problem entgegenzuwirken, wurden modifizierte Antikörper, wie beispielsweise bispezifische Antikörper (Quadroma), entwickelt. Dabei handelt es sich um ein Immunkonjugat bestehend aus 2 verschiedenen monoklonalen Antikörpern, dessen beide Arme gegen 2 unterschiedliche Antigene gerichtet sind (261, 262). Quadroma sind somit in der Lage unabhängig von der Antigen-Bindungsstelle mit dem Insulin- oder Transferrin-Rezeptor zu interagieren, ohne dabei die Funktionalität des Rezeptors gegen das Zielantigen zu beeinträchtigen. Eine weitere Möglichkeit bieten modifizierte Antikörper mit einem kurzen Peptid im Fc-Fragment, das unabhängig von der Antigen-Bindungsstelle an den Rezeptor bindet und dadurch eine Aufnahme des Antikörpers zusammen mit der Zielstruktur in die Zelle bewirkt (263). Das Verfahren wird bereits in einer klinischen Studie evaluiert (NCT05450549).

Vorausgegangene Untersuchungen haben ergeben, dass durch modifizierte Antikörper im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern eine bessere Reduktion der Amyloid- $\beta$  Last in Alzheimer-Mausmodellen erzielt werden kann (264, 265). Ferner konzentrierten sich neuere Untersuchungen darauf, die Wirksamkeit durch Optimierung der Quadroma zu verbessern (266, 267, 268, 269). Durch diverse Modifizierungen wie beispielsweise die Änderung der Antikörperspezies, Epitopauswahl oder Größe war es möglich die Halbwertszeit zu verlängern und die BBB-Permeabilität zu steigern (266, 267, 268, 269). Die vielversprechenden Resultate aus in-vitro Modellen und Tierversuchen müssen im nächsten Schritt in klinischen Studien evaluiert werden. Dass der Ansatz erfolgreich ist, zeigt Valanafusp Alpha und Pabinafusp Alpha. Es handelt sich dabei jeweils um ein anti-Insulin-Rezeptor Antikörper (Valanafusp Alpha) bzw. anti-Transferrin-Rezeptor Antikörper (Pabinafusp Alpha), der mit dem Enzym Alpha-L-Iduronidase (Valanafusp Alpha) bzw. mit Iduronat-2-Sulfatase (Pabinafusp Alpha) gekoppelt ist und zur Behandlung der Mukopolysaccharidose Typ 1 bzw. Typ 2 bei Kindern verwendet wird (270, 271). Daneben wird die Behandlung hämatologischer und onkologischer Erkrankungen mit Hilfe bispezifischer Antikörper intensiv erforscht (272). Wichtige zugelassene Vertreter dieser Substanzklasse sind hierbei Blinatumomab, für die Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie und Catumaxomab, zur Behandlung der Hämophilie-A (272).

Die beiden Shuttlesysteme eröffnen die interessante Möglichkeit passive Immuntherapie zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen noch effizienter zu gestalten und dadurch eine suffiziente Exposition im zentralen Nervensystem zu generieren. Wir haben uns dazu entschieden, das AAV-System zu untersuchen, da es im Mausmodell ein niedriges Nebenwirkungsprofil aufweist und bereits nach einmaliger Injektion eine konstitutive Expression des Antikörpers gewährleistet, ohne dass es repetitiver Injektionen bedarf.

### 1.6 Ziel der Arbeit

Die C9orf72 Mutation ist die häufigste bekannte genetische Ursache der Frontotemporalen Demenz und Amyotrophen Lateralsklerose. Die Ergebnisse aus mehreren Jahren intensiver Forschung legen nahe, dass die C9orf72 Haploinsuffizienz, die RNA-Toxizität und die DPR Protein Toxizität die zentralen Treiber der Krankheitsentstehung sind. Es ist noch unklar, welcher Mechanismus das initiale Ereignis der C9orf72 Pathogenese darstellt. Jedoch scheint es, dass vor allem die DPR Proteine eine ausschlaggebende Rolle dabei spielen. Aktuelle Therapieansätze mit Antisense Oligonukleotiden zielen darauf ab, Expression und Toxizität der RNA und DPR Proteine gleichzeitig zu reduzieren. Es stellt sich jedoch die Frage, ob eine spezifisch gegen DPR Proteine gerichtete Therapie ausreicht. Ausgehend von der Hypothese, dass unter den DPR Proteinen poly-GA maßgeblich an der Entstehung der C9orf72 bedingten ALS und FTD beteiligt ist, sollte mit diesem Forschungsprojekt getestet werden, ob die Reduktion von poly-GA ein effektiver therapeutischer Ansatz sein könnte. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war somit zunächst, speziell die Wirksamkeit einer Antikörpertherapie in einem *in vivo* Modell zu testen, da bereits in Zellkultur gezeigt werden konnte, dass durch die Behandlung mit anti-GA Antikörpern die Aggregat Bildung und interzelluläre Transmission reduziert werden konnte (23). Da poly-GA nur in Mutationsträgern exprimiert wird, keine endogene Funktion hat und im humanen Proteom auch sonst keine langen poly-GA Sequenzen vorkommen, könnten anti-GA Antikörper einen sicheren und effektiven therapeutischen Ansatz darstellen, um in asymptomatischen Patienten die Krankheitsentstehung zu verzögern oder sogar zu verhindern. In symptomatischen Patienten könnte man so vielleicht die Progredienz der Krankheit stoppen.

Das Ziel meiner Arbeit war es nun zu untersuchen, ob eine Immuntherapie gegen poly-GA Aggregate in einem C9orf72 ALS Mausmodell wirksam ist. Dazu sollte eine präsymptomatische Immunisierung mit zwei verschiedenen poly-GA Antigenen in einem etablierten poly-GA Modell (GA)<sub>149</sub>-CFP durchgeführt werden (19). Das (GA)<sub>149</sub>-CFP Modell eignet sich gut zur Untersuchung der Fragestellung, da das poly-GA spezifisch in Nervenzellen exprimiert wird und die motorischen Defizite relativ früh im Alter von 3 bis 4 Monaten auftreten. Die Wirksamkeit sollte anhand von Antikörpertitern, Neuropathologie und motorischer Funktion untersucht werden.

Dabei sollten zwei Antigene verglichen werden: ungekoppeltes (GA)<sub>15</sub> und (GA)<sub>10</sub> konjugiert an Ovalbumin als immunogenes Trägermolekül.

Im zweiten Teil meiner Arbeit sollte eine Methode zur direkten Antikörperexpression im ZNS von transgenen Mäusen etabliert werden, um die Blut-Hirn-Schranke zu umgehen, welche für Antikörper kaum permeabel ist. Dazu sollten AAV-Vektoren kloniert und verpackt werden, die monoklonale anti-GA- bzw. Kontroll-Antikörper mit nur einer Expressionskette rekombinant exprimieren. Schließlich sollte ein Verfahren zur intracerebroventrikulären AAV-Injektion in neugeborenen Mäusen etabliert werden, um eine möglichst großflächige Expression im ZNS zu gewährleisten. Zusammen sollten die Experimente den Grundstein für passive und aktive Vakzinierung gegen poly-GA bei *C9orf72* ALS/FTD legen.

## 2 Materialien & Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Instrumente und Geräte

Equipment	Hersteller
Scale BP3100S	Sartorius
Certomat BS-1 Inkubator	B. Braun Biotech International
Cawomat 2000 IR	CaWo
Pinzette	FST
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80°C) HFU-T Series	Hareus
Kühlschrank	Liebherr
Laborglaswaren	VWR, Hirschmann
Inkubator für Bakterien	Binder
Tank für flüssigen Stickstoff	Messer Griesheim
Mikrowelle	Sharp
MilliQ plus Filtrationssystem QPod	Merck Millipore
Multikanal Pipetten	VWR
NanoPhotometer	Implen
pH meter Five Easy	Mettler-Toledo
Pipette Boy	Brand
Pipetten	Gilson, Rainin
Scanner V700 Photo	Epson
Rüttler	Edmund Bühler
Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Multifuge 3 SR	Heraeus
Megafuge 16	Heraeus
Megafuge 40R	Heraeus
Zentrifuge 5427R	Eppendorf
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Cytation 3 imaging reader	BioTek
Lichtmikroskop WilovertS Mikro	Hund Wetzlar
RFL-T Mercury Burner MSH-1030L	Olympus
LSM710 ConfocalLaserScanning Microscope	Zeiss
LSM800 ConfocalLaserScanning Microscope	Zeiss
RMC 7812 Z2 remote control	LASOS
Illuminator HXP 120 V	Zeiss
Stage Controller XY CD MC 2008	Zeiss
Objective Plan Achromat 40x/1.4 Öl DIC	Zeiss
Leica DMI8	Leica Microsystems
Leica Application Suite X(LAS X)	Leica Microsystems
Smart Move	Leica Microsystems
Leica DFC 9000GT	Leica Microsystems

CTR advanced	Leica Microsystems
Wasserbad	GFL
Hera cell culture hood Safe2020	Heraeus
Hera Inkubator Safe Cell 150	Heraeus
Bunsenbrenner	Heraeus
Countess II	LifeTechnologies
Novex 10-20% TricineProteinGels, 12well	ThermoFisher Scientific
Novex 10-20% TricineProteinGels, 15well	ThermoFisher Scientific
XCell SureLock Mini-Cell Blot Module	ThermoFisher Scientific
Mini-Protean Trans-Blot Transfer Cell	Bio-Rad
Digital Sonifier 250	Branson
Röntgenfilm	Fuji
Röntgenfilm Kasette	G. Kisker
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad
PCR thermal cycler nexus	Eppendorf
UV Transilluminator	INTAS
P93D Drucker	Mitsubishi
SeparationSytemsGel Kammern und Kämme	Peqlab, OWL
MESO QuickPlex SQ 120	Mesoscale
Green Line IVC sealseal plus mouse	Tecniplast
Stock	OBI
Plastikkiste	OBI
Tablet Microsoft Surface	Microsoft
Stereotaxic Instrument 900LS	Kopf
Stereotaxic Instrument	WPI
Injektionspumpe	WPI
Digitale Koordinaten-Konsole	Kopf
Perfusionsgerät Peristar Pro	WPI
Precellys Evolution Homogenizer	Bertin Instruments
CryoStar NX70	ThermoFisher Scientific

### 2.1.2 Verbrauchsmittel

Equipment	Hersteller
Biosphere Filtertips (Pipettenspitzen)	Sarstedt
Pipettenspitzen, Ultrafine	VWR
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt
Röhrchen (1,5ml; 2ml; 5ml)	Sarstedt
Röhrchen (15ml, 50ml)	Sarstedt
LoBind Röhrchen (1,5ml)	Eppendorf
Handschuhe (Nitril)	Meditrade
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging
pH Indikator Streifen	Merck Millipore
Skalpell	Braun

Zellzählungskammer Countess II	Life Technologies
Zellkultur Petrischale (10cm)	Nunc
Zellkultur Platte (12-Lochplatte)	Nunc
Mikroskop Deckgläser (20mm)	VWR
Plastikspritze (50ml)	VWR
MicroAmp Optical 8-Röhrchenband	Applied Biosystems
Microseal 'B' Adhesive Seal (Verschlussfolie)	Bio Rad
PCR Röhrchenband	VWR
Löschpapier	Macherey-Nagel
Immobilon-P Membran, PVDF, 0,45 µM	Merck Millipore
Novex 10-20% Tricine Protein Gels (12/15 Lochplatte)	ThermoFisher Scientific
MaxiSorb 96-Lochplatten	ThermoFisher Scientific
Spezialdiät-Futter Maus	SSniff Spezialdiät GmbH
Injektionsnadel Injekt-F	Braun
Lanzette	Goldenrod
Krankenunterlagen blau	Medi-Inn
Injektionsnadel (ICV-Injektion)	Hamilton
Grüne Tätowierpaste	Raidex
Venofix Safety	Braun
Streptavidin Gold multi-array 96- Lochplatten	Mesoscale

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Equipment	Hersteller
2-Propanol	Merck Millipore
Borsäure	Merck Millipore
Brij 35	Sigma-Aldrich
Zitronensäure	Sigma-Aldrich
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Roth
Ethanol	Merck Millipore
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	USB
Fötale Kalbsserum (FCS)	Life Technologies
Ameisensäure	Sigma-Aldrich
Gelatine	Sigma-Aldrich
Glycerol	Biomol
Glycin	Biomol
KCl	USB
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck Millipore
Methanol	Merck Millipore
MgCl <sub>2</sub>	Roth
Na <sub>2</sub> (B <sub>4</sub> O <sub>5</sub> (OH) <sub>4</sub> ) (Borax)	Sigma-Aldrich
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck Millipore

## Materialien & Methoden

---

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck Millipore
NaCl	Merck Millipore
Paraformaldehyd (PFA)	SERVA
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Saccharose	Sigma-Aldrich
Tris	AppliChem
Triton X-100	Merck Millipore
Tween 20	Sigma-Aldrich
Xylol	Merck Millipore
Bovin Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
DMEM Glutamax	Life Technologies
L-Glutamat	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	Sigma-Aldrich
Lipofectamine 2000	Life Technologies
Neurobasal	Life Technologies
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Life Technologies
OptiMEM	Life Technologies
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies
Poly-D-Lysin (PDL)	Sigma-Aldrich
Tetracyclin	Sigma-Aldrich
Trypsin (2,5%)	Life Technologies
1 kb Plus DNA Leiter	Invitrogen
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roche Applied Science
Ampicillin	Boehringer Ingelheim
Antimycin	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Merck Millipore
Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	NEB
dNTP Mix, 10mM	ThermoFisher Scientific
FCCP	Sigma-Aldrich
GelRed	Biotium
Oligomycin	Sigma-Aldrich
Q5 DNA Polymerase	NEB
Random Hexamer Primer	Sigma-Aldrich
Restriktionsenzyme	NEB
T4 Ligase	NEB
Taq DNA Polymerase	Promega
UltraPure Agarose	Life Technologies
Proteinase K	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich
Benzonase Nuclease	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
DNaseI	Sigma-Aldrich
ECL plus	ThermoFisher Scientific
Signalverstärkte Chemolumineszenz (ECL)	ThermoFisher Scientific
i-Block	Tropix

NaN <sub>3</sub>	Merck Millipore
Protease + Phosphatase Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
SeeBlue Prestained Protein Ladder Plus 2	Life Technologies
Puromycin	Merck Millipore
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	USB
Tricin	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Merck Millipore
Acrylamid (37.5:1/40% (w/v))	Bio Rad
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich
OVA-(GA) <sub>10</sub>	PSL GmbH
(GA) <sub>15</sub>	PSL GmbH
Inkomplettes Freund-Adjuvans	Sigma-Aldrich
CpG 1668	Enzo
Trypanblau	Life technologies
Isofluran	CP Pharma
MMF-Narkotikum	
5x green GoTaq Reaktionspuffer	Promega madison
GoTaq G2 DNA Polymerase	Promega madison
Urea	Bio Rad
Hämatoxylin	Sigma Aldrich
Eosin	Sigma Aldrich
CpG-ODN 1668	Invivogen

### 2.1.4 Antikörper

Antigen	Hersteller	Anwendung
Maus α GA, Klon 1A12	HMGU	IF, WB, ELISA
Maus α PR, Klon 32B3	HMGU	IF, WB
Maus α HA	Sigma-Aldrich	IF
Ratte α HA	Sigma-Aldrich	IF
Kaninchen α HA	Sigma-Aldrich	IF
Maus α myc	abcam	IF
Kaninchen α myc	abcam	IF
Kaninchen α Calnexin	Proteintech	WB
Kaninchen α GFP	abcam	IHC
Kaninchen α GFP-488	Sigma-Aldrich	IF
Kaninchen α Iba1	Thermo Fisher Scientific	IHC
Maus α GA biotinyliert, Klon 5F2	HMGU	ELISA
Maus α GA sulfoniert, Klon 5F2	HMGU	ELISA
Ziege α Maus IgG Alexa 488 oder 555	Life Technologies	IF
Ziege α Kaninchen IgG Alexa 488 oder 555	Life Technologies	IF

Ziege $\alpha$ Ratte IgG Alexa488 oder 555	Life Technologies	IF
Ziege $\alpha$ Maus IgG HRP	Promega	WB, ELISA
Ziege $\alpha$ Kaninchen IgG HRP	Promega	WB
Ziege $\alpha$ Ratte IgG HRP	Merck Millipore	WB

### 2.1.5 Kits

Equipment	Hersteller
DCS SuperVision 2 Kit	DCS Diagnostics
Extract II Kit	Macherey-Nagel
NucleoBond Xtra Midi	Macherey Nagel
NucleoBond Plasmid	Macherey Nagel
NucleoSpin Gel and PCR Cleanup	Macherey-Nagel
AAV- DJ Helper Free Packaging System	Cell Biolabs
Pierce BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific

### 2.1.6 Puffer

Alle Puffer wurden in MilliQ-Wasser angesetzt. Ausnahmen wurden angegeben.

Equipment	Rezeptur
Borat Puffer	40 mM Borsäure 10 mM Natriumtetraborat Angepasst an pH 8.5
Beschichtungslösung für Cover Slips	1,5% PDL in Borate Puffer
HEK293-FT Medium	1% Penicillin/Streptomycin 1% NEAA 10% FCS In DMEM Glutamax
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	0,14 M NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl Angepasst an pH 7.4
5x DNA Auftragspuffer	50% Glycerol 50 mM Na <sub>2</sub> EDTA 0,05% Bromophenolblau Angepasst an pH 8.0
LB Agar	1,5% Agar 1% Trypton 0,5% Hefe-Extrakt 86 mM NaCl
Lysogeny Broth (LB) Medium	1% Trypton 0,5% Hefe-Extrakt

	86 mM NaCl
Natrium Borat Puffer (SB)	5 mM Na <sub>2</sub> (B <sub>4</sub> O <sub>5</sub> (OH) <sub>4</sub> ) Angepasst an pH 8.0 mit H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
Immunopräzipitation Lysis Puffer	2% Triton X-100 0,75 M NaCl 1 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Immunopräzipitation Basis Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7.5 150 mM NaCl 5% Glycerol
4x Lämmli Puffer	4% SDS 20% Glycerol 5% β-Mercaptoethanol 200 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Blockpuffer	0,2% i-Block in TBSTx
Tricin Gel Laufpuffer	0,1 M Tris-HCl 0,1 M Tricin 0,1% SDS
RIPA Puffer	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1% NP-40 0,1% SDS pH 7.5
TBSTx	20 mM Tris 0,14 M NaCl 0,2% Triton X-100 Angepasst an pH 7.6
Transfer Puffer	25 mM Tris 0,2 M Glycin
HotShot Puffer A 10x	250 mM NaOH 2 mM EDTA
HotShot Puffer B 10x	400 mM Tris-HCl
Citrat Puffer A für IHC	0,1 M Zitronensäure
Citrat Puffer B für IHC	0,1 M Natriumcitrat
Fixierungslösung	4% PFA 0,15 mM NaOH 0,13 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,12 mM Saccharose Angepasst an pH 7.5
Immunohistochemischer Blockpuffer	2% FCS in PBS
Immunohistochemischer Waschpuffer	0,05% Tween 20 in PBS
Immunofluoreszenz Gelatine Block-Puffer	2% FCS 2% Bovin Serum Albumin 0,2% Gelatine Gelöst in PBS
Permeabilisations-Puffer	0,2% Triton X-100

	50 mM NH <sub>4</sub> Cl Gelöst in PBS
--	---

### 2.1.7 Bakterienstämme, Zelllinien und primäre Neuronen

Equipment	Hersteller
DH5α und Stbl3 E.coli kompetente Zellen	Life Technologies
HEK293-FT	Life Technologies
Kortikale und hippocampale Neuronen (Ratte)	Charles River

### 2.1.8 Primer

Name		Sequenz
(GA) <sub>149</sub> -CFP	Sense	tccaggagcgtaccatcttc
	Antisense	gtgctcaggtagtggtgtc
4688-VH-sigpep-BglII-s	Sense	ttgagatctgccaccatggaatggacctgggtctttctcttct
4689-IgG2a-HA-a	Antisense	agcgtaatctggaacatcgatgggtattgccagggatctgctgattgtc
4690-HA-P2A-s	Sense	taccatacagatgtccagattacgctgagaaagcgacggggatccggagc
4691-kappa-myc-EcoRI-a	Antisense	gacgaattctcacaagtctcttcagatatcag-cttttgctcgactcgtttctgttgaaggacttcac
4222-32B3-VH-BglII-s	Sense	ttgagatctgccaccatggaatggagcagagtctatataactc

### 2.1.9 Plasmide

Konstrukt	Hersteller/Cloning Strategie
DF231 (pAAV-hSyn-1A12 anti-GA)	Dieter Edbauer, Daniel Farny
DF232 (pAAV-hSyn-32B3 anti PR)	Dieter Edbauer, Daniel Farny
MM167 (pEF6-GFP)	Dieter Edbauer, Meike Michaelsen
AD793 (pEF6-(GA) <sub>175</sub> -GFP)	Dieter Edbauer
AD797 (pEF6-(PR) <sub>175</sub> -GFP)	Dieter Edbauer
DF181 (pcDNA3.1/zeo-32B3 anti PR)	Dieter Edbauer, Daniel Farny
DF164 (pcDNA3.1/zeo-1A12 anti GA)	Dieter Edbauer, Daniel Farny
NM01 (pcDNA3.1/zeo-1A12-HA-myc)	PCR aus DF164 BglII bzw. BamHI/EcoRI cloning in pcDNA3.1/zeo
NM02 (pcDNA3.1/zeo-32B3-HA-myc)	PCR aus DF181 BglII bzw. BamHI/EcoRI cloning in pcDNA3.1/zeo
NM03 (pAAV-hSyn-1A12-HA-myc)	PCR aus DF164 BglII bzw. BamHI/EcoRI cloning in pAAV-

	hSyn-EGFP
NM04 (pAAV-hSyn-32B3-HA-myc)	PCR aus DF181 BglII bzw. BamHI/ECorI cloning in pAAV-hSyn-EGFP
pcDNA3.1/zeo	ThermoFisher Scientific
pAAV-hSyn-EGFP	AddGene
AAV-RC	Cell Biolabs
pAAV-Helper	Cell Biolabs
AAV1-EGFP	Vector biolabs
AAV8-EGFP	Vector biolabs
AAV9-EGFP	Vector biolabs
KR313 (pcDNA4-TO-80xGA-flag)	Dieter Edbauer
AD681 (pEF6-GAGA)	Dieter Edbauer
AD796 (pEF6-(PA) <sub>175</sub> -GFP)	Dieter Edbauer
AD706 (pEF6-GFP-(GR) <sub>149</sub> )	Dieter Edbauer
MM161 (pEGFP-(GP) <sub>47</sub> )	Dieter Edbauer, Meike Michaelsen

### 2.1.10 Software

Equipment	Hersteller
Adobe Acrobat Pro	Adobe Systems Incorporated
CLC Main Workbench for DNA, RNA and Protein Analysen	CLC bio
ImageJ/Fiji (Bildbearbeitung)	Fiji
GraphPad PRISM	GraphPad Software Inc.
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation
Primer 3	( <a href="http://bioinfo.ut.ee/primer3/">http://bioinfo.ut.ee/primer3/</a> )
NCBI online Datenbank	( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> )
EndNote X9/20	Thomson Reuters

### 2.1.11 Services

Equipment	Hersteller
DNA Sequenzierung	GATC Biotech
Oligonukleotid Synthese	Sigma-Aldrich

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Maushaltung und Methodik

Für die aktive Immunisierung wurde die (GA)<sub>149</sub>-CFP-Mauslinie im C57BL/6 Hintergrund aus Schludi et al. 2017 genutzt. Diese Linie exprimiert (GA)<sub>149</sub> von einem synthetischen DNA-Fragment und ein daran gekoppeltes Cyan-fluoreszierendes Protein (CFP) unter Kontrolle des murine Thy1.2 Promoters. Die Verpaarung und Aufzucht erfolgte in einem pathogenfreien Zuchtbereich. Anschließend wurden die Tiere in den pathogenfreien Experimentalbereich transferiert.

Für die Immunisierung wurden insgesamt 61 Mäuse verwendet. Zur Identifizierung dienten Ohrmarken. Hierbei wurde das ausgestanzte Gewebe zur Genotypisierung benutzt. Es handelte sich dabei um eine prospektive, verblindete, randomisierte, kontrollierte Studie. Die Mäuse wurden in drei Gruppen mit je 20 Tieren aufgeteilt. Die Einteilung in die Gruppen erfolgte zufällig und wurde von einer zweiten Person durchgeführt, um die Verblindung zu gewährleisten. Dabei wurde jedoch darauf geachtet, dass das Verhältnis zwischen Transgen- und Wildtyp-Mäusen und zwischen Männchen und Weibchen ausgeglichen war. Es wurden jeweils 4 - 5 Wurfgeschwister in einem Green Line IVC *sealsafe* plus Maus -Käfig mit einem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Bei der Ernährung wurde auf *ad libitum* Fütterung gesetzt. Zur Kontrolle des Gesundheitszustandes wurden die Tiere täglich inspiziert. Mit der Durchführung der einzelnen Methoden wurde im Alter von 2 Monaten begonnen. 27 der Tiere wurden 1 Monat später geboren als die restlichen 36 Tiere, sodass Sie erst 1 Monat später und dementsprechend 1 Monat länger behandelt wurden. Alle Experimente und die Haltung der Tiere erfolgte zum Schutz der Tiere nach den Leitlinien des Deutschen Zentrums für Neurodegenerative Erkrankungen e.V. (DZNE) und dem deutschen Tierschutzgesetz. Die Studie wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt. Impfungen, Blutentnahmen und Beam Walk Test wurden mit allen Mäusen gleichzeitig, nacheinander durchgeführt. Es wurde stets der Grundsatz verfolgt, möglichst schonend und mit möglichst geringer Schmerzintensität zu arbeiten.

	PBS	OVA-(GA) <sub>10</sub>	(GA) <sub>15</sub>
Transgen (tg)	10	10	10
Tg-Männchen	4	5	5
Tg-Weibchen	6	5	5
Wildtyp (wt)	11	11	9
Wt-Männchen	5	6	5
Wt-Weibchen	6	5	4

**Tabelle 2: Impfgruppenteilung (Quelle: Nikola Mareljic)**

Zuteilung der Mäuse in die einzelnen Gruppen. Kontrollgruppe PBS mit Transgen- und Wildtyp-Mäusen. Impfgruppe OVA-(GA)<sub>10</sub> mit Transgen- und Wildtyp-Mäusen. Impfgruppe (GA)<sub>15</sub> mit Transgen- und Wildtyp-Mäusen.

Für die Etablierung der intracerebroventrikulären Injektion wurden C57BL/6N Mäuse verwendet. Die Injektion erfolgte in neugeborenen Mäusen einen Tag nach dem Wurf (P1). Insgesamt wurde in 17 Mausjungen eine Trypanblau-Injektion und in 15 Mausjungen eine AAV-Injektion durchgeführt.

### 2.2.1.1 Immunisierung

Ähnlich zur Generierung von monoklonalen Antikörpern, wurde ein modifiziertes Immunisierungsprotokoll mit zusätzlichen Auffrischimpfungen verwendet (273). Die Mäuse wurden im Alter von 8 Wochen subkutan (s.c.) und intraperitoneal (i.p.) mit insgesamt 40 µg OVA-(GA)<sub>10</sub> oder (GA)<sub>15</sub>, gemischt mit 5 nmol CpG 1668 Oligonukleotid (Tib Molbiol, Berlin) in 200 µl PBS und 250 µl inkompletten Freund Adjuvans immunisiert. Dabei wurden 225 µl s.c. in die Nackenfalte und 225 µl i.p. in den linken Unterbauch injiziert. Der Kontrollgruppe wurden 5 nmol CpG 1668 Oligonukleotid (Tib Molbiol, Berlin) in 200 µl PBS und 250 µl inkompletten Freund

Adjuvans appliziert. In den Wochen 12, 16, 20, 24 und 28 erfolgte eine Auffrischimpfung mit 40 µg Peptid, gemischt mit 5 nmol CpG 1668 in 500 µl PBS. Dabei wurden 250 µl s.c. in die Nackenfalte und 250 µl i.p. in den linken Unterbauch injiziert. Ziel der multiplen Auffrischungen war es, einen möglichst hohen Antikörpertiter zu generieren. Der Kontrollgruppe wurden 5 nmol CpG 1668 in 500 µl PBS verabreicht. Die (GA)<sub>15</sub>-Gruppe wurde eingeführt, um zu sehen, ob ungekoppelte (GA)<sub>15</sub>-Aggregate auch ohne Konjugat immunogen genug sind. Um die Verblindung zu gewährleisten, wurden die Zubereitung der Impflösung und die Impfung von zwei Personen durchgeführt.

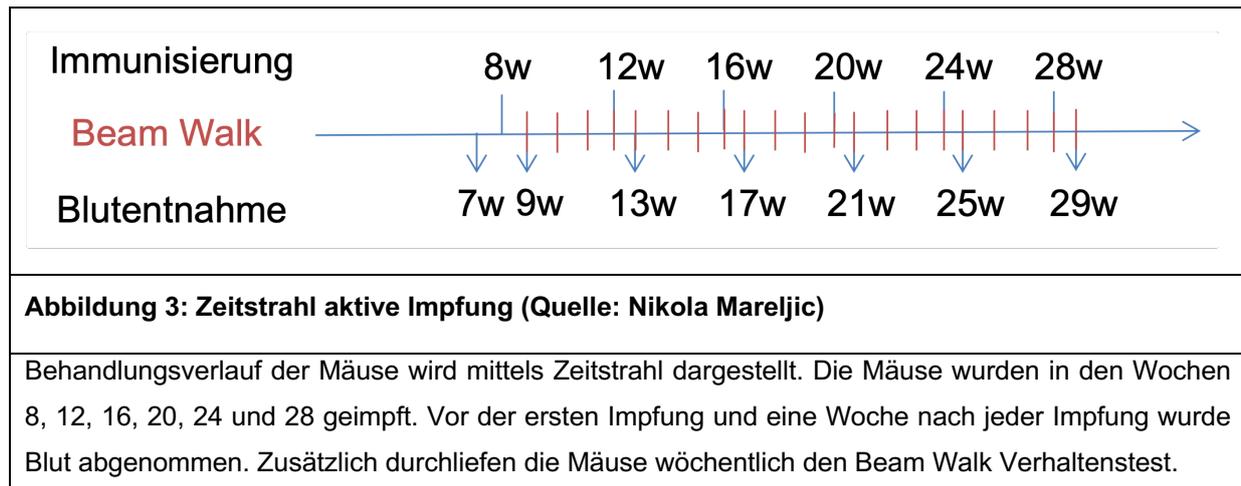
### 2.2.1.2 Blutentnahme

Vor Beginn der Immunisierung und in den Wochen 9, 13, 17, 21, 25 und 29 wurden 100 µl Blut aus der Fazialisvene entnommen, um die Antikörperantwort im ELISA zu quantifizieren. Dabei wurden die Mäuse fixiert und mit einer Lanzette in den bukkalen Bereich gestochen. 3 - 4 Tropfen Blut wurden anschließend mit einem 1,5 ml Röhrchen aufgefangen. Nach Agglutination des Blutes wurde dieses bei 13.000g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Serum wurde schließlich mittels Pipette in eine 96-Loch-Platte transferiert und im -80°C Gefrierschrank aufbewahrt. Bei jeder Blutentnahme wurde die Einstichseite gewechselt, um einer Fibrose im gestochenen Bereich vorzubeugen.

### 2.2.1.3 Beam Walk

Die Mäuse durchliefen ab der 9. Woche wöchentlich den sogenannten *Beam Walk* Verhaltenstest. Mit Hilfe dieses Tests wurde die Motorik der Tiere überprüft. Die (GA)<sub>149</sub>-CFP-Mauslinie, welche für die aktive Immunisierung verwendet wurde, fiel in diesem Test ab dem 4. Lebensmonat durch motorische Defizite auf. Dies äußerte sich als Schwäche in den Hinterbeinen mit Gang- und Gleichgewichts- Störungen (19). Die Maus wurde auf einen hölzernen Stock (Länge= 58cm, Durchmesser= 8mm) gesetzt und musste von einem Ende zum anderen Ende laufen. Hierbei wurde die benötigte Zeit gemessen. Die Maus hatte 1 Minute Zeit, den Stock zu überqueren. Sollte sie länger als 1 Minute gebraucht haben oder sollte sie vom Stock gefallen sein, wurde die Zeit als 1 Minute gewertet. Jede Maus hatte zwei Durchläufe. Als

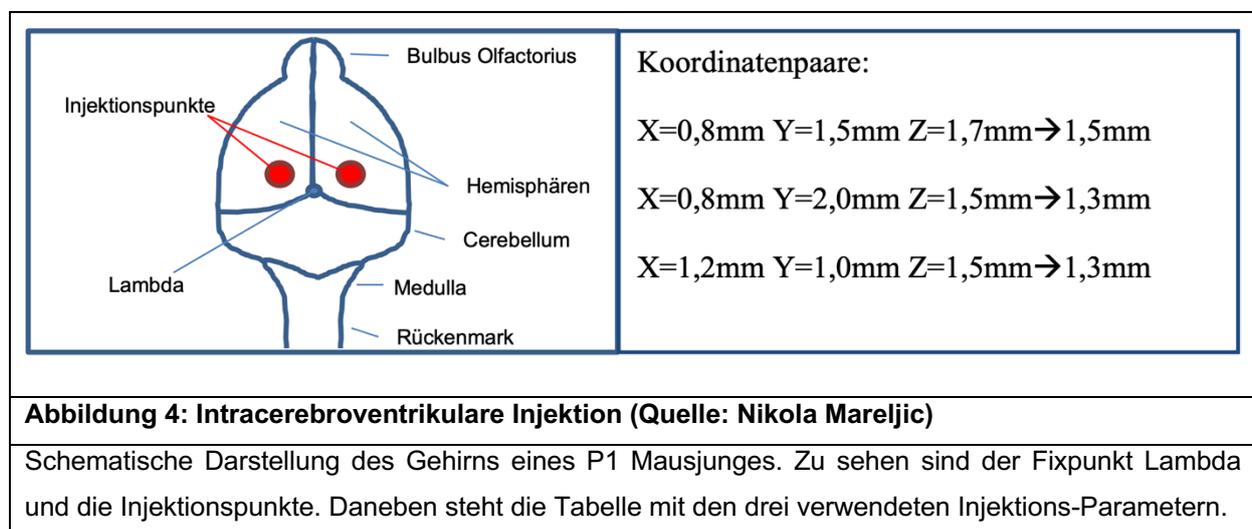
Ergebnis wurde die Durchschnittszeit aus beiden Läufen genommen. Zur Auswertung wurden die Läufe mit einer Kamera aufgezeichnet. Um die Verblindung zu gewährleisten, wurden die Läufe von einer anderen Person ausgewertet. Die verschiedenen Arbeitsschritte werden im folgenden Zeitstrahl nochmal veranschaulicht.



#### 2.2.1.4 Intracerebroventrikuläre Injektion

Für die intracerebroventrikuläre Injektion wurde das Protokoll aus Kim et al. 2014 verwendet (274). Nach Verpaarung wurde das trüchtige Weibchen engmaschig überwacht. Einen Tag nach dem Wurf wurde dann die Injektion durchgeführt. Für die Trypanblau-Injektion wurde eine 1% Trypanblau in PBS Lösung angesetzt. Ziel der Injektion war es zu sehen, ob das Ventrikelsystem getroffen wird. Bei erfolgreicher Infiltration sollte sich das Gehirn homogen blau verfärben. Für die AAV-Injektion wurden drei AAV-Vektoren verwendet, welche das grün-fluoreszierende Protein (GFP) exprimierten. Dabei wurden das AAV1-EGFP, AAV8-EGFP und AAV9-EGFP appliziert, um zu sehen mit welchem der drei Konstrukte die beste Expression erreicht wird. Es wurde immer ein Neugeborenes aus dem Käfig entnommen und nach erfolgter Injektion wieder zurückgesetzt. Die Mausjungen wurden mittels Sevofluran (Konzentration bei Einleitung: 2%; Konzentration zur Erhaltung 1%) anästhesiert. Um einer Hypothermie entgegenzuwirken, wurden die Mäuse während des Eingriffs auf ein Heizkissen gelegt. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde durch einen aufgehobenen Zwischenzehenreflex bestätigt. Die Injektion erfolgte mit Hilfe eines stereotaktischen Halteapparates. Das anästhesierte Mausjunge wurde auf dem

Halteapparat mittels zwei Bolzen mit Gummibeschichtung am Kopf fixiert. Die Injektionsnadel wurde dann oberhalb von Lambda in Position gebracht. Als Nächstes wurde der stereotaktische Arm zur Injektionsstelle hin koordiniert. Als Einstichstellen wurden drei verschiedene Koordinatenpunkte auf der X- und Y- Achse verwendet, um zu sehen mit welchem Koordinatenpaar das Ventrikelsystem am besten erreicht werden kann. Es erfolgte zunächst eine Säuberung der Kopfhaut mit 70% Ethanol. Die Nadel wurde dann bis zur Penetration der Kopfhaut gesenkt und anschließend wieder leicht retrahiert, damit der Schädel seine Ausgangsform wieder annimmt. Nachdem die Z-Koordinate zurückgesetzt wurde, wurde die Nadel 1,7mm gesenkt und anschließend gleich auf 1,5mm zurückgezogen. Nun wurden 2µl Lösung mit einer Geschwindigkeit von 30nl/sec injiziert. Die Retraktion der Nadel erfolgte langsam, um zu verhindern, dass Lösung zurückfließt. Das Prozedere wurde auf der anderen Hemisphäre wiederholt. Die Mausjungen wurden mittels Pfortentätowierung markiert. Anschließend wurde das Neugeborene wieder in den Käfig zurückgesetzt.



### 2.2.1.5 Gewebeentnahme

8 Monate alte (GA)<sub>149</sub>-CFP-Mäuse wurden mittels intraperitonealer Applikation einer Medetomidin (0,5mg/kg) + Midazolam (5mg/kg) + Fentanyl (0,05mg/kg)-Narkose (MMF) anästhesiert. Die Narkosetiefe wurde mittels Zwischenzehenreflex überprüft. Anschließend wurden die Tiere in Rückenlage an den Gliedmaßen fixiert. Im weiteren Verlauf erfolgte die Eröffnung des Thorax, um in die linke Herzkammer des

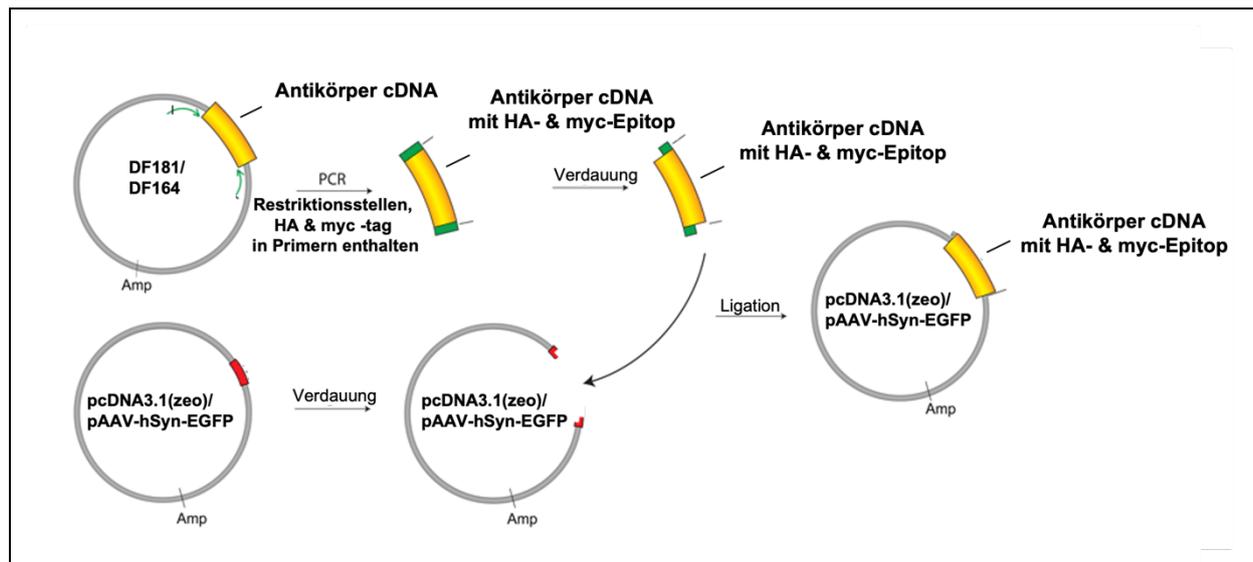
freiliegenden Herzens eine Flügelkanüle einzuführen. Es wurde eine 10-minütige Perfusion mit PBS durchgeführt, dabei wurde durch einen Schnitt in die rechte Herzkammer der Abfluss des Blutes gewährleistet. Anschließend wurden Gehirn, Rückenmark und Milz entnommen und in Formalin für 24 Stunden fixiert. Für histologische Färbungen wurde das Rückenmark samt Wirbelsäule verwendet. Für proteinbiochemische Untersuchungen wurde das Rückenmark aus dem Spinalkanal präpariert. Die Wirbelsäulen wurden in einem zusätzlichen Schritt mittels 5% Ameisensäure für 48 Stunden dekalzifiziert. Färbungen wurden an 5-7µm dicken Schnitten aus Paraffin-eingebettetem Gewebe unternommen. Das Gewebe für proteinbiochemische Untersuchungen wurde sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefrostet, bei -80°C aufbewahrt und später lysiert.

Neugeborene Mäuse, an welchen die Trypanblau-Injektion durchgeführt wurde, wurden 24 Stunden nach Injektion mittels Enthauptung getötet. Die Gehirne wurden herauspräpariert und die Verfärbung des Gehirns untersucht. Mausjungen, welchen das AAV-Konstrukt injiziert wurde, wurden 3 Wochen nach Injektion mit dem gleichen Verfahren getötet. Die Gehirne wurden nach 24-stündiger Formalin-Fixierung in 10%-Saccharose-Lösung eingelegt und entlang der Sagittalebene in zwei Hälften geteilt. Anschließend wurden Sie bei -80°C konserviert.

## 2.2.2 Molekularbiologie

### 2.2.2.1 Klonierung

Die komplementäre Ziel DNA-Sequenz wird per Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und mit Hilfe von Restriktionsenzymen aus einer Plasmidvorlage herausgeschnitten. Damit die Zielsequenz in den gewünschten Vektor inseriert werden kann, wird dieser mit den gleichen oder komplementären Restriktionsenzymen geschnitten. Dafür werden die folgenden PCR *Primer* verwendet, welche die gewünschten Restriktionsseiten enthalten: 4688-VH-sigpep-BgIII-s (5'-ttgagatctgccaccatggaatggacctgggtctttctctcct-3'), 4689-IgG2a-HA-a (5'-agcgtaatctggaacatcgatgggtattgccaggatctgctgattgctc-3'), 4690-HA-P2a-s (5'-taccatacgtatgtccagattacgctgagaaagcgacggggatccggagc-3'), 4691-kappa-myc-EcoRI-a (5'-gacgaattctcacaagtctcttcagatatcagctttgctcgactcgtttctgtgaaggactccac-3') und 4222-32B3-VH-BgIII-s (5'-ttgagatctgccaccatggaatggagcagagtctatataactc-3'). In diesem Fall kodieren die Zielsequenzen für einen monoklonalen anti-GA Antikörper und einen monoklonalen anti-PR Antikörper (Kontroll-Antikörper). Hierfür wurden die folgenden beiden Plasmide genutzt, welche für die Zielsequenzen kodieren: pcDNA3.1/zeo-32B3 anti-PR (im Folgenden DF181 genannt) und pcDNA3.1/zeo-1A12 anti-GA (im Folgenden DF164 genannt). Diese wurden mit Hilfe speziell synthetisierter Primer mit einem kurzen myc-Epitop (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu) und einem HA-Epitop (Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala) versehen, um sie in nachfolgenden Untersuchungen besser lokalisieren zu können. Nach erfolgreicher Koppelung wurden die Antikörper zum einen in den pcDNA3.1zeo Vektor inseriert, welcher eine gute Expression in somatischen Zellen gewährleistet. Zum anderen wurden sie in den pAAV-hSyn-EGFP Vektor inseriert, welcher AAV verpackt werden kann und eine gute Expression in Nervenzellen sicherstellt.



**Abbildung 5: PCR Cloning (Quelle: Dieter Edbauer)**

Die Zielsequenz wird aus dem ursprünglichen Plasmid mittels geeigneter Primer amplifiziert. Als nächstes werden die PCR-Produkte mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Parallel dazu werden auch die Ziel-Plasmide mit denselben bzw. komplementären Restriktionsenzymen verdaut. Abschließend wird die Ziel-DNA in das Ziel-Plasmid inseriert und im weiteren Verlauf für die Transformation verwendet.

Für die PCR wurde das Standardprotokoll wie unten angegeben verwendet. Mit Berücksichtigung der Anlagerungstemperatur wurde das Protokoll bedarfsgerecht modifiziert.

Komponente	Volumen
100ng DNA-Matrize	2µl
Sense-Primer (10µM)	1µl
Antisense-Primer (10µM)	1µl
dNTPs (10µM)	1µl
10x Tag Puffer	5µl
Taq Polymerase (5U/µl)	1µl
MilliQ Wasser	ad 50µl

	Temperatur	Zeit
Denaturierung (initial)	95°C	5min
Denaturierung	95°C	30sec
Anlagerung	40°C-70°C	30sec
Elongation	72°C	30sec
Elongation (final)	72°C	8min
<b>30 Zyklen</b>		

**Tabelle 3: PCR Standardprotokoll (Quelle: Eddie-Lab)**

Um die DNA-Fragmente zu analysieren und zu separieren, wurden sie auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dafür wurde 1% Agarose in Natrium Borate Puffer gelöst und mit GelRed (1:50.000) versetzt. Die Lösung wurde unter Verwendung eines Geltaschenkamms in eine Gelkammer gegeben. Die DNA-Proben wurden mit einem fünffachen DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente wurde eine Spannung von 300V appliziert. Im Anschluss wurden die DNA-Banden durch Illumination mit ultraviolettem Licht sichtbar gemacht. Zur Bestimmung der Bandengröße erfolgte der Vergleich mit dem beigefügten 1kb-DNA-Marker. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden dann mittels NucleoSpin Gel und PCR Cleanup Kit (Macherey-Nagel) nach Gebrauchsanleitung aufgereinigt.

PCR Produkte und Plasmide wurden bei 37°C für 2 Stunden oder über Nacht in einer 70µl Reaktionslösung verdaut. Um einen kompletten Verdau zu erzielen, wurde stets nach den Vorgaben des Herstellers gearbeitet (NEB). Einer Selbstligation der Plasmide wurde entgegengewirkt, indem das 5'-Phosphatrest durch die alkalische Phosphatase (CIP) entfernt wurde. Hierbei wurden 3µg des Vektors mit 1 Einheit Phosphatase bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Die verdauten Plasmide und PCR Produkte wurden schließlich mit Hilfe der Gel Elektrophorese aufgereinigt.

Für die Ligation der Ziel DNA-Sequenz mit dem gewünschten Vektor wurde eine 20µl Reaktionslösung angesetzt. Diese bestand aus 3µl Vektor, 9µl Ziel DNA-Sequenz, 2µl T4 DNA-Ligase, 2µl Reaktionspuffer und 4µl Wasser. Die Ligase katalysierte dabei die Reaktion der Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-Phosphatrest und der 3'-OH-Gruppe. Die Reaktionslösung wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Die komplette Reaktionslösung der Ligation wurde für die Transformation in chemisch kompetente *DH5α* oder *Stable3* Bakterien verwendet. Zunächst wurden 100µl der Bakterien auf Eis aufgetaut und die Reaktionslösung wurde vorsichtig zugegeben. Im Anschluss daran erfolgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis. Für eine gesteigerte Permeabilität der Bakterienmembran wurde die Lösung für 30 Sekunden bei 42°C erhitzt. Abschließend erfolgte die Inkubation auf Eis für 3 Minuten. Im nächsten Schritt wurden 400µl Antibiotika-freies LB Medium hinzugegeben und die Lösung wurde bei 37°C und 300rpm für 1 Stunde bebrütet. Anschließend wurde die Lösung auf eine vorgewärmte Ampicillin oder Kanamycin Agar-Platte verteilt und über Nacht bei 37°C (*DH5α*) oder 30°C (*Stable3*) inkubiert.

Zur Inokulierung einer 4ml Kultur (Mini-Präparation) oder einer 100ml Kultur (Midi-Präparation) wurden einzelne Bakterienklone von der Agar-Platte gepickt. Dazu wurde eine sterile Pipettenspitze benutzt und die Kolonie in Ampicillin oder Kanamycin haltiges LB Medium transferiert. Zur Amplifizierung wurden die Kulturen über Nacht bei 37°C (*DH5α*) oder 30°C (*Stable3*) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienkulturen pelletiert. Dazu wurden sie bei 4500g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) für Mini-Präparation oder NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel) für Midi-Präparation nach Vorgaben der Gebrauchsanleitung extrahiert. Zum Schluss wurde die DNA mit MilliQ Wasser eluiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Konzentration wurde durch Messung der Absorption bei 260nm bestimmt (NanoPhotometer, Implen).

Um die Erfolgsrate der Klonierung zu überprüfen, wurden 5µl des aufgereinigten Plasmids sequenziert (GATC Biotech). Standardprimer, welche an das Rückgrat der Plasmide binden können, werden von dem Unternehmen bereitgestellt.

### 2.2.2.2 Genotypisierung

Ziel der Genotypisierung ist die genaue Zuordnung der Tiere in Transgen- und Wildtyp-Mäuse. Dazu wurde eine Ohrstanzbiopsie jeder Maus in eine Mikrotiterplatte transferiert und mit HotShot-Lyse-Puffer lysiert (275). In der darauffolgenden Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und zur weiteren Verarbeitung verwendet. Anschließend wurden die Gensequenzen mit Hilfe der PCR amplifiziert und durch die Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die unterschiedlichen Bandenmuster erlaubten eine Zuordnung zum jeweiligen Genotyp. Für die Identifikation des CFP-Gensegments wurde das folgende Primer-Paar verwendet: 5'-tccaggagcgtaccatcttc-3' und 5'-gtgctcaggtagtggtgtc-3'. Das PCR-Protokoll ist in Tabelle 4 aufgelistet.

Komponente	Volumen
5xGoTaq Reaktionspuffer	5µl
dNTPs (10uM)	0,5µl
Sense-Primer (10uM)	0,25µl
Antisense-Primer (10uM)	0,25µl
GoTaqG2-DNA Polymerase	0,125µl
DNA (Maus)	1µl
MilliQ Wasser	17,875µl

	Temperatur	Zeit
1.Denaturierung (initial)	95°C	2min
2.Denaturierung	95°C	20sec
3.Anlagerung	58°C	30sec
4.Elongation	72°C	45sec
5.Elongation (final)	72°C	5min
<b>35 Zyklen</b> <b>(Schritt 2-4)</b>		

**Tabelle 4: CFP-Genotypisierung-Standardprotokoll (Quelle: Eddie-Lab)**

Zur Analyse der DNA-Fragmente wurde eine Agarose-Gel Elektrophorese durchgeführt. Dafür wurde 1% Agarose in Natrium-Borate Puffer durch Aufkochen gelöst und mit GelRed (1:50.000) versetzt. Nach Ausgießen des Gels wurden die mit sechsfachem Ladepuffer versetzten DNA-Proben in die Geltaschen geladen und bei einer Spannung von 120V für 30 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss daran wurde ein UV-Licht Photosystem zur Visualisierung der Banden benutzt. Mit Hilfe der DNA-Leiter konnten die Bandenmuster entsprechend ihrer Größe zugeordnet werden. Die Proben der Transgen-Mäuse wiesen die gesuchte Bande auf, wohingegen die Proben der Wildtyp-Geschwister-Tiere keine Bande zeigten.

### 2.2.3 Zellbiologie

#### 2.2.3.1 Kultivierung von Humanen embryonalen Nierenzellen und Neuronen

Die Kultivierung der HEK293-Zellen und primären Neuronen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem 5%-igen CO<sub>2</sub>/Luftgemisch. Die Durchführung jeglicher Experimente und Manipulationen mit den Zellen erfolgte zu jeder Zeit unter sterilen Bedingungen in einem laminaren Luftstrom.

HEK293-FT Zellen wurden in 75ml Zellkulturflaschen in DMEM Glutamax Medium kultiviert. Es erfolgten regelmäßige mikroskopische Inspektionen auf Zelluntergang und Verunreinigungen. Dem Medium wurde 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) und 1% nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA) beigesetzt. Nachdem die Konfluenz einen Wert von ca. 80% erreicht hat, wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 gesplittet. Für die Passage wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, dann mit 1ml einer 0,05% Trypsin-Lösung losgelöst und anschließend in frisches Medium übertragen.

Zur Isolierung primärer kortikaler und hippokampaler Neurone wurden 19 Tage alte Ratten-Embryonen (Sprague-Dawley) verwendet (148). Diese wurden in Neurobasal Medium kultiviert. Zur Behandlung kortikaler Neurone wurde dem Medium 2% B27, 1% Pen/Strep und 0,25% Glutamin beigesetzt. Hippokampalen Neuronen wurde zusätzlich noch 0,125% Glutamat hinzugefügt. Die Neurone wurden in Plastik-Platten oder auf Deckgläsern plattiert, welche zuvor mit 65% Salpetersäure behandelt wurden und bei 200°C für 6 Stunden sterilisiert wurden. Dabei wurden je 400.000 kortikale und je 80.000 hippokampale Zellen ausgesät. Die Zellen wurden nach 7 Tagen in vitro (DIV7) transduziert oder transfiziert.

Um eine Ablösung der Zellen von der Plastik-Platte oder den Deckgläsern zu vermeiden, wurden diese vor Zugabe der Zellen mit 1,5% PDL in 0,1M Borate Puffer für 4 Stunden beschichtet. Anschließend wurden die Platten und Deckgläser dreimal mit Wasser ausgewaschen und dann bis zur Verwendung in DMEM Glutamax Medium bzw. Neurobasal Medium im Zellkultur-Inkubator äquilibriert.

### 2.2.3.2 Transfektion von HEK293 Zellen und Neuronen

Um fremd-DNA in HEK293 Zellen einzubringen, wurden einen Tag vor der Transfektion 200.000 Zellen pro Milliliter ausgesät. Zur Quantifizierung der Lebendzellzahl erfolgte die Durchführung des Trypanblau-Ausschlusstests. Dabei wird der Farbstoff nur von toten Zellen aufgenommen. Mit Hilfe einer Zählkammer wird dann die Zellzahl ermittelt. Die Transfektionslösung für ein Loch in einer 12-Lochplatte setzte sich dabei wie folgt zusammen:

Komponente	Volumen für 1 Loch
DNA	1µg
OptiMEM	125µL
kombiniert mit:	
Lipofectamin 2000	2,5µl
OptiMEM	125µL

**Tabelle 5: Transfektionslösung für HEK293 Zellen (Quelle: Eddie-Lab)**

Nach 20-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Transfektionslösung dem Zellkultur Medium tröpfchenweise beigefügt. Die transfizierten Zellen wurden im nächsten Schritt für 48 Stunden in den Zellkultur-Inkubator gestellt, bevor sie zur weiteren Verwendung prozessiert wurden.

Ähnlich den HEK293-FT Zellen wurden auch die Neurone mittels Lipofectamin 2000 transfiziert. Die Transfektionslösung wurde dabei folgendermaßen angesetzt:

Komponente	Volumen für 1 well
DNA	1,8µg
OptiMEM	100µL
kombiniert mit:	
Lipofectamin 2000	3,2µl
OptiMEM	100µL

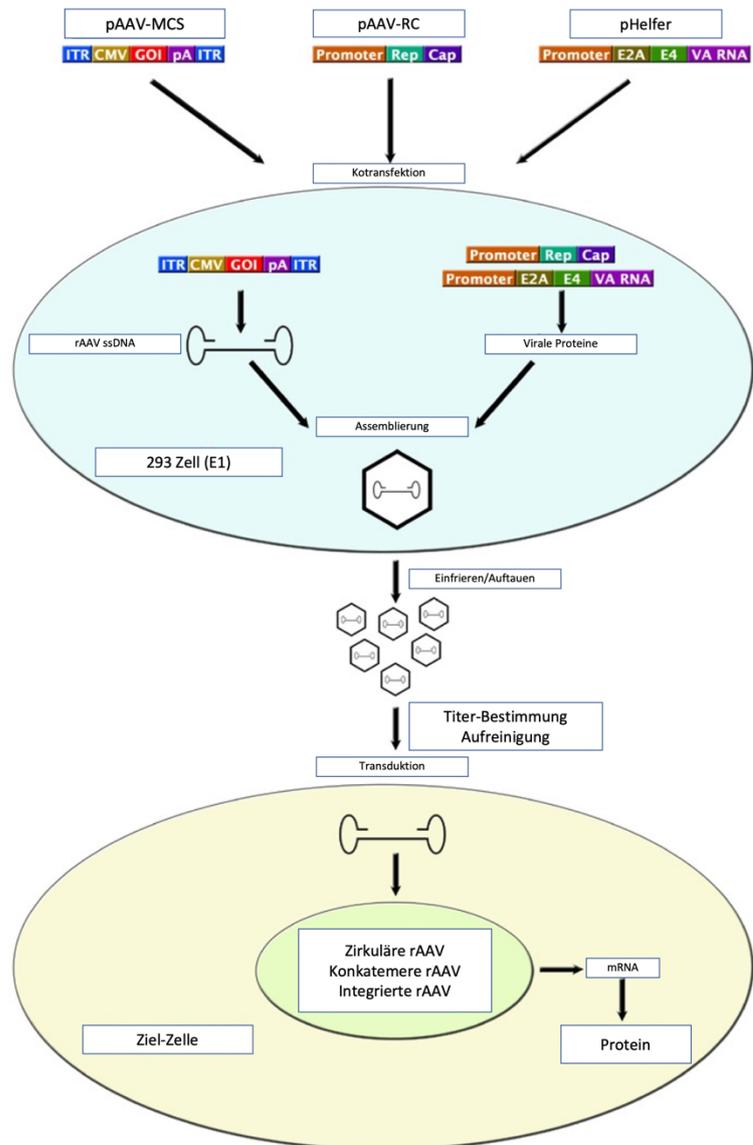
**Tabelle 6: Transfektionslösung für Neuronen (Quelle: Eddie-Lab)**

Für die Transfektion wurden Deckgläser-adhärenzte Neurone verwendet. Während der 20-minütigen Inkubationszeit wurden die Deckgläser aus ihrer ursprünglichen Platte herausgenommen, in aufgewärmtes Neurobasal Medium getunkt und anschließend in eine neue Platte transferiert. Die neue Platte enthielt aufgewärmtes Neurobasal Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin und 0,25% Glutamin. In die neue Platte wurde dann die Transfektionslösung tröpfchenweise beigefügt. Nach 45-minütiger Inkubation wurden die Deckgläser aus der neuen Platte entfernt, zweimal in aufgewärmtes Neurobasal Medium getaucht und anschließend wieder in die Ursprungsplatte transferiert. Nach drei bis fünf Tagen wurden die Neurone weiterverarbeitet.

### *2.2.3.3 AAV-Verpackung*

Um eine effiziente Produktion des Adenoassoziierten Virus mit hohem Virustiter zu erreichen, wurden HEK293 Zellen niedriger Passagerate zur Verpackung eingesetzt. 24 Stunden vor der geplanten Transfektion mit Lipofectamin 2000 wurden pro Kondition 6 Millionen Zellen in einer 10cm Petrischale ausgesät. Der Trypanblau-Ausschlusstest diente erneut zur Bestimmung der Lebendzellzahl. Die HEK293 Zellen wurden mit den folgenden Konstrukten co-transfiziert: pAAV-RC (kodiert für das Kapsid), pHelper (unterstützt die Bildung der viralen Proteine) und pAAV-hSyn-1A12-HA-myc (im Folgenden NM03 genannt) bzw. pAAV-hSyn-32B3-HA-myc (im Folgenden NM04 genannt) (codieren für den monoklonalen anti-GA bzw. anti-PR Antikörper). Die Zusammensetzung der Transfektionlösung wird in Abbildung 6 dargestellt:

Komponente	Volumen für 10cm Petrischale
pAAV-RC	7,3µL
pHelper	11µL
NM03 / NM04	30µL
OptiMEM	1,5mL
kombiniert mit:	
Lipofectamin 2000	35µL
OptiMEM	1,5mL



**Abbildung 6: Transfektionslösung und AAV Helper-free-System (Quelle: Nikola Mareljic; Cell Biolabs)**

Die Abbildung zeigt die Komponente der Transfektionslösung und das Prinzip der AAV-Verpackung. Dabei werden HEK293-FT Zellen mit den drei Konstrukten ko-transfiziert. Nach 3 Tagen wird der Virus eingesammelt und kann dann zur Transduktion genutzt werden.

Während einer 20-minütigen Inkubation wurde das Zellkultur Medium aus der 10cm Petrischale entfernt und durch 5mL OptiMEM, welchem 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden, ersetzt. Anschließend wurden 3mL der

Transfektionslösung tröpfchenweise hinzugegeben. Nach 3 Tagen erfolgte eine 3-minütige Inkubation mit 2µl 0,5M Trypsin. Die Zellen wurden in einem weiteren Schritt zusammen mit dem Medium eingesammelt und bei 3000rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde in 300µL DMEM Medium resuspendiert. Im Anschluss daran erfolgte die Lyse der Zellen durch vier Frost-Tau-Zyklen. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 10.000g wurde der AAV-Überstand in ein neues Röhrchen umgefüllt und bei -80°C aufbewahrt.

### *2.2.3.4 Transduktion von Neuronen*

Für eine effektive Transduktion der Neurone wurde 1µl des AAV-Überstandes pro Loch einer 12-Lochplatte appliziert. Anschließend wurden die Neurone für 4 Tage in einem Zellkultur-Inkubator inkubiert, bevor sie zur weiteren Analyse bearbeitet wurden (siehe 2.2.4 Proteinbiochemie).

### 2.2.4 Proteinbiochemie

#### 2.2.4.1 Western Blot (Immunoblotting)

Hierbei handelt es sich um eine Methode zur Identifizierung eines bestimmten Proteins in einem Proteingemisch. Dabei werden die Proteine durch Gelelektrophorese anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. HEK293-FT Zellen, die in 12-Lochplatten 48 Stunden inkubiert wurden, wurden nach einmaligem Waschen mit PBS in 300µL RIPA Puffer für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zum RIPA Puffer wurden zusätzlich ein Protease-Phosphatase-Inhibitor Cocktail (1:100) und DNase1 (1:200) beigesetzt. Im Anschluss daran wurde das Lysat bei 1.000g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) nach Gebrauchsanleitung bestimmt. Die Proben wurden auf eine Endkonzentration von 500µg/ml gebracht. Abschließend wurden die Proben mit 4x Laemmli-Puffer im Verhältnis 1:4 versetzt und bei 95°C für 5 Minuten aufgekocht. Bis zur Gelelektrophorese wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Kortikale und hippokampale Neurone, welche für mindestens drei Tage inkubiert wurden, wurden ebenfalls nach einmaligem Waschen mit PBS in 200µL RIPA Puffer für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Puffer enthielt neben dem Protease-Phosphatase Inhibitor Cocktail (1:100) noch zusätzlich Benzonase Nuklease (1:200). Anschließend wurde mit den Proben wie oben beschrieben verfahren.

Um die Proteine nach ihrer molekularen Masse zu separieren, wurde die SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dafür wurden die Proben unter denaturierenden Bedingungen auf ein 10-20% Tris-Trizin Polyacrylamid Gel von Novex geladen. Es wurden 10-20µL Probenmaterial pro Geltasche verwendet. Initial lief die Elektrophorese in Trizin Puffer bei 80 Volt für eine Dauer von einer Stunde. Anschließend wurde für eine weitere Stunde ein elektrisches Feld mit 120 Volt angelegt. Zum Vergleich der molekularen Masse wurde der SeeBlue Protein Marker zusätzlich zu den Proben zugegeben.

Die zuvor separierten Proteine wurden im nächsten Schritt auf eine in Isopropanol aktivierte polyvinylidene difluorid (PVDF) Membran bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA für eine Stunde transferiert. Dafür wurde eine Wet-Blot-Kammer verwendet. Zum Blocken der Membran wurde eine einstündige Inkubation bei

Raumtemperatur in einem 0,2% i-Block enthaltendem TBSTx-Puffer durchgeführt. Dadurch wird einer unspezifischen Antikörperbindung entgegengewirkt. Anschließend wurde die Membran in der primär-Antikörper Lösung bei 200rpm und 4°C über Nacht inkubiert und am Folgetag in 6 zehn-minütigen Zyklen in TBSTx-Puffer gewaschen. In einem weiteren Inkubationsschritt wurde der mit HRP-gekoppelte sekundär-Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur benutzt. Dabei galt es darauf zu achten, dass für eine optimale Detektion ein Isotyp-spezifischer Zweitantikörper verwendet wurde. Nach erneuten 6 zehn-minütigen Waschzyklen wurde die Membran mit dem chemilumineszenz Substrat ECL für 2 Minuten inkubiert, um das gesuchte Protein detektieren zu können. Abschließend wurde das Ergebnis auf einem Röntgenfilm mit Hilfe eines Röntgenfilm-Prozessor festgehalten.

### 2.2.4.2 *Elektrochemilumineszenz-Immunoassay von MSD*

Mittels Immunoassay wurde die Proteinkonzentration der unlöslichen poly-GA Fraktion im Rückenmark der Mäuse (indirekte *sandwich* Methode) bestimmt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der unlöslichen poly-GA Fraktion wurde das in flüssigem Stickstoff schockgefrostete Rückenmark benutzt.

Es erfolgte zunächst die Aufbereitung des Rückenmarks. Hierfür wurde dieses in 1mL RIPA Puffer, versetzt mit Protease-Phosphatase-Inhibitor Cocktail (1:100) und Benzonase Nuklease (1:1000), mit Hilfe des Precellys Evolution Homogenizer (Bertin-Instruments) lysiert. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Proben bei 4°C und 13.000g für 10 Minuten zentrifugiert. Der komplette Lyse-Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt, um die unlöslichen poly-GA Aggregate vom löslichen poly-GA zu trennen und so eine Kontaminierung zu verhindern. Anschließend wurden die Zellpellets in 1mL Urea-RIPA (3M Urea + Protease-Inhibitor Cocktail 1:100 + Benzonase Nuklease 1:1000 in RIPA-Puffer) resuspendiert, bei 4°C für 20 Minuten inkubiert und schließlich je zweimal für 20 Sekunden bei 20% Amplitude sonifiziert. Der Vorgang der Sonifikation beschreibt die Homogenisierung der Zellen mit Hilfe von hochfrequenten Ultraschallwellen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) nach Gebrauchsanleitung bestimmt.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der unlöslichen poly-GA Fraktion wurden Streptavidin Gold multi-array 96-well Platten (Mesoscale) mit biotinyliertem anti-GA Antikörper (5F2) über Nacht bei 4°C beschichtet. Für den weiteren Vorgang wurde, wie oben beschrieben verfahren. Da es sich bei den Proben um unlösliches poly-GA handelte, diente der MSD-markierte anti-GA Antikörper (5F2) als Detektionsantikörper. Die Standardkurve wurde mit Hilfe des aufgereinigten GA-GST bekannter Konzentration erstellt. Nach Zugabe des Lese-Puffers wurden die Platten mittels MESO QuickPlex SQ 120 (Mesoscale) analysiert.

### *2.2.4.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Mittels ELISA wurde der anti-GA Titer (indirekte Methode) bestimmt. Für die anti-GA Titer Bestimmung wurden die Mausseren, welche im Punkt „2.2.1.2 Blutentnahme“ beschrieben wurden, verwendet.

Für die anti-GA Titer Bestimmung wurden Nunc MaxiSorp™ 96-well ELISA Mikroplatten mit aufgereinigtem GA-GST (12) über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit Wasch-Puffer wurden die Platten mit Block-Puffer (1% BSA, 0,05% Tween 20 in PBS) für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt, um eine unspezifische Antikörperbindung zu reduzieren. Anschließend wurden die Blutseren, nach dreimaligem Waschen, in Duplikaten pipettiert und bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Eine Verdünnungsreihe des monoklonalen anti-GA Antikörpers 1A12 bekannter Konzentration diente dabei zur Generierung der Standardkurve. Vor Zugabe des HRP-gekoppelten anti-Maus Antikörpers wurden die Platten erneut dreimal gewaschen. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Detektions-Antikörper folgte ein weiterer Waschschrift. Im nächsten Schritt wurde in einer lichtgeschützten Umgebung 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) für 5 Minuten hinzugegeben, ehe die Farbreaktion durch Zugabe von Schwefelsäure (2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) beendet wurde. Dabei erfolgte ein Farbumschlag von blau zu gelb. Die Farbintensität korrelierte dabei positiv zur Proteinkonzentration. Die Analyse der Platten erfolgte mit Hilfe des Cytation 3 imaging readers bei 450nm. Mit Hilfe der Standardreihe war es möglich Antikörperkonzentration in den Seren zu berechnen.

### 2.2.5 Bildgebung

#### 2.2.5.1 *Immunfluoreszenz Färbung für HEK293-FT Zellen und Neurone*

Für die Immunofluoreszenz-Färbung wurden HEK293-FT Zellen und hippocampale Neurone, die auf PDL beschichteten Deckgläsern wuchsen, verwendet. Alle Inkubationsschritte wurden in einer lichtgeschützten, feuchten Kammer durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mittels 2% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Die einstündige Behandlung mit einer Lösung bestehend aus 5% Normalziegenserum und 0,5% Triton X-100 in PBS diente zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Anschließend wurden die Zellen nach einmaligem Waschen in PBS für 15 Minuten mit einer 4% Paraformaldehyd + 4% Saccharose -Lösung fixiert. Nach drei 5-minütigen Waschsritten in PBS erfolgte die Inkubation mit der Primärantikörper-Lösung (Gelatine Block-Puffer + Primärantikörper) über Nacht bei 4°C. Nach erneutem Waschen wurden die Deckgläser mit der Alexa-gekoppelten Sekundärantikörper-Lösung (Gelatine Block-Puffer + Sekundärantikörper) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Zellen für 15 Minuten mit DAPI behandelt (1:5000 in PBS), um die Zellkerne anzufärben, und dann auf Objektträger aufgezogen und mit dem Vectashield Eindeckmedium bedeckt. Die Aufbewahrung der Objektträger erfolgte lichtgeschützt bei 4°C.

#### 2.2.5.2 *Immunhistochemie + Immunfluoreszenz Färbung für Paraffin-eingebettetes Gewebe*

Alle Patientenmaterialien (Kleinhirngewebe-Schnitte) wurden von der Neurobiobank München und der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt. Die Bearbeitung wurde von der Ethik-Kommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt. Es wurde stets nach den Vorgaben der Deklaration von Helsinki und des Belmont Reportes vorgegangen. Die Immunhistochemie-Färbung erfolgte an 5-7 µm dicken Kleinhirn-Schnitten aus Paraffin-eingebettetem Patienten-Gewebe.

Mit Immunhistochemie und Immunfluoreszenz -Färbungen an 5-7µm dicken Schnitten aus Paraffin-eingebettetem Maus-Rückenmark wurden die poly-GA Distribution, die Mikroglia-Aktivierung und die TDP-43 Pathologie untersucht. Das Gewebe wurde zuerst de-paraffiniert und rehydriert. Dazu wurden die Objektträger

für 20 Minuten in Xylol eingelegt und anschließend in absteigender Ethanol-Reihe ausgespült. Zur Wiederherstellung des Antigens wurden die Schnitte viermal für je 5 Minuten in Zitrat-Puffer pH 6.0 mittels Mikrowelle erhitzt. Nach einer 20-minütigen Abkühlung bei Raumtemperatur und einem kurzen Auswaschen in de-ionisiertem Wasser wurden die Schnitte zur Inhibition der endogenen Peroxidase in 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 15 Minuten inkubiert. Daraufhin folgte ein Waschvorgang in 0,05% Tween20 in PBS. Für die anschließende Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde 2% fötales Kälberserum in PBS verwendet. Als nächstes wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C in der Primärantikörper-Lösung inkubiert. Nach erneutem Waschen in 0,05% Tween20 in PBS wurde der Primärantikörper mittels DCS SuperVision 2 -Kit detektiert. Dafür wurde das Gewebe für 20 Minuten mit der Verstärker-Reagenz inkubiert, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation mit der hrp-Reagenz, bevor die DAB-Lösung appliziert wurde. Im Anschluss daran wurden die Schnitte für 30 Sekunden in Hämatoxylin transferiert und für 10 Minuten unter laufendem Wasser ausgewaschen. Anschließend wurde das Gewebe in aufsteigender Ethanol-Reihe und Xylol wieder dehydriert. Zum Schluss wurden die Objektträger mittels Eindeckmedium fixiert.

Für die Immunfluoreszenz-Färbung des Maus-Rückenmarks wurde bis zur Primärantikörper-Behandlung wie oben beschrieben verfahren. Anschließend erfolgte, nach einmaligem Waschen in 0,05% Tween20 in PBS, die lichtgeschützte Inkubation mit dem Alexa-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift, bevor das Gewebe für 15 Minuten mit DAPI behandelt wurde. Abschließend wurden die Schnitte nach zwei erneuten Waschzyklen mit Fluoromount-Aqueos Eindeckmedium fixiert.

### *2.2.5.3 Hämatoxylin & Eosin (HE) Färbung*

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist ein Routineverfahren, das als Übersichtsfärbung die Diagnostik krankhafter Veränderungen in Präparaten erleichtert. Das Hämatoxylin färbt dabei basophile Strukturen wie die DNA und den Zellkern blau. Eosin dient der Färbung azidophiler Zellbestandteile wie Proteine, Mitochondrien oder Kollagen in Rot. Das Gewebe wurde zuerst de-paraffiniert und rehydriert. Dazu wurden die Objektträger für 20 Minuten in Xylol eingelegt und anschließend in absteigender Ethanol-Reihe ausgespült. Als Nächstes erfolgte die Inkubation mit Hämatoxylin für

10 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte unter fließendem Wasser ausgewaschen und kurz in eine 70% Ethanol-Lösung transferiert. Darauf folgte eine 2-minütige Behandlung mit Eosin. Zum Schluss wurden die Schnitte nach erneutem Waschen in aufsteigender Ethanol-Reihe und Xylol dehydriert und mittels Eindeckmedium fixiert.

### *2.2.5.4 Nissl Färbung*

Bei der Nissl-Färbung handelt es sich um eine Färbetechnik zur Hervorhebung der strukturellen Eigenschaften von Nervenzellen. Sie erlaubt die Untersuchung der spezifischen Zytoarchitektur des Gehirns sowie des Rückenmarks. Das dabei verwendete Kresylviolett färbt basophile Zellstrukturen wie die DNA und RNA blauviolett. Zunächst wird das Gewebe de-paraffiniert und rehydriert. Dazu wurden die Objektträger für 20 Minuten in Xylol eingelegt und anschließend in absteigender Ethanol-Reihe ausgespült. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation der Schnitte in 70% Ethanol bei 37°C über Nacht. Nach dem Waschen in de-ionisiertem Wasser wurden die Schnitte für 20 Minuten mit Kresylviolett behandelt und anschließend wieder mit Wasser ausgewaschen. Zur Entfärbung des Überstandes wurden die Schnitte in eine 96% Ethanol-Lösung, und dann in eine 100% Ethanol-Lösung transferiert. Abschließend erfolgte nach 5-minütiger Inkubation mit Isopropyl-Alkohol die Fixierung mit einem Eindeckmedium.

### *2.2.5.5 Freischwebende Immunfluoreszenz-Färbung*

Mit Hilfe der sogenannten „freischwebenden Immunfluoreszenz-Färbung“ wurden die Gehirne der intracerebroventrikularen AAV-injizierten Mäuse untersucht. Dazu wurden die Gehirne mit einer Rasierklinge in der Sagittalebene halbiert und mit dem CryoStar NX70 Kryostat in 50µm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden anschließend in 0,5% NaN<sub>3</sub> in PBS befüllte Lochplatten transferiert und im weiteren Verlauf für die Immunfluoreszenz-Färbung verwendet.

Für das Blocken und die Permeabilisation des Gewebes wurden die Schnitte in 5% fötalem Kalbsserum + 0,5% Triton X100 in PBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Verstärkung des intrinsischen GFP-Signals wurden die Schnitte mit einem Alexa-488 gekoppelten anti-GFP Antikörper behandelt. Der Antikörper wurde in 5% fötalem Kalbsserum + 0,1% Triton X100 in PBS gelöst. Es erfolgte die 3-stündige Inkubation des Gewebes mit der Antikörperlösung bei Raumtemperatur. Zum Waschen wurde 0,1% Triton X100 in PBS verwendet. Auf den ersten Waschgang folgte eine 10-minütige Inkubation mit DAPI. Nach zwei weiteren Waschschrinen wurden die Schnitte lichtgeschützt auf Objektträgern aufgezogen und mit dem Vectashield Eindeckmedium bedeckt. Die Aufbewahrung der Schnitte erfolgte lichtgeschützt bei 4°C.

### 2.2.6 Aufnahme und Bearbeitung von Mikroskopie-Bildern

Bilder von Immunhistochemie-, Nissl- und HE- gefärbtem Gewebe wurden mit dem Leica DMI8 Lichtmikroskop und der Leica Las X Software aufgenommen. Es wurden plan-apochromate 4x, 10x und 40x Objektive verwendet. Für eine aussagekräftige Analyse wurden Bilder von Proben eines Experiments stets mit den gleichen System-Einstellungen aufgenommen.

Die Aufnahmen der Immunfluoreszenz gefärbten Schnitte wurden mit dem inversen Konfokalmikroskop LSM710 bzw. LSM800 von Carl Zeiss und der ZEN 2010 bzw. Blue Software aufgenommen. Dabei wurden Anregungswellenlängen von 405, 488 und 633nm verwendet. Es wurde das plan-apochromate 40x Öl-Objektiv bzw. das EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Öl DIC M27 Objektiv verwendet. Für die Experimente wurde die Lochblende auf 1 Airy Unit für die längste Wellenlänge gesetzt und für die anderen Wellenlängen dementsprechend angepasst. Die Bildmatrix betrug 1,024 x 1,024 Pixel, die Skalierung betrug 0,2 x 0,2  $\mu\text{m}$  und die Farbtiefe betrug 8 Bit. Die Bilder wurden in Z-Stapeln mit einem Schichtabstand von 0,4  $\mu\text{m}$  aufgenommen. Für eine aussagekräftige Analyse wurden Bilder von Proben eines Experiments stets mit den gleichen System-Einstellungen aufgenommen.

Zur Bildbearbeitung wurde die ImageJ Software verwendet. Zur Auszählung der poly-GA Aggregate und der Mikroglia-Analyse wurden Rückenmarksschnitte mit einer Schichtdicke von 1mm untersucht. Mit Hilfe der Software-Toolbox wurden Aggregat- und Zell- Zählungen durchgeführt und Bilder unterschiedlicher Kanäle zusammengelegt (276).

### 2.2.7 Statistische Analysen

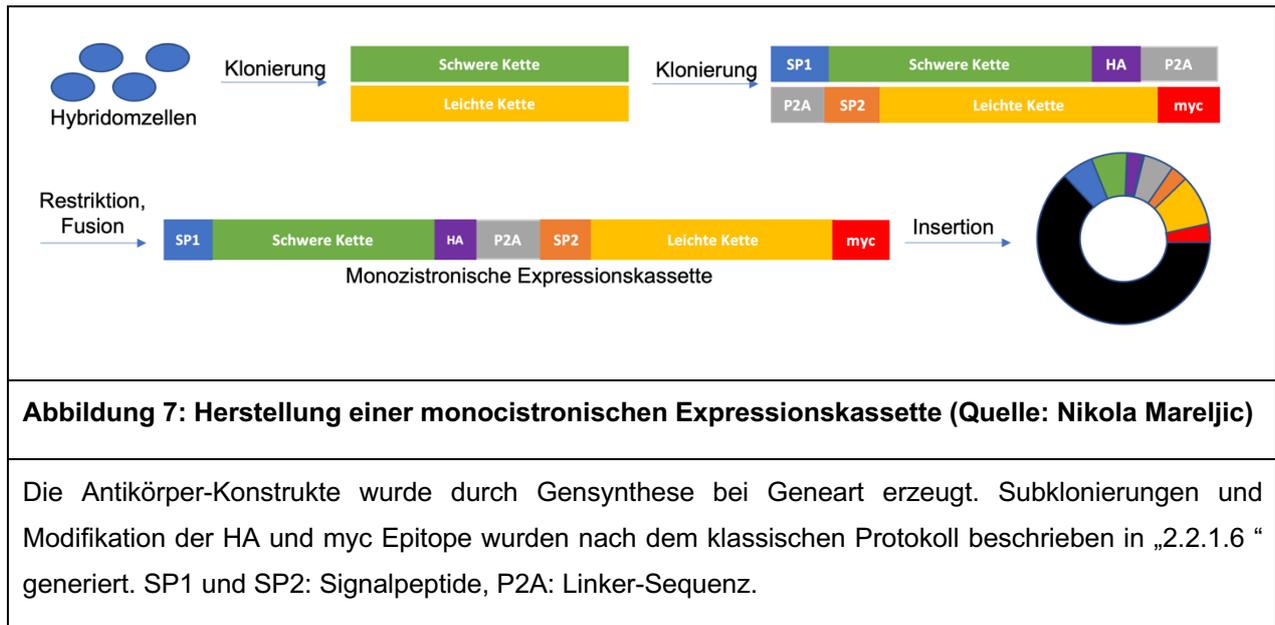
Für eine unvoreingenommene Analyse der Daten, erfolgte die Auswertung der Datensätze verblindet. Hierfür wurde jeder Maus bzw. jeder Probe ein Nummerncode zugeteilt, sodass die Zugehörigkeit zur Kontroll- bzw. Versuchsgruppe daraus nicht hervorgehen konnte. Statistische Analysen wurden mit Hilfe von R und RStudio (R Core Team, 2018) und Prism7 (GraphPad Software, Inc.) durchgeführt. Abhängig von den experimentellen Rahmenbedingungen und der Werteverteilung der einzelnen Untersuchungen wurde eine passende Testmethodik angewendet. Bei der aktiven Impfung wurden sechs Gruppen untereinander verglichen. Aus diesem Grund wurde der one-way ANOVA mit dem Tukey-Test ausgewählt. Zur Überprüfung, ob die Daten Normalverteilt sind, wurde der Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Die Varianzhomogenität wurde mittels F-Test und Brown-Forsythe-Test überprüft. Für nicht-normalverteilte Daten wurde der Kruskal-Wallis-Test mit der Benjamini-Hochberg Methode verwendet. Zum Gruppenvergleich wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test genutzt. Die Ergebnisse wurden stets als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Der p-Wert zeigt an mit welcher Wahrscheinlichkeit ein signifikanter Unterschied zwischen zwei Ereignissen besteht. Dabei wurde ein p-Wert von 0,05 als statistisch signifikant definiert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klonierung und AAV-Verpackung

Bei einer passiven Immunisierung mittels s.c. oder i.v. Applikation eines gereinigten monoklonalen Antikörpers wird die Injektion meist wöchentlich wiederholt, um den Titer hochzuhalten. Für die Therapie von ZNS-Erkrankungen ist die geringe Penetration durch die Bluthirnschranke limitierend. Hier soll durch rekombinante Expression mit Antikörper-kodierendem Virus schon nach einmaliger Injektion eine konstitutive Expression des Antikörpers direkt im ZNS erreicht werden. Aus diesem Grund sollten Anti-DPR Antikörper in einen viralen Vektor kloniert und abschließend AAV verpackt werden. Für die passive Vakzinierung wurde der monoklonale Maus-anti-GA Antikörper 1A12 (im Folgenden nur 1A12 genannt (277)) und der monoklonale Maus-anti-PR Antikörpers 32B3 (im Folgenden nur 32B3 genannt (135)) als Kontrolle verwendet. Der anti-PR Antikörper diene dabei als Negativkontrolle, um zu zeigen, dass die Antikörper ihre Antigene spezifisch binden und keine Affinität gegenüber anderen DPR Proteinen aufweisen. Da der direkte Nachweis der rekombinanten Maus-Antikörper in Mausgewebe schwierig ist, wurden sie zur leichteren Detektion mit HA und myc Epitopen gekoppelt. Die HA und myc Epitope interagieren aufgrund ihrer kurzen Aminosäuresequenz nicht mit anderen Proteinen und ermöglichen so den genauen Nachweis des Zielproteins mit spezifischen Antikörpern (278, 279). Die ursprüngliche Generierung der Antikörper erfolgte mit Hilfe der Hybridom-Technik (273, 280). Dabei wurden antikörperproduzierende B-Zellen und Myelomzellen fusioniert. Die so entstandenen Hybridomzellen können in Kultur rasch expandiert werden und exprimieren den monoklonalen Antikörper weiterhin. Nach Isolierung der mRNA und Herstellung einer cDNA werden die DNA-Fragmente, die für die leichte und schwere Kette kodieren, mit einer Signalpeptid-Sequenz (SP1 bzw. SP2), HA- bzw. myc-Sequenz und einer Linker-Sequenz (P2A) gekoppelt. Über P2A werden die Fragmente miteinander verbunden. Zudem ermöglicht die Sequenz eine getrennte Expression von schwerer und leichter Kette durch Abbruch und Neustart der Translation. Die Signalpeptide stellen sicher, dass die Proteine ins Periplasma gelangen. Durch Sequenzierung und Klonierung der leichten und schweren Kette aus Hybridomzellen war es möglich, eine monocistronische Expressionskassette, die für den jeweiligen Antikörper kodiert, herzustellen (281). Die synthetischen Gene wurden abschließend in die

gewünschten Expressions-Plasmide inseriert. Die Klonierung in den Säugetier-Expressionsvektor (pcDNA3.1/zeo) diente als Zusatzkontrolle. Der so generierte anti-GA Vektor wird im Folgenden NM01, der anti-PR Vektor NM02 genannt. Entscheidend war die Klonierung in den viralen Transfer-Vektor (pAAV-hSyn), der die Verpackung in AAV-Kapside ermöglicht. Der so generierte anti-GA Vektor wird im Folgenden NM03, der anti-PR Vektor NM04 genannt.

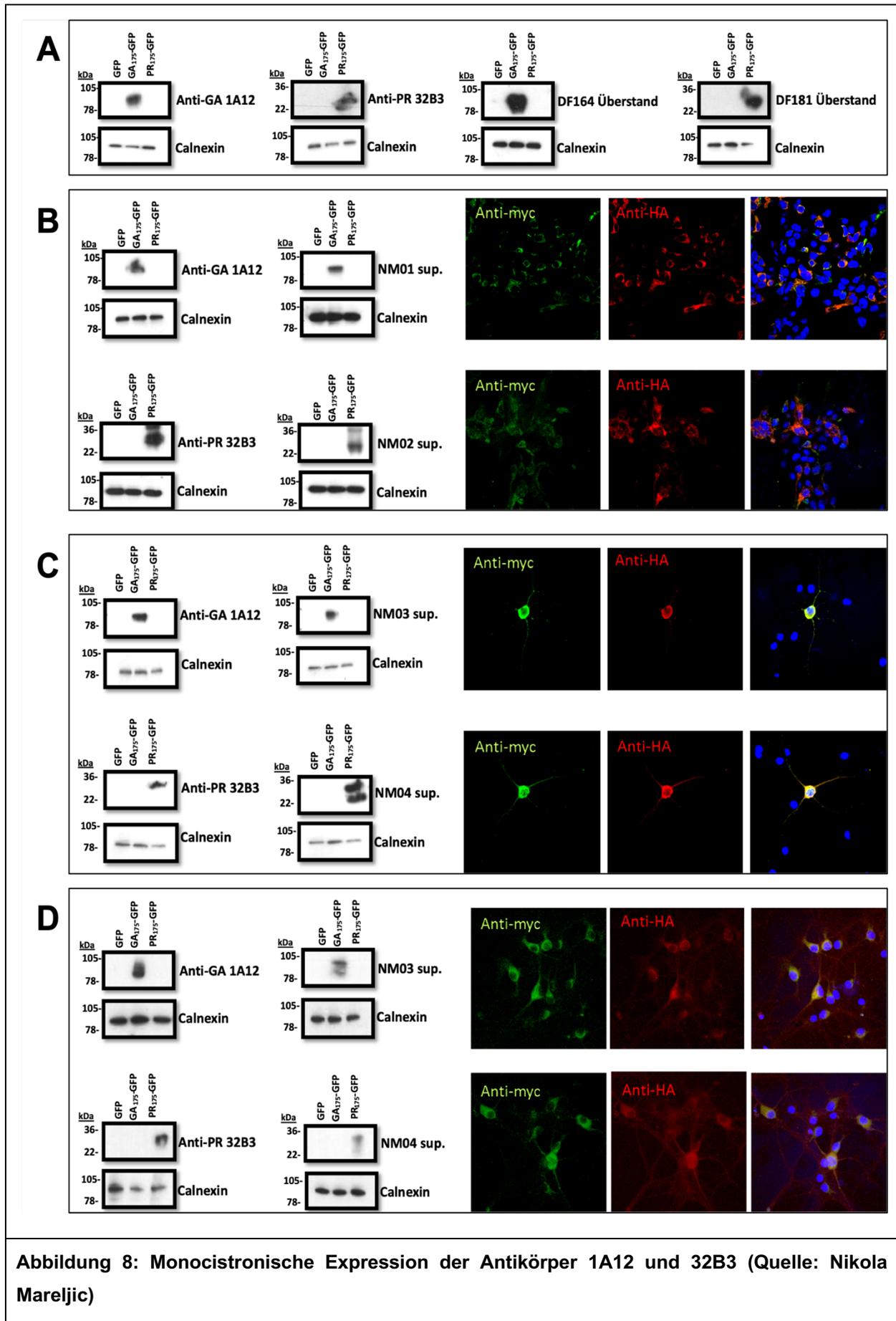


### 3.1.1 AAV Transduktion erlaubt monocistronische Expression der Anti-DPR Antikörper mit Epitop Tags

Um die Sekretion funktioneller Antikörper in transfizierten bzw. AAV-transduzierten HEK293FT-Zellen und primären Ratten-Neuronen nachzuweisen, wurden die Überstände der Zellkulturmedien im Western Blot zur Immundetektion von DPR-Extrakten ((GA)<sub>175</sub>-GFP bzw. (PR)<sub>175</sub>-GFP transfizierte HEK293-FT Zellen) verwendet und mittels Immunfluoreszenz die Antikörper-Expression im sekretorischen Weg überprüft.

Im ersten Schritt wurde die Spezifität der beiden Antikörper, die die Grundlage für das weitere Vorgehen bildeten, validiert. Hierfür wurden HEK293FT-Zellen mit den Expressionsvektoren für anti-GA (DF164) und anti-PR (DF181) transfiziert (Abbildung 8A). Anschließend erfolgte, nach Koppelung mit HA und myc, die Insertion in einen Säugetier-Expressionsvektor mit CMV-Promoter (für anti-GA NM01 und anti-PR NM02 genannt) und in einen viralen Transfer-Vektor mit Synapsin-Promoter (für anti-GA NM03 und anti-PR NM04 genannt). Die Transfektion von HEK293FT-Zellen mit NM01 und NM02 diente als Zusatzkontrolle (Abbildung 8B). Entscheidend war die Transfektion von Neuronen mit den Vektoren NM03 und NM04, da sie im nächsten Schritt für die Verpackung in AAV-Kapside verwendet wurden (Abbildung 8C). Abschließend wurden Neurone mit den beiden AAV-verpackten Konstrukten NM03 und NM04 transduziert. Der Erfolg wurde mittels Western-Blot und Immunfluoreszenz überprüft (Abbildung 8D).

Die rekombinant exprimierten Antikörper zeigen dabei stets die gleiche Spezifität für DPR Proteine wie die Hybridom-Überstände der Ursprungsklone. Immunofluoreszenz diente zum Nachweis der Antikörper-Expression im sekretorischen Weg. Die leichte Kette wurde mit einem myc-Tag (grüner Kanal), die schwere Kette mit einem HA-Tag (roter Kanal) markiert und nachgewiesen. Somit konnten wir die oben beschriebenen klonierten Antikörper validieren (Abbildung 8A) und die Funktionalität der HA und myc gekoppelten Konstrukte nachweisen (Abbildung 8B, C). Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die komplette cDNA des Antikörpers in AAV verpackt werden konnte (Abbildung 8D). Somit kann der Virus für eine Expression des Antikörpers im ZNS zur intracerebroventrikulären Injektion verwendet werden.



**A** Western-Blot zur Validierung der Antikörperspezifität. HEK293FT-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für anti-GA (DF164) und anti-PR (DF181) transfiziert. 1A12 und 32B3 Hybridomüberstand diente als Kontrolle.

**B** Western-Blot zur Validierung der Antikörperspezifität. HEK293FT-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für anti-GA (NM01) und anti-PR (NM02) mit Epitop Tags transfiziert. 1A12 und 32B3 dienten als Kontrolle.

Immunfluoreszenz zum Nachweis der Antikörper-Expression im sekretorischen Weg. HA (rot), myc (grün), DAPI (blau) Die einzelnen Kanäle (separat) und die Kombination sind gezeigt.

**C** Western-Blot zur Validierung der Antikörperspezifität. Primäre Ratten-Neuronen wurden mit viralen Expressionsvektoren für anti-GA (NM03) und anti-PR (NM04) mit Epitop Tags transfiziert. 1A12 und 32B3 dienten als Kontrolle.

Immunfluoreszenz zum Nachweis der Antikörper-Expression im sekretorischen Weg. HA (rot), myc (grün), DAPI (blau) Die einzelnen Kanäle (separat) und die Kombination sind gezeigt.

**D** Western-Blot zur Validierung der Antikörperspezifität. Primäre Ratten-Neuronen wurden mit AAV-verpacktem anti-GA (NM03) und anti-PR (NM04) mit Epitop Tags transduziert. 1A12 und 32B3 dienten als Kontrolle.

Immunfluoreszenz zum Nachweis der Antikörper-Expression im sekretorischen Weg. HA (rot), myc (grün), DAPI (blau) Die einzelnen Kanäle (separat) und die Kombination sind gezeigt.

### 3.2 Etablierung der intracerebroventrikulären Injektion von AAV

Aufgrund des neuronalen Promoters wäre die Expression des Antikörpers nach systemischer Applikation gering, da nur ein kleiner Teil des AAV ins Gehirn gelangen würde. DPR-Aggregate kommen jedoch fast ausschließlich im ZNS vor, sodass die gezielte Expression des Antikörpers im ZNS am effektivsten wäre (2, 11). Die größte Herausforderung der systemischen Injektion stellt die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke dar. Dabei handelt es sich um einen hochselektiven Filter bestehend aus Endothelzellen + *Tight junctions* + Astrozyten + Perizyten, der den Stoffaustausch zwischen ZNS und Blut reguliert und so eine Schutzbarriere gegen äußere Einflüsse darstellt (282). Eine Möglichkeit der Umgehung bietet die intracerebroventrikuläre Applikation. Hierbei wird der Virus direkt in das Ventrikelsystem injiziert (274, 283). Die Entwicklung des Ependyms, welches den Liquorraum auskleidet, ist bei neugeborenen Mäusen noch nicht ausgereift, sodass hier eine bessere Permeabilität des Parenchyms besteht. Aus diesem Grund sollte die Injektion einen Tag nach Geburt in Neonaten erfolgen. Im ersten Schritt wurde hierzu eine Trypanblau-Injektion durchgeführt, um die Injektionstechnik zu üben. Im darauffolgenden Schritt wurden drei AAV-Serotypen (AAV1, AAV8, AAV9) injiziert, um zu untersuchen welcher Subtyp die beste Expression im ZNS erlaubt.

#### 3.2.1 ICV-Injektion mit AAV9 führt zu effizienter Expression

Die Trypanblau-Injektion wurde zur Ermittlung der passenden Injektions-Koordinaten vor AAV-Injektion durchgeführt. Die Analyse der Farbstoffverteilung im Gehirn erlaubt es, Rückschlüsse auf die korrekte Durchführung der Injektionstechnik zu ziehen. Für die intracerebroventrikuläre Injektion in Neonaten wurde das Protokoll aus Kim et al. 2014 verwendet (274). Es wurden drei Injektionsparameter gewählt, um die bestmögliche Distribution des Farbstoffs zu untersuchen.

Wie in Abbildung 9A zu sehen, zeigte sich eine homogene und breite Verteilung des Farbstoffs in beiden Gehirnen unter Verwendung der Koordinaten X=0,8mm, Y=1,5mm, Z=1,7mm->1,5mm (Abbildung 9A1). Die Injektion bei X=0,8mm, Y=2,0mm, Z=1,5mm->1,3mm lieferte eine ungleichmäßige Distribution des Trypanblaus. Hierbei blieb im ersten Tier das Cerebellum komplett ausgespart (Abbildung 9A2). Auch mit den Injektionskoordinaten X=1,0mm, Y=1,2mm,

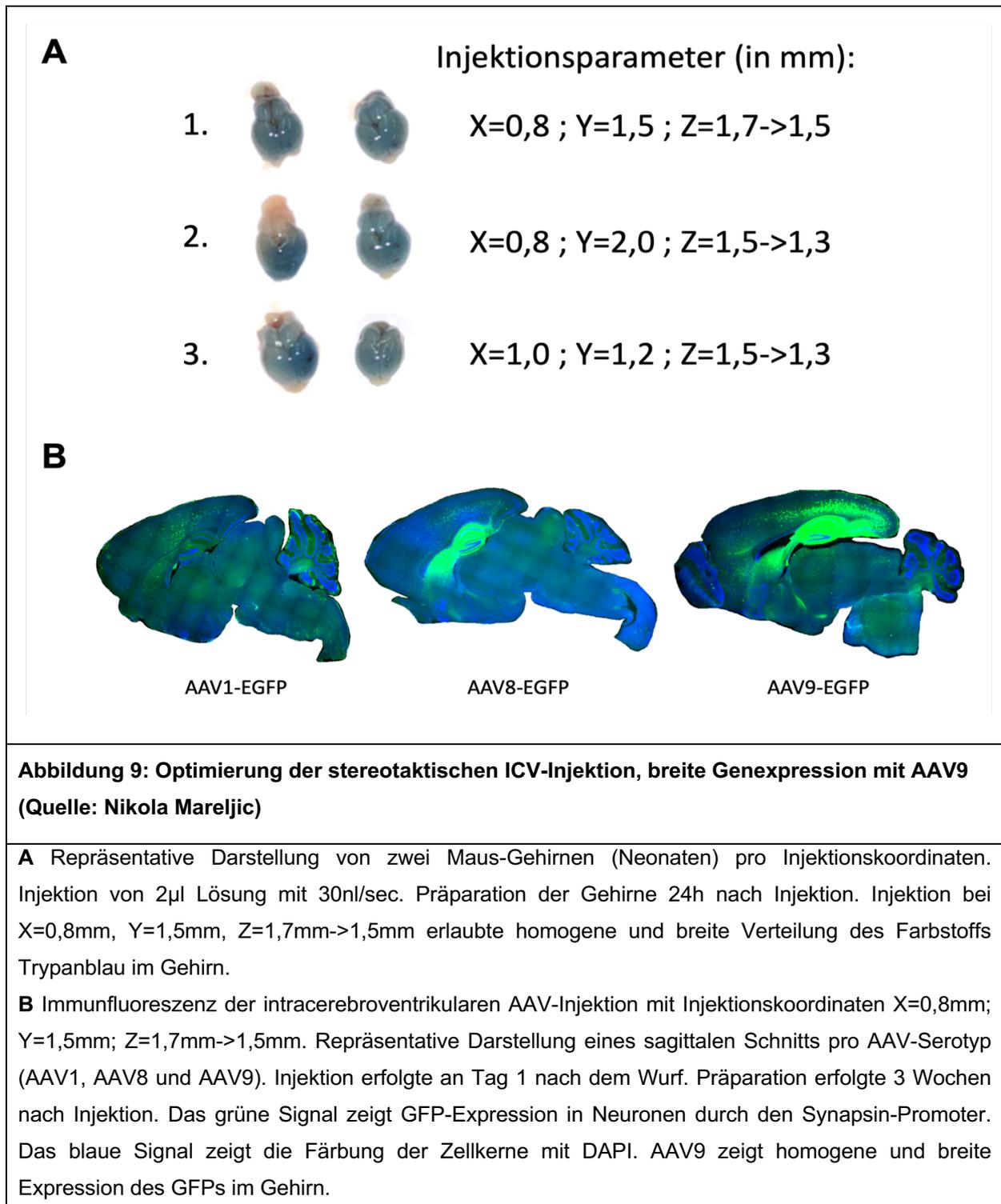
Z=1,5mm->1,3mm wurde keine homogene Verteilung des Farbstoffs erzielt. Die linke Hemisphäre des ersten Tieres wies eine deutlichere Färbung auf im Vergleich zur rechten Seite (Abbildung 9A3). Dies lässt darauf schließen, dass die Applikation über die Seitenventrikel mit den Koordinaten X=0,8mm; Y=1,5mm; Z=1,7mm->1,5mm am effektivsten ist. Folglich wurden diese Koordinaten für die AAV-Injektionen verwendet.

Für die intracerebroventrikuläre AAV-Injektion wurden drei vielversprechende Subtypen AAV1-EGFP, AAV8-EGFP und AAV9-EGFP getestet (284). Die Zielsequenz wird dabei stets von AAV2-ITRs flankiert, da sie für die genomische Integration sehr sicher sind. Aufgrund von Unterschieden in der Gewebe-Affinität werden unterschiedliche Kapside (in diesem Fall AAV 1/8/9) verglichen. Dabei kodierte das Zielgen für GFP, ein Protein, das bei Anregung durch blaues oder ultraviolettes Licht grün fluoresziert (285, 286). Mittels Immunfluoreszenz konnte dann die Distribution des Virus durch Expression des GFP in transduzierten Neuronen in sagittalen Schnitten dargestellt werden (Abbildung 9B).

Das AAV1-Kapsid führte zu GFP-Expression vor allem periventrikulär, nahe des Hippokampus, im Cerebellum und Hirnstamm. Auffallend war dabei jedoch, dass das Signal vereinzelt in Zellen detektiert wurde, was für eine geringe Transduktionsrate der Neuronen spricht. Die gleichmäßige Verteilung deutete auf eine homogene Distribution des Virus im Liquorraum hin. Verglichen dazu lieferte die AAV8-Injektion hauptsächlich parahippokampal eine ausgeprägte GFP-Expression. Aufgrund der hohen Dichte an transduzierten Neuronen in diesem Bereich war die Farbintensität deutlich gesteigert. Sowohl periventrikulär als auch im Cerebellum und Hirnstamm zeugte die niedrige Signalstärke von einer geringen GFP-Expression in diesen Bereichen. Nach Injektion von AAV9 wurde parahippokampal und periventrikulär ein sehr intensives Signal beobachtet. Zudem kam es auch im Cerebellum und Hirnstamm zu einer deutlichen GFP-Expression. Die homogene und breite Verteilung belegt eine gute Gewebepenetration und Transduktionsrate mit dem AAV9-Kapsid, wie schon in anderen Publikationen beschrieben (284, 287).

Vergleicht man die einzelnen sagittalen Schnitte untereinander so zeigt sich, dass das Virus in allen drei Fällen über das Ventrikelsystem in den Liquorraum verteilt wurde. Jedoch unterscheidet sich die Transduktionsrate der drei Subtypen deutlich. So lieferte AAV9 die beste Expression. Mit AAV8 fiel die Expression etwas

schwächer aus, wohingegen die ICV-Injektion von AAV1 die geringste Signalstärke aufwies. In Zusammenschau der Ergebnisse ist für die intracerebroventrikuläre Injektion eine Verpackung der beiden Antikörper mit dem AAV9 -Subtyp in Betracht zu ziehen. Diese Arbeiten werden von einem anderen Doktoranden fortgesetzt.



### 3.3 Aktive Immunisierung gegen poly-GA reduziert Symptome im Mausmodell

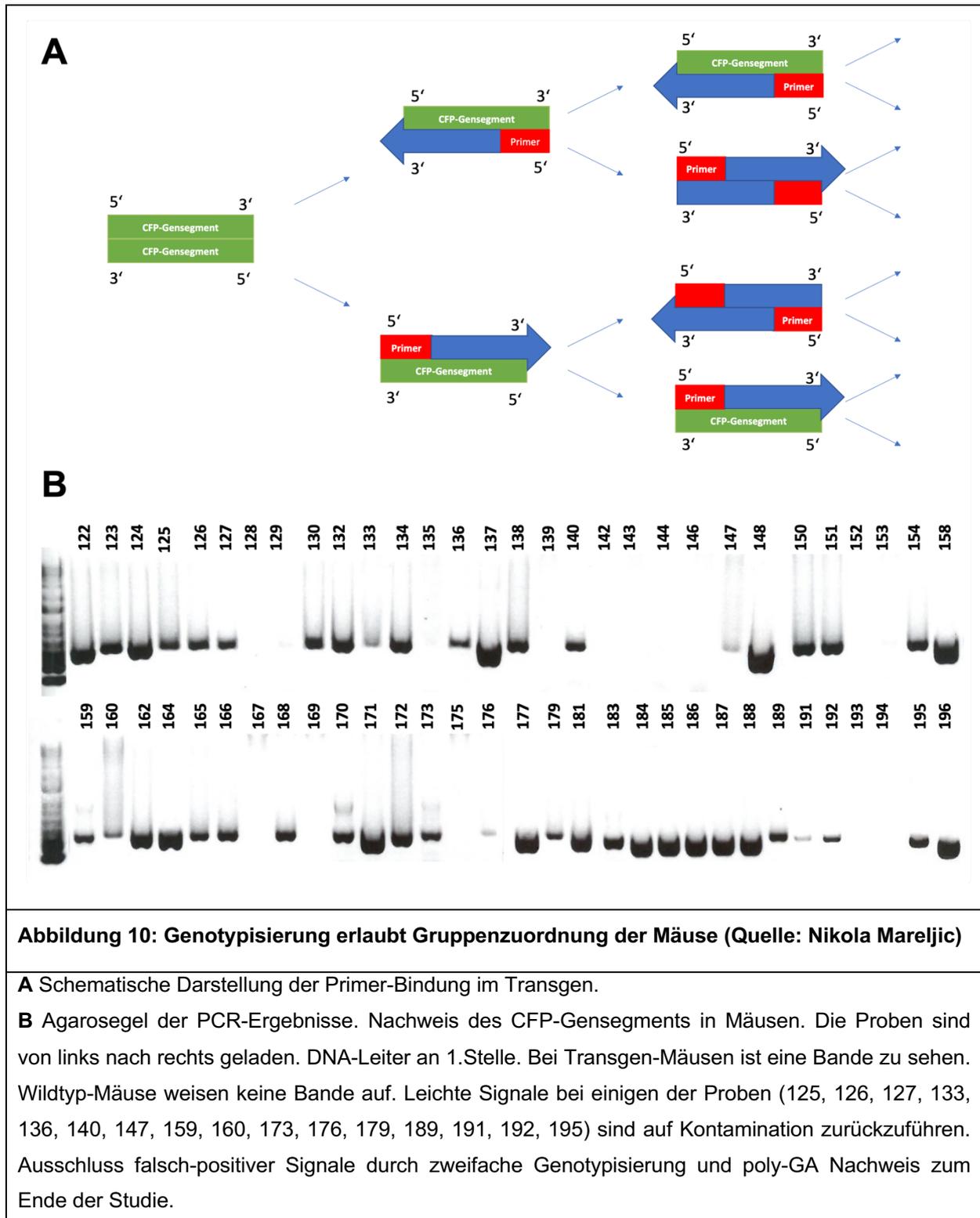
Umfassende Analysen haben ergeben, dass bei der C9orf72 Mutation Strang- und Gegenstrang-Transkripte in DiPeptid-Repeat Proteine translatiert werden (8, 11, 12). Neben poly-PR und poly-GR ist vor allem poly-GA sehr toxisch für die Zellen (13, 14). Fast alle TDP-43 negativen Einschlüsse bei C9orf72 ALS/FTD enthalten poly-GA. In vitro Experimente zeigen eine deutliche Toxizität durch Sequestrierung des Proteasoms und anderer Proteine. Insbesondere begünstigt poly-GA Expression die Mislokalisierung von TDP-43 ins Zytoplasma (15, 17, 18, 20, 148). Zudem verstärkt poly-GA durch Zell-zu-Zell Übertragung die RNA- und DPR-Toxizität (23).

In einem C9orf72 ALS Mausmodell mit einem (GA)<sub>149</sub>-CFP Transgen konnten motorische Defizite, Mikroglia-Aktivierung und Astrozytose nachgewiesen werden (19). Da mittels anti-GA Antikörpern die Aggregat-Bildung und interzelluläre Transmission poly-GA exprimierender Zellen reduziert werden konnte (23), wurde mit einer aktiven Immunisierung gegen das poly-GA in diesem Mausmodell untersucht, ob eine therapeutisch wirksame Antikörperantwort induziert werden kann. Der Erfolg der Impfung wurde anhand von Antikörpertitern, neuropathologischer Veränderungen und motorischer Funktionen quantifiziert.

### 3.3.1 Genotypisierung

Um transgene Mäuse (mit CFP-Gensegment) von Wildtyp-Mäusen (ohne CFP-Gensegment) zu unterscheiden, musste zunächst überprüft werden, welche der Mäuse das (GA)<sub>149</sub>-CFP Transgen enthielten. Hierfür wurden synthetisch hergestellte Primer zur Amplifizierung der CFP-Gensequenz verwendet (5'-tccaggagcgtaccatcttc-3' und 5'-gtgctcaggtagtggtgtc-3') (siehe 2.2.1.7 Genotypisierung).

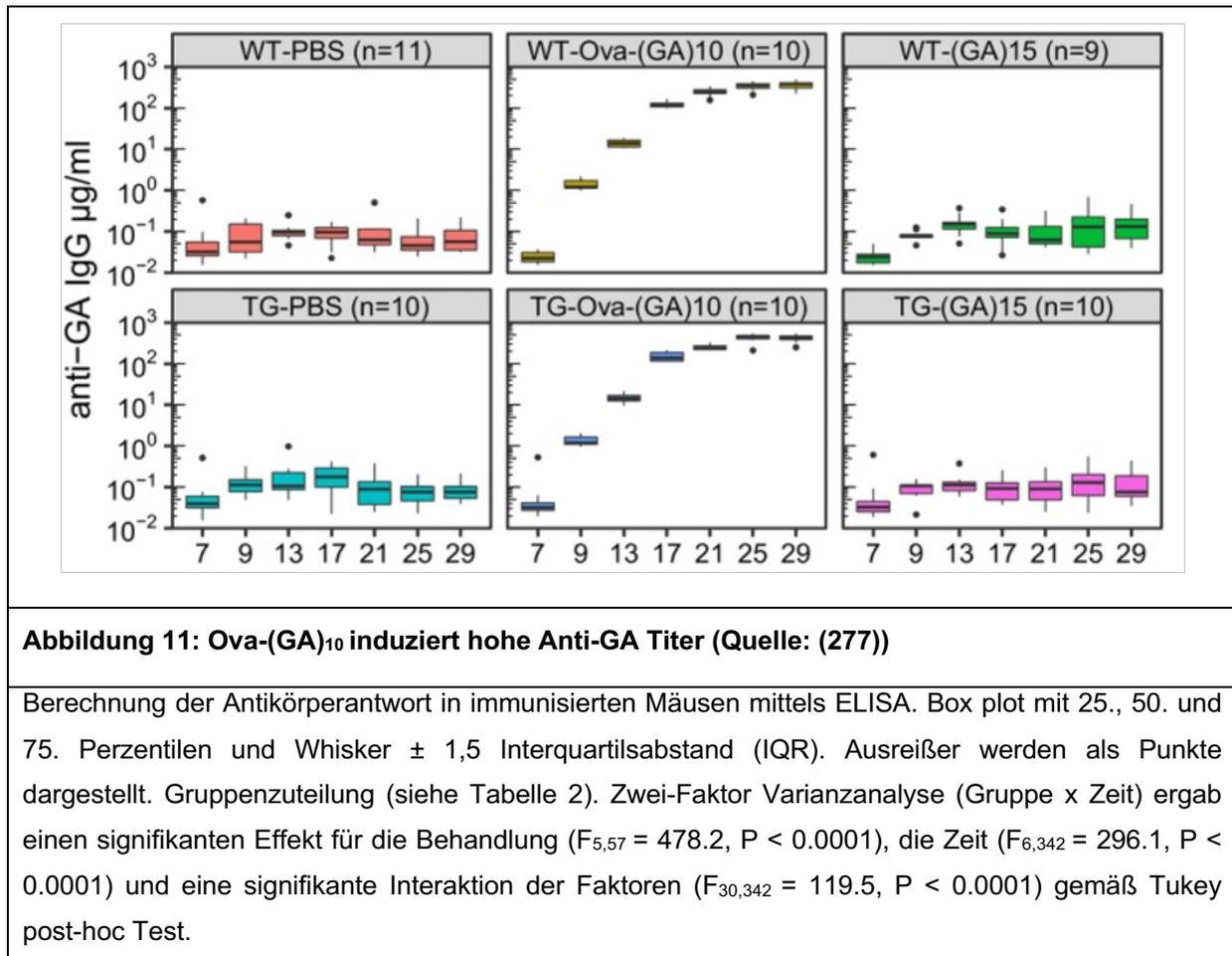
Transgen-Mäuse zeigen eine deutliche Amplifikation der spezifischen DNA-Sequenz, während Wildtyp-Mäuse keine Amplifikation zeigen. Die Mäuse wurden zur Verifizierung der Ergebnisse zweimal genotypisiert. Die erste Genotypisierung erfolgte 4 Wochen nach dem Wurf aus Biopsie-Material der Ohrmarkierungen. Die zweite Genotypisierung erfolgte zum Endpunkt aus Ohrgewebe nach Euthanasie. Von 61 genotypisierten Mäusen konnten 30 der Transgen-Gruppe und 31 der Wildtyp-Gruppe zugewiesen werden (siehe Tabelle 2). Nach Zuteilung in die jeweiligen Kohorten wurde mit der aktiven Impfung begonnen. Der Genotyp wurde am Ende der Studie durch poly-GA Nachweis bestätigt.



### 3.3.2 Immunisierung mit (Ova-GA<sub>10</sub>) aber nicht (GA)<sub>15</sub> induziert hohe Anti-GA Titer

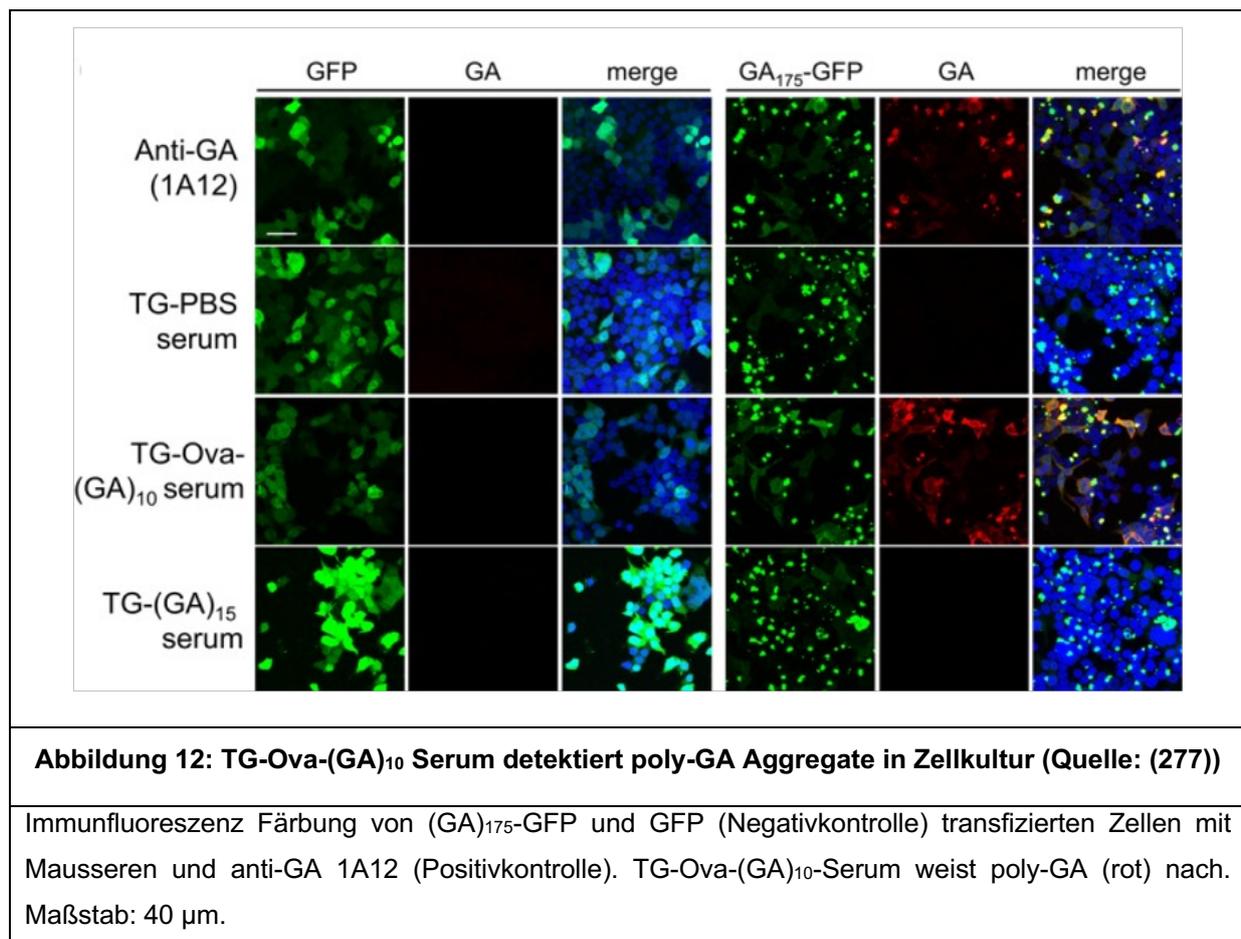
Da poly-GA nur schwach immunogen ist, wurde es zur Verstärkung der Immunantwort mit einem Trägermolekül gekoppelt. Dazu wurden Wildtyp-Mäuse und (GA)<sub>149</sub>-CFP Mäuse mit Ovalbumin gekoppeltem poly-GA (Ova-(GA)<sub>10</sub>) immunisiert. Eine weitere Gruppe wurde mit synthetischem stark aggregierendem (GA)<sub>15</sub> immunisiert. Damit sollte überprüft werden, ob poly-GA Aggregate aufgrund ihrer mit Viruspartikeln vergleichbaren Größe auch ohne Trägermolekül immunogen genug sind. Um die Effektivität der Immunantwort zu untersuchen, wurde der anti-GA Titer im Mausserum mittels ELISA quantifiziert. Als Antigen wurde GST-(GA)<sub>15</sub> verwendet. Die Standardkurve wurde mit Hilfe eines monoklonalen anti-GA Antikörpers erstellt.

Zu Beginn der Impfung in Woche 7 (Abbildung 3) wiesen alle Gruppen einen sehr niedrigen Ausgangswert zwischen 0,01 – 0,1 µg/ml auf (Abbildung 11). Diese primäre Reaktion von naivem Mausserum mit poly-GA wurde als Nullpunkt definiert. Der Antikörper-Titer in beiden PBS-immunisierten Kontrollgruppen blieb unverändert beim Ausgangswert. Auch in beiden (GA)<sub>15</sub>-Gruppen zeigte sich ein mit den Negativkontrollen übereinstimmendes Ergebnis (Abbildung 11). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, was belegt, dass (GA)<sub>15</sub> allein nicht immunogen ist. Im Gegensatz dazu stieg die anti-GA Konzentration in den Ova-(GA)<sub>10</sub>-Gruppen mit jeder Auffrischimpfung kontinuierlich an und erreichte so eine 10.000-fache Steigerung im Vergleich zum Ausgangswert (Abbildung 11). Diese Ergebnisse unterschieden sich deutlich von den PBS- und (GA)<sub>15</sub>-Gruppen. Lediglich Ovalbumin gekoppeltes poly-GA war in der Lage eine effektive, endogene Immunantwort zu generieren. Für die weiteren Versuche wurden nur Seren der transgenen Tiere verwendet, da Wildtyp- und Transgen- Mäuse keine signifikant unterschiedlichen Titer innerhalb der einzelnen Impfgruppen zeigten.



Im nächsten Schritt wurde die Antikörperspezifität der Antisera gegen poly-GA Aggregate untersucht. Hierzu wurden (GA)<sub>175</sub>-GFP exprimierende HEK293FT-Zellen mit Mausseren per Immunfluoreszenz gefärbt. Als Positivkontrolle wurde der monoklonale anti-GA Antikörper 1A12 verwendet. Zum Ausschluss unspezifischer Antikörperbindung dienten GFP exprimierende HEK293FT-Zellen als Negativkontrolle.

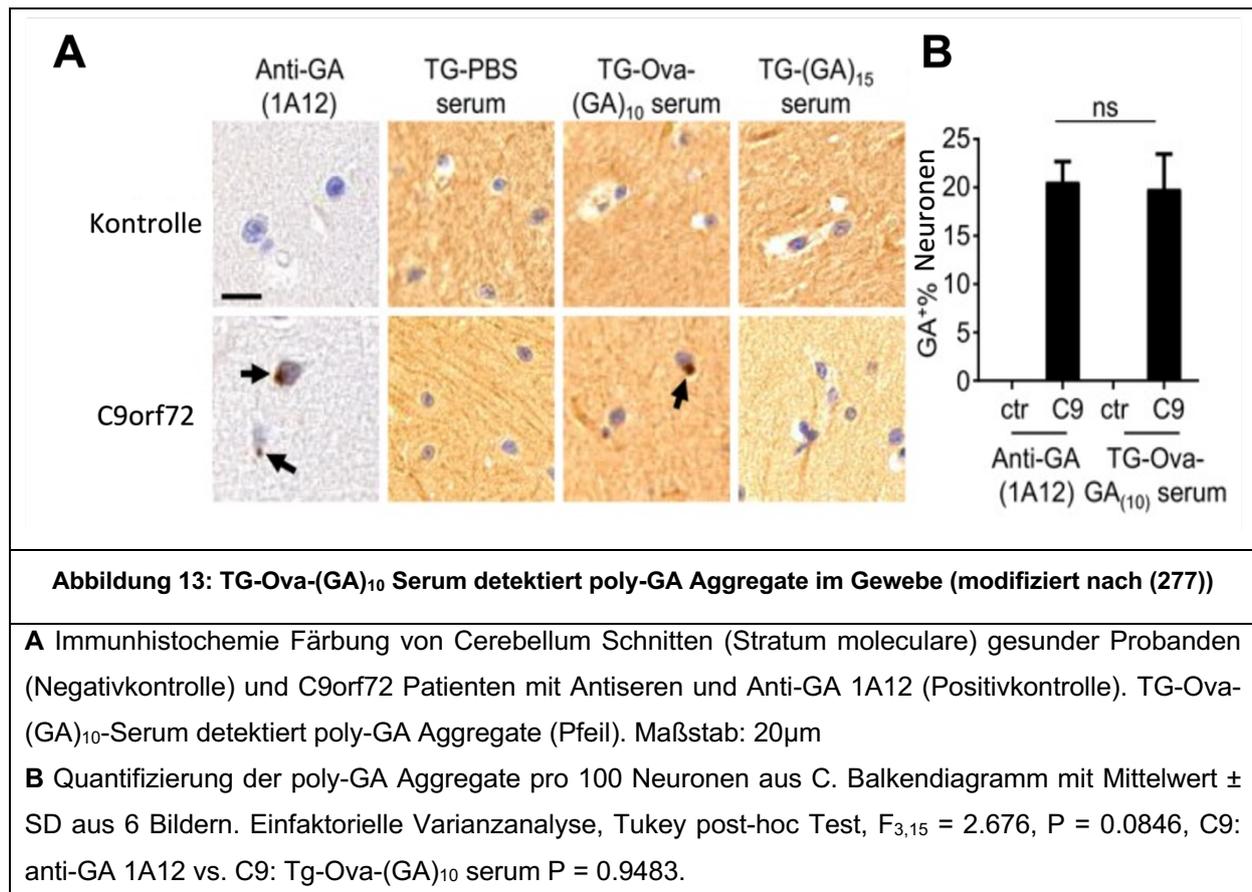
In der Immunfluoreszenz wurden poly-GA Aggregate nur mit Tg-Ova-(GA)<sub>10</sub>-Serum nachgewiesen. Das Bild war vergleichbar mit der Positivkontrolle (Abbildung 12, roter Kanal) während die Seren aus PBS und (GA)<sub>15</sub> immunisierten Tieren kein spezifisches Signal zeigten. Daraus lässt sich ableiten, dass Tg-Ova-(GA)<sub>10</sub>-Serum auch *in vitro* poly-GA Aggregate detektieren kann und somit funktionelle anti-GA Antikörper enthält. Dabei wurden sowohl das in Zellen diffus verteilte, lösliche poly-GA, als auch die kompakten, punktförmigen poly-GA Aggregate detektiert. Tg-PBS-Serum und Tg-(GA)<sub>15</sub>-Serum konnten poly-GA nicht detektieren, was die fehlende Antikörperproduktion bestätigt (Abbildung 11).



Zusätzlich wurde die Spezifität der endogen produzierten Antikörper gegen poly-GA Aggregate auch mittels Immunhistochemie dargestellt. Es wurden 5-7µm dicke Cerebellum-Schnitte von C9orf72 Mutationsträgern verwendet. Cerebellum-Schnitte gesunder Probanden dienten dabei als Negativkontrolle. Die Mausseren dienten als Primär-Antikörper-Lösung und der 1A12 Antikörper als Positivkontrolle.

Vergleicht man in der immunhistochemischen Färbung die 1A12 Positivkontrolle mit den Mausseren zeigte sich bei den Färbungen mit Mausserum ein Hintergrundrauschen aufgrund unspezifischer Interaktionen mit dem Gewebe. Unter Verwendung des Tg-Ova-(GA)<sub>10</sub>-Serums wurden in C9orf72-Proben poly-GA Aggregate in Form von punktförmigen Einschlüssen im Soma detektiert. Diese hoben sich deutlich vom Hintergrundrauschen ab und waren mit der Positivkontrolle vergleichbar. Die Seren aus den Tg-PBS- und Tg-(GA)<sub>15</sub>-Gruppen detektieren keine zellkernnahen punktförmigen Einschlüsse in C9orf72-Proben (Abbildung 13A). Ein Vergleich der 1A12- und Tg-Ova-(GA)<sub>10</sub>-Gruppe wies keinen signifikanten

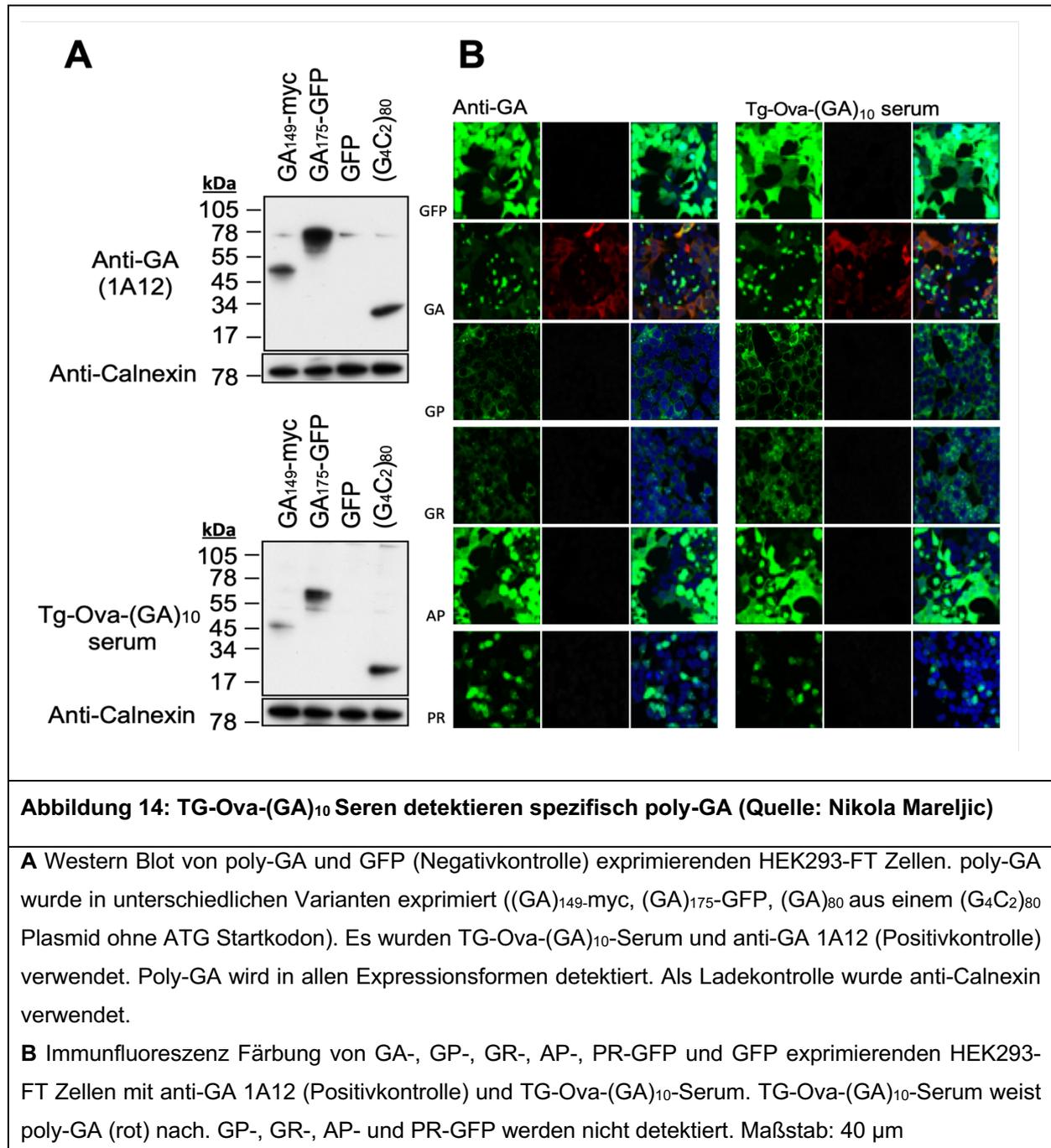
Unterschied in der Anzahl detektierter poly-GA Aggregate pro 100 Neuronen auf (Abbildung 13B). Demzufolge wies das Serum eine dem Kontrollantikörper analoge Spezifität auf. Konform mit den vorherigen Ergebnissen zeigte sich, dass in der PBS- und der (GA)<sub>15</sub>- Impfgruppe die anti-GA Immunantwort komplett ausblieb (Abbildung 11, 12, 13A), sodass für die weiteren Versuche nur Tg-Ova-(GA)<sub>10</sub>-Serum eingesetzt wurde.



Zur weiteren Spezifizierung der anti-GA Antikörper im Serum wurde die Bindungsaffinität gegenüber verschiedener poly-GA Varianten untersucht. Dabei wurde immunhistochemisch, nach Zugabe der Antiseren, die Antwort gegen (GA)<sub>149</sub>-myc und (GA)<sub>175</sub>-GFP exprimierende HEK293-FT Zellen analysiert. Zum Vergleich wurden mit einem (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>80</sub>-Konstrukt geringe Mengen poly-GA per RAN-Translation exprimiert. Zudem galt es zu überprüfen, ob die polyklonalen Antikörper im Mausserum auch andere DPR Proteine detektieren können. Mittels Immunfluoreszenz wurden GA-, GP-, GR-, AP- und PR-GFP exprimierende HEK293-FT Zellen mit Mausseren behandelt.

Im Western Blot wurden mit dem Tg-Ova-(GA)<sub>10</sub>-Mausserum alle poly-GA Expressionsformen ((GA)<sub>149</sub>-myc, (GA)<sub>175</sub>-GFP und (GA)<sub>80</sub>) detektiert. Das Ergebnis zeigte ein vergleichbares Bild wie die Positivkontrolle (Abbildung 14A). Die Bandenlängen unterschieden sich voneinander, da drei verschiedenen poly-GA Varianten ((GA)<sub>149</sub>-myc 50kDa, (GA)<sub>175</sub>-GFP 78kDa und (GA)<sub>80</sub> 25kDa) exprimiert wurden. Es erfolgte keine unspezifische Bindung gegen GFP. Somit konnte eindeutig belegt werden, dass die im Mausserum enthaltenen anti-GA Antikörper ähnlich spezifisch sind wie der bereits etablierten anti-GA 1A12 Antikörper. In der Immunfluoreszenz DPR Protein exprimierender Zellen wurde nur poly-GA mit anti-GA 1A12 und Tg-Ova-(GA)<sub>10</sub>-Mausserum rot markiert und nachgewiesen (Abbildung 14B). Daraus lässt sich schließen, dass es durch polyklonale Antikörper im Mausserum zu einer spezifischen Bindung mit poly-GA kommt, wohingegen anderen DPR Proteine nicht detektiert werden.

Die eigenen Versuche führen zu dem Ergebnis, dass durch die Ova-(GA)<sub>10</sub>-Impfung eine überraschend starke Antikörperantwort in Mäusen ausgelöst wurde (Abbildung 11). Immunhistochemie und Immunfluoreszenz haben ergeben, dass es zu einer Expression funktioneller und hoch affiner anti-GA Antikörper gegen poly-GA kam. Die (GA)<sub>15</sub>-Impfung führte hingegen zu keiner nachweisbaren Antikörperantwort (Abbildung 11, 12, 13A, 14A, 14B).



**Abbildung 14: TG-Ova-(GA)<sub>10</sub> Seren detektieren spezifisch poly-GA (Quelle: Nikola Mareljic)**

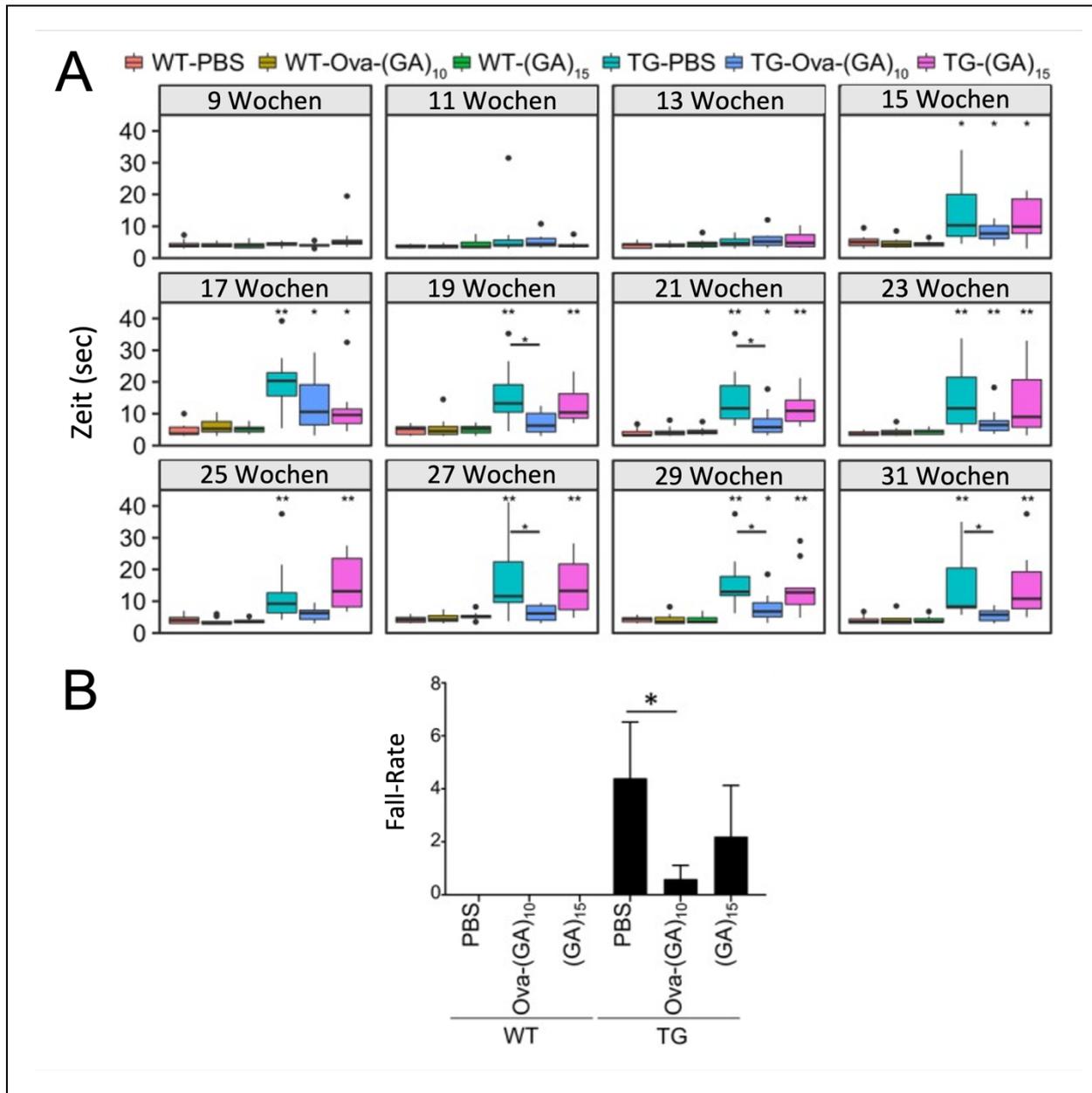
**A** Western Blot von poly-GA und GFP (Negativkontrolle) exprimierenden HEK293-FT Zellen. poly-GA wurde in unterschiedlichen Varianten exprimiert ((GA)<sub>149</sub>-myc, (GA)<sub>175</sub>-GFP, (GA)<sub>80</sub> aus einem (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>80</sub> Plasmid ohne ATG Startkodon). Es wurden TG-Ova-(GA)<sub>10</sub>-Serum und anti-GA 1A12 (Positivkontrolle) verwendet. Poly-GA wird in allen Expressionsformen detektiert. Als Ladekontrolle wurde anti-Calnexin verwendet.

**B** Immunfluoreszenz Färbung von GA-, GP-, GR-, AP-, PR-GFP und GFP exprimierenden HEK293-FT Zellen mit anti-GA 1A12 (Positivkontrolle) und TG-Ova-(GA)<sub>10</sub>-Serum. TG-Ova-(GA)<sub>10</sub>-Serum weist poly-GA (rot) nach. GP-, GR-, AP- und PR-GFP werden nicht detektiert. Maßstab: 40 μm

### 3.3.3 Minimierung motorischer Defizite nach Impfung mit Ova-(GA)<sub>10</sub>

Aufbauend auf den bisherigen Ergebnissen wurde in einem weiteren Schritt untersucht, ob die starke Immunantwort einen positiven Effekt auf den Phänotyp der transgenen Mäuse hat. Dazu wurde die motorische Leistungsfähigkeit wöchentlich ab der 9. Woche mittels Beam Walk Verhaltenstest analysiert (siehe Abbildung 3). Bei diesem Test wird die Zeit gemessen, welche die Tiere zum Überqueren eines Stocks benötigen. Dabei eignet sich der Test sowohl zur Beschreibung des motorischen Phänotyps als auch zur Evaluation der motorischen Leistungsfähigkeit im Verlauf (288, 289). (GA)<sub>149</sub>-CFP Mäuse entwickelten ab dem 4. Lebensmonat Muskelschwäche (19).

Innerhalb der ersten 13 Wochen ist kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen auszumachen. Ab der 13. Woche benötigten Transgen-Mäuse deutlich mehr Zeit zum Überqueren des Stocks als ihre Wildtyp-Geschwister, was auf das Auftreten motorischer Defizite zurückzuführen ist und mit vorherigen Beobachtungen übereinstimmt (19). Zwischen der Kontrollgruppe Tg-PBS und der Tg-(GA)<sub>15</sub>-Gruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Beam Walk Verhaltenstest (Abbildung 15A). In beiden Gruppen zeigte sich keine Verbesserung der motorischen Leistung. Diese Beobachtung deckt sich mit der fehlenden Antikörperantwort nach (GA)<sub>15</sub> Immunisierung (Abbildung 11). Im Gegensatz dazu kam es bei der Tg-Ova-(GA)<sub>10</sub>-Gruppe nach initialer Verschlechterung zu einer deutlichen Verbesserung der motorischen Leistungsfähigkeit im Verlauf, sodass schließlich überraschenderweise ein Ergebnis nahe dem Wildtyp-Niveau erreicht werden konnte (Abbildung 15A). Neben der Zeitmessung wurde zusätzlich die Fall-Rate ausgewertet. Über die ganze Versuchsdauer kam es durchschnittlich zu 4 Stürzen pro Maus in der Tg-PBS-Gruppe. In der Tg-(GA)<sub>15</sub>-Gruppe lag die Fall-Rate bei 3 und in der Tg-Ova-(GA)<sub>10</sub>-Gruppe war es 1 Sturz pro Maus. In den Wildtyp-Gruppen kam es zu keinem Sturzereignis (Abbildung 15B). Demzufolge stürzten Transgen-Mäuse, die mit Ova-(GA)<sub>10</sub> geimpft wurden, signifikant seltener als die mit PBS behandelten Tiere.



**Abbildung 15: Impfung mit Ova-(GA)<sub>10</sub> verbessert die Motorik (Quelle: (277))**

**A** Dargestellt ist die Durchschnittszeit aus zwei Messungen aufeinanderfolgender Wochen im Beam Walk. Box plot mit 25., 50. und 75. Perzentilen und Whiskers  $\pm 1,5$  IQR. Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test mit Benjamini-Hochberg Korrektur. Alle Vergleiche zwischen WT-PBS und TG-Ova-(GA)<sub>10</sub> vs. TG-PBS sind dargestellt mit \*P < 0,05, \*\*P < 0,01. n = 9-11 (siehe Tabelle 2 Impfgruppenteilung).

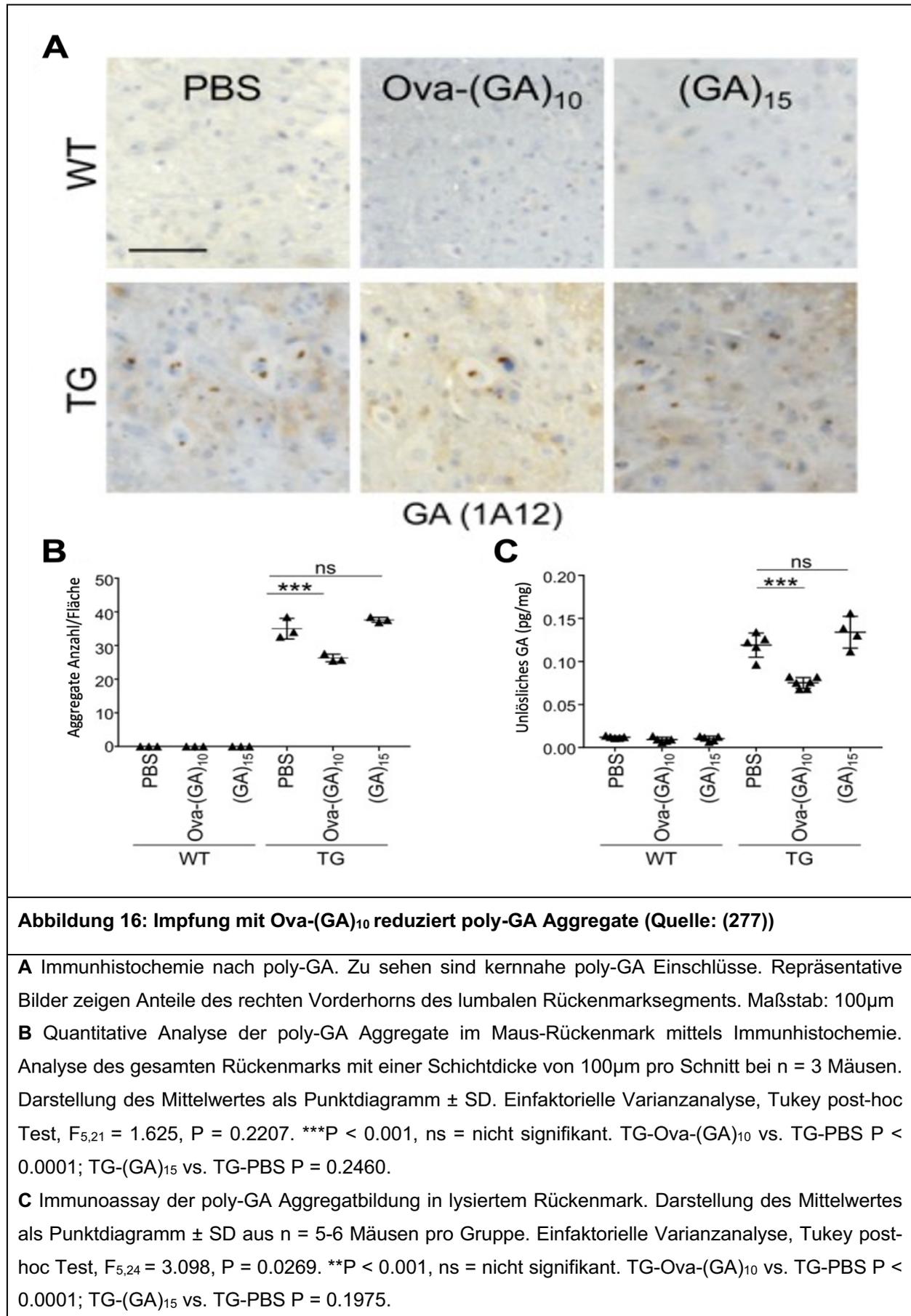
**B** Durchschnittliche Fall-Rate pro Maus einer Gruppe innerhalb der Versuchsdauer von Woche 9-31. Balkendiagramm mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD). Kruskal-Wallis Test mit Dunns Test. \*P = 0,05. TG-Ova-(GA)<sub>10</sub> vs. TG-PBS P = 0,0188.

### 3.3.4 Reduktion der poly-GA Aggregate nach Impfung mit Ova-(GA)<sub>10</sub>

Wie in Schludi et al. 2017 beschrieben wurde, sind diese phänotypischen Veränderungen in (GA)<sub>149</sub>-CFP Mäusen mit spinaler Ablagerung von poly-GA Einschlüssen assoziiert. Aus diesem Grund wurden poly-GA Aggregate im Rückenmark der Tiere quantitativ analysiert. Dazu wurde das Rückenmark bei einer Hälfte der Tiere nach Immunhistochemie mittels bildbasierter Quantifizierung analysiert. Zusätzlich erfolgte aus der anderen Gewebe-Hälfte die Bestimmung der poly-GA Aggregatbildung unter Verwendung des ELISA mit anti-GA Antikörpern. Hierfür wurde das Rückenmark zunächst lysiert und aufbereitet. Zur Generierung einer Standardkurve wurde aufgereinigtes GA-GST bekannter Konzentration verwendet.

Immunhistochemie zeigte wie erwartet in Wildtyp-Mäusen keine poly-GA Aggregate. In Transgen-Mäusen waren poly-GA Einschlusskörperchen perinukleär lokalisiert (Abbildung 16A), wie es auch bei *C9orf72* Patienten beobachtet wird (273). Die bildmorphologische Quantifizierung der Aggregate ergab, dass für Tg-PBS und Tg-(GA)<sub>15</sub> kein signifikanter Unterschied in der Anzahl vorhandener Aggregate bestand. Dagegen wies die Tg-Ova-(GA)<sub>10</sub>-Impfgruppe eine deutliche Reduktion an poly-GA Einschlüssen auf und unterschied sich somit signifikant von den beiden anderen Impfgruppen (Abbildung 16B). Das Ergebnis konnte auch mittels Immunoassay verifiziert werden (Abbildung 16C).

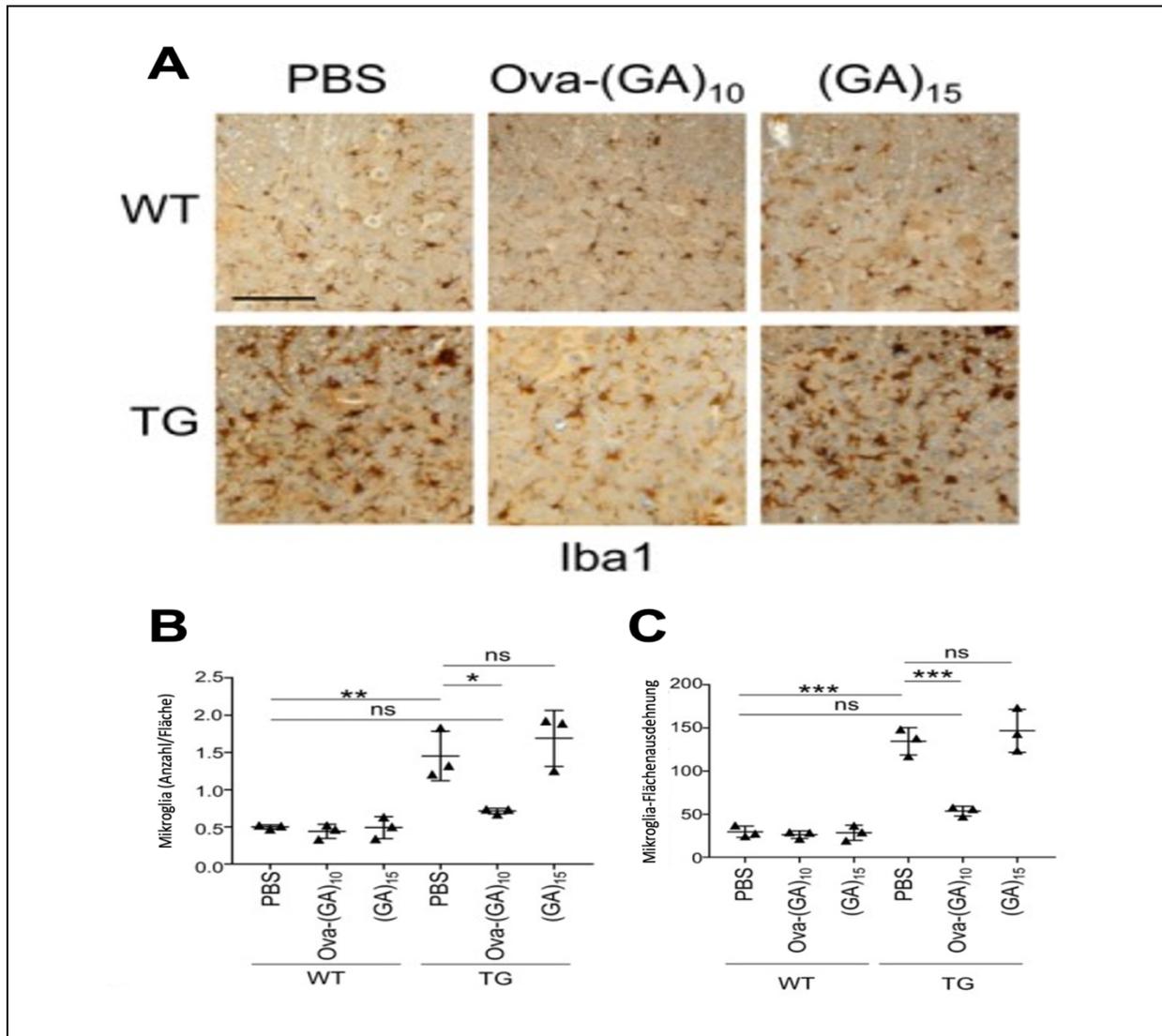
In Einklang mit den Ergebnissen der Antikörperbestimmung (Abbildung 11) hatte die (GA)<sub>15</sub>-Impfung keinen Effekt auf Motorik und Menge der poly-GA Aggregate. Demgegenüber konnte durch die Ova-(GA)<sub>10</sub>-Impfung eine Verbesserung der motorischen Leistungsfähigkeit und eine Reduktion der poly-GA Einschlüsse erzielt werden (Abbildung 15, 16), was auf einen hohen Antikörper Titer zurückzuführen ist.



### 3.3.5 OVA-(GA)<sub>10</sub> reduziert Mikroglia-Aktivierung

Mikroglia gehören zur Zellgruppe des mononukleär-phagozytären Systems und sind somit ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems im ZNS (290). Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie ALS und FTD besteht eine dynamische Wechselwirkung zwischen Mikroglia-Aktivierung und chronisch, dysregulierter Neuroinflammation mit progressivem Neuronenuntergang (291). Auch (GA)<sub>149</sub>-CFP Mäuse zeigen eine verstärkte Mikroglia-Aktivierung im Rückenmark (19). Mittels Immunhistochemie wurde die Auswirkung der anti-GA Immunisierung auf die Mikroglia-Aktivierung untersucht (292). Es wurden 100 µm Schnitte des gesamten Rückenmarks angefertigt. Für die Detektion der Mikroglia wurde anti-Iba1 Antikörper verwendet. Neben der Anzahl der Mikroglia wurde zusätzlich die Flächenausdehnung analysiert, da sich aktivierte Mikroglia in ihrer Dichte, Form und in ihrem Verzweigungsgrad von ruhenden Mikroglia deutlich unterscheiden (293).

Mit Hilfe der Immunhistochemie erfolgte eine bildbasierte Quantifizierung der Mikroglia. Wildtyp-Mäuse zeigten vereinzelt Mikroglia mit gering differenzierten Zellfortsätzen. Dabei handelte es sich um ruhende Mikroglia. In der Tg-PBS-Gruppe waren es deutlich mehr Mikroglia, die durch ausdifferenzierte Zellfortsätze als Zeichen der vermehrten Aktivierung auffielen. Zudem konnten einzelne Mikroglia-Gruppierungen beobachtet werden. Ein ähnliches Bild zeigte sich in der Tg-(GA)<sub>15</sub>-Gruppe. Im Unterschied dazu imponierte die Ova-(GA)<sub>10</sub>-Impfgruppe durch eine reduzierte Mikroglia-Anzahl. Weiterhin erschienen diese weniger differenziert. Das Ergebnis war mit Wildtyp-Gruppen vergleichbar (Abbildung 17A). Anzahl und Ausdehnung der Mikroglia in Tg-PBS und Tg-(GA)<sub>15</sub> war deutlich höher als in Wildtyp-Mäusen. Demgegenüber waren sowohl die Anzahl Iba1-positiver Mikroglia als auch die Flächenausbreitung in Tg-Ova-(GA)<sub>10</sub>-Mäusen im Vergleich zu den beiden anderen Transgen-Gruppen stark reduziert. Zwischen Wildtyp-Mäusen und Tg-Ova-(GA)<sub>10</sub>-Mäusen war kein signifikanter Unterschied nachweisbar (Abbildung 17B, C). Die Ergebnisse dieser Untersuchung lassen darauf schließen, dass durch die Impfung mit Ova-(GA)<sub>10</sub> eine bemerkenswerte Reduktion der Mikroglia-Aktivierung in (GA)<sub>149</sub>-CFP Mäusen erzielt wurde.



**Abbildung 17: Reduktion der Mikroglia-Aktivierung mit Ova-(GA)<sub>10</sub> (Quelle: (277))**

**A** Iba1-Immunhistochemie. Zu sehen ist eine starke und spezifische Mikroglia Färbung. Es werden Anteile des rechten Vorderhorns des lumbalen Rückenmarks gezeigt. In der Tg-Ova-(GA)<sub>10</sub> Gruppe zeigte sich weniger Mikroglia-Aktivierung im Vergleich zu Tg-PBS und Tg-(GA)<sub>15</sub> Gruppe. Maßstab = 100µm

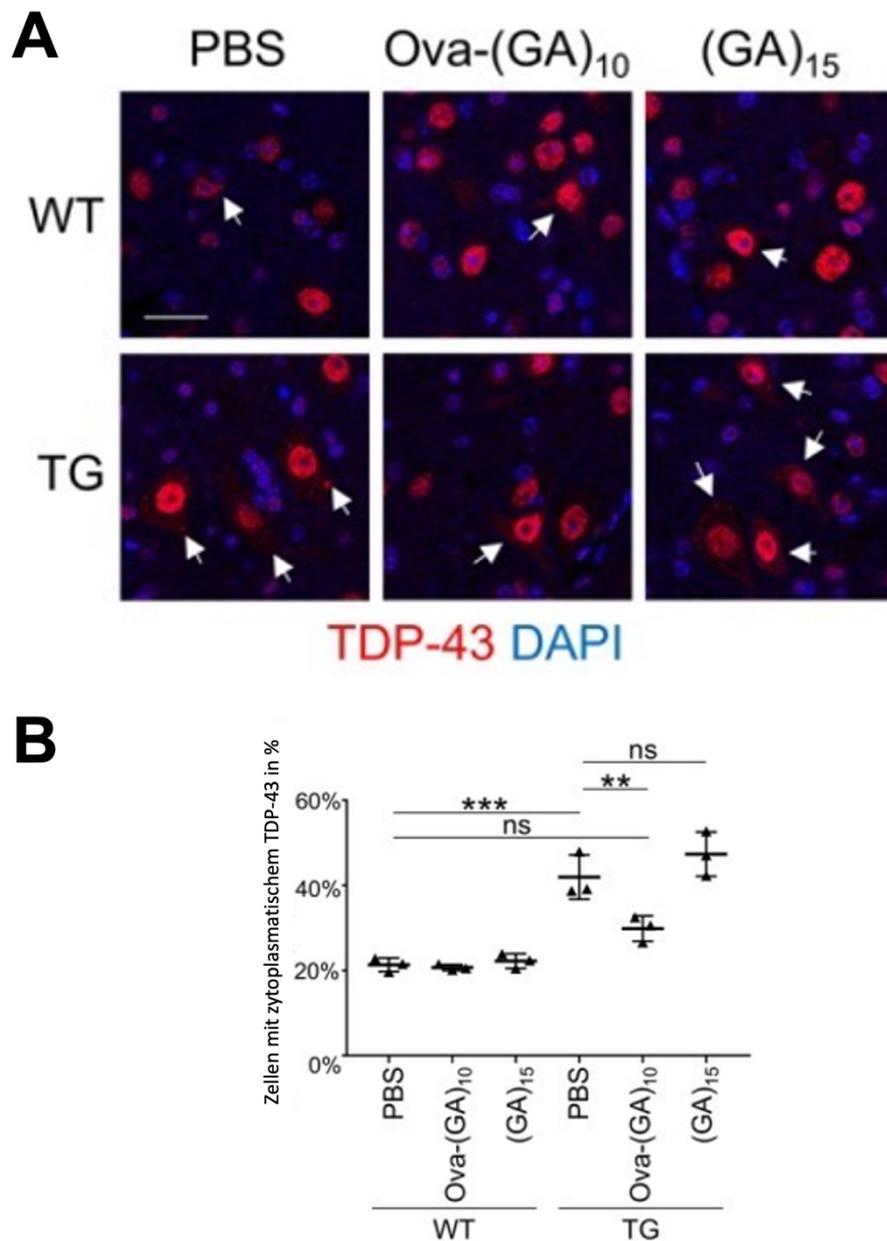
**B** Quantitative Analyse der Mikroglia-Auszählung im Mäuse-Rückenmark. Es wurden 100 µm dicke Schnitte des gesamten Rückenmarks von n = 3 Mäusen pro Gruppe ausgewertet. Der Mittelwert wird als Punktdiagramm mit Mittelwert dargestellt. Einfaktorielle Varianzanalyse, Tukey post-hoc Test, \*\*P < 0.01, \*P < 0.05, ns = nicht signifikant. F<sub>5,12</sub> = 0.6974, P = 0.6357; TG-Ova-(GA)<sub>10</sub> vs. TG-PBS P = 0.0131; TG-(GA)<sub>15</sub> vs. TG-PBS P = 0.7650. TG-PBS vs. WT-PBS P = 0.0018.

**C** Quantitative Analyse der Mikroglia-Flächenausdehnung im Mäuse-Rückenmark. Es wurden 100 µm dicke Schnitte des gesamten Rückenmarks von n = 3 Mäusen pro Gruppe ausgewertet. Der Mittelwert wird als Punktdiagramm mit Mittelwert dargestellt. Einfaktorielle Varianzanalyse, Tukey post-hoc Test, \*\*\*P < 0.001, ns = nicht signifikant. F<sub>5,12</sub> = 1.201, P = 0.3655; TG-Ova-(GA)<sub>10</sub> vs. TG-PBS P < 0.0001; TG-(GA)<sub>15</sub> vs. TG-PBS P = 0.8573. TG-PBS vs. WT-PBS P < 0.0001.

### 3.3.6 OVA-(GA)<sub>10</sub> reduziert TDP-43 Mislokalisierung

TDP-43 ist ein primär nukleär lokalisiertes, DNA-bindendes Protein, welches beim alternativen Spleißen von Bedeutung ist (294, 295). Durch poly-GA kommt es zu einer zytoplasmatischen Mislokalisierung dieses Proteins. Auch in (GA)<sub>149</sub>-CFP Mäusen konnte eine vermehrte pathologische TDP-43 Phosphorylierung nachgewiesen werden (19). Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt die TDP-43 Mislokalisierung mittels Immunfluoreszenz quantitativ analysiert. Spinale Schnitte wurden mit fluoreszierendem anti-TDP-43 Antikörper behandelt.

Mittels Immunfluoreszenz wurde eine bildbasierte Quantifizierung des zytoplasmatischen TDP-43 durchgeführt. Es zeigte sich, dass auch in Wildtyp-Mäusen TDP-43 in geringen Mengen zytoplasmatisch vorliegt. Im Unterschied dazu wurde in Transgen-Tieren vermehrte TDP-43 Mislokalisierung beobachtet (Abbildung 13 D). Sowohl die TG-PBS Gruppe als auch die TG-(GA)<sub>15</sub> Gruppe wiesen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich erhöhte Level von zytoplasmatischem TDP-43 auf (Abbildung 13E). Dagegen war der Anteil des zytoplasmatischen TDP-43 in der TG-Ova-(GA)<sub>10</sub> Gruppe erkennbar reduziert. Im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern der gleichen Behandlungsgruppe bestand hier kein signifikanter Unterschied in der TDP-43 Mislokalisierung (Abbildung 13E). Die Zusammenfassung der Ergebnisse zeigte, dass es in der TG-Ova-(GA)<sub>10</sub> Gruppe zu weniger TDP-43 Mislokalisierung kam als in den beiden anderen Transgen-Impfgruppen, die keine anti-GA Antikörper gebildet hatten. Es ist somit anzunehmen, dass die Impfung mit Ova-(GA)<sub>10</sub> entscheidend zu einer Reduktion der TDP-43 Mislokalisierung beigetragen hat.



**Abbildung 18: Reduktion der TDP-43-Mislokalisierung mit Ova-(GA)<sub>10</sub> (Quelle: (277))**

**A** TDP-43 Immunfluoreszenz im anterioren Vorderhorn lumbaler Rückenmarkssegmente. Es wurden 6 repräsentative Bilder pro Rückenmark analysiert. Pfeile deuten auf TDP-43 Mislokalisierung. In der Tg-Ova-(GA)<sub>10</sub> Gruppe zeigte sich weniger TDP-43 Mislokalisierung im Vergleich zu Tg-PBS und Tg-(GA)<sub>15</sub> Gruppe. Maßstab = 20µm.

**B** Quantitative Analyse der Zellen mit zytoplasmatischem/mislokalisiertem TDP-43. Angabe in Prozent. Darstellung des Mittelwertes als Punktdiagramm ± SD. Einfaktorielle Varianzanalyse, Tukey post-hoc Test, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, ns = nicht signifikant. F<sub>5,12</sub> = 0.6533, P = 0.6650; TG-Ova-(GA)<sub>10</sub> vs. TG-PBS P = 0.0096; TG-(GA)<sub>15</sub> vs. TG-PBS P = 0.4215.

### 3.3.7 Impfung rief keine Nebenwirkungen hervor

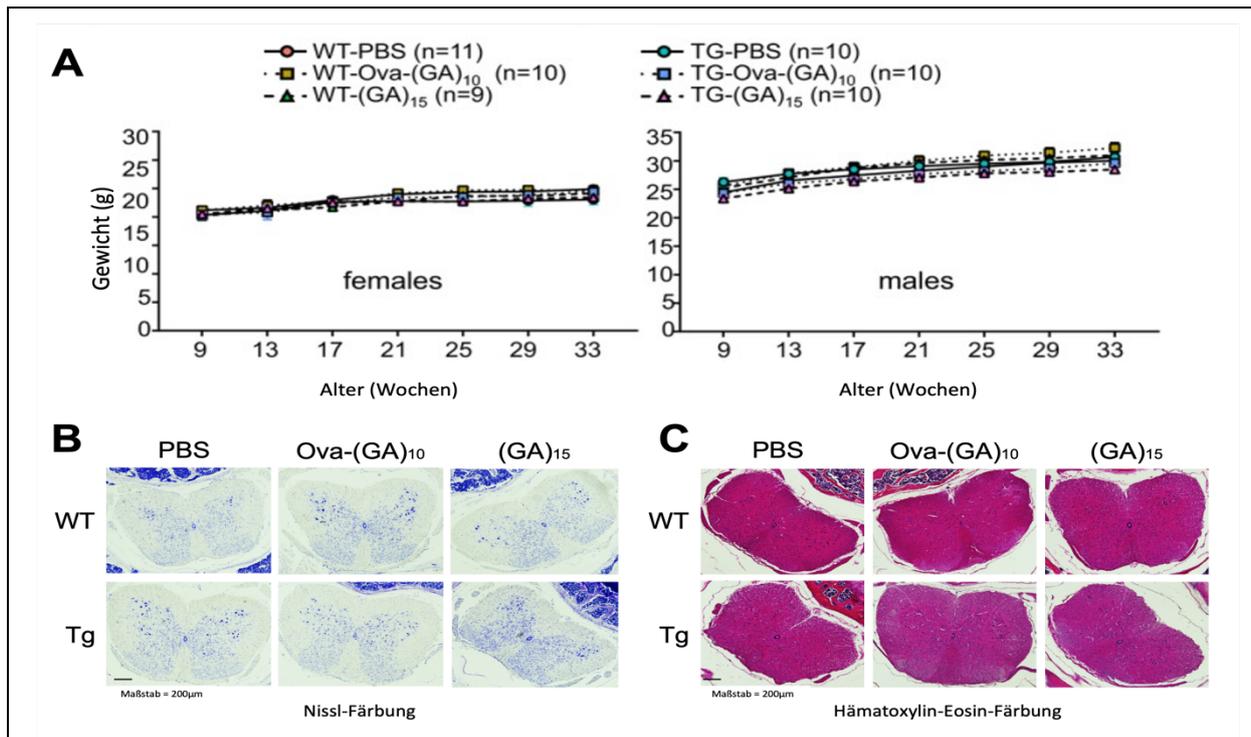
Während des gesamten Experiments wurde auf den allgemeinen Gesundheitszustand der Mäuse geachtet. Dabei wurde zum einen das Gewicht der Mäuse monatlich gemessen. Zudem wurden die Mäuse wöchentlich inspiziert. Dabei wurde auch das Sozialverhalten der Tiere beobachtet. Mögliche Hinweise für eine Störung wären zum Beispiel glasige Augen, vermehrter Fellausfall oder Gewichtsverlust. Ein gestörtes Verhalten würde sich durch erhöhte Aggressivität, Hypo-/Akinese, fehlende Interaktion oder selbstschädigende Handlungen auszeichnen. Während des gesamten Versuchszeitraums verhielten sich alle Mäuse normal und wiesen keine erkennbaren Auffälligkeiten auf. Lediglich die transgenen Mäuse zeigten ab der 13. Woche den sogenannten Hinterbein-Reflex. Dabei ziehen die Tiere ihre Hinterbeine beim Anheben am Schwanz reflexartig zusammen und drücken sie an den Körper. Bei Wildtyp-Geschwistern zeigte sich dieser Reflex nicht. Die Immunisierung führte zu keinerlei unerwünschten Reaktionen wie beispielsweise Anaphylaxie. Alle Versuchstiere erreichten den Endpunkt. Zusätzlich wurden die Nissl-Färbung und die Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Rückenmarksschnitten durchgeführt. Diese histologischen Färbeverfahren ermöglichen eine detaillierte Übersicht der Gewebestruktur, sodass man dadurch etwaige pathologische Veränderungen detektieren kann. Durch den Vergleich der einzelnen Versuchstier-Gruppen untereinander können so Veränderungen in der Morphologie des Rückenmarks ermittelt werden.

Aufgrund geschlechtsspezifischer Unterschiede im Gewicht, wurden die Tiere entsprechend in zwei Gruppen aufgeteilt. Es zeigte sich zwischen den einzelnen Gruppen kein signifikanter Unterschied im Gewicht. Sowohl Wildtyp-Mäuse als auch Transgen-Geschwister nahmen mit dem Alter kontinuierlich zu. Dabei wurde das Standardgewicht nicht überschritten. Somit konnte gezeigt werden, dass es durch die Impfung zu keiner pathologischen Gewichtsabnahme bzw. Gewichtszunahme kam (Abbildung 19A).

In der Nissl-Färbung des Rückenmarks konnten für die einzelnen Gruppen keine Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 19B). Ein ähnliches Bild zeigte sich in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Abbildung 19C). Das Rückenmark in Transgen- und Wildtyp-Mäusen, sowie in den jeweiligen Impfgruppen zeigte keine signifikanten

Unterschiede. Morphologisch konnten dadurch Veränderungen der Gewebestruktur dieser Bereiche des ZNS durch die Impfung ausgeschlossen werden.

In Zusammenschau der Ergebnisse scheint es, dass die Impfung keine unerwünschten Nebenwirkungen hervorgerufen hat. Geimpfte Mäuse entwickelten sich normal und wiesen, verglichen mit ungeimpften Mäusen, keine pathologischen Veränderungen auf.



**Abbildung 19: Mäuse zeigten keine pathologischen Auffälligkeiten (Quelle: Abbildung 19A: (277), Abbildung 19B, C: Nikola Mareljic)**

**A** Darstellung der Gewichtskurven für Weibchen (links) und Männchen (rechts) abhängig vom Alter der Tiere in Wochen (weeks). Anzahl der Tiere pro Gruppe wie in Tabelle 2 „Impfgruppenzuteilung“ angegeben. Zweifaktorielle Varianzanalyse (Gruppe x Zeit), Tukey post-hoc Test. Kein signifikanter Effekt für die Gruppen (Weibchen:  $F_{2,13} = 0.3747$ ,  $P = 0.6947$ ; Männchen:  $F_{2,11} = 3.042$ ,  $P = 0.0888$ ). Signifikanter Effekt für die Zeit (Weibchen:  $F_{5,65} = 13.28$ ,  $P < 0.0001$ ; Männchen:  $F_{5,55} = 102.6$ ,  $P < 0.0001$ ). Keine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren (Weibchen:  $F_{10,65} = 0.8671$ ,  $P = 0.5678$ ; Männchen:  $F_{10,55} = 1.067$ ,  $P = 0.4030$ ).

**B** Repräsentative Darstellung des lumbalen Rückenmarks in Nissl-Färbung. Es sind keine pathologischen Veränderungen (Tg im Vergleich zu WT) durch die Immunisierung zu sehen. Maßstab = 200µm

**C** Repräsentative Darstellung des lumbalen Rückenmarks in Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Es sind keine pathologischen Veränderungen (Tg im Vergleich zu WT) durch die Immunisierung zu sehen. Maßstab = 200µm

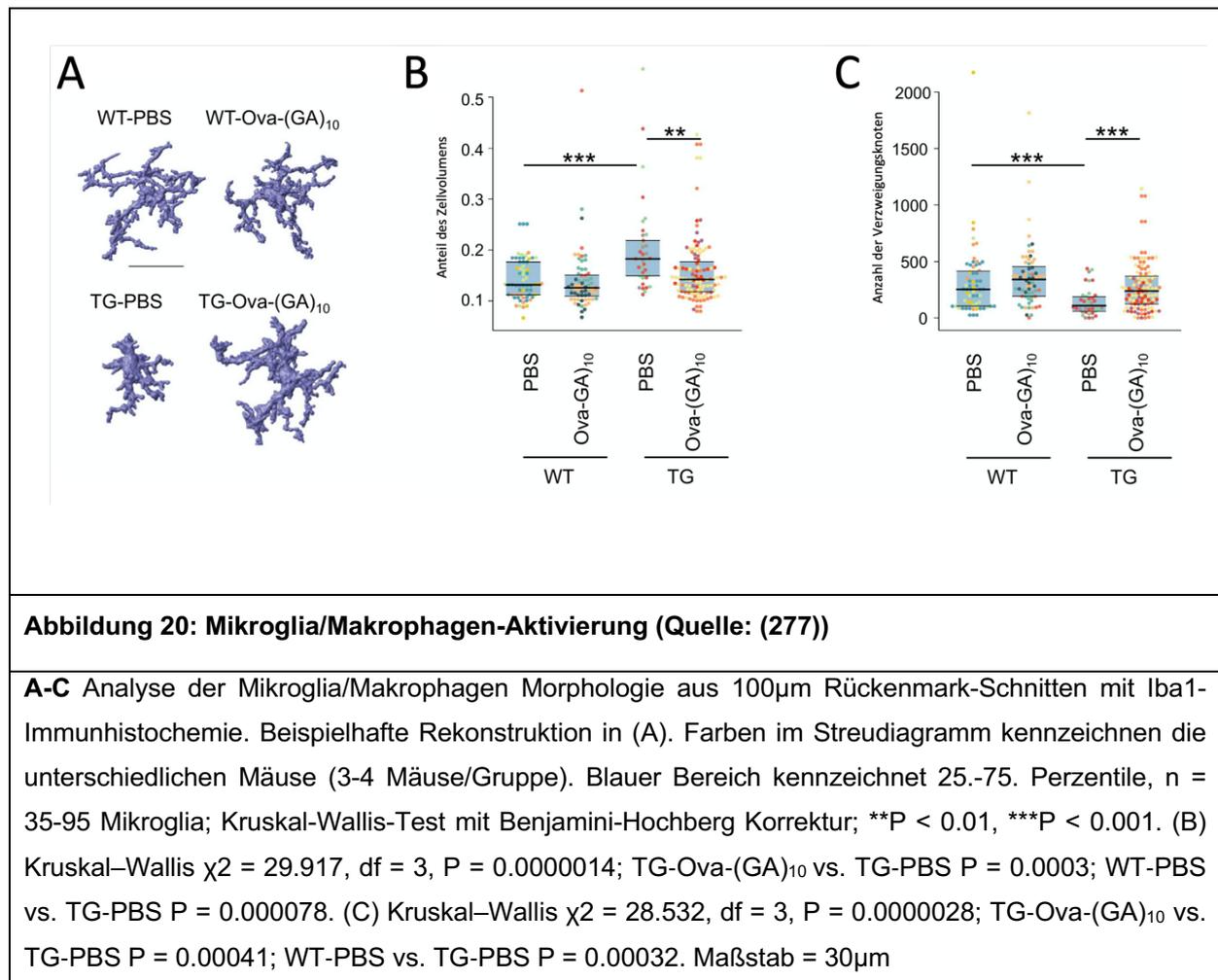
## 4 Diskussion

Immuntherapeutische Ansätze zur Behandlung des Morbus Alzheimer und anderer neurodegenerativer Erkrankungen sind vielversprechend (219, 220, 225, 231, 232). Diese Beobachtungen waren Anreiz für die Untersuchung der Immuntherapie zur Behandlung der ALS/FTD. Wir konnten zeigen, dass die präventive Immunisierung mit poly-GA in einem C9orf72-Mausmodell eine sichere und effektive Methode darstellt. Die Injektion des mit dem Trägermolekül Ovalbumin gekoppelten DiPeptid-Repeat Proteins poly-GA führte zu einer enormen Steigerung der Immunantwort im Vergleich zu (GA)<sub>15</sub> Immunisierung. Dies äußerte sich in Form von hohen Antikörpertitern, welche durch regelmäßige intravenöse Gaben monoklonaler Antikörper schwer aufrecht zu erhalten wären. Eine andere Möglichkeit hohe Titer zu erreichen und gleichzeitig die Bluthirnschranke zu umgehen, stellt die AAV vermittelte konstitutive Expression des Antikörpers im ZNS dar. Hierzu wurden im ersten Teil dieser Dissertation die intracerebroventrikuläre Injektion in neugeborenen Mäusen etabliert und ein anti-GA Antikörper AAV verpackt. Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die starke Antikörperantwort nach aktiver Immunisierung zu einem signifikanten Rückgang der neurodegenerativen Charakteristika in einem poly-GA C9orf72 Mausmodell führte. So kam es zu einer Reduktion der poly-GA Einschlüsse, TDP-43 Mislokalisierung, Neuroinflammation, neuronaler Schädigung und motorischer Defizite in (GA)<sub>149</sub>-CFP Mäusen. Diese Ergebnisse verdeutlichen das Potenzial der poly-GA Impfung als präventiven Ansatz bei C9orf72 bedingter ALS/FTD. Ob die Impfung neben einer präventiven Anwendung auch therapeutischen Nutzen nach Krankheitsbeginn hat und wie der genaue Wirkmechanismus der poly-GA Immunisierung aussieht, muss in weiteren Arbeiten geklärt werden. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein hoher Antikörper-Titer therapeutisch wirksam ist.

## 4.1 Hohe Antikörper-Titer als entscheidender Faktor für positive Ergebnisse der aktiven Impfung

Die Auswertung des Beam Walk Verhaltenstests hat ergeben, dass mittels Ova-(GA)<sub>10</sub> Impfung die Motorik der Transgen-Mäuse signifikant verbessert werden konnte. Die verzögerte Wirksamkeit ist womöglich darauf zurückzuführen, dass erst nach mehreren Injektionen ein suffizienter anti-GA Titer zur ausreichenden Penetration der Blut-Hirn-Schranke erzielt wurde. Des Weiteren erbrachte die Analyse der poly-GA Aggregate eine Aggregatreduktion um 20-30% unter Ova-(GA)<sub>10</sub>. Auch die Analyse der Mikroglia-Aktivierung lieferte für Ova-(GA)<sub>10</sub> geimpfte Tiere eine verminderte Anzahl und Differenzierung der Iba1-positiven Mikroglia im Rückenmark, sodass durch die Impfung einer Inflammation des ZNS entgegengewirkt werden konnte. Zur weiteren Evaluation des Impferfolges wurden unterschiedliche Untersuchungen durch Kollaborationspartner durchgeführt. Hierzu zählen die Analyse der dreidimensionalen Darstellung der Mikroglia-Morphologie, RNA-Sequenzierung und Bestimmung der NFL Konzentration im Liquor.

Charakteristisch für aktivierte Mikroglia ist eine Zellhypertrophie und Zunahme des Verzweigungsgrades (296). Die Mikroglia-Morphologie in Tg-PBS Mäusen weist eine deutliche Zunahme der Zellvolumens und Abnahme des Verzweigungsgrads im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf. Demgegenüber stellt sich die Mikroglia-Morphologie in Tg-Ova-(GA)<sub>10</sub> Mäusen ähnlich den Wildtyp-Wurfgeschwistern dar. Die hier beschriebenen Veränderungen sind weitere Indikatoren einer verstärkten Mikroglia-Aktivierung, die mittels Immunisierung vermindert werden konnte.



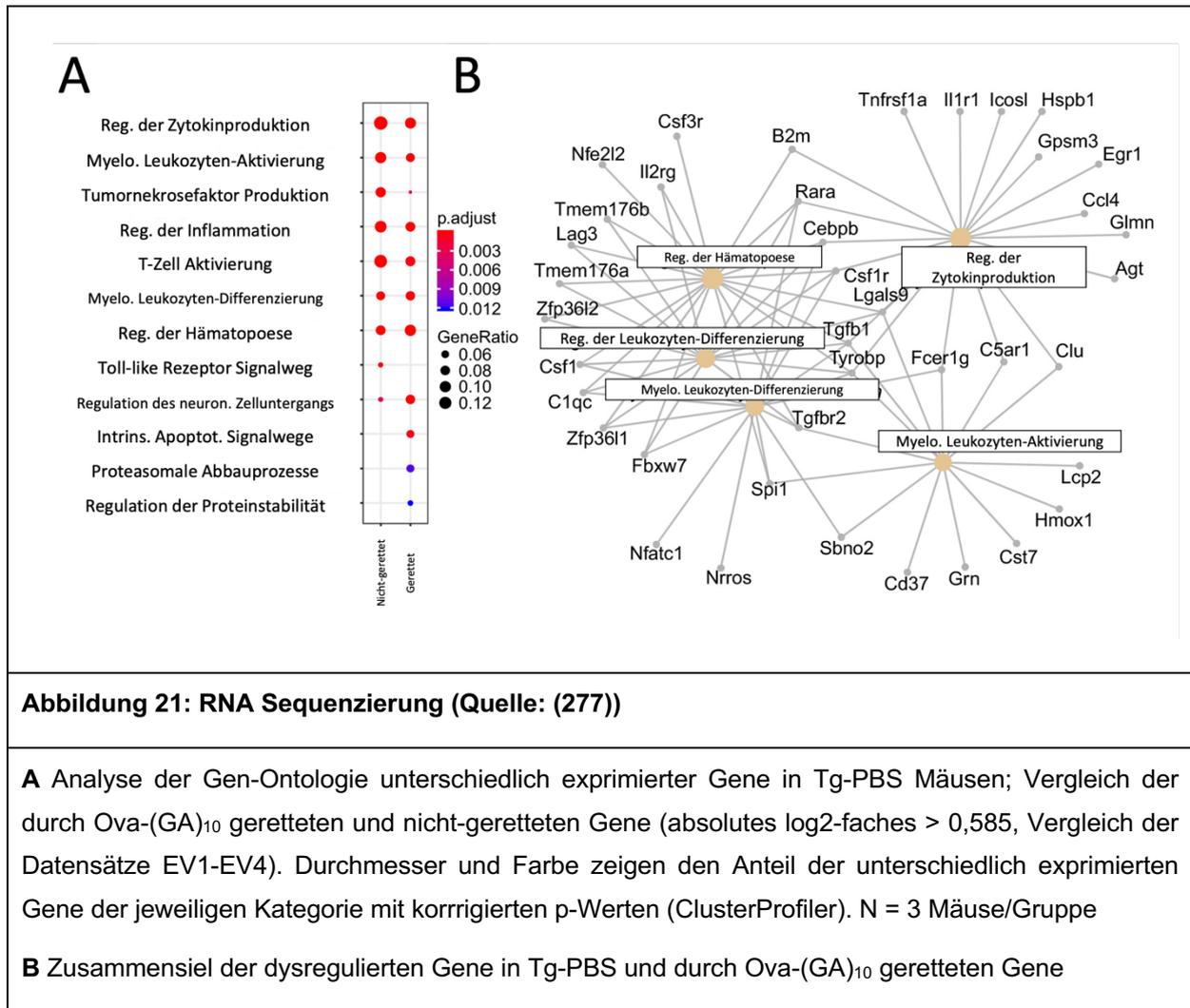
Es wäre jedoch ein Fehler Mikroglia-Aktivierung mit Neuroinflammation gleichzusetzen, da verschiedene Subpopulationen und Entwicklungsstufen innerhalb der Mikroglia existieren. So unterscheidet man zwischen proinflammatorischen und neuroprotektiven Mikroglia (297). Hierbei ist die Interaktion der Mikroglia mit dem Mikromilieu von entscheidender Bedeutung. Proinflammatorische Zytokine regen ruhende Mikroglia zur Expression der neurotoxischen Faktoren TNF- $\alpha$ , IL-6 oder Stickstoffmonoxid an (298). Demgegenüber stimulieren Faktoren wie IL-4 oder TGF- $\beta$  die Prozessierung neuroprotektiver Mikroglia (299). Der Arbeitsgruppe um Keren-Shaul et al. ist es gelungen die Gruppe der sogenannten „*disease-associated microglia*“ (DAM) in einem Alzheimer Mausmodell zu identifizieren. DAMs wurden auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben und scheinen einen protektiven Einfluss auf die Krankheitsentwicklung zu haben. Sie kommen vermehrt in der Anfangsphase der Erkrankung vor. Mit fortschreitender Degeneration überwiegen proinflammatorische Mikroglia (300, 301, 302). Weitere Arbeitsgruppen

konnten zeigen, dass vor allem die TREM2-vermittelte DAM-Aktivierung in Alzheimer-Mausmodellen durch Reduzierung der A $\beta$ -Last mittels Phagozytose neuroprotektiv wirkt (303, 304). Poly-GA induziert eine überwiegend proinflammatorische Mikroglia-Antwort (19, 169), auch wenn weitere Untersuchungen der Subpopulationen mit neueren Einzelzell-Transkriptom-Analysen notwendig sind. Es wäre interessant in zukünftigen Arbeiten zu untersuchen, ob die poly-GA Impfung zu einer Verschiebung der proinflammatorischen Mikroglia-Aktivierung in Richtung einer neuroprotektiven Differenzierung beiträgt.

Außerdem konnte Ova-(GA)<sub>10</sub> die zytoplasmatische TDP-43 Mislokalisierung in GA-CFP Mäusen reduzieren. Zytoplasmatische TDP-43 Aggregate sind ein typisches Merkmal der *C9orf72* ALS/FTD, die bei Patienten gut mit Neurodegeneration korrelieren, aber in Mausmodellen kaum beobachtet werden. Ursächlich hierfür scheint die unterschiedliche Prozessierung des Proteins in Primaten und Nagetieren. Die primatenspezifische Caspase 4, aber nicht die homologe Caspase 11 in Mäusen, führt zu einer vermehrten zytoplasmatischen Lokalisation des TDP-43 (305). Im Zuge der gestörten Prozessierung kommt es jedoch auch in Mäusen trotz fehlender Mislokalisierung zu einer Phosphorylierung des Proteins (19).

Um die Wirkungsweise der pathologischen Mechanismen besser verstehen zu können, wurden RNA Sequenzierungsanalysen aus dem Rückenmark von Tg-PBS, Tg- Ova-(GA)<sub>10</sub> Mäusen und den jeweiligen Wildtyp-Wurfgeschwistern durchgeführt. Dieses Verfahren erlaubt die quantitative Analyse der Genexpression, indem mittels Sequenzierung von revers-transkribierter RNA die relative Anzahl der Transkripte verglichen wird (306, 307).

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Wildtyp-Gruppen, sodass wir ausschließen konnten, dass anti-GA Antikörper in Abwesenheit des Antigens wesentliche Effekte auf das Gehirn haben. Im Gegensatz hierzu waren zwischen Tg-PBS und WT-PBS 545 Gene und zwischen Tg-PBS und Tg-Ova-(GA)<sub>10</sub> 233 Gene unterschiedlich exprimiert unter Verwendung der 1,5-fachen Änderung (absoluter log<sub>2</sub>-fold-change > 0,585) als cut-off-Wert (Datensätze 1-4). 210 Gene, die in der Tg-PBS-Gruppe unterschiedlich exprimiert wurden, konnten mittels Impfung teilweise gerettet werden.



**Abbildung 21: RNA Sequenzierung (Quelle: (277))**

**A** Analyse der Gen-Ontologie unterschiedlich exprimierter Gene in Tg-PBS Mäusen; Vergleich der durch Ova-(GA)<sub>10</sub> geretteten und nicht-geretteten Gene (absolutes log<sub>2</sub>-faches > 0,585, Vergleich der Datensätze EV1-EV4). Durchmesser und Farbe zeigen den Anteil der unterschiedlich exprimierten Gene der jeweiligen Kategorie mit korrigierten p-Werten (ClusterProfiler). N = 3 Mäuse/Gruppe

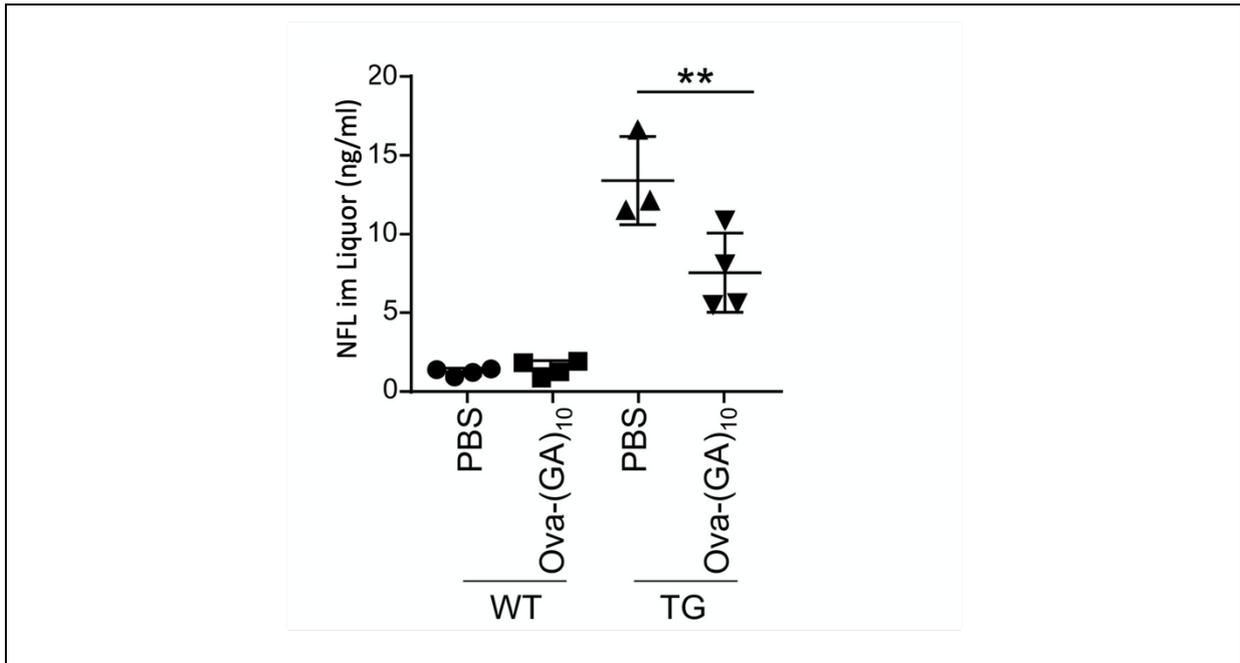
**B** Zusammensiel der dysregulierten Gene in Tg-PBS und durch Ova-(GA)<sub>10</sub> geretteten Gene

Die Analyse der Gen-Sequenzierung legt nahe, dass poly-GA eine Vielzahl immunologischer Prozesse im Gehirn induziert. Dazu zählt u.a. die Zytokin/Chemokin-Produktion. Unter der Impfung mit Ova-(GA)<sub>10</sub> konnte eine signifikante Senkung immunologischer Prozesse, wie beispielsweise die Induktion von Ccl4, Grn, Tyrobp und Komplementfaktoren, erzielt werden. Somit lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die Impfung antiinflammatorisch wirkt. Ursächlich hierfür können zwei Mechanismen diskutiert werden: 1. Poly-GA wirkt als Hauptursache der Entzündung, indem es die Zellhomöostase stört, Proteine sequestriert, TDP43-Pathologie induziert. Anti-GA Antikörper reduzieren poly-GA, z.B. durch Abbau mit intrazellulären Fc-Rezeptoren, und somit auch die sekundäre Inflammation. 2. Poly-GA induziert eine proinflammatorische Mikroglia-Antwort, welche im weiteren Verlauf die Entzündung aufrechterhält und dadurch selbst zur Neurodegeneration beiträgt. Antikörper hemmen somit Reduktion von poly-GA

entweder direkt die Ursache der Entzündung oder die proinflammatorische Mikroglia-Aktivierung. Eine Analyse der Mikroglia-Subpopulationen könnte Aufschluss darüber bringen, wie das Verhältnis zwischen proinflammatorischen zu neuroprotektiven Mikroglia ist. Zur Untersuchung der Kausalität könnte man zudem versuchen durch andere Methoden (z.B. virale Zytokin-Expression) im GA-CFP-Mausmodell poly-GA unabhängig die neuroprotektive Mikroglia-Aktivierung zu fördern. Eine Reduktion der Entzündung würde dafürsprechen, dass poly-GA nicht Hauptursache der Entzündung ist, sondern durch die proinflammatorische Mikroglia-Aktivierung den inflammatorischen Prozess induziert.

Eine Bestimmung der leichten Neurofilament-Kette (NFL) aus dem Liquor sollte Auskunft darüber geben, ob axonale Schädigungen vorliegen. Die Messung der NFL-Werte wird oftmals in neurodegenerativen Erkrankungen, und vor allem in ALS, als Biomarker für solche Schäden verwendet (308, 309, 310).

In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen der RNA-Sequenzierung zeigte sich auch in den NFL-Werten keine Diskrepanz zwischen den beiden Wildtyp-Gruppen. In der Tg-PBS Gruppe war eine deutliche Zunahme der NFL Konzentration gegenüber dem Wildtyp zu beobachten. Dies ist auf eine gesteigerte neuroaxonale Schädigung der transgenen Tiere zurückzuführen. Im Vergleich hierzu deutet die signifikante Abnahme des NFL-Levels in der Tg-Ova-(GA)<sub>10</sub> Gruppe darauf hin, dass es durch die anti-GA Immunisierung zu weniger axonaler Schädigung kommt. Das Ergebnis sollte für eine bessere Aussagekraft unter Verwendung einer größeren Fallzahl wiederholt werden. Sollte sich eine Reduktion des NFL im Liquor auch in einer größeren Population bestätigen, wäre dies mit dem Ergebnis der SOD1-ASO Therapie (Tofersen) vergleichbar und somit klinisch relevant (175, 311).



**Abbildung 22: NFL Konzentration im Liquor (Quelle: (277))**

Immunoassay der NFL Konzentration im Liquor. Der Mittelwert wird als Punktdiagramm  $\pm$  SD dargestellt. N = 4 Mäuse/Gruppe. Einfaktorielle Varianzanalyse, Tukey post-hoc Test, F 3,11 = 1.911, P = 0.1862. \*\*P < 0.01. TG-Ova-(GA)<sub>10</sub> vs. TG-PBS P = 0.0081.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die Ova-(GA)<sub>10</sub> Impfung eine sichere und effektive Immunantwort in unserem Mausmodell auslöst. Geimpfte Mäuse entwickelten sich normal und wiesen, verglichen mit ungeimpften Mäusen, keine pathologischen Veränderungen im Gewicht oder histopathologischen Färbungen des Rückenmarks auf. Zudem entwickelten die Mäuse keine Splenomegalie und auch die Leukozyten-Differenzierung wies keine Auffälligkeiten auf. Anhand der Ergebnisse konnten wir zeigen, dass mit Hilfe des Impfstoffes eine starke Antikörperantwort generiert wurde. Durch repetitive Injektionen des Antigens wurden exorbitant hohe IgG-Titer erreicht. Sie bewirkten eine Reduktion der neuronalen Inflammation, der Neurodegeneration und der motorischen Defizite in dem hier getesteten C9orf72 ALS Mausmodell. Es stellt sich die Frage, ob ähnlich gute Ergebnisse auch mit niedrigeren IgG-Leveln erzielt werden können, wie sie bei therapeutischen Impfungen realistischer sind. Hierfür sollte ein Impfschema vergleichbar mit bereits etablierten Impfungen angewendet werden, sodass nach erfolgter Grundimmunisierung nur noch vereinzelt Auffrischimpfungen notwendig wären.

## 4.2 Verstärkung der Immunantwort mit Hilfe von Trägermolekül und Adjuvantien

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die aktive Impfung mit immunogenen Carriern durch Generierung hoher Antikörper-Titer eine suffiziente Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ermöglicht. So entwickelten mit Ova-(GA)<sub>10</sub> geimpfte Mäuse eine starke und effiziente Antikörperantwort, wohingegen das (GA)<sub>15</sub>-Peptid allein nicht immunogen genug war. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es nicht gut auf MHC Molekülen präsentiert werden kann oder schlecht von T-Zell Rezeptoren erkannt wird. Erst die Koppelung von poly-GA mit Ovalbumin, das starke T-Zell Epitope mitbringt, hat zu einer suffizienten Antikörperantwort geführt. Neben Ovalbumin, welches in dieser Studie untersucht wurde, bieten sich auch das Keyhole Limpet Hämocyanin (KLH) oder das nicht-toxische CRM197-Fragment des Diphtherietoxins (CRM) an. Ovalbumin kommt in Hühnereiweiß vor und kann allergische Reaktionen auslösen, weshalb es als Trägermolekül für die Impfung beim Menschen nicht verwendet wird (312). Da es jedoch ein effizienter Carrier ist und in Mäusen nur selten zu Nebenwirkungen führt, entschieden wir uns in dieser Arbeit für Ovalbumin. Das 8 MDa große KLH-Protein wird aus der großen kalifornischen Schlüssellochschncke gewonnen und wird in experimentellen Immuntherapie-Studien gegen Krebs und das Tau-Protein als Trägerprotein genutzt (233, 234, 313). CRM197 wird unter anderem als Trägerprotein zur Impfung gegen *Hämophilus influenza B*, Pneumokokken oder auch Meningokokken verwendet (314, 315, 316). Auf der Suche nach weiteren geeigneten Trägermolekülen ist man außerdem auf die Gruppe der zwitterionischen Polysaccharide (ZPS) gestoßen. Dabei handelt es sich um Kapselbestandteile kommensaler Darmbakterien, die eine MHC-II abhängige, potente T-Zellantwort auslösen können (317, 318). Zu diesen ZPS gehört das vom gramnegativen *Bacteroides fragilis* abgeleitete Polysaccharid A (PSA). Die Entwicklung neuartiger Strategien zur Nutzung von PSA als immunmodulatorisches Trägermolekül sind Gegenstand aktueller Forschung (319). Welches dieser Trägermoleküle das am besten geeignete für eine Impfung gegen poly-GA im Menschen ist, muss in zukünftigen Studien getestet werden.

Zusätzlich zu Carriern sind häufig Adjuvantien feste Bestandteile eines Impfstoffes. Sie dienen als Hilfsmittel und führen zu einer Verstärkung der Immunantwort. Zudem haben sie durch Beeinflussung der T-Zell Differenzierung eine immunmodulatorische

Wirkung (320, 321). Eines der am besten erforschten Adjuvantien ist das Freund-Adjuvans bestehend aus Mineralöl, hitzeinaktivierten Mykobakterien und Arlacel A (322). Aufgrund seiner entzündungsfördernden Eigenschaft und damit einhergehender Nebenwirkungen wurde das inkomplette Freund-Adjuvans ohne hitzeinaktivierte Mykobakterien verwendet (323, 324). Als Alternative zu den schlecht metabolisierbaren Mineralölen werden heutzutage vollständig metabolisierbare Lipide wie beispielsweise Squalen verwendet (325). Daneben werden auch deutlich besser verträgliche Aluminium-basierte Adjuvantien (Aluminium-hydroxid oder Aluminium-phosphat) zur Verstärkung der Immunantwort genutzt (326). Auch CpG Oligonukleotide finden Anwendung als Hilfsmittel, indem sie eine gesteigerte Expression des MHC II Moleküls (*major histocompatibility complex*) und des TLR-9-Rezeptors (*toll-like receptor 9*) bewirken (327, 328). Nachdem beschrieben wurde, dass Adjuvantien in Kombination (inkomplettes Freund-Adjuvans + CpG Oligonukleotid) zu einer stärkeren Immunantwort mit Bildung hochaffiner Antikörper führen (329), entschieden wir uns in unserer Arbeit das inkomplette Freund-Adjuvans mit CPG 1668 zu kombinieren. Hierbei scheint es, dass sich die unterschiedlichen immunologischen Prozesse durch simultane Aktivierung positiv beeinflussen und daraus eine verstärkte Antikörperantwort resultiert. Somit konnte in unserer Arbeit durch Verwendung von Ovalbumin als Trägermolekül und inkomplettem Freund Adjuvans mit CpG ODN 1668 als Adjuvantien eine langanhaltende Antikörper-Expression mit hohen Antikörperspiegeln generiert werden, die für die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke von entscheidender Bedeutung sind.

Wichtig ist es darauf zu achten, dass bei all den Möglichkeiten der Modifizierung von Impfstoffen stets den EU-GMP-Leitfaden für Human- und Tierarzneimittel zu beachten. Dabei handelt es sich um Richtlinien zur Qualitätssicherung der Produktion von Arzneimittel und Wirkstoffen. Es bleibt noch ein weiter Weg bis zur Implementierung der Immuntherapie zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen. Die vielversprechenden Ergebnisse bisheriger Untersuchungen lassen uns jedoch optimistisch in die Zukunft blicken.

### 4.3 Impfung als primär, sekundär oder tertiär Prävention?

ALS und FTD gehören zum Spektrum der neurodegenerativen Erkrankungen. Diese sind definiert durch den fortschreitenden Untergang von Nervenzellen und damit einhergehenden neuronalen Funktionsstörungen. Es ist davon auszugehen, dass die Akkumulation aggregierender Proteine pathologische Prozesse induziert, welche im weiteren Verlauf zu einem progressiven Verlust von Neuronen führt (330). Diese sogenannten Proteinopathien beginnen oft Jahre vor Manifestation klinischer Symptome (331). Sobald motorische und kognitive Defizite beobachtet werden, ist anzunehmen, dass eine Degeneration von Neuronen und neuronaler Schaltkreise bereits stattgefunden hat. Es existieren elektrophysiologische Methoden mit deren Hilfe Neurodegeneration in Motoneuronenerkrankungen wie ALS gemessen werden kann. Beim sogenannten MUNIX (*motor unit number index*) werden unter Zuhilfenahme des Muskelsummenaktionspotentials (MSAP) und des oberflächen-EMG Interferenzmusters die motorischen Einheiten eines Muskels erfasst (332). Bei ALS Patienten kommt es im Vergleich zu gesunden Probanden zu einem deutlichen Abfall des MUNIX (333, 334). Diese Abnahme beginnt wahrscheinlich Jahre vor Manifestation motorischer Defizite und schreitet im Verlauf kontinuierlich voran (335). Eine Verbesserung des Zustandes nach Symptombeginn ist nach aktuellem Wissensstand nicht mehr realisierbar. Aus diesem Grund ist die Behandlung von Proteinopathien Gegenstand intensiver Forschung, um Behandlungsmöglichkeiten zu finden dem neuronalen Untergang entgegenzuwirken und somit den Krankheitsprozess aufzuhalten. Jegliche Maßnahmen, die den Erhalt der Gesundheit bzw. die Eindämmung der Krankheit zum Ziel haben, werden als Präventivmaßnahmen bezeichnet. Dabei wird zwischen Primär-, Sekundär- und Tertiärprävention unterschieden (336). Primärprävention beruht auf der Verhinderung der Krankheitsentstehung in der Allgemeinbevölkerung. Sekundärprävention umfasst die frühzeitige Behandlung betroffener Personen vor Manifestation klinischer Symptome. Tertiärprävention zielt darauf ab, Krankheitsfolgen zu mildern und progressive Krankheitsverläufe zu verhindern (336). Basierend auf Untersuchungen in Zellkulturen und Mäusen scheinen bei der C9orf72 ALS/FTD vor allem die DPR-Proteine poly-GA, poly-PR und poly-GR eine entscheidende Rolle für die Krankheitsentstehung zu spielen. Poly-GA bildet Amyloid-ähnliche Fibrillen und sequestriert das Proteasom und andere zelluläre Proteine (11, 148). Die Argininreichen DPR-Proteine poly-GR und poly-PR sequestrieren neben diversen RNA-

Bindungsproteinen auch Ribosomen und beeinträchtigen somit deren Phasenseparation und Funktion (143, 337). Die Aggregatbildung führt so durch Beeinträchtigung der Zellmorphologie, Ribosomen-Biogenese, des nukleozytoplasmatischen Transports, Neuriten-Wachstums und Ubiquitin-Proteasom-Systems zur TDP-43 Pathologie und einem Untergang von Neuronen (18, 20, 21, 22, 148). Zahlreiche C9orf72 Mausmodelle mit viraler oder transgener DPR-Protein-Expression zeigen pathologische Veränderungen und unterstreichen die kritische Rolle der DPR-Proteine für die Krankheitsentstehung (19, 145, 159, 162, 164, 169). Die Nutzung aktiver und passiver Immuntherapien scheint ein aussichtsreicher Behandlungsansatz zur Unterbindung der DPR-Protein Pathologie. Nguyen und Kollegen konnten in einem C9orf72 Mausmodell durch die Injektion eines hochaffinen humanen anti-GA Antikörpers DPR-Protein Aggregate reduzieren und die Überlebenszeit signifikant verlängern (338). Dabei exprimierten die Mäuse ein von Patienten abgeleitetes BAC-Konstrukt, das für Teile des humanen C9orf72-Gens mit der (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)-Hexanukleotid-Expansion codierte. Dieses Modell bildet sowohl die (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>n</sub> RNA-Fozi als auch die DPR-Protein Pathologie nach, ist allerdings im Feld umstritten (159, 339, 340). Nach wöchentlicher Applikation humaner anti-GA Antikörper mit muriner konstanter Region (30 mg/kg) konnte eine Reduktion der poly-GA Last und der Sequestrierung anderer Proteine erreicht werden. Zudem wurde eine Abnahme von Neuroinflammation und Neurodegeneration sowie ein längeres Überleben beobachtet (338). Die Beobachtungen dieser Arbeit unterstützen unsere Ergebnisse. Interessanterweise hatten anti-GP Antikörper keinen Effekt. Die positiven Effekte der poly-GA Antikörper in einem BAC Mausmodell mit Expression von poly-GA/GP/GR und RNA Fozi sprechen für eine dominante Rolle von poly-GA für die C9orf72 ALS und FTD und suggerieren, dass poly-GA einen vielversprechenden Angriffspunkt zur Behandlung der Erkrankung darstellt. Die im Rahmen dieser beiden Studien erhobenen Ergebnisse unterstreichen die Wirksamkeit der aktiven Impfung, wie auch der Gabe monoklonaler Antikörper im frühen Stadium der ALS/FTD. Leider konnte die Wirksamkeit des monoklonalen Antikörpers in einer aktuellen Studie unter Verwendung eines Mausmodells mit AAV-basierter Expression von (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)<sub>n</sub> nicht bestätigt werden (341). Der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse in den verschiedenen Mausmodellen kann nur durch weitere gezielte Experimente identifiziert werden. In einem 2.BAC Mausmodell zeigte sich hingegen eine leichte Verbesserung der motorischen Leistungsfähigkeit. Aus

diesem Grund sollte auch die aktive Immunisierung an weiteren Mausmodellen getestet werden. Ausgehend von der Annahme, dass beide Ansätze in Zukunft klinische Anwendung finden, stellt sich die Frage, welche Therapie zu welchem Zeitpunkt vielversprechender wäre.

Aktive Impfungen werden typischerweise zur Primärprävention von Infektionskrankheiten genutzt und haben dadurch in der Vergangenheit schon zur weltweiten bzw. regionalen Ausrottung vieler Krankheiten wie beispielsweise Pocken, Tetanus, Polio oder Diphtherie beigetragen (342). Im Falle der C9orf72 ALS/FTD handelt es sich um eine seltene genetische Erkrankung, sodass die Impfung der Allgemeinbevölkerung nicht sinnvoll wäre. Im Gegensatz dazu könnte die Impfung als sekundäre Präventionsmaßnahme Verwendung finden. Diese richtet sich vor allem an Verwandte/Kinder von C9orf72 Patienten. Mit Hilfe genetischer Testungen kann die Mutation und somit die Erkrankung bereits vor Manifestation klinischer Symptome detektiert werden. Eine Impfung dieser Personengruppe bietet die Möglichkeit durch die frühzeitige konstitutive Antikörperexpression die Krankheitsentstehung zu verhindern bzw. zu verlangsamen. Hierfür müssten jedoch Auffrischimpfungen durchgeführt werden, da, unter Würdigung der Ergebnisse unserer Arbeit, hohe Antikörper-Titer benötigt werden, um eine suffiziente Wirkung zu erzielen. Es stellt sich daher die Frage wie oft eine Boosterung im Jahr erfolgen müsste, um den Titer hoch genug zu halten. Eine Antwort hierauf kann in klinischen Studien evaluiert werden. Immuntherapie könnte sich darüber hinaus auch zur Tertiärprävention eignen. Dabei hätte die direkte Gabe monoklonaler Antikörper gegenüber der aktiven Impfung den Vorteil eines sofortigen Wirkungseintritts.

Allerdings ist davon auszugehen, dass die Erkrankung in symptomatischen Patienten aufgrund des Verlustes neuronaler Schaltkreise bereits zu weit fortgeschritten ist, als dass durch eine Impfung eine Verbesserung der Symptome erzielt werden könnte. Aus diesem Grund ist es von größter Wichtigkeit die Erkrankung bereits im Anfangsstadium zu diagnostizieren, damit ein progressiver Verlauf unterbunden werden kann. Eine Möglichkeit, die bereits in einigen Kliniken standardmäßig durchgeführt wird, ist die genetische Testung von Patienten mit Verdacht auf neurodegenerative Erkrankungen. Daneben gibt es neue Diagnoseverfahren, wie die Bestimmung der Konzentration neurodegenerativer Biomarker in der Cerebrospinalflüssigkeit. Hierfür eignet sich beispielsweise poly-GP. In

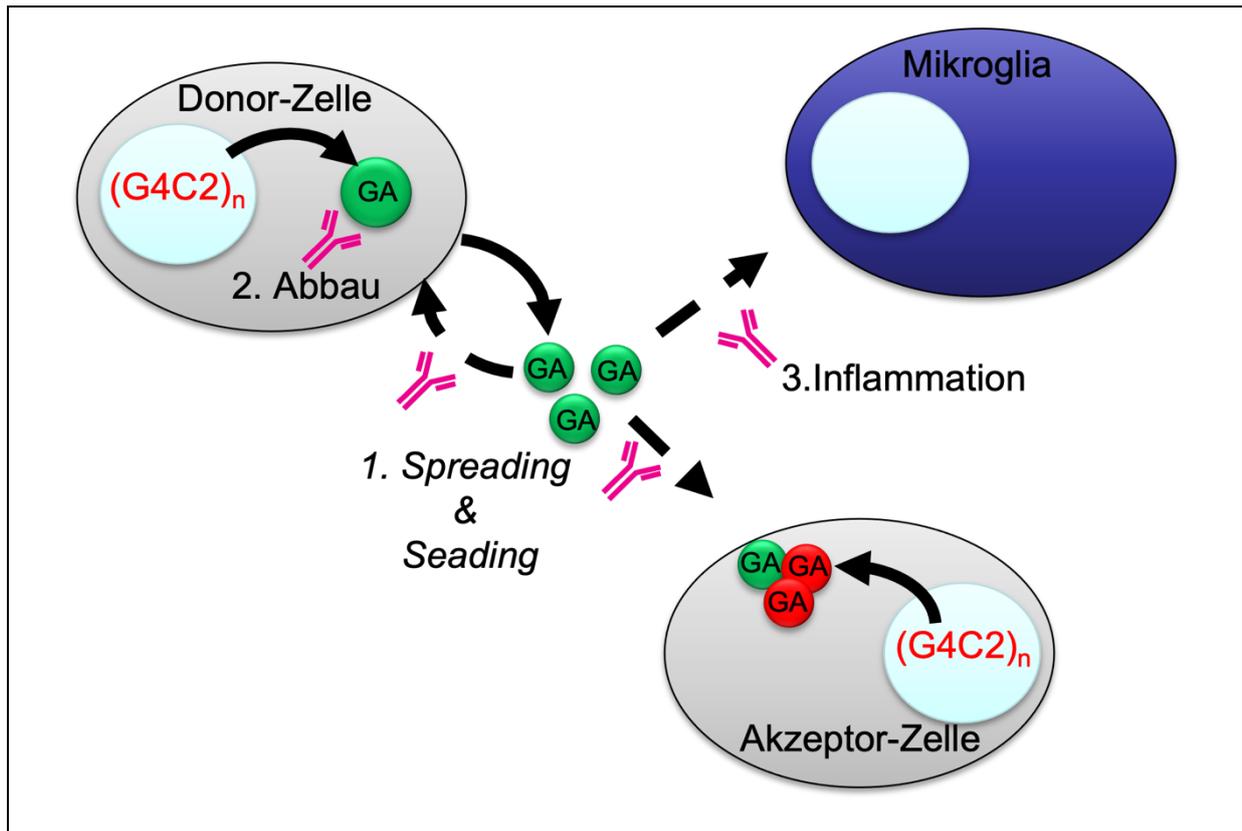
Untersuchungen asymptomatischer und symptomatischer C9orf72 Mutationsträger konnte poly-GP in der Cerebrospinalflüssigkeit detektiert werden (81, 343, 344). Im Unterschied dazu wurde in Kontrollen ohne C9orf72 Mutation kein poly-GP detektiert (343). In einer Studie wurde poly-GP als Therapiemarker verwendet. Es konnte eine Reduktion der poly-GP Spiegel in Zell- und Mausmodellen nach Behandlung mit Antisense Oligonukleotiden gezeigt werden (80). Somit bietet sich die interessante Möglichkeit poly-GP als Biomarker zur Früherkennung der Erkrankung und zur Kontrolle des Therapieerfolges für klinische Studien mit Inhibitoren der DPR-Expression, wie z.B. Antisense Oligonukleotide, einzusetzen. In einer kürzlich erschienenen Arbeit konnten auch poly-GA und poly-GR in der Cerebrospinalflüssigkeit von C9orf72 Mutationsträgern nachgewiesen werden, die aber nicht mit der Erkrankungsdauer bzw. der Symptomatik korrelieren. So wurden sowohl in symptomatischen als auch in asymptomatischen Mutationsträgern ähnliche poly-GA/GR Spiegel detektiert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es durch ASO-Therapie zu einer signifikanten Reduktion der DPR-Proteine im Liquor kam (345). Somit könnte man DPR-Spiegel im Liquor als Marker zur Kontrolle des Therapieerfolges einer aktiven oder passiven Immuntherapie einsetzen.

#### 4.4 Wirkungsweise der Antikörperantwort

Unabhängig davon, ob eine aktive oder passive Immuntherapie angewendet wird und zu welchem Zeitpunkt dies geschieht, stellt sich die Frage nach der zugrundeliegenden Wirkungsweise der Antikörperantwort. Poly-GA ist eines von 5 DPR Proteinen, das aus Transkripten der  $(G_4C_2)_n$ -Hexanukleotid-Expansion translatiert wird (11, 12). Aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaft aggregiert poly-GA und bildet Amyloid-ähnliche Fibrillen, welche die Grundlage der Koaggregation mit anderen Proteinen darstellen (14, 148). Zudem wurde beobachtet, dass poly-GA positiv rückgekoppelt die RNA-Fozi verstärkt und eine Aussaat der DPR-Aggregatbildung bewirkt. Neben der intrazellulären Protein-Aggregation konnte gezeigt werden, dass poly-GA auch von Zelle zu Zelle übertragen wird und dadurch pathologische Prozesse in Akzeptor-Zellen induziert (23, 24, 147). Die genauen Mechanismen der Zell-Zell-Transmission sind nicht komplett verstanden. Man geht davon aus, dass das hydrophobe DPR Protein durch unkonventionelle Sekretion bzw. passive Freisetzung nach extrazellulär gelangt, ähnlich wie es für Tau und alpha-Synuclein beschrieben wurde (346). Westergard et al zeigen sowohl Exosomen-vermittelte also auch Exosomen-unabhängige Übertragungen von DPR Proteinen. Der Prozess der Zell-Zell-Transmission und Aussaat der Aggregatbildung wird als „*Spreading & Seeding*“ bezeichnet. Auf Grundlage dieser Beobachtungen lassen sich zwei unterschiedliche Wirkmechanismen postulieren: (1) Auf der einen Seite könnte der Antikörper extrazelluläres poly-GA sequestrieren und dadurch die Wiederaufnahme und Zell-Zell-Transmission unterbinden. Durch die Neutralisierung des extrazellulären poly-GA entfällt somit die Aussaat und es werden weniger poly-GA Aggregate gebildet. Zhou und Kollegen konnten diesen Sachverhalt bereits mit Hilfe von Zellkultur-Modellen nachweisen (23). (2) Auf der anderen Seite könnte anti-GA von Zellen aufgenommen werden und über den intrazellulären Fc-Rezeptor TRIM21 den proteasomalen Abbau fördern (238, 338, 347). Es wurde bereits beschrieben, dass eine genetische oder pharmakologische Aktivierung des Proteasoms einen gesteigerten poly-GA Abbau bewirkt (24). Darüber hinaus ist es möglich, dass beide Mechanismen simultan ablaufen. Neben der verstärkten proteasomalen Aktivierung entfällt durch die Neutralisierung des poly-GA dessen inhibierender Einfluss auf das Proteasom. Sowohl die intrazelluläre als auch die extrazelluläre poly-GA Reduktion könnte im weiteren Verlauf zu einer verminderten Mikroglia-Aktivierung führen. So besteht die Möglichkeit durch Neutralisierung von

extrazellulärem poly-GA dessen direkten Einfluss auf die Mikroglia-Aktivierung zu hemmen. Alternativ könnte die Aktivierung des Proteasoms und der intrazelluläre poly-GA Abbau zu einer Reduktion des neuronalen Stresses führen, was wiederum eine verminderte Mikroglia-Antwort bewirkt. So konnte in unserer Arbeit mittels Transkriptom-Analysen gezeigt werden, dass die durch poly-GA vermittelte Neuroinflammation mit Hilfe von Immuntherapie abgeschwächt werden konnte. Zusätzlich zu den hier beschriebenen Mechanismen bewirkt TDP43-Mislokalisierung eine verstärkte Mikroglia-Aktivierung (348, 349). In Ova-(GA)<sub>10</sub>-geimpften Mäusen kommt es durch Abnahme der intrazellulären poly-GA Aggregate zu weniger TDP-43-assoziiierter Inflammation.

Weil die Mikroglia-Phänotypen in unserer Arbeit nach Immunisierung stärker reduziert sind als die poly-GA Aggregate gehen wir davon aus, dass die extrazelluläre Antikörperantwort im Vergleich zur intrazellulären Antwort einen größeren Einfluss hat. Im Falle einer intrazellulären anti-GA Wirkung würde man einen stärkeren Rückgang der Aggregatdichte erwarten. Die Reduktion ist eher auf eine Unterbindung der Wiederaufnahme und Zell-Zell-Transmission zurückzuführen, sodass es dadurch zu einer Hemmung der Aussaat der DPR-Aggregatbildung kommt. Dennoch bedarf es weiterer Untersuchungen, um den genauen Mechanismus dieses Prozesses und die Möglichkeit diesen Vorgang zu modulieren, genauer klären zu können.



**Abbildung 23: Möglicher Mechanismus der anti-GA Antikörper (Quelle: Dieter Edbauer)**

Schematische Darstellung der Wirkmechanismen. Antikörper sequestriert extrazelluläres poly-GA und unterbindet so *Spreading & Seeding* (1) und Mikroglia-Aktivierung (3). Antikörper sequestriert intrazelluläres poly-GA und fördert Abbau via TRIM21 und reduzieren so die neuronale Toxizität (2). Nukleus in Hellblau dargestellt.

## 4.5 Ausblick

Mit den hier vorgestellten Ergebnissen konnten vielversprechende Erkenntnisse über die Wirksamkeit der poly-GA Immunisierung in der prodromalen Phase, d.h. vor Auftritt motorischer Defizite, im *C9orf72* ALS Mausmodell gewonnen werden. Im nächsten Schritt sollte die Wirkung einer poly-GA Impfung nach Symptomanifestation untersucht werden. Hierfür wurde im poly-GA Mausmodell die Impfung ab Woche 13, nach Entwicklung motorischer Defizite, begonnen. Zur Untersuchung des Impfeffektes wurde die NFL-Konzentration im Liquor der Mäuse bestimmt. Diese eignet sich als Marker für axonale Schädigung und wird oftmals in neurodegenerativen Erkrankungen als Biomarker verwendet (308, 309, 310). In einem Pilotversuch konnte späte anti-GA Immunisierung in einer kleinen Gruppe von GA-CFP Mäusen die Neurofilament-Spiegel ähnlich wie bei präsymptomatischen Impfungen senken (Daten nicht gezeigt). Es scheint zu einer Stabilisierung des Krankheitszustandes und somit zu einer Stagnation des Krankheitsprogresses zu kommen. Daraus lässt sich ableiten, dass die Impfung möglicherweise nicht nur präventiven, sondern auch therapeutischen Nutzen haben könnte. Weitere Studien in größeren Kohorten und zu späteren Zeitpunkten sind nötig.

Die Impfung wurde in einem reinen poly-GA Mausmodell untersucht. Aus diesem Grund sollte die aktive Immuntherapie in einem BAC-transgenen Mausmodell eruiert werden, welches die  $(G_4C_2)_n$ -Hexanukleotid-Sequenz Verlängerung exprimiert, weil solche Modelle potentiell auch Toxizität durch RNA Foci und andere DPR Proteine zeigen. Sie spiegeln somit die Neuropathologie von *C9orf72* ALS/FTD genauer wider. Allerdings zeigt nur eine BAC-Linie deutliche Symptome, die aber nicht in allen Laboratorien reproduzierbar sind und eventuell durch den genetischen Hintergrund dieser Linie verursacht werden. Drei andere BAC Linien zeigen keine oder minimale Symptome, so dass Therapiestudien nur begrenzt aussagekräftig wären (5, 159, 160, 161). Der Arbeitsgruppe um Laura Ranum gelang es in ihrem (umstrittenen) *C9orf72* Mausmodell mit  $(G_4C_2)$ -Hexanukleotid-Expansion durch Injektion eines hochaffinen humanen anti-GA Antikörpers pathologische Prozesse zu unterbinden und so das Überleben zu verlängern und eine Verbesserung anderer phänotypischer Auffälligkeiten zu erzielen (338). Leider konnte das Ergebnis in zwei anderen Mausmodellen unter Verwendung des gleichen Antikörpers nicht reproduziert werden. Nur in einem der beiden Modelle wurde die motorische Leistungsfähigkeit

unter Gabe des monoklonalen Antikörpers leicht verbessert (341). In Zusammenschau der hier beschriebenen Arbeit und meiner Ergebnisse erweist sich poly-GA als ein wichtiges DPR Protein, dass weitere pathologische Veränderungen, wie die Mislokalisierung von TDP-43 ins Zytoplasma, auslöst. Somit scheint die Unterbindung der poly-GA Pathologie einen attraktiven Behandlungsansatz für die C9orf72 ALS und FTD darzustellen. Es gilt jedoch zu beachten, dass die Speziesunterschiede zwischen Nagetier und Mensch keine 100%-ige Übertragung der Ergebnisse erlauben. Aus diesem Grund müssen zukünftig Erfolg und Verträglichkeit einer aktiven oder passiven Immuntherapie am Menschen untersucht werden.

## Literaturverzeichnis

1. Ash PE, Bieniek KF, Gendron TF, Caulfield T, Lin WL, DeJesus-Hernandez M, et al. Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron*. 2013;77(4):639-46.
2. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011;72(2):245-56.
3. Renton AE, Majounie E, Waite A, Simon-Sanchez J, Rollinson S, Gibbs JR, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*. 2011;72(2):257-68.
4. Farg MA, Sundaramoorthy V, Sultana JM, Yang S, Atkinson RAK, Levina V, et al. C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Human molecular genetics*. 2017;26(20):4093-4.
5. Jiang J, Zhu Q, Gendron TF, Saberi S, McAlonis-Downes M, Seelman A, et al. Gain of Toxicity from ALS/FTD-Linked Repeat Expansions in C9ORF72 Is Alleviated by Antisense Oligonucleotides Targeting GGGGCC-Containing RNAs. *Neuron*. 2016;90(3):535-50.
6. O'Rourke JG, Bogdanik L, Yanez A, Lall D, Wolf AJ, Muhammad AK, et al. C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. *Science (New York, NY)*. 2016;351(6279):1324-9.
7. McCauley ME, O'Rourke JG, Yáñez A, Markman JL, Ho R, Wang X, et al. C9orf72 in myeloid cells suppresses STING-induced inflammation. *Nature*. 2020;585(7823):96-101.
8. Gendron TF, Bieniek KF, Zhang YJ, Jansen-West K, Ash PE, Caulfield T, et al. Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9FTD/ALS. *Acta neuropathologica*. 2013;126(6):829-44.
9. Mori K, Lammich S, Mackenzie IR, Forne I, Zilow S, Kretzschmar H, et al. hnRNP A3 binds to GGGGCC repeats and is a constituent of p62-positive/TDP43-negative inclusions in the hippocampus of patients with C9orf72 mutations. *Acta neuropathologica*. 2013;125(3):413-23.
10. Reddy K, Zamiri B, Stanley SY, Macgregor RB, Jr., Pearson CE. The disease-associated r(GGGGCC)<sub>n</sub> repeat from the C9orf72 gene forms tract length-dependent uni- and multimolecular RNA G-quadruplex structures. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(14):9860-6.
11. Mori K, Arzberger T, Grasser FA, Gijssels I, May S, Rentzsch K, et al. Bidirectional transcripts of the expanded C9orf72 hexanucleotide repeat are translated into aggregating dipeptide repeat proteins. *Acta neuropathologica*. 2013;126(6):881-93.
12. Mori K, Weng SM, Arzberger T, May S, Rentzsch K, Kremmer E, et al. The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTL/ALS. *Science (New York, NY)*. 2013;339(6125):1335-8.

13. Kwon I, Xiang S, Kato M, Wu L, Theodoropoulos P, Wang T, et al. Poly-dipeptides encoded by the C9orf72 repeats bind nucleoli, impede RNA biogenesis, and kill cells. *Science (New York, NY)*. 2014;345(6201):1139-45.
14. May S, Hornburg D, Schludi MH, Arzberger T, Rentzsch K, Schwenk BM, et al. C9orf72 FTL/ALS-associated Gly-Ala dipeptide repeat proteins cause neuronal toxicity and Unc119 sequestration. *Acta neuropathologica*. 2014;128(4):485-503.
15. Zhang YJ, Jansen-West K, Xu YF, Gendron TF, Bieniek KF, Lin WL, et al. Aggregation-prone c9FTD/ALS poly(GA) RAN-translated proteins cause neurotoxicity by inducing ER stress. *Acta neuropathologica*. 2014;128(4):505-24.
16. Zu T, Liu Y, Banez-Coronel M, Reid T, Pletnikova O, Lewis J, et al. RAN proteins and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(51):E4968-77.
17. Khosravi B, Hartmann H, May S, Mohl C, Ederle H, Michaelson M, et al. Cytoplasmic poly-GA aggregates impair nuclear import of TDP-43 in C9orf72 ALS/FTLD. *Human molecular genetics*. 2017;26(4):790-800.
18. Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Hosokawa M, Shimozawa A, Hirai S, Okado H, et al. C9ORF72 dipeptide repeat poly-GA inclusions promote: intracellular aggregation of phosphorylated TDP-43. *Human molecular genetics*. 2018.
19. Schludi MH, Becker L, Garrett L, Gendron TF, Zhou Q, Schreiber F, et al. Spinal poly-GA inclusions in a C9orf72 mouse model trigger motor deficits and inflammation without neuron loss. *Acta neuropathologica*. 2017;134(2):241-54.
20. Zhang YJ, Gendron TF, Grima JC, Sasaguri H, Jansen-West K, Xu YF, et al. C9ORF72 poly(GA) aggregates sequester and impair HR23 and nucleocytoplasmic transport proteins. *Nature neuroscience*. 2016;19(5):668-77.
21. Jovicic A, Mertens J, Boeynaems S, Bogaert E, Chai N, Yamada SB, et al. Modifiers of C9orf72 dipeptide repeat toxicity connect nucleocytoplasmic transport defects to FTD/ALS. *Nature neuroscience*. 2015;18(9):1226-9.
22. Boeynaems S, Bogaert E, Michiels E, Gijssels I, Sieben A, Jovicic A, et al. Drosophila screen connects nuclear transport genes to DPR pathology in c9ALS/FTD. *Scientific reports*. 2016;6:20877.
23. Zhou Q, Lehmer C, Michaelson M, Mori K, Alterauge D, Baumjohann D, et al. Antibodies inhibit transmission and aggregation of C9orf72 poly-GA dipeptide repeat proteins. *EMBO molecular medicine*. 2017;9(5):687-702.
24. Khosravi B, LaClair KD, Riemenschneider H, Zhou Q, Frottin F, Mareljic N, et al. Cell-to-cell transmission of C9orf72 poly-(Gly-Ala) triggers key features of ALS/FTD. *The EMBO journal*. 2020:e102811.
25. 6 F. Demenz Zi-Kodier-Manual: Zentralinstitut für Kassenärztliche Versorgung in Deutschland; [cited 2021 15.10.2021]. Available from: [https://www.zi.de/fileadmin/images/content/PDFs\\_alle/Kodiermanual\\_Demenz.pdf](https://www.zi.de/fileadmin/images/content/PDFs_alle/Kodiermanual_Demenz.pdf).
26. Bang J, Spina S, Miller BL. Frontotemporal dementia. *Lancet (London, England)*. 2015;386(10004):1672-82.
27. Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie PuND, Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN), Deutschen Alzheimer Gesellschaft e.V. – Selbsthilfe Demenz,. S3-Leitlinie "Demenzen" (Langversion – Januar 2016) 2016,

January [updated 2016, January. Available from:

[https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/038-013l\\_S3-Demenzen-2016-07.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/038-013l_S3-Demenzen-2016-07.pdf).

28. Hogan DB, Jette N, Fiest KM, Roberts JI, Pearson D, Smith EE, et al. The Prevalence and Incidence of Frontotemporal Dementia: a Systematic Review. *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques*. 2016;43 Suppl 1:S96-s109.
29. Rosen HJ, Gorno-Tempini ML, Goldman WP, Perry RJ, Schuff N, Weiner M, et al. Patterns of brain atrophy in frontotemporal dementia and semantic dementia. *Neurology*. 2002;58(2):198-208.
30. Bott NT, Radke A, Stephens ML, Kramer JH. Frontotemporal dementia: diagnosis, deficits and management. *Neurodegener Dis Manag*. 2014;4(6):439-54.
31. Rascovsky K, Hodges JR, Knopman D, Mendez MF, Kramer JH, Neuhaus J, et al. Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain : a journal of neurology*. 2011;134(Pt 9):2456-77.
32. Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, Kertesz A, Mendez M, Cappa SF, et al. Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology*. 2011;76(11):1006-14.
33. Kansal K, Mareddy M, Sloane KL, Minc AA, Rabins PV, McGready JB, et al. Survival in Frontotemporal Dementia Phenotypes: A Meta-Analysis. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 2016;41(1-2):109-22.
34. Onyike CU, Diehl-Schmid J. The epidemiology of frontotemporal dementia. *International review of psychiatry (Abingdon, England)*. 2013;25(2):130-7.
35. Vieira RT, Caixeta L, Machado S, Silva AC, Nardi AE, Arias-Carrion O, et al. Epidemiology of early-onset dementia: a review of the literature. *Clinical practice and epidemiology in mental health : CP & EMH*. 2013;9:88-95.
36. Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders : official publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases*. 2000;1(5):293-9.
37. Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN). Amyotrophe Lateralsklerose (Motoneuron- erkrankungen) 2014, June 1 [updated 2014, June 1. Available from: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/030-001l\\_Amyotrophe\\_Lateralsklerose\\_ALS\\_2015-06.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-001l_Amyotrophe_Lateralsklerose_ALS_2015-06.pdf).
38. Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet (London, England)*. 2011;377(9769):942-55.
39. Al-Chalabi A, Hardiman O, Kiernan MC, Chio A, Rix-Brooks B, van den Berg LH. Amyotrophic lateral sclerosis: moving towards a new classification system. *The Lancet Neurology*. 2016;15(11):1182-94.
40. Andersen PM, Al-Chalabi A. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nature reviews Neurology*. 2011;7(11):603-15.
41. Chio A, Logroscino G, Traynor BJ, Collins J, Simeone JC, Goldstein LA, et al. Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology*. 2013;41(2):118-30.

42. Haverkamp LJ, Appel V, Appel SH. Natural history of amyotrophic lateral sclerosis in a database population. Validation of a scoring system and a model for survival prediction. *Brain : a journal of neurology*. 1995;118 ( Pt 3):707-19.
43. Riviere M, Meininger V, Zeisser P, Munsat T. An analysis of extended survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis treated with riluzole. *Archives of neurology*. 1998;55(4):526-8.
44. Gao M, Zhu L, Chang J, Cao T, Song L, Wen C, et al. Safety and Efficacy of Edaravone in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Drug Investig*. 2023;43(1):1-11.
45. Paganoni S, Macklin EA, Hendrix S, Berry JD, Elliott MA, Maiser S, et al. Trial of Sodium Phenylbutyrate-Taurursodiol for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med*. 2020;383(10):919-30.
46. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Amyotrophe Lateralsklerose (Motoneuronenerkrankung) Leitlinien der DGN2008 [Available from: [https://dgn.org/wp-content/uploads/2013/01/II08kap\\_019.pdf](https://dgn.org/wp-content/uploads/2013/01/II08kap_019.pdf)].
47. Burrell JR, Kiernan MC, Vucic S, Hodges JR. Motor neuron dysfunction in frontotemporal dementia. *Brain : a journal of neurology*. 2011;134(Pt 9):2582-94.
48. Murphy J, Factor-Litvak P, Goetz R, Lomen-Hoerth C, Nagy PL, Hupf J, et al. Cognitive-behavioral screening reveals prevalent impairment in a large multicenter ALS cohort. *Neurology*. 2016;86(9):813-20.
49. Buratti E, Baralle FE. Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:867-78.
50. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, NY)*. 2006;314(5796):130-3.
51. Melamed Z, López-Erauskin J, Baughn MW, Zhang O, Drenner K, Sun Y, et al. Premature polyadenylation-mediated loss of stathmin-2 is a hallmark of TDP-43-dependent neurodegeneration. *Nature neuroscience*. 2019;22(2):180-90.
52. Ling JP, Pletnikova O, Troncoso JC, Wong PC. TDP-43 repression of nonconserved cryptic exons is compromised in ALS-FTD. *Science (New York, NY)*. 2015;349(6248):650-5.
53. Humphrey J, Emmett W, Fratta P, Isaacs AM, Plagnol V. Quantitative analysis of cryptic splicing associated with TDP-43 depletion. *BMC Med Genomics*. 2017;10(1):38.
54. Brown AL, Wilkins OG, Keuss MJ, Hill SE, Zanovello M, Lee WC, et al. TDP-43 loss and ALS-risk SNPs drive mis-splicing and depletion of UNC13A. *Nature*. 2022;603(7899):131-7.
55. Ma XR, Prudencio M, Koike Y, Vatsavayai SC, Kim G, Harbinski F, et al. TDP-43 represses cryptic exon inclusion in the FTD-ALS gene UNC13A. *Nature*. 2022;603(7899):124-30.
56. Van Deerlin VM, Leverenz JB, Bekris LM, Bird TD, Yuan W, Elman LB, et al. TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis. *The Lancet Neurology*. 2008;7(5):409-16.

57. Pottier C, Ravenscroft TA, Sanchez-Contreras M, Rademakers R. Genetics of FTLD: overview and what else we can expect from genetic studies. *Journal of neurochemistry*. 2016;138 Suppl 1:32-53.
58. Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, et al. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature*. 2006;442(7105):916-9.
59. Borroni B, Ferrari F, Galimberti D, Nacmias B, Barone C, Bagnoli S, et al. Heterozygous TREM2 mutations in frontotemporal dementia. *Neurobiology of aging*. 2014;35(4):934.e7-10.
60. Cruts M, Gijselink I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, Pirici D, et al. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature*. 2006;442(7105):920-4.
61. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*. 1998;393(6686):702-5.
62. Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL, Hummerich H, et al. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nature genetics*. 2005;37(8):806-8.
63. Kwiatkowski TJ, Jr., Bosco DA, Leclerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, NY)*. 2009;323(5918):1205-8.
64. Rosen DR. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993;364(6435):362.
65. Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, NY)*. 2008;319(5870):1668-72.
66. Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, De Vos KJ, Nishimura AL, Sreedharan J, et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science (New York, NY)*. 2009;323(5918):1208-11.
67. Bannwarth S, Ait-Ei-Mkadem S, Chaussenot A, Genin EC, Lacas-Gervais S, Fragaki K, et al. A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain : a journal of neurology*. 2014;137(Pt 8):2329-45.
68. Cirulli ET, Lasseigne BN, Petrovski S, Sapp PC, Dion PA, Leblond CS, et al. Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science (New York, NY)*. 2015;347(6229):1436-41.
69. Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, et al. Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*. 2011;477(7363):211-5.
70. Fecto F, Yan J, Vemula SP, Liu E, Yang Y, Chen W, et al. SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of neurology*. 2011;68(11):1440-6.
71. Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M, Abramzon Y, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, et al. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron*. 2010;68(5):857-64.

72. Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 2010;465(7295):223-6.
73. Pottier C, Bieniek KF, Finch N, van de Vorst M, Baker M, Perkersen R, et al. Whole-genome sequencing reveals important role for TBK1 and OPTN mutations in frontotemporal lobar degeneration without motor neuron disease. *Acta neuropathologica*. 2015;130(1):77-92.
74. Rubino E, Rainero I, Chio A, Rogaeva E, Galimberti D, Fenoglio P, et al. SQSTM1 mutations in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2012;79(15):1556-62.
75. Watts GD, Wymer J, Kovach MJ, Mehta SG, Mumm S, Darvish D, et al. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nature genetics*. 2004;36(4):377-81.
76. Schludi MH. Analysis of the C9orf72 dipeptide-repeat proteins and characterization of a poly-GA mouse model [Dissertation]. LMU München: LMU München; 2018.
77. van der Zee J, Gijssels I, Dillen L, Van Langenhove T, Theuns J, Engelborghs S, et al. A pan-European study of the C9orf72 repeat associated with FTL: geographic prevalence, genomic instability, and intermediate repeats. *Human mutation*. 2013;34(2):363-73.
78. Ng AS, Rademakers R, Miller BL. Frontotemporal dementia: a bridge between dementia and neuromuscular disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015;1338:71-93.
79. Zou ZY, Zhou ZR, Che CH, Liu CY, He RL, Huang HP. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2017;88(7):540-9.
80. Gendron TF, Chew J, Stankowski JN, Hayes LR, Zhang YJ, Prudencio M, et al. Poly(GP) proteins are a useful pharmacodynamic marker for C9ORF72-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Science translational medicine*. 2017;9(383).
81. Lehmer C, Oeckl P, Weishaupt JH, Volk AE, Diehl-Schmid J, Schroeter ML, et al. Poly-GP in cerebrospinal fluid links C9orf72-associated dipeptide repeat expression to the asymptomatic phase of ALS/FTD. *EMBO molecular medicine*. 2017;9(7):859-68.
82. Vatsavayai SC, Yoon SJ, Gardner RC, Gendron TF, Vargas JN, Trujillo A, et al. Timing and significance of pathological features in C9orf72 expansion-associated frontotemporal dementia. *Brain : a journal of neurology*. 2016;139(Pt 12):3202-16.
83. Edbauer D, Haass C. An amyloid-like cascade hypothesis for C9orf72 ALS/FTD. *Current opinion in neurobiology*. 2016;36:99-106.
84. Boeve BF, Boylan KB, Graff-Radford NR, DeJesus-Hernandez M, Knopman DS, Pedraza O, et al. Characterization of frontotemporal dementia and/or amyotrophic lateral sclerosis associated with the GGGGCC repeat expansion in C9ORF72. *Brain : a journal of neurology*. 2012;135(Pt 3):765-83.
85. Chio A, Borghero G, Restagno G, Mora G, Drepper C, Traynor BJ, et al. Clinical characteristics of patients with familial amyotrophic lateral sclerosis carrying

- the pathogenic GGGGCC hexanucleotide repeat expansion of C9ORF72. *Brain : a journal of neurology*. 2012;135(Pt 3):784-93.
86. Byrne S, Elamin M, Bede P, Shatunov A, Walsh C, Corr B, et al. Cognitive and clinical characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis carrying a C9orf72 repeat expansion: a population-based cohort study. *The Lancet Neurology*. 2012;11(3):232-40.
87. Beck J, Poulter M, Hensman D, Rohrer JD, Mahoney CJ, Adamson G, et al. Large C9orf72 hexanucleotide repeat expansions are seen in multiple neurodegenerative syndromes and are more frequent than expected in the UK population. *American journal of human genetics*. 2013;92(3):345-53.
88. Fratta P, Poulter M, Lashley T, Rohrer JD, Polke JM, Beck J, et al. Homozygosity for the C9orf72 GGGGCC repeat expansion in frontotemporal dementia. *Acta neuropathologica*. 2013;126(3):401-9.
89. Majounie E, Renton AE, Mok K, Dopper EG, Waite A, Rollinson S, et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *The Lancet Neurology*. 2012;11(4):323-30.
90. Simon-Sanchez J, Dopper EG, Cohn-Hokke PE, Hukema RK, Nicolaou N, Seelaar H, et al. The clinical and pathological phenotype of C9ORF72 hexanucleotide repeat expansions. *Brain : a journal of neurology*. 2012;135(Pt 3):723-35.
91. Stewart H, Rutherford NJ, Briemberg H, Krieger C, Cashman N, Fabros M, et al. Clinical and pathological features of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutation in the C9ORF72 gene on chromosome 9p. *Acta neuropathologica*. 2012;123(3):409-17.
92. Levine TP, Daniels RD, Gatta AT, Wong LH, Hayes MJ. The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related to DENN Rab-GEFs. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2013;29(4):499-503.
93. Zhang D, Iyer LM, He F, Aravind L. Discovery of Novel DENN Proteins: Implications for the Evolution of Eukaryotic Intracellular Membrane Structures and Human Disease. *Frontiers in genetics*. 2012;3:283.
94. Su MY, Fromm SA, Zoncu R, Hurley JH. Structure of the C9orf72 ARF GAP complex that is haploinsufficient in ALS and FTD. *Nature*. 2020;585(7824):251-5.
95. Sellier C, Campanari ML, Julie Corbier C, Gaucherot A, Kolb-Cheyne I, Oulad-Abdelghani M, et al. Loss of C9ORF72 impairs autophagy and synergizes with polyQ Ataxin-2 to induce motor neuron dysfunction and cell death. *The EMBO journal*. 2016;35(12):1276-97.
96. Sullivan PM, Zhou X, Robins AM, Paushter DH, Kim D, Smolka MB, et al. The ALS/FTLD associated protein C9orf72 associates with SMCR8 and WDR41 to regulate the autophagy-lysosome pathway. *Acta neuropathologica communications*. 2016;4(1):51.
97. Webster CP, Smith EF, Bauer CS, Moller A, Hautbergue GM, Ferraiuolo L, et al. The C9orf72 protein interacts with Rab1a and the ULK1 complex to regulate initiation of autophagy. *The EMBO journal*. 2016;35(15):1656-76.

98. Yang M, Liang C, Swaminathan K, Herrlinger S, Lai F, Shiekhattar R, et al. A C9ORF72/SMCR8-containing complex regulates ULK1 and plays a dual role in autophagy. *Science advances*. 2016;2(9):e1601167.
99. Al-Mahdawi S, Pinto RM, Ismail O, Varshney D, Lymperi S, Sandi C, et al. The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Human molecular genetics*. 2008;17(5):735-46.
100. Colak D, Zaninovic N, Cohen MS, Rosenwaks Z, Yang WY, Gerhardt J, et al. Promoter-bound trinucleotide repeat mRNA drives epigenetic silencing in fragile X syndrome. *Science (New York, NY)*. 2014;343(6174):1002-5.
101. He F, Todd PK. Epigenetics in nucleotide repeat expansion disorders. *Seminars in neurology*. 2011;31(5):470-83.
102. Liu F, Liu Q, Lu CX, Cui B, Guo XN, Wang RR, et al. Identification of a novel loss-of-function C9orf72 splice site mutation in a patient with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of aging*. 2016;47:219.e1-.e5.
103. Belzil VV, Bauer PO, Prudencio M, Gendron TF, Stetler CT, Yan IK, et al. Reduced C9orf72 gene expression in c9FTD/ALS is caused by histone trimethylation, an epigenetic event detectable in blood. *Acta neuropathologica*. 2013;126(6):895-905.
104. Cali CP, Park DS, Lee EB. Targeted DNA methylation of neurodegenerative disease genes via homology directed repair. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(22):11609-22.
105. Xi Z, Zinman L, Moreno D, Schymick J, Liang Y, Sato C, et al. Hypermethylation of the CpG island near the G4C2 repeat in ALS with a C9orf72 expansion. *American journal of human genetics*. 2013;92(6):981-9.
106. Gijssels I, Van Mossevelde S, van der Zee J, Sieben A, Engelborghs S, De Bleecker J, et al. The C9orf72 repeat size correlates with onset age of disease, DNA methylation and transcriptional downregulation of the promoter. *Molecular psychiatry*. 2016;21(8):1112-24.
107. Frick P, Sellier C, Mackenzie IRA, Cheng CY, Tahraoui-Bories J, Martinat C, et al. Novel antibodies reveal presynaptic localization of C9orf72 protein and reduced protein levels in C9orf72 mutation carriers. *Acta neuropathologica communications*. 2018;6(1):72.
108. Liu EY, Russ J, Wu K, Neal D, Suh E, McNally AG, et al. C9orf72 hypermethylation protects against repeat expansion-associated pathology in ALS/FTD. *Acta neuropathologica*. 2014;128(4):525-41.
109. Russ J, Liu EY, Wu K, Neal D, Suh E, Irwin DJ, et al. Hypermethylation of repeat expanded C9orf72 is a clinical and molecular disease modifier. *Acta neuropathologica*. 2015;129(1):39-52.
110. Lall D, Lorenzini I, Mota TA, Bell S, Mahan TE, Ulrich JD, et al. C9orf72 deficiency promotes microglial-mediated synaptic loss in aging and amyloid accumulation. *Neuron*. 2021;109(14):2275-91.e8.
111. Fratta P, Mizielinska S, Nicoll AJ, Zloh M, Fisher EM, Parkinson G, et al. C9orf72 hexanucleotide repeat associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia forms RNA G-quadruplexes. *Scientific reports*. 2012;2:1016.

112. Lagier-Tourenne C, Baughn M, Rigo F, Sun S, Liu P, Li HR, et al. Targeted degradation of sense and antisense C9orf72 RNA foci as therapy for ALS and frontotemporal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(47):E4530-9.
113. Mizielińska S, Lashley T, Norona FE, Clayton EL, Ridler CE, Fratta P, et al. C9orf72 frontotemporal lobar degeneration is characterised by frequent neuronal sense and antisense RNA foci. *Acta neuropathologica*. 2013;126(6):845-57.
114. Miller JW, Urbinati CR, Teng-Umuay P, Stenberg MG, Byrne BJ, Thornton CA, et al. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)<sub>n</sub> expansions associated with myotonic dystrophy. *The EMBO journal*. 2000;19(17):4439-48.
115. Celona B, Dollen JV, Vatsavayai SC, Kashima R, Johnson JR, Tang AA, et al. Suppression of C9orf72 RNA repeat-induced neurotoxicity by the ALS-associated RNA-binding protein Zfp106. *eLife*. 2017;6.
116. Cooper-Knock J, Walsh MJ, Higginbottom A, Robin Highley J, Dickman MJ, Edbauer D, et al. Sequestration of multiple RNA recognition motif-containing proteins by C9orf72 repeat expansions. *Brain : a journal of neurology*. 2014;137(Pt 7):2040-51.
117. Donnelly CJ, Zhang PW, Pham JT, Haeusler AR, Mistry NA, Vidensky S, et al. RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention. *Neuron*. 2013;80(2):415-28.
118. Haeusler AR, Donnelly CJ, Periz G, Simko EA, Shaw PG, Kim MS, et al. C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature*. 2014;507(7491):195-200.
119. Lee YB, Chen HJ, Peres JN, Gomez-Deza J, Attig J, Stalekar M, et al. Hexanucleotide repeats in ALS/FTD form length-dependent RNA foci, sequester RNA binding proteins, and are neurotoxic. *Cell reports*. 2013;5(5):1178-86.
120. Sareen D, O'Rourke JG, Meera P, Muhammad AK, Grant S, Simpkinson M, et al. Targeting RNA foci in iPSC-derived motor neurons from ALS patients with a C9ORF72 repeat expansion. *Science translational medicine*. 2013;5(208):208ra149.
121. Xu Z, Poidevin M, Li X, Li Y, Shu L, Nelson DL, et al. Expanded GGGGCC repeat RNA associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia causes neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(19):7778-83.
122. Prudencio M, Belzil VV, Batra R, Ross CA, Gendron TF, Pregent LJ, et al. Distinct brain transcriptome profiles in C9orf72-associated and sporadic ALS. *Nature neuroscience*. 2015;18(8):1175-82.
123. Conlon EG, Lu L, Sharma A, Yamazaki T, Tang T, Shneider NA, et al. The C9ORF72 GGGGCC expansion forms RNA G-quadruplex inclusions and sequesters hnRNP H to disrupt splicing in ALS brains. *eLife*. 2016;5.
124. Cooper-Knock J, Higginbottom A, Stopford MJ, Highley JR, Ince PG, Wharton SB, et al. Antisense RNA foci in the motor neurons of C9ORF72-ALS patients are associated with TDP-43 proteinopathy. *Acta neuropathologica*. 2015;130(1):63-75.
125. Yuva-Aydemir Y, Almeida S, Gao FB. Insights into C9ORF72-Related ALS/FTD from *Drosophila* and iPSC Models. *Trends Neurosci*. 2018;41(7):457-69.

126. Freibaum BD, Lu Y, Lopez-Gonzalez R, Kim NC, Almeida S, Lee KH, et al. GGGGCC repeat expansion in C9orf72 compromises nucleocytoplasmic transport. *Nature*. 2015;525(7567):129-33.
127. Tran H, Almeida S, Moore J, Gendron TF, Chalasani U, Lu Y, et al. Differential Toxicity of Nuclear RNA Foci versus Dipeptide Repeat Proteins in a Drosophila Model of C9ORF72 FTD/ALS. *Neuron*. 2015;87(6):1207-14.
128. Mizielińska S, Gronke S, Niccoli T, Ridler CE, Clayton EL, Devoy A, et al. C9orf72 repeat expansions cause neurodegeneration in Drosophila through arginine-rich proteins. *Science (New York, NY)*. 2014;345(6201):1192-4.
129. DeJesus-Hernandez M, Finch NA, Wang X, Gendron TF, Bieniek KF, Heckman MG, et al. In-depth clinico-pathological examination of RNA foci in a large cohort of C9ORF72 expansion carriers. *Acta neuropathologica*. 2017;134(2):255-69.
130. Al-Sarraj S, King A, Troakes C, Smith B, Maekawa S, Bodi I, et al. p62 positive, TDP-43 negative, neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the cerebellum and hippocampus define the pathology of C9orf72-linked FTL and MND/ALS. *Acta neuropathologica*. 2011;122(6):691-702.
131. Cykowski MD, Dickson DW, Powell SZ, Arumanayagam AS, Rivera AL, Appel SH. Dipeptide repeat (DPR) pathology in the skeletal muscle of ALS patients with C9ORF72 repeat expansion. *Acta neuropathologica*. 2019;138(4):667-70.
132. Cleary JD, Ranum LP. Repeat-associated non-ATG (RAN) translation in neurological disease. *Human molecular genetics*. 2013;22(R1):R45-51.
133. Zu T, Gibbens B, Doty NS, Gomes-Pereira M, Huguet A, Stone MD, et al. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(1):260-5.
134. Green KM, Linsalata AE, Todd PK. RAN translation-What makes it run? *Brain research*. 2016;1647:30-42.
135. Schludi MH, May S, Grasser FA, Rentzsch K, Kremmer E, Kupper C, et al. Distribution of dipeptide repeat proteins in cellular models and C9orf72 mutation cases suggests link to transcriptional silencing. *Acta neuropathologica*. 2015;130(4):537-55.
136. Lin Y, Mori E, Kato M, Xiang S, Wu L, Kwon I, et al. Toxic PR Poly-Dipeptides Encoded by the C9orf72 Repeat Expansion Target LC Domain Polymers. *Cell*. 2016;167(3):789-802.e12.
137. Boeynaems S, Bogaert E, Kovacs D, Konijnenberg A, Timmerman E, Volkov A, et al. Phase Separation of C9orf72 Dipeptide Repeats Perturbs Stress Granule Dynamics. *Molecular cell*. 2017;65(6):1044-55.e5.
138. Kanekura K, Yagi T, Cammack AJ, Mahadevan J, Kuroda M, Harms MB, et al. Poly-dipeptides encoded by the C9ORF72 repeats block global protein translation. *Human molecular genetics*. 2016;25(9):1803-13.
139. Lee KH, Zhang P, Kim HJ, Mitrea DM, Sarkar M, Freibaum BD, et al. C9orf72 Dipeptide Repeats Impair the Assembly, Dynamics, and Function of Membrane-Less Organelles. *Cell*. 2016;167(3):774-88.e17.
140. Wen X, Tan W, Westergard T, Krishnamurthy K, Markandaiah SS, Shi Y, et al. Antisense proline-arginine RAN dipeptides linked to C9ORF72-ALS/FTD form toxic

nuclear aggregates that initiate in vitro and in vivo neuronal death. *Neuron*. 2014;84(6):1213-25.

141. Yin S, Lopez-Gonzalez R, Kunz RC, Gangopadhyay J, Borufka C, Gygi SP, et al. Evidence that C9ORF72 Dipeptide Repeat Proteins Associate with U2 snRNP to Cause Mis-splicing in ALS/FTD Patients. *Cell reports*. 2017;19(11):2244-56.

142. Choi SY, Lopez-Gonzalez R, Krishnan G, Phillips HL, Li AN, Seeley WW, et al. C9ORF72-ALS/FTD-associated poly(GR) binds Atp5a1 and compromises mitochondrial function in vivo. *Nature neuroscience*. 2019;22(6):851-62.

143. Hartmann H, Hornburg D, Czuppa M, Bader J, Michaelsen M, Farny D, et al. Proteomics and C9orf72 neuropathology identify ribosomes as poly-GR/PR interactors driving toxicity. *Life Sci Alliance*. 2018;1(2):e201800070.

144. Saberi S, Stauffer JE, Jiang J, Garcia SD, Taylor AE, Schulte D, et al. Sense-encoded poly-GR dipeptide repeat proteins correlate to neurodegeneration and uniquely co-localize with TDP-43 in dendrites of repeat-expanded C9orf72 amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica*. 2018;135(3):459-74.

145. Cook CN, Wu Y, Odeh HM, Gendron TF, Jansen-West K, Del Rosso G, et al. C9orf72 poly(GR) aggregation induces TDP-43 proteinopathy. *Science translational medicine*. 2020;12(559).

146. Morón-Oset J, Supèr T, Esser J, Isaacs AM, Grönke S, Partridge L. Glycine-alanine dipeptide repeats spread rapidly in a repeat length- and age-dependent manner in the fly brain. *Acta neuropathologica communications*. 2019;7(1):209.

147. Westergard T, Jensen BK, Wen X, Cai J, Kropf E, Iacovitti L, et al. Cell-to-Cell Transmission of Dipeptide Repeat Proteins Linked to C9orf72-ALS/FTD. *Cell reports*. 2016;17(3):645-52.

148. Guo Q, Lehmer C, Martinez-Sanchez A, Rudack T, Beck F, Hartmann H, et al. In Situ Structure of Neuronal C9orf72 Poly-GA Aggregates Reveals Proteasome Recruitment. *Cell*. 2018;172(4):696-705.e12.

149. Baborie A, Griffiths TD, Jaros E, Perry R, McKeith IG, Burn DJ, et al. Accumulation of dipeptide repeat proteins predates that of TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration associated with hexanucleotide repeat expansions in C9ORF72 gene. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2015;41(5):601-12.

150. Gami P, Murray C, Schottlaender L, Bettencourt C, De Pablo Fernandez E, Mudanohwo E, et al. A 30-unit hexanucleotide repeat expansion in C9orf72 induces pathological lesions with dipeptide-repeat proteins and RNA foci, but not TDP-43 inclusions and clinical disease. *Acta neuropathologica*. 2015;130(4):599-601.

151. Proudfoot M, Gutowski NJ, Edbauer D, Hilton DA, Stephens M, Rankin J, et al. Early dipeptide repeat pathology in a frontotemporal dementia kindred with C9ORF72 mutation and intellectual disability. *Acta neuropathologica*. 2014;127(3):451-8.

152. Rohrer JD, Nicholas JM, Cash DM, van Swieten J, Dopper E, Jiskoot L, et al. Presymptomatic cognitive and neuroanatomical changes in genetic frontotemporal dementia in the Genetic Frontotemporal dementia Initiative (GENFI) study: a cross-sectional analysis. *The Lancet Neurology*. 2015;14(3):253-62.

153. Suzuki N, Maroof AM, Merkle FT, Koszka K, Intoh A, Armstrong I, et al. The mouse C9ORF72 ortholog is enriched in neurons known to degenerate in ALS and FTD. *Nature neuroscience*. 2013;16(12):1725-7.

154. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science (New York, NY)*. 2015;347(6220):1260419.
155. Burberry A, Suzuki N, Wang JY, Moccia R, Mordes DA, Stewart MH, et al. Loss-of-function mutations in the C9ORF72 mouse ortholog cause fatal autoimmune disease. *Science translational medicine*. 2016;8(347):347ra93.
156. Koppers M, Blokhuis AM, Westeneng HJ, Terpstra ML, Zundel CA, Vieira de Sa R, et al. C9orf72 ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. *Annals of neurology*. 2015;78(3):426-38.
157. Sudria-Lopez E, Koppers M, de Wit M, van der Meer C, Westeneng HJ, Zundel CA, et al. Full ablation of C9orf72 in mice causes immune system-related pathology and neoplastic events but no motor neuron defects. *Acta neuropathologica*. 2016;132(1):145-7.
158. Atanasio A, Decman V, White D, Ramos M, Ikiz B, Lee HC, et al. C9orf72 ablation causes immune dysregulation characterized by leukocyte expansion, autoantibody production, and glomerulonephropathy in mice. *Scientific reports*. 2016;6:23204.
159. Liu Y, Pattamatta A, Zu T, Reid T, Bardhi O, Borchelt DR, et al. C9orf72 BAC Mouse Model with Motor Deficits and Neurodegenerative Features of ALS/FTD. *Neuron*. 2016;90(3):521-34.
160. O'Rourke JG, Bogdanik L, Muhammad A, Gendron TF, Kim KJ, Austin A, et al. C9orf72 BAC Transgenic Mice Display Typical Pathologic Features of ALS/FTD. *Neuron*. 2015;88(5):892-901.
161. Peters OM, Cabrera GT, Tran H, Gendron TF, McKeon JE, Metterville J, et al. Human C9ORF72 Hexanucleotide Expansion Reproduces RNA Foci and Dipeptide Repeat Proteins but Not Neurodegeneration in BAC Transgenic Mice. *Neuron*. 2015;88(5):902-9.
162. Chew J, Gendron TF, Prudencio M, Sasaguri H, Zhang YJ, Castanedes-Casey M, et al. Neurodegeneration. C9ORF72 repeat expansions in mice cause TDP-43 pathology, neuronal loss, and behavioral deficits. *Science (New York, NY)*. 2015;348(6239):1151-4.
163. Herranz-Martin S, Chandran J, Lewis K, Mulcahy P, Higginbottom A, Walker C, et al. Viral delivery of C9orf72 hexanucleotide repeat expansions in mice leads to repeat-length-dependent neuropathology and behavioural deficits. *Disease models & mechanisms*. 2017;10(7):859-68.
164. Chew J, Cook C, Gendron TF, Jansen-West K, Del Rosso G, Daugherty LM, et al. Aberrant deposition of stress granule-resident proteins linked to C9orf72-associated TDP-43 proteinopathy. *Molecular neurodegeneration*. 2019;14(1):9.
165. Zhang YJ, Gendron TF, Ebbert MTW, O'Raw AD, Yue M, Jansen-West K, et al. Poly(GR) impairs protein translation and stress granule dynamics in C9orf72-associated frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Nature medicine*. 2018;24(8):1136-42.
166. Zhang YJ, Guo L, Gonzales PK, Gendron TF, Wu Y, Jansen-West K, et al. Heterochromatin anomalies and double-stranded RNA accumulation underlie C9orf72 poly(PR) toxicity. *Science (New York, NY)*. 2019;363(6428).

167. Riemsdijk FW, van der Toorn EC, Verhagen RFM, Maas A, Bosman LWJ, Hukema RK, et al. Inducible expression of human C9ORF72 36x G(4)C(2) hexanucleotide repeats is sufficient to cause RAN translation and rapid muscular atrophy in mice. *Disease models & mechanisms*. 2021;14(2).
168. Hao Z, Liu L, Tao Z, Wang R, Ren H, Sun H, et al. Motor dysfunction and neurodegeneration in a C9orf72 mouse line expressing poly-PR. *Nature communications*. 2019;10(1):2906.
169. LaClair KD, Zhou Q, Michaelsen M, Wefers B, Brill MS, Janjic A, et al. Congenic expression of poly-GA but not poly-PR in mice triggers selective neuron loss and interferon responses found in C9orf72 ALS. *Acta neuropathologica*. 2020;140(2):121-42.
170. Hao Z, Liu L, Tao Z, Wang R, Ren H, Sun H, et al. Motor dysfunction and neurodegeneration in a C9orf72 mouse line expressing poly-PR. *Nature communications*. 2019;10(1):2906.
171. Bennett CF, Krainer AR, Cleveland DW. Antisense Oligonucleotide Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Neurosci*. 2019;42:385-406.
172. Chiriboga CA, Swoboda KJ, Darras BT, Iannaccone ST, Montes J, De Vivo DC, et al. Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMN(Rx)) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology*. 2016;86(10):890-7.
173. Hua Y, Vickers TA, Baker BF, Bennett CF, Krainer AR. Enhancement of SMN2 exon 7 inclusion by antisense oligonucleotides targeting the exon. *PLoS Biol*. 2007;5(4):e73.
174. Miller TM, Pestronk A, David W, Rothstein J, Simpson E, Appel SH, et al. An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *The Lancet Neurology*. 2013;12(5):435-42.
175. Miller T, Cudkovic M, Shaw PJ, Andersen PM, Atassi N, Bucelli RC, et al. Phase 1-2 Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. *N Engl J Med*. 2020;383(2):109-19.
176. Benatar M, Wu J, Andersen PM, Bucelli RC, Andrews JA, Otto M, et al. Design of a Randomized, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial of Tofersen Initiated in Clinically Presymptomatic SOD1 Variant Carriers: the ATLAS Study. *Neurotherapeutics*. 2022.
177. Tabrizi SJ, Leavitt BR, Landwehrmeyer GB, Wild EJ, Saft C, Barker RA, et al. Targeting Huntingtin Expression in Patients with Huntington's Disease. *N Engl J Med*. 2019;380(24):2307-16.
178. Liu Y, Andreucci A, Iwamoto N, Yin Y, Yang H, Liu F, et al. Preclinical evaluation of WVE-004, an investigational stereopure oligonucleotide for the treatment of C9orf72-associated ALS or FTD. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022;28:558-70.
179. Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature*. 2009;457(7228):426-33.
180. Kobayashi H, Tomari Y. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1859(1):71-81.

181. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.
182. Chen X, Mangala LS, Rodriguez-Aguayo C, Kong X, Lopez-Berestein G, Sood AK. RNA interference-based therapy and its delivery systems. *Cancer Metastasis Rev*. 2018;37(1):107-24.
183. Adams D, Gonzalez-Duarte A, O'Riordan WD, Yang CC, Ueda M, Kristen AV, et al. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med*. 2018;379(1):11-21.
184. Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(5):358-78.
185. Hu J, Liu J, Li L, Gagnon KT, Corey DR. Engineering Duplex RNAs for Challenging Targets: Recognition of GGGGCC/CCCCGG Repeats at the ALS/FTD C9orf72 Locus. *Chem Biol*. 2015;22(11):1505-11.
186. Hu J, Rigo F, Prakash TP, Corey DR. Recognition of c9orf72 Mutant RNA by Single-Stranded Silencing RNAs. *Nucleic Acid Ther*. 2017;27(2):87-94.
187. Martier R, Liefhebber JM, Miniarikova J, van der Zon T, Snapper J, Kolder I, et al. Artificial MicroRNAs Targeting C9orf72 Can Reduce Accumulation of Intra-nuclear Transcripts in ALS and FTD Patients. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;14:593-608.
188. Martier R, Liefhebber JM, García-Osta A, Miniarikova J, Cuadrado-Tejedor M, Espelosin M, et al. Targeting RNA-Mediated Toxicity in C9orf72 ALS and/or FTD by RNAi-Based Gene Therapy. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;16:26-37.
189. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, NY)*. 2012;337(6096):816-21.
190. Heidenreich M, Zhang F. Applications of CRISPR-Cas systems in neuroscience. *Nat Rev Neurosci*. 2016;17(1):36-44.
191. Long C, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science (New York, NY)*. 2014;345(6201):1184-8.
192. Yang S, Chang R, Yang H, Zhao T, Hong Y, Kong HE, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *J Clin Invest*. 2017;127(7):2719-24.
193. Rohn TT, Kim N, Isho NF, Mack JM. The Potential of CRISPR/Cas9 Gene Editing as a Treatment Strategy for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*. 2018;8(3).
194. Shi Y, Lin S, Staats KA, Li Y, Chang WH, Hung ST, et al. Haploinsufficiency leads to neurodegeneration in C9ORF72 ALS/FTD human induced motor neurons. *Nature medicine*. 2018;24(3):313-25.
195. Meijboom KE, Abdallah A, Fordham NP, Nagase H, Rodriguez T, Kraus C, et al. CRISPR/Cas9-mediated excision of ALS/FTD-causing hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 rescues major disease mechanisms in vivo and in vitro. *Nature communications*. 2022;13(1):6286.

196. Pinto BS, Saxena T, Oliveira R, Méndez-Gómez HR, Cleary JD, Denes LT, et al. Impeding Transcription of Expanded Microsatellite Repeats by Deactivated Cas9. *Molecular cell*. 2017;68(3):479-90.e5.
197. Batra R, Nelles DA, Pirie E, Blue SM, Marina RJ, Wang H, et al. Elimination of Toxic Microsatellite Repeat Expansion RNA by RNA-Targeting Cas9. *Cell*. 2017;170(5):899-912.e10.
198. Redman M, King A, Watson C, King D. What is CRISPR/Cas9? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2016;101(4):213-5.
199. Zamiri B, Reddy K, Macgregor RB, Jr., Pearson CE. TMPyP4 porphyrin distorts RNA G-quadruplex structures of the disease-associated r(GGGGCC)<sub>n</sub> repeat of the C9orf72 gene and blocks interaction of RNA-binding proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(8):4653-9.
200. Zhang K, Donnelly CJ, Haeusler AR, Grima JC, Machamer JB, Steinwald P, et al. The C9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature*. 2015;525(7567):56-61.
201. Simone R, Balendra R, Moens TG, Preza E, Wilson KM, Heslegrave A, et al. G-quadruplex-binding small molecules ameliorate C9orf72 FTD/ALS pathology in vitro and in vivo. *EMBO molecular medicine*. 2018;10(1):22-31.
202. Su Z, Zhang Y, Gendron TF, Bauer PO, Chew J, Yang WY, et al. Discovery of a Biomarker and Lead Small Molecules to Target r(GGGGCC)-Associated Defects in c9FTD/ALS. *Neuron*. 2014;84(1):239.
203. Wang ZF, Ursu A, Childs-Disney JL, Guertler R, Yang WY, Bernat V, et al. The Hairpin Form of r(G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)(exp) in c9ALS/FTD Is Repeat-Associated Non-ATG Translated and a Target for Bioactive Small Molecules. *Cell Chem Biol*. 2019;26(2):179-90.e12.
204. Archbold HC, Jackson KL, Arora A, Weskamp K, Tank EM, Li X, et al. TDP43 nuclear export and neurodegeneration in models of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Scientific reports*. 2018;8(1):4606.
205. Dey SK, Jaffrey SR. RIBOTACs: Small Molecules Target RNA for Degradation. *Cell Chem Biol*. 2019;26(8):1047-9.
206. Bush JA, Aikawa H, Fuerst R, Li Y, Ursu A, Meyer SM, et al. Ribonuclease recruitment using a small molecule reduced c9ALS/FTD r(G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>) repeat expansion in vitro and in vivo ALS models. *Science translational medicine*. 2021;13(617):eabd5991.
207. Czuppa M, Dhingra A, Zhou Q, Schludi C, König L, Scharf E, et al. Drug screen in iPSC-Neurons identifies nucleoside analogs as inhibitors of (G<sub>4</sub>C<sub>2</sub>)(<sub>n</sub>) expression in C9orf72 ALS/FTD. *Cell reports*. 2022;39(10):110913.
208. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 1999;400(6740):173-7.
209. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet (London, England)*. 2005;366(9503):2112-7.

210. Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E, Mount SL, et al. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science (New York, NY)*. 2005;307(5713):1282-8.
211. Golde TE, Schneider LS, Koo EH. Anti- $\beta$  therapeutics in Alzheimer's disease: the need for a paradigm shift. *Neuron*. 2011;69(2):203-13.
212. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, NY)*. 2002;297(5580):353-6.
213. Roberson ED, Scearce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, et al. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid  $\beta$ -induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science (New York, NY)*. 2007;316(5825):750-4.
214. Spillantini MG, Goedert M. Tau pathology and neurodegeneration. *The Lancet Neurology*. 2013;12(6):609-22.
215. Zilka N, Korenova M, Novak M. Misfolded tau protein and disease modifying pathways in transgenic rodent models of human tauopathies. *Acta neuropathologica*. 2009;118(1):71-86.
216. Agadjanyan MG, Ghochikyan A, Petrushina I, Vasilevko V, Movsesyan N, Mkrtichyan M, et al. Prototype Alzheimer's disease vaccine using the immunodominant B cell epitope from  $\beta$ -amyloid and promiscuous T cell epitope pan HLA DR-binding peptide. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2005;174(3):1580-6.
217. Janus C, Westaway D. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Physiology & behavior*. 2001;73(5):873-86.
218. Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, et al. A  $\beta$  peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2000;408(6815):982-5.
219. Nikolic WV, Bai Y, Obregon D, Hou H, Mori T, Zeng J, et al. Transcutaneous  $\beta$ -amyloid immunization reduces cerebral  $\beta$ -amyloid deposits without T cell infiltration and microhemorrhage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(7):2507-12.
220. Wang S, Yu Y, Geng S, Wang D, Zhang L, Xie X, et al. A coimmunization vaccine of A $\beta$ 42 ameliorates cognitive deficits without brain inflammation in an Alzheimer's disease model. *Alzheimer's research & therapy*. 2014;6(3):26.
221. Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, et al. Clinical effects of A $\beta$  immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*. 2005;64(9):1553-62.
222. Bayer AJ, Bullock R, Jones RW, Wilkinson D, Paterson KR, Jenkins L, et al. Evaluation of the safety and immunogenicity of synthetic A $\beta$ 42 (AN1792) in patients with AD. *Neurology*. 2005;64(1):94-101.
223. Ferrer I, Boada Rovira M, Sanchez Guerra ML, Rey MJ, Costa-Jussa F. Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid- $\beta$  immunization in Alzheimer's disease. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2004;14(1):11-20.

224. Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nature medicine*. 2003;9(4):448-52.
225. Avgerinos KI, Ferrucci L, Kapogiannis D. Effects of monoclonal antibodies against amyloid- $\beta$  on clinical and biomarker outcomes and adverse event risks: A systematic review and meta-analysis of phase III RCTs in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 2021;68:101339.
226. Ulvestad E, Williams K, Matre R, Nyland H, Olivier A, Antel J. Fc receptors for IgG on cultured human microglia mediate cytotoxicity and phagocytosis of antibody-coated targets. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1994;53(1):27-36.
227. Wes PD, Sayed FA, Bard F, Gan L. Targeting microglia for the treatment of Alzheimer's Disease. *Glia*. 2016;64(10):1710-32.
228. Asuni AA, Boutajangout A, Quartermain D, Sigurdsson EM. Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(34):9115-29.
229. Bi M, Ittner A, Ke YD, Gotz J, Ittner LM. Tau-targeted immunization impedes progression of neurofibrillary histopathology in aged P301L tau transgenic mice. *PLoS one*. 2011;6(12):e26860.
230. Boutajangout A, Quartermain D, Sigurdsson EM. Immunotherapy targeting pathological tau prevents cognitive decline in a new tangle mouse model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2010;30(49):16559-66.
231. Kontsekova E, Zilka N, Kovacech B, Novak P, Novak M. First-in-man tau vaccine targeting structural determinants essential for pathological tau-tau interaction reduces tau oligomerisation and neurofibrillary degeneration in an Alzheimer's disease model. *Alzheimer's research & therapy*. 2014;6(4):44.
232. Troquier L, Caillierez R, Burnouf S, Fernandez-Gomez FJ, Grosjean ME, Zommer N, et al. Targeting phospho-Ser422 by active Tau Immunotherapy in the THY Tau22 mouse model: a suitable therapeutic approach. *Current Alzheimer research*. 2012;9(4):397-405.
233. Novak P, Schmidt R, Kontsekova E, Kovacech B, Smolek T, Katina S, et al. FUNDAMANT: an interventional 72-week phase 1 follow-up study of AADvac1, an active immunotherapy against tau protein pathology in Alzheimer's disease. *Alzheimer's research & therapy*. 2018;10(1):108.
234. Novak P, Schmidt R, Kontsekova E, Zilka N, Kovacech B, Skrabana R, et al. Safety and immunogenicity of the tau vaccine AADvac1 in patients with Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *The Lancet Neurology*. 2017;16(2):123-34.
235. Jadhav S, Avila J, Schöll M, Kovacs GG, Kövari E, Skrabana R, et al. A walk through tau therapeutic strategies. *Acta neuropathologica communications*. 2019;7(1):22.
236. Novak P, Kovacech B, Katina S, Schmidt R, Scheltens P, Kontsekova E, et al. ADAMANT: a placebo-controlled randomized phase 2 study of AADvac1, an active immunotherapy against pathological tau in Alzheimer's disease. *Nature Aging*. 2021;1(6):521-34.

237. Foss S, Bottermann M, Jonsson A, Sandlie I, James LC, Andersen JT. TRIM21-From Intracellular Immunity to Therapy. *Front Immunol*. 2019;10:2049.
238. McEwan WA, Falcon B, Vaysburd M, Clift D, Oblak AL, Ghetti B, et al. Cytosolic Fc receptor TRIM21 inhibits seeded tau aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(3):574-9.
239. Landen JW, Cohen S, Billing CB, Jr., Cronenberger C, Styren S, Burstein AH, et al. Multiple-dose ponezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease: Safety and efficacy. *Alzheimer's & dementia (New York, N Y)*. 2017;3(3):339-47.
240. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, 3rd, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2017;31(4):317-34.
241. Stanimirovic DB, Sandhu JK, Costain WJ. Emerging Technologies for Delivery of Biotherapeutics and Gene Therapy Across the Blood-Brain Barrier. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2018;32(6):547-59.
242. Chakrabarty P, Rosario A, Cruz P, Siemienski Z, Ceballos-Diaz C, Crosby K, et al. Capsid Serotype and Timing of Injection Determines AAV Transduction in the Neonatal Mice Brain. *PloS one*. 2013;8(6):e67680.
243. Choudhury SR, Hudry E, Maguire CA, Sena-Esteves M, Breakefield XO, Grandi P. Viral vectors for therapy of neurologic diseases. *Neuropharmacology*. 2017;120:63-80.
244. McCarty DM, Young SM, Jr., Samulski RJ. Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu Rev Genet*. 2004;38:819-45.
245. Venditti CP. Safety questions for AAV gene therapy. *Nat Biotechnol*. 2021;39(1):24-6.
246. Bessis N, GarciaCozar FJ, Boissier MC. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther*. 2004;11 Suppl 1:S10-7.
247. Xiao W, Chirmule N, Berta SC, McCullough B, Gao G, Wilson JM. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *Journal of virology*. 1999;73(5):3994-4003.
248. Bennett J, Wellman J, Marshall KA, McCague S, Ashtari M, DiStefano-Pappas J, et al. Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial. *Lancet (London, England)*. 2016;388(10045):661-72.
249. luxturna Fachinformation [Available from: <https://www.novartis.de/arzneimittel-produkte/luxturna-informationen-zur-risikominimierung>].
250. zolgensma fachinformation [Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zolgensma-epar-product-information\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zolgensma-epar-product-information_de.pdf)].
251. Mingozzi F, High KA. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nature reviews Genetics*. 2011;12(5):341-55.

252. Hocquemiller M, Giersch L, Audrain M, Parker S, Cartier N. Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy for CNS Diseases. *Human gene therapy*. 2016;27(7):478-96.
253. Ojala DS, Amara DP, Schaffer DV. Adeno-associated virus vectors and neurological gene therapy. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2015;21(1):84-98.
254. Mendell JR, Al-Zaidy SA, Rodino-Klapac LR, Goodspeed K, Gray SJ, Kay CN, et al. Current Clinical Applications of In Vivo Gene Therapy with AAVs. *Mol Ther*. 2021;29(2):464-88.
255. Tycko J, Adam VS, Crosariol M, Ohlstein J, Sanmiguel J, Tretiakova AP, et al. Adeno-Associated Virus Vector-Mediated Expression of Antirespiratory Syncytial Virus Antibody Prevents Infection in Mouse Airways. *Human gene therapy*. 2021;32(23-24):1450-6.
256. Sacramento CB, Sondhi D, Rosenberg JB, Chen A, Giordano S, Pey E, et al. Anti-Phospho-Tau Gene Therapy for Chronic Traumatic Encephalopathy. *Human gene therapy*. 2020;31(1-2):57-69.
257. Phelps M, Balazs AB. Contribution to HIV Prevention and Treatment by Antibody-Mediated Effector Function and Advances in Broadly Neutralizing Antibody Delivery by Vectored Immunoprophylaxis. *Front Immunol*. 2021;12:734304.
258. Gilbert PB. Ongoing Vaccine and Monoclonal Antibody HIV Prevention Efficacy Trials and Considerations for Sequel Efficacy Trial Designs. *Stat Commun Infect Dis*. 2019;11(1).
259. Corey L, Gilbert PB, Juraska M, Montefiori DC, Morris L, Karuna ST, et al. Two Randomized Trials of Neutralizing Antibodies to Prevent HIV-1 Acquisition. *N Engl J Med*. 2021;384(11):1003-14.
260. Jones AR, Shusta EV. Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharm Res*. 2007;24(9):1759-71.
261. Labrijn AF, Janmaat ML, Reichert JM, Parren P. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(8):585-608.
262. Brinkmann U, Kontermann RE. The making of bispecific antibodies. *MAbs*. 2017;9(2):182-212.
263. Kariolis MS, Wells RC, Getz JA, Kwan W, Mahon CS, Tong R, et al. Brain delivery of therapeutic proteins using an Fc fragment blood-brain barrier transport vehicle in mice and monkeys. *Science translational medicine*. 2020;12(545).
264. Do TM, Capdevila C, Pradier L, Blanchard V, Lopez-Grancha M, Schussler N, et al. Tetravalent Bispecific Tandem Antibodies Improve Brain Exposure and Efficacy in an Amyloid Transgenic Mouse Model. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020;19:58-77.
265. Sumbria RK, Hui EK, Lu JZ, Boado RJ, Pardridge WM. Disaggregation of amyloid plaque in brain of Alzheimer's disease transgenic mice with daily subcutaneous administration of a tetravalent bispecific antibody that targets the transferrin receptor and the Abeta amyloid peptide. *Mol Pharm*. 2013;10(9):3507-13.
266. Yu YJ, Atwal JK, Zhang Y, Tong RK, Wildsmith KR, Tan C, et al. Therapeutic bispecific antibodies cross the blood-brain barrier in nonhuman primates. *Science translational medicine*. 2014;6(261):261ra154.

267. Thom G, Burrell M, Haqqani AS, Yogi A, Lessard E, Brunette E, et al. Enhanced Delivery of Galanin Conjugates to the Brain through Bioengineering of the Anti-Transferrin Receptor Antibody OX26. *Mol Pharm*. 2018;15(4):1420-31.
268. Haqqani AS, Thom G, Burrell M, Delaney CE, Brunette E, Baumann E, et al. Intracellular sorting and transcytosis of the rat transferrin receptor antibody OX26 across the blood-brain barrier in vitro is dependent on its binding affinity. *Journal of neurochemistry*. 2018;146(6):735-52.
269. Faresjö R, Bonvicini G, Fang XT, Aguilar X, Sehlin D, Syvänen S. Brain pharmacokinetics of two BBB penetrating bispecific antibodies of different size. *Fluids Barriers CNS*. 2021;18(1):26.
270. Okuyama T, Eto Y, Sakai N, Nakamura K, Yamamoto T, Yamaoka M, et al. A Phase 2/3 Trial of Pabinafusp Alfa, IDS Fused with Anti-Human Transferrin Receptor Antibody, Targeting Neurodegeneration in MPS-II. *Mol Ther*. 2021;29(2):671-9.
271. Giugliani R, Giugliani L, de Oliveira Poswar F, Donis KC, Corte AD, Schmidt M, et al. Neurocognitive and somatic stabilization in pediatric patients with severe Mucopolysaccharidosis Type I after 52 weeks of intravenous brain-penetrating insulin receptor antibody-iduronidase fusion protein (valanafusp alpha): an open label phase 1-2 trial. *Orphanet J Rare Dis*. 2018;13(1):110.
272. Wang S, Chen K, Lei Q, Ma P, Yuan AQ, Zhao Y, et al. The state of the art of bispecific antibodies for treating human malignancies. *EMBO molecular medicine*. 2021;13(9):e14291.
273. Mackenzie IR, Arzberger T, Kremmer E, Troost D, Lorenzl S, Mori K, et al. Dipeptide repeat protein pathology in C9ORF72 mutation cases: clinico-pathological correlations. *Acta neuropathologica*. 2013;126(6):859-79.
274. Kim JY, Grunke SD, Levites Y, Golde TE, Jankowsky JL. Intracerebroventricular viral injection of the neonatal mouse brain for persistent and widespread neuronal transduction. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2014(91):51863.
275. Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques*. 2000;29(1):52, 4.
276. Shu J, Fu H, Qiu G, Kaye P, Ilyas M. Segmenting overlapping cell nuclei in digital histopathology images. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*. 2013;2013:5445-8.
277. Zhou Q, Mareljic N, Michaelsen M, Parhizkar S, Heindl S, Nuscher B, et al. Active poly-GA vaccination prevents microglia activation and motor deficits in a C9orf72 mouse model. *EMBO molecular medicine*. 2019:e10919.
278. Field J, Nikawa J, Broek D, MacDonald B, Rodgers L, Wilson IA, et al. Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol*. 1988;8(5):2159-65.
279. Cravchik A, Matus A. A novel strategy for the immunological tagging of cDNA constructs. *Gene*. 1993;137(1):139-43.
280. Tomita M, Tsumoto K. Hybridoma technologies for antibody production. *Immunotherapy*. 2011;3(3):371-80.

281. Li J, Olvera AI, Akbari OS, Moradian A, Sweredoski MJ, Hess S, et al. Vectored antibody gene delivery mediates long-term contraception. *Curr Biol*. 2015;25(19):R820-2.
282. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(1):a020412.
283. Cohen-Pfeffer JL, Gururangan S, Lester T, Lim DA, Shaywitz AJ, Westphal M, et al. Intracerebroventricular Delivery as a Safe, Long-Term Route of Drug Administration. *Pediatr Neurol*. 2017;67:23-35.
284. Hammond SL, Leek AN, Richman EH, Tjalkens RB. Cellular selectivity of AAV serotypes for gene delivery in neurons and astrocytes by neonatal intracerebroventricular injection. *PLoS one*. 2017;12(12):e0188830.
285. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*. 1962;59:223-39.
286. Shimomura O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc*. 2005;217(Pt 1):1-15.
287. McLean JR, Smith GA, Rocha EM, Hayes MA, Beagan JA, Hallett PJ, et al. Widespread neuron-specific transgene expression in brain and spinal cord following synapsin promoter-driven AAV9 neonatal intracerebroventricular injection. *Neurosci Lett*. 2014;576:73-8.
288. Carter RJ, Morton J, Dunnett SB. Motor coordination and balance in rodents. *Curr Protoc Neurosci*. 2001;Chapter 8:Unit 8.12.
289. Luong TN, Carlisle HJ, Southwell A, Patterson PH. Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2011(49).
290. Prinz M, Jung S, Priller J. Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell*. 2019;179(2):292-311.
291. Subhramanyam CS, Wang C, Hu Q, Dheen ST. Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Semin Cell Dev Biol*. 2019;94:112-20.
292. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998;57(1):1-9.
293. Boche D, Perry VH, Nicoll JA. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2013;39(1):3-18.
294. Donde A, Sun M, Ling JP, Braunstein KE, Pang B, Wen X, et al. Splicing repression is a major function of TDP-43 in motor neurons. *Acta neuropathologica*. 2019;138(5):813-26.
295. Ederle H, Dormann D. TDP-43 and FUS en route from the nucleus to the cytoplasm. *FEBS Lett*. 2017;591(11):1489-507.
296. Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nature reviews Neurology*. 2010;6(4):193-201.

297. Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener.* 2020;9(1):42.
298. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell.* 2010;140(6):918-34.
299. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* 2016;53(2):1181-94.
300. Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, et al. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell.* 2017;169(7):1276-90.e17.
301. Mathys H, Adaikkan C, Gao F, Young JZ, Manet E, Hemberg M, et al. Temporal Tracking of Microglia Activation in Neurodegeneration at Single-Cell Resolution. *Cell reports.* 2017;21(2):366-80.
302. Hammond TR, Dufort C, Dissing-Olesen L, Giera S, Young A, Wysoker A, et al. Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity.* 2019;50(1):253-71.e6.
303. Wang Y, Ulland TK, Ulrich JD, Song W, Tzaferis JA, Hole JT, et al. TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *J Exp Med.* 2016;213(5):667-75.
304. Jiang T, Tan L, Zhu XC, Zhang QQ, Cao L, Tan MS, et al. Upregulation of TREM2 ameliorates neuropathology and rescues spatial cognitive impairment in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology.* 2014;39(13):2949-62.
305. Yin P, Guo X, Yang W, Yan S, Yang S, Zhao T, et al. Caspase-4 mediates cytoplasmic accumulation of TDP-43 in the primate brains. *Acta neuropathologica.* 2019;137(6):919-37.
306. McDermaid A, Monier B, Zhao J, Liu B, Ma Q. Interpretation of differential gene expression results of RNA-seq data: review and integration. *Brief Bioinform.* 2019;20(6):2044-54.
307. Segundo-Val IS, Sanz-Lozano CS. Introduction to the Gene Expression Analysis. *Methods Mol Biol.* 2016;1434:29-43.
308. Meeter LH, Dopfer EG, Jiskoot LC, Sanchez-Valle R, Graff C, Benussi L, et al. Neurofilament light chain: a biomarker for genetic frontotemporal dementia. *Ann Clin Transl Neurol.* 2016;3(8):623-36.
309. Feneberg E, Oeckl P, Steinacker P, Verde F, Barro C, Van Damme P, et al. Multicenter evaluation of neurofilaments in early symptom onset amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 2018;90(1):e22-e30.
310. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani MP, Gattringer T, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nature reviews Neurology.* 2018;14(10):577-89.
311. Miller TM, Cudkowicz ME, Genge A, Shaw PJ, Sobue G, Bucelli RC, et al. Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. *N Engl J Med.* 2022;387(12):1099-110.

312. Urisu A, Kondo Y, Tsuge I. Hen's Egg Allergy. *Chem Immunol Allergy*. 2015;101:124-30.
313. Villanueva H, de Cerio AL, Inoges S, Pastor F, Soldevilla MM, Bendandi M. BiovaxID®: a customized idiotypic vaccine for the treatment of B-cell lymphoma. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10(12):1661-9.
314. Bixler GS, Jr., Eby R, Dermody KM, Woods RM, Seid RC, Pillai S. Synthetic peptide representing a T-cell epitope of CRM197 substitutes as carrier molecule in a Haemophilus influenzae type B (Hib) conjugate vaccine. *Adv Exp Med Biol*. 1989;251:175-80.
315. Gruber WC, Scott DA, Emini EA. Development and clinical evaluation of Prevnar 13, a 13-valent pneumococcal CRM197 conjugate vaccine. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1263:15-26.
316. Badahdah AM, Rashid H, Khatami A. Update on the use of meningococcal serogroup C CRM<sub>197</sub>-conjugate vaccine (Meningitec) against meningitis. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(1):9-29.
317. Stephen TL, Niemeyer M, Tzianabos AO, Kroenke M, Kasper DL, Kalka-Moll WM. Effect of B7-2 and CD40 signals from activated antigen-presenting cells on the ability of zwitterionic polysaccharides to induce T-Cell stimulation. *Infect Immun*. 2005;73(4):2184-9.
318. Zhang Q, Overkleeft HS, van der Marel GA, Codée JD. Synthetic zwitterionic polysaccharides. *Curr Opin Chem Biol*. 2017;40:95-101.
319. Kakwere H, Harriman R, Pirir M, Avila C, Chan K, Lewis JS. Engineering immunomodulatory nanoplatfroms from commensal bacteria-derived polysaccharide A. *J Mater Chem B*. 2022;10(8):1210-25.
320. Korsholm KS, Petersen RV, Agger EM, Andersen P. T-helper 1 and T-helper 2 adjuvants induce distinct differences in the magnitude, quality and kinetics of the early inflammatory response at the site of injection. *Immunology*. 2010;129(1):75-86.
321. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol*. 2013;4:114.
322. Anderson JR. Iso-immunisation of rabbits by means of Freund-McDermott adjuvants. *Br J Exp Pathol*. 1955;36(2):137-42.
323. Jensen FC, Savary JR, Diveley JP, Chang JC. Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;32(3):173-86.
324. Stills HF, Jr. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *Ilar j*. 2005;46(3):280-93.
325. Del Giudice G, Rappuoli R, Didierlaurent AM. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Semin Immunol*. 2018;39:14-21.
326. Jiao XD, Cheng S, Hu YH, Sun L. Comparative study of the effects of aluminum adjuvants and Freund's incomplete adjuvant on the immune response to an Edwardsiella tarda major antigen. *Vaccine*. 2010;28(7):1832-7.
327. Cárdenas-Reyna T, Angulo C, Hori-Oshima S, Velázquez-Lizárraga E, Reyes-Becerril M. B-cell activating CpG ODN 1668 enhance the immune response of Pacific red snapper (Lutjanus peru) exposed to Vibrio parahaemolyticus. *Dev Comp Immunol*. 2016;62:72-81.

328. Nguyen HT, Nguyen TTT, Wang YT, Wang PC, Chen SC. Effectiveness of formalin-killed vaccines containing CpG oligodeoxynucleotide 1668 adjuvants against *Vibrio harveyi* in orange-spotted grouper. *Fish Shellfish Immunol.* 2017;68:124-31.
329. Hawksworth D. Advancing Freund's and AddaVax Adjuvant Regimens Using CpG Oligodeoxynucleotides. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2018;37(5):195-9.
330. Jellinger KA. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. *J Neural Transm (Vienna).* 2009;116(9):1111-62.
331. Shimada H. [The DIAN study]. *Brain Nerve.* 2013;65(10):1179-84.
332. Nandedkar SD, Barkhaus PE, Stålberg EV. Motor unit number index (MUNIX): principle, method, and findings in healthy subjects and in patients with motor neuron disease. *Muscle Nerve.* 2010;42(5):798-807.
333. Escorcio-Bezerra ML, Abrahao A, de Castro I, Chieia MAT, de Azevedo LA, Pinheiro DS, et al. MUNIX: Reproducibility and clinical correlations in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Clin Neurophysiol.* 2016;127(9):2979-84.
334. Fathi D, Mohammadi B, Dengler R, Bösel S, Petri S, Kollwe K. Lower motor neuron involvement in ALS assessed by motor unit number index (MUNIX): Long-term changes and reproducibility. *Clin Neurophysiol.* 2016;127(4):1984-8.
335. Fatehi F, Grapperon AM, Fathi D, Delmont E, Attarian S. The utility of motor unit number index: A systematic review. *Neurophysiol Clin.* 2018;48(5):251-9.
336. Kisling LA MDJ. Prevention Strategies StatPearls StatPearls Publishing; Updated 2021 May 9 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537222/>].
337. White MR, Mitrea DM, Zhang P, Stanley CB, Cassidy DE, Nourse A, et al. C9orf72 Poly(PR) Dipeptide Repeats Disturb Biomolecular Phase Separation and Disrupt Nucleolar Function. *Molecular cell.* 2019;74(4):713-28.e6.
338. Nguyen L, Montrasio F, Pattamatta A, Tusi SK, Bardhi O, Meyer KD, et al. Antibody Therapy Targeting RAN Proteins Rescues C9 ALS/FTD Phenotypes in C9orf72 Mouse Model. *Neuron.* 2020;105(4):645-62.e11.
339. Mordes DA, Morrison BM, Ament XH, Cantrell C, Mok J, Egan P, et al. Absence of Survival and Motor Deficits in 500 Repeat C9ORF72 BAC Mice. *Neuron.* 2020;108(4):775-83.e4.
340. Nguyen L, Laboissonniere LA, Guo S, Pilotto F, Scheidegger O, Oestmann A, et al. Survival and Motor Phenotypes in FVB C9-500 ALS/FTD BAC Transgenic Mice Reproduced by Multiple Labs. *Neuron.* 2020;108(4):784-96.e3.
341. Jambau M, Meyer KD, Hruska-Plochan M, Tabet R, Lee CZ, Ray-Soni A, et al. Comprehensive evaluation of human-derived anti-poly-GA antibodies in cellular and animal models of C9orf72 disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2022;119(49):e2123487119.
342. Plotkin S. History of vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2014;111(34):12283-7.
343. Meeter LHH, Gendron TF, Sias AC, Jiskoot LC, Russo SP, Donker Kaat L, et al. Poly(GP), neurofilament and grey matter deficits in C9orf72 expansion carriers. *Ann Clin Transl Neurol.* 2018;5(5):583-97.

344. Querin G, Biferi MG, Pradat PF. Biomarkers for C9orf7-ALS in Symptomatic and Pre-symptomatic Patients: State-of-the-art in the New Era of Clinical Trials. *J Neuromuscul Dis.* 2022;9(1):25-37.
345. Krishnan G, Raitcheva D, Bartlett D, Prudencio M, McKenna-Yasek DM, Douthwright C, et al. Poly(GR) and poly(GA) in cerebrospinal fluid as potential biomarkers for C9ORF72-ALS/FTD. *Nature communications.* 2022;13(1):2799.
346. Chai X, Dage JL, Citron M. Constitutive secretion of tau protein by an unconventional mechanism. *Neurobiol Dis.* 2012;48(3):356-66.
347. Mallery DL, McEwan WA, Bidgood SR, Towers GJ, Johnson CM, James LC. Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21). *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010;107(46):19985-90.
348. Swarup V, Phaneuf D, Dupré N, Petri S, Strong M, Kriz J, et al. Deregulation of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis triggers nuclear factor  $\kappa$ B-mediated pathogenic pathways. *J Exp Med.* 2011;208(12):2429-47.
349. Zhao W, Beers DR, Bell S, Wang J, Wen S, Baloh RH, et al. TDP-43 activates microglia through NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome. *Exp Neurol.* 2015;273:24-35.

# Anhang

## Danksagung

Als ich 2018 mit meiner Arbeit angefangen habe, beschäftigten mich viele Fragen: Was ist Forschung eigentlich? Werde ich alle Versuche korrekt ausführen können? Finde ich mich im Labor zurecht? Was mache ich, wenn mich eine Maus beißt? Und vieles mehr. Während meiner Zeit im Labor fand ich Antworten auf all diese Fragen. Nun sitze ich da, schreibe die letzten Zeilen und merke, dass ich nun mehr Fragen habe als zu Beginn: Wie geht es wohl weiter mit diesem Projekt? Gelingt es Eddie und Co die Impfung vom Tier zum Menschen zu übertragen? Werden wir bald ein zugelassenes Impfmittel gegen ALS haben? Und ich glaube genau das ist das Großartige an der Forschung. Sobald man ein Projekt abgeschlossen hat, öffnen sich unzählige Türen zu weiteren Projekten und man weiß nie, was einen hinter der nächsten Tür erwartet.

Zusammenfassend blicke ich auf eine großartige Zeit zurück, in der ich wundervolle Menschen kennenlernen durfte, unglaubliche Experimente durchführen konnte und mich als Forscher und Mensch weiterentwickeln konnte.

Ich möchte ich bei denjenigen bedanken ohne deren Hilfe diese Arbeit nie entstanden wäre.

Prof. Dr. med Dieter Edbauer (Eddie): Ich fühlte mich geehrt als du mir nach dem Physikum eine Doktorandenstelle angeboten hast und ich bin sehr froh das Angebot angenommen zu haben. Einen besseren Doktorvater hätte ich mir nicht aussuchen können. Vielen Dank, dass du dir stets die Zeit genommen hast meine Fragen zu beantworten, meine Daten durchzusprechen und meine Arbeit zu korrigieren (wahrscheinlich kannst du sie mittlerweile auch schon auswendig 😊).

Dr. rer. nat. Qihui Zhou: Danke, dass du immer so freundlich und so geduldig mit mir warst. Du hast mich angeleitet und mir die Arbeit im Labor und mit Mäusen beigebracht. Und auch im Verlauf warst du immer zur Stelle, mir zu helfen und mich in allen Bereichen zu unterstützen.

Zudem möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Kolleginnen und Kollegen aus dem Eddie Lab bedanken: Hannelore Hartmann, Meike Michaelsen, Bahram Khosravi, Martin Schludi, Katherine LaClair und Carina Lehmer. Ihr wart immer hilfsbereit und habt eine gute Stimmung verbreitet. Ein ganz besonderer Dank an Mareike Czuppa für die Korrektur meiner Arbeit. Und gemäß dem Motto „Das Beste kommt zum

Schluss“, möchte ich mich bei Henrick Riemschneider und Daniel Farny bedanken. Danke für die tollen gemeinsamen Momente innerhalb und außerhalb des Labs. Die Wiesen mit euch bleiben unvergesslich!

Sabine Odoy und Marcel Matt: Danke für eure Unterstützung und Organisation im Lab. Ohne euch läuft der Laden nicht.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meinen besten Freund Kristijan Budimir für unsere tolle Zeit, in der ich auch mal abschalten konnte.

Und zum Schluss möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern bedanken. Ihr wart immer für mich da und habt mich bei diesem Projekt bedingungslos unterstützt. Danke für alles!

## **Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen sind keine persönlichen Informationen hinterlegt





## Eidesstattliche Versicherung

Mareljic, Nikola

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

### ***Aktive und passive anti-GA Immuntherapie für C9orf72 ALS/FTD im Mausmodell***

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 29.11.2023

Ort, Datum

Mareljic Nikola

Unterschrift Doktorand

## Publikationsliste

- **Active poly-GA vaccination prevents microglia activation and motor deficits in a C9orf72 mouse model** Zhou Q, Mareljic N, Michaelsen M, Parhizkar S, Heindl S, Nuscher B, Farny D, Czuppa M, Schludi C, Graf A, Krebs S, Blum H, Feederle R, Roth S, Haass C, Arzberger T, Liesz A und Edbauer D (2019). EMBO molecular medicine: e10919.
- **Immunogen for preventing or treating familial frontotemporal dementia (ftd) and/or amyotrophic lateral sclerosis (als)** Edbauer D, Zhou Q, Mareljic N. <https://patents.google.com/patent/WO2020221937A1/en>
- **Cell-to-cell transmission of C9orf72 poly-(Gly-Ala) triggers key features of ALS/FTD** Khosravi B, LaClair K.D, Riemenschneider H, Zhou Q, Frottin F, Mareljic N, Czuppa M, Farny D, Hartmann H, Michaelsen M, Arzberger T, Hartl F.U, Hipp M.S und Edbauer D (2020). Embo j: e102811.