

Kausale Therapie von Prionerkrankungen

Entwicklung und Charakterisierung neuartiger
anti-aggregativer Wirkstoffe *in vitro* und *in vivo*

Dissertation

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Jens Wagner

aus Marburg

München, Dezember 2009

Wagner, Jens

Kausale Therapie von Prionerkrankungen – Entwicklung und Charakterisierung neuartiger anti-aggregativer Wirkstoffe *in vitro* und *in vivo*

Die vorliegende Arbeit wurde am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (Direktor: Prof. Dr. Hans A. Kretzschmar) der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Gutachter:

1. Gutachter

Prof. Dr. Thomas Cremer

2. Gutachter

Prof. Dr. Michael Schleicher

Dissertation eingereicht am:

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2010

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der entsprechenden Literaturzitate gekennzeichnet.

Hiermit erkläre ich, dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg nicht unterzogen habe

München, Dezember 2009

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	8
2.	Einleitung	9
2.1.	Transmissible Spongiforme Enzephalopathien	9
2.2.	Die Prion-Hypothese	10
2.3.	Das zelluläre Prionprotein und seine pathogene Isoform.....	11
2.3.1.	Das zelluläre Prionprotein (PrP ^C).....	11
2.3.2.	Expressionsmuster und Biosynthese des zellulären Prionproteins	12
2.3.3.	Physiologische Funktion von PrP ^C	13
2.3.4.	Struktur von PrP ^C	14
2.3.5.	Die pathogene Isoform des Prionproteins (PrP ^{Sc}).....	15
2.4.	Neurotoxizität	17
2.5.	Neurodegeneration	18
2.6.	Therapeutische Strategien	18
2.7.	Zielsetzung.....	20
3.	Material und Methoden.....	22
3.1.	Chemikalien und Materialien	22
3.2.	Molekularbiochemische Methoden.....	22
3.2.1.	Natriumwolframat-Fällung	22
3.2.2.	Deglykosylierung von Glykoproteinen	23
3.2.3.	Proteolyse durch Proteinase K	23
3.2.4.	Bradford-Assay	24
3.2.5.	Bicinchoninsäure-Assay	24
3.2.6.	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	24
3.2.7.	Coomassie-Färbung.....	25
3.2.8.	Western Blot Analyse	25
3.2.9.	Dot Blot Analyse.....	27
3.2.10.	Zellkultur.....	28
3.2.11.	Fluoreszenzmarkierung von rekombinantem PrP und L42.....	28
3.2.12.	„Scanning for intensely fluorescent targets“-Assay	29
3.3.	Histologische Methoden.....	32
3.3.1.	Hämatoxylin und Eosin-Färbung	32

3.3.2.	Immunhistochemie	32
3.3.3.	Auswertung der Immunhistochemie	33
3.3.4.	PrP ^{Sc} -Färbung	34
3.3.5.	Paraffin-Embedded Tissue (PET) Blot.....	35
3.3.6.	Quantifizierung PET Blot.....	36
3.4.	Experimentelle Prionversuche	37
3.4.1.	Herstellung von Gewebe-Homogenaten.....	37
3.4.2.	Infektion mit Hirnhomogenat	37
3.4.3.	Therapie- und Screeningversuche	38
3.5.	Synthese der NBB-Substanzen	42
3.6.	DPP-Substanzen.....	44
4.	Ergebnisse	47
4.1.	Stimulierung des angeborenen Immunsystems	47
4.1.1.	Immuntherapie I.....	48
4.1.2.	Immuntherapie II.....	50
4.2.	Molekulare Analyse von potentiellen Antiprion-Substanzen.....	52
4.3.	Tetracyclin-Derivat	52
4.3.1.	Ergebnisse aus SIFT und Zellkultur.....	53
4.4.	3,5-Diphenylpyrazole und Derivate	54
4.4.1.	Primärscreening	54
4.4.2.	Molekulare Analyse der DPP-Substanzen mit Hydroxylgruppen	56
4.4.3.	Molekulare Analyse der DPP-Substanzen mit Halogen-Substituenten	59
4.4.4.	Validierung der Wirksamkeit in Zellkultur	61
4.5.	Imidazo[1,2- α] Pyridin-Derivate	63
4.6.	N ^c -Benzylidene-benzohydrazid-Bibliothek	67
4.6.1.	SIFT-Ergebnisse.....	68
4.6.2.	Zellkultur-Ergebnisse	69
4.7.	<i>In Vivo</i> Tiermodelle zur Analyse von Antiprion-Substanzen.....	70
4.7.1.	Therapie 1: Behandlung über osmotische Pumpen	71
4.7.2.	Etablierung eines schnellen <i>in vivo</i> Screeningtests.....	73
4.7.3.	Substanz-Screening im Überlebenszeitmodell	77
4.7.4.	Weiterentwicklung des schnellen peripheren Screeningtests	79
4.7.5.	Therapie 2: Überlebenszeitversuch mit Substanz anle138b	83
4.7.6.	<i>In vivo</i> Struktur-Wirkungs-Analyse	87

4.7.7.	Pharmakokinetik von Substanz anle138b.....	91
4.7.8.	Therapie 3: Lebenslange orale Therapie mit Substanz anle138b	93
4.7.9.	Zusammenfassung <i>in vivo</i> Therapie-Versuche	97
5.	Diskussion	99
5.1.	Notwendigkeit einer Therapie	99
5.2.	Stimulierung des angeborenen Immunsystems	100
5.3.	<i>In vitro</i> Strukturanalyse potentieller Antiprion-Substanzen.....	101
5.3.1.	SIFT Antiprion-Assay	102
5.3.2.	Prion-Zellkulturmodell	104
5.4.	<i>In vivo</i> Strukturanalyse potentieller Antiprion-Substanzen.....	106
5.5.	Auswirkungen auf die Prionpathologie	109
5.6.	Ausblick.....	112
6.	Zusammenfassung	114
7.	Literaturverzeichnis	116
8.	Veröffentlichungen	135
9.	Danksagung	136
10.	Lebenslauf	137

1. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BBB	Blut-Hirn-Schranke (“blood-brain-barrier”)
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CpG-ODN	CpG-Oligodesoxynukleotid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco’s PBS
DPP	3,5-Diphenylpyrazole
DTT	Dithiothreitol
FDC	Follikulär Dendritische Zellen
FIDA	Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungs-Analyse
GndHCl	Guanidinium-Hydrochlorid
i.c.	intrazerebral
IMPY	Imidazo[1,2- α] Pyridin
i.p.	intraperitoneal
NaPTA	Natriumwolframat
NBB	N [‘] -Benzylidene-benzohydrazid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute (“revolutions per minute”)
rPrP	rekombinantes Prionprotein
RT	Raumtemperatur
TEMED	N,N,N’,N’,-Tetramethylethylendiamin
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (“weight per volume“)

Weitere Standard-Abkürzungen wurden entsprechend der “Author Guidelines” des *European Journal of Biochemistry* verwendet.

2. Einleitung

2.1. Transmissible Spongiforme Enzephalopathien

Prionkrankheiten, auch Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) genannt, sind eine große Gruppe neurodegenerativer Krankheiten mit Bildung pathologischer Proteinaggregate und tödlich verlaufendem Ausgang, welche sowohl beim Menschen als auch bei einer Reihe verschiedener Tierarten auftreten. Zu den spongiformen Enzephalopathien der Tiere zählen die seit über 250 Jahren bekannte Traberkrankheit von Schafen und Ziegen (McGowan, 1922), die auch als Scrapie bezeichnet wird (Stockmann, 1913), die Bovine Spongiforme Enzephalopathie beim Rind (BSE) (Wells *et al.*, 1987), die übertragbare spongiforme Hirndegeneration bei Nerzen (TME) (Burger und Hartsough, 1965; Hartsough und Burger, 1965), die chronisch zehrende Krankheit der Hirschartigen (CWD) (Williams und Young, 1980) und die Feline Spongiforme Enzephalopathie der Katzen (FSE) (Wyatt *et al.*, 1991). TSE-Erkrankungen können sowohl sporadisch auftreten, als auch durch Vererbung und Infektion weitergegeben werden.

Zu den humanen spongiformen Enzephalopathien gehören die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) (Gerstmann, 1928; Gerstmann *et al.*, 1936), die letale familiäre Schlaflosigkeit (FFI) (Lugaresi *et al.*, 1986) und Kuru (Gajdusek und Zigas, 1957). Kuru ist eine bei Volksstämmen in Papua Neuguinea auftretende neurologische Erkrankung, welche durch rituellen Kannibalismus übertragen wurde (Gajdusek *et al.*, 1966; Gajdusek, 1977; Klitzman, 1999).

Im Krankheitsverlauf der TSE-Erkrankungen kommt es zu einer charakteristischen, in unterschiedlich starker Ausprägung auftretenden schwammartigen Vakuolisierung des ZNS, assoziiert mit einem massiven Nervenzellverlust, einer Aktivierung von Gliazellen (Astrogliose), sowie der pathologischen Ablagerung des Prionproteins. Eine Besonderheit der TSE-Erkrankungen, welche sie einzigartig gegenüber anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson macht, ist ihre Übertragbarkeit, was bereits 1936 von Cuillé und Chelle durch Infektion von Schafen und Ziegen mit Scrapie (Cuille und Chelle, 1936) experimentell gezeigt werden konnte. Entsprechend konnten menschliche TSE-Erkrankungen wie Kuru, CJD, GSS und FFI auf Schimpansen übertragen werden (Gajdusek *et al.*, 1967; Gibbs *et al.*, 1968; Masters *et al.*, 1981; Tateishi *et al.*, 1995).

Die Übertragbarkeit der TSE-Erkrankungen zeigte sich auch Mitte der 80er-Jahre in der BSE-Epidemie, welche 1993 schließlich ihren Höhepunkt erreichte. Aufgrund

epidemiologischer, biochemischer und tierexperimenteller Untersuchungen muss davon ausgegangen werden, dass als Folge einer Infektion mit dem BSE-Erreger eine neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) auftrat (Bruce *et al.*, 1997; Collinge *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1997; Will *et al.*, 1996).

An der neuen Variante vCJD sind in Großbritannien rund 150 Menschen verstorben (160 Menschen weltweit). Mit 28 Fällen wurde im Jahr 2000 ein Höhepunkt erreicht. Im Jahre 2007 waren es nur noch 5 Fälle (<http://www.cjd.ed.ac.uk/>). Trotz dieser deutlich abnehmenden Tendenz ist aufgrund der Ungewissheit über den Einfluss genetischer Faktoren auf die Inkubationszeit, sowie aufgrund weiterer noch ungeklärter Sachverhalte eine genaue Prognose bezüglich der weiteren Entwicklung der vCJD zur Zeit nicht möglich (Llewelyn *et al.*, 2004; Peden *et al.*, 2004). Besondere Sorge bereitet zusätzlich die Tatsache, dass bei vCJD-Patienten PrP^{Sc} in großer Menge auch außerhalb des ZNS, insbesondere im lymphatischen Gewebe, nachweisbar ist (Wadsworth *et al.*, 2001) und dass es Hinweise auf eine sekundäre Transmission des Erregers von Mensch zu Mensch über Bluttransfusionen und durch Transplantation der Hornhaut des Auges gibt (Llewelyn *et al.*, 2004; Maddox *et al.*, 2008; Peden *et al.*, 2004).

2.2. Die Prion-Hypothese

Die Natur des infektiösen Agens der spongiformen Enzephalopathien wurde lange Zeit kontrovers diskutiert und ist bis heute noch nicht in allen Punkten geklärt. Aufgrund der langen Inkubationszeiten wurden zunächst sich langsam vermehrende Viren als mögliche Erreger betrachtet (Diringer *et al.*, 1988; Diringer *et al.*, 1994; Nathanson, 1980; Thormar, 1971), doch konnte keine virale Nukleinsäure nachgewiesen werden (Kellings *et al.*, 1993). Auch konnte der TSE-Erreger selbst mit massiver Nukleinsäuren-schädigender Bestrahlung nicht inaktiviert werden, weshalb daraus der Schluss gezogen wurde, dass es sich nicht um eine der bekannten Erregerklassen wie Viren, Bakterien und Pilzen handele, sondern um ein neues infektiöses Agens, welches über kein Genom verfügt (Alper *et al.*, 1966; Alper *et al.*, 1967; Alper, 1985).

Diese Ideen wurden von Gibbons und Hunter 1967 aufgegriffen, die ein sich vermehrendes Zellmembranprotein als Erreger vorschlugen (Gibbons und Hunter, 1967). Im gleichen Jahr postulierte Griffith, dass ein Protein sich selbst repliziert und daraus die Übertragung von TSE resultieren könnte (Griffith, 1967).

Im Jahre 1982 wurde schließlich von Stanley Prusiner dargestellt, dass sich mit nukleinsäureschädigenden Verfahren die Infektiosität des TSE-Erregers nicht verringern lässt,

dafür aber mit Substanzen, die entweder Proteine abbauen oder die natürliche Faltung auflösen. Er führte erstmalig die Bezeichnung „Prion“ (für „**proteinaceous infectious particle**“) ein, um die Eigenart des TSE-Erregers zu unterstreichen, im Wesentlichen aus einem Protein zu bestehen (Prusiner, 1982).

Die Prion-Hypothese geht davon aus, dass der TSE-Erreger ausschließlich aus einer pathogenen, fehlgefalteten Form des zellulären Prionproteins (PrP^{C}) besteht. Diese fehlgefaltete Form ist in der Lage die strukturelle Umwandlung weiterer Moleküle in einer autokatalytischen Reaktion zu bewirken, wodurch sich die pathogene Form repliziert (Alper *et al.*, 1967; Griffith, 1967; Prusiner *et al.*, 1982; Prusiner, 1991). Das verantwortliche Protein konnte in seiner pathogenen Form aufgereinigt werden (Bolton *et al.*, 1982; Prusiner, 1982) und wurde als „Scrapie“-assoziiertes Prionprotein (PrP^{Sc}) bezeichnet. In Präparationen von PrP^{Sc} lassen sich elektronenmikroskopisch erkennbare, makromolekulare Proteinstrukturen darstellen, welche als Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) oder „prion rods“ bezeichnet werden (Bolton *et al.*, 1982; Merz *et al.*, 1981; Merz *et al.*, 1983). Die Anreicherungen dieser Strukturen erwiesen sich als hochinfektiös (Diringer *et al.*, 1983; Prusiner *et al.*, 1983) korrelieren positiv mit der Infektiösität, was als weiterer Hinweis für die Richtigkeit der Prion-Hypothese gedeutet wurde (Gabizon *et al.*, 1988). Eine Herausforderung für die Prion-Hypothese ist dabei der Umstand, dass Prionkrankheiten nicht nur durch Infektion erworben, sondern auch erblich bedingt sein oder offenbar spontan entstehen können. Die Prion-Hypothese geht davon aus, dass einerseits Mutationen im Gen des Prionproteins die Umwandlung von PrP^{C} zu PrP^{Sc} begünstigen und andererseits, basierend auf grundsätzlichen, thermodynamischen Eigenschaften, die Umfaltung des Proteins mit geringer Wahrscheinlichkeit auch spontan möglich ist. Die Prion-Hypothese konnte durch die *in vitro* Herstellung von infektiösem PrP^{Sc} weiter bestätigt werden (Bieschke *et al.*, 2004; Castilla *et al.*, 2005; Legname *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2008).

2.3. Das zelluläre Prionprotein und seine pathogene Isoform

2.3.1. Das zelluläre Prionprotein (PrP^{C})

Der offene Leserahmen des *Prnp*-Gens des Menschen codiert für ein Protein mit 253 Aminosäuren. Bei Maus und Hamster sind es 254 Aminosäuren, wobei die cDNS des *Prnp*-Gens von infizierten und nicht-infizierten Individuen identisch sind (Basler *et al.*, 1986; Chesebro *et al.*, 1985; Kretschmar *et al.*, 1986b; Loch *et al.*, 1986; Oesch *et al.*, 1985).

Das zelluläre Prionprotein ist ein extrazelluläres Glykoprotein, welches mit einer Glykosylphosphatidyl-Einheit (GPI-Anker) auf der Zelloberfläche verankert ist und experimentell mittels Phospholipasen oder Proteasen von der Membran entfernt werden kann (Borchelt *et al.*, 1990; Caughey *et al.*, 1988; Caughey *et al.*, 1989; Caughey und Raymond, 1991; Shyng *et al.*, 1993). Wie viele andere Oberflächenproteine wird PrP zuerst in das raue Endoplasmatische Retikulum (ER) synthetisiert, wobei die dazu nötige N-terminale Signalsequenz von 22 Aminosäuren vom primären Translationsprodukt abgespalten wird.

2.3.2. Expressionsmuster und Biosynthese des zellulären Prionproteins

Bei adulten Organismen wird das *Prnp*-Gen in fast allen Geweben exprimiert, wobei das Expressionsniveau abhängig vom untersuchten Gewebe variiert (Bendheim *et al.*, 1992; Manson *et al.*, 1992). Im ZNS, insbesondere in Neuronen und Gliazellen, ist das Expressionsniveau am höchsten (Kretzschmar *et al.*, 1986a; Moser *et al.*, 1995). PrP^C ist bereits während der Embryogenese im Gehirn nachweisbar (Harris *et al.*, 1993), wobei der mRNS-Gehalt mit fortschreitender Entwicklung zunimmt und auch im peripheren Nervensystem sowie in nicht-neuronalen Zellpopulationen nachweisbar wird (Manson *et al.*, 1992). Weiterhin wird das Prionprotein auch in Zellen des Immunsystems exprimiert (Cashman *et al.*, 1990; Dodelet und Cashman, 1998). Die breite Expression deutet auf eine konservierte und breite Funktion des zellulären Prionproteins hin. Der N-Terminus des Proteins enthält eine Signalsequenz für das Endoplasmatische Retikulum (ER), die vom primären Translationsprodukt im ER abgespalten wird. Nach der Translokation ins ER werden weitere 23 Aminosäuren im Zuge der Reifung vom C-Terminus abgetrennt, um die Bindung der Glykosylphosphatidyl-Einheit an das Serin 231 für die Membranverankerung zu ermöglichen (Stahl *et al.*, 1987). Im ER werden an die beiden Asparagin-Reste des 25 kDa Proteins noch zwei Mannose-haltige Polysaccharide angehängt, welche auf dem Weg zur Zelloberfläche beim Durchlaufen des Golgi-Apparates in komplexe, hybride Zuckerstrukturen umgewandelt werden. Aufgrund einer unvollständigen Glykosylierung während der PrP-Genese kommt es neben der zweifach-glykosylierten auch zur Bildung einer einfach- und einer unglykosylierten Form (Bolton *et al.*, 1985; Endo *et al.*, 1989; Haraguchi *et al.*, 1989). Das reife PrP^C wird in Sekretionsvesikeln zur Zellmembran transportiert, wo das Protein über den GPI-Anker befestigt wird. Die meisten PrP^C Moleküle werden wieder durch Endozytose über die endosomalen und lysosomalen Kompartimente der Zelle abgebaut und nur 10-30 % werden in den extrazellulären Raum abgegeben (Borchelt *et al.*, 1990; Caughey *et al.*, 1989).

2.3.3. Physiologische Funktion von PrP^C

Eine Vielzahl von Experimenten mit dem Ziel die physiologische Funktion von PrP^C aufzuklären, brachten bisher keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Bis heute ist die genaue Funktion des Proteins ungeklärt, obwohl PrP^C eine Reihe von Funktionen, wie zum Beispiel Kupferbindung, Signaltransduktion und protektive Funktion bei oxidativem Stress zugeschrieben werden. Außerdem deutet die hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenz in verschiedenen Organismen auf eine wichtige Funktion des Prionproteins hin (Schätzl *et al.*, 1995). Bis heute wurden keine *Prnp*^{-/-}-Allele beschrieben, trotz eines möglicherweise negativen evolutionären Druckes (Mead *et al.*, 2003). Auch zeigen verschiedene transgene Mauslinien mit einem inaktivierten *Prnp*-Gen eine normale Entwicklung ohne auffällige Verhaltensstörungen (Bueler *et al.*, 1992; Manson *et al.*, 1994a). In vertiefenden Experimenten konnten schließlich bei *Prnp*^{-/-}-Mäusen kleinere Veränderungen in der Reizweiterleitung von Nervenzellen (Collinge *et al.*, 1994; Fuhrmann *et al.*, 2006; Herms *et al.*, 2001) und dem zirkadianen Aktivitäts- und Schlafrythmus (Tobler *et al.*, 1997) entdeckt werden. Eine neuere Arbeit zur physiologischen Funktion des PrP^C zeigt, dass *Prnp*^{-/-}-Mäuse ein verändertes olfaktorisches Verhalten besitzen und PrP^C möglicherweise wichtig für die Prozessierung von sensorischen Informationen durch das olfaktorische System ist (Le Pichon *et al.*, 2009). Der auffälligste Phänotyp der *Prnp*^{-/-}-Mäuse bleibt weiterhin die Resistenz gegenüber der Inokulation mit Prionen. Nach einer postnatalen Deletion des Prionproteins zeigen Mäuse auch keine Neurodegeneration oder histologischen Veränderungen (Mallucci *et al.*, 2002), was wiederum andeutet, dass die Prionpathologie nicht auf das Verschwinden von PrP^C zurückzuführen ist. Bei alternden Mäusen konnte eine Demyelinisierung im peripheren Nervensystem gezeigt werden, die jedoch zu keinen klinischen Symptomen führt (Nishida *et al.*, 1999).

Die Fähigkeit zur Kupferbindung von PrP^C (Brown *et al.*, 1997a), zusammen genommen mit der Lokalisation von PrP^C in der präsynaptischen Membran (Herms *et al.*, 1999), sowie der Stimulation der PrP^C-Endozytose durch Zugabe von Kupfer in das Kulturmedium neuronaler Zellen (Pauly und Harris, 1998), deutet auf eine Funktion in der Kupfer-Homöostase an der Synapse von Neuronen hin (Kretschmar *et al.*, 2000). Weiterhin zeigen kultivierte neuronale Zellen von *Prnp*^{-/-}-Mäusen eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress, was möglicherweise auf eine verringerte Superoxid-Dismutase-Aktivität zurückzuführen ist (Brown *et al.*, 1997b; Brown und Besinger, 1998).

Für PrP^C konnten inzwischen eine Vielzahl von Interaktionspartnern identifiziert werden (Gauczynski *et al.*, 2001a; Lasmezas, 2003). Dazu zählt unter anderem der Laminin-Rezeptor

(LR) bzw. dessen Vorstufe (LRP, „laminin receptor precursor“) (Gauczynski *et al.*, 2001b; Rieger *et al.*, 1997) und Heparansulfat, ein Bestandteil der in der extrazellulären Matrix vorkommenden Glykosaminoglykane (Caughey *et al.*, 1994; Gabizon *et al.*, 1993; Pan *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte die Interaktion von PrP^C mit den Proteinen Bax (Bounhar *et al.*, 2001), Bcl2 (Kurschner und Morgan, 1995, 1996) und dem Chaperon HSP60 (Edenhofer *et al.*, 1996) gezeigt werden. Jedoch konnte für keinen der identifizierten Interaktionspartner eine wichtige Rolle bei der Prionpathogenese *in vivo* gezeigt werden. Lauren und Kollegen konnten neuerdings zeigen, dass PrP^C als Rezeptor für A β 42 Oligomere und als Mediator der A β 42 Oligomer-induzierten synaptischen Dysfunktion fungiert (Lauren *et al.*, 2009).

2.3.4. Struktur von PrP^C

Die strukturelle Umwandlung des zellulären Prionproteins in die falschgefaltete pathologische Isoform des Proteins ist das Schlüsselereignis in der Pathogenese der TSE-Erkrankungen. Vor diesem Hintergrund ist die Auflösung der Struktur der beiden Formen des Prionproteins von zentraler Bedeutung. Die Proteinsequenzen der Säugetiere sind stark konserviert und weisen eine hohe Sequenzidentität auf (Schätzl *et al.*, 1995), weshalb für die Prionproteine der Säuger eine identische Proteinstruktur und Funktion angenommen werden kann. Die Gewinnung der für eine röntgenkristallographische Strukturermittlung essentiellen hochreinen Einkristalle des zellulären Prionproteins hat sich bisher als sehr schwierig erwiesen, deshalb wurden die meisten Strukturdaten durch die magnetische Kern-Resonanzspektroskopie (NMR, „nuclear magnetic resonance“) an löslichen Proteinen gewonnen. Die Tertiärstruktur von PrP^C beinhaltet einen langen, flexiblen N-Terminus und einen strukturierten, globulären C-Terminus, bestehend aus drei α -Helices und zwei anti-parallel verlaufenden β -Faltblättern. Beim humanen PrP^C umspannen die drei α -Helices die Aminosäuren 144-154, 173-194 und 200-228, die β -Faltblattanteile die Aminosäuren 128-131 und 161-164 und der flexible N-Terminus die Aminosäuren 23-124 (Zahn *et al.*, 2000). Bei dem murinen PrP^C, einem für die Forschung weiterem interessanten PrP^C, erstreckt sich der flexible N-Terminus über die Aminosäuren 21-120 und der C-Terminus enthält die drei α -Helices mit den Aminosäuren 145-155, 175-193 und 200-219 und die beiden β -Faltblätter im Bereich der Aminosäuren 128-131 und 161-164 (Riek *et al.*, 1997). Die Prionproteine nehmen demzufolge eine sehr ähnliche Struktur in den unterschiedlichen Organismen ein. Obwohl der N-Terminus in den NMR-Analysen stets flexibel und ungeordnet erscheint, enthält dieser ebenfalls zwei abgegrenzte und konservierte Bereiche. Die erste Region enthält ein Segment von

Wiederholungen von einem Sequenzmotiv aus acht Aminosäuren (PHGGGWGQ), die sogenannten Oktapeptid-Region. Die Anzahl der Motiv-Wiederholungen kann abhängig von der betrachteten Spezies zwischen zwei und sieben betragen (van Rheede *et al.*, 2003). Für die Oktapeptid-Region von PrP^C wird eine Bindung mit hoher Affinität zu Kupfer vorgeschlagen (Brown *et al.*, 1997a; Hornshaw *et al.*, 1995; Viles *et al.*, 1999). Die Kupfer-Bindung ist kooperativ und bewirkt eine Konformationsänderung des flexiblen Bereichs (Morante *et al.*, 2004). Im Wesentlichen wird die Kupfer-Assoziation durch die Histidin-Reste der Oktapeptid-Region vermittelt (Aronoff-Spencer *et al.*, 2000; Burns *et al.*, 2002; Burns *et al.*, 2003). Der zweite Bereich beinhaltet eine Transmembranregion mit überwiegend hydrophoben Aminosäuren.

Obwohl für PrP^{Sc} die gleiche Aminosäuresequenz und identische posttranslationale Modifikationen angenommen werden, unterscheiden sich die beiden Proteine beträchtlich in ihrer Sekundärstruktur (Pan *et al.*, 1993; Stahl *et al.*, 1993). Während bei PrP^{Sc} ein großer Teil des Proteins aus β -Faltblättern besteht, bildet bei PrP^C die α -Helix das Hauptelement der Sekundärstruktur (Caughey *et al.*, 1991; Pan *et al.*, 1993).

2.3.5. Die pathogene Isoform des Prionproteins (PrP^{Sc})

Die pathogene Isoform (PrP^{Sc}) ist ausschließlich im Gehirn und in lymphoretikulären Geweben nachweisbar, wohingegen die physiologische Form des Prionproteins in fast allen Geweben exprimiert wird (Bendheim *et al.*, 1992; Manson *et al.*, 1992).

Sowohl PrP^C, als auch PrP^{Sc}, weisen die identische Aminosäureabfolge des Wirtes auf (Basler *et al.*, 1986; Oesch *et al.*, 1985), worin vermutlich der Grund liegt, weshalb der Erreger nicht immunogen wirkt und daher während des Krankheitsverlaufs weder eine entzündliche noch eine immunologische Reaktion zu beobachten ist. Ebenso unterscheiden sich die beiden Proteine auch nicht aufgrund von posttranslationellen, chemischen Modifikationen (Stahl *et al.*, 1993). Die Aminosäuresequenz, der GPI-Anker und die Glykosylierungen werden daher bei beiden Formen als identisch angenommen, wobei die Zusammensetzung der Zuckerketten an Asn181 und Asn197 eine gewisse Heterogenität ausweist. Deshalb ist eine vergleichende Analyse nur innerhalb dieser Variabilität möglich (Endo *et al.*, 1989; Haraguchi *et al.*, 1989; Rudd *et al.*, 1999; Stahl *et al.*, 1993; Stimson *et al.*, 1999).

Durch Strukturanalysen mittels Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FITR) und Circular dichroismus Spektroskopie (CD) konnte gezeigt werden, dass der relevante Unterschied zwischen PrP^C und PrP^{Sc} in der Proteinkonformation begründet ist (Pan *et al.*,

1993). Dieser Konformationsunterschied wird durch eine deutliche Zunahme an β -Faltblatt Strukturen sichtbar. PrP^{Sc} ist im Gegensatz zu PrP^C, welches zu 40 % aus α -Helices besteht und einen sehr geringen Anteil an β -Faltblättern aufweist, durch einen 50 %-igen Anteil an β -Faltblättern und einem 20 %-igen Anteil an α -Helices charakterisiert (Caughey *et al.*, 1991; Pan *et al.*, 1993; Safar *et al.*, 1993a).

Diese strukturellen Unterschiede von PrP^{Sc} zu PrP^C bedingen eine Reihe von biochemischen Besonderheiten. Dazu zählt die ungewöhnliche Resistenz gegenüber der Inaktivierung durch Chemikalien (Prusiner *et al.*, 1993), gegenüber einer Hitzedenaturierung (Safar *et al.*, 1993b) und gegenüber dem Abbau durch Proteasen (McKinley *et al.*, 1983). Selbst eine Behandlung mit der proteolytisch besonders aktiven Proteinase K (PK) bewirkt nur einen partiellen Abbau. Ein Umstand, der für die differentielle Detektion von PrP^C und PrP^{Sc} verwendet werden kann. Durch die Einwirkung der PK wird ein etwa 68 Aminosäuren umfassendes N-terminales Segment von PrP^{Sc} abgespalten, wodurch ein verändertes Migrationsverhalten bei der gelelektrophoretischen Auftrennung hervorgerufen wird. PrP^C hingegen wird unter denselben Bedingungen durch die PK innerhalb kurzer Zeit vollständig abgebaut (Barry *et al.*, 1986; McKinley *et al.*, 1983). Da PK-verdautes PrP^{Sc} Infektiösität aufweist (McKinley *et al.*, 1983) und transgene Mäuse, die ein äquivalent verkürztes Prionprotein exprimieren, mit PK-behandeltem PrP^{Sc} infiziert werden können und die Krankheit von diesen Tieren weiter übertragbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass die volle Länge des Prionproteins für den Replikationszyklus von PrP^{Sc} nicht zwingend benötigt wird (Fischer *et al.*, 1996).

Da PrP^{Sc} unlösliche Aggregate bildet, konnten die meisten Techniken zur Strukturanalyse, wie NMR oder Röntgenbeugung, bei der pathogenen Isoform des Prionproteins nicht angewendet werden, weshalb bis heute keine Tertiärstruktur aufgeklärt werden konnte. Systematische Studien mit dem Ziel PrP^{Sc} in Lösung zu bringen, wurden überwiegend mit Guanidinium-Hydrochlorid (GndHCl) (Kocisko *et al.*, 1994; Prusiner *et al.*, 1993) sowie Sarkosyl und Natriumdodecylsulfat (SDS) (Riesner *et al.*, 1996) durchgeführt, wobei die Auflösung der PrP^{Sc}-Aggregate in der Regel mit einer Reduktion des β -Faltblattgehaltes einherging. Dies führt zu einer Verringerung der Infektiösität, woraus die Schlussfolgerung gezogen werden kann, dass die Konversion von α -Helix zu β -Faltblatt das fundamentale Ereignis in der PrP^{Sc}-Bildung als auch in der Replikation der Prion-Infektiösität darstellt (Gasset *et al.*, 1993; Riesner *et al.*, 1996).

2.4. Neurotoxizität

Die Ablagerung von pathologischen Aggregaten des Prionproteins (PrP^{Sc}) im Gehirn ist ein Kennzeichen der Prionerkrankung. Sind aber diese PrP^{Sc} -Aggregate ausschließlich für die Toxizität und den Nervenzelltod verantwortlich? In Zellkulturmodellen konnte Neurotoxizität von PrP^{Sc} gezeigt werden (Forloni *et al.*, 1993; Hetz *et al.*, 2003), aber Ergebnisse aus *in vivo* Untersuchungen argumentieren gegen eine direkte Toxizität, denn eine Transmission des BSE-Agens zu Mäusen führt zu neurologischem Zelltod ohne detektierbares Prionprotein (Lasmézas *et al.*, 1997). Zusätzlich zeigt sich keine Toxizität von PrP^{Sc} gegenüber Neuronen, die kein PrP^{C} exprimieren (Brandner *et al.*, 1996; Bueler *et al.*, 1993; Sailer *et al.*, 1994). Darüberhinaus schützt postnatale Depletion des neuronalen PrP^{C} bei gleichzeitig etablierter Prioninfektion des Gehirns Mäuse vor klinischen Symptomen, damit einhergehend vor neuronalem Zelltod, und führt zu einer Rückbildung früher spongiformer Neuropathologie sowie Verhaltensauffälligkeiten der Tiere. Die Genesung findet trotz kontinuierlicher PrP^{Sc} -Bildung in Glia-Zellen statt und einem PrP^{Sc} -Gehalt im Gehirn, der ein ähnliches Niveau wie in terminalen Wildtyp-Tieren erreicht (Mallucci *et al.*, 2003). Aus diesen Gründen ist die Akkumulation von PrP^{Sc} wahrscheinlich nicht direkt für die Prionpathologie verantwortlich. Ist demzufolge die Eliminierung oder der Verlust der Funktion von PrP^{C} für die Toxizität verantwortlich? Auch dies scheint nicht der Fall zu sein, denn so zeigen die obengenannten $\text{Prnp}^{-/-}$ -Mäuse keinen Scrapie-Phänotyp, dies gilt auch für Tiere, denen PrP^{C} postnatal entfernt wird (Mallucci *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse deuten wieder eher daraufhin, dass das zentrale Ereignis der Neurotoxizität die Konversion von PrP^{C} in PrP^{Sc} ist. Denn schon 1993 konnte gezeigt werden, dass für die Propagation von PrP^{Sc} zelluläres PrP^{C} vorhanden sein muss, da mit PrP^{Sc} -haltigem Hirnhomogenat infizierte $\text{Prnp}^{-/-}$ -Mäuse keine Pathologie zeigten (Bueler *et al.*, 1993). Dies wurde weiter belegt durch den Befund, dass $\text{Prnp}^{-/-}$ -Mäuse, denen PrP^{C} -haltiges Hirngewebe transplantiert wurde, und die anschließend mit PrP^{Sc} infiziert wurden, zwar messbare Mengen an PrP^{Sc} bilden, aber nicht krank werden (Brandner *et al.*, 1996). Der molekulare Mechanismus der Neurotoxizität der Prionen bleibt somit weiterhin eine wichtige Fragestellung, auch wenn die aktuellen Ergebnisse daraufhinweisen, dass die Konversion der konformationellen Proteinstruktur das Neurotoxizität auslösende Ereignis darstellt. Die Natur der neurotoxischen Spezies und der zu Grunde liegende Mechanismus der neurologischen Schädigung bleiben jedoch bis heute ungeklärt.

2.5. Neurodegeneration

Die vier charakteristischen Veränderungen spongiöser Erkrankungen sind Gliose, Vakuolisierung, Protein-Ablagerungen und neuronale Apoptose (Hörnlimann, 2001). Spongiforme Veränderungen sind kleine blasenartige Gebilde im Neuropil mit einem Durchmesser von 2-10 μm . Bei verschiedenen spongiösen Erkrankungen findet man außerdem verschiedene PrP^{Sc}-Ablagerungen. Diese sind reich an β -Faltblatt Strukturen und besitzen eine starke Affinität zu Kongorot. Sie werden als „prion rods“ oder Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) bezeichnet. Bei verschiedenen CJD Formen findet man weiterhin große Ansammlungen von PrP^{Sc}-Ablagerungen, die als Plaques bezeichnet werden. Dabei unterscheidet man Kuru-Plaques, Multizentrische Plaques und Floride Plaques (Kretzschmar *et al.*, 2003). Ein weiteres Charakteristikum von Prionerkrankungen ist eine häufig vorzufindende Gliose. Im Mausmodell konnte von Giese *et al.* gezeigt werden, dass die Aktivierung von Mikroglia und die PrP^{Sc}-Deposition zeitlich parallel ablaufen, aber die Aktivierung der Mikroglia der neuronalen Apoptose vorangeht (Giese *et al.*, 1998). Es wird diskutiert, ob durch PrP^{Sc} aktivierte Mikroglia die Apoptose von Nervenzellen induziert. Aktivierte Mikroglia könnte z.B. durch Ausschüttung von zytotoxischen Zytokinen oder durch vermehrte Produktion von Sauerstoffradikalen (O^{2-}) zur neuronalen Apoptose im Verlauf der Scrapie Erkrankung bei der Maus beitragen (Giese und Kretzschmar, 2001).

Die im Verlauf der Prionerkrankungen auftretenden neurologischen Defekte resultieren wahrscheinlich aus einer Kombination von synaptischer Pathologie und neuronalem Zelltod. Mit Hilfe von Elektronenmikroskopie und konfokaler Mikroskopie wurden die neuronalen Veränderungen bei der Scrapie-infizierten Maus untersucht (Belichenko *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2001; Fuhrmann *et al.*, 2007; Jeffrey *et al.*, 1997; Jeffrey *et al.*, 2000; Johnston *et al.*, 1997). Bei der elektronenmikroskopischen Analyse hippocampaler Neurone von Mäusen, die mit dem Scrapie-Erreger-Stamm ME7 infiziert wurden, fand man eine frühe Ablagerung von PrP^{Sc} im Hippocampus. Welche Mechanismen an der Entstehung der beschriebenen neuropathologischen Veränderungen beteiligt sind und wie die pathogene und zelluläre Isoform des Prion-Proteins daran beteiligt sind, konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden.

2.6. Therapeutische Strategien

Die konformationsbedingte Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} spielt eine zentrale Rolle bei der Prionpathogenese. Trotz der Ungewissheit über den möglichen Mechanismus der

Neurotoxizität (2.4), kann das Unterbinden der Konversion in Neuronen den Krankheitsfortschritt verhindern und frühe degenerative Veränderungen zurückbilden (Mallucci *et al.*, 2003). Aus diesem Grund zielen die meisten Antiprion-Therapien auf eine Verringerung der PrP^{Sc}-Akkumulation ab.

Für eine therapeutische Strategie bieten sich verschiedene Ansatzmöglichkeiten zur Intervention an. Den offensichtlichsten Ansatz stellt das Unterbinden der Akkumulation von PrP^{Sc} dar. In Zellkultur ist eine Reihe von Substanzen bekannt, welche die PrP^{Sc} Akkumulation reduzieren, wie z.B. polyanionische Substanzen (Caughey und Raymond, 1993), Kongorot (Caughey und Race, 1992), Amphotericin B (Tagliavini *et al.*, 1997), Porphyrine (Supattapone *et al.*, 2001) und Quinacrine (Korth *et al.*, 2001). Im Tiermodell stellt sich jedoch eine andere Situation dar, denn dort sind nur sehr wenig aktive Substanzen bekannt. Außerdem führt die Behandlung mit den bisher bekannten Substanzen nur zu einem moderaten Effekt bezüglich der Überlebenszeit in *in vivo* Experimenten (Farquhar und Dickinson, 1986; Ingrosso *et al.*, 1995; Ladogana *et al.*, 1992; McKenzie *et al.*, 1994; Priola *et al.*, 2000; Tagliavini *et al.*, 1997) und zeigen diesen Effekt auch nur bei Gabe um den Zeitpunkt der Prioninfektion (Tagliavini *et al.*, 1997). Einige der Substanzen reduzieren offenbar nur den effektiven Titer des Inokulums und beeinflussen nicht die Pathogenese als solche. Mit dieser Beobachtung einhergehend zeigte sich zusätzlich, dass einige dieser Substanzen nur nach peripherer Infektion, bevor eine Neuroinvasion stattgefunden hat, wirksam sind. Einzige Ausnahmen sind die beiden Substanzen Pentosan Polysulphat bei intraventrikulärer Administration und Amphotericin B (Demaimay *et al.*, 1997; Doh-ura *et al.*, 2004).

Eine weitere Möglichkeit der therapeutischen Intervention besteht darin die Konversion von PrP^C in die pathogene Form das PrP^{Sc} zu verhindern. Der Umwandlungsprozess kann auf verschiedenen Wegen verhindert werden. So können Liganden eingesetzt werden, die PrP^C binden und stabilisieren, wie anti-PrP Antikörper oder Substanzen wie Kongorot, die PrP^C sequestrieren und einer Umfaltung entziehen (Caughey *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2008), was zu einer geringeren Konversion führt. Die Stabilisierung von PrP^C stellt durchaus eine sinnvolle Therapie dar, weil PrP^C weitgehend entfaltet werden muss, damit eine Konversion in PrP^{Sc} stattfinden kann (Hosszu *et al.*, 1999).

Der Einsatz von anti-PrP Antikörper als Prion-Therapeutika konnte bereits erfolgreich durchgeführt werden. In einem Mausmodell nach peripherer Infektion mit Prionen führte die passive Immunisierung mit einem anti-PrP Antikörper zu deutlich reduziertem PrP^{Sc}-Gehalt und Infektivität in der Milz. Darüber hinaus überlebten die behandelten Tiere mehr als 300

Tage, während die unbehandelten Tiere bereits verstorben waren (White *et al.*, 2003). Die Antikörper konnten die Blut-Hirn-Schranke jedoch nicht passieren, weshalb bei Tieren nach intrazerebraler Infektion kein protektiver Effekt sichtbar war. Dennoch könnten humanisierte Antikörper für die Post-Expositions-Prophylaxe bei besonderen Risikogruppen eingesetzt werden. Bei fortgeschrittenen Erkrankungen können solche Antikörper hingegen nicht eingesetzt werden. Außerdem zeigte eine Studie, dass große Mengen von anti-PrP Antikörper nach intraventrikulärer Infusion zu einer massiven neuronalen Apoptose führen (Solfrosi *et al.*, 2004). Die aktive Immunisierung ist durch die vorhandene Immuntoleranz gegenüber PrP, welches auch im Immunsystem exprimiert wird, nur eingeschränkt möglich. Ansätze die Toleranz zu umgehen werden untersucht, aber die bisherigen Ergebnisse zeigen nur einen geringen Effekt (Schwarz *et al.*, 2003; Sigurdsson *et al.*, 2002).

Die Verstärkung der natürlichen Clearance setzt nicht wie die anderen Strategien an dem Entstehungsprozess von PrP^{Sc} an, sondern zielt vielmehr auf dessen effiziente Entfernung ab. Auch wenn sich PrP^{Sc} durch eine gewisse Stabilität gegenüber einer proteolytischen Spaltung durch Proteinase K auszeichnet, gibt es jedoch Beweise für eine relativ effiziente Beseitigung. Nach intrazerebraler Inokulation von *Prnp*^{-/-}-Mäusen mit einem hohen Priontiter fällt der ursprüngliche Titer bereits nach zwei Wochen unter die Nachweisgrenze (Bueler *et al.*, 1993). Obwohl der zugrundeliegende Mechanismus noch näher charakterisiert werden muss, scheint die Verstärkung dieses Mechanismus durchaus einen rationalen therapeutischen Ansatz darzustellen. Eine Alternative stellt die Gabe von therapeutischen Substanzen dar, die den Umwandlungsprozess von PrP^C in PrP^{Sc} soweit verlangsamt, dass die natürliche Clearance den Prion-Gehalt verringert und damit eine Heilung erreicht werden könnte.

2.7. Zielsetzung

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind keine Therapien für Prionkrankheiten bei Menschen verfügbar, weshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit Grundlagen für neue Therapieansätze entwickelt werden sollten. Dazu sollten zwei Strategien mit potentieller Wirkung auf PrP^{Sc} eingesetzt werden, denen unterschiedliche Mechanismen zu Grunde liegen.

Die erste Strategie richtete sich auf die Stimulierung des angeborenen Immunsystems, welche zu einer erhöhten Clearance des gebildeten PrP^{Sc} führen sollte. Durch repetitive Gabe von CpG-ODN sollte das angeborene Immunsystem der behandelten Mäuse stimuliert und der Einfluss auf die Überlebenszeit untersucht werden. Außerdem sollte untersucht werden, welche Wirkung die wiederholte Gabe von CpG-ODN auf die Mikroarchitektur der Milz hat.

Der zweite Ansatz zielte auf die Entdeckung und Weiterentwicklung von chemischen Verbindungen mit antiaggregativer Wirkung ab. Dieser Ansatz untersucht die Möglichkeit einer kausalen Therapie über eine pharmakologische Hemmung der PrP^{Sc}-Bildung. In einem ersten Schritt sollten mittels eines Hochdurchsatzassays durch die systematische Analyse verschiedener chemischer Substanzbibliotheken neue Leitstrukturen identifiziert werden, die die PrP^C-PrP^{Sc}-Interaktion auf molekularer Ebene beeinflussen. Im zweiten Schritt sollten die Substanzen auch im zellulären System und danach in *in vivo* Tiermodellen auf Antiprion-Aktivität untersucht werden. Darüberhinaus sollten biochemische Methoden und die Prion-Tiermodelle weiterentwickelt werden, um eine größere Anzahl an unterschiedlichen Substanzen in kürzerer Zeit auf Antiprion-Aktivität untersuchen zu können.

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien und Materialien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien stammten von den Firmen Roche (Mannheim), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt), VWR (Darmstadt), andernfalls ist die Herkunft im Text gesondert ausgewiesen. Die Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen Eppendorf (Hamburg), VWR (Darmstadt), Evotec (Hamburg), Sarstedt (Nümbrecht). Die überwiegend für immunochemische Untersuchungen verwendeten Antikörper wurden von den Firmen Dako Deutschland GmbH (Hamburg), Dianova (Hamburg), BD Biosciences (Heidelberg) und Prionics AG (Schlieren-Zürich, Schweiz) bezogen, ansonsten wird die Herkunft des Antikörpers im Text angegeben. Das CCD Kamerasystem DianaIII und die Analysesoftware Aida Image Analyzer v3.52 zur Auswertung von Western Blot Analysen stammten von Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH (Straubenhardt).

3.2. Molekularbiochemische Methoden

3.2.1. Natriumwolframat-Fällung

Die Aufreinigung von PrP^{Sc} durch Natriumwolframat (NaPTA)-Fällung erfolgte nach dem Protokoll von Wadsworth und Kollegen (Wadsworth *et al.*, 2001). Für die NaPTA-Fällung wurde 10 %-iges (w/v) Milzhomogenat in DPBS (Invitrogen, Karlsruhe) hergestellt. Um den Zelldebris vom Homogenat abzutrennen, wurde der Ansatz bei 100 x g für 1 min mit einer Tischzentrifuge Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit gleichem Volumen von 4 %-igem Sarkosyl in einem neuen Reaktionsgefäß versetzt und für 10 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Ansatz wurde danach auf eine Endkonzentration von 50 U/mL Benzonase (Merck, Darmstadt) und 1 mM MgCl₂ eingestellt und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde zu dem Ansatz eine auf 37 °C vorgewärmte NaPTA-Stammlösung hinzugefügt, sodass NaPTA mit einer Endkonzentration von 0,3 % vorliegt und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Der Fällungsansatz wurde für 30 min bei 15800 x g zentrifugiert und Überstand vom Pellet getrennt. Das Pellet wurde in 200 µL PBS/ Sarkosyl und 50 µL 250 mM EDTA (pH 8,0) resuspendiert und anschließend bei 158000 x g für 15 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift kann optional wiederholt

werden, wenn sich ein weißes Präzipitat, welches aus unlöslichen Magnesiumsalzen besteht, im Pellet befindet. Nach den Waschschrinen wird das Pellet in 30 μL PBS/ Sarkosyl resuspendiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tabelle 1: Puffer und Lösungen für Wolframat-Fällung

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Natriumwolframat-Stammlösung	4 g Wolframat 3,49 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ in 50 mL Aqua dest. lösen pH 7,4 mit NaOH einstellen ad 100 mL Aqua dest.
DPBS	Dulbecco's PBS (Invitrogen, Karlsruhe)
4 % Sarkosyl	4 g Sarkosyl ad 100 mL PBS pH 7,4
PBS/ Sarkosyl	0,25 mL 4 % Sarkosyl ad 10 mL PBS pH 7,4
0,5 M EDTA	93 g EDTA in 350 mL Aqua dest. lösen pH 8,0 mit 10 M NaOH einstellen ad 0,5 L Aqua dest.

3.2.2. Deglykosilierung von Glykoproteinen

Die Abspaltung von Asparagin-gebundenen Zuckerresten von Glykoproteinen wurde durch Inkubation der Proteine mit PNGase F (New England Biolabs, Frankfurt) durchgeführt. Die Deglykosilierung wurde nach den Angaben des Herstellers und mit den mitgelieferten Puffern und Lösungen durchgeführt. Die Inkubation des Hirnhomogenates mit PNGase F wurde über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Das eingesetzte Volumen betrug 5 oder 10 μL 10 %-iges Hirnhomogenat.

3.2.3. Proteolyse durch Proteinase K

Zum Nachweis der protease-resistenten Form des Prionproteins wurden die zu untersuchenden Proben mit Proteinase K (Roche, Mannheim) inkubiert. In der Regel wurde dafür eine Proteinase K-Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eingestellt und die Ansätze für eine Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Proteolyse wurde entweder durch Zugabe von

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) bei einer Endkonzentration von 2 mM oder durch Aufkochen der Proben für 10 min in 2 x SDS Auftragspuffer abgestoppt. Die bei der PrP^{Sc} Aufreinigung (3.2) aus Milzhomogenat erzielten Proben wurden mit einer Proteinase K-Konzentration von 50 µg/mL für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

3.2.4. Bradford-Assay

Die Bestimmung der Protein-Konzentration wurde durch eine modifizierte Methode von Bradford ermittelt. Dazu wurden 1 µL der zu analysierenden Protein-Lösung mit 200 µL Bradford-Reagenz (Bio-Rad, München) und 799 µL H₂O vermischt, für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Spectrophotometer Typ Ultrospec 3000 (Amersham Biosciences, Freiburg) fotometrisch bestimmt. Die Proteinkonzentration konnte anschließend anhand einer Eichkurve aus definierten BSA-Konzentrationen ermittelt werden. Es wurden in der Regel Proteinkonzentrationen von 1-10 µg/µL gemessen.

3.2.5. Bicinchoninsäure-Assay

Zur Bestimmung der Protein-Konzentration von Hirn-Homogenaten wurde eine modifizierte Methode von Lowry *et al.* (Lowry *et al.*, 1951) verwendet. Dazu wurden die Proben mit 1 ml Arbeitslösung des „Bicinchoninic acid“ (BCA) Kits (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) versehen, nach den Angaben des Herstellers prozessiert und bei 562 nm in einem Spectrophotometer Typ Ultrospec 3000 (Amersham Biosciences, Freiburg) fotometrisch vermessen.

3.2.6. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Mit Hilfe einer diskontinuierlichen, denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Durchführung erfolgte mit 8 x 6,5 cm² großen Gelen in der Gelelektrophorese-Apparatur Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad, München), wobei 1/4 der Gel-Länge aus dem Sammelgel und 3/4 aus dem Trenngel bestand. Zunächst wurde ein 12 %-iges Trenngel aus einer Acrylamid-Stammlösung (Tabelle 3) hergestellt. Nach dem Gießen des Trenngels wurde die Trenngellösung mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren bei RT wurde das Isopropanol entfernt und die 5 %-ige Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen. Vor der Elektrophorese wurden die Proteinproben mit 2 x SDS Auftragspuffer (Tabelle 3) versetzt, 10 min bei 95 °C aufgeköcht und nach Abkühlung für 5 min auf Eis zusammen mit

einem Molekulargewichtsstandard „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Fermentas, St. Leon-Rot) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 30 min bei 80 V, wodurch das Einlaufen der Proben in das Sammelgel erreicht wurde. Danach wurde die Auftrennung der Proteine bei einer Spannung von 140 V durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Bande das Ende des Trenngels erreicht hat.

3.2.7. Coomassie-Färbung

In der Regel wurden die denaturierenden Polyacrylamid-Gele für 30 min in Coomassie-Färbelösung (Tabelle 2) bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Zur Entfärbung wurde das Gel für mehrere Stunden in Entfärber (Tabelle 2) gegeben und unter mehrmaligem Wechsel des Entfärbers bis zu dem gewünschten Färbegrad entfärbt.

Tabelle 2: Puffer zur Coomassie-Färbung

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Coomassie-Färbelösung	50 % (v/v) Methanol 0,05 % (w/v) Coomassie brilliant blue R-250 10 % (v/v) Essigsäure ad 100 mL Aqua dest. Lagerung bei RT für 6 Monate
Entfärber	5 % (v/v) Methanol 7 % (v/v) Essigsäure ad 100 mL Aqua dest. Lagerung bei RT für 1 Monat

3.2.8. Western Blot Analyse

Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine aus dem ungefärbten Polyacrylamid-Gel durch eine Elektroelution in einer „semi-dry“ Transfer-Apparatur SemiPhor TE77 (Hofer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, USA) auf die Polyvinylidenfluorid (PVDF) Transfermembran Immobilon-P mit einer Porengröße von 0,45 μm (Millipore, Eschborn) übertragen.

Dazu wurde die mit Methanol aktivierte PVDF Transfermembran ($8 \times 6,5 \text{ cm}^2$), das Polyacrylamid-Gel und vier an die Größe der Membran angepasste GB 005 Gel-Blotting-Papiere (Schleicher & Schuell, Dassel) in Transfer-Puffer (Tabelle 3) äquilibriert. Der Transferstapel wurde ausgehend von der Anodenplatte in der Reihenfolge zwei Gel-Blotting-Papiere, Transfermembran, Polyacrylamid-Gel und zwei Gel-Blotting-Papiere luftblasenfrei

in der Transfer-Apparatur zusammengesetzt und abschließend mit der Katodenplatte abgedeckt. Der Elektrotransfer wurde für 1,5 h bei konstanter Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche durchgeführt.

Nach dem Proteintransfer auf die PVDF Transfermembran wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation der Membran in Blockierungspuffer (Tabelle 3) unter ständigem Schwenken für 1 h bei RT abgesättigt. Anschließend wurde die Membran mit in Blockierungspuffer verdünntem Anti-PrP-Antikörper über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nachdem die Membran zweimal für 15 min in PBST gewaschen wurde, um den ungebundenen Primär-Antikörper zu entfernen, wurde die Membran für 1 h in Blockierungspuffer verdünnten mit alkalischer Phosphatase-konjugiertem Sekundär-Antikörpers inkubiert, wieder zweimal für 15 min in PBST gewaschen und abschließend für 5 min in Detektionspuffer inkubiert. Der Detektionspuffer wurde abgossen und Puffer-Reste durch Abtupfen mit Zellstoff von der Membran entfernt.

Zur Immunodetektion wurden 0,5 ml CDP-Star Substrat-Lösung (Roche, Mannheim) auf die Membran getropft. Die Membran wurde mit einer transparenten Folie umhüllt und verschlossen. Die enzymatische Dephosphorylierung des Substrates durch die an den Sekundär-Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase führt zu einem meta-stabilem Intermediat, bei dessen Zerfall Licht mit einer Wellenlänge von 466 nm emittiert wird. Das abgestrahlte Licht wurde mit dem CCD Kamerasystem DianaIII (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt) detektiert und die Ergebnisse mit der Software Aida Image Analyzer v3.52 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt) ausgewertet.

Tabelle 3: Puffer und Lösungen für Proteinanalyse

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Acrylamid-Stammlösung (37,5 : 1)	30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid Lagerung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$
Trenngel (12%)	12 % (v/v) Acrylamid-Stammlösung 375 mM Tris/ HCl pH 8,3 0,1 % (w/v) SDS 0,05 % (v/v) TEMED 0,05 % (v/v) APS ad 20 mL Aqua dest.
Sammelgel (5%)	5 % (v/v) Acrylamid-Stammlösung 125 mM Tris/ HCl pH 6,8 0,1 % (w/v) SDS

	0,1 % (v/v) TEMED 0,05 % (v/v) APS ad 10 mL Aqua dest.
10 x SDS Elektrophoresispuffer	30,2 g Tris Base 144 g Glycin 10 g SDS ad 1 L Aqua dest. Lagerung bei 4 °C
2 x SDS Auftragspuffer	100 mM Tris/ HCl pH 6,8 200 mM DTT (Dithiothreitol) 4% (v/v) SDS 20 % (v/v) Glycerin 0,25 % (w/v) Bromphenolblau Lagerung bei -20 °C
Transferpuffer	100 mL 10 x SDS Elektrophoresispuffer 200 mL Methanol (100%) ad 1 L Aqua dest.
10 x PBS	80 g NaCl 2 g KCl 7,6 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 L Aqua dest. Lagerung bei RT
1 x PBS(T)	100 mL 10 x PBS 1 mL Tween 20 (für PBST) ad 1 L Aqua dest. Lagerung bei RT
Blockierungspuffer	1 g I-Block (Applied Biosystems, Darmstadt) ad 0,5 L PBST Lagerung bei 4 °C
Detektionspuffer	0,1 M Tris/ HCl 0,1 M NaCl pH 9,5 Lagerung bei RT

3.2.9. Dot Blot Analyse

Zur Quantifizierung des PrP^{Sc}-Gehaltes in Milzhomogenaten nach der PrP^{Sc} Aufreinigung (3.2) und Hirnhomogenaten wurde neben der Western Blot- auch eine Dot Blot-Analyse durchgeführt.

Dazu wurde eine Nitrozellulose Transfermembran mit einer Porengröße von 0,45 µm (Bio-Rad, München) für 10 min in PBS äquilibriert. Anschließend wurde die Membran in die „Bio-Dot Microfiltration“ Apparatur (Bio-Rad, München) eingesetzt und diese nach den Angaben

des Herstellers zusammgebaut, wobei freie Probenkammern mit Parafilm abgedichtet wurden. Anschließend wurden die Probenkammern mit 100 µL PBS befüllt und durch das Anlegen eines Vakuums wurde der Puffer durch die Membran gesogen. Durch diese zusätzliche Befeuchtung der Membran wird eine gleichmäßige Bindung der Proteine an die Membran gewährleistet. Danach wurden 50 µL PBS/ Sarkosyl (Tabelle 1) in die Probenkammern vorgelegt, das entsprechende Volumen für ein Äquivalent von 2,5 mg Milzgewebe aus der PrP^{Sc} Aufreinigung hinzugegeben und mittels Vakuum durch die Membran gesogen. Nach dem Waschen der Probenkammern mit 100 µL PBS und erneutem Anlegen eines Vakuums wurde die Apparatur nach den Angaben des Herstellers auseinander gebaut.

Zur Detektion des an die Membran gebundenen PrP^{Sc} wurde diese für 10 min in 4 M Guanidiniumhydrochlorid (GndHCl) geschwenkt, um die Antigene für den Anti-PrP-Antikörper zugänglich zu machen. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurde die Membran für 1 h in Blockierungspuffer (Tabelle 3) inkubiert und die weitere Entwicklung wie bei der Western Blot Analyse durchgeführt (3.2.7).

3.2.10. Zellkultur

Die Zellkulturversuche wurden von der Arbeitsgruppe Groschup vom Friedrich-Loeffler-Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger auf der Insel Riems durchgeführt.

3.2.11. Fluoreszenzmarkierung von rekombinantem PrP und L42

Um die Aggregation von rekombinantem Maus-Prionprotein (rPrP) mittels Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse (FIDA) zu untersuchen, wurden die rPrP-Moleküle mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Karlsruhe) markiert. Dabei wurde die Reaktion des als Succinimidylester vorliegenden Farbstoffes mit nicht-protonierten aliphatischen Aminogruppen, wie der N-terminalen Aminogruppe von Proteinen und der ε-Aminogruppe von Lysin für die Verknüpfung ausgenutzt.

Die Markierungsreaktion für Maus-PrP wurde mit 500 µg rPrP aus einer Stammlösung (50 % Glycerin bei -20 °C) in Kaliumphosphat-Puffer (20 mM, pH 6,0) mit 0,1 % NP40 durchgeführt. Dem Markierungsansatz wurde 1/25 Volumen Natriumhydrogencarbonat (1 M, pH 8,3) zugegeben, um die Reaktion bei einem pH-Wert von 7,2 ablaufen zu lassen. Dadurch wurde eine spezifischere Markierung des N-Terminus der Proteine mit dem Farbstoff erreicht. Die Stoffmenge des Farbstoffes in der Markierungsreaktion betrug den zweifachen

Überschuss zu den eingesetzten rPrP-Molekülen. Die Reaktion wurde 1 Stunde bei 4 °C unter Lichtausschluss durchgeführt. Anschließend wurden die markierten rPrP-Moleküle von freiem Farbstoff durch Gelfiltration mit PD-10 Säulen (GE Healthcare, Freiburg) getrennt. Zur Kontrolle der Markierungsrate wurden von 1:1000 Verdünnungen in Natriumphosphat-Puffer (20 mM, pH 6,0) mit 0,2 % SDS eine FCS-Analyse vor und nach einer Proteinase K-Behandlung (0,1 mg/ml) durchgeführt. Durch den Zusatz von 0,2 % SDS wurde gewährleistet, dass das rPrP ausschließlich in Monomeren vorliegt. Durch die proteolytische Spaltung der Proteine werden die gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe vom Protein getrennt und führen zum Anstieg fluoreszierender Partikel, daraus lässt sich auf die Markierungsrate eines Proteins schließen. Die Markierungsansätze wurden abschließend aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Der monoklonale Antikörper L42 (r-biopharm, Darmstadt) wurde mit Alexa Fluor 647 (Invitrogen, Karlsruhe) markiert. Die Markierungsreaktion des Antikörpers wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Markierung wurde der Antikörper von freiem Farbstoff mittels Gelfiltration durch Sephadex G-50 Zentrifugationssäulen (Amersham Biosciences, Freiburg) getrennt. Die Lagerung des markierten Antikörpers erfolgte bei -80 °C.

3.2.12. „Scanning for intensely fluorescent targets“-Assay

Mit Hilfe des “Scanning for intensely fluorescent targets“ (SIFT)-Assay, weiter SIFT Antiprion-Assay genannt, wurde der inhibitorische Effekt von chemischen Substanzen auf die Assoziation von rekombinantem PrP und PrP^{Sc} untersucht. PrP^{Sc} wurde aus Gehirnen von verstorbenen CJD-Patienten nach dem Protokoll von Safar (Safar *et al.*, 1998) aufgereinigt und in PBS/ Sarkosyl (Tabelle 1) resuspendiert. Danach wurde das PrP^{Sc} fünffach in Puffer A verdünnt und in einem Wasserbad für 60 s sonifiziert. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 1 min wurde der Überstand 1:100 in Puffer A für den Antiprion-Assay weiter verdünnt. Die Substanzen für den Antiprion-Assay wurden in einer Konzentration von 10 mM in 100 % DMSO angesetzt und anschließend 10-fach in DMSO verdünnt. Zusätzlich wurde fluoreszenz-markiertes rPrP und Antikörper L42, welcher humanes PrP und PrP^{Sc} Aggregate aus humanen CJD-Gehirnen bindet, jedoch kein murines PrP, in Puffer A in einer Konzentration von 2-6 nM hergestellt. Ein 20 µL-Ansatz besteht zunächst aus 8 µL rPrP/Antikörper-Gemisch und 2 µL Substanz, bevor 10 µL des verdünnten PrP^{Sc} zugesetzt werden. Die Proben wurden schließlich in einer 96-er Probenplatte mit Glasboden (Evotec-Technologies, Hamburg) in einem Insight Reader gemessen. Dazu wurde die Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungs-Analyse (FIDA) verwendet. FIDA stellt eine sehr gut geeignete

Technik dar, um die Emissionskraft von einzelnen fluoreszierenden Molekülen zu messen. Dazu wird ein konfokaler Aufbau verwendet und die Detektion von einzelnen Photonen mit Einzelphotonendetektoren ermöglicht. Die Basis von FIDA ist eine statistische Auswertung der Photonenzahl, die während einer Messung in einem bestimmten Zeitfenster (bin) detektiert wurden. Die Anregungsenergie betrug $200 \mu\text{W}$ für den 488 nm Laser und $300 \mu\text{W}$ für den 633 nm Laser. Nach der Anregung wurde das emittierte Licht der beiden Fluorophore in zwei unabhängigen Einzelphotonendetektoren detektiert und die Photonen wurden über ein Zeitintervall konstanter Länge (bin) aufsummiert. Die „bin“-Länge betrug $40 \mu\text{s}$ bei einer Messzeit von 10 s . Die statistische Auswertung enthält die Anzahl der Photonen pro bin und die Häufigkeit solcher Ereignisse. Aus dieser Statistik lässt sich ein zwei-dimensionales Fluoreszenz-Intensitäts-Histogramm entwickeln. Die Histogramme wurden anschließend mit dem Softwaremodul 2D-SIFT (Evotec Technologies, Hamburg) ausgewertet.

Die Bindung von rPrP-Molekülen (grün) und Antikörper L42 (rot) an die PrP^{Sc} -Aggregate resultiert in der Bildung von Komplexen, die rote und grüne Fluorophore beinhalten (Abbildung 1A). Die Aggregate können in zwei-dimensionalen Fluoreszenz-Intensitäts-Histogrammen identifiziert und analysiert werden (Abbildung 1B+D). Wird ein Inhibitor für die Assoziation von rPrP an PrP^{Sc} eingesetzt, dann sinkt die Intensität der grünen Fluoreszenz von den Aggregaten. Die Farbverteilung der Aggregate verschiebt sich dann in Richtung roter Fluoreszenz (Abbildung 1D). Je stärker die inhibitorische Aktivität einer Substanz, desto weniger nimmt die Zahl und Größe der grün fluoreszierenden Aggregate zu.

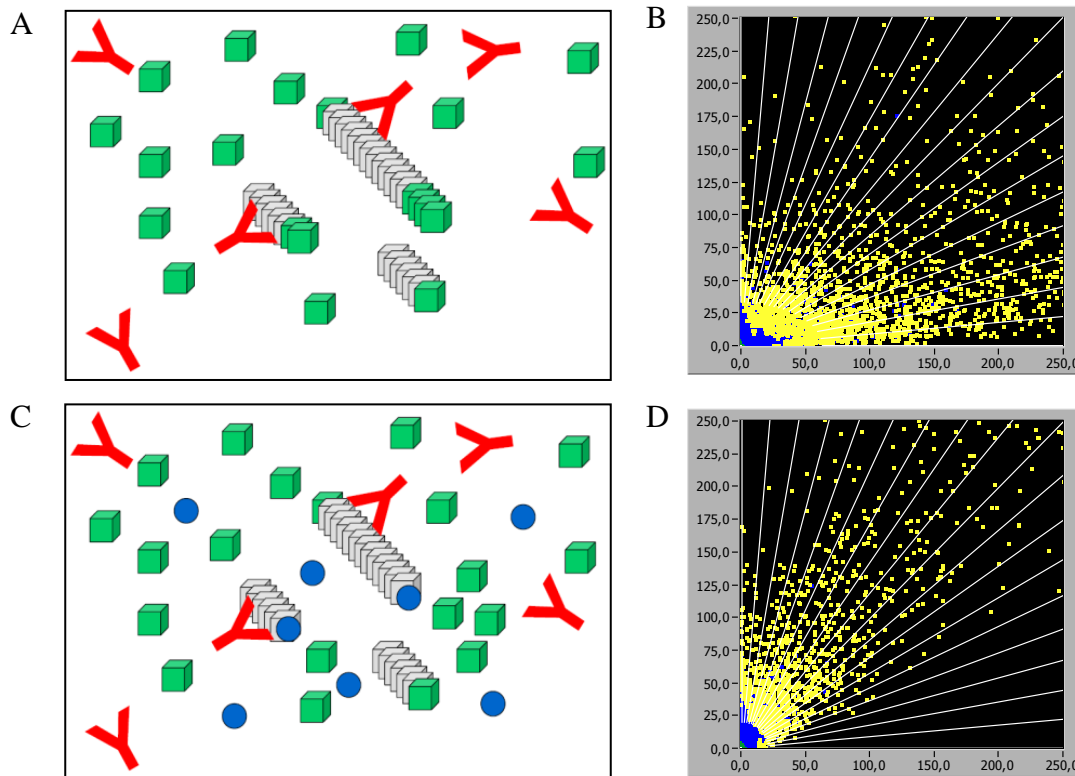


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Antiprion-Assay mit und ohne therapeutische Substanz. (A+C) L42 Antikörper ist als rotes Ypsilon dargestellt. Grüne Quader stellen rekombinantes PrP dar. Humanes PrP^{Sc} wird durch weiße Quader repräsentiert. In (C) symbolisieren die blauen Kreise die zugesetzte Substanz. (B+D) zeigen 2D-FIDA Diagramm. Intensität der roten Fluoreszenz ist auf der y-Achse abgetragen und grüne Fluoreszenz auf der x-Achse. (D) mit wirksamer Substanz. Verdeutlicht die Verschiebung in Richtung roter Fluoreszenz der Aggregate.

Tabelle 4: Puffer und Lösungen für den SIFT-Assay

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Puffer A	20 mM K-Phosphatpuffer, pH 6,0 0,1 % (v/v) Nonidet P40
DPBS	Dulbecco's PBS (Invitrogen, Karlsruhe)
4 % Sarkosyl	4 g Sarkosyl ad 100 mL PBS pH 7,4
PBS/ Sarkosyl	0,25 mL 4 % (w/v) Sarkosyl ad 10 mL PBS pH 7,4
0,5 M EDTA	93 g EDTA in 350 mL Aqua dest. lösen pH 8,0 mit 10 M NaOH einstellen ad 0,5 L Aqua dest.

3.3. Histologische Methoden

3.3.1. Hämatoxylin und Eosin-Färbung

Nach Dekontamination in 100 %-iger Ameisensäure für 1 h und einer Nachfixierung in 4 %-igem phosphat-gepuffertem Formalin für 48 h nach dem Protokoll von (Brown *et al.*, 1990), wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet. Die Hämatoxylin und Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurde an 2,5 µm dicken Paraffinschnitten auf silanisierten Objektträgern durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden zunächst entparaffiniert. Hierzu wurden sie für 30 min in einem Wärmeschrank auf 37°C erwärmt, dann zweimal für jeweils 5 min in Xylol, anschließend für jeweils 2 min in einer Mischung aus 50 % Xylol und 50 % Isopropanol, dreimal in 100 %-igem Isopropanol, zweimal in 90 %-igem Isopropanol, je einmal in 70 %-igem und 50 %-igem Isopropanol und zum Abschluss in H₂O gespült. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 10 min in Hämalalaun nach Mayer inkubiert, durch mehrmaliges kurzes Eintauchen in HCl-Alkohol differenziert und dann für 10 min in vollentsalztem Wasser gebläut. Dann wurden die Präparate für 4 min in 0,5 % Eosin gestellt, rasch durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt und mit DEPEX eingedeckelt.

3.3.2. Immunhistochemie

Die immunhistochemische Darstellung von Follikulär Dendritischen Zellen (FDC) und B-Zellen wurde an Gefrierschnitten von nativ tiefgefrorenem Milzgewebe durchgeführt. Hierzu wurden in einem Kryostaten des Modells 2800 Frigocut E der Firma Reichert-Jung 5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf mit Polylysin beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden anschließend für 15 min luftgetrocknet und bei Bedarf bei -80 °C für die weitere Bearbeitung gelagert. Die getrockneten Gewebeschnitte für 10 min bei Raumtemperatur in 100%-igem Ethanol nachfixieren und 3 x 5 min mit PBS waschen. Danach mit 3 %-igem H₂O₂ für 5 min inkubieren und erneut waschen.

Als Primärantikörper dienen die monoklonalen Rattenantikörper FDC-M1 (BD; BD 551320) und CD45/B220 (BD; BD 550286). Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper erfolgte nach Waschen der Schnitte mit PBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:50 in PBS/ 0,1 % Brij und 1 % Mausnormalserum eingesetzt. Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Kaninchen-anti-Ratte-Antikörper biotinyliert (Dako, E 0468) in einer Verdünnung von 1:50 in PBS inkubiert und nochmals mehrfach mit

TBS gespült. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit Streptavidin-HRP (Dako, P 0397) in einer Verdünnung von 1:50 in PBS für 30 Minuten. Als Farbsubstrat für die Peroxidase wurde DAB-Chromogen (Dako, S 3000) verwendet, das durch die alkalische Phosphatase in ein bräunliches, wasserunlösliches Reaktionsprodukt umgesetzt wird. Die DAB-Färbelösung wurde durch lösen einer DAB Tablette in 0,05 M Tris-Puffer pH 7,6 unter ständigem Rühren hergestellt. Nach Zugabe von 30 %-igem H_2O_2 (1 μL / 1 mL) ist die Färbelösung 2 Stunden stabil.

Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Färbeküvette inkubiert. Die Färbereaktion wurde durch Spülen mit destilliertem Wasser beendet und die Gewebeschnitte nach einer Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer mit Aquamount eingedeckelt. Die Dekontamination der Objektträger erfolgte durch eine 30-minütige Behandlung mit 2 M NaOH.

Zur Auswertung der FDC-Netzwerke und B-Zellfollikel in der Milz wurden die Schnitte entsprechend dem unter (3.3.3) beschriebenen Vorgehen geblindet ausgewertet.

3.3.3. Auswertung der Immunhistochemie

Zur Auswertung der gefärbten Gewebeschnitte wurde die Auswertesoftware CellID von Olympus benutzt. Mit Hilfe dieses Programms konnten die B-Zellfollikel und FDC-Netzwerke in den gefärbten Gewebeschnitten quantitativ ausgewertet werden. In (Abbildung 2) ist repräsentativ die Auswertung eines lymphatischen Follikels dargestellt. In dem Follikel sind die B-Zellen nach Färbung durch einen entsprechenden Antikörper sichtbar (bräunliche Färbung). In dem lymphatischen Follikel sind peripher zwei B-Zellfollikel zu erkennen (nummeriert mit 1 und 2). Die B-Zellfollikel können durch Anzahl und Durchmesser beschrieben werden. Dadurch lassen sich die B-Zellfollikel der gesamten Milz histologisch beschreiben und quantitativ auswerten.

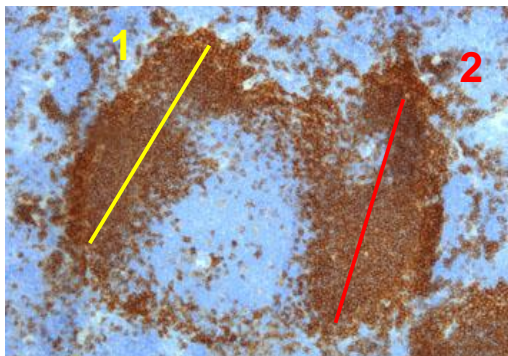


Abbildung 2: Histologische Auswertung der B-Zellfollikel in der Milz. Die B-Zellen wurden mit einem CD45/B220 Antikörper angefärbt. Quantitative Beschreibung der B-Zellfollikel durch das Programm CellID (Olympus). Die Linien zeigen den Durchmesser der ausgewerteten B-Zellfollikel.

Neben den B-Zellfollikeln wurden außerdem die FDC-Netzwerke innerhalb eines B-Zellfollikels ausgewertet. Zur Darstellung der FDC-Netzwerke wurde der Antikörper FDC-M1 verwendet. Die FDC-Netzwerke stellen sich als verwobene Strukturen in einem B-Zellfollikel dar (Abbildung 3A). Diese verwobene netzartige Struktur schließt eine einfache Bestimmung der eingenommenen Fläche aus. Deshalb wurde durch Setzen eines entsprechenden Farbschwellwertes mit Hilfe des Programms CellD ein binärisiertes Bild erstellt werden (Abbildung 3B), aus diesem anschließend automatisiert die Gesamtfläche eines FDC-Netzwerkes berechnet wurde.

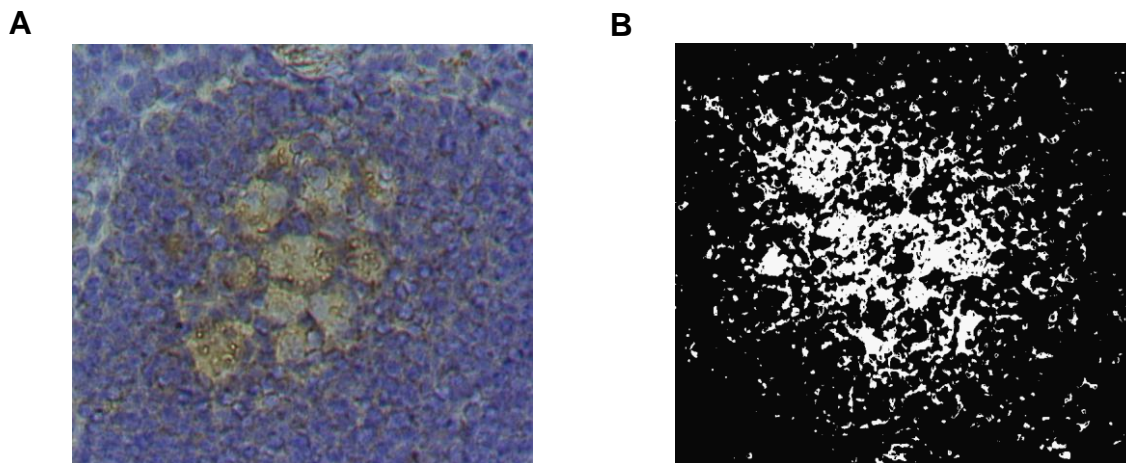


Abbildung 3: Histologische Auswertung der FDC-Netzwerke. (A) Färbung eines FDC-Netzwerkes in einem B-Zellfollikel (FDC-M1). (B) Binärisierung des Bildes aus (A) durch Verwendung eines Farbschwellwertes. Bestimmung der Fläche des FDC-Netzwerkes durch das Programm CellD (Olympus).

3.3.4. PrP^{Sc}-Färbung

Nach Dekontamination in 100 %-iger Ameisensäure für 1 h und einer Nachfixierung in 4 %-igem phosphat-gepuffertem Formalin für 48 h nach dem Protokoll von (Brown *et al.*, 1990), wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet. Die PrP^{Sc}-Färbung wurde an 2,5 µm dicken Paraffinschnitten auf silanisierten Objektträgern durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden zunächst entparaffiniert. Hierzu wurden sie für 30 Minuten in einem Wärmeschrank auf 37 °C erwärmt, dann zweimal für jeweils fünf Minuten in Xylol, anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol) rehydriert. Danach wurden die Gewebeschnitte für 30 min bei 63 °C in 0,2 M Borsäure (pH 9) inkubiert und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach 5-maligem Waschen mit Wasser werden die Gewebeschnitten für 2 min in Hämalaun nach Mayer gefärbt und danach für 2 min in Wasser gebläut. Daran anschließend wurde eine Proteolyse mit Proteinase K für 32 min durchgeführt.

Die Detektion des PrP^{Sc} wurde schließlich mit dem Antikörper CDC1 und einem geeigneten 2. Antikörper in der Färbemaschine Benchmark von Ventana (Illkirch, Frankreich) durchgeführt. Zur Visualisierung wurde abschließend das DAB Detektionssystem Iview (Ventana) verwendet.

3.3.5. Paraffin-Embedded Tissue (PET) Blot

Nach dem Dekontaminieren in 100 %-iger Ameisensäure für 1 h und Nachfixieren in 4 %-igem phosphat-gepuffertem Formalin für 48 h nach dem Protokoll von (Brown *et al.*, 1990), wurde das Formalin-fixierte Gewebe in Paraffin eingebettet. Das Gewebe wurde auf einem Mikrotom in Gewebeschnitte (5-7 µm) geschnitten, in ein Wasserbad (55 °C) gelegt, auf einer angefeuchteten Nitrozellulose Transfermembran (Porengröße 0,45 µm, Bio-Rad, München) platziert und für mindestens 30 min bei 55 °C getrocknet. Die Nitrozellulose Transfermembran wurde anschließend mit Xylol entparaffiniert. Xylol wird danach durch schrittweise Rehydrierung mit Isopropanol ersetzt. Tween 20 wurde im letzten Rehydrierungsschritt in einer Endkonzentration von 0,1 % zu destilliertem Wasser zugesetzt. Danach können die Membranen getrocknet und bei Raumtemperatur gelagert werden. Nach dem Anfeuchten mit TBST wurde eine Proteinase K-Behandlung (250 µg/mL) in PK-Puffer für 8 h bei 55 °C durchgeführt. Danach wurden die Membranen dreimal mit TBST gewaschen und anschließend die Proteine für 10 min durch 3 M Guanidinium Isothiocyanat denaturiert. Guanidinium Isothiocyanat wurde durch dreimaliges Waschen mit TBST entfernt. Die Immunodetektion wurde nach Inkubation für 30 min in Blockierungspuffer durchgeführt. Als 1. Antikörper wurde der polyklonale Antikörper CDC1 in einer Verdünnung von 1:500 in „Antibody-Diluent“-Lösung (Ventana, Illkirch, Frankreich) verwendet. Die Membranen wurden für 1 h mit dem Antikörper inkubiert. Nach drei Waschschritten mit TBST wurden die Membranen für 1 h mit dem 2. Antikörper (Hase Anti-Maus Alkalische Phosphatasegekoppelt) inkubiert. Nach 5 weiteren Waschschritten mit TBST für 10 min, wurden die Membranen zweimal für 5 min in NTM inkubiert, um den pH auf 9,5 einzustellen. Die Visualisierung der Antikörperreaktion wurde mit NBT/BCIP durchgeführt. Die PET Blots wurden mit einem Olympus Mikroskop ausgewertet.

Tabelle 5: verwendete Puffer und Lösungen für den PET Blot

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
TBST	10 mM Tris pH 7,8

	100 mM NaCl 0,05 % (w/v) Tween 20
PK-Puffer	10 mM Tris pH 7,8 100 mM NaCl 0,1 % (w/v) Brij 35
Blockierungspuffer	TBST 0,2 % (w/v) Casein
NTM	10 mM Tris pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂

3.3.6. Quantifizierung PET Blot

Nach der Anfärbung des PrP^{Sc} mit Hilfe des PET Blots wurden die Milzen bezüglich ihres PrP^{Sc}-Gehaltes in vier histologische Stufen eingeordnet, um eine semi-quantitative Auswertung der PET Blots zu ermöglichen (Abbildung 4). Die Einteilung in die histologischen Stufen erfolgte geblendet für den Experimentator und wurde stets von mehreren Personen durchgeführt.

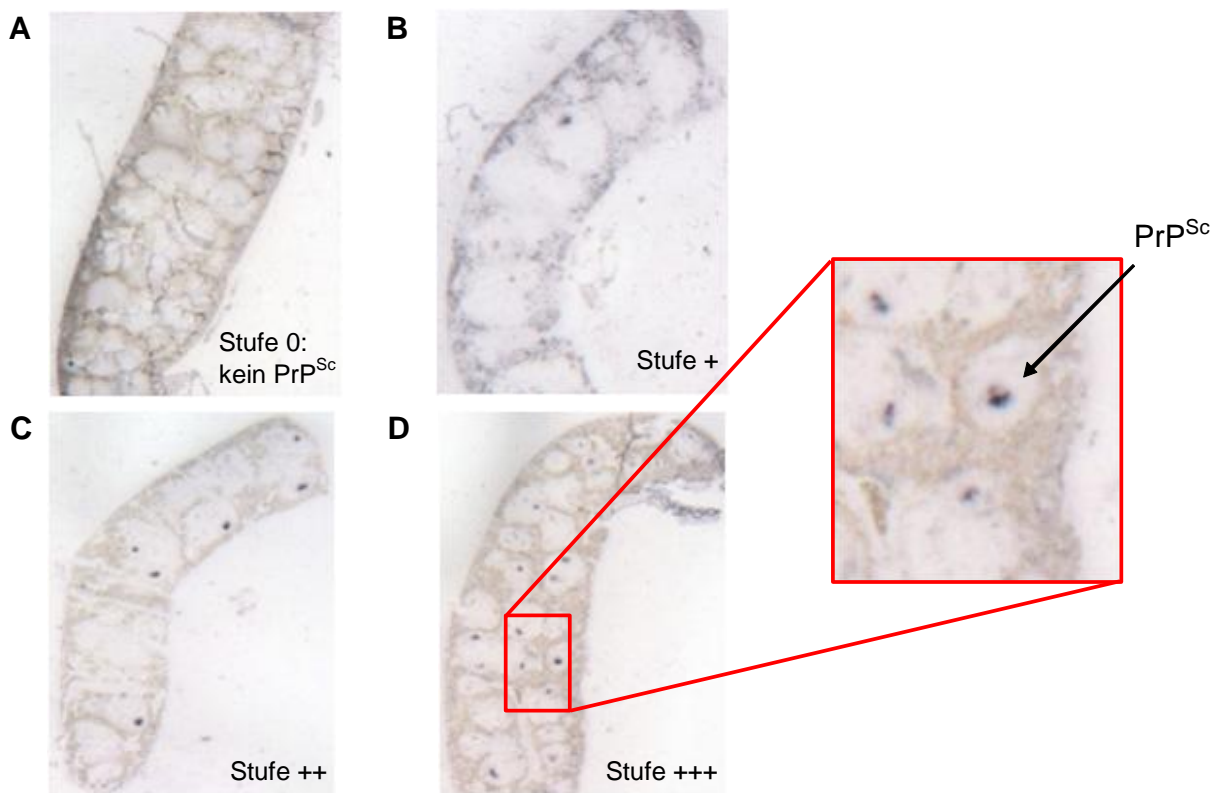


Abbildung 4: PET Blot Analyse von Milzen scrapie-infizierter Mäuse. (A-D) Nach Detektion der PrP^{Sc}-Ablagerungen (Pfeil) mit Hilfe des PET Blots werden die gefärbten Milzen in histologische Stufen von 0 (kein PrP^{Sc} nachweisbar) bis +++ (viel PrP^{Sc} nachweisbar) eingeordnet. Von (B) nach (D) steigt die Intensität und Anzahl der gefärbten PrP^{Sc}-Ablagerungen an.

3.4. Experimentelle Prionversuche

3.4.1. Herstellung von Gewebe-Homogenaten

Für die Herstellung von 10 %-igem Hirnhomogenat wurden 100 mg Hirngewebe in 900 μ L Hirn-Lysepuffer mit Hilfe des Homogenisators Precellys 24 (Peqlab, Erlangen) homogenisiert. Danach wurde das Homogenat in einer Tischzentrifuge Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg) für 5 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um grobe Gewebefragmente abzutrennen. Der Überstand wurde weiter als Hirnhomogenat eingesetzt. Sämtliche Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt und die verwendeten Lösungen auf 4 °C vorgekühlt. Nach Aliquotieren des Hirnhomogenats erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

Zum Herstellen von Milzhomogenaten wurde das Gewebe mit 9-fachem Volumen DPBS (Invitrogen, Karlsruhe) homogenisiert. Dazu wurde der Homogenisator Precellys 24 mit zugehörigem Precellys Keramik-Kit (Peqlab, Erlangen) verwendet. Das resultierende Homogenat wurde zur PrP^{Sc} Aufreinigung in der Natriumwolframat-Fällung (3.2) eingesetzt.

Tabelle 6: Verwendete Puffer zur Herstellung von Gewebekomogenaten

Puffer	Zusammensetzung
Hirn-Lysepuffer	100 mM NaCl 10 mM EDTA pH 8,0 0,5 % (v/v) NP-40 0,5 % (w/v) Desoxycholat 10 mM Tris/ HCl pH 7,4 ad 50 mL Aqua dest.
DPBS	Dulbecco's PBS (Invitrogen, Karlsruhe)

3.4.2. Infektion mit Hirnhomogenat

Die Infektionen mit 1 %-igem RML Hirnhomogenat, welches aus Gehirnen von terminal erkrankten Mäusen hergestellt wurde, wurden im infektiösen Tierstall des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung München von Tierärzten durchgeführt. Intrazerebrale Inokulationen (i.c.) der Mäuse mit dem Scrapie-Erreger wurden mittels intrazerebraler Einführung einer Kanüle durchgeführt. Dazu wurde eine Gesamtmenge von 30 μ L 1 %-igem Hirnhomogenat injiziert. Für intraperitoneale Infektion (i.p.) wurde den Mäusen 100 μ L 1 %-iges Hirnhomogenat inokuliert.

3.4.3. Therapie- und Screeningversuche

Zur Untersuchung ihrer *in vivo* Wirkung wurden potentielle Antiprion-Substanzen im Prionmausmodell getestet. Dabei fanden unterschiedliche Versuchsmodelle abhängig der Fragestellung Anwendung. Für das Screening neuer Substanzen hinsichtlich ihrer Antiprion-Wirksamkeit wurden Kurzzeitversuche durchgeführt. Mit diesen Modellen wurde der Einfluss potentieller Antiprion-Substanzen auf die Akkumulation von PrP^{Sc} nach einer definierten Behandlungsdauer untersucht. Die Auswirkungen der therapeutischen Behandlung auf die Prionpathologie wurde in Überlebenszeitversuchen untersucht.

In (Abbildung 5; Abbildung 6D) sind die verwendeten Kurzzeit-Therapieversuche schematisch dargestellt. In diesen Versuchen wurde der PrP^{Sc}-Gehalt in der Milz an Tag 35 nach intraperitonealer Infektion (Abbildung 5) oder im Gehirn an Tag 120 nach intrazerebraler Infektion bestimmt (Abbildung 6D). Die Milz wurde zu diesem Zeitpunkt untersucht, da PrP^{Sc} in den meisten Mausmodellen in diesem lymphatischen Organ als erstes nachweisbar ist (Kimberlin und Walker, 1988) und zu diesem frühen Zeitpunkt der PrP^{Sc}-Gehalt der Milz exponentiell ansteigt (Beringue *et al.*, 2000a), welches die experimentelle Differenzierung von unterschiedlichen PrP^{Sc}-Mengen erleichtert. Der Vorteil die Substanzen in einem Post-Expositions-Prophylaxe Modell bezüglich ihrer Inhibition auf die periphere Prionreplikation zu untersuchen, ist in den physikochemischen Eigenschaften der Substanzen begründet. Denn damit können Substanzen mit großen polaren Moleküloberflächen (z.B. hohe Anzahl OH-Gruppen), welche die Blut-Hirn-Schranke deshalb nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit passieren (Clark, 1999; Lipinski *et al.*, 2001), getestet werden. Neben diesen Überlegungen bietet das Modell einen Zeitvorteil gegenüber den Inkubationszeitmodellen (Abbildung 6A-C). Das Ergebnis ist nach 35 und nicht erst 160 Tagen verfügbar.

Zur Untersuchung der Substanzen in den Kurzzeitversuchen (Abbildung 5) wurden weibliche C57BL/6-Tiere im Alter von 7 Wochen intraperitoneal mit 100 µL 1 %-igem Hirnhomogenat (RML-Scrapie) infiziert.

Nach Inokulation wurden die Tiere entsprechend den abgebildeten Schemata behandelt. Im Schema (Abbildung 5A) wurden die Tiere über einen Zeitraum von 14 Tagen einmal täglich mit einer Antiprion-Substanz intraperitoneal behandelt. In allen Modellen wurde den Tieren DMSO als Kontrollsubstanz, in welchem die Substanzen gelöst werden, verabreicht. Die Behandlung begann direkt nach der Inokulation mit RML-Prionen. Während der Behandlung wurde das Gewicht der Mäuse kontrolliert, damit toxische Effekte möglichst schnell erkannt werden können.

Im Prionmodell (Abbildung 5B) wurde der Behandlungszeitraum durch eine Kombination aus intraperitonealer und oraler Applikation ausgedehnt. Den Mäusen wurde erst für 14 aufeinander folgende Tage intraperitoneal 25 μ L 100 mM Substanz und anschließend für neun Tage 50 μ L Substanz oral appliziert (Speiseöl/DMSO Gemisch).

Im dritten Modell (Abbildung 5C) wurde den Tieren die Substanzen oral über Erdnussbutter verabreicht. Die Tiere wurden einmal täglich für 34 aufeinanderfolgende Tage durch orale Gabe über Erdnussbutter therapiert.

Die Aufarbeitung der Organe wurde in allen verwendeten Versuchsmodellen gleich durchgeführt. An Tag 35 nach Inokulation wurden die Tiere getötet und eine Hälfte der Milz bei -80 °C für biochemische Analysen weggefroren und die andere Hälfte für histologische Untersuchungen in 4 % Formaldehyd fixiert. Der PrP^{Sc}-Gehalt in den Milzen wurde zum einen durch biochemische Methoden und zum anderen durch immunhistologische Färbungen der PrP^{Sc}-Ablagerungen bestimmt (3.2; 3.3).

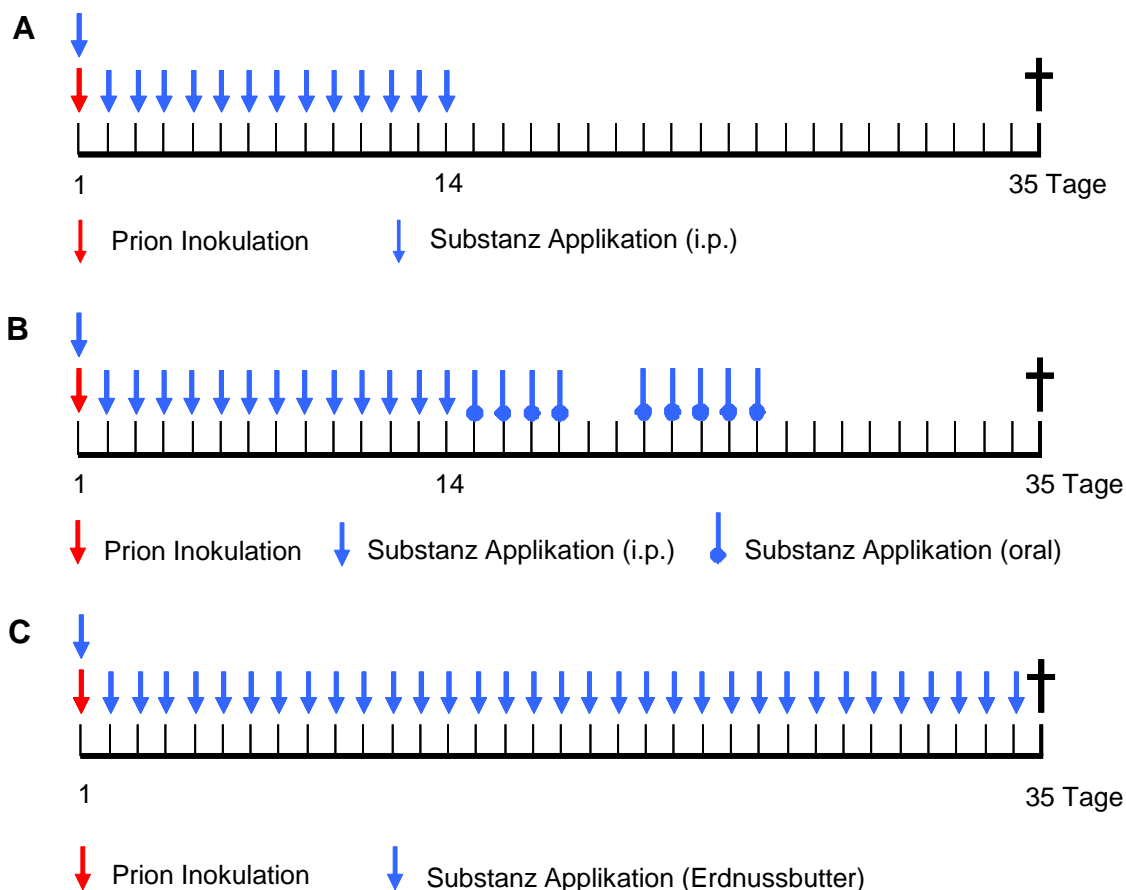


Abbildung 5: Tierexperimentelle Modelle zur Bestimmung des PrP^{Sc}-Gehalts in der Milz. (A-C) Darstellung der verwendeten Behandlungsschemata, die sich in Länge und Art der Behandlung unterscheiden.

In (Abbildung 6) sind die verwendeten Überlebenszeitversuche schematisch dargestellt. Im Unterschied zu den Kurzzeitversuchen (Abbildung 5) begann die Behandlung nicht sofort

nach Infektion der Tiere, sondern erst zu einem späten Zeitpunkt der Erkrankung. Zu diesem Zeitpunkt ist PrP^{Sc} schon deutlich im Gehirn detektierbar und im Kleinhirn zeigt sich erste Pathologie in Form von apoptotischen Zellen. Durch die Wahl dieser stringenten Bedingungen sollen die Substanzen unter einem möglichst realitätsnahen Ansatz getestet werden, da der Großteil der potentiellen Patienten bereits erste klinische Symptome, also eine fortgeschrittene Erkrankung, aufweisen werden. Außerdem zeigt sich durch die Wahl dieses Ansatzes, ob die verwendeten Substanzen die Blut-Hirn-Schranke passieren, die Akkumulation von PrP^{Sc} inhibieren und weitere Pathologie verhindern können.

Dazu wurden für die Überlebenszeitversuche (Abbildung 6) weibliche C57BL/6-Tiere im Alter von 7 Wochen intrazerebral mit 30 µL 1 %-igem Hirnhomogenat (RML-Scrapie) infiziert.

Zur Durchführung der Behandlung wurden die Tiere ab Tag 80 nach der Infektion entsprechend den Modellen therapiert.

Im Versuchsmodell (Abbildung 6A) wurde den Tieren an Tag 80 nach Inokulation eine osmotische Pumpe implantiert, die über einen Katheter mit einer intraventrikulären Kanüle direkt in den linken Ventrikel des Gehirns endet. An Tag 108 wurde ein Pumpenwechsel durchgeführt und eine neue Pumpe implantiert. Die osmotischen Pumpen gaben kontinuierlich 60 nmol Substanz/ Tag über einen Zeitraum von vier Wochen ab. Mit diesem Ansatz wurde sichergestellt, dass die Substanzen die Blut-Hirn-Schranke umgehen und ihren Wirkort erreichen.

Dem in (Abbildung 6B) dargestellten Schema folgend wurden die Tiere einmal täglich für 14 aufeinander folgende Tage durch intraperitoneale Injektion mit 25 µL 100 mM Substanz oder der Trägersubstanz DMSO behandelt.

(Abbildung 6C) zeigt ein Behandlungsschema mit einer verlängerten Behandlungsdauer verglichen mit dem zuvor dargestellten Modell. Die Tiere wurden zu Beginn für 14 aufeinander folgende Tage mit intraperitoneal 25 µL 100 mM Substanz und abschließend 10 Tagen 50 µL Substanz (50 mg/kg Körpergewicht in Speiseöl/DMSO) orale Gabe über eine Schlundsonde therapiert. Vor Beginn der Behandlung wurden 4 Mäuse aus dem Versuch genommen und je eine Hemisphäre des Gehirns entweder bei -80 °C für biochemische Untersuchungen weggefroren oder in Formaldehyd für anschließende histologische Untersuchungen aufbereitet. Außerdem wurden an den Zeitpunkten 95 und 106 nach Infektion jeweils 4 Mäuse der Behandlungsgruppen getötet. Die anderen Tiere der Behandlungsgruppen wurden getötet, wenn sie das terminale Stadium der Prionerkrankung erreicht hatten.

In Therapiemodell (Abbildung 6D) wurden die Tiere einer lebenslangen Therapie unterzogen. Die Tiere wurden einmal täglich durch orale Gabe der Substanz über Erdnussbutter therapiert. Dieses Modell wurde in zwei Varianten eingesetzt. In der ersten Variante wurden C57BL/6-Mäuse ab Tag 80 nach Infektion behandelt. Zu diesem Zeitpunkt ist PrP^{Sc} bereits im Gehirn detektierbar und erste Apoptosen, als früheste Zeichen der Prionpathogenese, sichtbar werden. In zweiter Variante wurde als Startpunkt der Behandlung Tag 120 nach Infektion ausgewählt, weil sich ab diesem Zeitpunkt die ersten klinischen Zeichen der Prionerkrankung manifestieren. Dieser Behandlungszeitpunkt im Experiment entspricht dem frühestmöglichen Zeitpunkt einer Diagnostik bei CJD-Patienten und einer sich anschließenden Therapie. Die Substanz wurde den Tieren täglich durch Untermischen in Erdnussbutter verabreicht. Zu den Zeitpunkten 80 und 120 Tage nach Infektion wurden jeweils 4 Tiere aus jeder Gruppe getötet und jeweils eine Hemisphäre des Gehirns entweder für biochemische oder histologische Untersuchungen aufbereitet. Zusätzlich wurden aus den anle138b-Behandlungsgruppen vier Mäuse getötet, wenn die Hälfte der Tiere aus den entsprechenden Kontrollgruppen terminal an Scrapie erkrankt waren. Das Gewicht der Mäuse wurde während des Experimentes regelmäßig kontrolliert, um den Einfluss der Behandlung und der Prionerkrankung aufzuzeigen.

Dieses Modell wurde auch in verkürzter Variation zum Screening von Substanzen eingesetzt. Dazu wurden die Mäuse ab Tag 80 nach Infektion mit 50 mg Substanz/ Körpergewicht für 40 Tage über Erdnussbutter therapiert. An Tag 120 wurden die Tiere getötet und die Organe wie nachfolgend aufgearbeitet.

Nach Abschluss der Behandlung wurden die Organe in allen verwendeten Versuchsmodellen einheitlich durchgeführt. Die Mäuse wurden getötet, wenn sie terminal an Scrapie erkrankt waren. Anschließend wurde das Gehirn entnommen und je eine Hälfte bei -80 °C weggefroren oder für immunhistologische Färbungen in 4 %-igem Formaldehyd fixiert. Der PrP^{Sc}-Gehalt im Gehirn wurde durch biochemische Methoden und immunhistologische Färbungen der PrP^{Sc}-Ablagerungen bestimmt (3.2; 3.3).

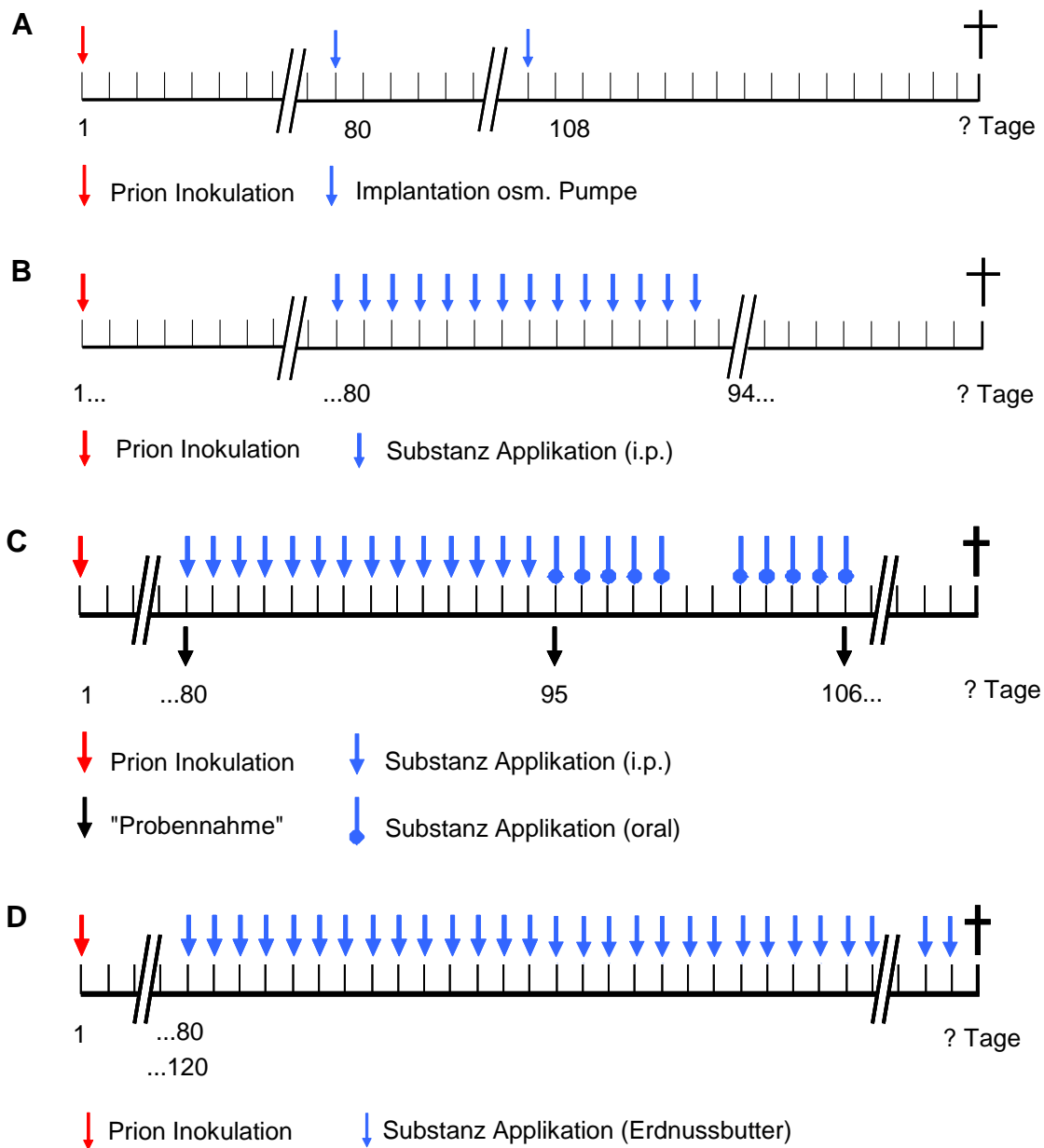


Abbildung 6: Versuchsmodelle zur Bestimmung der Überlebenszeit und des PrP^{Sc}-Gehalts im Gehirn. (A-D) schematische Darstellung der durchgeführten Therapie mit Angabe der Dauer und Art der Behandlung.

3.5. Synthese der NBB-Substanzen

Die NBB-Substanzen wurden von der Arbeitsgruppe Boris Schmidt von der TU Darmstadt synthetisiert und bereitgestellt. Die Synthese der Substanzen fand direkt in 96-well Mikrotiterplatten statt. Dazu wurden jeweils 10 µL einer 20 mM Stammlösung gelöst in DMSO eines Hydrazids und eines Aldehyds in jede Reaktionskammer pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend für 30 min bei 300 W in einer Mikrowelle bestrahlt. Die Gleichung dieser chemischen Reaktion ist in (Abbildung 7) dargestellt. Nach Bestrahlung wurde die Platte auf Raumtemperatur abgekühlt und mittels HPLC analysiert. Von den 330

Substanzen konnten über 290 Substanzen mit einer Reinheit von über 70 % hergestellt werden.

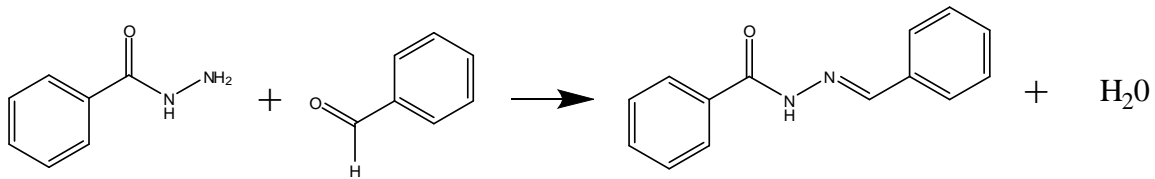
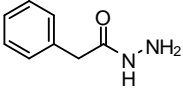
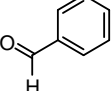
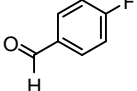
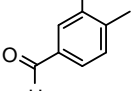
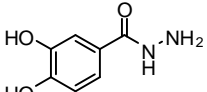
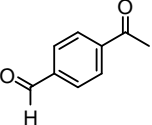
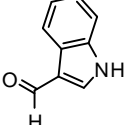
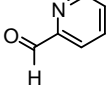
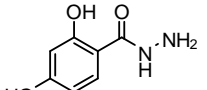
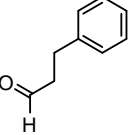
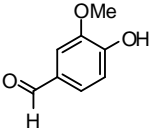
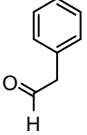
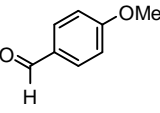
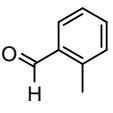
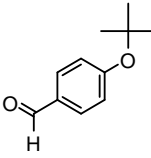


Abbildung 7: Reaktionsgleichung der NBB-Synthese.

Die verwendeten Bausteine zur NBB-Synthese sind in (Tabelle 7) aufgelistet. Auf diese Weise wurden 10 Hydrazide mit 33 Aldehyden kombiniert, sodass 330 unterschiedliche NBB-Substanzen synthetisiert werden konnten.

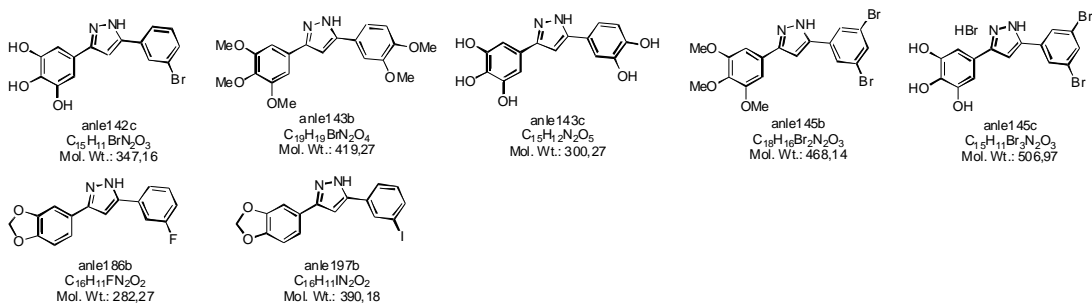
Tabelle 7: Bausteine zur NBB-Synthese

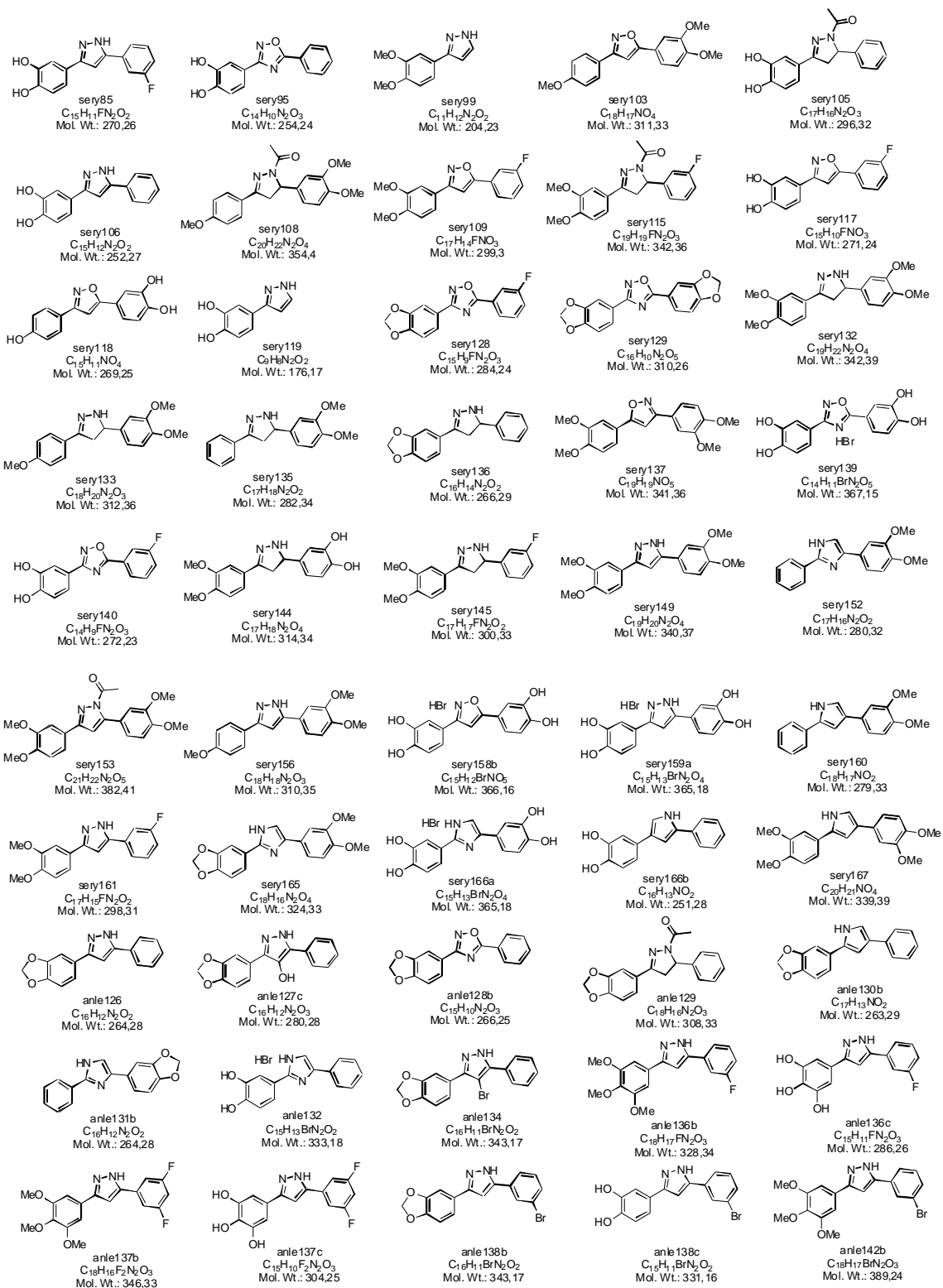
Nr.	Hydrazid (H)	Aldehyd (A)	Nr.	Aldehyd (A)	Nr.	Aldehyd (A)
1			12		23	
2			13		24	
3			14		25	
4			15		26	
5			16		27	
6			17		28	
7			18		29	

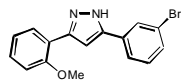
8			19		30	
9			20		31	
10			21		32	
11			22		33	

3.6. DPP-Substanzen

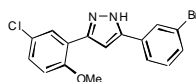
Die verwendeten DPP-Substanzen sind folgend dargestellt.



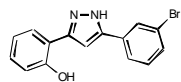




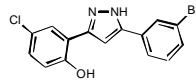
sery256b
 $C_{18}H_{13}BrN_2O$
 Mol. Wt.: 329,19



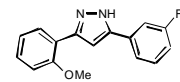
sery257b
 $C_{16}H_{12}BrClN_2O$
 Mol. Wt.: 363,64



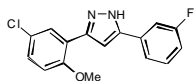
sery260a
 $C_{15}H_{11}BrN_2O$
 Mol. Wt.: 315,16



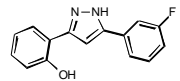
sery260b
 $C_{15}H_{10}BrClN_2O$
 Mol. Wt.: 349,61



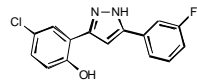
sery261a
 $C_{22}H_{15}Br_4Cl_2FN_2O_5$
 Mol. Wt.: 1625,89



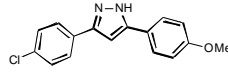
sery261b
 $C_{17}H_{12}ClFN_2O$
 Mol. Wt.: 302,73



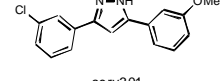
sery263a
 $C_{15}H_{11}FN_2O$
 Mol. Wt.: 254,26



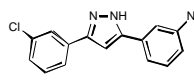
sery263b
 $C_{15}H_{10}ClFN_2O$
 Mol. Wt.: 288,7



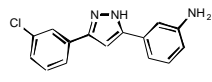
sery269b
 $C_{16}H_{13}ClN_2O$
 Mol. Wt.: 284,74



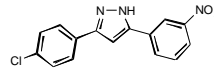
sery301
 $C_{16}H_{13}ClN_2O$
 Mol. Wt.: 284,74



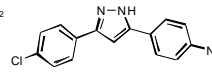
sery275a
 $C_{15}H_{10}ClN_3O_2$
 Mol. Wt.: 299,71



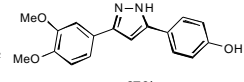
sery275b
 $C_{15}H_{12}ClN_3$
 Mol. Wt.: 269,73



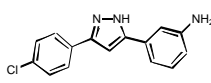
sery278a
 $C_{15}H_{10}ClN_3O_2$
 Mol. Wt.: 299,71



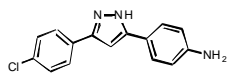
sery278b
 $C_{15}H_{10}ClN_3O_2$
 Mol. Wt.: 299,71



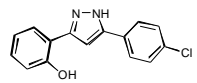
sery279b
 $C_{17}H_{16}N_2O_3$
 Mol. Wt.: 296,32



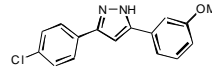
sery280a
 $C_{15}H_{12}ClN_3$
 Mol. Wt.: 269,73



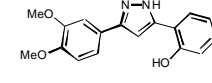
sery280b
 $C_{15}H_{12}ClN_3$
 Mol. Wt.: 269,73



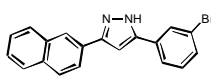
sery283
 $C_{15}H_{11}ClN_2O$
 Mol. Wt.: 270,71



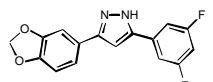
sery289
 $C_{16}H_{13}ClN_2O$
 Mol. Wt.: 284,74



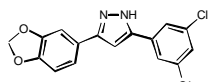
sery290b
 $C_{17}H_{16}N_2O_3$
 Mol. Wt.: 296,32



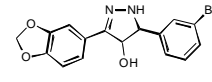
sery292b
 $C_{19}H_{13}BrN_2$
 Mol. Wt.: 349,22



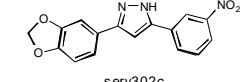
sery294b
 $C_{16}H_{10}F_2N_2O_2$
 Mol. Wt.: 300,26



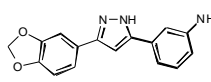
sery297b
 $C_{16}H_{10}Cl_2N_2O_2$
 Mol. Wt.: 333,17



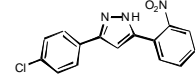
sery300a
 $C_{16}H_{13}BrN_2O_3$
 Mol. Wt.: 361,19



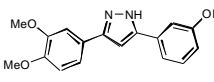
sery302c
 $C_{16}H_{11}N_2O_4$
 Mol. Wt.: 309,28



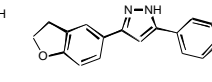
sery308
 $C_{16}H_{13}N_3O_2$
 Mol. Wt.: 279,29



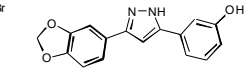
sery309
 $C_{15}H_{10}ClN_3O_2$
 Mol. Wt.: 299,71



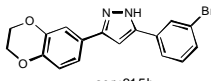
sery310b
 $C_{17}H_{16}N_2O_3$
 Mol. Wt.: 296,32



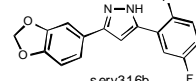
sery312b
 $C_{17}H_{13}BrN_2O$
 Mol. Wt.: 341,2



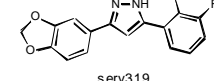
sery313b
 $C_{16}H_{12}N_2O_3$
 Mol. Wt.: 280,28



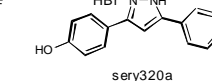
sery315b
 $C_{17}H_{13}BrN_2O_2$
 Mol. Wt.: 357,2



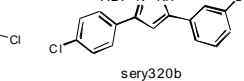
sery316b
 $C_{16}H_{10}F_2N_2O_2$
 Mol. Wt.: 300,26



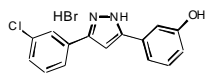
sery319
 $C_{16}H_{10}F_2N_2O_2$
 Mol. Wt.: 300,26



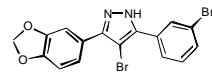
sery320a
 $C_{15}H_{12}BrClN_2O$
 Mol. Wt.: 351,63



sery320b
 $C_{15}H_{12}BrClN_2O$
 Mol. Wt.: 351,63



sery320c
 $C_{15}H_{12}BrClN_2O$
 Mol. Wt.: 351,63



sery330
 $C_{16}H_{10}Br_2N_2O_2$
 Mol. Wt.: 422,07

4. Ergebnisse

Bis zum heutigen Zeitpunkt existieren nur sehr eingeschränkt Therapiemöglichkeiten für Prionkrankheiten bei Menschen, deshalb war das Ziel dieser Arbeit Grundlagen für eine Therapie zu entwickeln. Dazu wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt.

Der erste Abschnitt der Ergebnisse beschäftigt sich mit der Stimulierung des angeborenen Immunsystems durch wiederholte Gabe von CpG-ODN, um dadurch eine positive Veränderung der Prionpathogenese zu erreichen. Der zweite Abschnitt der Arbeit beschäftigt sich mit der Entdeckung und Weiterentwicklung chemischer Substanzen zur Behandlung von Prionerkrankungen.

4.1. Stimulierung des angeborenen Immunsystems

Nicht-methylierte CpG-Motive kommen häufig in bakterieller, jedoch nicht in Vertebraten-DNS vor. Oligodesoxynukleotide (ODN) mit CpG-Motiven werden von Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen, endozytiert und wirken aktivierend auf das angeborene Immunsystem (Krieg, 2002). Die Aktivierung findet über den Toll-like Rezeptor 9 (TLR9) statt (Hemmi *et al.*, 2000). CpG-ODNs werden als Adjuvans bei antimikrobieller, antiallergischer und in der Anti-Tumor Immuntherapie eingesetzt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass CpG-ODNs nach repetitiver Gabe von 32 µg einen protektiven Effekt auf intraperitoneal mit Scrapie-Prionen inokulierte Mäuse haben (Sethi *et al.*, 2002). Da die repetitive Gabe von 64 µg zu Veränderungen der Mikroarchitektur in peripheren lymphatischen Organen, wie der Milz, führt (Heikenwalder *et al.*, 2004) und dieser Effekt auch für 32 µg nicht ganz ausgeschlossen werden konnte, wurden entweder Mausmodelle verwendet, für welche beschrieben wurde, dass keine Veränderungen in der Mikroarchitektur nach CpG-ODN Behandlung beobachtet wurden (4.1.1), oder die verwendete Konzentration im Vergleich zum Experiment von (Sethi *et al.*, 2002) halbiert wurde (4.1.2). Die intakte Mikroarchitektur der Milz scheint bei der intraperitonealen Prioninfektion eine wichtige Funktion einzunehmen, da chirurgische oder genetische Splenektomie zu verlängerten Überlebenszeiten von infizierten Mäusen in Prionmausmodellen führt (Kimberlin und Walker, 1989).

4.1.1. Immuntherapie I

Um den Einfluss repetitiver CpG-ODN Behandlung auf die Überlebenszeit von Scrapie-infizierten Mäusen zu untersuchen, wurden Balb/c-Tiere nach einem beschriebenen Schema, bei dem keine Veränderungen in der Mikroarchitektur der Milz vorkommen (Klinman *et al.*, 1999), behandelt. Dazu wurden die Tiere entweder über den intraperitonealen (100 μ L 1 %igen Hirnhomogenat) oder intrazerebralen (30 μ L Hirnhomogenat) Infektionsweg mit RML-Prionen inokuliert. Dadurch kann unterschieden werden, ob die Behandlung auf beide Infektionswege oder nur auf einen protektiv wirkt. Die Tiere wurden nach Infektion einmal wöchentlich über einem Zeitraum von vier Wochen mit 50 μ g CpG-ODN intraperitoneal behandelt. Als Kontrollen dienten Behandlungsgruppen, die nur mit Aqua inject. oder mit Oligodesoxynukleotiden, die keine stimulierenden nicht-methylierten CpG-Motive (Neg-ODN) enthielten, behandelt wurden. Sobald die Tiere Symptome einer terminalen Prionerkrankung zeigten, wurden sie getötet.

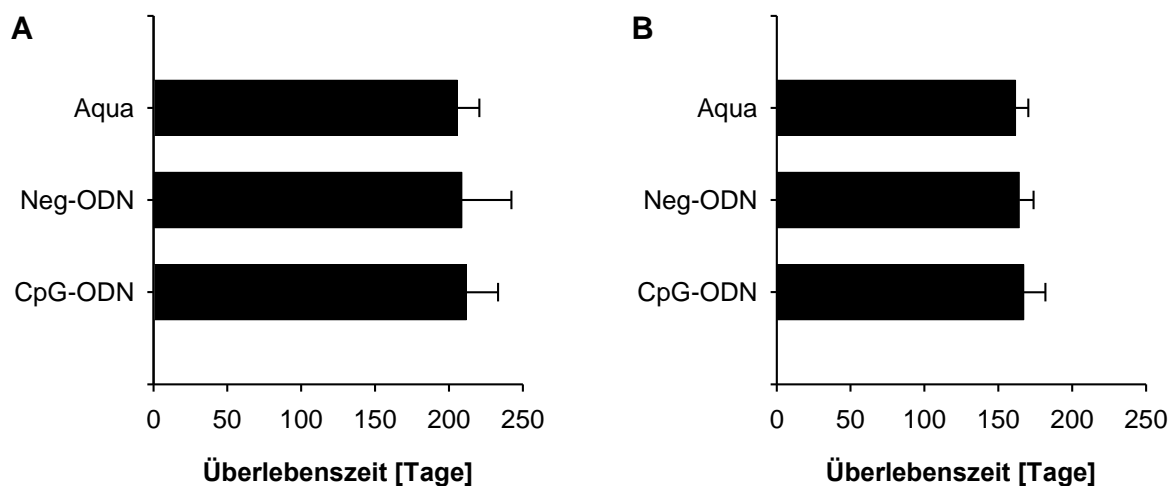


Abbildung 8: Überlebenszeit von Scrapie-infizierten Balb/c-Mäusen nach CpG-ODN Behandlung. (A+B) durchschnittliches Überleben nach Infektion mit RML-Prionen und einmal wöchentlicher Behandlung mit 50 μ g CpG-ODN. **(A)** Überleben nach intraperitonealer Infektion **(B)** nach intrazerebraler Infektion.

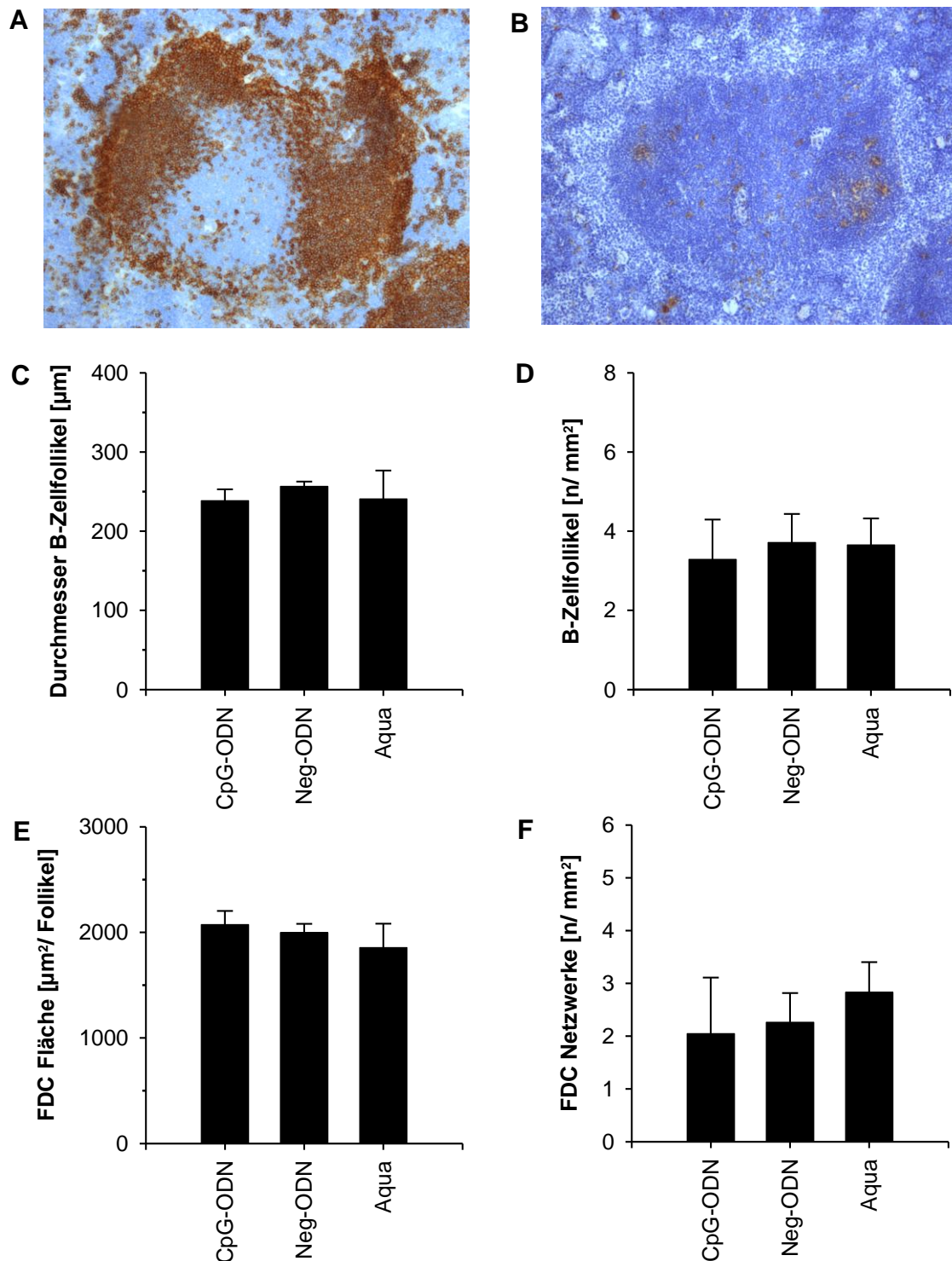


Abbildung 9: Konsequenzen der CpG-ODN Behandlung auf die Mikroarchitektur der Milz in Balb/c-Mäusen. (A) Darstellung eines B-Zellfollikels durch Anfärbung der B-Zellen (CD45/B220). (B) Immunhistologische Darstellung der Follikulär Dendritischen Zellen (FDC; FDC-M1). (C) Durchmesser der B-Zellfollikel in den Behandlungsgruppen. (D) Durchschnittliche Anzahl der B-Zellfollikel. (E) Fläche der Follikulär Dendritischen Zellen (FDC) in den B-Zellfollikeln. (F) Anzahl der FDC-Netzwerke.

Durch die Behandlung der infizierten Tiere mit CpG-ODNs nach dem beschriebenen Behandlungsschema (Klinman *et al.*, 1999) konnte im Vergleich zu den Kontrolltieren keine

signifikante Verlängerung der Überlebenszeit erreicht werden (Abbildung 8). Die durchschnittliche Überlebenszeit der CpG-ODN-behandelten Gruppe betrug 212 Tage bei intraperitonealer (i.p.) Infektion und 167 Tage nach intrazerebraler (i.c.) Infektion. Die Tiere der Neg-ODN-Kontrollgruppe überlebten im Mittel 209 (i.p.) bzw. 164 (i.c.) Tage. Nach Gabe von Aqua inject. erreichten die Tiere das terminale Stadium im Mittel nach 206 (i.p.) bzw. 162 Tage (i.c.).

Danach wurde die Mikroarchitektur der Milz von Tieren, die intraperitoneal infiziert wurden, histologisch untersucht. Nach Auswertung der immunhistologischen Färbungen konnten keine Veränderungen der Mikroarchitektur nach Behandlung mit CpG-ODN bezüglich B-Zellfollikel und FDC-Netzwerke festgestellt werden (Abbildung 9). Der Durchmesser der B-Zellfollikel betrug in allen Behandlungsgruppen ungefähr 250 μm , wobei durchschnittlich knapp vier B-Zellfollikel/ mm^2 nachgewiesen wurden. Die Fläche der FDC-Netzwerke in den Gruppen konnte mit 2000 μm^2 bestimmt werden. Auch die Anzahl der FDC-Netzwerke/ mm^2 zeigte keinen relevanten Unterschied in den verschiedenen Gruppen.

4.1.2. Immuntherapie II

Nachdem die Therapie von Balb/c-Mäusen mit CpG-ODN nach dem Behandlungsschema von (Klinman *et al.*, 1999) zu keiner Verlängerung der Überlebenszeit geführt hatte, wurde in diesem Versuch das Schema von (Sethi *et al.*, 2002), allerdings mit verringerter CpG-ODN Konzentration, verwendet. Dazu wurden C57BL/6 Tiere über den intraperitonealen oder intrazerebralen Infektionsweg mit RML-Prionen inokuliert. Anschließend wurden die Tiere einmal täglich an vier aufeinander folgenden Tagen mit 16 μg CpG-ODN intraperitoneal behandelt. Als Kontrollen dienten Behandlungsgruppen, die entweder mit Aqua inject. oder mit Neg-ODN behandelt wurden. Die Tiere wurden getötet, wenn sie Symptome einer terminalen Prionerkrankung zeigten.

Die Behandlung der infizierten C57BL/6-Tiere mit CpG-ODNs nach dem oben beschriebenen Schema führte zu keiner signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit (Abbildung 10). Die durchschnittliche Überlebenszeit der CpG-ODN-behandelten Gruppe betrug 190 Tage bei i.p.-Infektion, gegenüber 201 Tage nach Behandlung mit Neg-ODN bzw. 196 Tage mit Aqua inject., und nach i.c.-Infektion lag die durchschnittliche Überlebenszeit bei 165 Tagen im Vergleich zu 160 Tagen bei Applikation von Neg-ODN oder bei 152 Tagen nach Behandlung mit Aqua inject.

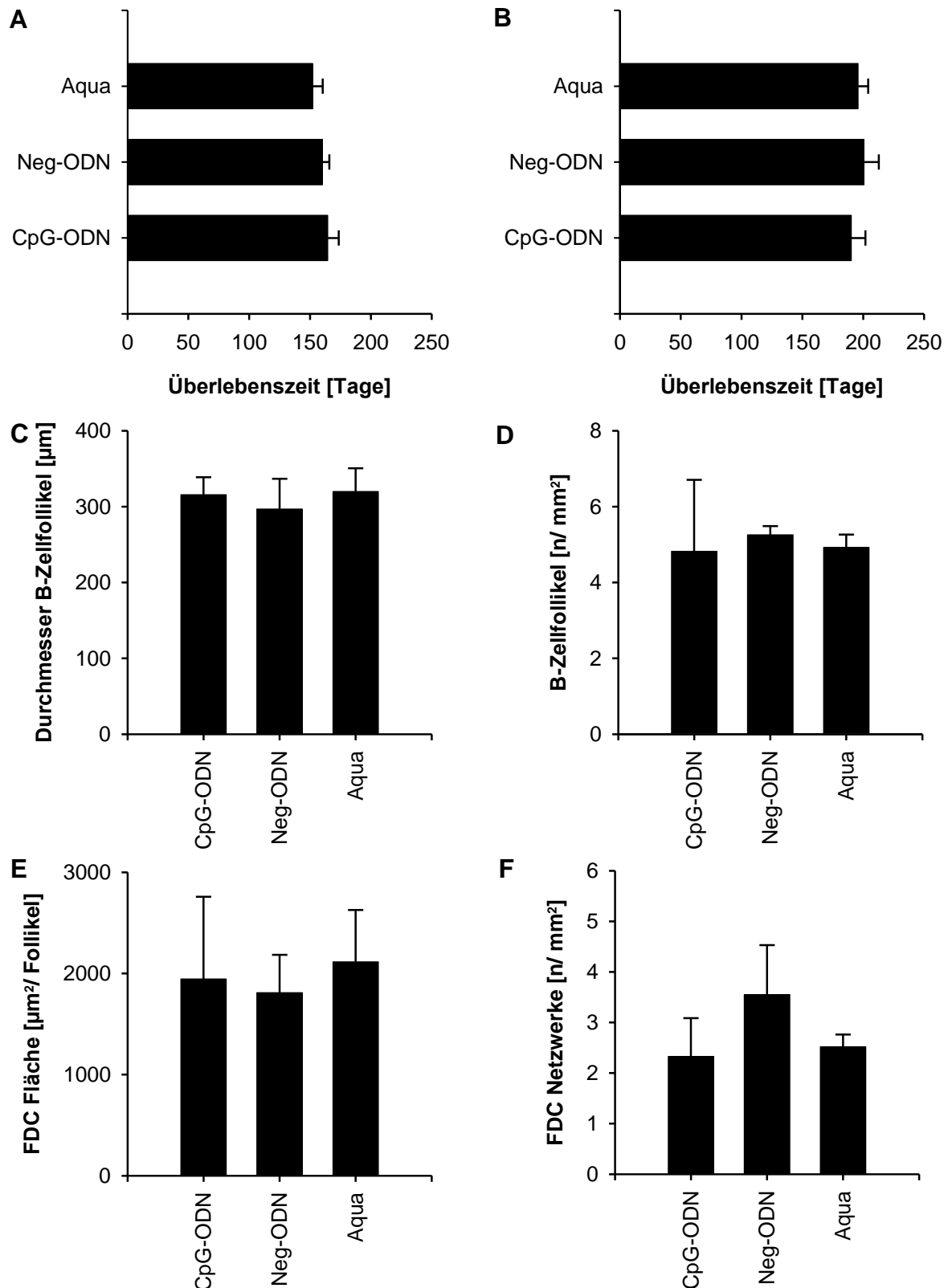


Abbildung 10: Einfluss der CpG-ODN Behandlung auf die Überlebenszeit und Mikroarchitektur der Milz von C57BL/6-Mäusen. (A+B) Durchschnittliche Überlebenszeit der Mäuse nach Infektion mit RML-Prionen. (A) nach intraperitonealer Infektion, (B) bei intrazerebraler Infektion. (C+D) Quantitative Auswertung der B-Zellfollikel im Milzgewebe. (E+F) Quantitative Auswertung der Fläche der FDC-Netzwerke (E) und Anzahl der FDC-Netzwerke (F).

Die histologische Auswertung der immunhistologischen Färbungen von Milzgewebeschnitten von intraperitoneal infizierten Mäusen zeigte keine Veränderungen der Mikroarchitektur nach Behandlung mit CpG-ODN gegenüber den beiden Kontrollgruppen (Abbildung 10).

Da bei der verwendeten Konzentration in diesen Versuchen (16 µg) keine Überlebenszeitverlängerung gegenüber (32 µg bei (Sethi *et al.*, 2002)) auftritt, scheint die Wirkung von CpG-ODNs auf die Prionpathogenese Dosis-abhängig zu sein.

4.2. Molekulare Analyse von potentiellen Antiprion-Substanzen

Die Konversion von PrP^C in die pathologische Isoform PrP^{Sc} ist das zentrale Ereignis in der Pathogenese bei den Prionerkrankungen. Das Unterbinden der Konversion von PrP^C in Neuronen kann den Krankheitsfortschritt verhindern und frühe degenerative Veränderungen zurückbilden (Mallucci *et al.*, 2003). Aus diesem Grund scheint eine Verringerung der PrP^{Sc}-Akkumulation den am aussichtsreichsten therapeutischen Ansatz darzustellen. Im Rahmen eines Substanz-Screenings zur Identifizierung potentieller Antiprion-Substanzen, was am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung durchgeführt wurde, konnten Verbindungen aus unterschiedlichen Substanzklassen mit aggregationshemmender Aktivität entdeckt werden (Bertsch *et al.*, 2005). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurden fokussierte Substanzbibliotheken, der zuvor identifizierten Substanzklassen, hergestellt und in dieser Arbeit molekular untersucht. Ziel der molekularen Analyse war die Bestätigung der Substanzen als Inhibitor der Aggregation des Prionproteins und die Schaffung neuer Grundlagen für die Weiterentwicklung der identifizierten Substanzklassen.

4.3. Tetracyclin-Derivat

Forloni und Kollegen (Forloni *et al.*, 2002) konnten zeigen, dass durch die Inkubation von PrP^{Sc} mit Tetracyclin die Menge an protease-resistentem PrP^{Sc} verringert wird. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Infektiösität von Scrapie-Hirnhomogenat durch die Inkubation mit Tetracyclin verringert wird. Diese Eigenschaften von Tetracyclin werden auf die Bindung der Moleküle an PrP-Aggregate zurückgeführt, durch die die Aggregate aufgelöst und die Konformation des PrP^{Sc} destabilisiert wird. Aus diesem Grund wurde das Tetracyclin-Derivat Bsc3594 (Abbildung 11) in dem Antiprion-Assay und in einem Zellkulturmodell bezüglich der inhibierenden Wirkung auf die Aggregation des Prion-Proteins untersucht.

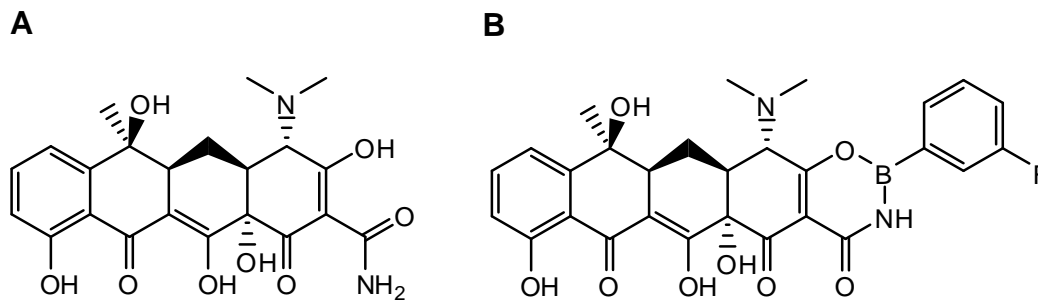


Abbildung 11: Struktur der Tetracycline. (A) Tetracyclin. (B) Tetracyclin-Derivat Bsc3594.

4.3.1. Ergebnisse aus SIFT und Zellkultur

Um zu untersuchen, ob das Tetracyclin-Derivat Bsc3594 die Assoziation von rekombinantem PrP an PrP^{Sc} hemmt, wurde das Molekül im Antiprion-Assay eingesetzt. Dazu wurde die Aktivität bei verschiedenen Konzentrationen gemessen. Anhand der resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurve kann der EC₅₀-Wert von Bsc3594 bestimmt werden. Bsc3594 hat einen EC₅₀-Wert im Bereich von 1 μ M. Dieser niedrige EC₅₀-Wert zeigt, dass die Verbindung einen großen Effekt auf die Assoziation von rPrP und PrP^{Sc} hat (Abbildung 12A). Überraschenderweise konnte in Zellkultur keine relevante Reduzierung des PrP^{Sc}-Gehaltes bei der eingesetzten Konzentration von 2 μ M im Vergleich zur Kontrolle erreicht werden (Abbildung 12B).

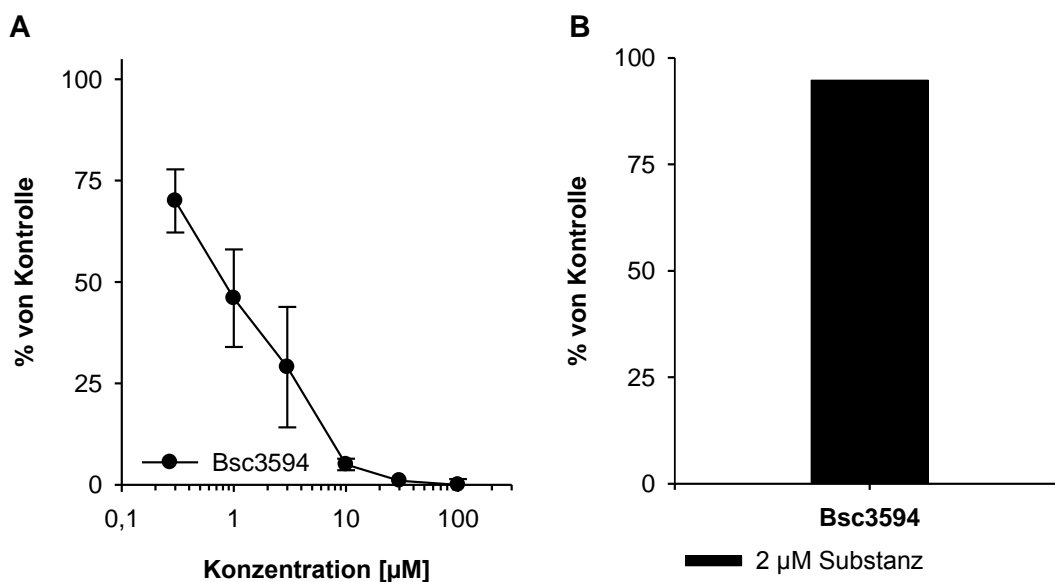


Abbildung 12: Ergebnisse von Bsc3594. (A) Dosis-Wirkungs-Kurve zeigt die hervorragende Aktivität von Bsc3594 im Antiprion-Assay. (B) Bsc3594 besitzt keine Antiprion-Wirkung in Zellkultur.

4.4. 3,5-Diphenylpyrazole und Derivate

Im Rahmen einer Screeningkampagne wurden über 20000 Substanzen aus der DiverSet-Bibliothek auf ihre aggregationshemmende Aktivität getestet, was zur Entdeckung von Verbindungen aus unterschiedlichen Substanzklassen führte, welche in Auszügen von Bertsch (Bertsch *et al.*, 2005) veröffentlicht wurde. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde eine fokussierte Substanzbibliothek der 3,5-Diphenylpyrazole (DPP) mit über 70 verschiedenen Substanzen synthetisiert und analysiert, um die Bedeutung als Antiprion-Leitstruktur zu bestätigen und Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu untersuchen. Die synthetisierten Verbindungen verfügten über ein einheitliches chemisches Grundgerüst und unterscheiden sich nur an wenigen Positionen durch unterschiedliche Substituenten (Abbildung 13). Die verwendeten Verbindungen sind in (3.6) aufgelistet. Durch die hohe strukturelle Übereinstimmung der Verbindungen wurde eine detaillierte Struktur-Wirkungs-Analyse ermöglicht.

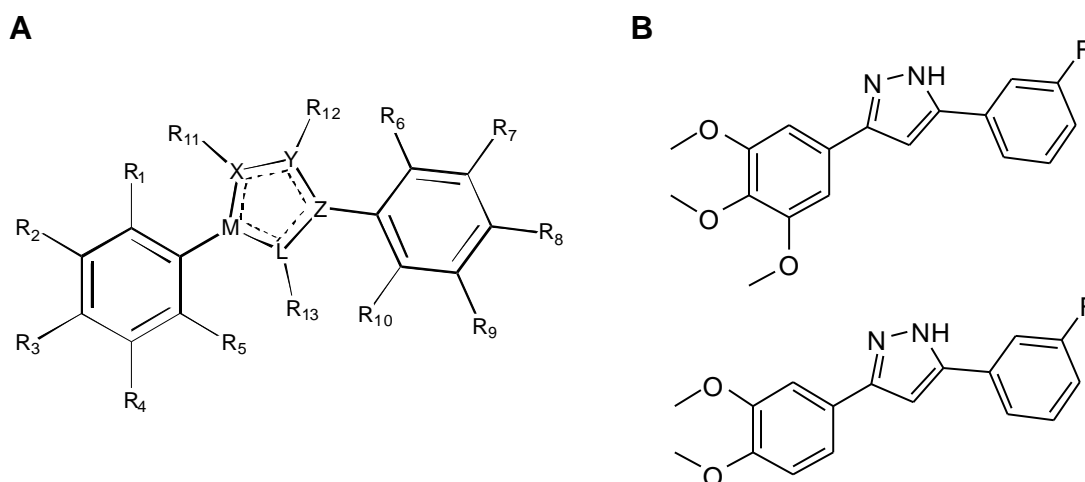


Abbildung 13: chemische Struktur der DPPs und deren Derivate. (A) allgemeine Leitstruktur der DPP-Substanzklasse. (B) zwei Substanzen der DPP-Substanzklasse, die sich durch einen zusätzlichen Substituenten (Methylether) an Position R₄ unterscheiden.

4.4.1. Primärscreening

Zur Untersuchung der Moleküle aus der fokussierten Substanzbibliothek wurde der SIFT Antiprion-Assay (3.2.12) eingesetzt. Eine Inhibition der Anlagerung von rekombinanten PrP (rPrP) Molekülen an die PrP^{Sc} Fibrillen resultiert in weniger neugebildeten Aggregaten. Je stärker die inhibitorische Wirkung einer Substanz, desto weniger nimmt die Zahl und Größe der neugebildeten Aggregate zu. Dazu wurde die Aktivität der Moleküle aus der fokussierten Substanzbibliothek bei einer Konzentration von 100 μ M getestet.

An den Ergebnissen des Primärscreenings lässt sich ablesen (Abbildung 14), dass der Großteil der Verbindungen aus der DPP-Substanzbibliothek die Aggregation des Prionproteins einschränkt (Werte unter 100 % der Kontrolle). Durch diese Ergebnisse konnte die zuvor identifizierte DPP-Substanzklasse als wirksame Leitstruktur bestätigt werden. Durch die Modifikationen an der Leitstruktur konnte zusätzlich erreicht werden, dass Substituenten entdeckt wurden, die die Aggregation von rPrP stark inhibieren (Werte um 50 %), beziehungsweise konnte in der Substanzbibliothek eine kleine Anzahl an Verbindungen identifiziert werden, welche die Neubildung von Aggregaten nahezu komplett hemmen (Werte nahe 0 %).

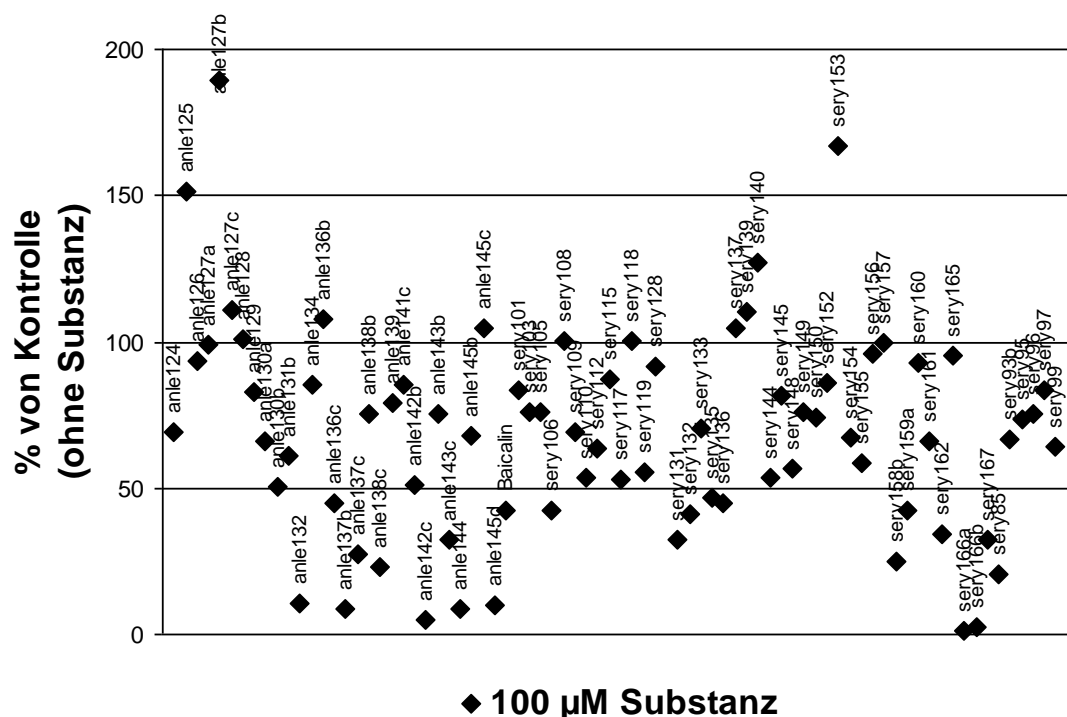


Abbildung 14: Primärscreening der DPP-Substanzbibliothek. Inhibition der Aggregation durch DPP-Substanzen im Primärscreening. Substanzen mit starker inhibierender Aktivität weisen niedrige %-Werte auf, wohingegen nicht-wirksame Substanzen Werte um 100 % aufweisen. Vereinzelt fördern Substanzen die Aggregation des Prionproteins (> 100 %).

Nachdem die DPP-Substanzklasse als potentielle Antiprion-Wirkstoffgruppe bestätigt wurde, konnte aus den erzielten Ergebnissen des Primärscreenings mit der fokussierten Substanzbibliothek eine erste Struktur-Wirkungs-Beziehung abgeleitet werden. Durch die strukturelle Analyse der am stärksten wirksamen Substanzen der DPP-Wirkstoffklasse im Primärscreening konnten häufig vorkommende, aktivitätsfördernde Struktur motive wie

Hydroxylgruppen identifiziert werden, weshalb diese Struktur motive weitergehend untersucht wurden.

4.4.2. Molekulare Analyse der DPP-Substanzen mit Hydroxylgruppen

Die Ergebnisse des Primärscreenings mit den Verbindungen aus der fokussierten Substanzbibliothek der DPP-Substanzen im SIFT Antiprion-Assay zeigten, dass wirksame Substanzen überproportional häufig Hydroxyl (OH)-Gruppen tragen. Die Beobachtung, dass Substanzen mit OH-Gruppen die Aggregation von PrP hemmen, konnte auch bei der N^ε-Benzylidene-benzohydrazid (NBB)-Substanzklasse gemacht werden (Bertsch *et al.*, 2005). Um den Einfluss der OH-Gruppen auf die Aggregation näher zu charakterisieren, wurden im nächsten Schritt detaillierte Struktur-Wirkungs-Beziehungen für DPP-Substanzen, die sich durch Anzahl und Position der OH-Gruppen unterscheiden, im SIFT Antiprion-Assay herausgearbeitet. Dazu wurde die Aktivität der Substanzen bei unterschiedlichen Konzentrationen (0,3 μ M – 100 μ M) bestimmt.

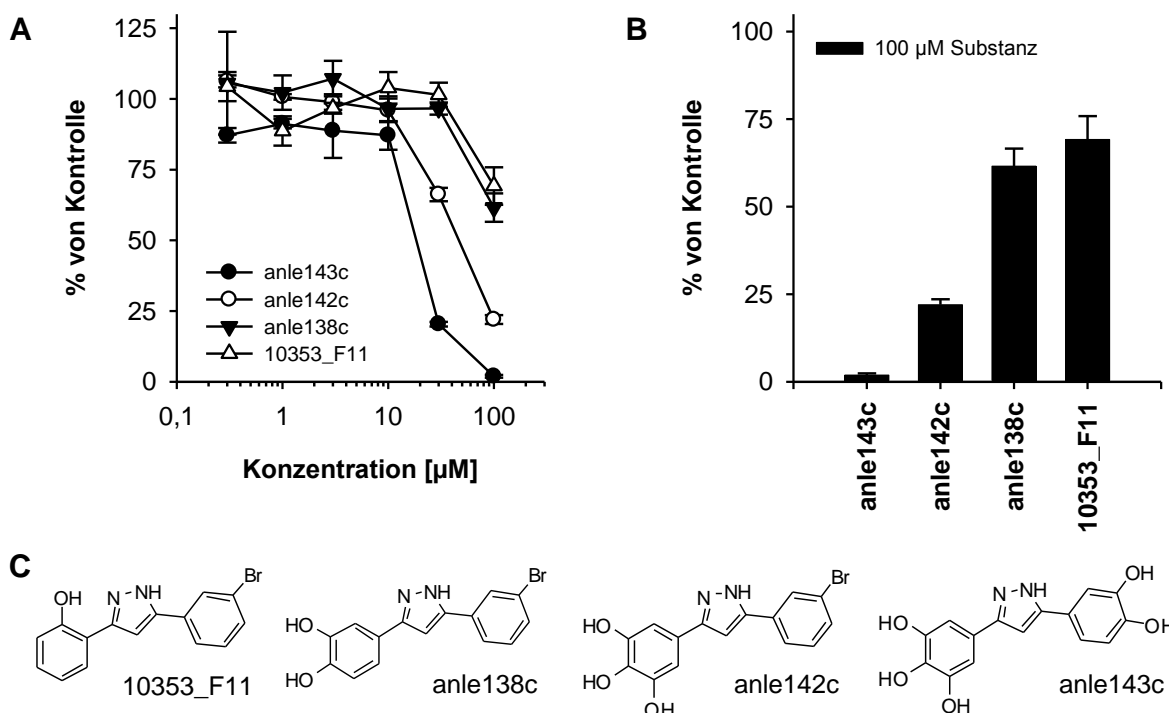


Abbildung 15: Struktur-Wirkungs-Analyse von DPPs mit OH-Gruppen. (A) Die Substanzen wurden bei verschiedenen Konzentrationen auf ihre inhibierende Wirkung im SIFT Antiprion-Assay getestet. Der Einfluss von OH-Gruppen auf die Wirkung der Substanzen wurde analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler (n=3). (B) Das Säulendiagramm zeigt die Wirkung der Substanzen bei einer Konzentration von 100 μ M. (C) Strukturen der verwendeten Substanzen mit unterschiedlicher Anzahl an OH-Gruppen.

In (Abbildung 15A) ist exemplarisch für vier Verbindungen der Substanzklasse die resultierende Dosis-Wirkungs-Kurve dargestellt. Durch die Dosis-Wirkungs-Kurven der Substanzen können die Auswirkungen der strukturellen Änderungen untereinander verglichen und mit der Inhibition der Aggregation in Bezug gesetzt werden. Deutlich ist zu erkennen, dass die Aktivität der Verbindungen im Antiprion-Assay mit der Anzahl an OH-Gruppen zunimmt (Abbildung 15A). Die Substanz 10353_F11 hat eine OH-Gruppe an Position R1 (siehe Grundgerüst in Abbildung 13A) und kann die Aggregation von rPrP auf 69 % der Kontrolle reduzieren. Bei anle138c wurde die OH-Gruppe von 10353_F11 entfernt und durch zwei OH-Gruppen an den Positionen R2 und R3 am Grundgerüst substituiert. Diese Substitutionen führten zu einer marginalen Verbesserung der Aktivität im Antiprion-Assay (62 % der Kontrolle). Durch die Addition einer weiteren OH-Gruppe an Position R4 bei Substanz anle142c, konnte die Aktivität wesentlich erhöht werden. Bei einer Substanzkonzentration von 100 µM konnte die Aggregation auf 22 % der Kontrolle reduziert werden (Abbildung 15). Die Ergänzung von zwei weiteren OH-Gruppen an den Positionen R7 und R8 bei Substanz anle143c konnte die Aktivität weiter verstärken. Bei der höchsten Konzentration konnte die Neubildung von rPrP-Aggregaten blockiert werden. Der Vergleich bei konstanter Konzentration der Substanzen (Abbildung 15B) lässt erkennen, wie die Addition von OH-Gruppen die inhibierende Aktivität im SIFT Antiprion-Assay positiv beeinflusst. Für die inhibierende Aktivität der Substanzen im SIFT Antiprion-Assay scheint die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Antiprion-Substanzen und den rPrP-Aggregaten entscheidend zu sein, da mit der Erhöhung der Anzahl an OH-Gruppen gleichzeitig die Anzahl der möglichen Wasserstoffbrückenbindungen ansteigt.

Nachdem gezeigt wurde, dass die Anzahl der OH-Gruppen die Aktivität der Substanzen im SIFT Antiprion-Assay beeinflusst, sollte die Frage beantwortet werden, ob OH-Gruppen durch Methylether (MeO) substituiert werden können, da sich die große Zahl an polaren OH-Gruppen negativ auf die Bioverfügbarkeit und die Hirngängigkeit der Substanzen auswirkt. In (Abbildung 16) sind repräsentativ die Ergebnisse von zwei Verbindungen im SIFT Antiprion-Assay dargestellt, bei denen die OH-Gruppen durch MeO ersetzt wurden. Nach Substitution der OH- durch MeO-Gruppen wird die Aktivität der Substanzen im SIFT Antiprion-Assay aufgehoben bzw. fällt bei den getesteten Konzentrationen auf ein Niveau unter der Nachweisgrenze. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass die OH-Gruppen eine wichtige Funktion bei der Interaktion mit den Proteinaggregaten im SIFT Antiprion-Assay haben.

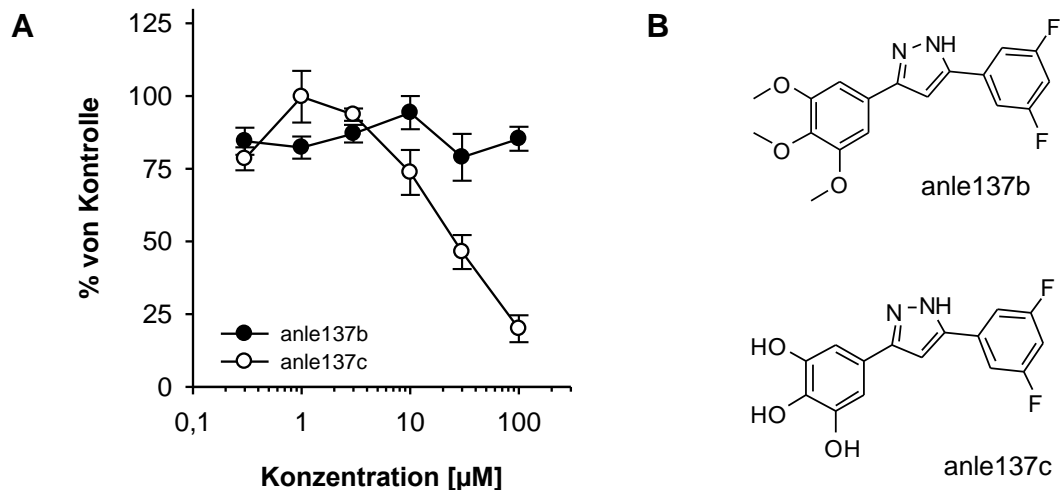


Abbildung 16: Bedeutung der OH-Gruppen als wirksame Substituenten. (A) Die Substanzen wurden im Antiprion-Assay bei den angegebenen Konzentrationen analysiert. Die Bedeutung der OH-Gruppen auf die inhibierende Wirkung der Substanzen im Antiprion-Assay stellt sich dar. Abgebildet ist der Mittelwert und der Standardfehler ($n=3$). (B) Strukturen der verwendeten Substanzen. Die OH-Gruppen wurden durch Methylether-Gruppen substituiert.

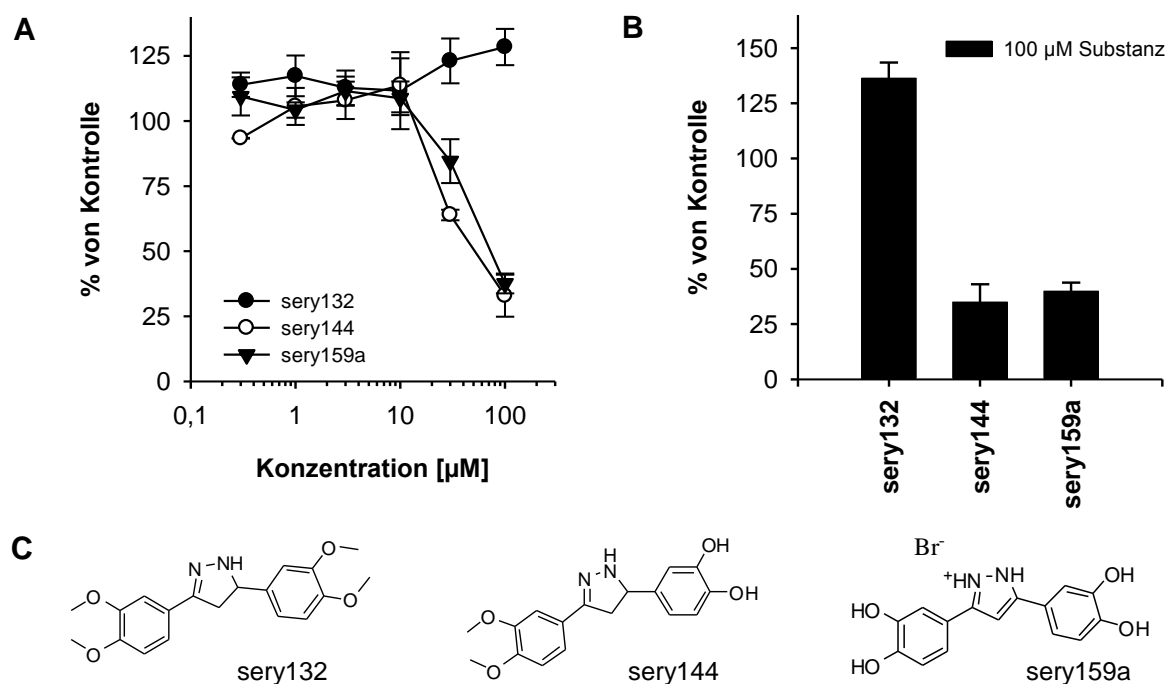


Abbildung 17: Struktur-Wirkungs-Analyse von OH- und MeO-Gruppen an DPP-Analoga. (A) Dosis-Wirkungs-Analyse der Substanzen im SIFT Antiprion-Assay. Die OH-Gruppen an Position R2 und R3 des Grundgerüsts können durch MeO-Gruppen ohne Verminderung der Aktivität substituiert werden. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler für $n=3$. (B) Das Säulendiagramm zeigt die Wirkung der Substanzen bei 100 μM Konzentration. (C) Strukturformeln der Substanzen.

Da nach Substitution aller OH- durch MeO-Gruppen die Aktivität der Substanzen im SIFT Antiprion-Assay aufgehoben wurde, wurde der Frage nachgegangen, wie sich eine teilweise

Substitution der OH-Gruppen auf die Aktivität der Substanzen auswirkt. Möglicherweise tragen nicht alle OH-Gruppen gleichermaßen zur Aktivität der Verbindungen bei, wodurch diese entfernt werden könnten und sich die Bioverfügbarkeit und Hirngängigkeit der Substanzen verbessern würde. In (Abbildung 17) zeigt sich schließlich, dass auch die Position der Substituenten von Bedeutung ist. Die Positionen R2 und R3 am Grundgerüst der DPPs scheinen eine untergeordnete Bedeutung bei der Interaktion der Substanzen mit den PrP-Aggregaten zu haben, da die Substanz sery144 die gleiche Aktivität wie die Substanz sery159a hat, obwohl die OH-Gruppen an diesen Positionen durch MeO-Gruppen substituiert wurden. Die zusätzliche Substitution der OH-Gruppen an Position R7 und R8 durch MeO hebt die Aktivität der Substanzen im SIFT Antiprion-Assay nicht nur auf, sondern wirkt sich bei einer Konzentration von 100 μM sogar aggregationsfördernd aus. Dabei ist darauf zu achten, dass sich die Kerngruppe bei zwei Verbindungen unterscheidet (Abbildung 17C).

Trotz dieser Einschränkung konnten entscheidende Positionen für OH-Gruppen, die zur Interaktion zwischen den Aggregaten und der Leitstruktur beitragen, bestimmt werden. Desweiteren konnte mit einer geringeren Anzahl an OH-Gruppen bei Substanz sery144 die gleiche Aktivität wie mit Substanz sery159a erzielt werden, wodurch die pharmakologischen Eigenschaften der Substanz für einen möglichen Einsatz in einem *in vivo* Tierexperimenten verbessert werden konnten.

Durch die molekulare Analyse der OH-Gruppen konnte dargelegt werden, dass OH-Gruppen für die Aktivität der Substanzen im SIFT Antiprion-Assay von entscheidender Bedeutung sind. Die Substitution der OH-Gruppen durch Methylether hebt die Wirkung der Substanzen auf und führt im Fall von sery132 sogar zu einem Anstieg der Aggregation der PrP-Moleküle im *in vitro* Assay. Zudem wurde deutlich, dass der entwickelte SIFT Antiprion-Assay geeignet ist kleine Unterschiede in der Wirksamkeit von Substanzen darzustellen und damit eine aussagekräftige Struktur-Wirkungs-Analyse zu ermöglichen.

4.4.3. Molekulare Analyse der DPP-Substanzen mit Halogen-Substituenten

Im Anschluss an die strukturelle Analyse der DPPs mit unterschiedlicher Anzahl und Position von OH-Gruppen, wurde der Einfluss der Halogene auf die Inhibition der Aggregation untersucht. Zwar konnte durch die molekulare Analyse die Bedeutung der OH-Gruppen für die Aktivität herausgearbeitet werden, jedoch ist die Bioverfügbarkeit und Fähigkeit zum Passieren der Blut-Hirn-Schranke (BBB) von Substanzen mit OH-Gruppen stark eingeschränkt. Gerade potentielle Antiprion-Substanzen müssen aber die BBB überqueren, um im Gehirn die Akkumulation von PrP^{Sc} und das Fortschreiten der Prionpathologie

verhindern zu können. Da Halogene eine gute Hirngängigkeit besitzen, wurde für Substanzen mit unterschiedlicher Art und Anzahl von Halogenen eine Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehung durchgeführt, um zu charakterisieren, wie die Aktivität durch Halogene beeinflusst wird. Dazu wurden von den Substanzen Dosis-Wirkung-Kurven mit einer Konzentrationsreihe von 0,3 μM bis 100 μM erstellt (Abbildung 18A), wie bereits für die Substanzen mit OH-Gruppen beschrieben.

In (Abbildung 18) lässt sich der Einfluss der Halogene auf die Aktivität im SIFT Antiprion-Assay erkennen. Hierbei lassen sich zwei Effekte beobachten, die die Aktivität der Substanzen beeinflussen. Zum einen ist die Aktivität der Verbindungen im SIFT Antiprion-Assay von der Anzahl der Halogene abhängig. Denn die Aktivität der Substanzen mit einem Halogen an Position R7 (anle136 bzw. anle142c) kann durch die Addition von einem weiteren Halogen (anle137c bzw. anle145d) an der Position R9 erhöht werden (Abbildung 18). Durch die Addition konnte die Aktivität im SIFT Antiprion-Assay bei Fluor um knapp 30 % bzw. um über 60 % für Brom erhöht werden. Dieser Effekt ist unabhängig von dem verwendeten Halogen, da er sowohl bei Fluor als auch Brom sichtbar wird. Zum anderen lässt sich in (Abbildung 18B) erkennen, dass die Aktivität der Verbindungen nicht nur durch die Anzahl der Halogene bestimmt wird, sondern auch von der Art des Halogens abhängt, welches an dem aromatischen Ring substituiert wird. Die Substanzen mit Brom besitzen jeweils eine höhere Aktivität als die entsprechenden Verbindungen mit Fluor.

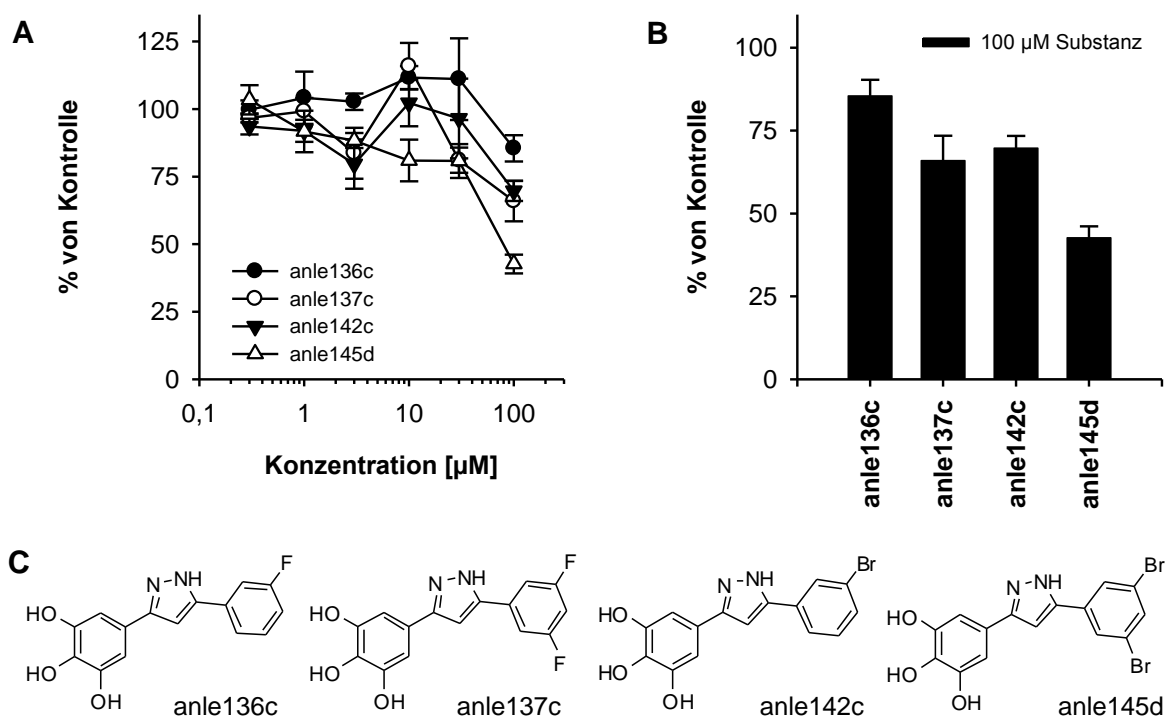


Abbildung 18: Molekulare Analyse der Aktivität im SIFT Antiprion-Assay von DPP-Substanzen mit Halogenen. (A) Die Dosis-Wirkung-Kurven der eingesetzten Substanzen zeigen, dass die Wirkung im SIFT

Antiprion-Assay sowohl von der Art des Halogens, welches an dem Phenyl-Ring substituiert wurde, als auch von der Anzahl der substituierten Halogene, abhängt. **(B)** Wirkung bei 100 μM Substanzkonzentration. **(C)** Strukturformeln der untersuchten Substanzen.

Darüberhinaus zeigt sich, dass durch die Kombination von Chlor und einer OH-Gruppe die Aktivität der Substanzen verstärkt werden kann (Abbildung 19). Somit konnte eine größere Aktivität bei gleicher Anzahl von OH-Gruppen erreicht werden, was von entscheidender Bedeutung für die Verwendung in Tierexperimenten sein kann. Halogene können demzufolge gezielt eingesetzt werden, um die Aktivität von Substanzen zu erhöhen.

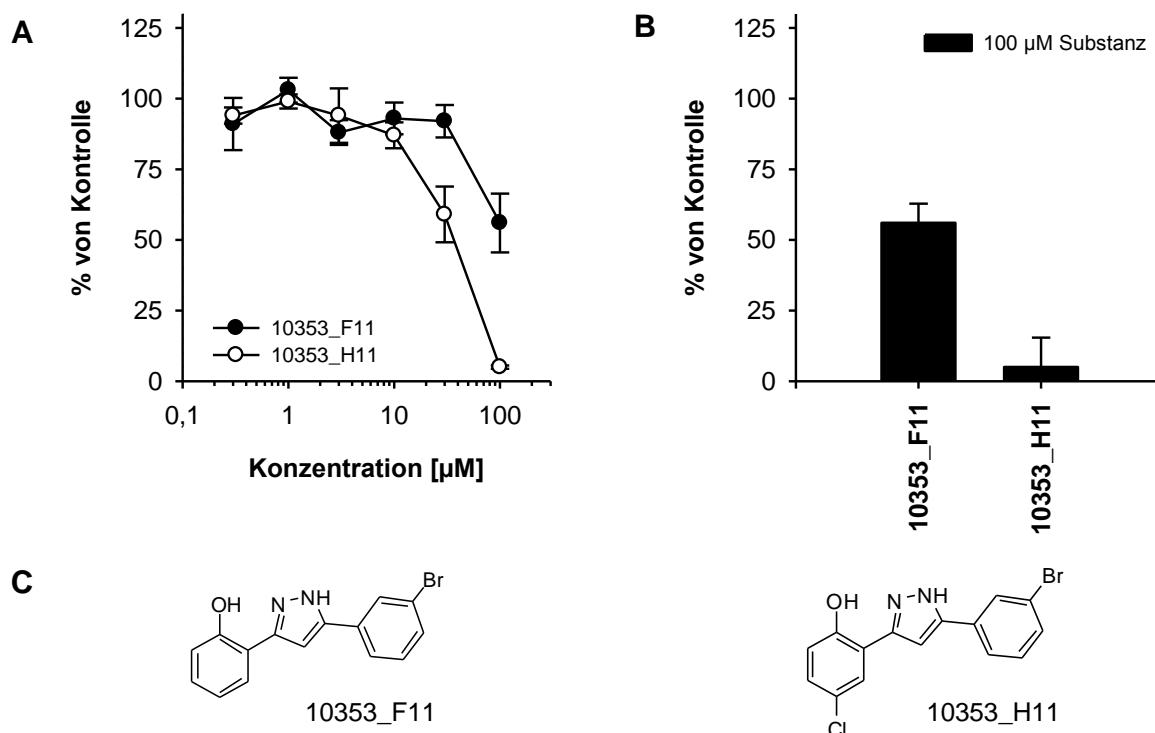


Abbildung 19: Molekulare Aktivität der DPPs mit zusätzlichen Halogen-Substituenten. (A) Vergleich der konzentrationsabhängigen Aktivität im SIFT Antiprion-Assay. (B) zeigt die Wirkung bei 100 μM Substanzkonzentration. (C) Strukturvergleich der beiden DPP-Substanzen 10353_F11 und 10353_H11. 10353_H11 trägt ein zusätzliches Halogen.

4.4.4. Validierung der Wirksamkeit in Zellkultur

Nach der molekularen Analyse der DPP-Substanzen mit Hilfe des SIFT Antiprion-Assays stellte sich die Frage nach der Antiprion-Wirkung der Verbindungen in einem biologischen System. Dazu wurden Scrapie-infizierte Mausgehirnzellen (SMB Zellen) verwendet, um eine Auswahl an Verbindungen der fokussierten Bibliothek im Zellkulturmodell zu untersuchen und die Aktivität aus den molekularen Untersuchungen zu validieren. Die Untersuchungen der DPP-Substanzen im Zellkulturmodell wurden durch die Arbeitsgruppe Groschup am

Friedrich-Löffler-Institut auf der Insel Riems durchgeführt. Zellkultursysteme wurden bereits erfolgreich eingesetzt, um wirksame Substanzen, die mit der PrP^{Sc}-Akkumulation interferieren, zu identifizieren (Bertsch *et al.*, 2005). Die ausgewählten Substanzen wurden zur Analyse in zwei Konzentrationen im Zellkulturmodell eingesetzt und der PrP^{Sc}-Gehalt im Vergleich zur Kontrolle bestimmt, dabei weisen wirksame Substanzen, in Analogie zum SIFT Antiprion-Assay, Werte kleiner als 100 % auf (Abbildung 20).

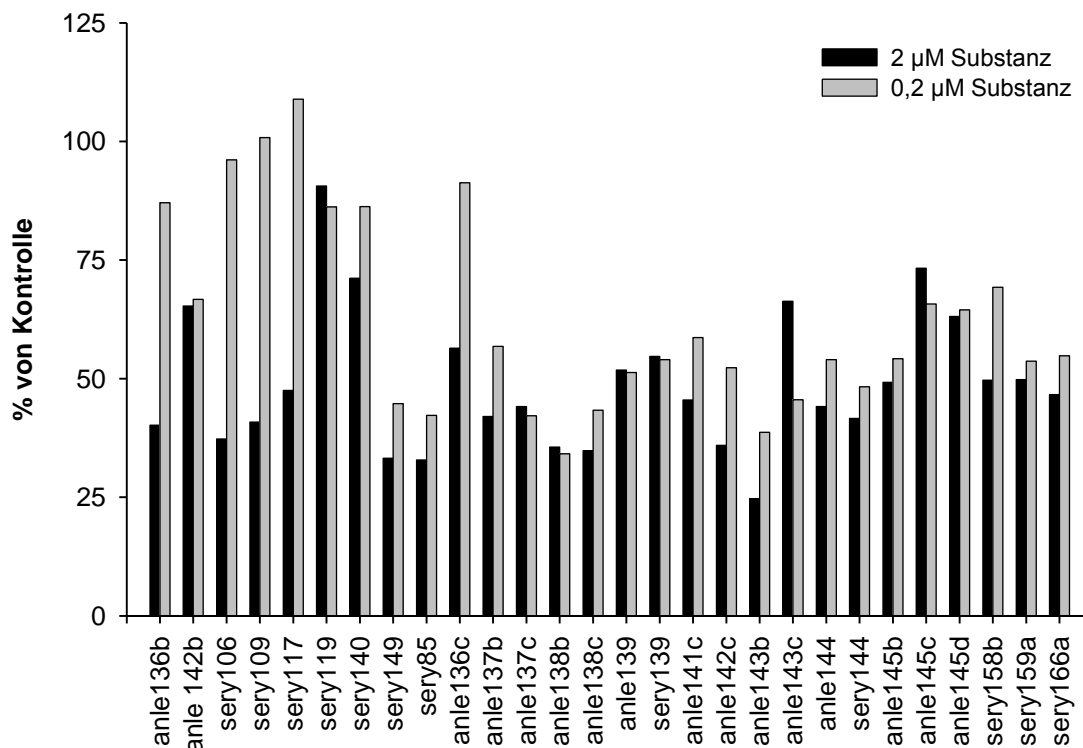


Abbildung 20: Untersuchung von DPP-Substanzen im SMB-Zellkulturmodell. Die Substanzen der DPP-Substanzklasse zeichnen sich durch eine durchgängig gute Wirksamkeit im Zellkulturmodell aus. Nur wenige Substanzen zeigten keine Inhibition der PrP^{Sc}-Akkumulation bei den eingesetzten Substanzkonzentrationen.

Diese Wirkstoffklasse weist insgesamt eine gute Antiprion-Wirkung in dem verwendeten biologischen System auf (Abbildung 20). Nur wenige Substanzen zeigten bei einer Konzentration von 2 µM keine inhibierende Wirkung auf die PrP^{Sc}-Akkumulation. Unter den wirksamen Substanzen im Zellkulturmodell konnten auch diejenigen Substanzen wiederentdeckt werden, die bereits im SIFT Antiprion-Assay eine inhibierende Aktivität gezeigt hatten. Beispielhaft seien die Substanzen anle138c, sery85 und sery166a genannt, die den PrP^{Sc}-Gehalt der infizierten SMB-Zellen auf weniger als 50 % bei einer Konzentration von 2 µM reduzieren. Das bestätigt die Ergebnisse aus dem Antiprion-Assay und zeigt, dass

durch den SIFT Antiprion-Assay wirksame Substanzen identifiziert werden konnten, die die Akkumulation von PrP^{Sc} auch in einem biologischen System effizient inhibieren können.

Darüberhinaus konnten, neben den im SIFT Antiprion-Assay aktiven Substanzen, weitere wirksame Substanzen im Zellkulturmodell entdeckt werden, wie die Substanzen anle143b und anle138b. Auffallend an diesen identifizierten Substanzen ist, dass viele dieser Verbindungen Methylethergruppen tragen. Diese Verbindungen besitzen in dem Zellkulturmodell eine größere Wirkung als vergleichbare Substanzen mit Hydroxylgruppen, wie der Vergleich der Substanzen anle143c und anle143b bei 2 µM Substanzkonzentration deutlich macht. Durch die Substanz anle138b konnte mit dem Methylendioxyphenylring noch ein weiterer aggregationshemmender Substituent identifiziert werden.

Dass nicht nur die Substituenten an den beiden Aromaten die Wirkung der Substanzen beeinflussen, zeigen die Ergebnisse zu den Substanzen sery85 (Pyrazol), sery117 (Isoxazol) und sery140 (Oxadiazol), welche sich nur anhand der Kerngruppe unterscheiden. Der Pyrazol-Ring besitzt die größte Wirkung im Zellkulturmodell. Die Substitution des Stickstoff-Atoms durch ein Sauerstoff-Atom führt zu einer schlechteren Wirkung und sery140 mit einem Oxadiazol-Ring verliert nahezu die Wirkung in einem biologischen System. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen besitzen die drei wirksamsten Substanzen im Zellkulturmodell (anle138b, anle143 und sey85) einen Pyrazol-Ring als Kerngruppe.

Durch die Kombination der beiden verwendeten Substanzscreening-Assays konnten sehr effizient wirksame Verbindungen aus der DPP-Substanzklasse identifiziert und auf eine sinnvolle Anzahl für anschließende Tierversuche reduziert werden.

4.5. Imidazo[1,2- α] Pyridin-Derivate

Eine weitere Substanzklasse, die auf ihre Antiprion-Wirkung hin getestet und für die eine Struktur-Wirkungs-Beziehung erarbeitet wurde, ist die der Imidazo[1,2- α] Pyridin (IMPY)-Derivate. Die Substanz IMPY ist ein Thioflavin-T Derivat, welches für die *in vivo* Diagnostik von β -amyloiden Plaques entwickelt wurde (Kung *et al.*, 2002). Das Derivat hat gute Bindungsaffinitäten bei synthetisch hergestellten A β 40-Aggregaten und färbt selektiv Plaques in postmortem Alzheimer Gehirnschnitten an. Deshalb wurden IMPY-Derivate von der Arbeitsgruppe Boris Schmidt an der TU Darmstadt synthetisiert, um diese hinsichtlich der anti-aggregatorischen Wirkung auf das Prionprotein zu untersuchen.

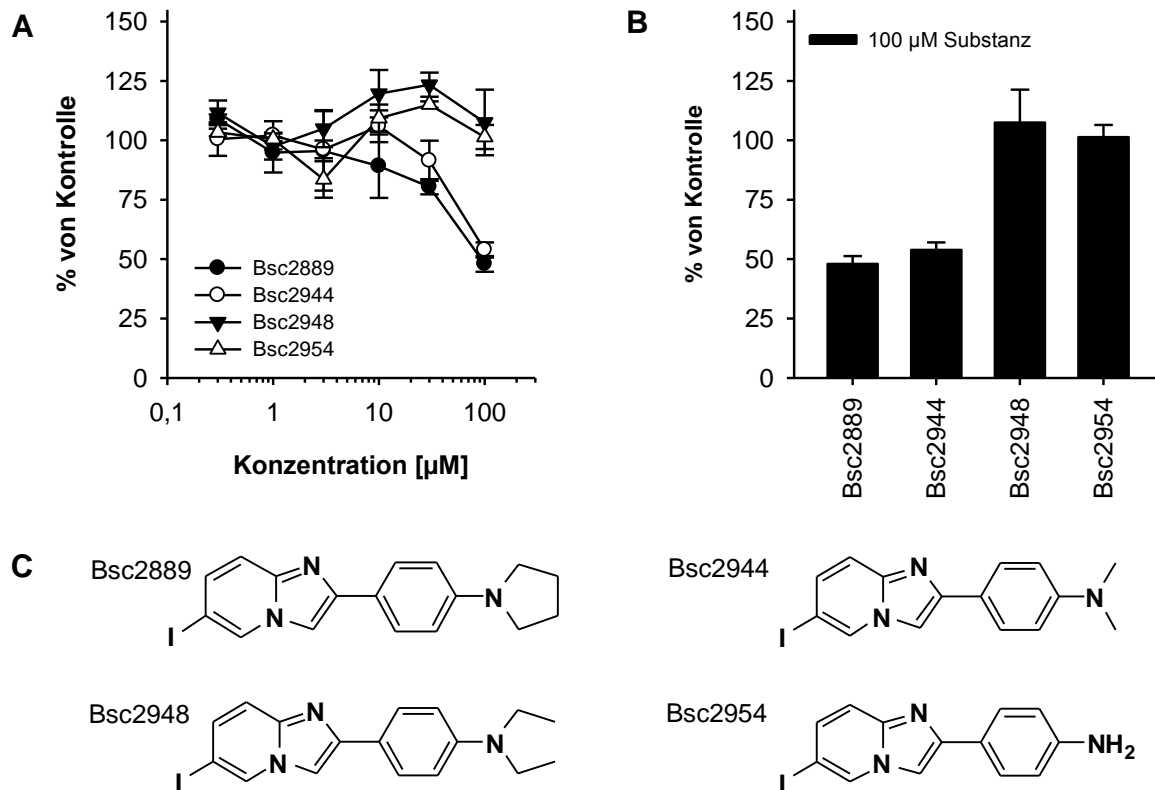


Abbildung 21: I-IMPY-Derivate mit unterschiedlichen Stickstoff-Substitutionen. (A) Dosis-Wirkungs-Analyse der I-IMPY-Derivate. Die Substanzen unterscheiden sich ausschließlich durch den Stickstoff-Substituenten. (B) zeigt Aktivität bei höchster Substanzkonzentration. (C) Strukturformeln der vier I-IMPY-Derivate.

Der Vergleich der Aktivitäten in den Dosis-Wirkungs-Kurven der Jod-IMPY Derivate mit verschiedenen Stickstoff-Substituenten legt offen, dass die Substanzen mit Stickstoff als Wasserstoff-Akzeptor (Bsc2889, Bsc2944) eine größere Aktivität besitzen als Substanz Bsc2954 mit Stickstoff als Wasserstoff-Donor (Abbildung 21). Die Verbindung Bsc2948 mit dem N-Diethylsubstituenten, welcher über große flexible Kohlenstoffketten verfügt, zeigt jedoch keine Wirkung im Antiprion-Assay. Die Bindungsstelle an den Fibrillen scheint für große Gruppen an dieser Position nicht zugänglich zu sein.

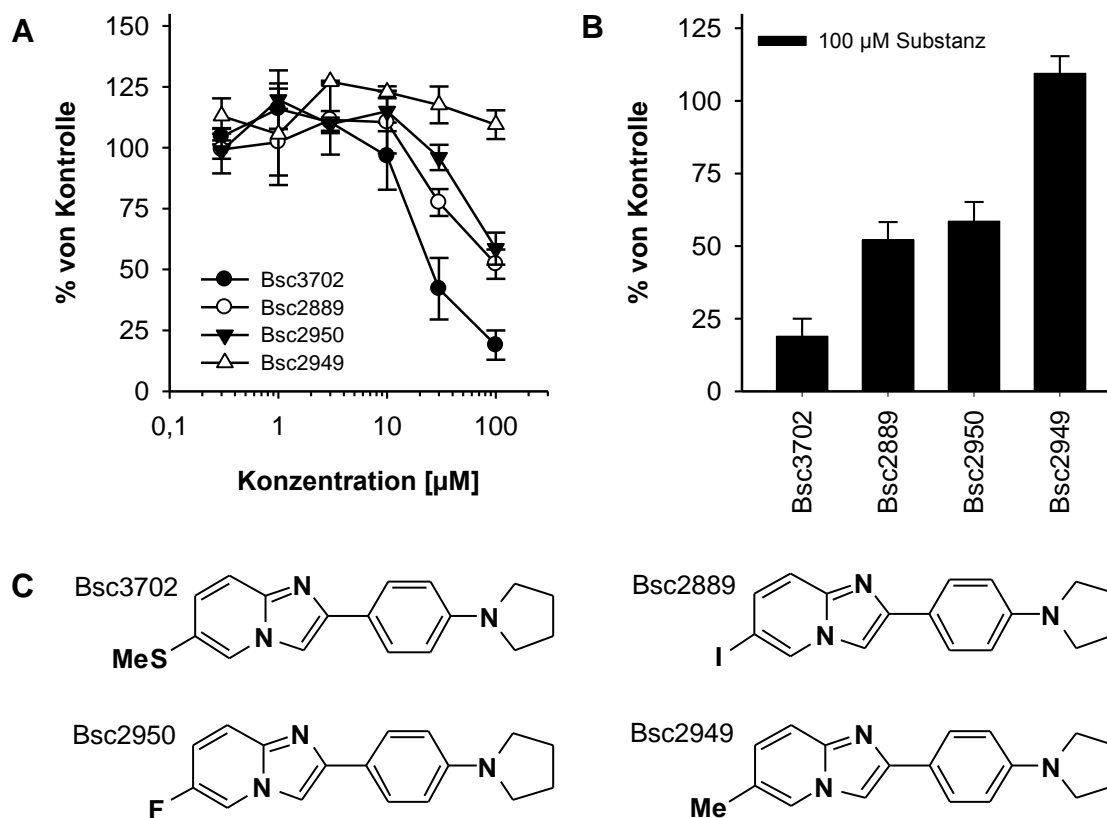


Abbildung 22: Vergleich von Pyrolidino-IMPY Derivaten. (A) Dosis-Wirkungs-Kurve der IMPY-Substanzen. Der MeS-Substituent an Bsc3702 zeigt die größte Inhibition der Aggregation der getesteten Substanzen, wohingegen Bsc2949 (Me) keine Aktivität im SIFT Antiprion-Assay aufweist. (B) Darstellung der Aktivität bei 100 µM Substanz. (C) Strukturen der verwendeten IMPY-Substanzen.

Im nächsten Schritt der Struktur-Wirkungs-Analyse wurde das Halogen Jod der Substanz Bsc2889 durch verschiedene Substituenten ausgetauscht und der Einfluss auf die Wirkung im Antiprion-Assay charakterisiert (Abbildung 22). Dabei zeigt die Methylthioether (MeS)-Gruppe der Substanz Bsc3702 die höchste Aktivität der untersuchten Substituenten, wohingegen die Methyl-Gruppe von Bsc2949 keine anti-aggregatorische Aktivität besitzt. Die Substitution von Jod durch das Halogen Fluor scheint für die Aktivität weitgehend indifferent zu sein. Die Aktivität von Bsc2889 (Jod) beträgt 52 % der Kontrolle und bei Bsc2950 (Fluor) 58 % der Kontrolle.

Um den Einfluss der Halogene auf die Aktivität der IMPY-Substanzen genauer zu beschreiben, wurden an beiden bisher untersuchten Positionen der IMPY-Leitstruktur Halogene substituiert. In (Abbildung 23) sind die Ergebnisse der Halogen-IMPYs dargestellt. Wie sich bereits für Jod und Fluor in den vorangegangenen Versuchen angedeutet hatte, zeigen die Halogen-IMPYs sehr ähnliche Aktivitäten, wobei die Substanz Bsc3110 mit zwei Jod-Atomen eine marginal höhere anti-aggregatorische Wirkung zeigt.

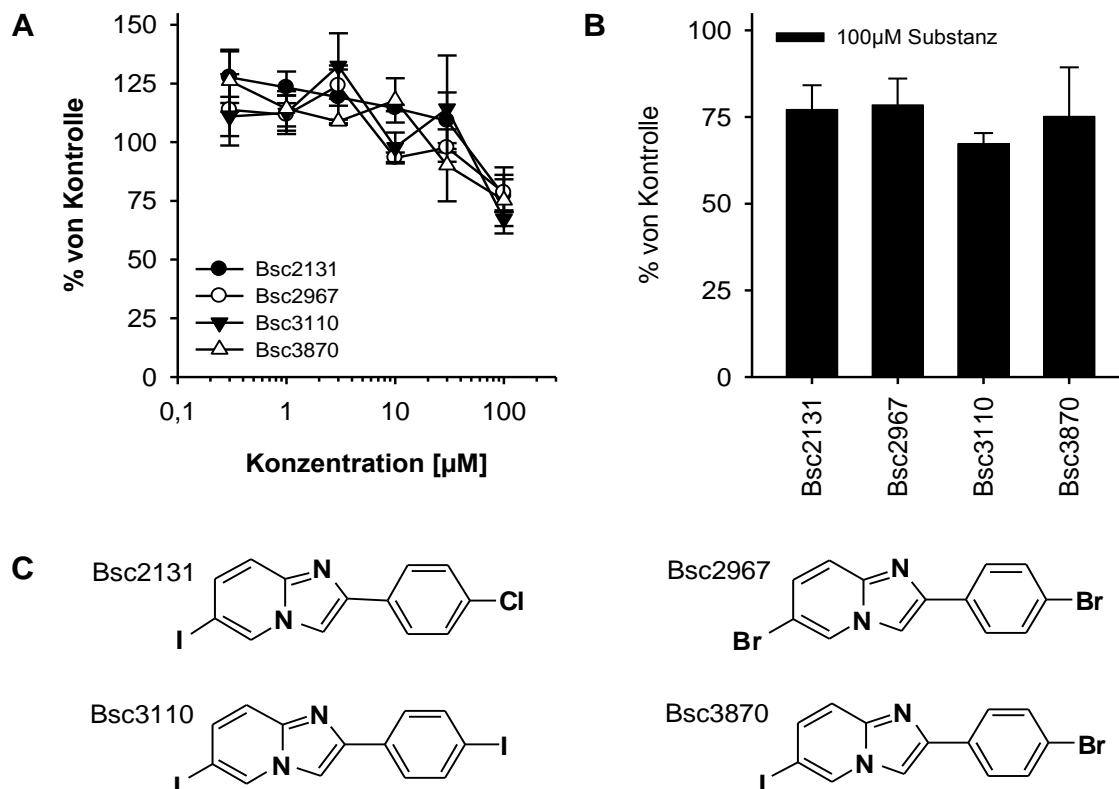


Abbildung 23: Vergleich der Halogen-IMPY Derivate. (A) Die Dosis-Wirkungs-Beziehungen zeigen, dass die Halogen-Substituenten keinen Einfluss auf die Aktivität der Verbindungen haben. (B) Vergleich der Aktivität im Antiprion-Assay bei 100 µM Substanzkonzentration. (C) Strukturformeln der Halogen-IMPY Derivate.

Eine Auswahl der synthetisierten IMPY-Derivate wurde ebenfalls in Zellkultur auf deren Wirkung auf die PrP^{Sc}-Akkumulation untersucht. Die getesteten Substanzen der IMPY-Wirkstoffklasse zeigten eine gute Wirkung in dem biologischen System (Abbildung 24). Alle Substanzen zeigten bei einer Konzentration von 2 µM eine inhibierende Wirkung auf die PrP^{Sc}-Akkumulation im Zellkulturmodell. Unter den wirksamen Substanzen im Zellkulturmodell befinden sich auch im Antiprion-Assay unwirksame Substanzen. So zeigte Substanz Bsc2949 keine Aktivität im Antiprion-Assay, aber verfügte im Zellkulturmodell über eine gute Wirksamkeit. Die Substanz Bsc2949 kann die PrP^{Sc}-Menge auf 28 % der Kontrolle reduzieren.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass die Ursprungssubstanz IMPY (Bsc2889) nicht nur an β -amyloide Plaques bindet, sondern ebenfalls Aggregate des Prionproteins. Weiter konnten durch die schrittweise Derivatisierung von IMPY neue Aggregat-bindende Substanzen entdeckt werden, die in der Diagnostik Verwendung finden könnten. Darüberhinaus konnten kooperierende Arbeitsgruppen für diese Substanzen die Bindung an Aggregate des tau-Proteins zeigen (B. Schmidt, persönliche Mitteilung). Diese Ergebnisse

deuten daraufhin, dass die Proteinaggregate vom Prionprotein, tau-Protein und A β 40, trotz unterschiedlicher Aminosäure-Sequenz, über sehr identische Bindungsstellen für die IMPY-Derivate verfügen.

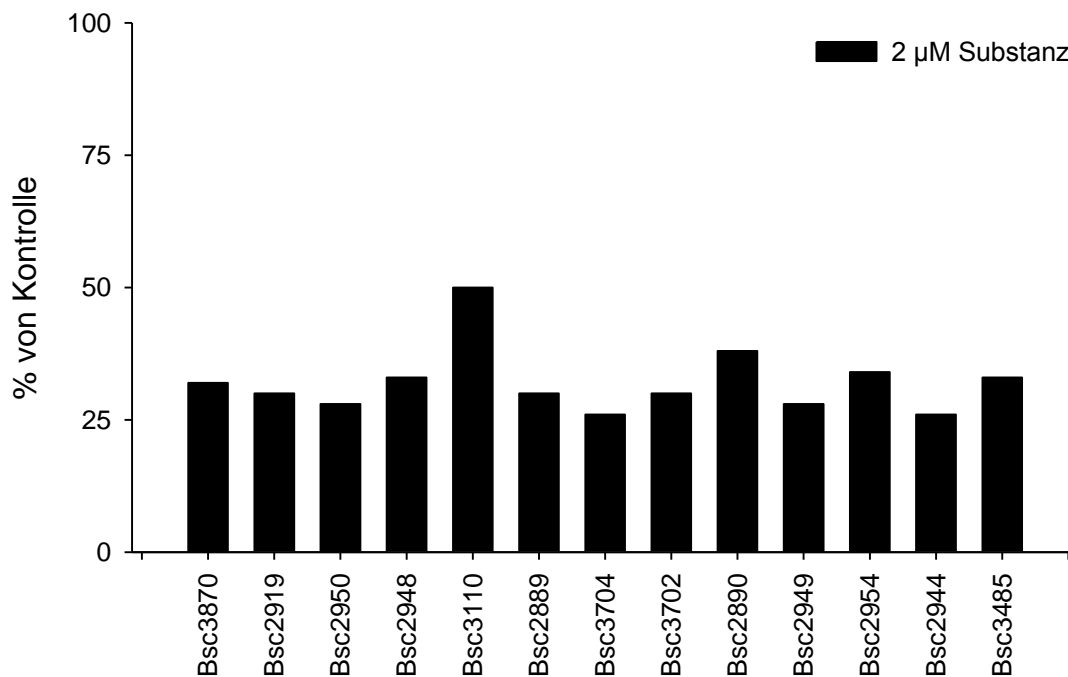


Abbildung 24: Wirkung der IMPY-Derivate in SMB-Zellkultur. Die IMPY-Derivate weisen eine gute Wirkung hinsichtlich der PrP^{Sc}-Akkumulation in Zellkultur auf.

4.6. N'-Benzylidene-benzohydrazid-Bibliothek

Die N'-Benzylidene-benzohydrazid (NBB)-Substanzklasse wurde in der Arbeit von (Bertsch *et al.*, 2005) als wirksame Antiprion-Substanzklasse entdeckt und ist als Leitstruktur durch Struktur-Wirkungs-Analysen bestätigt worden. Zur Weiterentwicklung dieser Substanz wurde in Kooperation mit Professor Boris Schmidt von der TU Darmstadt eine fokussierte Substanzbibliothek durch kombinatorische Chemie mit 330 unterschiedlichen Verbindungen hergestellt. Bei den neu synthetisierten Substanzen flossen nicht nur Überlegungen zur Steigerung der aggregationshemmenden Wirkung ein, sondern das Augenmerk wurde speziell auf die pharmakologischen Eigenschaften gerichtet, die auf den physikochemischen Eigenschaften der Verbindungen beruhen, wie Bioverfügbarkeit und Blut-Hirn-Schranken Passage. Die Strukturformeln, der verwendeten Bausteine zur Synthese der Verbindungen, sind in (Tabelle 7) aufgelistet.

4.6.1. SIFT-Ergebnisse

Um die neu synthetisierten Substanzen einer Struktur-Wirkungs-Analyse zu unterziehen, wurden die Substanzen im SIFT Antiprion-Assay auf ihre aggregationshemmende Wirkung getestet. Der Vorteil der kombinatorischen Chemie besteht darin, dass alle entstehenden Substanzen, jeweils aus einem Hydrazid und einem Aldehyd kombiniert werden, und auf diese Weise systematisch neue Substituenten identifiziert werden können, die die Aktivität der Substanzen entweder positiv oder negativ beeinflussen (Synthese s. 3.5). Dazu wurde die Aktivität der Moleküle aus der fokussierten Substanzbibliothek bei einer Konzentration von 100 μM getestet. Um eine vereinfachte Identifizierung von wirksamen Substituenten zu ermöglichen, wurde deren Aktivität optisch mithilfe einer Farbcodierung dargestellt. Die Aktivität der Substanzen wurde relativ zur Kontrolle angegeben, wobei nicht-wirksame Substanzen Werte um 100 % (blaue Farbcodierung) und wirksame Substanzen Werte kleiner 70 % (hellblaue bis gelbe Farbcodierung) aufweisen.

Die Ergebnisse des SIFT Antiprion-Assay sind in (Abbildung 25) zusammengefasst dargestellt. Die aktivsten Gruppen im Antiprion-Assay sind das Hydrazid H4 mit einer Nitrogruppe, sowie die Aldehyde A15 und A13, welche jeweils eine Anilingruppe in *ortho*- bzw. *para*-Position tragen. Ebenfalls über eine gute Aktivität verfügen die OH-Gruppen der Aldehyde A17 und A2, ebenfalls in *ortho*- bzw. *para*-Position, wohingegen die Aldehyde A12 und A3, die eine Anilin- bzw. OH-Gruppe in *meta*-Position tragen, nur über eine sehr schwache Aktivität im SIFT Antiprion-Assay verfügen. Mit den Aldehyden A29, A9, A30 und A14 konnten weitere Substituenten mit geringer Aktivität identifiziert werden.

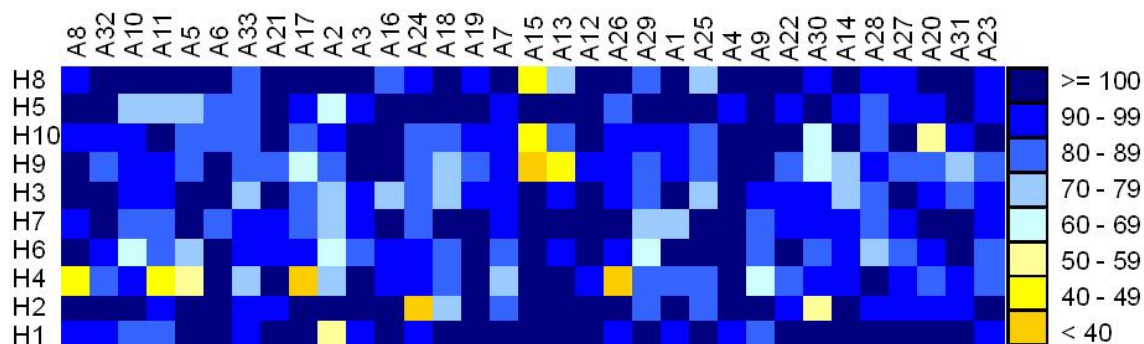


Abbildung 25: Struktur-Wirkungs-Analyse der NBB-Substanzklasse im SIFT Antiprion Assay. Weiterentwicklung dieser Wirkstoffklasse durch den Einsatz kombinatorischer Chemie. In jeder Zeile sind die Ergebnisse eines Hydrazides kombiniert mit den einzelnen Aldehyden aufgelistet. In Zeile H8 ist demzufolge jedes Aldehyd (A1-A33) mit dem Hydrazid H8 kombiniert. In der darauffolgenden Zeile H5 sind entsprechend die Ergebnisse der Kombination des Hydrazids H5 mit den Aldehyden A1-A33 dargestellt. Die aktivsten Substituenten sind das Hydrazid H4, sowie die Aldehyde A13 und A15. Die Aktivität ist durch eine Farbcodierung von unwirksam (dunkelblau) nach gut wirksam (gelb) angegeben.

Durch die Weiterentwicklung der Ursprungssubstanzen mit Hilfe kombinatorischer Chemie konnten im SIFT Antiprion-Assay neue wirksame Substituenten für NBB-Substanzen entdeckt werden.

4.6.2. Zellkultur-Ergebnisse

Nach der molekularen Analyse der neu synthetisierten NBB-Substanzen im SIFT Antiprion-Assay (4.6.1) wurden diese auf Aktivität in einem Zellkultur-Assay untersucht. Die zellbiologischen Analysen wurden mit SMB-Zellen durchgeführt. Zur Darstellung der Aktivitäten der Substanzen wurde die gleiche Farbcodierung wie im vorherigen Kapitel (4.6.1) verwendet.

Als wirksame Gruppen im Zellkultur-Assay konnten die Hydrazide H2, H5 und H8 identifiziert werden (Abbildung 26). Auffällig bei den beiden Hydraziden H5 und H8 ist, dass sie nahezu komplementäre Wirksamkeiten bei gleichen Aldehyden aufweisen. Das Hydrazid H8 zeigt beispielweise sehr gute Aktivität mit dem Aldehyd A18, wohingegen die Substanz H5-A18 keine Aktivität aufweist. Für das Aldehyd A29 sind die Wirksamkeiten genau entgegengesetzt. In diesem Fall weist die Substanz H5-A29 gute Aktivität auf und H8-A29 ist wiederum unwirksam. Vereinzelt zeigen auch einige Kombinationen mit den Hydraziden H9 und H10 gute Aktivitäten im Zellkultur-Assay, wobei diese Hydrazide die größte Aktivität mit großen, unpolaren Aldehyden, wie A28, aufweisen. Neben den Hydraziden konnten auch einige Aldehyde, die die Aktivität beeinflussen, entdeckt werden. Die aktivsten Aldehyde sind A12, A26 und A29, die jeweils ein Stickstoff-Atom an gleicher Position tragen. Das Stickstoff-Atom an dieser Position kann anscheinend eine Wasserstoff-Brücke mit der Bindestelle an den Fibrillen ausbilden, sowohl als H-Donor (A12) als auch Akzeptor (A26 und A29), wobei A26 die aktivere Gruppe dieser Aldehyde darstellt. Interessanterweise konnte eine ähnliche Beobachtung schon bei der IMPY-Substanzklasse gemacht werden (4.5). Das Aldehyd A11 mit einer OMe-Gruppe in *meta*-Position zeigt gute Wirksamkeit bei der Kombination mit den Hydraziden H2, H4, H6 und H7. Wird die Anzahl der OMe-Substituenten an dem Phenyl-Ring weiter erhöht, wird die Wirksamkeit komplett aufgehoben. Möglicherweise können die Substanzen durch eine sterische Hinderung nun nicht mehr die aktive Bindungsstelle erreichen, wodurch die weitere Akkumulation von PrP^{Sc} nicht mehr unterbunden wird.

Nach Abschluss der Analysen mit der fokussierten NBB-Substanzbibliothek konnten in beiden Screening-Assays wirksame chemische Gruppen identifiziert werden, die die PrP^{Sc}-Akkumulation verringern. Die wirksamsten Gruppen im SIFT Antiprion-Assay sind die

Nitro-Gruppe des Hydrazids H4 und die beiden Aldehyde A13, A15 mit einer NH₂-Gruppe. Für den zellkulturbasierten Assay konnten die Hydrazide H2, H5 und H8, sowie die Aldehyde A12, A26 und A29, als wirksamste Gruppen im Zellkultur-Assay identifiziert werden. Weiter konnten chemische Gruppen mit Wirksamkeit in beiden Assays entdeckt werden. Die Aldehyde mit OH-Gruppen (A2, A3 und A17), sowie die Aldehyde A18 und A19 mit Halogenen und das Aldehyd A29 zeigen, abgesehen von kleinen Abweichungen, Aktivität in beiden Assays.

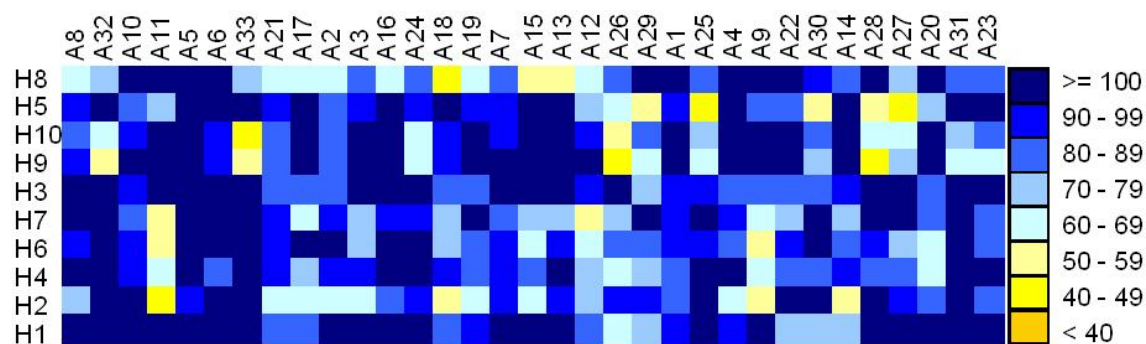


Abbildung 26: Ergebnisse der Struktur-Wirkungs-Analyse im Zellkulturmodell. Die Hydrazide H2, H5 und H8 konnten durchgängig als wirksame Gruppen identifiziert werden. Vereinzelt zeigen auch H9 und H10 Aktivität. Bei den Aldehyden weisen A12, A26 und A29 die größte Aktivität auf. Die Farbcodierung gibt die Aktivität im Assay an (Dunkelblau = unwirksam; orange-gelb = gut wirksam).

4.7. *In Vivo* Tiermodelle zur Analyse von Antiprion-Substanzen

Die folgenden Experimente dienen dem Zweck die Wirksamkeit der identifizierten Substanzen durch *in vivo* Tiermodelle zu bestätigen, da von einer vielversprechenden *in vitro* Aktivität nicht auf die Wirkung der Substanz in Tiermodellen geschlossen werden kann (Kocisko *et al.*, 2004). Das Anti-Malaria Medikament Quinacrin wurde nur aufgrund von *in vitro* Ergebnissen in klinischen Studien als Prion-Therapeutikum eingesetzt. Jedoch zeigte das Medikament in anschließenden *in vivo* Tiermodellen mit Scrapie-infizierten Mäusen keine therapeutische Wirkung (Barret *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2002), was leider in den klinischen Studien bestätigt wurde (Kobayashi *et al.*, 2003; Nakajima *et al.*, 2004). Aus diesem Grund sollten potentielle Prion-Therapeutika vor ihrem Einsatz in klinischen Studien zunächst in Tiermodellen untersucht werden. Dort können vielfältige Faktoren die Wirksamkeit einer Substanz einschränken, wie eine rasche Ausscheidung, schnelle Metabolisierung oder Nicht-Erreichen des Wirkortes z. B. durch schlechte Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit des Wirkstoffes. Demzufolge ist eine tierexperimentelle Untersuchung der Substanzen nicht nur sinnvoll, sondern sollte vor klinischen Studien unbedingt durchgeführt werden.

4.7.1. Therapie 1: Behandlung über osmotische Pumpen

Mit diesem Tierexperiment sollte die therapeutische Wirkung der Substanzen anle143c und sery166a hinsichtlich des Verlaufs der Prionerkrankung untersucht werden. Die beiden Substanzen wurden ausgewählt, da sie eine hohe inhibierende Wirkung auf die Aggregation des Prionproteins, sowohl im SIFT Antiprion Assay (Abbildung 14) als auch im Zellkulturmodell zeigten (Abbildung 20).

Zur Durchführung der Behandlung wurde den Tieren an Tag 80 nach Inokulation eine osmotische Pumpe zur direkten Applikation der Substanzen in den linken Ventrikel implantiert (Abbildung 6A). (Abbildung 27A+B) zeigt das Behandlungsschema und die Strukturformeln der beiden verwendeten Substanzen. Durch die Behandlung der intrazerebral infizierten Tiere mit den Substanzen über Alzempumpen ab Tag 80 nach Infektion konnte im Vergleich zu den Kontrolltieren keine Verlängerung der Überlebenszeit erreicht werden (Abbildung 27C). Die durchschnittliche Überlebenszeit der Gruppe, die mit Substanz sery166a behandelt wurde, betrug 164,5 Tage. Die Tiere der Kontrollgruppe überlebten im Mittel 162,4 Tage. Die Behandlung der Tiere mit anle143c musste abgebrochen werden, weil die Tiere der Gruppe nach kurzer Zeit verstarben. Anschließend wurde der Einfluss der sery166a-Behandlung auf die PrP^{Sc}-Ablagerungen im Gehirn analysiert.

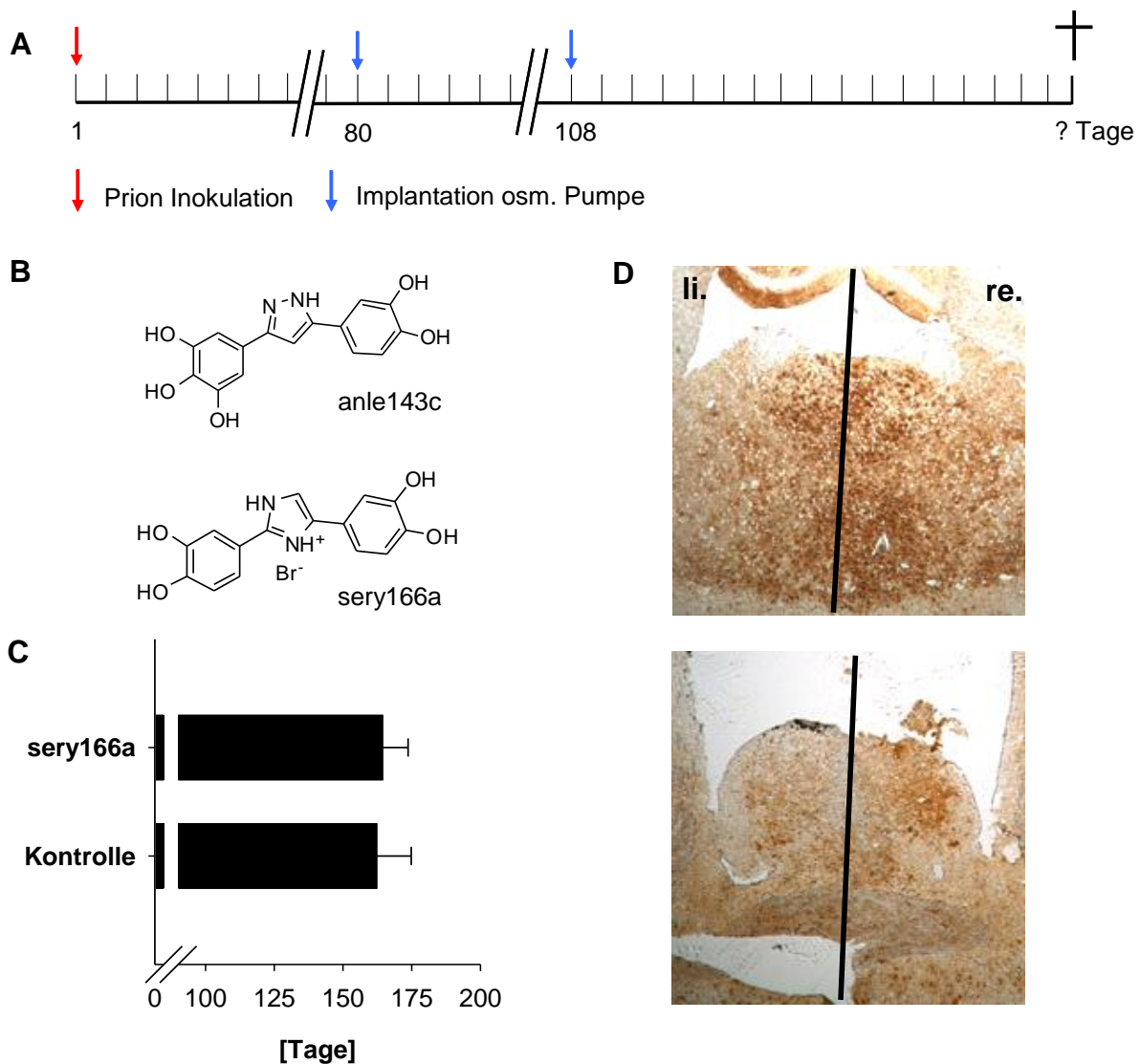


Abbildung 27: Einfluss der Therapie auf Überlebenszeit und PrP^{Sc}-Immunhistologie des Gehirns von C57BL/6-Mäusen nach intrazerebraler Inokulation mit Scrapie-Prionen. (A) Die Mäuse wurden im Alter von 7 Wochen intrazerebral mit Prionen inokuliert (roter Pfeil). An Tag 80 nach Inokulation wurde den Mäusen eine Alzetpumpe implantiert, welche die Substanz kontinuierlich direkt in den linken Ventrikel abgibt. Nach 28 Tagen wurde ein Pumpenwechsel durchgeführt. Die Pumpen gaben 60 nmol Substanz/ Tag ab. (B) Strukturformeln von anle143c und sery166a. (C) Die Behandlung der Mäuse mit der Substanz sery166a konnte keine Verlängerung der Inkubationszeit hervorrufen. Die Behandlung mit Substanz anle143c musste wegen toxischer Nebenwirkungen abgebrochen werden. (D) Immunhistologischer Nachweis von PrP^{Sc} in Gehirnen sery166a- oder DMSO-behandelter Tiere. Linke Bildhälfte (li.) zeigt jeweils die Hemisphäre, in die die Kanüle der osmotischen Pumpe implantiert und die Substanz injiziert wurde. Bei den Kontrolltieren (oberes Bild) ist kein Unterschied nach PrP^{Sc}-Färbung in den Gehirnhälften sichtbar. Auf dem unteren Bild ist eine repräsentative Färbung für die sery166a-behandelten Tiere dargestellt. In der linken Hemisphäre (li.) ist eine leicht hellere Färbung (weniger PrP^{Sc}), als in der rechten Gehirnhälfte erkennbar.

Nach histologischer Untersuchung des Gehirns von sery166a-behandelten Tieren konnte an der Eintrittsstelle der Kanüle in den linken Ventrikel zumindest eine leichte Reduktion der PrP^{Sc}-Ablagerungen erkannt werden (Abbildung 27D unten), welche nicht in den Kontrolltieren sichtbar ist (Abbildung 27D oben). Durch dieses Ergebnis wird zumindest die grundsätzliche Wirksamkeit der eingesetzten Verbindung bestätigt, aber zeigt sich auf der anderen Seite, dass die Wirkung lokal sehr begrenzt ist. Die Verbindungen konnten ihre Wirkung aus den *in vitro* Untersuchungen im Tierexperiment nicht bestätigen, was wiederum die Bedeutung von Tierexperimenten in der Medikamentenentwicklung hervorhebt.

4.7.2. Etablierung eines schnellen *in vivo* Screeningtests

Die langen Latenzzeiten der Prionkrankheiten zwischen Infektion und Manifestation klinischer Zeichen ermöglichen auf der einen Seite eine therapeutische Behandlung, aber auf der anderen Seite kann der therapeutische Erfolg der Behandlung im Mausmodell erst nach ungefähr 160 Tagen bewertet werden. Aus diesem Grund wurde ein schneller *in vivo* Screeningtest etabliert, in dem der Einfluss potentieller Antiprion-Substanzen auf die periphere PrP^{Sc}-Akkumulation in der Milz an Tag 35 nach intraperitonealer Infektion untersucht wurde. Die Milz wurde zu diesem Zeitpunkt untersucht, da PrP^{Sc} in den meisten Mausmodellen in diesem lymphatischen Organ als erstes nachweisbar ist (Beringue *et al.*, 2000a; Kimberlin und Walker, 1988). Ein weiterer Vorteil die Substanzen in einem Post-Expositions-Prophylaxe Modell bezüglich ihrer Inhibition auf die periphere Prionreplikation zu untersuchen, ist in den physikochemischen Eigenschaften der Substanzen begründet. Denn damit können Substanzen mit großen polaren Moleküloberflächen (z.B. hohe Anzahl OH-Gruppen), welche die Blut-Hirn-Schranke deshalb nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit passieren (Clark, 1999; Lipinski *et al.*, 2001), getestet werden.

(Abbildung 28A+B) zeigt den Versuchsablauf und die Strukturen der untersuchten Substanzen. Die Akkumulation von PrP^{Sc} in der Milz konnte nach 14-tägiger Behandlung mit den meisten Substanzen im Vergleich zur Kontrolle nicht reduziert werden (Abbildung 28C). Die Behandlung der Scrapie-infizierten Mäuse mit den Substanzen Bsc3504, Bsc3744, sery158b und sery159a führte zu keiner Veränderung des PrP^{Sc}-Gehaltes in der Milz gegenüber der Kontrolle. In den Milzen der beiden Behandlungsgruppen Bsc3704 und Bsc3745 stieg der PrP^{Sc}-Gehalt überraschend auf einen höheren Wert an. Die periphere Akkumulation von PrP^{Sc} in der Milz wurde durch die Behandlung mit diesen Substanzen erhöht. Für die Substanz Bsc3745 wurde die PrP^{Sc} Menge signifikant erhöht ($p < 0,01$ Students t-Test; $n = 7$). Einzig die Substanz sery166a konnte die Akkumulation von PrP^{Sc} in

der Milz leicht reduzieren. Nach histologischer Auswertung bestätigten sich die Ergebnisse aus der biochemischen Analyse. Für Bsc3745 zeigte sich eine stärkere PrP^{Sc}-Färbung in den PET Blots, was ebenfalls auf eine höhere PrP^{Sc}-Menge in der Milz hinweist (Abbildung 28D).

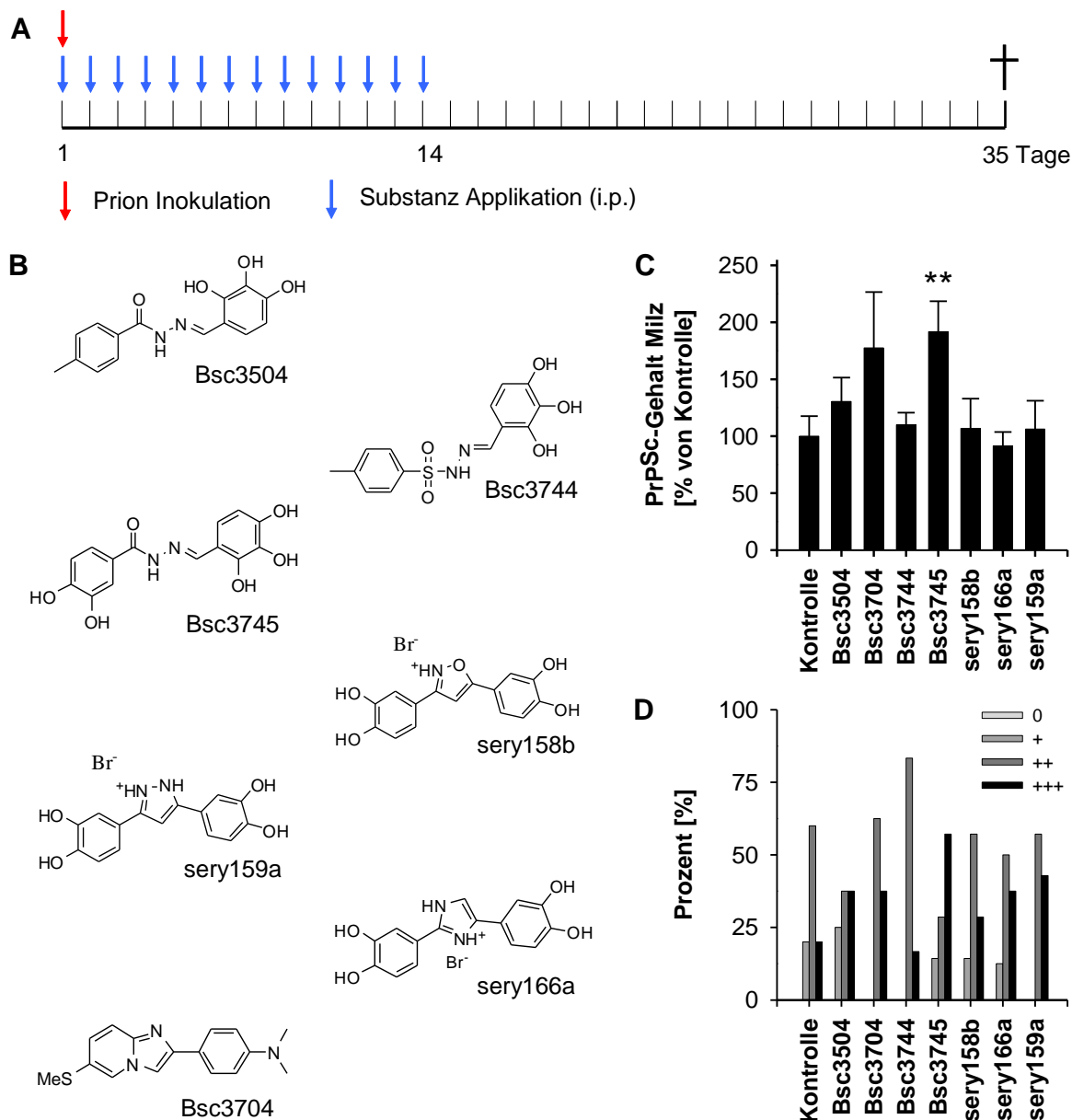


Abbildung 28: Einfluss potentieller Antiprion-Substanzen auf die periphere PrP^{Sc}-Akkumulation. (A)

Nach intraperitonealer Infektion der Mäuse mit 100 μ L 1 %-igem Hirnhomogenat (RML-Scrapie) wurden die Tiere für 14 aufeinanderfolgende Tage einmal täglich mit 50 μ L 10 mM Substanz (5 mM sery166a) intraperitoneal behandelt. Als Kontrollsubstanz wurde DMSO verabreicht. An Tag 35 nach Inokulation wurden die Mäuse getötet und der PrP^{Sc}-Gehalt der Milz bestimmt. (B) Strukturformeln der verwendeten Verbindungen. (C) Densitometrische Auswertung des PrP^{Sc}-Gehalts in Milzen mittels Dot Blot-Analyse. Die Signalstärke der Kontrollgruppe wurde auf 100 % gesetzt. Die Behandlungsgruppen zeigten keine Reduzierung der PrP^{Sc}-Akkumulation gegenüber der Kontrollgruppe. Die Gabe von Bsc3704 und Bsc3745 führte zu einem höheren PrP^{Sc}-Gehalt in der Milz. Für Bsc3745 zeigt sich ein signifikanter Anstieg der PrP^{Sc}-Menge (**; $p < 0,01$)

Students t-Test; n = 7 Tiere (Bsc3745)/15 (Kontrolle)). (D) Semi-Quantitative Auswertung der PrP^{Sc}-Färbung in PET-Blots. Bsc3745 zeigte in PET-Blots eine stärkere PrP^{Sc}-Färbung.

Aus den Ergebnissen der biochemischen und histologischen Untersuchungen dieses Experimentes und der Ergebnisse des vorhergehenden Experimentes ließ sich erkennen, dass die Substanzen mit einer hohen Anzahl an OH-Gruppen, trotz ihrer guten *in vitro* Aktivität, im Tiermodell keinen inhibierenden Einfluss auf die periphere PrP^{Sc}-Akkumulation in der Milz oder auf die Verlängerung der Überlebenszeit haben.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Zahl der OH-Gruppen an den untersuchten Verbindungen eingeschränkt, um eventuell die Bioverfügbarkeit zu vergrößern. Zusätzlich sollte die therapeutische Wirkung von Substanzen aus mehreren potentiellen Antiprion-Substanzklassen *in vivo* auf die periphere Akkumulation von Prionen untersucht werden. In diesem Versuch wurden vier verschiedene Wirkstoffklassen getestet, die in molekularen Untersuchungen identifiziert wurden. Die Substanzen Bsc3104, Bsc3119 (Daten nicht abgebildet) und Bsc3594 (4.3) zeichnen sich durch eine starke Inhibition der PrP^C-PrP^{Sc} Interaktion auf molekularer Ebene aus und besitzen Antiprion-Aktivität im zellulären System. Die Substanz Bsc3217 wurde aufgrund medizinisch-chemischer Überlegungen und Erfahrungen aus dem Zellkulturmodell mit dieser Substanzklasse ausgewählt (4.6.2). Für diesen Versuch wurde erneut das Post-Expositions-Prophylaxe Modell gewählt (Abbildung 28A). Die Strukturformeln sind (Abbildung 29A) zu entnehmen.

Der Einfluss der Behandlung auf die periphere Akkumulation von PrP^{Sc} in der Milz ist in (Abbildung 29B) dargestellt. Die Behandlung der infizierten Mäuse mit den ausgewählten Substanzen für 14 Tage, beginnend nach Infektion führte zu einer Reduktion des PrP^{Sc}-Gehaltes in der Milz im Vergleich zur Kontrolle. Für Bsc3594 konnte allerdings nur eine minimale Reduktion festgestellt werden. Durch die Applikation der Substanzen Bsc3104, Bsc3119 und Bsc3217 konnte der PrP^{Sc}-Gehalt signifikant reduziert werden. Für Bsc3104 betrug der PrP^{Sc}-Gehalt 44 % der Kontrolle an Tag 35 nach Infektion ($p < 0,05$). Bsc3119 konnte den PrP^{Sc}-Gehalt auf 53 % der Kontrolle im gleichen Behandlungszeitraum verringern ($p < 0,05$). Das gleiche Ergebnis konnte mit Bsc3217 erreicht werden ($p < 0,05$). Die Ergebnisse der biochemischen Analyse konnten in den Immunoblots bestätigt werden (Abbildung 29C). In den Behandlungsgruppen zeigt sich im PET Blot eine Verschiebung von starker PrP^{Sc}-Färbung zu schwächerer PrP^{Sc}-Färbung verglichen mit der Kontrollgruppe.

Mit diesem Tierexperiment konnte belegt werden, dass durch die Behandlung mit den gewählten Substanzen die periphere Prionakkumulation in der Milz reduziert werden konnte. Damit wurde zum ersten Mal in einem Tierversuch bestätigt, dass der gewählte Ansatz zum

Screening von Proteinaggregationsinhibitoren auf molekularer und zellulärer Ebene geeignet ist Antiprion-Substanzen zu identifizieren. Außerdem konnten mit diesem Versuch neben der bereits bekannten NBB-Substanzklasse weitere wirksame Leitstrukturen bestimmt werden.

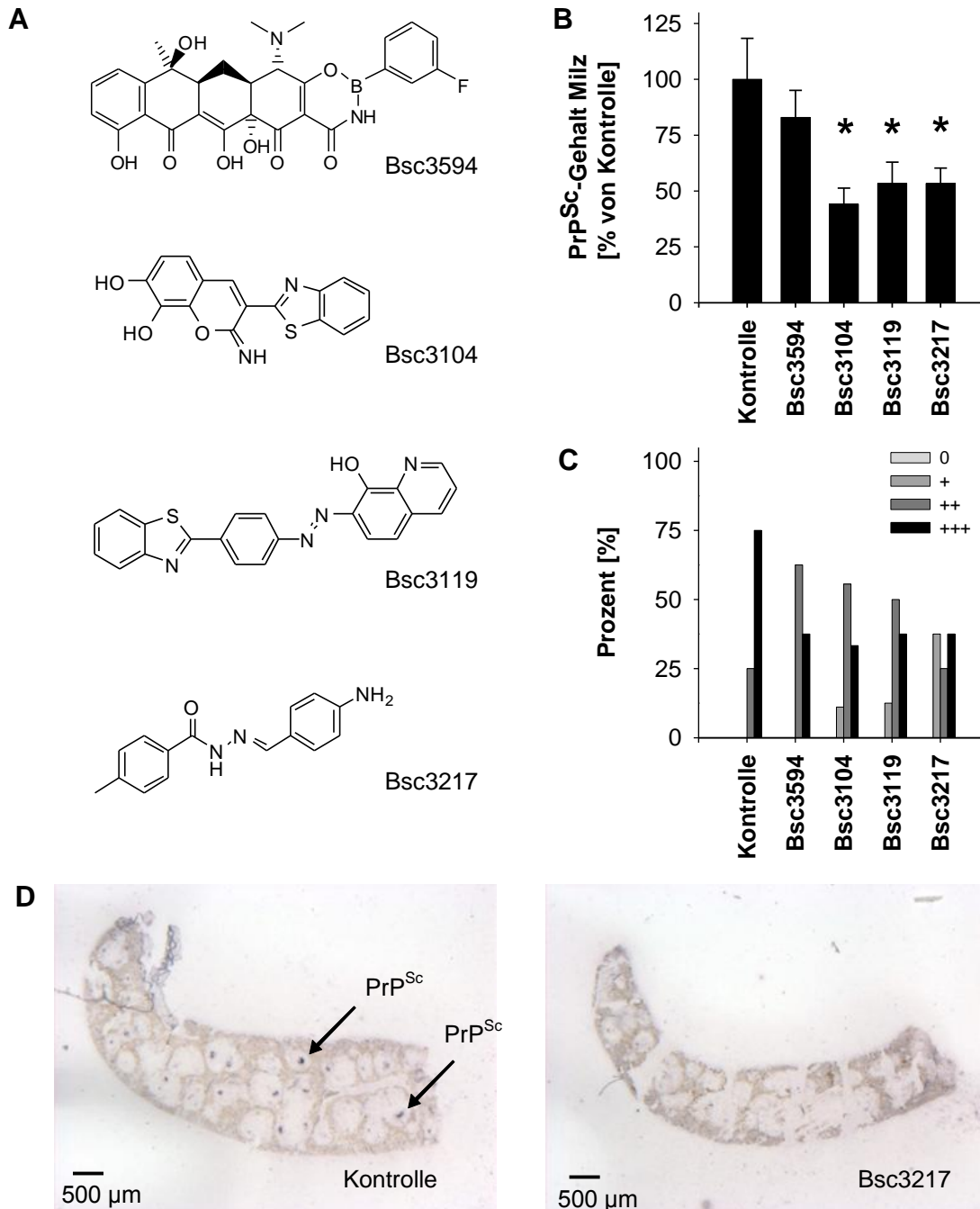


Abbildung 29: Effekt von antiaggregativen Verbindungen auf den PrP^{Sc}-Gehalt in der Milz. (A) Strukturformeln der applizierten Substanzen. **(B)** Einfluss der Behandlung auf die periphere Akkumulation von PrP^{Sc} nach intraperitonealer Infektion, bestimmt durch Dot Blot-Analyse mit densitometrischer Quantifizierung. Die Behandlungsgruppe Bsc3594 zeigte keine signifikante Reduktion gegenüber der Kontrollgruppe. Durch Behandlung mit den Substanzen Bsc3104, Bsc3119 und Bsc3217 konnte der PrP^{Sc}-Gehalt der Milz im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert werden (*; $p < 0,05$ Students t-Test; $n = 8$ Tiere). **(C)** Semi-Quantitative

Auswertung der PrP^{Sc}-Färbung in PET-Blots. (D) Exemplarisch ist ein PET-Blot einer Milz aus der Kontrolle bzw. Bsc3217-Behandlungsgruppe dargestellt. PrP^{Sc} (Pfeil) ist in der weißen Pulpa zu erkennen.

4.7.3. Substanz-Screening im Überlebenszeitmodell

Mit diesem Versuch sollte der Einfluss der Substanzen auf die Überlebenszeit nach Prioninfektion untersucht werden. Die Behandlung von intrazerebral infizierten C57BL/6-Tieren begann zu einem späten Zeitpunkt (Tag 80 nach Inokulation) der Erkrankung. Um diesen Zeitpunkt herum sind sowohl PrP^{Sc} als auch apoptotische Zellen im Gehirn nachweisbar (Giese *et al.*, 1995). Durch die Wahl dieser stringenten Bedingungen sollten die Substanzen unter einem möglichst realitätsnahen Ansatz getestet werden, da der Großteil der potentiellen Patienten bereits erste klinische Symptome, also eine fortgeschrittene Erkrankung, aufweisen werden. Außerdem wurde bei der Auswahl der Substanzen darauf geachtet, dass diese die von Clark und Lipinsky charakterisierten Kriterien erfüllen (Clark, 1999; Lipinski *et al.*, 2001), damit sie die BBB passieren und Einfluss auf die Prionpathologie nehmen können. Weiter sollten eine größere Stabilität und günstigere pharmakologische Eigenschaften der Substanzen erreicht werden (Lipinski *et al.*, 2001).

In diesem Inkubationszeitversuch wurden hauptsächlich Substanzen aus der DPP-Substanzklasse ohne OH-Gruppen eingesetzt (Abbildung 30B), da vorhergehende Experimente gezeigt haben, dass Verbindungen mit mehreren OH-Gruppen, trotz guter Wirkung im SIFT Antiprion- und Zellkulturassay, keinen Einfluss auf die Prionpathologie im Tiermodell zeigen (4.7.2). Zusätzlich wurde die Auswahl um die Substanz Bsc2130, welche zur Klasse der IMPY gehört, erweitert, da für einige Verbindungen dieser Substanzklasse gezeigt wurde, dass sie die BBB passieren können (Kung *et al.*, 2002; Seneca *et al.*, 2007). Die Behandlung der Tiere mit diesen Substanzen wurde einmal täglich für 14 aufeinander folgende Tage durch intraperitoneale Injektion mit 25 µL 100 mM Substanz oder dem Vehikel DMSO durchgeführt (Abbildung 30A).

Die Überlebenszeit der Tiere konnte mit einer 14-tägigen Behandlung beginnend zu einem späten Zeitpunkt der Prion-Erkrankung nach intrazerebraler Infektion verlängert werden (Abbildung 30C). Für die Substanzen Bsc2130, sery106 und anle143b konnte keine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit erreicht werden. Die Behandlung mit den DPP-Substanzen sery149 und anle138b führte jedoch zu einer signifikanten Überlebenszeitverlängerung. Die Tiere der Behandlungsgruppe sery149 lebten im Schnitt 12 Tage länger als die Kontrolltiere ($p < 0,05$ Students t-Test; $n = 8$) und bei den mit Substanz

anle138b behandelten Tieren konnte eine Verlängerung von 15 Tagen beobachtet werden ($p < 0,01$ Students t-Test; $n = 7$).

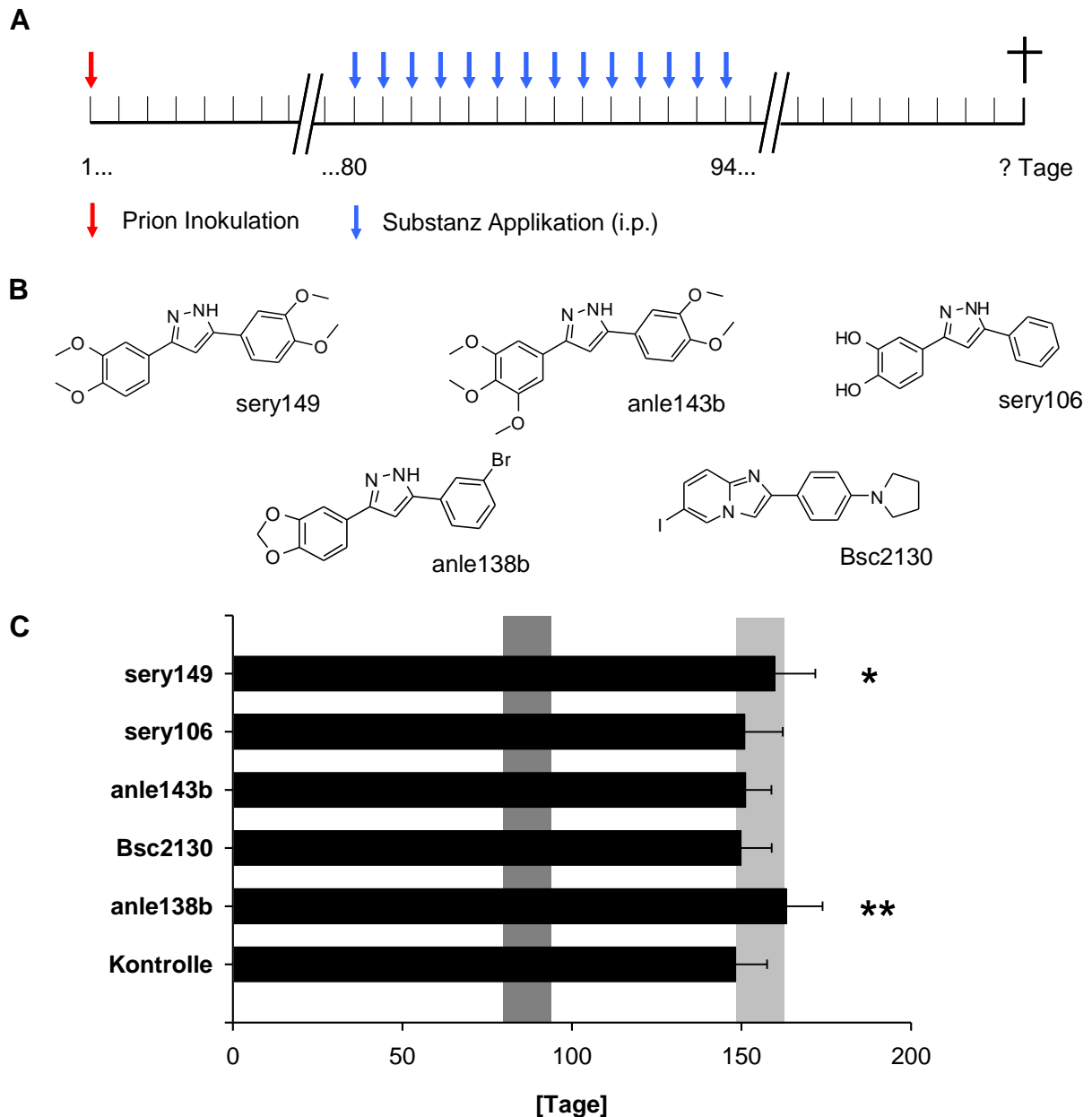


Abbildung 30: Versuchsüberblick und Überlebenszeiten der behandelten Scrapie-infizierten Mäusen. (A) Die Behandlung von intrazerebral mit RML Prionen inokulierten C57BL/6 Mäusen (30 μ L 1 %-igem Hirnhomogenat) wurde an Tag 80 nach Infektion begonnen. Dafür wurden die Tiere 14 Tage einmal täglich mit 25 μ L 100 mM Substanz intraperitoneal therapiert. **(B)** untersuchte Substanzen. **(C)** Mittlere Überlebenszeit von C57BL/6 Tieren nach intrazerebraler Infektion und 14-tägiger Behandlung (dunkelgrauer Balken) ab Tag 80 post Infektion. Die Behandlungsgruppen sery106, anle143b und Bsc2130 zeigten keine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit. Durch Behandlung mit den Substanzen sery149 und anle138b konnte hingegen die Überlebensdauer der Mäuse im Vergleich zur Kontrolle signifikant verlängert werden (*; $p < 0,05$ Students t-Test; **, $p < 0,01$ Students t-Test; $n=8$ Tiere). Der hellgraue Balken zeigt die zu erwartende Verlängerung der Überlebenszeit um die 14 Tage dauernde Behandlung.

Dieser Versuch konnte zeigen, dass sogar bei fortgeschrittener Prionpathologie eine Therapie möglich ist und die Überlebenszeit der infizierten Mäuse durch die Behandlung mit anle138b und sery149 verlängert werden konnte. Da die 14-tägige Behandlungsdauer ungefähr mit der erzielten Überlebenszeitverlängerung, zumindest für anle138b, übereinstimmt, deutet dieses Ergebnis daraufhin, dass das Fortschreiten der Prionpathologie, während des Behandlungszeitraumes, blockiert werden konnte.

Die Konsequenz, die aus den Ergebnissen der Versuche in (4.7.2) gezogen wurde, den pharmakologischen Eigenschaften der Substanzen einen größeren Stellenwert einzuräumen (Verringerung der Anzahl der OH-Gruppen), konnte mit den guten Resultaten dieses Experimentes bestätigt werden. Die MeO-Gruppen an der Verbindung sery149 und der Methylendioxyphenyl-Ring bei der Substanz anle138b (Abbildung 30B) wurden als wirksame Substituenten für die DPP-Leitstruktur in einem Tiermodell entdeckt. Damit konnten die Ergebnisse der beiden Substanzen aus dem Zellkulturassay bestätigt werden. Interessanterweise führt die Behandlung mit anle143b zu keiner signifikanten Überlebenszeitsverlängerung, obwohl sich diese Substanz nur durch eine zusätzliche MeO-Gruppe am 3'-Phenylring gegenüber sery149 unterscheidet. Allerdings spielt die Molekülgröße bei der Passage der Blut-Hirn-Schranke eine wichtige Rolle. Durch die zusätzliche MeO-Gruppe erhöht sich die Anzahl der rotierbaren Bindungen und die polare Moleküloberfläche. Unter Umständen liegt auch eine sterische Hinderung vor, die die Interaktion der Substanz mit den PrP^{Sc}-Fibrillen stört. Die Vermutung, dass Substanzen mit mehreren OH-Gruppen keine gute *in vivo* Wirksamkeit haben, wurde mit dem Ergebnis von sery106 erneut bestätigt. Für Bsc2130 könnte eine kurze Halbwertszeit das schwache Ergebnis erklären. Seneca und Kollegen (Seneca *et al.*, 2007) konnten kürzlich in Rhesus-Affen zeigen, dass MeS-IMPY bereits nach 30 Minuten in der Harnblase nachweisbar ist.

4.7.4. Weiterentwicklung des schnellen peripheren Screeningtests

Dieser Versuch setzt direkt bei den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche (4.7.2) an. Mit Hilfe dieses Versuches sollten zwei Ziele verfolgt werden. Zum ersten sollte die Wirkung der zuvor identifizierten Antiprion-Substanzen in einem zusätzlichen Experiment, in dem die Akkumulation von PrP^{Sc} in der Milz betrachtet wird, bestätigt werden und zum zweiten sollte die Behandlungsdauer über die üblichen 14 Tage hinaus ausgedehnt werden. Der Behandlungszeitraum wurde ausgedehnt, da eine längere Behandlungsdauer von großer Bedeutung für den Therapieerfolg sein könnte. Die getesteten Substanzen konnten entweder die periphere Akkumulation von PrP^{Sc} in der Milz reduzieren (Bsc3104, Bsc3119, Bsc3217)

oder verlängerten die Überlebenszeit von intrazerebral mit Prionen infizierten Mäusen (anle138b). Ergänzt wurde die Auswahl durch die Substanzen Bsc3893, die sowohl erfolgreich im Zellkultursystem die Prionakkumulation inhibiert (Bertsch *et al.*, 2005), als auch in einem Zebrafisch-Modell für die Huntington Erkrankung mit einem PolyQ-verlängerten Huntingtin eingesetzt wurde (Schiffer *et al.*, 2007), und sery255b, welche die Akkumulation von PrP^{Sc} in einem Zellkulturmodell inhibiert (Daten nicht abgebildet). Neben der längeren Behandlungsdauer wurden die Substanzen zusätzlich in einer höheren Dosis eingesetzt, da in den bisherigen Experimenten keine toxischen Nebenwirkungen beobachtet wurden, sodass die Menge der verabreichten Substanz erhöht werden konnte.

Die Strukturformeln der verwendeten Substanzen und Behandlungsschema sind in (Abbildung 31) gezeigt. Die Substanz Bsc3119 wurde nur für 14 Tage intraperitoneal appliziert, denn anhand von Gewichtsverlust der Mäuse, während der Behandlung, ließen sich toxische Nebenwirkungen erkennen.

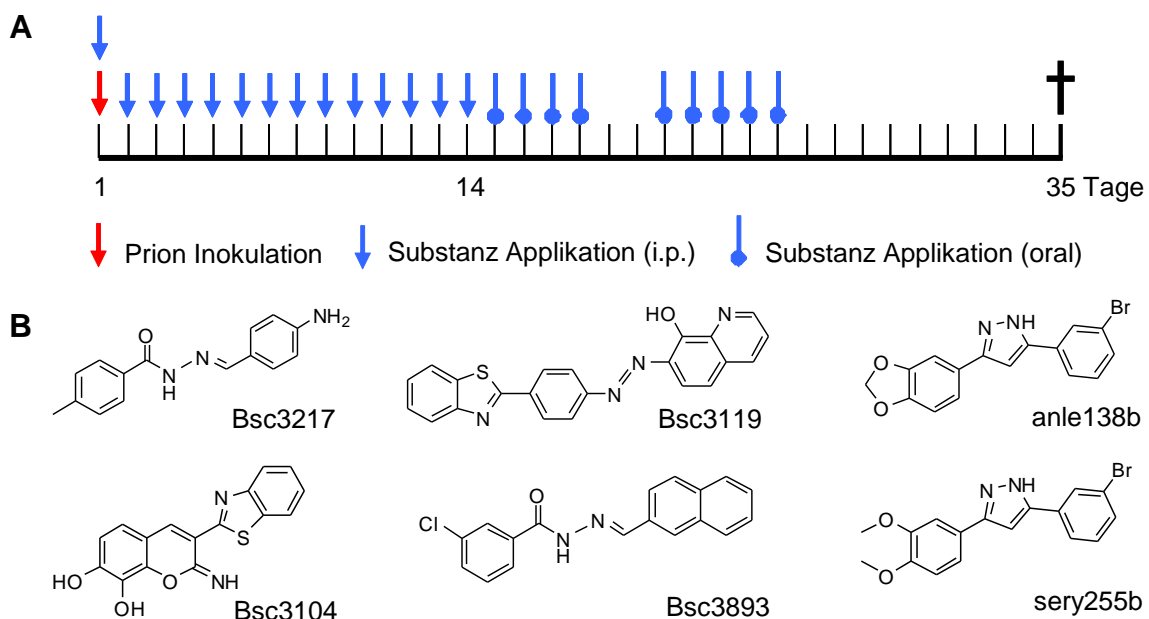


Abbildung 31: Behandlungsschema und verwendete Substanzen. (A) Die Mäuse wurden an Tag 1 intraperitoneal mit 100 μ L 1 %-igem Hirnhomogenat (RML-Scrapie) infiziert. Anschließend wurde die Tiere für 14 Tage einmal täglich mit 25 μ L 100 mM Substanz intraperitoneal und für weitere neun Tage mit 50 mg/kg Körpergewicht Substanz oral mittels Gavage therapiert. (B) Strukturformeln der Substanzen.

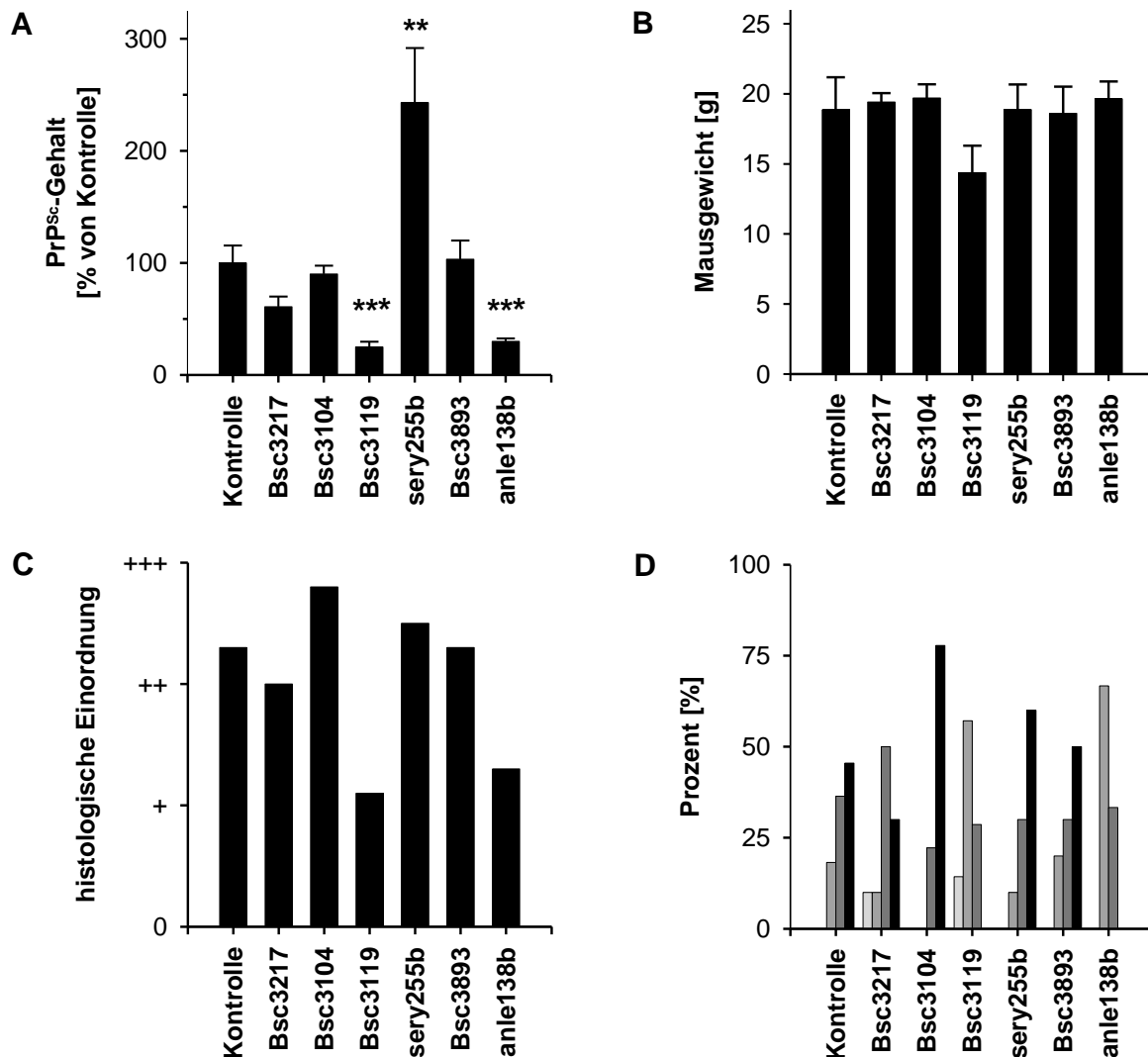


Abbildung 32: PrP^{Sc}-Gehalt und histologische Untersuchungen der Milzen von Mäusen am Tag 35 nach Inokulation. (A) Quantifizierung des PrP^{Sc}-Gehaltes in Milzen nach Dot-Blot Analyse. Die Behandlungsgruppen Bsc3104 und Bsc3893 zeigten keine Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe. Für Bsc3217 konnte der PrP^{Sc}-Gehalt reduziert werden. Die Gabe von sery255b führte zu einem höheren PrP^{Sc}-Gehalt in der Milz (**; $p < 0,01$ Students t-Test; $n = 8$ Tiere). Durch Behandlung mit den Substanzen Bsc3119 und anle138b konnte hingegen der PrP^{Sc}-Gehalt der Milz im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert werden (***; $p < 0,001$ Students t-Test; $n=8$ Tiere). (B) Mausegewicht nach der Behandlung. (C + D) Semi-Quantitative immunhistologische Analyse der Milzen nach PrP^{Sc}-Färbung. Nach Behandlung mit anle138b und Bsc3119 erhöht sich der Anteil von Milzen mit wenigen PrP^{Sc}-Ablagerungen (Stufe +), wohingegen keine Milz eine starke PrP^{Sc}-Färbung (Stufe +++) zeigt. (C) Durchschnittswert der Behandlungsgruppen. (D) Prozentuale Zusammensetzung der Gruppen nach ihrem PrP^{Sc}-Färbeverhalten.

Der Einfluss der Behandlung auf die periphere Akkumulation von PrP^{Sc} in der Milz zeigt sich in Abbildung 32. Die Behandlung der infizierten Mäuse mit den Substanzen nach dem gewählten Schema führte bei den Behandlungsgruppen Bsc3217, Bsc3119 und anle138b zu einer Reduktion des PrP^{Sc}-Gehaltes in der Milz im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 32A),

wohingegen die Behandlung mit Bsc3104 und Bsc3893 den PrP^{Sc}-Gehalt nicht verändern konnte. Durch die Applikation der Substanzen Bsc3119 und anle138b konnte die Akkumulation von PrP^{Sc} in der Milz signifikant reduziert werden. Für Bsc3119 betrug der PrP^{Sc}-Gehalt 25 % ($p < 0,001$; $n = 8$ Tiere) und bei anle138b 30 % der Kontrolle ($p < 0,001$; $n = 8$ Tiere) an Tag 35 nach Infektion. Die Substanz Bsc3217 führte zu einer Reduktion auf 60 % der Kontrolle, was ungefähr dem Wert aus dem Versuch (4.7.2) entspricht. Die Ergebnisse der biochemischen Analyse konnten mit den Immunoblots bestätigt werden (Abbildung 32C+D). In den Milzen der Gruppen Bsc3217, Bsc3119 und anle138b zeigt sich eine Tendenz zu einer schwächeren PrP^{Sc}-Färbung in den Behandlungsgruppen, was wiederum auf eine Verringerung des PrP^{Sc}-Gehaltes hindeutet und somit die Ergebnisse des Dot Blot Assays bestätigt.

Dieses Experiment konnte die Ergebnisse für Bsc3119 und Bsc3217 aus dem Versuch (4.7.2) reproduzieren, wobei das Ergebnis von Bsc3217 trotz höherer Dosis und verlängerter Behandlung nicht verbessert werden konnte. Da die Verlängerung des Therapiezeitraumes über eine Kombinationstherapie von intraperitonealem und oralem Applikationsweg erzielt wurde, könnte mangelnde orale Verfügbarkeit der Grund dafür sein. Die inhibitorische Wirkung von Bsc3119 konnte deutlich gegenüber dem vorherigen Versuch gesteigert werden. Der PrP^{Sc}-Gehalt in der Milz wurde von über 50 % der Kontrolle (Abbildung 29B) auf nur noch 25 % gesenkt (Abbildung 32A). Allerdings zeigte die Substanz Bsc3119 bei der verwendeten Konzentration toxische Nebenwirkungen, welche sich in Gewichtsverlust und histologischen Veränderungen der Leber äußerten (Abbildung 32B; Daten nicht abgebildet). Deshalb ist nicht ganz auszuschließen, dass die inhibitorische Wirkung von Bsc3119 auf diese Nebenwirkungen zurückzuführen ist, wobei keine histologischen Veränderungen in H&E gefärbten Gewebeschnitten der Milz sichtbar waren. Die Substanz Bsc3893, welche die Aggregation von PolyQ-verlängertem Huntingtin in Zebrafisch (Schiffer *et al.*, 2007) und in Zellkultur die PrP^{Sc}-Akkumulation inhibiert (Bertsch *et al.*, 2005), konnte in diesem *in vivo* Tiermodell keine Reduzierung des PrP^{Sc}-Gehaltes erzielen. Für die Substanz sery255b wurde ein Ansteigen der PrP^{Sc}-Menge beobachtet, obwohl in den Zellkulturmodellen gute Ergebnisse erzielt wurden (Daten nicht abgebildet). Weiterhin wird durch den reduzierten PrP^{Sc}-Gehalt in der Milz nach Behandlung mit anle138b deutlich, dass die Verlängerung der Inkubationszeit in dem Versuch (4.7.3) wahrscheinlich auf die Inhibition der Akkumulation von PrP^{Sc} im Gehirn zurückzuführen ist. Damit konnte bereits in zwei unabhängigen Tierexperimenten eine Antiprion Wirkung nach Behandlung mit anle138b beobachtet werden.

4.7.5. Therapie 2: Überlebenszeitversuch mit Substanz anle138b

Mit diesem Versuch sollte der Einfluss der Behandlung mit der potentiellen Antiprion-Substanz anle138b auf die PrP^{Sc}-Akkumulation und Prionpathologie im Gehirn zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Erkrankung genauer charakterisiert werden. Zusätzlich sollte die Hirngängigkeit von anle138b untersucht werden und ob demzufolge der therapeutische Effekt der Substanz in Versuch (4.7.3) auf einer Inhibition der PrP^{Sc}-Akkumulation im Gehirn beruht. In diesem Versuch wurden die Substanzen anle138b und anle186b, welche durch Substitution von Brom durch Fluor erzielt wurde und dadurch eine bessere Hirngängigkeit bekommen soll, eingesetzt (Abbildung 33). Außerdem sollte das Applikationsschema aus dem vorangegangenen Versuch auf diesen Inkubationszeitversuch übertragen werden, womit eine längere Behandlung der Tiere und möglicherweise eine deutlich verlängerte Überlebenszeit der infizierten Mäuse erreicht wird. Denn die nahezu exakte Übereinstimmung der Behandlungsdauer mit der Verlängerung der Überlebenszeit in dem Versuch (4.7.3) und dem sehr guten therapeutischen Effekt aus Versuch (4.7.4) deuten daraufhin, dass eine längere Behandlungsdauer mit einem besseren therapeutischen Erfolg korreliert.

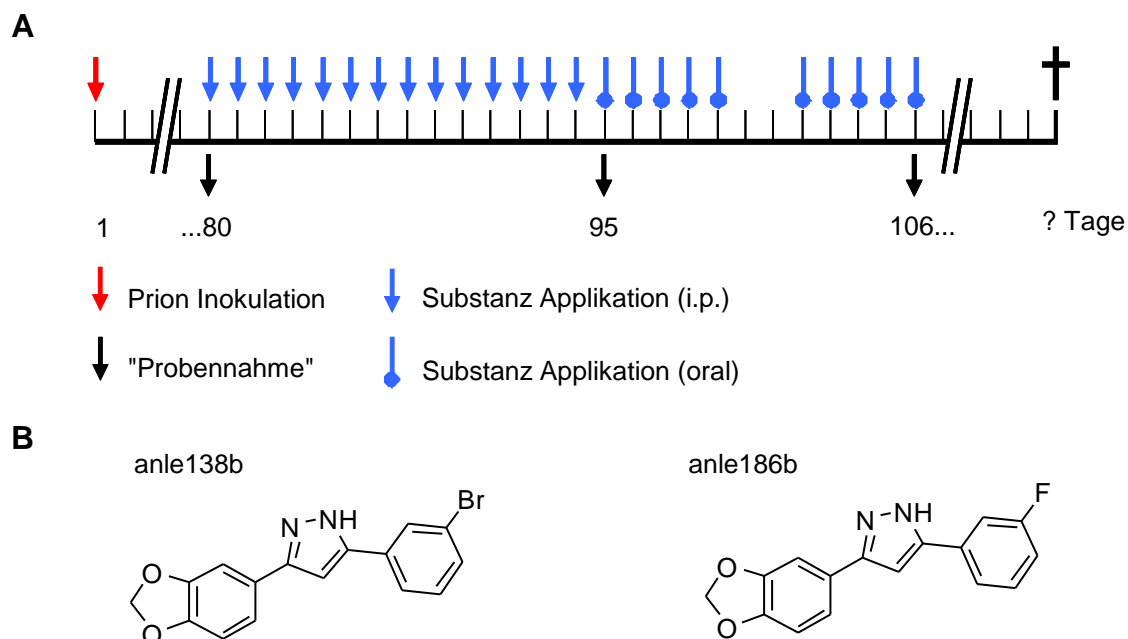


Abbildung 33: Versuchsüberblick Therapie 2. (A) Nach intrazerebraler Infektion mit RML-Scrapie wurden die Mäuse ab Tag 80 für 14 Tage einmal täglich mit 25 μ L 100 mM Substanz intraperitoneal und für zweimal 5 aufeinanderfolgende Tage mit 50 mg/kg Körpergewicht Substanz oral mittels Gavage therapiert. (B) Strukturformel von anle138b und anle186b, bei der Brom durch Fluor substituiert wurde.

Zusätzlich zu dem dargestellten Behandlungsschema wurden drei Mäuse mit DMSO bzw. zwei Tiere mit anle138b für 28 Tage über dieses Schema hinweg weiterbehandelt. Dazu

wurde DMSO oder anle138b (50 mg/kg) mit Erdnussbutter vermischt und verfüttert. Die Akkumulation von PrP^{Sc} im Gehirn von Prion-infizierten Mäusen während der Behandlung zeigt Abbildung 34A. Die Applikation von anle186b konnte die Akkumulation von PrP^{Sc} im Gehirn verglichen mit den DMSO-behandelten Kontrollen leicht hemmen. Hingegen zeigt sich bei Substanz anle138b, dass die weitere Akkumulation von PrP^{Sc} blockiert werden konnte. Der PrP^{Sc}-Gehalt bleibt an den betrachteten Zeitpunkten unverändert auf dem Niveau der unbehandelten Kontrollen an Tag 80. Ein Vergleich des PrP^{Sc}-Gehaltes zeigt einen signifikanten Unterschied zu den DMSO-behandelten Kontrollen ($p < 0,01$ Students t-Test; $n = 4$). Mit Blick auf die Messwerte, ohne Berücksichtigung der Messungenauigkeit, zeigt sich eine leichte Tendenz für eine Reduzierung des PrP^{Sc}-Gehaltes verglichen mit der unbehandelten Kontrolle an Tag 80 (100 %) auf 98 % an Tag 95 (14 Tage Behandlung) und 91 % an Tag 106 (24 Tage Behandlung) nach Behandlung (Abbildung 34B).

Als nächstes sollte die Frage untersucht werden, wie sich die verlangsamte Akkumulation von PrP^{Sc} im Gehirn der infizierten Tiere auf die Prionpathologie auswirkt. Dazu wurde die Anzahl apoptotischer Zellen in H&E-gefärbten Gewebeschnitten des Kleinhirns bestimmt (Giese *et al.*, 1995). Die Anzahl der apoptotischen Zellen ist in den Behandlungsgruppen niedriger als bei den Tieren der Kontrollgruppe an den betrachteten Zeitpunkten (Abbildung 34C). Für anle138b zeigte sich eine signifikante Reduktion der apoptotischen Zellen an Tag 106 verglichen mit der Kontrolle (Abbildung 34; $p < 0,05$ Students t-Test; $n = 4$). Durch die Behandlung konnte sowohl der PrP^{Sc}-Gehalt als auch die Zahl der Apoptosen im Gehirn der infizierten Mäuse positiv beeinflusst werden.

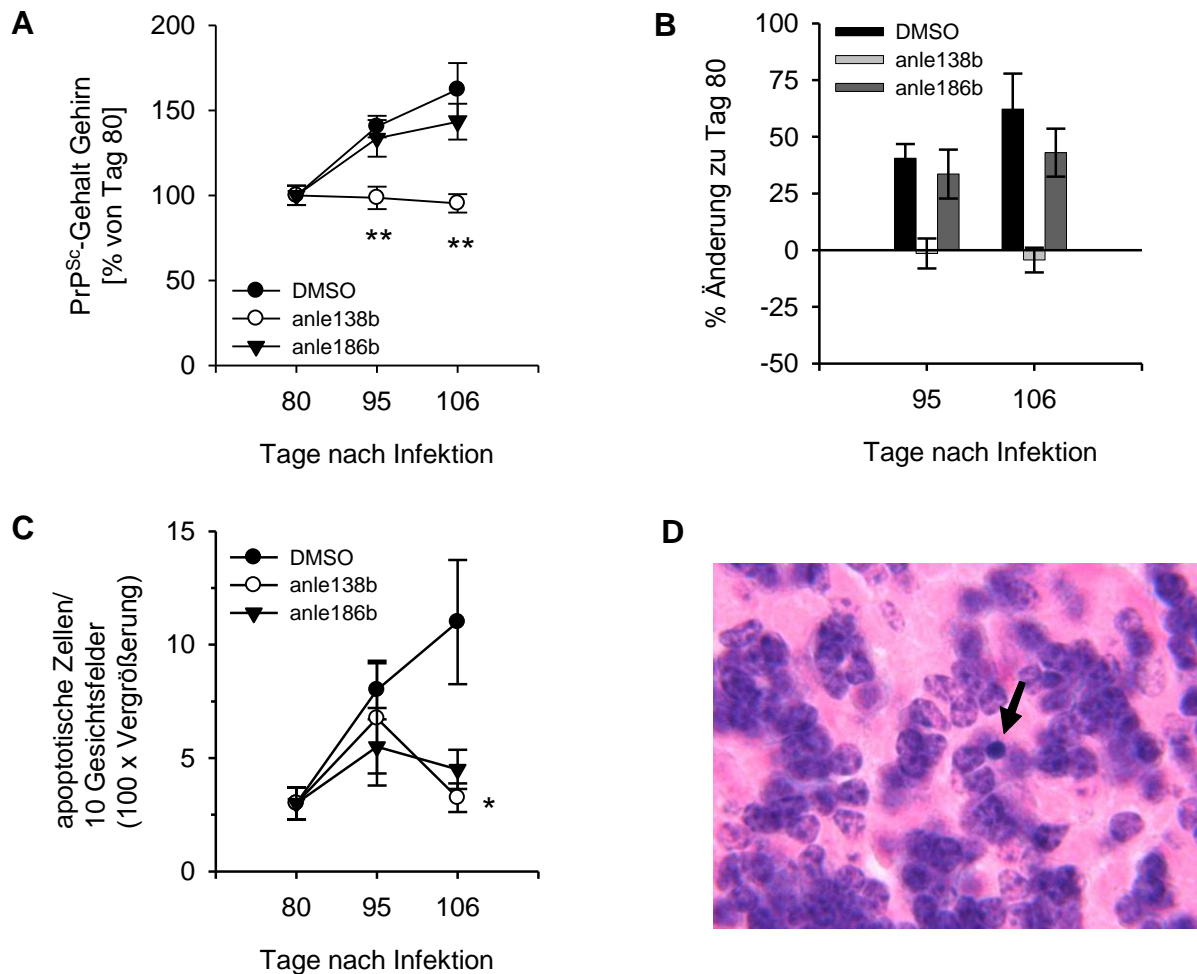


Abbildung 34: PrP^{Sc}-Gehalt und Pathologie im Gehirn von infizierten Mäusen nach Behandlung mit anle138b und anle186b. (A) Quantifizierung von PrP^{Sc} in den Hirnhomogenaten von Prion-infizierten Mäusen zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Behandlung mit anle186b führt zu einer leichten Reduktion des PrP^{Sc}-Gehaltes im Gehirn verglichen mit den DMSO-behandelten Mäusen. Die Applikation von anle138b kann die Akkumulation von PrP^{Sc} im Gehirn inhibieren. Der PrP^{Sc}-Gehalt verbleibt an den betrachteten Zeitpunkten auf dem gleichen Niveau wie an Tag 80 zu Beginn der Behandlung. Im Vergleich zu den DMSO-behandelten Kontrollen ist dies eine signifikante Änderung (**; $p < 0,01$ Students t-Test; $n = 4$ Tiere). (B) relative Änderung des PrP^{Sc}-Gehaltes im Gehirn während der Behandlung verglichen mit der unbehandelten Kontrolle an Tag 80. (C) Anzahl von apoptotischen Zellen (Pfeil in (D)) in H&E gefärbten Gehirnschnitten an den angezeigten Zeitpunkten. Die Behandlung mit anle138b führt zu einer signifikant geringeren Zahl apoptotischer Zellen (*; $p < 0,05$ Students t-Test; $n = 4$ Tiere). Auswertung nach (Giese *et al.*, 1995). Dargestellt ist die mittlere Anzahl an apoptotischen Zellen \pm Standardfehler (D) zeigt eine apoptotische Zelle (Pfeil) in einem H&E gefärbten Gehirnschnitt.

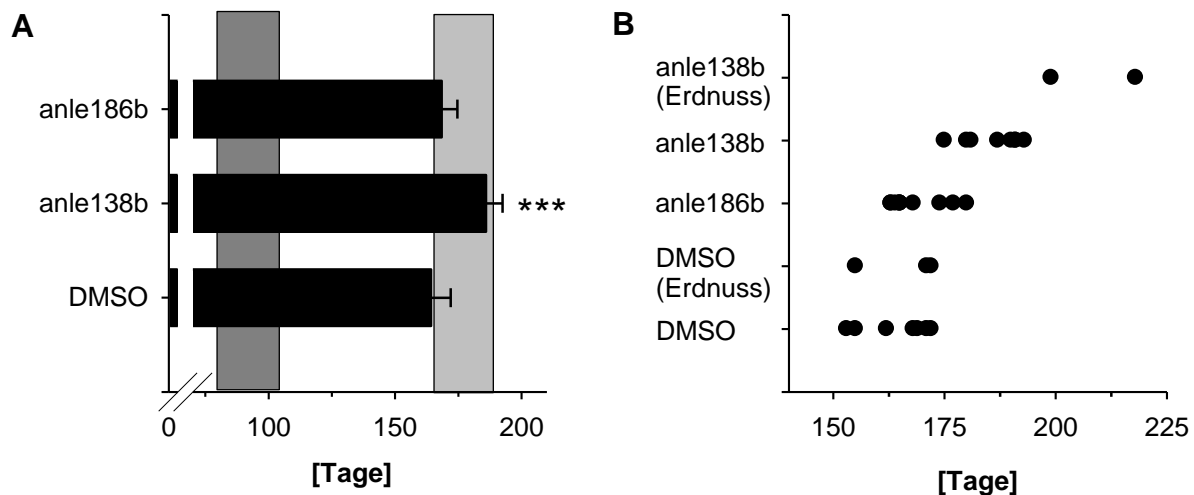


Abbildung 35: Einfluss von anle138b- und anle186b-Behandlung auf die Überlebenszeit von Prion-infizierten C57BL/6 Mäusen. Die Behandlung der Tiere mit den Substanzen begann an Tag 80 nach intrazerebraler Infektion mit RML-Scrapie für 24 Tage (dunkelgraue Säule). Durch die Behandlung nach dem in (Abbildung 33) vorgestellten Behandlungsschema konnte die Überlebenszeit von Scrapie-infizierten Mäusen mit beiden Substanzen verlängert werden. Durch die Therapie mit anle186b konnte die Überlebenszeit im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nur marginal um 4 Tage verlängert werden, wohingegen durch die Behandlung mit anle138b zu einer signifikanten Verlängerung von 22 Tagen gegenüber der Kontrollgruppe der Überlebenszeit führte (***) $p < 0,001$; $n = 8$ Tiere). **(B)** Todeszeitpunkten der einzelnen Mäuse.

Danach stand die Frage im Raum, wie die beobachteten Veränderungen mit der Überlebenszeit der infizierten Mäuse korrelieren. Die Überlebenszeit der anle186b-behandelten Tiere konnte marginal um 4 Tage verlängert werden, wohingegen die Überlebenszeit der anle138b-behandelten Tiere um 22 Tage ($p < 0,001$ Students t-Test; $n = 8$) gegenüber der Kontrolle ausgedehnt werden konnte. Die Fortführung der Behandlung über 28 Tage mittels Erdnussbutter konnte die Überlebenszeit der Tiere nochmals verlängern. Die anle138b-behandelten Tiere lebten 42 Tage länger als die entsprechenden Kontrolltiere (Abbildung 35B).

Diese Studie konnte zeigen, dass die Akkumulation von PrP^{Sc} im Gehirn durch die Behandlung mit den Substanzen, insbesondere anle138b, beeinflusst werden konnte. Die Applikation von anle138b über i.p.-Injektion und oraler Gavage konnte die Akkumulation von PrP^{Sc}, während der Behandlung, komplett inhibieren. Das Ergebnis der biochemischen Untersuchung wird, sowohl durch die histologische Auswertung der Anzahl der apoptotischen Zellen in Gewebeschnitten des Gehirns, als auch durch die Verlängerung der Überlebenszeit von den behandelten Mäusen bestätigt. Die erzielte Verlängerung der Überlebenszeit stimmt wiederum ungefähr mit dem Behandlungszeitraum überein, was daraufhin deutet, dass durch die Behandlung das Fortschreiten der Prionpathologie gestoppt werden konnte.

4.7.6. *In vivo* Struktur-Wirkungs-Analyse

Nachdem die *in vivo* Antiprion-Wirkung der Substanz anle138b in drei unabhängigen Tierexperimenten (4.7.3; 4.7.4; 4.7.5) mit jeweils signifikanten Ergebnissen gezeigt wurde, stand die Weiterentwicklung dieser Leitstruktur im Vordergrund der nächsten Untersuchungen. Durch das erneute Screening von strukturell ähnlichen Verbindungen sollte eine Substanz mit höherer Antiprion-Wirkung als anle138b identifiziert werden. Außerdem sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Substanzen nach ausschließlich oraler Behandlung bioverfügbar sind und in einer ausreichenden Konzentration vorliegen, um die Akkumulation von PrP^{Sc} zu hemmen. Eine lebenslange Behandlung der Tiere ist mit vertretbarem Aufwand nur über den oralen Applikationsweg durchführbar.

In diesem Versuch wurde hauptsächlich der Einfluss der Halogene am 5'-Phenylring der Substanzen auf die Antiprion-Wirkung untersucht, da mit dem Therapieversuch (4.7.5) die Bedeutung des Halogens an dieser Position für die Antiprion-Wirkung gezeigt wurde. Zusätzlich zu diesen Variationen wurde der Brom-substituierte Phenylring durch Bausteine mit OH-Gruppen ausgetauscht. Eine weitere Änderung wurde an der Kerngruppe durchgeführt. Der Pyrazol-Ring der Substanz anle138b wurde durch einen Pyroxazol-Ring ersetzt. Die Substanzen wurden ausschließlich über den oralen Applikationsweg durch das Untermischen in Erdnussbutter verabreicht. Der Versuch wurde wie in Abbildung 36A dargestellt durchgeführt. Die Strukturen der verwendeten Substanzen sind in Abbildung 36B gezeigt.

Abbildung 36C zeigt den Effekt der Behandlung auf die Akkumulation von PrP^{Sc} in der Milz. Die Behandlung von Scrapie-infizierten Mäusen mit den Substanzen sery313b, sery335b, sery338b und anle138b für 34 Tage führte zu einer geringeren Akkumulation von PrP^{Sc} als bei den Kontrolltieren. Durch die Applikation der Substanzen anle138 und sery335b konnte der PrP^{Sc}-Gehalt signifikant reduziert werden. Für anle138b betrug der PrP^{Sc}-Gehalt 44 % der Kontrolle an Tag 35 nach Infektion ($p < 0,01$). Substanz sery335b verringerte den PrP^{Sc}-Gehalt auf 54 % der Kontrolle ($p < 0,05$). Die Behandlung mit den Substanzen sery313b und sery338b führte zu einer Reduktion der PrP^{Sc}-Akkumulation auf 64 bzw. 65 %. Damit konnten weitere wirksame Verbindungen aus der DPP-Substanzklasse identifiziert werden.

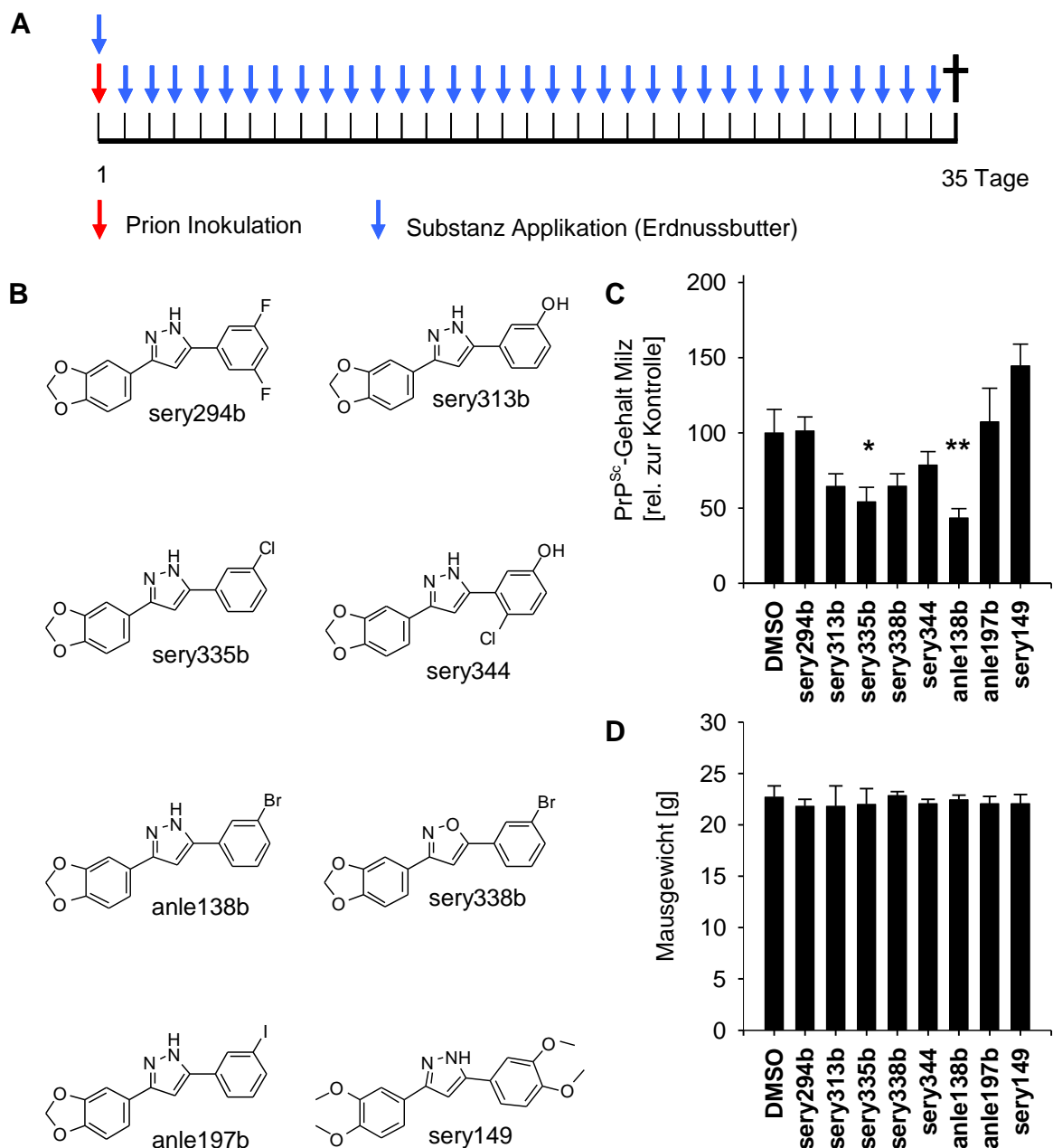


Abbildung 36: Versuchsüberblick Struktur-Analyse und Einfluss der Therapie auf PrP^{Sc}-Gehalt und Mausgewicht. (A) Die Mäuse wurden an Tag 1 intraperitoneal mit RML-Scrapie infiziert. Danach wurden die Tiere für 34 Tage einmal täglich mit 50 mg/kg Körpergewicht Substanz oral über Erdnussbutter behandelt. (B) Strukturformeln neuer potentieller Antiprion-Substanzen. (C) Quantifizierung des PrP^{Sc}-Gehaltes nach Therapie in Milzen nach Dot-Blot Analyse. Neben anle138b konnten die Substanzen sery313b, sery335b und sery338b konnten den PrP^{Sc}-Gehalt reduzieren. Die Applikation von sery149 führte zu einem höheren PrP^{Sc}-Gehalt in der Milz (*; $p < 0,05$ Students t-Test; **, $p < 0,01$ Students t-Test; $n=4$ Tiere). Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. (D) Das Mausgewicht zeigt keine toxischen Nebeneffekte nach Behandlung mit den Substanzen.

Im Rahmen dieses Tierexperimentes konnte aus der Reihe der Halogene Chlor als aktiver Substituent entdeckt werden. Außerdem könnte Chlor als Substituent anstelle von Brom aus pharmakologischer Sicht einige Vorteile mitbringen, weshalb sery335b als eine interessante

Substanz für weitergehende Versuche anzusehen ist. Die Substitution von Brom durch Fluor konnte in diesem Experiment nicht die Akkumulation von PrP^{Sc} hemmen, obwohl im SIFT Antiprion-Assay die Aktivität von Substanzen mit zwei Fluor-Atomen höher war als bei Molekülen mit einem Brom-Atom (Abbildung 18). Auch zeigte die Substanz anle197b mit dem Halogen Jod keinen Effekt auf die PrP^{Sc}-Akkumulation in der Milz. Desweiteren konnte mit Substanz sery313b eine Verbindung aus der DPP-Substanzklasse mit einer OH-Gruppe als aktiver Wirkstoff bestimmt werden, wobei die Verbindung nur eine OH-Gruppe an einem Phenylring trägt. Anhand des Vergleiches der Substanzen anle138b und sery338b zeigt sich, dass nicht nur die Substitutionen an den beiden Phenylringen die Wirkung der Substanzen beeinflussen, sondern auch die Kerngruppe eine Rolle bei der Wirkung spielt. Substanz anle138b mit dem Pyrazol-Ring kann die Akkumulation von PrP^{Sc} stärker hemmen als Substanz sery338b mit einem Pyroxazol-Ring. Auch in den Zellkulturversuchen hatten die Substanzen mit einem Pyrazol-Ring als Kerngruppe eine größere Wirkung (4.4.4).

Weiter konnte gezeigt werden, dass anle138b nach ausschließlich oraler Gabe über Fütterung mit Erdnussbutter bioverfügbar ist und die periphere Prionreplikation signifikant reduziert. Schließlich konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass eine lebenslange Therapie über den oralen Applikationsweg möglich ist.

Weiter sollten mit diesem Versuch die strukturellen Voraussetzungen charakterisiert werden, die zur Wirkung von Antiprion-Substanzen notwendig sind. Dazu wurden erneut Derivate auf Grundlage der Struktur von Substanz anle138b synthetisiert. Im Gegensatz zum vorhergehenden Experiment wurde diesmal die PrP^{Sc}-Akkumulation im Gehirn der Tiere untersucht, um gleichzeitig die Blut-Hirn-Schranken Gängigkeit der Substanzen zu analysieren. Außerdem wurde ein Dosis-Wirkungs-Experiment mit anle138b durchgeführt, um die Dosis für die halb-maximale Wirkung zu bestimmen. Die Substanzen wurden wieder über den oralen Applikationsweg durch das Untermischen in Erdnussbutter verabreicht. Das Screening der neuen Substanzen wurde bei einer Konzentration von 50 mg/kg Mausgewicht durchgeführt und für die Dosis-Wirkungs-Kurve von anle138b wurde die Wirkung anhand von vier unterschiedlichen Tagesdosen (0,04 mg, 0,2 mg, 1 mg und 5 mg) untersucht. Die Strukturen der verwendeten Substanzen sind in Abbildung 37 dargestellt.

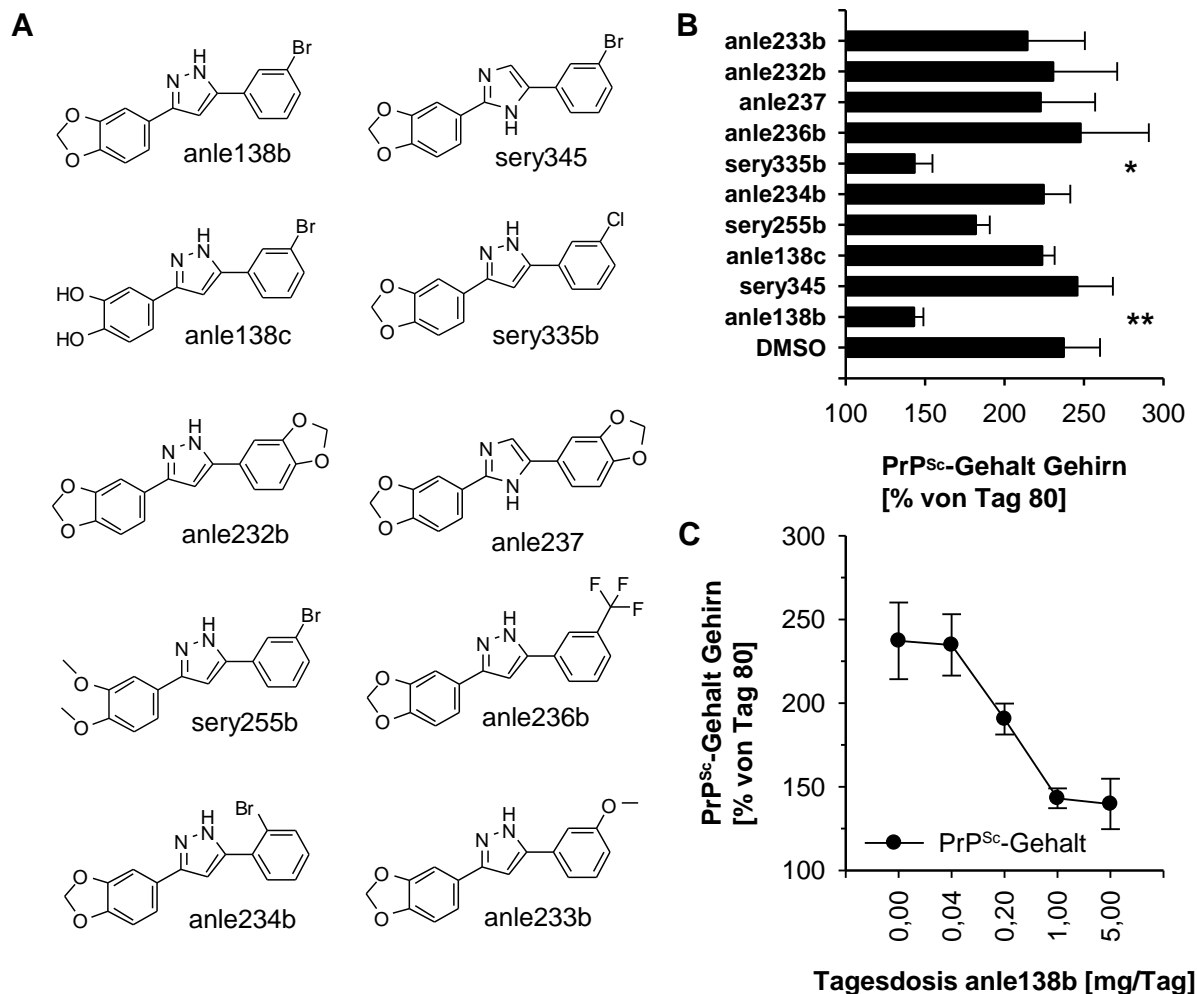


Abbildung 37: Strukturen der verwendeten Substanzen und PrP^{Sc}-Gehalt im Gehirn von infizierten Mäusen nach Behandlung mit Antiprion-Substanzen. (A) Strukturformeln der untersuchten Substanzen. **(B)** Quantifizierung des PrP^{Sc}-Gehaltes nach Behandlung mit potentiellen Antiprion-Substanzen. Neben anle138b konnten noch die Substanzen sery255b und sery335b den PrP^{Sc}-Gehalt reduzieren (*; $p < 0,05$ Students t-Test; **, $p < 0,01$ Students t-Test; $n=4$ Tiere). **(C)** Dosis-Wirkungs-Kurve von anle138b. Die halb-maximale Wirkstoffkonzentration von anle138b liegt bei 0,2 mg Substanz pro Tag. In beiden Graphen ist der Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

Die Behandlung von Scrapie-infizierten Mäusen mit den Substanzen sery255b, sery335b und anle138b führte zu einer geringeren Akkumulation von PrP^{Sc} im Gehirn als bei den Kontrolltieren (Abbildung 37B). Die Applikation der Substanzen anle138 und sery335b konnte die Akkumulation von PrP^{Sc} signifikant reduzieren (Abbildung 37B). Für anle138b bzw. sery335b konnte der Anstieg des PrP^{Sc}-Gehaltes auf 143,0 % ($p < 0,01$) und 143,4 % ($p < 0,05$) des PrP^{Sc}-Gehaltes zu Beginn der Behandlung an Tag 80 begrenzt werden, wohingegen im gleichen Zeitraum der PrP^{Sc}-Gehalt der DMSO-behandelten Kontrolle auf

237,7 % anstieg. Die Behandlung mit Substanz sery255b führte zu einer Reduktion der PrP^{Sc}-Akkumulation auf 181,9 %.

Damit konnte eine weitere wirksame Verbindungen aus der DPP-Substanzklasse identifiziert werden. Weiter konnte die Wirkung von sery335b aus dem vorhergehenden Experiment bestätigt und die Wirkung auf die Akkumulation von PrP^{Sc} im Gehirn ausgeweitet werden. Interessanterweise zeigte die Substanz sery255b genau den gegenteiligen Effekt auf die Akkumulation von PrP^{Sc} im Gehirn wie bei der peripheren Akkumulation in der Milz. Außerdem wurde die Bedeutung der Kerngruppe für die Wirkung auf die PrP^{Sc}-Akkumulation bestätigt. Die Substitution der Kerngruppe durch einen Imidazol-Ring bei Substanz sery345 hebt die Antiprion-Wirkung der Substanz auf, trotz gleicher Substituenten an den beiden Aromaten wie bei anle138b. Die Antiprion-Wirkung wurde ebenfalls aufgehoben, nachdem das Brom-Halogen nicht an *para*-Position (anle138b), sondern an *ortho*-Position substituiert wurde (anle234b). Ebenfalls konnte keine Antiprion-Wirkung erzielt werden, wenn beide Phenyl-Ringe durch Methylendioxyphenyle substituiert wurden (anle232b und anle237).

Anhand der Dosis-Wirkungs-Kurve konnte die halb-maximale Wirkung von anle138b bestimmt werden. Bei einer Tagesdosis von 0,2 mg Substanz nach oraler Gabe über Erdnussbutter wurde die halb-maximale Wirkung erreicht (Abbildung 37C). Wird die Tagesdosis auf 5 mg erhöht, kann die Wirkung gegenüber 1 mg nicht signifikant vergrößert werden.

4.7.7. Pharmakokinetik von Substanz anle138b

Das Ziel dieses Versuches war die Untersuchung der Pharmakokinetik von anle138b bei verschiedenen Applikationsformen und deren Einfluss auf den PrP^C-Gehalt. Durch die Bestimmung des PrP^C-Gehalts nach Behandlung mit anle138b sollte die Frage geklärt werden, ob die Antiprion-Wirkung von anle138b auf eine Verringerung der Menge des zellulären PrP^C zurückgeht. Denn eine Senkung des PrP^C-Gehalts kann zu einer Reduktion von PrP^{Sc} führen (Rambold *et al.*, 2008).

Dazu wurden C57BL/6-Mäuse über den intraperitonealen oder oralen Applikationsweg, in dem die Substanz über eine Schlundsonde (DMSO/Speiseöl-Gemisch) oder über Erdnussbutter verabreicht wurde, eine definierte Substanzmenge appliziert. Nach Applikation der Substanz wurden jeweils zwei Tiere aus einer Gruppe nach 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h getötet und die Substanzkonzentration im Gehirn und Serum bestimmt.

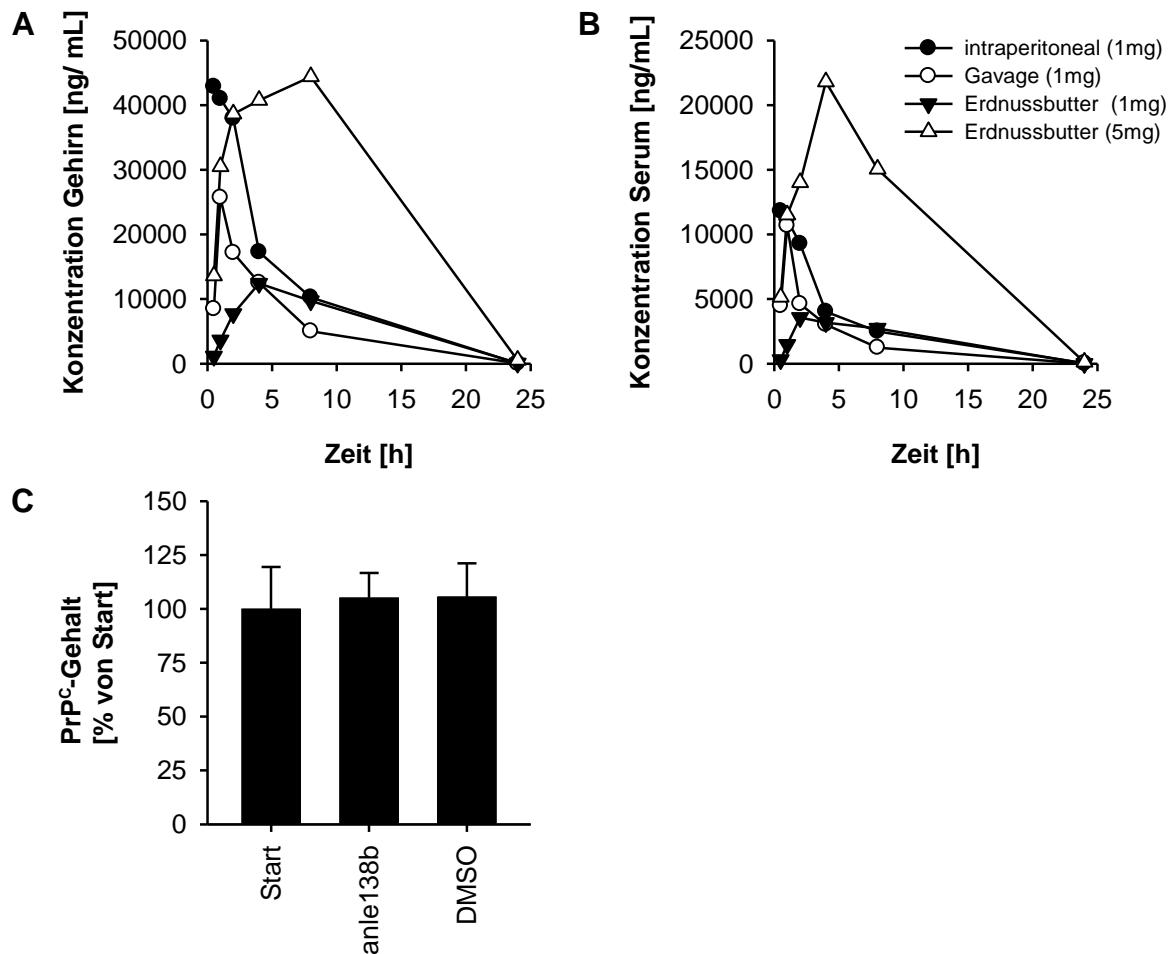


Abbildung 38: Pharmakokinetik von anle138b und Einfluss der Behandlung auf PrP^C-Gehalt. (A+B) Substanzkonzentration von anle138b zu den angegebenen Zeitpunkten. (A) Substanzkonzentration im Gehirn und (B) im Serum. (C) Der PrP^C-Gehalt im Gehirn ist nach Behandlung mit 1 mg anle138b in Erdnussbutter für 1 Woche auf dem gleichen Niveau wie in den DMSO-behandelten Kontrolltieren.

Die Pharmakokinetik (Abbildung 38A+B) zeigt, dass nach intraperitonealer Applikation (1 mg Substanz) und oraler Gabe (1 mg Substanz) über eine Schlundsonde nach spätestens einer Stunde ein hoher Substanzspiegel in Gehirn und Serum erreicht wird. Nach Applikation der Substanz über Erdnussbutter (1 mg oder 5 mg) wurde der höchste Substanzpegel erst zwischen 4 und 8 Stunden erreicht. Dagegen konnte der Substanzspiegel über einen längeren Zeitraum stabilisiert werden, da die Aufnahme der Substanz durch die Erdnussbutter verzögert wurde. Anhand des Kurvenverlaufs bei intraperitonealer Applikation lässt sich für Substanz anle138b eine Halbwertszeit von ungefähr 4 Stunden bestimmen. Nach 24 Stunden sind keine relevanten Rückstände von Substanz anle138b im Gehirn oder Serum nachweisbar, sodass nach Abbruch der Behandlung keine unerwünschten Rückstände der Substanz zu befürchten sind. Weiterhin können bei intraperitonealer Applikation ca. 2,5 % der eingesetzten Substanzmenge im Gehirn wiedergefunden werden, was ungefähr dem

Verhältnis von Gehirn (0,5 g) zu Körpergewicht (20 g) entspricht. Somit kann die Substanz ohne Einschränkung die Blut-Hirn-Schranke passieren und ihren Wirkort erreichen. Die erreichte Substanzkonzentration im Gehirn von anle138b liegt nach intraperitonealer Applikation bei etwas über 100 μM Substanz.

In (Abbildung 38C) zeigt sich, dass der PrP^C-Gehalt nach einer Woche Behandlung mit 1 mg Substanz anle138b über Erdnussbutter gegenüber den Kontrolltieren unverändert bleibt, weshalb die beobachtete Antiprion-Wirkung von anle138b nicht auf einer Reduktion des PrP^C-Gehalts in den therapierten Tieren beruht, sondern in der wirkungsvollen Inhibition der Aggregation.

4.7.8. Therapie 3: Lebenslange orale Therapie mit Substanz anle138b

Nachdem in den Experimenten (4.7.3; 4.7.5) gezeigt wurde, dass die zeitlich begrenzte Behandlung von Scrapie-infizierten Mäusen mit anle138b zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit in der Größenordnung des Behandlungszeitraumes führt, sollten die Tiere in diesem Versuch einer lebenslangen Therapie unterzogen werden. Dass dies grundsätzlich möglich ist, konnte mit den Versuchen zur Struktur-Wirkungs-Analyse (4.7.6) hinreichend belegt werden. Der Versuch Therapie 3 setzt sich aus zwei Teilversuchen zusammen. Im ersten Teilversuch wurden C57BL/6-Mäuse ab Tag 80 nach Infektion behandelt, da zu diesem Zeitpunkt PrP^{Sc} im Gehirn detektierbar ist und erste Apoptosen, als früheste Zeichen der Prionpathogenese, sichtbar werden (4.7.5). Im zweiten Teilversuch wurde als Startpunkt der Behandlung Tag 120 ausgewählt, weil sich um diesen Zeitpunkt herum die ersten klinischen Zeichen der Prionerkrankung entwickeln. Dieser Behandlungszeitpunkt im Experiment entspricht dem frühestmöglichen Zeitpunkt einer Diagnostik bei CJD-Patienten und einer sich anschließenden Therapie.

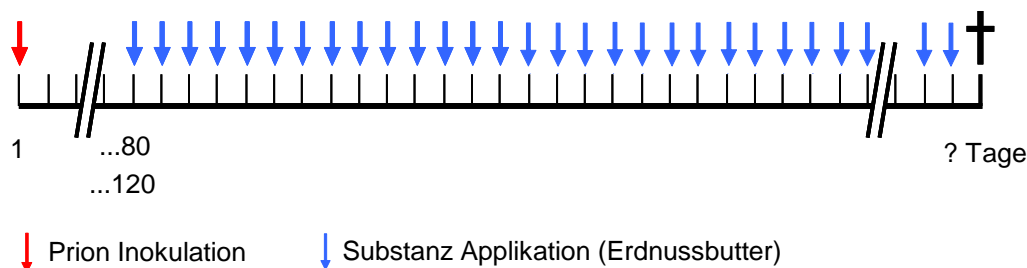


Abbildung 39: Behandlungsschema Therapie 3. Nach intrazerebraler Infektion wurden C57BL/6-Mäuse ab 80 bzw. 120 Tagen nach Prion Inokulation einmal täglich mit 5 mg/ Maus anle138b bis zur terminalen Erkrankung über Erdnussbutter therapiert. Zu den Zeitpunkten 80 und 120 Tage nach Infektion wurden jeweils 4 Tiere aus jeder Gruppe für biochemische und histologische Untersuchungen getötet.

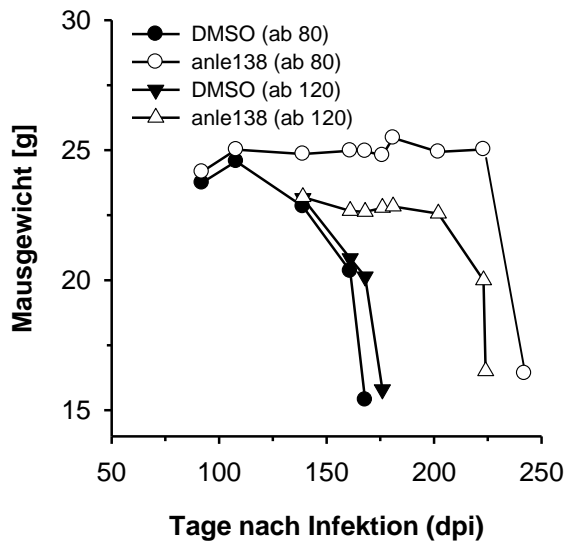


Abbildung 40: Gewichtsentwicklung unter Einfluss der Prionpathogenese und Therapie. Der eintretende Gewichtsverlust im Verlaufe der Prionpathogenese konnte durch die Therapie mit anle138b (offene Symbole) gegenüber den Kontrolltieren (geschlossene Symbole) über einen längeren Zeitraum stabilisiert werden.

Das Gewicht der Mäuse wurde während des Experimentes regelmäßig kontrolliert, um den Einfluss der Behandlung und der Prionerkrankung aufzuzeigen. Mit der auftretenden Gewichtsabnahme ab Tag 139 nach Infektion zeigt sich das erste klinische Symptom in den ab Tag 80 DMSO-behandelten Tieren und in den bis Tag 120 unbehandelten Tieren, wohingegen die ab Tag 80 mit anle138b therapierten Mäuse keinen Gewichtsverlust zeigen (Abbildung 40). Durch die Behandlung der Tiere ab Tag 120 nach Infektion kann das Gewicht der Tiere und damit das Fortschreiten der Erkrankung über einen größeren Zeitraum stabilisiert werden (Abbildung 40; offene Dreiecke). Somit konnte anhand des Mausgewichts als messbaren objektiven Marker für die klinische Symptomatik gezeigt werden, dass anle138b nicht nur einen Einfluss auf die Akkumulation von PrP^{Sc} besitzt, sondern sehr wohl den Verlauf der Prionerkrankung positiv verändern kann.

Der Verlauf der PrP^{Sc}-Akkumulation im Gehirn von Prion-infizierten Mäusen ist in (Abbildung 41A+B) dargestellt. Die Applikation von anle138b kann die Akkumulation von PrP^{Sc} stark verlangsamen, was sowohl durch immunhistologische Untersuchungen als auch biochemischer Quantifizierung gezeigt wurde. Selbst ab Tag 120, an dem in allen Gehirnregionen PrP^{Sc} detektierbar ist, kann durch die Gabe von anle138b die Akkumulation verlangsamt werden (Abbildung 41B; offene Dreiecke). Der PrP^{Sc}-Gehalt in den DMSO-behandelten Kontrolltieren stieg innerhalb des betrachteten Zeitraumes bis zur terminalen Erkrankung auf über 420 % von Tag 80 an.

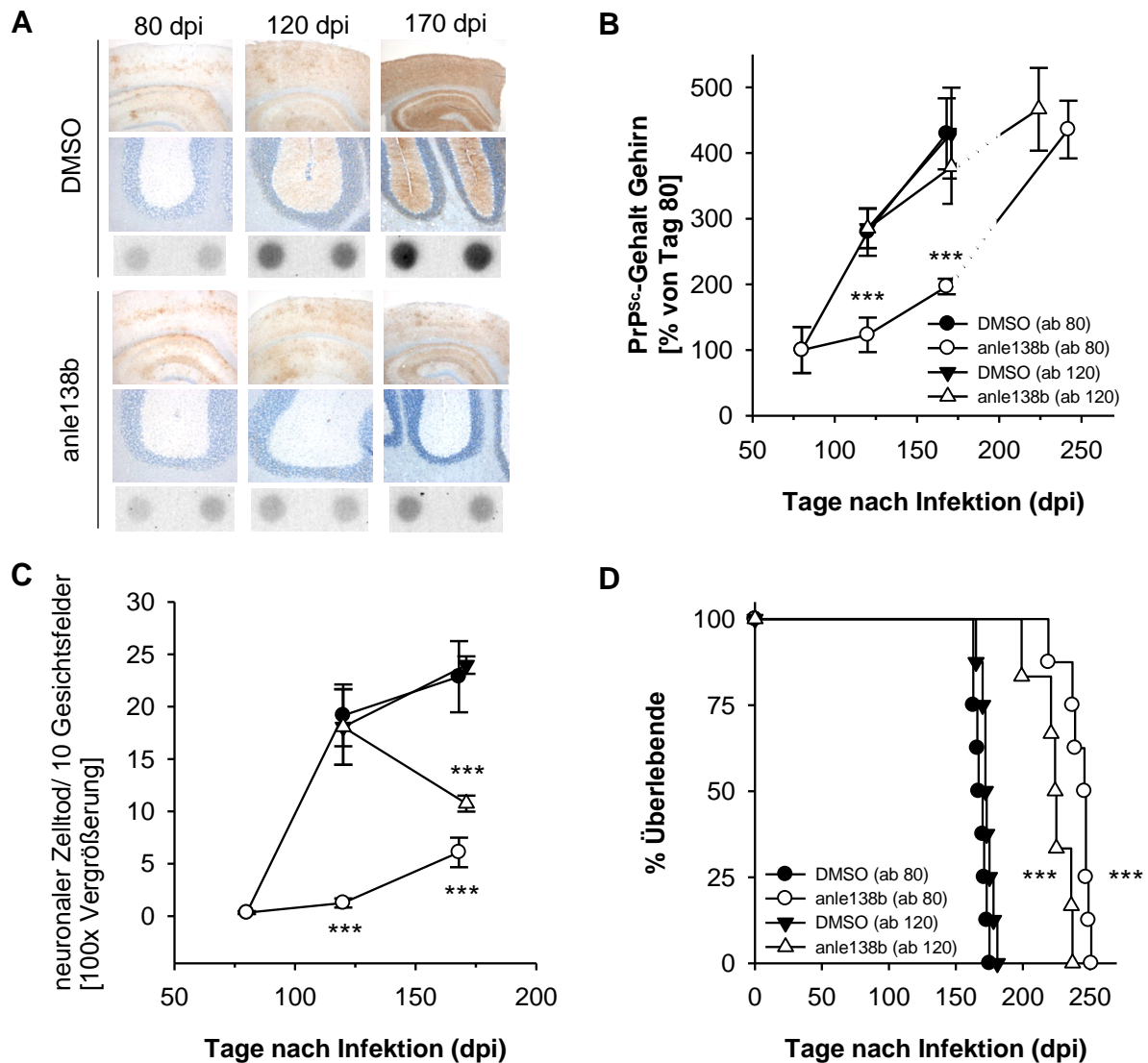


Abbildung 41: Einfluss der durchgängigen anle138b-Behandlung auf PrP^{Sc}-Gehalt im Gehirn und Prionpathologie von infizierten Mäusen. (A) PrP^{Sc}-Immunhistochemie von Gehirngewebeschnitten zeigt die verminderte PrP^{Sc}-Akkumulation bei anle138b-Behandlung. Diese Beobachtung wird biochemisch durch die Dot Blot Analyse bestätigt (je dunkler das Signal, desto höher die PrP^{Sc}-Menge). (B) PrP^{Sc}-Quantifizierung mit Dot Blot Analyse von Hirnhomogenaten Scrapie-infizierter Mäusen. Die Behandlung ab Tag 80 nach Infektion mit anle138b führt zu einer signifikanten Verlangsamung der PrP^{Sc}-Akkumulation im Gehirn (***; $p < 0,001$; Students t-Test; $n = 4$ Tiere). Der PrP^{Sc}-Gehalt zum terminalen Zeitpunkt wird durch die Therapie nicht beeinflusst. Die gestrichelte Linie zeigt den Zeitraum, in dem die Substanzmenge kurzfristig auf 50 mg/kg reduziert wurde. (C) Die Häufigkeit neuronalen Zelltodes im Kleinhirn ist in den jeweiligen Behandlungsgruppen verglichen mit den entsprechenden Kontrolltieren signifikant reduziert (***; $p < 0,001$; Students t-Test; $n = 4$ Tiere). (D) Die durchgängige tägliche Behandlung mit anle138b führte zur signifikanten Überlebenszeitverlängerung. Die Verlängerung betrug 73 Tage für die Behandlungsgruppe ab Tag 80 und 51 Tage für die Gruppe mit Behandlung ab Tag 120 nach Infektion ($p < 0,001$; Students t-Test; $n = 8$ Tiere).

Durch die Behandlung ab Tag 120 nach Infektion konnte der Anstieg der PrP^{Sc}-Menge bis zum Vergleichszeitpunkt auf 379 % verringert werden. Wenn die Behandlung der Tiere an

Tag 80 begann, stieg die PrP^{Sc}-Menge nur auf 197 % von Tag 80 an. Ein Vergleich des PrP^{Sc}-Gehaltes der DMSO-behandelten Kontrollen zum terminalen Zeitpunkt mit den ab Tag 80 anle138b-behandelten Tieren zeigt, dass die Akkumulation von PrP^{Sc} im Gehirn zum entsprechenden Vergleichszeitpunkt signifikant verlangsamt wurde ($p < 0,001$; $n = 4$). Der PrP^{Sc}-Gehalt im Gehirn zum terminalen Endzeitpunkt der anle138b-behandelten Tiere ist identisch mit der Menge in den Kontrolltieren.

Als nächstes sollte die Frage untersucht werden, wie sich die Behandlung der infizierten Tiere mit anle138b auf die Prionpathologie auswirkt. Dazu wurde die Häufigkeit neuronalen Zelltodes in H&E-gefärbten Gewebeschnitten des Kleinhirns bestimmt. Das Auftreten neuronalen Zelltodes ist in den Behandlungsgruppen niedriger als bei den Tieren der Kontrollgruppe zu vergleichbaren Zeitpunkten (Abbildung 41C). Die Zahl des neuronalen Zelltodes steigt in den DMSO-behandelten Kontrolltieren auf 19 Zellen in 10 betrachteten Gesichtsfelder an Tag 120 nach Infektion an. Bis zum terminalen Zeitpunkt der Erkrankung steigt die Zahl leicht auf 23 Zellen an. Im Gegensatz zu den Kontrollen steigt die Anzahl der apoptotischen Zellen in der Behandlungsgruppe, die ab Tag 80 therapiert wurde, nur auf 6 Zellen an dem vergleichbaren Zeitpunkt (Tag 168 nach Infektion) an. Bei der zweiten Behandlungsgruppe (ab Tag 120 nach Infektion) wurden durchschnittlich 11 Zellen an Tag 172 nach Infektion nachgewiesen. Anhand dieser Behandlungsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Zahl des neuronalen Zelltodes nach Behandlung mit anle138b auf ein niedrigeres Niveau als zu Beginn der Behandlung abfällt. Der Fortschritt der Prionpathologie, gemessen am neuronalen Zelltod, konnte durch die Therapie signifikant verlangsamt werden (Tag 80: $p < 0,001$ bei 120 dpi bzw. $p < 0,01$ bei 186 dpi; Tag 120: $p < 0,001$; je Gruppe $n = 4$). Dass die Prionpathologie tatsächlich verlangsamt werden konnte, zeigt sich schließlich an der Überlebenszeit der behandelten Mäuse. Die Überlebenszeit der infizierten Mäuse nach Therapie mit anle138b ist in (Abbildung 41D) dargestellt. Die Überlebenszeit der anle138b-behandelten Tiere ab Tag 120 nach Infektion konnte im Vergleich zur korrespondierenden Kontrolle um 51,2 Tage verlängert werden (Kontrolle: 172,5 Tage; anle138b: 223,7 Tage). Wurde die Behandlung der Tiere zu dem früheren Zeitpunkt begonnen, konnte die Überlebenszeit um 73,6 Tage verlängert werden (jeweils $p < 0,001$; $n = 8$ Tiere).

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass durch die lebenslange Therapie der Scrapie-infizierten Mäuse mit Substanz anle138b der Zeitraum vom Beginn der Behandlung bis zum Tod verdoppelt wird.

4.7.9. Zusammenfassung *in vivo* Therapie-Versuche

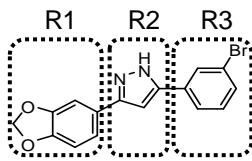
In Tabelle 8 sind die Ergebnisse einiger DPP-Substanzen aus den Prion-Tiermodellen zusammenfassend dargestellt, anhand derer entscheidende Strukturelemente für die Antiprion-Wirkung entdeckt werden konnten.

Die Verwendung von verschiedenen Substituenten am 3'-Phenylring (R1) der Leitstruktur zeigte, dass der Methyendioxyphenyl-Ring von anle138b die größte inhibitorische Wirkung (65 %) nach oraler Administration auf die PrP^{Sc}-Akkumulation in den Tiermodellen besitzt. Die Verwendung von 2 MeO- bzw. 2 OH-Gruppen reduzierte die Wirkung.

Im Vergleich verschiedener Kerngruppen (R2) zeigte der Pyrazol-Ring von Substanz anle138b eine größere Antiprion-Wirkung (69 %) als der Pyroxazol-Ring von sery338b (19 %) oder der Imidazol-Ring der Substanz sery345 (<5 %). Die Derivatisierung von anle138b am 5'-Phenylring (R3) mit den Halogenen Fluor, Chlor, Brom und Jod erlaubte die Charakterisierung des Einflusses der Halogene auf die Antiprion-Wirkung der Substanzen. Der Brom-substituierte Aromat an anle138b zeigte wiederum die höchste Antiprion-Wirkung in den Tierexperimenten. Eine ähnlich gute Wirkung konnte mit Chlor als Substituent bei Substanz sery335b (61 %) erreicht werden. Die fluorierte Verbindung anle186b zeigte eine schwächere Wirkung (21 %) auf die Akkumulation von PrP^{Sc} im Gehirn. Die Substitution mit Jod bei Substanz anle197b zeigte keinen Einfluss auf die periphere PrP^{Sc}-Akkumulation in der Milz (<5 %). Außerdem wurden verschiedene chemische Substituenten an der Position des Halogens am 5'-Aromaten getestet, da diese Position eine entscheidende Rolle in der Aktivität der Substanzen einnimmt. Dadurch konnte Substanz sery313b mit einer OH-Gruppe an dieser Position als wirksame Substanz identifiziert werden (33 %). Die Substanz sery344 besitzt hingegen keine inhibierende Wirkung, obwohl auch diese Verbindung eine OH-Gruppe an der gleichen Position trägt, jedoch trägt diese Verbindung einen zusätzlichen Chlor-Substituenten an *ortho*-Position am Phenylring, was infolge einer sterischen Hinderung die Bindung der Substanz an die Aggregate verhindern könnte (4.7.6).

Mit den durchgeführten *in vivo* Experimenten konnte mit Substanz anle138b ein vielversprechender Medikamenten-Kandidat zur Behandlung von Prionerkrankungen identifiziert werden. Außerdem konnten entscheidende strukturelle Voraussetzungen für die inhibitorische Wirkung von Antiprion-Substanzen im Tiermodell beschrieben werden.

Tabelle 8: Inhibitorischer Effekt verschiedener DPP-Substanzen auf PrP^{Sc}-Akkumulation in Gehirn und Milz im Prion-Tiermodell.



Verbindung	R1	R2	R3	Inhibition der PrP ^{Sc} -Akkumulation [%]*
anle138b				65 ^a ; 107 ^b ; 49 ^c
sery255b				35 ^a ; <5 ^c
anle138c				<5 ^a
sery338b				19 ^a
sery345				<5 ^a
sery378b				39 ^a
anle234b				<5 ^a
sery335b				61 ^a ; 41 ^c
anle186b				21 ^b
anle197b				<5 ^c
anle236b				6 ^a
sery313b				33 ^c
anle233b				26 ^a
anle232b				17 ^a

* relative Inhibition der PrP^{Sc}-Akkumulation normalisiert zur DMSO-behandelten Gruppe (0 % Inhibition).

a PrP^{Sc}-Gehalt im Gehirn am Tag 120 nach i.c. Infektion und Behandlung über 40 Tage mit 1 mg Substanz in Erdnussbutter.

b PrP^{Sc}-Gehalt im Gehirn am Tag 106 nach i.c. Infektion und Behandlung über 24 Tage (14 Tage i.p. (0,84 mg Substanz); 2 x 5 Tage orale Gavage (1 mg)).

c PrP^{Sc}-Gehalt Milz bestimmt an Tag 35 nach i.p. Infektion und 34 Behandlungstagen mit 1 mg Substanz in Erdnussbutter.

5. Diskussion

5.1. Notwendigkeit einer Therapie

Prionkrankheiten oder Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) gehören zu den neurodegenerativen Krankheiten, bei denen pathologische Proteinaggregate auftreten. Die TSE-Erkrankungen weisen eine Besonderheit auf, welche sie von anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson abgrenzt, denn sie stellen übertragbare Erkrankungen dar (Cuille und Chelle, 1936; Gajdusek *et al.*, 1967; Gibbs *et al.*, 1968; Masters *et al.*, 1981; Tateishi *et al.*, 1995). Diese Übertragbarkeit der TSE-Erkrankungen zeigte sich mit dem Auftreten der BSE-Epidemie. Während der BSE-Epidemie wurde eine neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) entdeckt, welche vermutlich auf den BSE-Erreger zurückzuführen ist (Bruce *et al.*, 1997; Collinge *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1997; Will *et al.*, 1996). Die Zahl der diagnostizierten erkrankten Menschen infolge der BSE-Epidemie blieb relativ klein, jedoch ist die Zahl der infizierten Individuen unbekannt.

Therapien werden grundsätzlich nach kurativen, palliativen und prophylaktischen Ansätzen klassifiziert. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist keine kurative kausale Therapie für Prionkrankheiten verfügbar und deshalb beruht die derzeitige Therapie hauptsächlich in der symptomatischen Behandlung. Ein gegenwärtiges Ziel in der Entwicklung molekularer Therapieansätze ist eine Verlangsamung der Erkrankung über die Beeinflussung der zu Grunde liegenden pathophysiologischen Prozesse, um so eine Verlängerung der Überlebenszeit und eine Verbesserung der Lebensqualität zu erreichen. Die meisten therapeutischen Ansätze für Prionerkrankungen zielen auf eine kausale Intervention durch Unterbinden der PrP^{Sc}-Akkumulation ab, denn das Verhindern der Konversion von PrP^C in PrP^{Sc} in Neuronen kann den Krankheitsfortschritt verhindern und frühe degenerative Veränderungen zurückbilden (Mallucci *et al.*, 2003). Das gleiche Prinzip wird auch für anormal aggregierte Proteine, wie α -Synuklein, A β und polyQ-verlängerte Proteine, vorgeschlagen (Hayashita-Kinoh *et al.*, 2006; Schenk *et al.*, 2005; Schiffer *et al.*, 2007). Da Prionkrankheiten gewöhnlich sehr lange Latenzzeiten zwischen der Infektion und der Manifestation erster klinischer Zeichen haben, eröffnet sich ein Zeitfenster für eine Therapie nach der Infektion, noch bevor Schäden im Gehirn aufgetreten sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten gegen Prionerkrankungen. Eine kausale Therapie, die direkt am PrP^{Sc} angreift, kann grundsätzlich

über unterschiedliche Ansätze, wie Stabilisierung der nicht amyloiden Form des Proteins, Inhibition der Aggregation oder Aktivierung der Immunantwort, erreicht werden (Berger *et al.*, 2006; Schenk *et al.*, 2005; Sekijima *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurden zwei Therapieansätze ausgewählt und auf Wirksamkeit bei Prionerkrankungen untersucht. Zum einen sollte die Therapie über eine Stimulierung des angeborenen Immunsystems, welche zu einer erhöhten Clearance des gebildeten PrP^{Sc} führen soll, und zum anderen durch die Behandlung mit aggregationshemmenden chemischen Verbindungen erfolgen, was direkt an der Bildung der PrP^{Sc}-Aggregate ansetzt.

5.2. Stimulierung des angeborenen Immunsystems

Im ersten Teil der Arbeit wurden Versuche zur Stimulierung des angeborenen Immunsystems mit CpG-ODN durchgeführt (4.1), um den Einfluss der Stimulierung des Immunsystems auf die Prionpathologie zu untersuchen. CpG-ODN wirken aktivierend auf das angeborene Immunsystem und konnten bereits bei einer Vielzahl von Erkrankungen, wie bakteriellen und viralen Infektionen, sowie in der Anti-Tumortherapie und als Adjuvans erfolgreich eingesetzt werden (Klinman, 2004; Krieg, 2002; Oxenius *et al.*, 1999; Switaj *et al.*, 2004; Vabulas *et al.*, 2000). Aus diesem Grund wurden Scrapie-infizierte Mäuse beginnend mit der Infektion mit CpG-ODN nach unterschiedlichen Applikationsschemata behandelt (4.1.1; 4.1.2). Die Behandlung mit 1 x 50 µg CpG-ODN pro Woche über einen Zeitraum von 4 Wochen führte zu keiner verlängerten Überlebenszeit von Scrapie-infizierten Balb/c-Mäusen (Abbildung 8). Auch die tägliche Behandlung mit 16 µg CpG-ODN über 5 Tage konnte das Überleben von C57BL/6-Mäusen nach Infektion nicht verlängern (Abbildung 10). Da eine höhere Konzentration von täglich 32 µg CpG-ODN über 5 Tage die Überlebenszeit von Scrapie-infizierten Mäusen verlängerte (Sethi *et al.*, 2002), deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass der Effekt der CpG-ODN-Behandlung konzentrationsabhängig ist. Allerdings führte eine nochmals erhöhte Konzentration (64 µg CpG-ODN) zu Veränderungen der Mikroarchitektur der Milz, was für die beobachtete Überlebenszeitverlängerung verantwortlich sein könnte (Heikenwalder *et al.*, 2004). Alternativ könnte der Anstieg der Makrophagen und dendritischer Zellen, welcher nach Behandlung mit CpG-ODN beobachtet werden kann (Heikenwalder *et al.*, 2004), zu einer erhöhten Degradierung von PrP^{Sc} oder Sequestrierung der Prionen zu einem frühen Zeitpunkt nach peripherer Infektion führen (Beringue *et al.*, 2000b). Eine weitere Erklärung könnte sich aus neueren Ergebnissen ergeben, bei denen ODN den effektiven Titer im Inokulum verringern (Kocisko *et al.*, 2006), was auf eine molekulare Interaktion der ODN mit PrP^{Sc} schließen lässt. Dieser Effekt ist jedoch unabhängig von dem

Vorhandensein von CpG-Motiven in der Nukleotidsequenz. Dass die Stimulierung des Immunsystems einen Antiprion-Effekt hervorrufen kann, konnte von Tal und Kollegen (Tal *et al.*, 2003) gezeigt werden. Die Stimulierung des Immunsystems durch "Complete Freund's Adjuvans" führte zu einer signifikanten Überlebenszeitverlängerung, sowohl nach intrazerebraler als auch intraperitonealer Infektion.

Da die repetitive Behandlung von Scrapie-infizierten Mäusen mit CpG-ODN eine sehr komplexe und schwer verständliche Wirkung hervorruft und die Antiprion-Wirkung in einem engen Konzentrationsbereich liegt, wurde die Therapie über die Stimulierung des angeborenen Immunsystems nicht weiter verfolgt. Der Schwerpunkt in den nächsten Therapie-Versuchen lag in der Identifizierung und Charakterisierung von chemischen Substanzen, die die Aggregation von PrP^{Sc} inhibieren.

5.3. *In vitro* Strukturanalyse potentieller Antiprion-Substanzen

Im thematisch zweiten Abschnitt dieser Arbeit lag der Fokus auf der Identifizierung und Charakterisierung chemischer Verbindungen, um eine Therapie für Prionerkrankungen zu entwickeln. Die Grundlage für die Charakterisierung und Weiterentwicklung der beschriebenen Substanzklassen lag bei einer Substanz-Screeningkampagne zur Identifizierung potentieller Antiprion-Substanzen, welche am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung durchgeführt wurde. Im Rahmen dieser Screeningkampagne wurden über 20000 Substanzen aus der DiverSet-Bibliothek auf ihre aggregationshemmende Aktivität getestet, was zur Entdeckung von Verbindungen aus unterschiedlichen Substanzklassen führte, welche in Auszügen von Bertsch (Bertsch *et al.*, 2005) veröffentlicht wurde. Bei diesen Ergebnissen setzte die vorliegende Arbeit an und sollte anhand fokussierter Substanzbibliotheken die Wirkung der zuvor identifizierten Leitstrukturen genauer charakterisieren und deren Weiterentwicklung vorantreiben. Die Charakterisierung der Substanzen erfolgte durch zwei *in vitro* Assays, dem SIFT Antiprion-Assay und einem Prion-Zellkulturmodell, und daran anschließend, für eine Auswahl von Substanzen *in vivo*, im Prion-Mausmodell. Der Schwerpunkt der molekularen Analyse von potentiellen Antiprion-Substanzen lag bei den beiden Substanzklassen der N'-Benzylidene-benzohydrazide (NBBs) und 3,5-Diphenylpyrazole (DPPs), einschließlich verwandter Strukturen. Außerdem wurden auch Substanzen aus der IMPY-Substanzklasse und ein Tetracyclin-Derivat molekular untersucht. Vor der Verwendung in Tierexperimenten wurden präzise Struktur-Wirkungs-Beziehungen anhand fokussierter Substanzbibliotheken herausgearbeitet, um die Substanzklassen als Leitstrukturen von neuen Antiprion-Wirkstoffen zu bestätigen und die

Weiterentwicklung dieser Antiprion-Wirkstoffe voranzutreiben. Darüberhinaus lassen sich durch Struktur-Wirkungs-Beziehungen Substanzen mit unspezifisch inhibitorischer Aktivität herausfiltern (McGovern *et al.*, 2002; Ryan *et al.*, 2003).

5.3.1. SIFT Antiprion-Assay

Die molekulare Analyse der DPP-Substanzbibliothek im SIFT Antiprion-Assay zeigte die Bedeutung von OH-Gruppen für die Wirkung der Verbindungen als Aggregationsinhibitor unter *in vitro* Bedingungen. Durch die sukzessive Addition von OH-Gruppen an das chemische Grundgerüst der DPPs (Abbildung 13) konnte die Aktivität der Verbindungen erhöht werden. Die Verbindung 10353_F11 mit einer OH-Gruppe konnte bei einer Substanzkonzentration von 100 μM die Aggregation auf 69 % der Kontrolle reduzieren, wohingegen die Substanz anle143c mit 5 OH-Gruppen die Aggregation komplett inhibieren konnte (Abbildung 15). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Ausbildung von Wasserstoffbrücken für die Bindung der Substanzen an die Aggregate im SIFT Antiprion-Assay entscheidend ist, da diese von OH-Gruppen ausgebildet werden. Der Anstieg der aggregationshemmenden Aktivität der Verbindungen könnte auf die steigende Zahl der potentiellen Wasserstoffbrücken zurückzuführen sein (Abbildung 15). Die Ergebnisse mit den Substanzen sery144 und sery159a lassen jedoch vermuten, dass nicht alle OH-Gruppen für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aggregaten von gleicher Bedeutung sind. Die Verbindung sery144 zeigt mit zwei OH-Gruppen an den Positionen R7 und R8 im SIFT Antiprion-Assay die gleiche inhibitorische Aktivität, wie sery159a mit 4 OH-Gruppen an den Positionen R2, R3, R7 und R8 (Abbildung 17). Die vollständige Substitution der OH-Gruppen durch MeO-Gruppen hebt die Aktivität der Substanzen im SIFT Antiprion-Assay auf (Abbildung 16; Abbildung 17). OH-Gruppen können, im Gegensatz zu den MeO-Gruppen, als Wasserstoff-Donor fungieren, was für die Bindung der Substanzen an die Aggregate eine wichtige Voraussetzung zu sein scheint.

Neben dem Einfluss der OH-Gruppen auf die Aktivität der Verbindungen im SIFT Antiprion-Assay, konnte darüberhinaus für Halogen-Substituenten eine Struktur-Wirkungs-Beziehung herausgearbeitet werden. Bei den Halogen-substituierten Substanzen konnten zwei Effekte, die die Aktivität beeinflussen, beobachtet werden. Zum einem konnte die Aktivität der Verbindungen durch die Anzahl der Halogene erhöht werden. Die Addition eines zusätzlichen Brom-Substituenten an Position R9 konnte die Inhibition der Aggregation der Substanz anle142c von knapp 70 % auf unter 43 % der Kontrolle bei Substanz anle145d steigern (Abbildung 18). Zum anderen ist die Aktivität der Verbindungen von der Art des

substituierten Halogens abhängig. Brom-substituierte Verbindungen zeigen im SIFT Antiprion-Assay eine größere Aktivität als vergleichbare Strukturen mit einem Fluor-Substituenten (Abbildung 18).

Der Vergleich der Ergebnisse der DPP-Substanzen mit den Resultaten der NBB-Substanzklasse zeigte, dass für diese Verbindungen entsprechende Beobachtungen gemacht werden konnten. Die NBB-Substanzen mit OH-Gruppen gehörten im SIFT Antiprion-Assay zu den aktivsten Substanzen (Abbildung 25; (Bertsch *et al.*, 2005)). Beispielhaft seien die Verbindungen H9A13 und H9A15 mit zwei OH-Gruppen genannt, welche die Aggregation auf unter 50 % der Kontrolle senken konnten. Damit konnte bei zwei Substanzklassen der Einfluss von OH-Gruppen auf die *in vitro* Wirksamkeit im SIFT Antiprion-Assay gezeigt werden. Die Gemeinsamkeiten in den Struktur-Wirkungs-Beziehungen bestanden zusätzlich noch in der Wirkung der Halogen-Substituenten. Sowohl bei den DPP- als auch NBB-Substanzen zeigten die Brom-substituierten Verbindungen eine größere Aktivität als vergleichbare Strukturen mit Fluor (Abbildung 18 und Abbildung 25). Darüberhinaus lag die gemessene Aktivität von Chlor-substituierten NBB-Verbindungen zwischen denen der Fluor-beziehungsweise Brom-substituierten Verbindungen, sodass die Größe des Halogens bei der Interaktion der Halogen-substituierten Aromaten mit den Aggregaten von Bedeutung zu sein scheint (Abbildung 25).

Bei der Betrachtung weiterer Struktur-Wirkungs-Beziehungen der verschiedenen Substanzklassen konnte eine zusätzliche Übereinstimmung beobachtet werden. Die Verbindungen aus der NBB- und IMPY-Substanzklasse, welche einen Stickstoff-Substituenten als Wasserstoff-Akzeptor tragen (Bsc2944, H5A26), besitzen eine größere Aktivität als solche (Bsc2954, H5A12), bei denen Stickstoff als Wasserstoff-Donor dient (Abbildung 21; Abbildung 25). Anscheinend kann das Stickstoff-Atom als Wasserstoff-Akzeptor bei diesen Substanzen eine Wasserstoff-Brücke mit den Fibrillen ausbilden und zu einer stärkeren Bindung beitragen.

Zusammenfassend legen die ähnlichen Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Verbindungen aus verschiedenen Substanzklassen den Schluss nahe, dass die Substanzen im SIFT Antiprion-Assay ein identisches Bindungsmotiv an den Prionprotein-Aggregaten aufweisen. Dass Substanzen aus verschiedenen Substanzklassen gleiche Bindungsstellen aufweisen können, konnte für die drei Substanzklassen der Thioflavin T-, Congo Rot- und Aminonaphthalen-Derivate bei *in vitro* generierten A β -(1-40) Fibrillen gezeigt werden (Ye *et al.*, 2005). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass die identifizierten Antiprion-Substanzen nicht nur beim Prionprotein erfolgreich als Aggregationsinhibitor eingesetzt

werden können, sondern die gleichen Substanzen die Aggregation von unterschiedlichen Proteinen, die mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind, inhibieren können. Substanzen aus der NBB-Substanzklasse wurden erfolgreich in einem Zebrafisch-Modell für die Huntington-Erkrankung mit einem PolyQ-verlängerten Huntingtin (Schiffer *et al.*, 2007) und in einem α -Synuklein Modell eingesetzt (Kostka *et al.*, 2008). Ähnliche Ergebnisse konnten mit Substanzen aus der IMPY-Substanzklasse erzielt werden. Die Verbindungen aus der IMPY-Substanzklasse, die über gute anti-aggregative Aktivität beim Prionprotein verfügten, konnten die Aggregation von anderen Proteinen, die im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen stehen, inhibieren (B. Schmidt, persönliche Mitteilung). Daraus folgend entstehen durch die Aggregation der Proteine anscheinend, unabhängig von der Aminosäuresequenz, strukturell gleichartige Bindungsstellen, an denen die Substanzen mit dem Protein wechselwirken und die Aggregation inhibieren können. Das Vorhandensein von Oligomer-spezifischen Antikörpern, die die Oligomere verschiedener Proteine, trotz unterschiedlicher Aminosäuresequenz erkennen und deren Zytotoxizität inhibieren, stützt diese Beobachtung. Eine Gemeinsamkeit der bei neurodegenerativen Erkrankungen entstehenden Proteinaggregate ist der hohe Anteil an β -Faltblattstrukturen. Strukturelle Untersuchungen von A β -, α -Synuclein- und Polyglutamin-Aggregaten zeigen das ein β -Faltblatt kombiniert mit einer β -Schleife ein allgemeines Strukturmotiv neurodegenerativer, krankheitsassoziierter Amyloide sein könnte. Diese Ergebnisse deuten auf strukturelle Gemeinsamkeiten und einen gemeinsamen Pathomechanismus der neurodegenerativen Erkrankungen hin (Bucciantini *et al.*, 2002; Kaye *et al.*, 2003).

5.3.2. Prion-Zellkulturmodell

Neben der molekularen Untersuchung wurden ausgewählte Substanzen in einem biologischen System auf ihre Antiprion-Wirkung getestet. Dabei zeigten die Substanzen der DPP-Wirkstoffklasse überwiegend gute Antiprion-Wirkungen, denn mit Ausnahme einer Substanz konnten diese bei 2 μ M Substanzkonzentration den PrP^{Sc}-Gehalt im Vergleich zur Kontrolle deutlich verringern (Abbildung 20). Neben den zuvor im SIFT Antiprion-Assay identifizierten Verbindungen mit OH-Gruppen, konnten im Prion-Zellkulturmodell weitere wirksame Verbindungen entdeckt werden, die MeO-Gruppen (sery149) oder den Methylendioxyphenyl-Ring (anle138b) als Substituenten tragen. Diese Substanzen wiesen eine hohe Aktivität im Zellkulturmodell auf und konnten den PrP^{Sc}-Gehalt um 50 % reduzieren (Abbildung 20). Der Vergleich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Substanzen sery85, sery117 und sery140 zeigt, neben dem Einfluss der Substituenten an den

Aromaten, die Bedeutung der verwendeten Kerngruppe für die Wirkung der DPP-Derivate als Antiprion-Substanz. Die Substanz sery85 mit einem Pyrazol-Ring reduziert den PrP^{Sc}-Gehalt auf 33 %, wohingegen die Substanzen sery117 (Isoxazol) und sery140 (Oxadiazol) die PrP^{Sc}-Menge auf 48 % bzw. 71 % reduzieren. Diese Ergebnisse bestätigend, verfügen die drei wirksamsten Verbindungen (anle143b, sery85 und sery149) über einen Pyrazol-Ring.

Ein Vergleich der Zellkultur-Ergebnisse der DPP- und NBB-Substanzklasse bringt, wie schon bei der molekularen Analyse im SIFT Antiprion-Assay, ähnliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen zum Vorschein. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der DPP-Substanzklasse konnten wirksame NBB-Substanzen mit OH- oder MeO-Gruppen identifiziert werden (Abbildung 26). Jedoch zeigten NBB-Substanzen mit drei MeO-Gruppen keine Antiprion-Wirkung im Prion-Zellkulturmodell (Abbildung 26, Spalten A5 und A6), da unter Umständen eine sterische Hinderung durch die Substituenten die Bindung der Substanzen an die Aggregate einschränkt. Darüberhinaus konnte der Diphenyl-Ring bei den NBB-Substanzen, die mit den Aldehyden A27 oder A28 synthetisiert wurden, mit antiaggregatorischer Wirkung assoziiert werden (Abbildung 26). Substanzen der NBB-Klasse mit einem Diphenyl-Ring konnten auch die Aggregation von PolyQ-verlängerten Proteinen inhibieren (Schiffer *et al.*, 2007). Die ähnlichen Struktur-Wirkungs-Beziehungen der untersuchten Substanzklassen im Zellkulturmodell deuten wiederum auf gemeinsame Bindungsstellen der Verbindungen aus den Substanzklassen an den Aggregaten hin.

Der Vergleich der Antiprion-Substanzen, die im SIFT Antiprion-Assay oder im Prion-Zellkulturmodell entdeckt wurden, zeigt, dass durch die beiden Screening-Methoden nicht nur identische, sondern auch unterschiedliche, Substanzen identifiziert wurden. Beim SIFT Antiprion-Assay spielt die molekulare Aktivität einer aktiven Substanz eine größere Rolle als im Prion-Zellkulturmodell, welches ein komplexeres biologisches System darstellt. In einem biologischen System geht die Wirksamkeit einer Substanz nicht allein auf deren molekulare Aktivität der Inhibition der Aggregation zurück, sondern auch auf deren Stabilität und Spezifität in einem komplexeren biologischen Umfeld. Ein enzymatischer Abbau oder eine unspezifische Bindung an andere Proteine können die Wirkung der Substanzen einschränken. Auf der anderen Seite ist eine Aktivierung der Substanzen durch Enzyme möglich, wobei durch die Verstoffwechslung aktive Metabolite entstehen könnten, die die Aggregation von PrP^{Sc} inhibieren.

Zusammenfassend verfügen aktive Substanzen im Zellkulturmodell über große, lipophile Bausteine, wohingegen die aktiven Substanzen im SIFT Antiprion-Assay mehr kleinere,

polare Substituenten tragen. Die Bindung der Substanzen an die Aggregate in einem biologischen System scheint über hydrophobe Wechselwirkungen stattzufinden. Die lipophilen Gruppen der Substanzen, wie die aromatischen Kohlenwasserstoffe oder die Halogen-Substituenten, können hydrophobe Wechselwirkungen mit den unpolaren Aminosäure-Seitenketten der aggregierten Proteine ausbilden. Spezifische Interaktionen zwischen aromatischen Seitenketten spielen vermutlich eine Schlüsselrolle in dem Erkennungs- und Selbstanordnungsprozess bei der Bildung amyloider Fibrillen (Gazit, 2002; Makin *et al.*, 2005), somit stellen diese aromatischen Wechselwirkungen einen rationalen Angriffspunkt für Therapien dar (Cohen *et al.*, 2006; Inouye *et al.*, 2006; Porat *et al.*, 2006).

5.4. *In vivo* Strukturanalyse potentieller Antiprion-Substanzen

Nachdem potentielle Antiprion-Substanzen durch *in vitro* Analysen identifiziert wurden und auf eine, für Tierexperimente realistische, Anzahl reduziert werden konnten, sollten die effektivsten Substanzen unter *in vivo* Bedingungen in Prion-Tierexperimenten eingesetzt werden, da aus der *in vitro* Aktivität nicht die Wirkung in einem Tiermodell antizipiert werden kann (Kocisko *et al.*, 2004). Das Anti-Malaria Medikament Quinacrin wurde aufgrund der *in vitro* Aktivität in klinischen Studien eingesetzt, ohne zuvor in Tierexperimenten getestet worden zu sein. Nachfolgende Tierversuche und die klinischen Studien selbst, belegten die Unwirksamkeit der Substanz (Barret *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2003; Nakajima *et al.*, 2004). Aus diesen Gründen sollten die neu entdeckten Substanzen in Tierexperimenten auf ihre Antiprion-Wirkung getestet und belegt werden, ob diese Verbindungen potentielle Antiprion-Wirkung *in vivo* besitzen.

In den ersten Screening-Versuchen wurden Substanzen aus 10 Substanzklassen getestet, um ein möglichst breites Spektrum abzudecken und potentielle Leitstrukturen zu identifizieren. Außerdem lag der Schwerpunkt bei Substanzen, die sehr gute Ergebnisse in beiden Screening-Assays erzielen konnten. Jedoch zeigte sich in den ersten Tierexperimenten, dass viele Substanzen, trotz hervorragender molekularer Aktivität im Antiprion-Assay und guter Wirksamkeit in Prion-Zellkulturmodell, *in vivo* unwirksam waren (4.7.1; 4.7.2). Die Konsequenz aus diesen Erfahrungen war, dass die Auswahl der Substanzen für Tierexperimente nicht nur anhand der molekularen Aktivität erfolgte, sondern ebenfalls pharmakologische Eigenschaften, wie Löslichkeit, Permeabilität, orale Bioverfügbarkeit und Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit, berücksichtigt wurden (Clark, 1999; Lipinski *et al.*, 2001; Veber *et al.*, 2002). Durch die Kombination von molekularer Aktivität und pharmakologischen Eigenschaften konnten schließlich die Verbindungen Bsc3119, Bsc3217,

anle138b und sery149 als neue potentielle Antiprion-Substanzen entdeckt werden (4.7.2; 4.7.3). Dass mit anle138b und sery149 zwei Verbindungen aus der DPP-Substanzklasse signifikante Wirkung im Prion-Tiermodell zeigten, hob die Relevanz dieser Substanzklasse als potentielle Antiprion-Wirkstoffklasse eindeutig hervor. Deshalb wurden auf Grundlage der DPP-Leitstruktur Derivate synthetisiert, um die Wirkung im Prion-Tiermodell zu verbessern und die Identifizierung entscheidender Strukturelemente für die Antiprion-Wirkung zu ermöglichen.

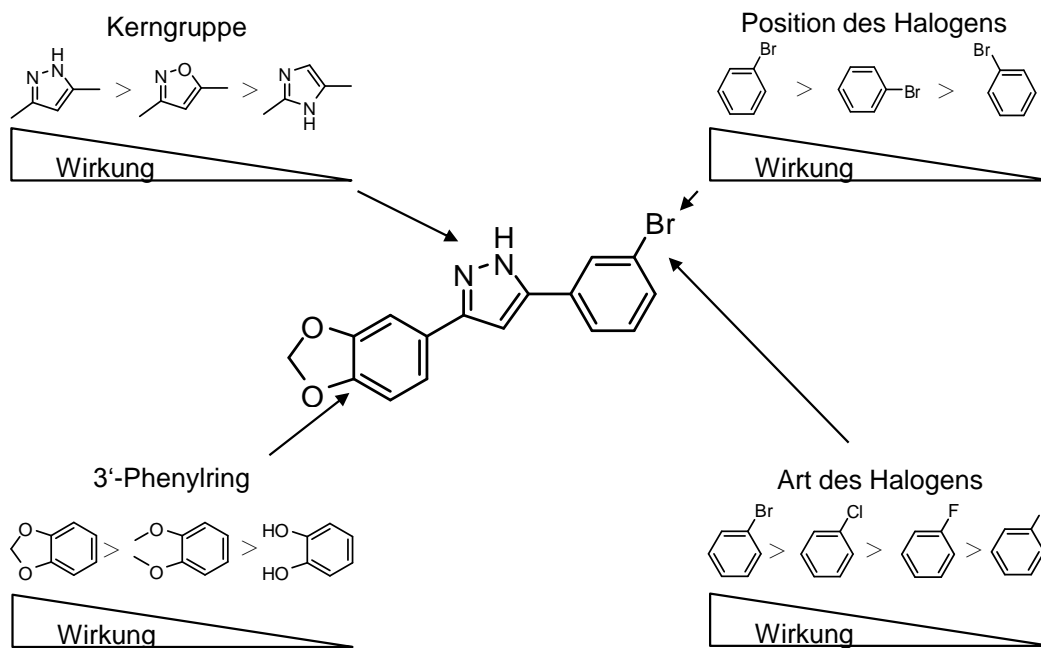


Abbildung 42: Struktur-Wirkungs-Beziehungen der anle138b-Leitstruktur.

(Abbildung 42) stellt die Ergebnisse einiger Strukturelemente von DPP-Substanzen in den Prion-Tiermodellen schematisch dar. Die Verwendung von verschiedenen Substituenten am 3'-Phenylring der Leitstruktur zeigt, dass der Methylenedioxyphenyl-Ring von anle138b die größte inhibitorische Wirkung auf die PrP^{Sc}-Akkumulation *in vivo* besitzt. Verbindungen mit zwei MeO-Gruppen oder zwei OH-Gruppen weisen eine verringerte bzw. keine Antiprion-Wirkung auf. Im Vergleich verschiedener Kerngruppen zeigt der Pyrazol-Ring (anle138b) eine größere Antiprion-Wirkung als der Pyroxazol-Ring (sery338b) und der Imidazol-Ring (sery345). Die Derivatisierung von anle138b am 5'-Phenylring mit den Halogenen Fluor, Chlor, Brom und Jod erlaubte die Charakterisierung des Einflusses der Halogene auf die Antiprion-Wirkung der Substanzen. Der Brom-substituierte Aromat zeigte die höchste Antiprion-Wirkung in den Tierexperimenten, wobei Chlor eine ähnlich gute Wirksamkeit besaß. Die fluorierte Verbindung zeigte nur noch eine schwache Wirkung auf die Akkumulation von PrP^{Sc} und die Substitution mit Jod besaß keinen Einfluss auf die periphere

PrP^{Sc}-Akkumulation. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Größe des substituierten Halogens eine Rolle bei der Antiprion-Wirkung spielt. Die Antiprion-Wirkung der Halogene steigt mit deren Größe immer weiter an, bis mit dem Jod-Atom anscheinend die optimale Größe überschritten wird.

Darüberhinaus zeigte sich, dass auch die Position des Halogens am Aromaten von Bedeutung für die Antiprion-Wirkung ist. Die Substitution des Brom-Atoms am Aromaten in *meta*-Stellung zeigte eine größere Wirkung als die Substitution in *para*- oder *ortho*-Stellung.

Die Darstellung der Substanzen in einem 3D-Strukturmodell kann möglicherweise die unterschiedlichen Wirksamkeiten der Substanzen, welche sich auf den ersten Blick nur gering von anle138b unterscheiden, erklären. Die Substanz anle234b unterscheidet sich von anle138b nur durch die Verschiebung des Br-Substituenten am 5'-Aromaten von *meta*- an *ortho*-Position. Durch die Änderung der Position des Halogens werden jedoch die beiden Aromaten gegeneinander verdreht (Abbildung 43A+B). Außerdem erklärt sich nun die Abnahme der Wirkung der Substanzen sery338b und sery345 gegenüber anle138b, welche sich ausschließlich an der Kerngruppe unterscheiden, was aber zu größeren Unterschieden in der 3D-Struktur führt (Abbildung 43C). Je nach Ausmaß dieser strukturellen Unterschiede gegenüber anle138b geht eine Abnahme der Aktivität (sery338b) bis zur kompletten Unwirksamkeit der Substanzen einher (sery345).

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass eine Abweichung von einer planaren, linearen Molekülstruktur, wie sie bei anle138b vorliegt (Abbildung 43A), zu einer Verringerung der Antiprion-Wirkung unter *in vivo* Bedingungen führt.

Durch diese Erkenntnis kann die Entwicklung neuer potentieller Antiprion-Substanzen unter Berücksichtigung der 3D-Struktur in Zukunft beschleunigt werden. Außerdem kann über die Modellierung neuer wirksamer Substanzen die Bindungsstelle der Moleküle an den Aggregaten näher charakterisiert werden. Die Bindungsstelle an den Proteinaggregaten scheint leichter zugänglich für linear, planare Verbindungen zu sein, da die Abweichung von dieser Struktur die antiaggregatorische Wirkung der Substanzen verringert.

Eine kürzlich identifizierte Substanzklasse, für die eine Bindung an A β -Amyloid gezeigt wurde (Ono *et al.*, 2008), zeigt in der Darstellung der räumlichen Struktur und Aufteilung der lipophilen Moleküloberfläche eine beachtliche Ähnlichkeit zu Substanz anle138b (Abbildung 43D). So zeigen zwei unabhängig in unterschiedlichen Modellsystemen für neurodegenerative Erkrankungen entdeckte Substanzen eine hohe Übereinstimmung in ihrer 3-dimensionalen Struktur. Dies kann als Hinweis dafür gesehen werden, dass Proteinaggregate, die mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind, möglicherweise über strukturelle

Gemeinsamkeiten und einen gemeinsamen Pathomechanismus verfügen (Bucciantini *et al.*, 2002; Kaye *et al.*, 2003).

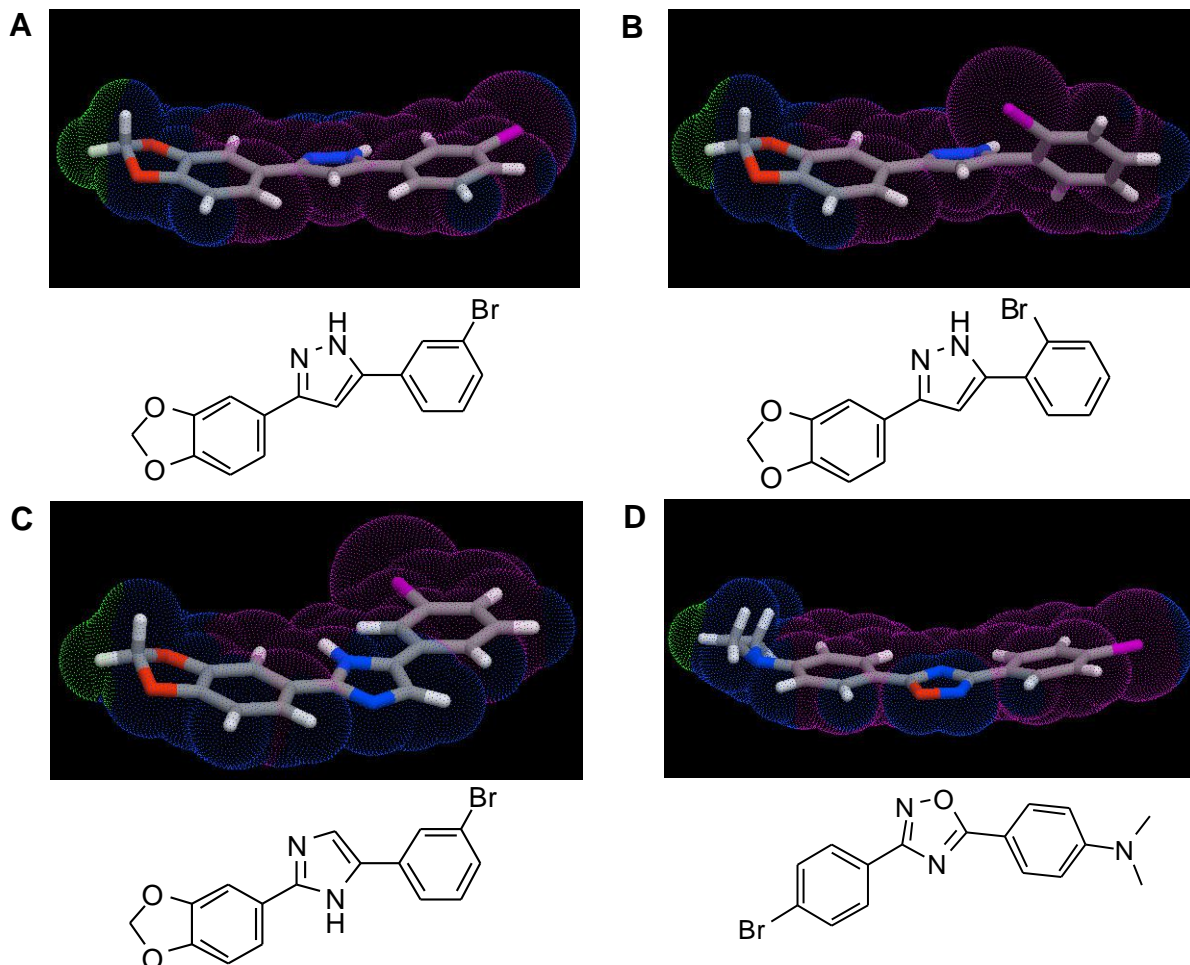


Abbildung 43: Darstellung im 3D-Strukturmodell. (A) Substanz anle138b, (B) anle234b, (C) sery345 und (D) Alzheimer Compound 4 (Ono *et al.*, 2008). Die 3D-Strukturen wurden mit dem Programm Molinspiration Galaxy 3D Structure Generator unter www.molinspiration.com dargestellt.

5.5. Auswirkungen auf die Prionpathologie

Nach Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Substanzen im Tierexperiment wurde der Einfluss der Behandlung auf die Prionpathologie untersucht. Die Konversion von PrP^C in die pathologische Isoform PrP^{Sc} stellt das zentrale Ereignis in der Pathogenese bei Prionerkrankungen dar. Der Vorteil des verwendeten Prion-Mausmodells liegt darin, dass die Prionerkrankung mit den auftretenden Symptomen sehr identisch mit der Erkrankung beim Menschen ist. Aus diesem Grund sind die erzielten experimentellen Daten aussagekräftig und relevant für eine Therapie der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit.

Der offensichtlichste und bedeutendste Therapieerfolg, der durch die Behandlung mit den Antiprion-Substanzen erzielt werden kann, ist eine signifikante Verlängerung der

Überlebenszeit von Scrapie-infizierten Tieren. Auf diese Weise konnten die beiden Verbindungen anle138b und sery149 aus der DPP-Substanzklasse identifiziert werden (4.7.3). Weitergehende Analysen zeigten, dass die Verlängerung der Überlebenszeit vermutlich auf eine verlangsamte Akkumulation von PrP^{Sc} zurückgeht (4.7.5; 4.7.8). Der Einfluss der PrP^{Sc}-Akkumulation im Gehirn auf die Überlebenszeit der infizierten Mäuse zeigte sich beim direkten Vergleich zwischen PrP^{Sc}-Anstieg und daraus resultierender Überlebenszeit. Die Kombinationstherapie von intraperitonealer und oraler Behandlung mittels Gavage über 24 Tage im Therapie-Versuch 2 (4.7.5) führte zu einer Überlebenszeitverlängerung von 22 Tagen. Die gleichzeitige Betrachtung der Akkumulation von PrP^{Sc} im Behandlungszeitraum zeigte, dass die PrP^{Sc}-Akkumulation, während der Therapie mit anle138b, inhibiert wurde. Demzufolge hängen die erzielte Überlebenszeitverlängerung und das Unterbinden des Anstiegs der PrP^{Sc}-Menge im Gehirn zusammen, was schließlich den übereinstimmenden Zeitraum der Behandlung und der Verlängerung des Überlebens erklärt. Die Behandlung führte zu einer sehr effizienten Inhibition der Prionpathologie.

Da der orale Behandlungsweg den bedeutsameren Applikationsweg für eine potentielle Therapie am Menschen darstellt, wurde zusätzlich die Möglichkeit untersucht anle138b oral zu applizieren, denn eine Therapie der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit wird eine chronische Behandlung nach sich ziehen. Die durchgängige, einmal tägliche Behandlung der Tiere mit 5 mg anle138b über Erdnussbutter ab Tag 80 nach Infektion führte zu einer Verlängerung der Überlebenszeit von über 73 Tagen im Vergleich zur Kontrolle (DMSO: 168,25 Tage; anle138b: 241,88; Abbildung 41C). Durch die Behandlung ab Tag 120 nach Infektion, mit dem Auftreten der ersten klinischen Symptome, überlebten die behandelten Tiere beinahe 52 Tage länger als die entsprechenden Kontrolltiere (DMSO: 172,5 Tage; anle138b: 223,7; Abbildung 41C). Damit konnten zwei bedeutende Erkenntnisse erzielt werden. Erstens, konnte der Zeitraum vom Beginn der Behandlung bis zum Tod durch die Therapie der Scrapie-infizierten Mäuse mit Substanz anle138b verglichen mit der Kontrolle verdoppelt werden, was die längste bekannte Überlebenszeitverlängerung im Prion-Mausmodell darstellt. Zweitens zeigte sich, dass der Therapieerfolg vom Zeitpunkt des Beginns der Behandlung abhängt. Beginnt die Behandlung knapp 70 Tage vor Erreichen der terminalen Erkrankung, konnte eine Überlebenszeitverlängerung von 73 Tagen erreicht werden, wohingegen zum späteren Zeitpunkt nur eine Verlängerung von 52 Tagen erreicht werden konnte.

Die Therapie konnte nicht nur die reine Überlebenszeit der Tiere verlängern, sondern darüberhinaus stabilisierte sich der Allgemeinzustand der Mäuse, was sich an der Gewichtsentwicklung während der Erkrankung zeigte. Der einhergehende Gewichtsverlust

konnte durch die Therapie über einen längeren Zeitraum aufgehalten werden (4.7.8; Abbildung 40).

Der Behandlungserfolg von Scrapie-infizierten Mäusen konnte ebenso auf histologischer Ebene identifiziert werden. Die Häufigkeit neuronalen Zelltodes im Kleinhirn konnte durch die Applikation der Antiprion-Substanzen für längere Zeit auf niedrigem Niveau gehalten werden (4.7.5; 4.7.8). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit älteren Arbeiten, die zeigen, dass der apoptotische neuronale Zelltod der PrP^{Sc}-Akkumulation folgt (Giese *et al.*, 1995; Lucassen *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1997). Die niedrige Zahl neuronalen Zelltodes ist ein zusätzlicher Beleg für den Therapieerfolg und deutet auf eine Verringerung der Toxizität des akkumulierten PrP^{Sc} im Gehirn durch die Behandlung hin.

Schließlich stand noch die Frage im Raum, ob mit der Entwicklung einer Resistenz gegenüber der eingesetzten Substanz zu rechnen ist. Denn Prionstämme zeigen eine beträchtliche Vielfalt und sind mit unterschiedlichen PrP^{Sc}-Typen assoziiert, welche sich in ihrer Konformation (Bessen und Marsh, 1994; Collinge *et al.*, 1996; Parchi *et al.*, 1996; Parchi *et al.*, 1999; Telling *et al.*, 1996) und Glykosylierung (Collinge *et al.*, 1996) unterscheiden. So sind mehrere Typen von PrP^{Sc} für sporadisches und erworbenes CJD beschrieben (Collinge *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 2003; Notari *et al.*, 2004). Die Möglichkeit eines Auftretens eines resistenten Prionstammes gegenüber der eingesetzten Substanz kann dementsprechend antizipiert werden. Die Behandlung von infizierten Mäusen mit einer Antiprion-Substanz führte zu einer Veränderung der Glykosylierung des PrP^{Sc} (Kawasaki *et al.*, 2007). Dies konnte bei Behandlung der infizierten Mäuse mit Substanz anle138b über ungefähr 100 Tage nicht beobachtet werden, sodass nicht mit einer Resistenzentwicklung zu rechnen ist.

Die Therapie Scrapie-infizierter Mäuse mit der Antiprion-Substanz anle138b führte zu einem deutlichen therapeutischen Effekt, auch wenn die Therapie zu einem späten Zeitpunkt in der Erkrankung begonnen wurde. Dieser Therapieerfolg zeigte sich in einer Verdopplung des Überlebenszeitraums ab Beginn der Behandlung und der längsten Überlebenszeitverlängerung, die mit chemischen Molekülen bisher erreicht wurde. Weiterhin zeigten die Versuche mit antiaggregativen Substanzen, dass die Hemmung der Aggregation als neues kausales Therapiekonzept für Prionerkrankungen eingesetzt werden kann. Die Antiprion-Substanzen verminderten die Aggregation des Prionproteins, was in der Folge zu einer geringeren PrP^{Sc}-Ablagerung, einer Hemmung neuronalen Zelltodes und schließlich zu einem längeren Überleben der Tiere führte.

Zusammenfassend konnte durch die Behandlung mit der Antiprion-Substanz anle138b die Aggregation der Prionproteins vermindert werden, was zu einer Reduktion der PrP^{Sc}-Ablagerung im Gehirn führte. Die verminderte PrP^{Sc}-Ablagerung führte zu einer Reduktion des neuronalen Zelltodes, was durch die niedrigere Anzahl der Apoptosen im Kleinhirn behandelte Tiere sichtbar wurde, und nachfolgend zu einem längeren Überleben der Tiere bestätigt wurde. Die Behandlung mit anle138b führte zu keiner Veränderung des PrP^C-Gehalts im Gehirn, womit die Wirkung auf die Reduzierung der Konversion von PrP^C nach PrP^{Sc} zurückgeht und nicht indirekt auf einen abgesunkenen PrP^C-Gehalt (Abbildung 38C), was ebenfalls die Überlebensdauer von infizierten Mäusen und die Bildung von PrP^{Sc} beeinflussen kann (Manson *et al.*, 1994b; Rambold *et al.*, 2008).

5.6. Ausblick

Grundsätzlich können die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Fortschritte die therapeutischen Möglichkeiten bei Prionerkrankungen verbessern. Durch die systematische Analyse der Substanzbibliotheken konnten 8 Verbindungen als potentielle Wirkstoffe mit Antiprion-Wirkung identifiziert werden, wovon 6 Verbindungen der DPP-Substanzklasse angehören. Darunter befand sich mit anle138b eine äußerst vielversprechende Substanz, die im Tierexperiment eine hoch signifikante Antiprion-Wirkung zeigte. Durch die Therapie Scrapie-infizierter Mäuse mit dieser Antiprion-Substanz konnte eine Verdopplung der Überlebenszeit beginnend mit dem Beginn der Behandlung erreicht werden, welches schließlich zu der längsten bekannten Überlebenszeitverlängerung durch Behandlung mittels chemischer Verbindungen führte. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Aggregation als neues kausales Therapiekonzept eingesetzt werden kann. Die Verminderung der Aggregation des Prionproteins führte zu einer verminderten PrP^{Sc}-Ablagerung, was schließlich zu einer Hemmung des neuronalen Zelltodes und folgend einem längeren Überleben der Tiere führte.

Die Erfahrungen, die mit der Behandlung der Prionerkrankung in dieser Arbeit gemacht wurden, werden definitiv einen Einfluss auf andere Erkrankungen, welche durch pathologische Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen charakterisiert werden, haben. Denn Proteinablagerungen und oligomere Aggregationsintermediate spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese neurodegenerativer Krankheiten (Aguzzi und Haass, 2003; Caughey und Lansbury, 2003; Haass und Selkoe, 2007; Hardy und Selkoe, 2002; Silveira *et al.*, 2005). Außerdem verfügen Proteinaggregate, die mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind, über strukturelle Gemeinsamkeiten und einen gemeinsamen Pathomechanismus

(Bucciantini *et al.*, 2002; Kaye *et al.*, 2003). Demzufolge kann anle138b möglicherweise nicht nur bei Prionerkrankungen, sondern auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt werden. So konnte bereits für die Parkinsonsche Erkrankung in einem relevanten Tiermodell eine Wirksamkeit von anle138b gezeigt werden (C. Griesinger, persönliche Mitteilung).

Darüberhinaus dienen die erzielten Ergebnisse als Grundlage für die Planung und Durchführung einer präklinischen Studie. Die präklinische Studie bereitet den Einsatz der entdeckten Antiprion-Substanz anle138b in klinischen Studien zur Behandlung von Creutzfeldt-Jakob-Patienten vor. In dieser Studie wurde die Toxizität und Mutagenität der Substanz anle138b untersucht. Diese Analysen wurden erfolgreich durchgeführt und die Gabe von anle138b zeigte keine toxikologischen oder mutagenen Effekte. Diese Ergebnisse lassen hoffen, dass dieser identifizierte Medikamentenkandidat zur Behandlung von Creutzfeldt-Jakob-Patienten im Rahmen einer klinischen Studie eingesetzt wird. Mit dieser Arbeit konnten Grundlagen geschaffen werden, um eine Therapie für die unheilbare, stets tödlich verlaufende Creutzfeldt-Jakob-Krankheit zu ermöglichen.

6. Zusammenfassung

Prionkrankheiten bilden eine Gruppe neurodegenerativer Krankheiten, bei denen pathologische Proteinaggregate des Prionproteins auftreten, die auch als PrP^{Sc} bezeichnet werden. Zu den bekanntesten Prionkrankheiten gehören neben der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit des Menschen die Traberkrankheit bei Schafen (Scrapie), sowie die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind. Die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien stellen übertragbare Erkrankungen dar, wodurch sie sich von anderen neurodegenerativen Krankheiten abgrenzen. Diese Übertragbarkeit zeigte sich unter anderem am Auftreten der BSE-Epidemie. Im Laufe der BSE-Epidemie wurde eine neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit entdeckt, welche nach derzeitigem Wissensstand auf den BSE-Erreger zurückzuführen ist.

Bis zum heutigen Zeitpunkt existiert keine kurative Therapie für Prionerkrankungen, die mit dem Auftreten klinischer Zeichen unabwendbar tödlich verlaufen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Entwicklung neuer kausaler Therapien, die direkt an der molekularen Pathogenese, der Bildung und Ablagerung von Prionproteinaggregaten, ansetzen. Zum einen sollte die Therapie über die Stimulierung des angeborenen Immunsystems durch Administration von CpG-Oligodesoxynukleotiden (CpG-ODN) erfolgen, um eine erhöhte Clearance der entstandenen Aggregate zu erreichen. Zum anderen sollten über ein systematisches Wirkstoffscreening neuartige pharmakologisch wirksame Substanzen gefunden und charakterisiert werden, die inhibierend auf die Bildung pathologischer Prionproteinaggregate wirken und somit das zentrale molekulare Ereignis in der Pathogenese blockieren.

CpG-ODN finden bei einer Vielzahl von Erkrankungen wie bakteriellen und viralen Infektionen, sowie in der Anti-Tumorthherapie und als Adjuvans Anwendung. Frühere Versuche zeigten, dass die tägliche Administration von 32 µg CpG-ODN in Mäusen einen Antiprion-Effekt bewirkte, der in weiteren Stimulierungsmodellen mit verschiedenen Applikationsschemata untersucht werden sollte. Die gewählten CpG-ODN Mengen und Behandlungsmodelle in dieser Arbeit führten jedoch zu keinem signifikanten Antiprion-Effekt. Da die Antiprion-Wirkung der CpG-ODN Applikation somit offenbar nur in einem engen Konzentrationsbereich zu beobachten ist, wurde die Therapie über die Stimulierung des angeborenen Immunsystems nicht weiter verfolgt.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Identifizierung und Charakterisierung chemischer Substanzen, die die Bildung von PrP^{Sc} inhibieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden knapp 500 Substanzen aus 13 verschiedenen chemischen Substanzklassen mittels molekularer Assays unter Verwendung von konfokaler Fluoreszenz-Einzelmolekülspektroskopie bezüglich ihrer antiaggregativen Wirkung untersucht. Durch die systematische molekulare Analyse konnten spezifische Strukturmerkmale der Verbindungen identifiziert werden, die für die direkte molekulare inhibitorische Aktivität von Bedeutung sind. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse in Kombination mit medizinalchemischen Erwägungen wurden dann 35 Substanzen in mehreren *in vivo* Prionmausmodellen getestet, wobei hier sowohl die biochemischen Effekte auf die Prionpropagation als auch die histologischen und biologischen Effekte auf neuronalen Zelltod und Überlebensdauer analysiert wurden. Dabei konnten 8 Verbindungen mit Antiprion-Wirkung im Mausmodell identifiziert werden, von denen 6 Verbindungen der Diphenylpyrazol-Substanzklasse angehören, die damit als neuartige Leitstruktur für die Behandlung von Proteinaggregationskrankheiten erstmals beschrieben werden konnte. Die Verbindungen anle138b und sery149 aus dieser Substanzklasse konnten das Überleben Scrapie-infizierter Tiere signifikant verlängern. Die systematische Derivatisierung von anle138b ermöglichte die genaue Charakterisierung der strukturellen Voraussetzungen für die Wirkung der Antiprion-Substanzen im Prion-Mausmodell *in vivo*.

Die Therapie Scrapie-infizierter Mäuse mit der Substanz anle138b führte zu einem deutlichen therapeutischen Effekt, auch wenn die Therapie zu einem späten Zeitpunkt in der Erkrankung begonnen wurde. Dieser Therapieerfolg zeigte sich in einer Verdopplung des Überlebenszeitraums ab Beginn der Behandlung und der längsten Überlebenszeitverlängerung, die mit chemischen Molekülen bisher erreicht wurde. Weiterhin zeigten die Versuche mit antiaggregativen Substanzen, dass die Hemmung der Aggregation als neues kausales Therapiekonzept für Prionerkrankungen eingesetzt werden kann. Die Antiprion-Substanzen verminderten die Aggregation des Prionproteins, was in der Folge zu einer geringeren PrP^{Sc}-Ablagerung, einer Hemmung neuronalen Zelltodes und schließlich zu einem längeren Überleben der Tiere führte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten somit relevante Fortschritte in Hinblick auf eine zukünftige kausale Therapie von Prionkrankheiten erzielt werden. Die gewonnenen Ergebnisse führten unter anderem zur Initiierung einer präklinischen Studie für die Substanz anle138b, in welcher der entdeckte Medikamentenkandidat bereits erfolgreich die ersten toxikologischen Untersuchungen und Mutagenitätstests bestand. Diese präklinische Studie dient zur Vorbereitung des Einsatzes der beschriebenen Substanz in einer klinischen Studie zur Behandlung von Creutzfeldt-Jakob-Patienten.

7. Literaturverzeichnis

- Aguzzi, A., und Haass, C. (2003) Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease. *Science* **302**: 814-818.
- Alper, T., Haig, D.A., und Clarke, M.C. (1966) The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun* **22**: 278-284.
- Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A., und Clarke, M.C. (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**: 764-766.
- Alper, T. (1985) Scrapie agent unlike viruses in size and susceptibility to inactivation by ionizing or ultraviolet radiation. *Nature* **317**: 750.
- Aronoff-Spencer, E., Burns, C.S., Avdievich, N.I., Gerfen, G.J., Peisach, J., Antholine, W.E., Ball, H.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., und Millhauser, G.L. (2000) Identification of the Cu(2+) binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy. *Biochemistry* **39**: 13760-13771.
- Barret, A., Tagliavini, F., Forloni, G., Bate, C., Salmona, M., Colombo, L., De Luigi, A., Limido, L., Suardi, S., Rossi, G., Auvre, F., Adjou, K.T., Sales, N., Williams, A., Lasmezas, C., und Deslys, J.P. (2003) Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases. *J Virol* **77**: 8462-8469.
- Barry, R.A., Kent, S.B.H., McKinley, M.P., Meyer, R.K., DeArmond, S.J., Hood, L.E., und Prusiner, S.B. (1986) Scrapie and cellular prion proteins share polypeptide epitopes. *Journal of Infectious Diseases* **153**: 848-854.
- Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., W., Ichli, M., Groth, D.F., McKinley, M.P., Prusiner, S.B., und Weissmann, C. (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**: 417-428.
- Belichenko, P.V., Brown, D., Jeffrey, M., und Fraser, J.R. (2000) Dendritic and synaptic alterations of hippocampal pyramidal neurones in scrapie-infected mice. *Neuropathol and Appl Neurobiol* **26**: 143-149.
- Bendheim, P.E., Brown, H.R., Rudelli, R.D., Scala, L.J., Goller, N.L., Wen, G.Y., Kascsak, R.J., Cashman, N.R., und Bolton, D.C. (1992) Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* **42**: 149-156.
- Berger, Z., Ravikumar, B., Menzies, F.M., Oroz, L.G., Underwood, B.R., Pangalos, M.N., Schmitt, I., Wullner, U., Evert, B.O., O'Kane, C.J., und Rubinsztein, D.C. (2006) Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Hum Mol Genet* **15**: 433-442.

- Beringue, V., Adjou, K.T., Lamoury, F., Maignien, T., Deslys, J.P., Race, R., und Dormont, D. (2000a) Opposite effects of dextran sulfate 500, the polyene antibiotic MS-8209, and Congo red on accumulation of the protease-resistant isoform of PrP in the spleens of mice inoculated intraperitoneally with the scrapie agent. *J Virol* **74**: 5432-5440.
- Beringue, V., Demoy, M., Lasmezas, C.I., Gouritin, B., Weingarten, C., Deslys, J.P., Andreux, J.P., Couvreur, P., und Dormont, D. (2000b) Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *J Pathol* **190**: 495-502.
- Bertsch, U., Winklhofer, K.F., Hirschberger, T., Bieschke, J., Weber, P., Hartl, F.U., Tavan, P., Tatzelt, J., Kretzschmar, H.A., und Giese, A. (2005) Systematic identification of antiprion drugs by high-throughput screening based on scanning for intensely fluorescent targets. *J Virol* **79**: 7785-7791.
- Bessen, R.A., und Marsh, R.F. (1994) Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* **68**: 7859-7868.
- Bieschke, J., Weber, P., Sarafoff, N., Beekes, M., Giese, A., und Kretzschmar, H. (2004) Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* **101**: 12207-12211.
- Bolton, D.C., McKinley, M.P., und Prusiner, S.B. (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**: 1309-1311.
- Bolton, D.C., Meyer, R.K., und Prusiner, S.B. (1985) Scrapie PrP27-30 is a sialoglycoprotein. *J Virol* **53**: 596-606.
- Borchelt, D.R., Scott, D., Taraboulos, A., Stahl, N., und Prusiner, S.B. (1990) Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol* **110**: 743-752.
- Bounhar, Y., Zhang, Y., Goodyer, C.G., und Leblanc, A.C. (2001) Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem*.
- Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C., und Aguzzi, A. (1996) Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* **379**: 339-343.
- Brown, D., Belichenko, P., Sales, J., Jeffrey, M., und Fraser, J.R. (2001) Early loss of dendritic spines in murine scrapie revealed by confocal analysis. *Neuroreport* **12**: 179-183.
- Brown, D.R., Qin, K., Herms, J., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., und Kretzschmar, H. (1997a) The cellular prion protein binds copper in vivo *Nature* **390**: 684-687.

- Brown, D.R., Schulz-Schaeffer, W.J., Schmidt, B., und Kretzschmar, H.A. (1997b) Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* **146**: 104-112.
- Brown, D.R., und Besinger, A. (1998) Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J* **423**: 436.
- Brown, P., Wolff, A., und Gajdusek, D.C. (1990) A simple and effective method for inactivating virus infectivity in formalin-fixed tissue samples from patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* **40**: 887-890.
- Bruce, M.E., Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardie, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., und Bostock, C.J. (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**: 489-501.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C.M., und Stefani, M. (2002) Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* **416**: 507-511.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., und Weissmann, C. (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**: 577-582.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., und Weissmann, C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**: 1339-1347.
- Burger, D., und Hartsough, G.R. (1965) Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis* **115**: 387-392.
- Burns, C.S., Aronoff-Spencer, E., Dunham, C.M., Lario, P., Avdievich, N.I., Antholine, W.E., Olmstead, M.M., Vrielink, A., Gerfen, G.J., Peisach, J., Scott, W.G., und Millhauser, G.L. (2002) Molecular Features of the Copper Binding Sites in the Octarepeat Domain of the Prion Protein 2. *Biochemistry* **41**: 3991-4001.
- Burns, C.S., Aronoff-Spencer, E., Legname, G., Prusiner, S.B., Antholine, W.E., Gerfen, G.J., Peisach, J., und Millhauser, G.L. (2003) Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein. *Biochemistry* **42**: 6794-6803.
- Cashman, N.R., Loertscher, R., Nalbantoglu, J., Shaw, I., Kascsak, R.J., Bolton, D.C., und Bendheim, P.E. (1990) Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* **61**: 185-192.
- Castilla, J., Saa, P., Hetz, C., und Soto, C. (2005) In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* **121**: 195-206.

- Caughey, B., Race, R.E., Vogel, M., Buchmeier, M.J., und Chesebro, B. (1988) In vitro expression in eukaryotic cells of a prion gene cloned from scrapie-infected mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 4657-4661.
- Caughey, B., Race, R.E., Ernst, D., Buchmeier, M.J., und Chesebro, B. (1989) Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol* **63**: 175-181.
- Caughey, B., und Raymond, G.J. (1991) The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease-sensitive and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem* **266**: 18217-18223.
- Caughey, B., und Race, R.E. (1992) Potent inhibition of scrapie-associated prp accumulation by congo red. *J Neurochem* **59**: 768-771.
- Caughey, B., und Raymond, G.J. (1993) Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. *J Virol* **67**: 643-663.
- Caughey, B., Brown, K., Raymond, G.J., Katzenstein, G.E., und Thresher, W. (1994) Binding of the protease-sensitive form of PrP (Prion protein) to sulfated glycosaminoglycan and congo red. *J Virol* **68**: 2135-2141.
- Caughey, B., und Lansbury, P.T. (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* **26**: 267-298.
- Caughey, B., Caughey, W.S., Kocisko, D.A., Lee, K.S., Silveira, J.R., und Morrey, J.D. (2006) Prions and transmissible spongiform encephalopathy (TSE) chemotherapeutics: A common mechanism for anti-TSE compounds? *Acc Chem Res* **39**: 646-653.
- Caughey, B.W., Dong, A., Bhat, K.S., Ernst, D., Hayes, S.F., und Caughey, W.S. (1991) Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* **30**: 7672-7679.
- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J.M., Garon, C., und Haase, A. (1985) Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* **315**: 331-333.
- Clark, D.E. (1999) Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 2. Prediction of blood-brain barrier penetration. *J Pharm Sci* **88**: 815-821.
- Cohen, T., Frydman-Marom, A., Rechter, M., und Gazit, E. (2006) Inhibition of amyloid fibril formation and cytotoxicity by hydroxyindole derivatives. *Biochemistry* **45**: 4727-4735.

- Collinge, J., Whittington, M.A., Sidle, K.C.L., Smith, C.J., Palmer, M.S., Clarke, A.R., und Jefferys, J.G.R. (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**: 295-297.
- Collinge, J., Sidle, K.C.L., Meads, J., Ironside, J., und Hill, A.F. (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* **383**: 685-690.
- Collins, S.J., Lewis, V., Brazier, M., Hill, A.F., Fletcher, A., und Masters, C.L. (2002) Quinacrine does not prolong survival in a murine Creutzfeldt-Jakob disease model. *Ann Neurol* **52**: 503-506.
- Creutzfeldt, H.G. (1920) šber eine eigenartige herdf'rmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* **57**: 1-18.
- Cuille, J., und Chelle, P.L. (1936) Pathologie animale. La maladie dite tremblante du moutton est-elle inoculable? *Comptes Rendus de l'Acad,mie des Sciences.Serie III.* **26**: 1552-1554.
- Demaimay, R., Adjou, K.T., Beringue, V., Demart, S., Lasm,zas, C.I., Deslys, J.P., Seman, M., und Dormont, D. (1997) Late treatment with polyene antibiotics can prolong the survival time of scrapie-infected animals. *J Virol* **71**: 9685-9789.
- Diringer, H., Gelderblom, H., Hilmert, H., TMzel, M., Edelbluth, C., und Kimberlin, R.H. (1983) Scrapie infectivity, fibrils and low molecular weight protein. *Nature* **306**: 476-478.
- Diringer, H., Braig, H.R., Czub, M., und Ciba, F. (1988) Scrapie: a virus-induced amyloidosis of the brain. In *Ciba Foundation Symposium 135*. New York: John Wiley & Sons, pp. 135-145.
- Diringer, H., Beekes, M., und Oberdieck, U. (1994) The nature of the scrapie agent: the virus theory. *Ann N Y Acad Sci* **724**: 246-258.
- Dodelet, V.C., und Cashman, N.R. (1998) Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood* **91**: 1556-1561.
- Doh-ura, K., Ishikawa, K., Murakami-Kubo, I., Sasaki, K., Mohri, S., Race, R., und Iwaki, T. (2004) Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models. *J Virol* **78**: 4999-5006.
- Edenhofer, F., Rieger, R., Famulok, M., Wendler, W., Weiss, S., und Winnacker, E.L. (1996) Prion protein PrP^c interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *J Virol* **70**: 4724-4728.
- Endo, T., Groth, D., Prusiner, S.B., und Kobata, A. (1989) Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* **28**: 8380-8388.

- Farquhar, C.F., und Dickinson, A.G. (1986) Prolongation of scrapie incubation period by an injection of dextran sulphate 500 within the month before or after infection. *J Gen Virol* **67** (Pt 3): 463-473.
- Feng, B.Y., Toyama, B.H., Wille, H., Colby, D.W., Collins, S.R., May, B.C., Prusiner, S.B., Weissman, J., und Shoichet, B.K. (2008) Small-molecule aggregates inhibit amyloid polymerization. *Nat Chem Biol* **4**: 197-199.
- Fischer, M., R • licke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A., und Weissmann, C. (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* **15**: 1255-1264.
- Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O., und Tagliavini, F. (1993) Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* **362**: 543-546.
- Forloni, G., Iussich, S., Awan, T., Colombo, L., Angeretti, N., Girola, L., Bertani, I., Poli, G., Caramelli, M., Bruzzone, M.G., Farina, L., Limido, L., Rossi, G., Giaccone, G., Ironside, J.W., Bugiani, O., Salmona, M., und Tagliavini, F. (2002) Tetracyclines affect prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Fuhrmann, M., Bittner, T., Mitteregger, G., Haider, N., Moosmang, S., Kretzschmar, H., und Herms, J. (2006) Loss of the cellular prion protein affects the calcium homeostasis in hippocampal CA1 neurons. *J Neurochem*.
- Fuhrmann, M., Mitteregger, G., Kretzschmar, H., und Herms, J. (2007) Dendritic pathology in prion disease starts at the synaptic spine. *J Neurosci* **27**: 6224-6233.
- Gabizon, R., McKinley, M.P., Groth, D., und Prusiner, S.B. (1988) Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 6617-6621.
- Gabizon, R., Meiner, Z., Halimi, M., und Bensasson, S.A. (1993) Heparin-like molecules bind differentially to prion-proteins and change their intracellular metabolic fate. *J Cell Physiol* **157**: 319-325.
- Gajdusek, D.C., und Zigas, V. (1957) Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea. The endemic occurrence of "kuru" in the native population. *N Engl J Med* **257**: 974-978.
- Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J., und Alpers, M. (1966) Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* **209**: 794-796.
- Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J., Jr., und Alpers, M. (1967) Transmission and passage of experimental "kuru" to chimpanzees. *Science* **155**: 212-214.
- Gajdusek, D.C. (1977) Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* **197**: 943-960.

- Gasset, M., Baldwin, M.A., Fletterick, R.J., und Prusiner, S.B. (1993) Perturbation of the secondary structure of the scrapie prion protein under conditions that alter infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1-5.
- Gauczynski, S., Hundt, C., Leucht, C., und Weiss, S. (2001a) Interaction of prion proteins with cell surface receptors, molecular chaperones, and other molecules. *Adv Protein Chem* **57**: 229-272.
- Gauczynski, S., Peyrin, J.M., Haik, S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys, J.P., Dormont, D., Lasmezas, C.I., und Weiss, S. (2001b) The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J* **20** 5863-5875.
- Gazit, E. (2002) A possible role for pi-stacking in the self-assembly of amyloid fibrils. *FASEB J* **16**: 77-83.
- Gerstmann, J. (1928) über ein noch nicht beschriebenes Reflexphänomen bei einer Erkrankung des zerebellaren Systems. *Wiener Medizinische Wochenschrift* **78**: 906-908.
- Gerstmann, J., Strüssler, E., und Scheinker, I. (1936) über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Zeitschrift für Neurologie* **154**: 736-762.
- Gibbons, R.A., und Hunter, G.D. (1967) Nature of the scrapie agent. *Nature* **215**: 1041-1043.
- Gibbs, C.J., Jr., Gajdusek, D.C., Asher, D.M., Alpers, M.P., Beck, E., Daniel, P.M., und Matthews, W.P. (1968) Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* **161**: 388-389.
- Giese, A., Groschup, M.H., Hess, B., und Kretzschmar, H.A. (1995) Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol* **5**: 213-221.
- Giese, A., Brown, D.R., Groschup, M., Feldmann, C., Haist, I., und Kretzschmar, H.A. (1998) Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol* **8**: 449-457.
- Giese, A., und Kretzschmar, H.A. (2001) Prion-induced neuronal damage--the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies. *Curr Top Microbiol Immunol* **253**: 203-217.
- Griffith, J.S. (1967) Self-replication and scrapie. *Nature* **215**: 1043-1044.
- Haass, C., und Selkoe, D.J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 101-112.
- Haraguchi, T., Fisher, S., Olofsson, S., Endo, T., Groth, D., Tarentino, A., Borchelt, D.R., Teplow, D., Hood, L., Burlingame, A., Lycke, E., Kobata, A., und Prusiner, S.B.

- (1989) Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys* **274**: 1-13.
- Hardy, J., und Selkoe, D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**: 353-356.
- Harris, D.A., Lele, P., und Snider, W.D. (1993) Localization of the messenger RNA for a chicken prion protein by insitu hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 4309-3796.
- Hartsough, G.R., und Burger, D. (1965) Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis* **115**: 387-392.
- Hayashita-Kinoh, H., Yamada, M., Yokota, T., Mizuno, Y., und Mochizuki, H. (2006) Down-regulation of alpha-synuclein expression can rescue dopaminergic cells from cell death in the substantia nigra of Parkinson's disease rat model. *Biochem Biophys Res Commun* **341**: 1088-1095.
- Heikenwalder, M., Polymenidou, M., Junt, T., Sigurdson, C., Wagner, H., Akira, S., Zinkernagel, R., und Aguzzi, A. (2004) Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med* **10**: 187-192.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., und Akira, S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**: 740-745.
- Herms, J., Tings, T., Gall, S., Madlung, A., Giese, A., Siebert, H., Schurmann, P., Windl, O., Brose, N., und Kretzschmar, H. (1999) Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci* **19**: 8866-8875.
- Herms, J.W., Tings, T., Dunker, S., und Kretzschmar, H.A. (2001) Prion protein affects Ca²⁺-activated K⁺ currents in cerebellar Purkinje cells. *Neurobiol Dis* **8**: 324-330.
- Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Maundrell, K., Castilla, J., und Soto, C. (2003) Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *EMBO J* **22**: 5435-5445.
- Hill, A., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K.C., Gowland, I., und Collinge, J. (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**: 448-450.
- Hill, A.F., Joiner, S., Wadsworth, J.D., Sidle, K.C., Bell, J.E., Budka, H., Ironside, J.W., und Collinge, J. (2003) Molecular classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* **126**: 1333-1346.
- Hörnlimann, B., Riesner, D., und Kretzschmar, H. (2001) *Prionen und Prionerkrankungen*. Berlin - New York: Walter de Gruyter.

- Hornshaw, M.P., McDermott, J.R., und Candy, J.M. (1995) Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* **207**: 621-629.
- Hosszu, L.L.P., Baxter, N.J., Jackson, G.S., Power, A., Clarke, A.R., Waltho, J.P., Craven, C.J., und Collinge, J. (1999) Structural mobility of the human prion protein probed by backbone hydrogen exchange. *Nat Struct Biol* **6**: 740-742.
- Ingrosso, L., Ladogana, A., und Pocchiari, M. (1995) Congo red prolongs the incubation period in scrapie-infected hamsters. *J Virol* **69**: 506-508.
- Inouye, H., Sharma, D., Goux, W.J., und Kirschner, D.A. (2006) Structure of core domain of fibril-forming PHF/Tau fragments. *Biophys J* **90**: 1774-1789.
- Jakob, A. (1921) über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde* **70**: 132-146.
- Jeffrey, M., Goodsir, C.M., Bruce, M.E., McBride, P.A., und Fraser, J.R. (1997) In vivo toxicity of prion protein in murine scrapie: ultrastructural and immunogold studies. *Neuropathol Appl Neurobiol* **23**: 93-101.
- Jeffrey, M., Halliday, W.G., Bell, J., Johnston, A.R., MacLeod, N.K., Ingham, C., Sayers, A.R., Brown, D.A., und Fraser, J.R. (2000) Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol* **26**: 41-54.
- Johnston, A.R., Black, C., Fraser, J., und MacLeod, N. (1997) Scrapie infection alters the membrane and synaptic properties of mouse hippocampal CA1 pyramidal neurones. *J Physiol* **500**: 1-15.
- Kawasaki, Y., Kawagoe, K., Chen, C.J., Teruya, K., Sakasegawa, Y., und Doh-ura, K. (2007) Orally administered amyloidophilic compound is effective in prolonging the incubation periods of animals cerebrally infected with prion diseases in a prion strain-dependent manner. *J Virol* **81**: 12889-12898.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., und Glabe, C.G. (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* **300**: 486-489.
- Kellings, K., Meyer, N., Miranda, C., Prusiner, S.B., Riesner, D., Kaaden, O.R., Eichhorn, W., und Czerny, C.P. (1993) Analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations. In *Unconventional agents and unclassified viruses*. Vienna: Springer-Verlag, pp. 215-226.
- Kimberlin, R.H., und Walker, C.A. (1988) Incubation periods in six models of intraperitoneally injected scrapie depend mainly on the dynamics of agent replication

- within the nervous system and not the lymphoreticular system. *J Gen Virol* **69**: 2953-2960.
- Kimberlin, R.H., und Walker, C.A. (1989) The role of the spleen in the neuroinvasion of scrapie in mice. *Virus Res* **12**: 201-212.
- Klinman, D.M., Conover, J., und Coban, C. (1999) Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection. *Infect Immun* **67**: 5658-5663.
- Klinman, D.M. (2004) Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* **4**: 249-258.
- Klitzman, R. (1999) Sorcery and science: responses to kuru and other epidemics. *West J Med* **171**: 204-206.
- Kobayashi, Y., Hirata, K., Tanaka, H., und Yamada, T. (2003) [Quinacrine administration to a patient with Creutzfeldt-Jakob disease who received a cadaveric dura mater graft--an EEG evaluation]. *Rinsho Shinkeigaku* **43**: 403-408.
- Kocisko, D.A., Come, J.H., Priola, S.A., Chesebro, B., Raymond, G.J., Lansbury, P.T., und Caughey, B. (1994) Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* **370**: 471-473.
- Kocisko, D.A., Morrey, J.D., Race, R.E., Chen, J., und Caughey, B. (2004) Evaluation of new cell culture inhibitors of protease-resistant prion protein against scrapie infection in mice. *J Gen Virol* **85**: 2479-2483.
- Kocisko, D.A., Vaillant, A., Lee, K.S., Arnold, K.M., Bertholet, N., Race, R.E., Olsen, E.A., Juteau, J.M., und Caughey, B. (2006) Potent antiscrapie activities of degenerate phosphorothioate oligonucleotides. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 1034-1044.
- Korth, C., May, B.C., Cohen, F.E., und Prusiner, S.B. (2001) Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9836-9841.
- Kostka, M., Hogen, T., Danzer, K.M., Levin, J., Habeck, M., Wirth, A., Wagner, R., Glabe, C.G., Finger, S., Heinzemann, U., Garidel, P., Duan, W., Ross, C.A., Kretschmar, H., und Giese, A. (2008) Single particle characterization of iron-induced pore-forming alpha-synuclein oligomers. *J Biol Chem* **283**: 10992-11003.
- Kretschmar, H.A., Prusiner, S.B., Stowring, L.E., und DeArmond, S.J. (1986a) Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol* **122**: 1-5.
- Kretschmar, H.A., Stowring, L.E., Westaway, D., Stubblebine, W.H., Prusiner, S.B., und DeArmond, S.J. (1986b) Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* **5**: 315-324.

- Kretzschmar, H.A., Tings, T., Madlung, A., Giese, A., und Herms, J. (2000) Function of PrP(C) as a copper-binding protein at the synapse. *Arch Virol Suppl*: 239-249.
- Kretzschmar, H.A., Sethi, S., Foldvari, Z., Windl, O., Querner, V., Zerr, I., und Poser, S. (2003) Latrogenic Creutzfeldt-Jakob disease with florid plaques. *Brain Pathol* **13**: 245-249.
- Krieg, A.M. (2002) CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* **20**: 709-760.
- Kung, M.P., Hou, C., Zhuang, Z.P., Zhang, B., Skovronsky, D., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., und Kung, H.F. (2002) IMPY: an improved thioflavin-T derivative for in vivo labeling of beta-amyloid plaques. *Brain Res* **956**: 202-210.
- Kurschner, C., und Morgan, J.I. (1995) The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res Mol Brain Res* **30**: 165-167.
- Kurschner, C., und Morgan, J.I. (1996) Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family members and the cellular prion protein. *Brain Res Mol Brain Res* **37**: 249-258.
- Ladogana, A., Casaccia, P., Ingrosso, L., Cibati, M., Salvatore, M., Xi, Y.G., Masullo, C., und Pocchiari, M. (1992) Sulphate polyanions prolong the incubation period of scrapie-infected hamsters. *J Gen Virol* **73**: 661-665.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage and structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lasmezas, C.I., Deslys, J.P., Robain, O., Jaegly, A., Beringue, V., Peyrin, J.M., Fournier, J.G., Hauw, J.J., Rossier, J., und Dormont, D. (1997) Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* **275**: 402-405.
- Lasmezas, C.I. (2003) Putative functions of PrPC. *Br Med Bull* **66**: 61-+.
- Lauren, J., Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Gilbert, J.W., und Strittmatter, S.M. (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* **457**: 1128-1132.
- Le Pichon, C.E., Valley, M.T., Polymenidou, M., Chesler, A.T., Sagdullaev, B.T., Aguzzi, A., und Firestein, S. (2009) Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice. *Nat Neurosci* **12**: 60-69.
- Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.O., Riesner, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., und Prusiner, S.B. (2004) Synthetic mammalian prions. *Science* **305**: 673-676.

- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., und Feeney, P.J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **46**: 3-26.
- Llewelyn, C.A., Hewitt, P.E., Knight, R.S., Amar, K., Cousens, S., Mackenzie, J., und Will, R.G. (2004) Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* **363**: 417-421.
- Locht, C., Chesebro, B., Race, R., und Keith, J.M. (1986) Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 6372-6376.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., und Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Lucassen, P.J., Williams, A., Chung, W.C.J., und Fraser, H. (1995) Detection of apoptosis in murine scrapie. *Neurosci Lett* **198**: 185-188.
- Lugaresi, E., Medori, R., Montagna, P., Baruzzi, A., Cortelli, B., Lugaresi, A., Tinuper, P., Zucconi, M., und Gambetti, P. (1986) Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* **315**: 997-1003.
- Maddox, R.A., Belay, E.D., Curns, A.T., Zou, W.Q., Nowicki, S., Lembach, R.G., Geschwind, M.D., Haman, A., Shinozaki, N., Nakamura, Y., Borer, M.J., und Schonberger, L.B. (2008) Creutzfeldt-Jakob disease in recipients of corneal transplants. *Cornea* **27**: 851-854.
- Makin, O.S., Atkins, E., Sikorski, P., Johansson, J., und Serpell, L.C. (2005) Molecular basis for amyloid fibril formation and stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 315-320.
- Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klohn, P.C., Brandner, S., und Collinge, J. (2003) Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* **302**: 871-874.
- Mallucci, G.R., Ratte, S., Asante, E.A., Linehan, J., Gowland, I., Jefferys, J.G., und Collinge, J. (2002) Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J* **21**: 202-210.
- Manson, J., West, J.D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M.H., und Hope, J. (1992) The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* **115**: 117-122.
- Manson, J.C., Clarke, A.R., Hooper, M.L., Aitchison, L., McConnell, I., und Hope, J. (1994a) 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* **8**: 121-127.
- Manson, J.C., Clarke, A.R., McBride, P.A., McConnell, I., und Hope, J. (1994b) PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology. *Neurodegeneration* **3**: 331-340.

- Masters, C.L., Gajdusek, D.C., und Gibbs, C.J., Jr. (1981) Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Strussler syndrome. With an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain* **104**: 559-588.
- McGovern, S.L., Caselli, E., Grigorieff, N., und Shoichet, B.K. (2002) A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. *J Med Chem* **45**: 1712-1722.
- McGowan, J. (1922) Scrapie in sheep. *Scott. J. Agri* **5**: 365 – 375.
- McKenzie, D., Kaczowski, J., Marsh, R., und Aiken, J. (1994) Amphotericin B delays both scrapie agent replication and PrP-res accumulation early in infection. *J Virol* **68**: 7534-7536.
- McKinley, M.P., Bolton, D.C., und Prusiner, S.B. (1983) A protease resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* **35**: 57-62.
- Mead, S., Stumpf, M.P., Whitfield, J., Beck, J.A., Poulter, M., Campbell, T., Uphill, J.B., Goldstein, D., Alpers, M., Fisher, E.M., und Collinge, J. (2003) Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. *Science* **300**: 640-643.
- Merz, P.A., Somerville, R.A., Wisniewski, H.M., und Iqbal, K. (1981) Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol* **54**: 63-74.
- Merz, P.A., Somerville, R.A., Wisniewski, H.M., Manuelidis, L., und Manuelidis, E.E. (1983) Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* **306**: 474-476.
- Morante, S., Gonzalez-Iglesias, R., Potrich, C., Meneghini, C., Meyer-Klaucke, W., Menestrina, G., und Gasset, M. (2004) Inter- and intra-octarepeat Cu(II) site geometries in the prion protein - Implications in Cu(II) binding cooperativity and Cu(II)-mediated assemblies. *J Biol Chem* **279**: 11753-11759.
- Moser, M., Colello, R.J., Pott, U., und Oesch, B. (1995) Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* **14**: 509-517.
- Nakajima, M., Yamada, T., Kusuhara, T., Furukawa, H., Takahashi, M., Yamauchi, A., und Kataoka, Y. (2004) Results of quinacrine administration to patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* **17**: 158-163.
- Nathanson, N. (1980) Slow viruses and chronic disease: the contribution of epidemiology. *Public Health Rep* **95**: 436-443.
- Nishida, N., Tremblay, P., Sugimoto, T., Shigematsu, K., Shirabe, S., Petromilli, C., Erpel, S.P., Nakaoka, R., Atarashi, R., Houtani, T., Torchia, M., Sakaguchi, S., De Armond, S., Prusiner, S.B., und Katamine, S. (1999) A mouse prion protein transgene rescues

- mice deficient for the prion protein gene from Purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest* **79**: 689-697.
- Notari, S., Capellari, S., Giese, A., Westner, I., Baruzzi, A., Ghetti, B., Gambetti, P., Kretzschmar, H.A., und Parchi, P. (2004) Effects of different experimental conditions on the PrP^{Sc} core generated by protease digestion: implications for strain typing and molecular classification of CJD. *J Biol Chem* **279**: 16797-16804.
- Oesch, B., Westaway, D., W., Ichli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B.H., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E., Prusiner, S.B., und Weissmann, C. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**: 735-746.
- Ono, M., Haratake, M., Saji, H., und Nakayama, M. (2008) Development of novel beta-amyloid probes based on 3,5-diphenyl-1,2,4-oxadiazole. *Bioorg Med Chem* **16**: 6867-6872.
- Oxenius, A., Martinic, M.M., Hengartner, H., und Klenerman, P. (1999) CpG-containing oligonucleotides are efficient adjuvants for induction of protective antiviral immune responses with T-cell peptide vaccines. *J Virol* **73**: 4120-4126.
- Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E., und Prusiner, S.B. (1993) Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10962-10966.
- Pan, T., Wong, B.S., Liu, T., Li, R., Petersen, R.B., und Sy, M.S. (2002) Cell surface prion protein interacts with glycosaminoglycans 33. *Biochem J Pt*.
- Parchi, P., Castellani, R., Capellari, S., Ghetti, B., Young, K., Chen, S.G., Farlow, M., Dickson, D.W., Sima, A.A.F., Trojanowsky, J.Q., Petersen, R.B., und Gambetti, P. (1996) Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* **39**: 767-778.
- Parchi, P., Giese, A., Capellari, S., Brown, P., Schulz-Schaeffer, W., Windl, O., Zerr, I., Budka, H., Kopp, N., Piccardo, P., Poser, S., Rojiani, A., Streichemberger, N., Julien, J., Vital, C., Ghetti, B., Gambetti, P., und Kretzschmar, H. (1999) Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* **46**: 224-233.
- Pauly, P.C., und Harris, D.A. (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* **273**: 33107-33111.
- Peden, A.H., Head, M.W., Ritchie, D.L., Bell, J.E., und Ironside, J.W. (2004) Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* **364**: 527-529.

- Porat, Y., Abramowitz, A., und Gazit, E. (2006) Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chem Biol Drug Des* **67**: 27-37.
- Priola, S.A., Raines, A., und Caughey, W.S. (2000) Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science* **287**: 1503-1506.
- Prusiner, S.B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**: 136-144.
- Prusiner, S.B., Bolton, D.C., Groth, D.F., Bowman, K.A., Cochran, S.P., und McKinley, M.P. (1982) Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* **21**: 6942-6950.
- Prusiner, S.B., McKinley, M.P., Bowman, K.A., Bolton, D.C., Bendheim, P.E., Groth, D.F., und Glenner, G.G. (1983) Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* **35**: 349-358.
- Prusiner, S.B. (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**: 1515-1522.
- Prusiner, S.B., Groth, D., Serban, A., Stahl, N., und Gabizon, R. (1993) Attempts to restore scrapie prion infectivity after exposure to protein denaturants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 2793-2811.
- Rambold, A.S., Miesbauer, M., Olschewski, D., Seidel, R., Riemer, C., Smale, L., Brumm, L., Levy, M., Gazit, E., Oesterhelt, D., Baier, M., Becker, C.F., Engelhard, M., Winklhofer, K.F., und Tatzelt, J. (2008) Green tea extracts interfere with the stress-protective activity of PrP and the formation of PrP. *J Neurochem* **107**: 218-229.
- Rieger, R., Edenhofer, F., Lasmezas, C.I., und Weiss, S. (1997) The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med* **3**: 1383-1388.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R., und Wöhrlich, K. (1997) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Letters* **413**: 282-386.
- Riesner, D., Kellings, K., Post, K., Wille, H., Serban, H., Groth, D., Baldwin, M.A., und Prusiner, S.B. (1996) Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high α -helical content and lacking scrapie infectivity. *J Virol* **70**: 1714-1722.
- Rudd, P.M., Endo, T., Colominas, C., Groth, D., Wheeler, S.F., Harvey, D.J., Wormald, M.R., Serban, H., Prusiner, S.B., Kobata, A., und Dwek, R.A. (1999) Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13044-13050.
- Ryan, A.J., Gray, N.M., Lowe, P.N., und Chung, C.W. (2003) Effect of detergent on "promiscuous" inhibitors. *J Med Chem* **46**: 3448-3451.

- Safar, J., Roller, P.P., Gajdusek, D.C., und Gibbs, C.J. (1993a) Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem* **268**: 20276-20284.
- Safar, J., Roller, P.P., Gajdusek, D.C., und Gibbs, C.J., Jr. (1993b) Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity. *Protein Sci* **2**: 2206-2216.
- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F.E., und Prusiner, S.B. (1998) Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations. *Nat Med* **4**: 1157-1165.
- Sailer, A., Boller, H., Fischer, M., Aguzzi, A., und Weissmann, C. (1994) No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* **77**: 967-968.
- Schätzl, H.M., Da Costa, M., Taylor, L., Cohen, F.E., und Prusiner, S.B. (1995) Prion protein gene variation among primates. *J Mol Biol* **245**: 362-374.
- Schenk, D.B., Seubert, P., Grundman, M., und Black, R. (2005) A beta immunotherapy: Lessons learned for potential treatment of Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* **2**: 255-260.
- Schiffer, N.W., Broadley, S.A., Hirschberger, T., Tavan, P., Kretzschmar, H.A., Giese, A., Haass, C., Hartl, F.U., und Schmid, B. (2007) Identification of anti-prion compounds as efficient inhibitors of polyglutamine protein aggregation in a zebrafish model. *J Biol Chem* **282**: 9195-9203.
- Schwarz, A., Kratke, O., Burwinkel, M., Riemer, C., Schultz, J., Henklein, P., Bammé, T., und Baier, M. (2003) Immunisation with a synthetic prion protein-derived peptide prolongs survival times of mice orally exposed to the scrapie agent. *Neurosci Lett* **350**: 187-189.
- Sekijima, Y., Dendle, M.A., und Kelly, J.W. (2006) Orally administered diflunisal stabilizes transthyretin against dissociation required for amyloidogenesis. *Amyloid* **13**: 236-249.
- Seneca, N., Cai, L., Liow, J.S., Zoghbi, S.S., Gladding, R.L., Hong, J., Pike, V.W., und Innis, R.B. (2007) Brain and whole-body imaging in nonhuman primates with [¹¹C]MeS-IMPY, a candidate radioligand for beta-amyloid plaques. *Nucl Med Biol* **34**: 681-689.
- Sethi, S., Lipford, G., Wagner, H., und Kretzschmar, H. (2002) Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity. *Lancet* **360**: 229-230.
- Shyng, S.L., Huber, M.T., und Harris, D.A. (1993) A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **268**: 15922-15928.

- Sigurdsson, E.M., Brown, D.R., Daniels, M., Kascsak, R.J., Kascsak, R., Carp, R., Meeker, H.C., Frangione, B., und Wisniewski, T. (2002) Immunization delays the onset of prion disease in mice 7. *Am J Pathol* **161**: 13-17.
- Silveira, J.R., Raymond, G.J., Hughson, A.G., Race, R.E., Sim, V.L., Hayes, S.F., und Caughey, B. (2005) The most infectious prion protein particles. *Nature* **437**: 257-261.
- Solforosi, L., Criado, J.R., McGavern, D.B., Wirz, S., Sanchez-Alavez, M., Sugama, S., DeGiorgio, L.A., Volpe, B.T., Wiseman, E., Abalos, G., Masliah, E., Gilden, D., Oldstone, M.B., Conti, B., und Williamson, R.A. (2004) Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science* **303**: 1514-1516.
- Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K., und Prusiner, S.B. (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **51**: 229-240.
- Stahl, N., Baldwin, M.A., Teplow, D.B., Hood, L., Gibson, B.W., Burlingame, A.L., und Prusiner, S.B. (1993) Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* **32**: 1991-2002.
- Stimson, E., Hope, J., Chong, A., und Burlingame, A.L. (1999) Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. *Biochemistry* **38**: 4885-4886.
- Stockmann, S. (1913) Scrapie: an obscure disease of sheep. *J Comp Pathol* **26**: 317-329.
- Supattapone, S., Wille, H., Uyechi, L., Safar, J., Tremblay, P., Szoka, F.C., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., und Scott, M.R. (2001) Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. *J Virol* **75**: 3453-3461.
- Switaj, T., Jalili, A., Jakubowska, A.B., Drela, N., Stoksik, M., Nowis, D., Basak, G., Golab, J., Wysocki, P.J., Mackiewicz, A., Sasor, A., Socha, K., Jakobisiak, M., und Lasek, W. (2004) CpG immunostimulatory oligodeoxynucleotide 1826 enhances antitumor effect of interleukin 12 gene-modified tumor vaccine in a melanoma model in mice. *Clin Cancer Res* **10**: 4165-4175.
- Tagliavini, F., McArthur, R.A., Canciani, B., Giaccone, G., Porro, M., Bugiani, M., Lievens, P.M.J., Bugiani, O., Peri, E., DallAra, P., und et al. (1997) Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters. *Science* **276**: 1119-1122.
- Tal, Y., Souan, L., Cohen, I.R., Meiner, Z., Taraboulos, A., und Mor, F. (2003) Complete Freund's adjuvant immunization prolongs survival in experimental prion disease in mice. *J Neurosci Res* **71**: 286-290.
- Tateishi, J., Brown, P., Kitamoto, T., Hoque, Z.M., Roos, R., Wollman, R., Cervenkov, L., und Gajdusek, D.C. (1995) First experimental transmission of fatal familial insomnia. *Nature* **376**: 434-435.

- Telling, G.C., Parchi, P., DeArmond, S.J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P., and Prusiner, S.B. (1996) Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* **274**: 2079-2082.
- Thormar, H. (1971) Slow infections of the central nervous system. II. *Z Neurol* **199**: 151-166.
- Tobler, I., Deboer, T., und Fischer, M. (1997) Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *J Neurosci* **17**: 1869-1879.
- Vabulas, R.M., Pircher, H., Lipford, G.B., Hacker, H., und Wagner, H. (2000) CpG-DNA activates in vivo T cell epitope presenting dendritic cells to trigger protective antiviral cytotoxic T cell responses. *J Immunol* **164**: 2372-2378.
- van Rheede, T., Smolenaars, M.M.W., Madsen, O., und de Jong, W.W. (2003) Molecular evolution of the mammalian prion protein. *Mol Biol Evol* **20**: 111-121.
- Veber, D.F., Johnson, S.R., Cheng, H.Y., Smith, B.R., Ward, K.W., und Kopple, K.D. (2002) Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* **45**: 2615-2623.
- Viles, J.H., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Goodin, D.B., Wright, P.E., und Dyson, H.J. (1999) Copper binding to the prion protein: Structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2042-2047.
- Wadsworth, J.D., Joiner, S., Hill, A.F., Campbell, T.A., Desbruslais, M., Luthert, P.J., und Collinge, J. (2001) Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* **358**: 171-180.
- Weber, P., Reznicek, L., Mitteregger, G., Kretzschmar, H., und Giese, A. (2008) Differential effects of prion particle size on infectivity in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **369**: 924-928.
- Wells, G.A.H., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.D., Jeffrey, M., Dawson, M., und Bradley, R. (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy. *Vet Rec* **121**: 419-420.
- White, A.R., Enever, P., Tayebi, M., Mushens, R., Linehan, J., Brandner, S., Anstee, D., Collinge, J., und Hawke, S. (2003) Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature* **422**: 80-83.
- Will, R.G., Ironside, J.W., Zeidler, M., Cousens, S.N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., und Smith, P.G. (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **347**: 921-925.
- Williams, A., Lucassen, P.J., Ritchie, D., und Bruce, M. (1997) PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Exp Neurol* **144**: 433-438.

- Williams, E.S., und Young, S. (1980) Chronic wasting disease of captive mule deer: spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis* **16**: 89-98.
- Wyatt, J.M., Pearson, G.R., Smerdon, T.N., Gruffydd-Jones, T.J., Wells, G.A.H., und Wilesmith, J.W. (1991) Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Vet Rec* **129**: 233-236.
- Ye, L., Morgenstern, J.L., Gee, A.D., Hong, G., Brown, J., und Lockhart, A. (2005) Delineation of positron emission tomography imaging agent binding sites on beta-amyloid peptide fibrils. *J Biol Chem* **280**: 23599-23604.
- Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez, G.F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G., und Wuthrich, K. (2000) NMR solution structure of the human prion protein [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 145-150.

8. Veröffentlichungen

Patentanmeldung

Wagner, J., Ryazanov, S., Leonov, A., Habeck, M., Weber, P., Hirschberger, T., Geissen, M., Groschup, M., Griesinger, C., Tavan, P., Kretzschmar H., Bertsch, U., Giese, A. (2009) New drugs for inhibiting aggregation of proteins involved in diseases linked to protein aggregation and/or neurodegenerative diseases. PCT/EP 2009/004144.

9. Danksagung

Prof. Dr. Armin Giese möchte ich meinen herzlichsten Dank aussprechen, da ohne seine Bereitschaft zum wissenschaftlichen Gespräch, Rückendeckung und das Vertrauen, das mir entgegengebracht wurde, die Durchführung der Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. A. Kretzschmar für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Unterstützung bei der Durchführung.

Herrn Prof. Dr. Thomas Cremer danke ich für die stets interessierte und entgegenkommende Art bei der Betreuung meiner Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Michael Schmidt, Brigitte Kraft und Janina Mielke für die Hilfe bei der experimentellen Durchführung. Bedanken möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern des ZNP, wobei Martin Fuhrmann ein ganz besonderer Dank für die anregenden Diskussionen und hilfsbereite Unterstützung gilt.

Natürlich möchte ich mich auch bei den „Ehemaligen“ Marko Maringer, Niklas Piening, Alexander Hepp, Steffanie Ochs und Kathrin Dittmer bedanken, die immer mit Rat und Tat bei Problemen zur Seite standen.

Mein größter Dank geht an meine Familie und meine Freundin Simona, auf deren Unterstützung und Verständnis in sämtlicher Hinsicht und in allen Bereichen ich mich immer verlassen konnte.

10. Lebenslauf

Name	Jens Wagner
Geburtstag	20.01.1978
Geburtsort	Marburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

1984-1988 Grundschule Wetter

1988-1997 Gymnasium Martin-Luther Schule, Marburg
1997 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

1997-1998 Wehrdienst

1998-2003 Philipps-Universität Marburg, Studiengang: Diplom-Biologie

2000 Vordiplom

2001 Industriepraktikum BASF AG Ludwigshafen

2002-2003 Diplomarbeit (Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie)
Thema:

Molekulare Analyse von *lccA-D* und *aygA* aus *Aspergillus nidulans*

9/2003 Diplomprüfung, Abschluss: gut

Hauptfach: Mikrobiologie

Nebenfächer: Genetik, Biochemie und Informatik

2007-2009 Fernuniversität Hagen, Weiterbildungsprogramm „Betriebswirt(IWW)“

2/2009 Examen zum Betriebswirt (IWW), Abschluss: gut

seit April 2004 Promotion am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der
Ludwig-Maximilians-Universität München