

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Systematische Entwicklung neuer Wirkstoffe für die kausale Therapie von
Prionkrankheiten**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer Doktorin
der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von
Fabienne Leidel
Zweibrücken

Hannover 2014

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Martin H. Groschup

Institut für Neue und Neuartige Tierseuchenerreger,
Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin H. Groschup

2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Moennig

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2014

Diese Forschungsarbeit wurde am Institut für neue und neuartige Tierseuchenerreger des Friedrich-Loeffler-Institutes (FLI), Insel Riems angefertigt.

Für meine Eltern
In Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Diese Dissertation basiert auf fünf Veröffentlichungen in international anerkannten Fachzeitschriften mit Gutachtersystem (peer review).

1	Enleitung	1
2	Manuskript I	
	From cell culture to mouse model: Identification of two new inhibitors of Prion disease	6
2.1	Abstract	7
3	Manuskript II	
	Piperazine derivatives inhibit PrP/PrP(res) propagation <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	8
3.1	Abstract	9
4	Manuskript III	
	Diphenyl-pyrazole derived compounds increase survival time of mice after prion infection	10
4.1	Abstract	11
5	Manuskript IV	
	A medicinal herb <i>Scutellaria lateriflora</i> inhibits PrP replication <i>in vitro</i> and delays the onset of prion disease in mice	12
5.1	Abstract	13
6	Manuskript V	
	Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson´s disease	14
6.1	Abstract	16
7	Übergreifende Diskussion	17
7.1	<i>In vitro</i> -Testsystem	17
7.2	Mausmodell	21
7.3	Wirkungsmechanismen	24

8	Zusammenfassung	26
9	Summary	29
10	Literaturverzeichnis	31
11	Anhang	42
11.1	Erklärungen über die erbrachten Eigenleistungen gemäß § 8 Promotionsordnung der Tierärztlichen Hochschule Hannover.....	42
12	Danksagung	45

Abkürzungsverzeichnis

µM	Mikromol
Abb.	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase
BACE 1	Beta-Sekretase 1
BI	Black
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
BTD	Benzothiazol-Derivat
bzw.	beziehungsweise
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, <i>Creutzfeldt-Jakob-Disease</i>
CWD	Chronisch-zehrende Krankheit der Hirsche, <i>Chronic-Wasting-Disease</i>
<i>DKP</i>	Diketopiperazin
DPP	Diphenyl-Pyrazol
et al.	und andere, et alii bzw. et aliae
fCJD	familiäre CJD
FFI	Fatale Familiäre Insomnie (Schlaflosigkeit)
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
<i>Hsp</i>	Hitze-Schock-Proteine
i.c.	intrazerebral
i.p.	intraperitoneal
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
INNT	Institut für Neue und Neuartige Tierseuchenerreger
Kuru	Kuru-Krankheit
LMU	Ludwig-Maximilian-Universität

PD	Piperazin-Derivat
PPS	Pentosanpolysulfat
RML	Rocky-Mountain-Labor-Stamm, <i>Rocky-Mountain-Laboratory</i>
Prnp-Gen	PrP-kodierendes Gen
pp	pages
PrP	Prion-Protein
PrP ^C	zelluläres Prion-Protein (C, <i>cellular</i>)
PrP ^{res}	Proteinase K-resistentes Prion-Protein
PrP ^{Sc}	infektiöses Prion-Protein, Prion (Sc, Scrapie)
recPr	Rekombinantes Prion-Protein
sCJD	sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
ScN ₂ a-Zellen	Maus-Neuroblastoma-Zellen
S. lateriflora	Scutellaria lateriflora
Sc	Scrapie
Si	<i>small interfering</i>
SIFT	<i>Scanning for Intensely Fluorescent Targets</i>
SMB	Scrapie Mouse Brain
TME	Schwammartige Hirndegeneration der Nerze, <i>Transmissible Mink Encephalopathy</i>
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
u.	und
u.a.	unter anderem
USA	United States of America
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
vCJD	Variante der CJD
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) stellen eine Gruppe von Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) dar, deren Leitbild durch einen stets tödlich verlaufenden, neurodegenerativen Krankheitsprozess charakterisiert ist. Sie kommen sowohl im Tierreich als auch beim Menschen vor und sind durch das Auftreten der Traberkrankheit (Scrapie) bei Schafen und Ziegen (MCGOWAN 1922), der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE; WELLS et al. 1987; JEFFREY u. WELLS 1988; KIRKWOOD et al. 1990) bei Rindern und der Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD; WILL et al. 1996a) beim Menschen in den Fokus von Wissenschaft und Öffentlichkeit gerückt.

Die TSE-Erkrankungen des Menschen werden ursächlich in sporadische, erbliche und erworbene Erkrankungen unterteilt. Die sporadische Form der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJD; COLLINS et al. 2004) ist die häufigste humane TSE-Erkrankung (LADOGANA et al. 2005). Die gehäuft auftretenden Formen, zu denen die familiären CJD (fCJD; JAKOB 1921), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom (GSS; GERSTMANN et al. 1936) und die Fatale Familiäre Schlaflosigkeit (FFI; LUGARESI et al. 1986) zählen, sind durch Mutationen im PrP-kodierenden Gen (Prnp-Gen; JACKSON u. COLLINGE 2001) bedingt.

Zur Gruppe der erworbenen humanen TSE-Erkrankungen zählen die Kuru-Krankheit (Kuru; ZIGAS u. GAJDUSEK 1957) und die Variante der CJD (vCJD), welche 1996 zum ersten Mal beschrieben wurde und mit der Aufnahme BSE-kontaminierter Nahrungsmittel in Verbindung gebracht wird (COLLINGE et al. 1996; LASMÉZAS et al. 1996; WILL et al. 1996b; BRUCE et al. 1997). Auch in anderen Spezies tritt die Krankheit auf, darunter fallen die Transmissible Mink Encephalopathy (TME; BURGER u. HARTSOUGH 1965; HARTSOUGH u. BURGER 1965; MARSH u. HADLOW 1992) bei Nerzen, die Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE; WYATT et al. 1990, WILLOUGHBY et al. 1992, KIRKWOOD u. CUNNINGHAM 1994) bei Katzen und die Chronic Wasting Disease (CWD; WILLIAMS u. YOUNG 1980; WILLIAMS u. YOUNG 1992) bei Zerviden.

Trotz intensiver Forschung sind wichtige Fragen zum Verständnis von TSE-Erkrankungen und der Natur des Erregers noch nicht vollständig geklärt. Die derzeit weitgehend akzeptierte „Protein-only“-Hypothese (PRUSINER 1982) geht davon aus, dass es sich bei dem infektiösen Agens um sogenannte „proteinaceous infectious particles“, kurz als Prionen bezeichnet, handelt. Laut PRUSINER (1982) entstehen Prionen durch Umwandlung (Konversion) des körpereigenen Prion-Proteins (PrP^{C} , C für cellular = zellulär) in seine pathologische Isoform (PrP^{Sc} , Sc für Scrapie). Das zelluläre Prion-Protein, das ubiquitär in Säugetieren und auch in anderen Vertebraten vorkommt, ist an der Zelloberfläche lokalisiert und über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Zellmembran verbunden. Seine Funktion ist weitgehend ungeklärt, ihm wird jedoch eine wichtige Rolle bei der synaptischen Plastizität zugesprochen (CAIATI et al. 2013)

PrP^{C} und PrP^{Sc} besitzen die gleiche Aminosäuresequenz, unterscheiden sich jedoch in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften. Das proteaseresistente und wasserunlösliche PrP^{Sc} aggregiert zu amyloiden Plaques, welche nicht vom Organismus abgebaut werden können. Für den Mechanismus der Umwandlung in die pathologische Form werden zwei Modelle diskutiert; das „template-assistance“- und das „seeded-polymerization“-Modell (Abb. 1). Im „template-assistance“-Modell interagiert das zelluläre PrP^{C} mit PrP^{Sc} , das als Matrize (template) für die Umwandlung in die pathologische Form fungiert. Das entstehende $\text{PrP}^{\text{Sc}}\text{-PrP}^{\text{Sc}}$ -Homodimer dissoziiert anschließend wieder, um erneut als Matrize für die Interaktion mit weiteren PrP^{C} -Molekülen zu dienen oder sich letztendlich in Amyloid-Fibrillen zusammen zu lagern. Im „seeded-polymerization“-Modell interagiert zelluläres PrP^{C} mit PrP^{Sc} -Aggregaten, die als Nukleationskerne (seeds) agieren und die Umwandlung von PrP^{C} in PrP^{Sc} katalysieren. Die entstehenden Amyloide zerfallen bei einer bestimmten Größe. Die entstehenden Fragmente dienen wiederum als Nukleationskerne für weitere Konversionen (TUIE u. COX 2003).

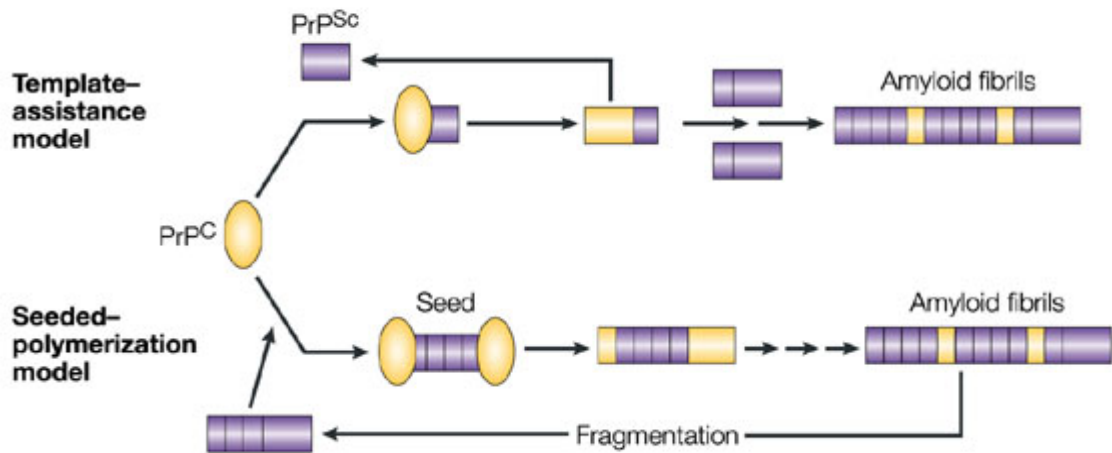


Abb. 1: „Template-assistance“- und „seeded-polymerization“-Modell (TUIE u. COX 2003)

Wie die Nervenzellschädigung durch die gebildeten und akkumulierten Prionen letztlich erfolgt, ist nicht vollständig geklärt. Untersuchungen zeigten, dass die bei der Bildung von PrP^{Sc}-Fibrillen und Amyloid-Plaques entstehenden Zwischenformen, sogenannte diffuse PrP^{Sc}-Oligomere, zu einer spezifischen Schädigung von Membranstrukturen führen können (CAUGHEY u. LANSBURY 2003), welche die Synapsenfunktion stören (SENATORE et al. 2013) oder direkt neurotoxische Signale induzieren (HAFNER-BRATKOVIC et al. 2012). Andere Untersuchungen zeigten, dass PrP^{Sc}-Aggregate nach Internalisierung das endosomale Kompartiment schädigen können (POGGIOLINI et al. 2013).

Die genaue Infektionsroute konnte beim Rind im Rahmen einer BSE-Pathogenesestudie aufgeklärt werden. So konnte durch orale Infektionsexperimente an Rindern gezeigt werden, dass der Übertritt von PrP^{Sc} an den Peyerschen Platten des distalen Ileums erfolgt und der Erreger von dort über das enterische Nervensystem weiter in das zentrale Nervensystem gelangt (HOFFMANN et al. 2007, KAATZ et al. 2012).

Die Inkubationszeit bis zum Auftreten der klinischen Symptome dauert bei der klassischen BSE dosisabhängig etwa zwei bis acht Jahre (ANDERSON 1996). Erkrankte Tiere zeigen neurologische Symptome wie Verhaltensänderungen,

Bewegungs- und Sensibilitätsstörungen, Schreckhaftigkeit, Tremor und Ataxien (FOSTER et al. 2001).

Die Diagnose einer TSE-Erkrankung beim Menschen bedeutet für die Patienten eine bisher nicht heilbare Krankheit, die durch einen schnell fortschreitenden mentalen Verfall, welcher sich in Persönlichkeitsveränderungen, Demenz, Bewegungsstörungen und Koma manifestiert, zum Tod führt. Das ZNS weist schwammartige Veränderungen, Nervenzellverluste und astrozytäre Gliosen auf. Bislang wurden in mehr als 30 Studien 14 verschiedene chemische Wirkstoffe zur therapeutischen Behandlung von Patienten eingesetzt, ohne dass diese eine kurative Wirkung zeigten (STEWART et al. 2008). Insofern stehen bisher weder eine wirkungsvolle kausale noch eine symptomatische Therapie zur Verfügung (STEWART et al. 2008).

Ziel dieser Arbeit war daher die Identifizierung von neuen Wirkstoffen zur Linderung, Behandlung und/oder Verhütung von TSE-Erkrankungen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit erfolgte der Einsatz eines von GEISSEN et al. (2011) am FLI etablierten zellbasierten Screening-Systems. Dieses Hochdurchsatz-Screening-System beruht auf der Verwendung permanent Scrapie-infizierter Zelllinien, die zusammen mit potentiellen Prion-Hemmstoffen kokultiviert werden. Durch die Verwendung von 96-well-Platten lässt sich eine chemische Substanzbibliothek mit tausenden Wirkstoffen vergleichsweise effektiv screenen, so dass mit diesem Ansatz die Identifizierung von Substanzen, welche einerseits die Konversion und Akkumulation des Prion-Proteins hemmen und andererseits bereits bestehende Aggregate auflösen, gelingt. In der Arbeitsgruppe waren beim Screening einer chemischen Substanzbibliothek aus 10.000 Substanzen bereits Hemmstoffe gefunden worden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden für diese, sowie für die im Rahmen der vorliegenden Studie ermittelten Hemmstoffe, welche durch sieben verschiedene Leitmotive charakterisiert sind, die *in vitro*-zytotoxischen Eigenschaften bestimmt und ihre Anti-Prion-Wirksamkeit über Dosis-Wirkungskurven als mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) ermittelt.

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgte die Überprüfung der Wirksamkeit der effektivsten Zellkultur-Inhibitoren im Mausmodell. Nach Abklärung der *in vivo*-Unschädlichkeit

wurden die Substanzen an Scrapie-infizierten Mäusen auf ihre therapeutische Wirksamkeit hin getestet. Hierzu wurden die Mäuse mit einem Maus-passagierten Scrapiestamm inokuliert und der Einfluss der Wirkstoffe auf die Entstehung und das Fortschreiten der Erkrankung anhand der Verlängerung der Inkubationszeiten ermittelt. In einem zusätzlichen prophylaktischen Ansatz wurde für die therapeutisch effektiven Substanzen die krankheitsverhütende Wirkung nach erfolgter Exposition mit dem Erreger überprüft.

2 Manuskript I

Chemmedchem

Volume 6, Issue 10, pp 1928-1937, October 2011

Published online: 13. July 2011: DOI: 10.1002/cmdc.201100119

From cell culture to mouse model: Identification of two new inhibitors of Prion disease

Geissen M.^{1, 6}, Leidel F.¹, Eiden M.¹, Hirschberger T.², Hoffmann C.¹, Bertsch U.^{3, 4}, Tavan P.², Kretzschmar H.⁴, Schaetzel H.M.⁵ and Groschup M.H.^{1, *}

1 Institute for Novel and Emerging Infectious Diseases at the Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald- Insel Riems, Germany,

2 Arbeitsgruppe Theoretische Biophysik, Lehrstuhl für BioMolekulare Optik, LMU, Munich, Germany,

3 Institute of Immunology, UK S-H, Kiel, Germany,

4 Centres for Neuropathology and Prion Research, LMU, Munich, Germany,

5 Wyoming Excellence Chair in Prion Biology, University of Wyoming, Laramie, U.S.A.,

6 Department of Vascular Medicine, UKE, Hamburg, Germany.

*** Corresponding author**

2.1 Abstract

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) or prion diseases belong to a category of fatal and so far untreatable neurodegenerative conditions. All prion diseases are characterized by both degeneration in the central nervous system (CNS) in humans and animals and the deposition and accumulation of Proteinase K-resistant prion protein (PrP^{res}). Until now, no pharmaceutical product has been available to cure these diseases or to alleviate their associated symptoms. Here, a cell-culture screening system is described that allows for the large-scale analysis of the PrP^{res} inhibitory potential of a library of compounds and the identification of structural motifs leading potent compounds able to cause PrP^{res} clearance at the cellular level. Based on different scrapie-infected cell lines, 10000 substances were tested, out of which 530 potential inhibitors were identified. After re-screening and validation using a series of dilutions, 14 compounds were identified as the most effective. These 14 compounds were then used for therapeutic studies in a mouse bioassay to test and verify their in vivo potency. Two compounds exhibited therapeutic potential in the mouse model by significantly extending the survival time of intracerebrally infected mice, when treated 90 days after infection with scrapie.

3 Manuskript II

Biochemical and Biophysical Research Communications

Volume 445, Issue 1, pp 23-29, Februar 2014

Published online: 03. February 2014: DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.122

Piperazine derivatives inhibit PrP/PrP(res) propagation in vitro and in vivo.

Fabienne Leidel¹, Martin Eiden¹, Markus Geissen², Thomas Hirschberger³, Paul Tavan³, Armin Giese⁴, Hans A. Kretzschmar⁴, Hermann Schätzl⁵ and Martin H. Groschup^{1*}

¹ Institute for Novel and Emerging Infectious Diseases at the Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald-Insel Riems

² Department of Vascular Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany

³ Theoretische Biophysik, Lehrstuhl für Biomolekulare Optik, Ludwig-Maximilians Universität, München, Germany

⁴ Institut für Neuropathologie, Ludwig-Maximilians Universität, München, Germany

⁵ Department of Molecular Biology and of Veterinary Sciences, University of Wyoming, Laramie, WY, USA

*** Corresponding author**

Keywords: Piperazine, cell assay, prion, inhibitor

3.1 Abstract

Prion diseases are fatal neurodegenerative disorders, which are not curable and no effective treatment exists so far. The major neuropathological change in diseased brains is the conversion of the normal cellular form of the prion protein PrP(C) into a disease-associated isoform PrP(Sc). PrP(Sc) accumulates into multimeres and fibrillar aggregates, which leads to the formation of amyloid plaques. Increasing evidence indicates a fundamental role of PrP(Sc) species and its aggregation in the pathogenesis of prion diseases, which initiates the pathological cascade and leads to neurodegeneration accompanied by spongiform changes. In search of compounds that have the potential to interfere with PrP(Sc) formation and propagation, we used a cell based assay for the screening of potential aggregation inhibitors. The assay deals with a permanently prion infected cell line that was adapted for a high-throughput screening of a compound library composed of 10,000 compounds (DIVERset 2, ChemBridge). We could detect six different classes of highly potent inhibitors of PrP(Sc) propagation in vitro and identified piperazine derivatives as a new inhibitory lead structure, which increased incubation time of scrapie infected mice

4 Manuskript III

Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Volume 55, Issue 10, pp 4774-4781, October 2011

Published online: 11. July 2011: DOI: 10.1128/AAC.00151-11

Diphenyl-pyrazole derived compounds increase survival time of mice after prion infection

Fabienne Leidel[†], Martin Eiden[†], Markus Geissen^{†°}, Hans A. Kretzschmar[#], Armin Giese[#], Thomas Hirschberger[‡], Paul Tavan[‡], Hermann M. Schätzl[§] and Martin H. Groschup^{†*}

[†] Institute for Novel and Emerging Infectious Diseases at the Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald-Insel Riems, Germany

[#] Institute for Neuropathology, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany

[§] Department of Molecular Biology and of Veterinary Sciences, University of Wyoming, USA

[‡] Arbeitsgruppe Theoretische Biophysik, Lehrstuhl für BioMolekulare Optik, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany

[°]present address: Department of Vascular Medicine, UKE, Hamburg, Germany

* **Corresponding author**

Short title: DPP as prion inhibitors

4.1 Abstract

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) represent a group of fatal neurodegenerative disorders which can be transmitted by natural infection or inoculation. TSEs include scrapie in sheep, BSE in cattle, and Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans. The emergence of a variant form of CJD (vCJD) which has been associated to BSE, produced strong pressure to search for effective treatments with new drugs. Up to now, however, TSEs are incurable, although many efforts have been made *in vitro* as well as *in vivo* for the search for potent therapeutic and prophylactic compounds.

For this purpose we analyzed a compound library consisting of 10.000 compounds with a cell-based high-throughput screening assay dealing with scrapie-infected SMB and ScN₂A cells and identified a new class of inhibitors consisting of 3,5-diphenylpyrazole (DPP) derivatives. The most effective DPP derivative showed half-maximal inhibition of PrP^{Sc} formation at concentrations (IC₅₀) of 0.6 μM and 1.2 μM respectively. This compound was subsequently subjected to a number of animal experiments using scrapie infected wild type C57Bl/6 and transgenic Tga 20 mice. The DPP derivative induced a significant increase of incubation time both in therapeutic and prophylactic experiments. The onset of the prion disease was delayed by 37 days after intraperitoneal and 42 days after oral application, respectively. In summary, we have shown a high *in vitro* efficiency of DPPs against prion infections which was substantiated *in vivo* for one of these compounds. These results indicate that the novel class of DPP compounds should comprise excellent candidates for future therapeutic studies.

5 Manuskript IV

Frontiers in Psychiatry

Volume 3, p 9, February 2012

Published online: 17. February 2012: DOI: 10.3389/fpsy.2012.00009

A medicinal herb *Scutellaria lateriflora* inhibits PrP replication *in vitro* and delays the onset of prion disease in mice

Martin Eiden¹, Fabienne Leidel¹, Barbara Strohmeier¹, Christine Fast¹, and Martin H. Groschup^{*1}

¹Institute for Novel and Emerging Infectious Diseases at the Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Greifswald-Insel Riems, Germany

***Corresponding author**

Keywords: Prion-Protein, inhibitor, *Scutellaria lateriflora*, Baicalein, Baicalin

5.1 Abstract

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) are characterized by the misfolding of the host encoded prion protein (PrP^C) into a pathogenic isoform (PrP^{Sc}) which leads to the accumulation of β -sheet-rich fibrils and subsequent loss of neurons and synaptic functions. Although many compounds have been identified which inhibit accumulation or dissolve fibrils and aggregates in vitro there is no therapeutic treatment to stop these progressive neurodegenerative diseases. Here we describe the effects of the traditional medicinal herb *Scutellaria lateriflora* (*S. lateriflora*) and its natural compounds, the flavonoids baicalein and baicalin, on the development of prion disease using in vitro and in vivo models. *S. lateriflora* extract as well as both constituents reduced the PrP^{res} accumulation in scrapie-infected cell cultures and cell-free conversion assays and lead to the destabilization of pre-existing PrP^{Sc} fibrils. Moreover, tea prepared from *S. lateriflora*, prolonged significantly the incubation time of scrapie-infected mice upon oral treatment. Therefore *S. lateriflora* extracts as well as the individual compounds can be considered as promising candidates for the development of new therapeutic drugs against TSEs and other neurodegenerative diseases like Alzheimer's and Parkinson's disease.

6 Manuskript V

Acta Neuropathologica

Volume 125, Issue 6, pp 795-813, Juni 2013

Published online: 19. April 2013: DOI: 10.1007/s00401-013-1114-9

Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson's disease.

Jens Wagner^{1,#}, Sergey Ryazanov^{2,3,#}, Andrei Leonov^{2,3,#}, Johannes Levin^{4,#}, Song Shi^{1,#}, Felix Schmidt^{1,4}, Catharina Prix¹, Francisco Pan-Montojo⁵, Uwe Bertsch^{1,14}, Gerda Mitteregger-Kretzschmar¹, Markus Geissen^{6,15}, Martin Eiden⁶, Fabienne Leidel⁶, Thomas Hirschberger⁷, Andreas A. Deeg⁷, Julian J. Krauth⁷, Wolfgang Zinth⁷, Paul Tavan⁷, Jens Pilger^{2,3}, Markus Zweckstetter^{2,3,8}, Tobias Frank^{3,9}, Mathias Bähr^{3,9}, Jochen Weishaupt^{3,9}, Manfred Uhr¹⁰, Henning Urlaub¹¹, Ulrike Teichmann¹², Matthias Samwer¹³, Kai Bötzel⁴, Martin Groschup⁶, Hans Kretzschmar¹, Christian Griesinger^{2,3,*}, Armin Giese^{1,*}

1 Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany

2 NMR-basierte Strukturbiologie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Germany

3 DFG Center for the Molecular Physiology of the Brain (CMPB), Göttingen, Germany

4 Neurologische Klinik, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany

5 Institute for Anatomy, Medical Faculty, TU-Dresden, Dresden, Germany

6 Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Greifswald-Insel Riems, Germany

7 BioMolekulare Optik, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany

8 German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Göttingen, Germany

9 Neurologie, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen, Germany

10 Labor für Pharmakokinetik, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, Germany

11 Bioanalytische Massenspektrometrie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, & Bioanalytics, Department of Clinical Chemistry, University Medical Center, Göttingen, Germany

12 Tierhaltung, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Germany

13 Zelluläre Logistik, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Germany

14 current address: Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel, Germany

15 current address: Department of Vascular Medicine, UKE, Hamburg, Germany

***Corresponding authors**

6.1 Abstract

In neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD) and prion diseases, deposits of aggregated disease-specific proteins are found. Oligomeric aggregates are presumed to be the key neurotoxic agent. Here we describe the novel oligomer modulator anle138b [3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(3-bromophenyl)-1*H*-pyrazole], an aggregation inhibitor we developed based on a systematic high-throughput screening campaign combined with medicinal chemistry optimization. *In vitro*, anle138b blocked the formation of pathological aggregates of prion protein (PrP^{Sc}) and of α -synuclein (α -syn), which is deposited in PD and other synucleinopathies such as dementia with Lewy bodies (DLB) and multiple system atrophy (MSA). Notably, anle138b strongly inhibited all prion strains tested including BSE-derived and human prions. Anle138b showed structure-dependent binding to pathological aggregates and strongly inhibited formation of pathological oligomers *in vitro* and *in vivo* both for prion protein and α -synuclein. Both in mouse models of prion disease and in three different PD mouse models, anle138b strongly inhibited oligomer accumulation, neuronal degeneration, and disease progression *in vivo*. Anle138b had no detectable toxicity at therapeutic doses and an excellent oral bioavailability and blood-brain-barrier penetration. Our findings indicate that oligomer modulators provide a new approach for disease-modifying therapy in these diseases, for which only symptomatic treatment is available so far. Moreover, our findings suggest that pathological oligomers in neurodegenerative diseases share structural features, although the main protein component is disease-specific, indicating that compounds such as anle138b that modulate oligomer formation by targeting structure-dependent epitopes can have a broad spectrum of activity in the treatment of different protein aggregation diseases.

7 Übergreifende Diskussion

7.1 *In vitro*-Testsystem

Um therapeutisch wirksame Substanzen für den Einsatz gegen Prionkrankheiten zu identifizieren, stehen zum einen *in vitro*-Systeme und zum anderen Tiermodelle als Testverfahren zur Verfügung. Der Vorteil der *in vitro*-Systeme liegt, neben dem Verzicht auf Tierversuche, in der schnellen und zielgerichteten Suche in einem genau definierten System. So gelang durch Untersuchungen in zellfreien Konversions-Assays und in zellbasierten Testsystemen die Ermittlung zahlreicher Inhibitoren (KOCISKO et al. 2003, 2006, TREVITT u. COLLINGE 2006).

In den zellfreien Systemen wird zelluläres PrP^C mit aufgereinigtem PrP^{Sc} inkubiert und die Bildung des neu konvertierten PrP^{Sc} quantifiziert. Nach Zugabe der Testsubstanzen werden potentielle Inhibitoren anhand ihres Einflusses auf die Konversion und Aggregation bestimmt. Beispiele sind Kongorot und andere Farbstoffe wie Trypanblau (DEMAIMAY et al. 1998, 2000), Porphyrine und Pthalocyanine (CAUGHEY et al. 1998), aber auch Flavonoide, wie Baicalein und Baicalin, die direkt mit PrP^{Sc} interferieren (EIDEN et al. 2011). Ein weiteres *in vitro*-Verfahren stellt die auf Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie basierende Methode des *Scanning for Intensely Fluorescent Targets* (SIFT) dar. Mit diesem Verfahren kann, über mit fluoreszierenden Farbstoffen markierte Prion-Aggregate, die Hemmung der Prion-Aggregation durch zugegebene Substanzen *in vitro* gemessen werden. Mit dieser Technik konnten z.B. Benzohydrazin-Derivate als effektive Inhibitoren detektiert werden (BERTSCH et al. 2005). Neben den zellfreien Verfahren stellen zellbasierte *in vitro*-Systeme, auf der Basis von permanent PrP^{Sc} produzierenden (das heißt Scrapie-infizierten) Zellen, eine weitere Möglichkeit zur systematischen Suche nach neuen Wirkstoffen dar. Eingesetzt wurden hierzu u.a. Neuroblastom-Zellen (z.B. N₂a-Zellen), Fibroblasten (z.B. NIH/3T3), Epithelzellen (z.B. RK 13) und Myoblasten, die in der Regel mit mausadaptierten Scrapiestämmen infiziert waren (VILETTE 2008). Mit Hilfe dieser zellbasierten Assays konnten neben

Inhibitoren, die direkt mit PrP^{Sc} und PrP^{Sc}-Aggregaten wechselwirken, auch Substanzen identifiziert werden, die indirekt auf die PrP^{Sc}-Akkumulation einwirken. Derartige indirekte Wirkungsmechanismen stellen die Wechselwirkung mit Chaperonen, die Prozessierung des zellulären PrP^C, die Stabilisierung der PrP-Monomere oder die Wechselwirkung mit Protein-Abbauprozessen (Abb. 2) dar. Die inhibitorische Wirkung führt letztlich immer zu einer Hemmung der PrP-Aggregation oder zu einer Reduktion der PrP/PrP^{Sc}-Aggregate.

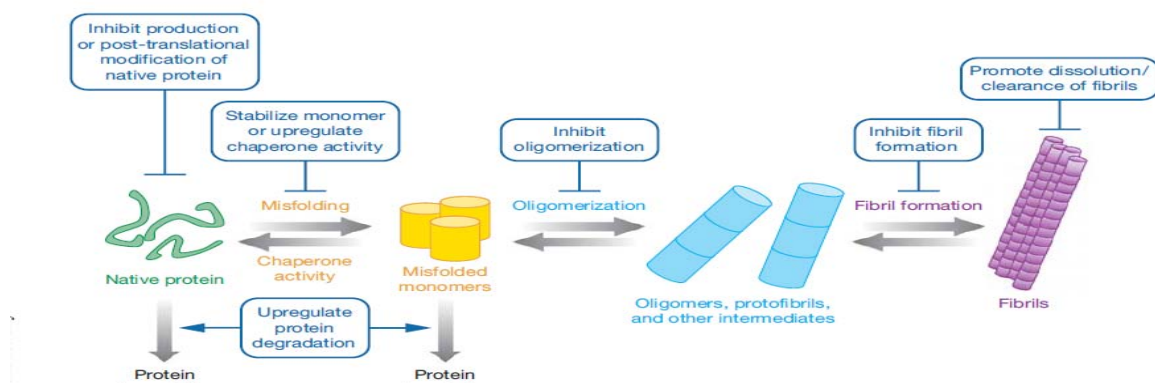


Abb. 2: Angriffspunkte potentieller Wirkstoffe auf die Protein Aggregation und Fibrillenbildung (SKOVRONSKY 2006)

Zu den mittels zellbasierter Assays determinierten Inhibitoren zählen Pentosanpolysulphat (CAUGHEY u. RAYMOND 1993, DOH-URA et al. 2004), Suramin (NUNZIANTE et al. 2005), Tetrapyrrole (CAUGHEY et al. 1998), Antibiotika wie Amphotericin B (MANGE et al. 2000) und Tetrazyklin (DE LUIGI et al. 2008), Anti-Malaria-Medikamente wie Quinacrin und Chloroquin (DOH-URA et al. 2000) und natürliche Substanzen wie Curcumin (CAUGHEY et al. 2003, KOCISKO et al. 2005). Auch Flavonoide wie Baicalein und Baicalin und Extrakte des Helmkrautes (*Scutellaria lateriflora*) können die PrP^{Sc}-Akkumulation hemmen (EIDEN et al. 2011). Die Inhibition erfolgt dabei durch eine direkte Wechselwirkung der Substanzen mit PrP^{Sc} und den entstehenden PrP^{Sc}-Aggregaten.

Zudem wurden Ansätze verfolgt mit Prion-spezifischen Antikörpern die Konversion und Aggregation von PrP^{Sc} zu inhibieren. Dabei konnten verschiedene wirksame Antikörper detektiert werden (ENARI et al. 2001, BERINGUE et al. 2004,

FÉRAUDET et al. 2004), deren Effekte auf der Bindung der Antikörper an zelluläres PrP^C beruht. In der Folge wird dadurch deren Interaktion mit PrP^{Sc}-Aggregaten verhindert, so dass kein neues Substrat für die Konversion und Fibrillenbildung zur Verfügung steht.

Inhibitorische Effekte wurden ebenfalls durch die Anwendung von RNA-Interferenz erzielt. Dabei wird durch Zugabe von *small interfering* (si) RNA-Molekülen die Expression von PrP^C und damit auch die (Neu-)Bildung von PrP^{Sc} unterdrückt (DAUDE et al. 2003, TILLY et al. 2003). Schließlich wurden Prion-inhibitorische Eigenschaften auch für Inhibitoren von Signaltransduktionswegen festgestellt. So konnte mit dem Antikrebsmittel Gleevec (Imatinib), das verschiedene Tyrosinkinase inhibiert, auch eine starke Reduktion von PrP^{Sc} in der Zellkultur festgestellt werden (ERTMER et al. 2004). Der Wirkmechanismus liegt hierbei nicht in der direkten Wechselwirkung mit PrP/PrP^{Sc}, sondern in der Aktivierung des lysosomalen Abbaus von PrP^{Sc}-Aggregaten.

Um systematisch weitere Wirkstoffe zu finden und auch Substanzbibliotheken mit mehreren tausend Einzelsubstanzen auf effektive Inhibitoren zu durchsuchen, etablierten GEISSEN et al. (2011) am FLI ein zellkulturbasiertes Hochdurchsatzverfahren, welches den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit darstellt. Die Grundlage dieses Testsystems bilden permanent infizierte Zelllinien mit kontinuierlicher PrP^{Sc}-Replikation (CLARKE u. HAIG 1970, BOSQUE u. PRUSINER 2000, KLOEHN et al. 2003), welche auf ein 96-well-Format adaptiert wurden. Desweiteren etablierten GEISSEN et al. (2011) ein Dotblot-System als spezifisches Detektionsverfahren und testeten 10.000 Substanzen einer Substanzbibliothek (DIVERset 1) der Firma ChemBridge auf Ihre PrP^{Sc}-inhibitorische Wirkung. Darauf fußend wurde in der vorliegenden Arbeit eine zweite Substanzbibliothek (DIVERset 2, ChemBridge) mit ebenfalls 10.000 Einzelsubstanzen plattenweise prozessiert und nach Wirkstoffen in diesem zellkulturbasierten Hochdurchsatzverfahren durchsucht (LEIDEL et al. 2014). Beide DIVERset-Bibliotheken zeichnen sich durch eine große Vielfalt an strukturell unterschiedlichen Substanzen mit potentieller biologischer Aktivität aus. Aus den Bibliotheken konnten 73 (DIVERset 1, GEISSEN et al. 2011), beziehungsweise 52 (DIVERset 2, LEIDEL et al. 2014) hochwirksame Substanzen

ermittelt werden. Wiederkehrende Substanzmotive aus der DIVERset 1 Bibliothek waren dabei Phenylbenzamid-, Naphtalen-, Benzylidenhydrazin-, Benzothiazol-, Nitrobenzen- und Diphenylpyrazol-Derivate. Einige der identifizierten Substanzen erzielten zudem inhibitorische Effekte im zellfreien Konversionsversuch und bei der Expression des zellulären PrP^C (GEISSEN et al. 2011). Aus der DIVERset 2 Bibliothek konnten insgesamt 7 inhibitorischen Substanzklassen herausgefiltert werden, wovon die Gruppen der Benzimidazole, Quinoline und Indole bereits als TSE hemmende Substanzen in der Literatur beschrieben waren (THOMPSON et al. 2011, MAYS et al. 2012, STANTON et al. 2012). Zudem konnten wiederum Diphenylpyrazole und Benzothiophene als wirksame Inhibitoren der PrP^{Sc}-Akkumulation bestimmt werden (GEISSEN et al. 2011, LEIDEL et al. 2014). Zusätzlich wurden Piperazinverbindungen als hochwirksame Inhibitoren identifiziert (LEIDEL et al. 2014).

Die effektivsten Inhibitoren wurden im zweiten Teil dieser Arbeit auf ihre therapeutische Wirksamkeit im Tierversuch getestet. Um zytotoxische Effekte auszuschließen, wurden die selektierten Substanzen zudem auf mögliche schädliche Eigenschaften hin im kolorimetrischen MTT-Test untersucht (MOSMANN et al. 1983), wobei keine der eingesetzten Substanzen eine zellschädigende Wirkung aufwies (GEISSEN et al. 2011, LEIDEL et al. 2011, 2014)

7.2 Mausmodell

Da sich die Ergebnisse der Zellkulturexperimente nicht direkt auf die Vorgänge im lebenden Organismus übertragen lassen, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die Wirksamkeit der *in vitro* identifizierten Substanzen im Tiermodell überprüft. Die Auswahl der Substanzen für die Testung im Tiermodell erfolgte anhand der im zellbasierten Assay ermittelten IC₅₀-Werte. Demnach wurden ein Diphenylpyrazol-Derivat (DPP-1) und vier Piperazin-Derivate (PD 1-4), sowie 14 weitere im Zellkulturversuch hochpotente PrP^{Sc}-Inhibitoren auf ihre Wirksamkeit gegen TSE-Erreger überprüft. Zudem war Helmkraut-Tee Gegenstand der Wirksamkeitsprüfung im Tier (EIDEN et al. 2011, GEISSEN et al. 2011, LEIDEL et al. 2011, 2014).

Die Substanzen wurden an Scrapie-infizierten Mäusen getestet und die therapeutische Wirkung anhand der Verlängerung der Inkubationszeit bestimmt. Je nach Applikationsart und verwendetem Mausmodell (C57BL/6- und Tga20-Mäuse) lag die Inkubationszeit der Kontrollen zwischen 110 und 170 Tagen.

In der C57BL/6-Wildtyp-Mauslinie ist der Verlauf der Scrapie-Erkrankung mit dem etablierten Rocky-Mountain-Labor-Stamm (RML) hinsichtlich des Läsionsmusters und der Inkubationszeit genau charakterisiert (BRUCE et al. 1991). Zusätzlich wurden Tga20-Mäuse, welche das murine PrP^C um den Faktor 10 überexprimieren und dadurch eine verkürzten Inkubationszeit besitzen, eingesetzt (FISCHER et al. 1996). Dies ermöglichte eine zusätzliche Kontrolle und Verifikation der im Wildtyp-Modell ermittelten therapeutischen Effekte.

Zunächst wurde die *in vivo*-Unschädlichkeit der ausgewählten Substanzen für den Organismus getestet (Toxizitätsstudie). Durch pathologische und histopathologische Untersuchungen relevanter Organe (unter anderem Leber, Milz, Niere und Pankreas) konnten unmittelbar schädliche Wirkungen der eingesetzten Substanzen ausgeschlossen werden. Ein Ausschluss von Langzeitschädigungen des Organismus war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob die ausgewählten Substanzen eine Wirkung auf die Inkubationszeit beziehungsweise den klinischen Verlauf bei experimentell intrazerebral (i.c.) infizierten Tieren zeigten. Dabei wurden die Substanzen

intraperitoneal (i.p.) durch tägliche Injektion über einen Zeitraum von 20 Tagen appliziert, um die Testung der Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit mit in den Versuchsaufbau einzubeziehen. Um dem Szenario einer natürlichen Erkrankung und Therapie Rechnung zu tragen, begann die Behandlung zu der Zeit, als die ersten Symptome zu erwarten waren. Vier Substanzen, ein Benzothiofen-Derivat, ein Benzothiazol-Derivat (BTD), ein Diphenylpyrazol-Derivat (DPP-1) und ein Piperazin-Derivat (PD-3) konnten eine signifikante Verzögerung des Krankheitsausbruchs erzielen (GEISSEN et al. 2011; LEIDEL et al. 2011, 2014). BTD und DPP-1 wurden anschließend in weiteren therapeutischen Versuchen eingesetzt und auf ihren therapeutischen Nutzen hin getestet.

Da die physikalisch-chemischen und pharmakologischen Eigenschaften der detektierten Substanzen weitgehend unbekannt sind, wurden zusätzliche Applikationsformen gewählt. Zum einen die intraperitoneale (i.p.) Gabe mittels osmotischer Pumpen. Diese Applikationsart stellt einen konstanten Wirkspiegel der Substanz im Organismus sicher und vermeidet zudem eine Stressbelastung der Tiere durch die tägliche Injektion. Zum anderen wurden orale Applikatoren verwendet, um Rückschlüsse auf die orale Bioverfügbarkeit der Substanzen zu erlangen. Schließlich wurden auch Mäuse behandelt, die i.p. infiziert worden waren. Diese Form der Inokulation geht mit einer längeren Inkubationszeit im Vergleich zu einer i.c. Inokulation einher, bildet aber den Infektionsweg der Prionen im Organismus naturgetreuer ab. In allen Untersuchungen konnte die therapeutische Wirksamkeit von DPP-1 sowohl nach i.p. Applikation mittels osmotischer Pumpen, als auch nach oraler Gabe anhand einer signifikanten Verlängerung der Inkubationszeiten gezeigt werden (LEIDEL et al. 2011).

Während BTD keinen therapeutischen Nutzen im Mausmodell besaß, zeigte DPP-1, neben einem signifikanten therapeutischen Potential auch eine ausreichende orale Bioverfügbarkeit und eine potentielle Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit (LEIDEL et al. 2011)

KOCISKO (2006) zeigte eine prophylaktische Wirkung von Porphyrin-Derivaten in i.p. inokulierten Tieren. Aufgrund der überzeugenden Ergebnisse in den therapeutischen Ansätzen wurde in dieser Arbeit ebenfalls die krankheitsverhütende Wirksamkeit von

DPP-1 getestet. Dabei erzielte DPP-1 auch im prophylaktischen Applikationsmodell eine signifikante Verlängerung der Inkubationszeiten (LEIDEL et al. 2011). Zudem zeigte diese neue Substanzklasse der Diphenylpyrazole bei einer weiteren neurodegenerativen Erkrankung –Morbus Parkinson– therapeutische Effekte. So konnte durch Gabe von Diphenylpyrazol-Derivaten (Anle138b) in drei verschiedenen Mausmodellen die Überlebenszeit signifikant verlängert und die Aggregation von α -Synuklein reduziert werden (WAGNER et al. 2013).

Neben den DPP-Derivaten konnten bisher nur wenige Substanzen eine signifikante Wirkung gegen eine TSE Erkrankung nach oraler Applikation erzielen. Dazu zählen die Flavonoide Baicalein und Baicalin, die in dieser Arbeit in Form von Helmkraut-Tee bei Scrapie-infizierten Mäusen eingesetzt wurden und zu einer signifikanten Verlängerung der Inkubationszeiten führten (EIDEN et al. 2011). Weitere Substanzen sind das Statin Pravastatin (VETRUGNO et al. 2009) und das Polysaccharid Fucoidan (DOH-URA 2007). Andere Substanzen wie Curcumin und Pentosanpolysulfat (PPS), die *in vitro* hochwirksam waren, besaßen keine signifikante Wirkung nach oraler Behandlung (FARQUHAR 1999, CAUGHEY et al. 2003).

Nur wenige der im Tiermodell wirksamen Substanzen wurden bisher bei Creutzfeldt-Jakob-Patienten angewandt. Zu ihnen gehören Amphotericin B, Quinacrin oder PPS (HAIK et al. 2004, WHITTLE 2006, STEWART et al. 2008). Weitere bei Creutzfeldt-Jakob-Patienten eingesetzte Substanzen waren Flupirtine (OTTO et al. 2004), Aciclovir (DAVID 1984, NEWMAN 1984) und Amantadine (NERI et al 1984). Jedoch konnte keine der eingesetzten Substanzen einen Behandlungserfolg erzielen. Somit steht bislang kein wirksames Mittel gegen die Krankheitsursache oder die Symptomatik zur Verfügung und macht eine intensive Forschung nach anwendbaren Wirkstoffen unerlässlich.

Anle138b, ein synthetisches DPP-Derivat, das in Mausbioassays neben einer Anti-Prion-Wirkung auch eine Anti-Parkinson-Wirkung besitzt, soll voraussichtlich im Jahr 2015 erstmals beim Menschen im Rahmen einer Phase 1-Studie eingesetzt werden.

7.3 Wirkungsmechanismen

Um potentielle molekulare Wirkungsmechanismen der gefundenen Substanzen zu identifizieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere zellkulturbasierte als auch zellfreie (*in vitro*) Untersuchungen durchgeführt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die Inhibitoren weder den Proteinabbau über das Proteasomsystem beeinflussen noch, mit einer Ausnahme, in die Expression des zellulären PrP^C eingreifen (GEISSEN et al. 2011, LEIDEL et al. 2011).

Die Wirkung des Helmkrauttees beruht auf der direkten Wechselwirkung seiner Komponenten Baicalein und Baicalin mit der PrP^{Sc}-Akkumulation und einer Destabilisierung bereits bestehender PrP^{Sc}-Aggregate. Offensichtlich können diese Flavonoide eine spezifische Bindung mit den PrP-Aggregaten eingehen, wie sie auch bereits bei der Interaktion mit α -Synuklein Aggregaten gezeigt wurde (ZHU et al. 2004). Ebenso ist eine Reduktion des PrP^{Sc}-Spiegels durch die Einlagerung der Flavonoide in die β -Faltblattstrukturen denkbar, was eine PrP^{Sc}-Degradierung durch lysosomale Proteasen bewirken könnte (EIDEN et al. 2011).

Bei den Substanzen aus der Gruppe der Diphenylpyrazole und Piperazine konnte keine direkte Interaktion mit PrP/PrP^{Sc}-Aggregaten in zellfreien Assays gezeigt werden. Die Wirksamkeit im Zellkultursystem bzw. im Mausmodell basiert daher wahrscheinlich auf einem indirekten Wirkungsmechanismus. Eine Möglichkeit ist die Wechselwirkung mit Ko-Faktoren der Protein(-fehl)faltung und/oder Prion-Protein-Aggregation. Dies würde auch die fehlende Hemmung der PrP^{Sc}-Akkumulation im zellfreien Konversionsversuch erklären, da dieser ausschließlich mit aufgereinigtem Prion-Protein arbeitet (LEIDEL et al. 2011, 2014).

Mögliche Zielproteine wären demnach z.B. Hitze-Schock (Hsp) Proteine, die als molekulare Chaperone die korrekte Faltung von Proteinen ermöglichen und den Abbau von fehlgefalteten Prionen beeinflussen (CHERNOFF et al. 2007). So werden hsp70 und 90 bei Scrapie-Erkrankungen besonders in den Purkinje-Zellen im Cerebellum hochreguliert, was vermutlich eine neuroprotektive Wirkung hervorruft (SERRANO et al. 2011). Auch im Drosophila-Modell wurde gezeigt, dass die Induktion von hsp70 die neurotoxischen Eigenschaften von Prion-Aggregaten

reduziert (ZHANG et al. 2014). Die Wirkung der Substanzen könnte daher auf einer Modulation der Hsp-Funktion basieren. In diesem Kontext wurde berichtet, dass die Hemmung von hsp90 durch ein Novobiocin-Analogon die Amyloid β -induzierte Neurodegeneration vermindert (ANSAR 2007).

Auch allgemeine Prozesse in neurodegenerativen Erkrankungen, wie die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen, könnten durch das antioxidative Potential von DPP-Derivaten durch die Hemmung von Monoaminoxidasen beeinflusst werden (MANNA et al. 2002, CHIMENTI et al. 2006).

Ein direkter Einfluss von entzündungshemmenden Substanzen auf die Verlängerung der Inkubationszeit bei Scrapie-infizierten Mäusen konnte mit dem Statin Simvastatin gezeigt werden (MOK et al. 2006, KEMPSTER et al. 2007).

Im Hinblick auf die gefundenen Piperazinverbindungen ist ebenfalls eine Beeinflussung neuroinflammatorischer Prozesse denkbar. So induzieren Piperazinverbindungen durch die Hemmung der p38 α -mitogenaktivierten Proteinkinase eine Verminderung der pro-inflammatorischen Zytokine (BROWN et al. 2012).

Zusammenfassend ermöglichte die vorliegende Arbeit durch den Einsatz eines am FLI durch GEISSEN (2011) etablierten schnellen und spezifischen zellkulturbasierten Detektionsverfahrens die *in vitro*-Testung eines sehr umfangreichen Substanzpools. Dadurch gelang die Identifizierung von neuen Strukturmotiven gegen Prionkrankheiten, für die eine therapeutische und prophylaktische Wirksamkeit im Tierversuch bestätigt werden konnte. Insbesondere für die identifizierten Pyrazol-, und Piperazinverbindungen besteht die Erwartung, dass diese nicht nur zur Therapie von Prion-Erkrankungen sondern auch von anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Morbus Alzheimer, Parkinson oder Huntington geeignet sind.

8 Zusammenfassung

Fabienne Leidel (2014)

Systematische Entwicklung neuer Wirkstoffe für die kausale Therapie von Prionkrankheiten

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) stellen eine Gruppe von Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) dar, welche sowohl im Tierreich als auch beim Menschen vorkommen und mit einem stets tödlich verlaufenden, neurodegenerativen Krankheitsprozess einhergehen. Sie sind gekennzeichnet durch die Fehlfaltung und Aggregation des wirtseigenen Prion-Proteins und lösen die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei Rindern, die Traberkrankheit (Scrapie) bei Schafen und Ziegen und die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (CJK) beim Menschen aus.

Trotz intensiver Forschung stehen bisher weder wirkungsvolle Therapeutika noch geeignete Prophylaktika zur Verfügung. Ziel dieser Arbeit war daher die Identifizierung neuer Wirkstoffe zur Linderung, Behandlung und/oder Verhütung von Prion-Erkrankungen.

Der erste Teil der vorgelegten Arbeit basierte auf dem Einsatz eines am FLI durch GEISSEN (2011) etablierten *in vitro*-Screeningmodells, welches auf der Verwendung permanent Scrapie-infizierter Zelllinien und dem Nachweis der Hemmung der PrP^{Sc}-Akkumulation und/oder der Destabilisierung bereits bestehende PrP^{Sc}-Aggregate durch ein Dotblot-System, beruht. Mittels dieses zellbasierten Hochdurchsatzverfahrens wurde eine Substanzbibliothek (DIVERset 2, ChemBridge), welche einen Pool von 10.000 strukturell unterschiedlichen Substanzen mit potentieller biologischer Aktivität umfasst, auf potentielle Wirkstoffe getestet. Insgesamt konnten 52 hochwirksame Substanzen, die die Konversion und Akkumulation des Prion-Proteins hemmen und/oder bestehende PrP^{Sc}-Aggregate auflösen, ermittelt und 7 inhibitorische Struktur motive identifiziert werden.

Um die Wirksamkeit auch im lebenden Organismus zu testen, wurden im zweiten Teil dieser Arbeit die *in vitro* identifizierten Substanzen im Tiermodell überprüft. Die Auswahl der Substanzen für die *in vivo*-Testung erfolgte anhand der durch die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) determinierten Wirkstärke. Insofern wurden ein Diphenylpyrazol-Derivat (DPP-1), vier Piperazin-Derivate (PD 1-4) sowie 14 weitere im Zellkulturversuch hochpotente PrP^{Sc}-Inhibitoren *in vivo* überprüft. Die Substanzen wurden, nach Abklärung der Unschädlichkeit für den Gesamtorganismus (Toxizität), an Scrapie-infizierten Mäusen getestet. So konnte das therapeutische Potential von Piperazin-Derivaten im Mausmodell bestätigt und die therapeutische Wirksamkeit des Diphenylpyrazol-Derivates (DPP-1) bei einer intraperitonealen Applikation als auch nach oraler Gabe gezeigt werden. Dies weist neben der signifikanten Wirksamkeit auch auf eine hinreichende orale Bioverfügbarkeit und eine potentielle Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit des Pyrazol-Derivates hin. Zudem erzielte das eingesetzte Pyrazol auch im prophylaktischen Applikationsmodell eine signifikante Verlängerung der Inkubationszeit und bestätigte damit sein Potential Prion-Erkrankungen sowohl im peripheren als auch im neuronalen Gewebe zu behandeln.

Zur Bestimmung potentieller molekularer Wirkungsmechanismen der gefundenen Substanzen wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere *in vitro*-Untersuchungen durchgeführt. Da keine direkte Interaktion der identifizierten Pyrazol-, und Piperazinverbindungen mit PrP/PrP^{Sc}-Aggregaten gezeigt werden konnte, beruht ihre TSE inhibitorische Wirkung vermutlich auf einem indirekten Wirkungsmechanismus, wie der Wechselwirkung mit Ko-Faktoren der Protein(-fehl)faltung und/oder Prionenaggregation, der Beeinflussung neuroinflammatorischer Prozesse und/oder der Funktion als Antioxidationsmittel.

Schließlich konnte auch die orale Wirkung von Helmkrauttee im Mausmodell durch eine signifikante Verlängerung der Inkubationszeit gezeigt werden. Hierbei induzierten auch die reinen Inhaltstoffe des Tees, die Flavonoide Baicalin und Baicalein, eine direkte Hemmung der PrP-Akkumulation *in vitro*.

Zusammenfassend gelang somit mittels *in vitro*-Verfahren die Identifizierung von neuen Substanzklassen gegen Prion-Erkrankungen, deren therapeutische und

gegebenenfalls sogar prophylaktische Wirksamkeit auch im Tierversuch bestätigt werden konnte. Über den Einsatz bei TSE-Erkrankungen hinaus bestehen vielleicht weitere Einsatzmöglichkeiten bei anderen Protein-Fehlfaltungskrankheiten wie z.B. Morbus Alzheimer oder Huntington. So wurde die neue Substanzklasse der Diphenylpyrazole von WAGNER (2013) in einem Mausmodell für Morbus Parkinson eingesetzt, wodurch signifikante therapeutische Effekte erzielt wurden.

9 Summary

Fabienne Leidel (2014)

Systematic identification of new compounds for the treatment of prion diseases

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) represent a group of fatal neurodegenerative disorders in animals and humans.

They are characterized by the conversion of host encoded cellular prion protein (PrP^C) into an abnormal pathological isoform named PrP^{Sc}. Prion diseases include Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in cattle, Scrapie in sheep and Creutzfeldt-Jakob-Disease (CJK) in humans.

Although intensive research and different treatment strategies against TSE has been performed over the last decades, no effective therapeutics or prophylactics are currently available.

Therefore, the goal of this study was to identify new compounds that can potentially be used for the prophylaxis of the disease or for the management of clinical signs caused by prion diseases.

In the first part of the work an *in vitro* cell based high throughput screening assay in a 96-well format was used, which dealt with scrapie-infected cells and applied a dotblot-system for the detection of potential inhibitors. Using this assay one compound library (DIVERset 2, ChemBridge) including a total number of 10.000 structurally different but potentially bioactive compounds was screened. Finally, 52 highly effective compounds based on 7 different structural motifs could be identified. Further selection of test compounds for *in vivo* testing was made by determining their medium inhibitory concentration (IC₅₀).

In the second part of the study the *in vivo* effectiveness of the compounds was evaluated in a mouse scrapie model.

For this purpose one diphenylpyrazole-derivative (DPP-1), four piperazine-derivatives (PD 1-4) as well as 14 additional PrP^{Sc}-inhibitors, that displayed the highest effectivity *in vitro*, were selected.

The animal experiments revealed a significant delay in incubation time after treatment with one piperazine (PD 3) and the diphenylpyrazole-derivative (DPP-1). Moreover, DPP-1 displayed significant therapeutic as well as prophylactic effects after intraperitoneal as well as oral administration. The results therefore confirm the bioavailability and capability to cross the blood-brain-barrier of the pyrazole-derivative. Since no direct interference of the pyrazole- and piperazine-derivatives with PrP/PrP^{Sc}-aggregates was observed, an indirect mode of action was proposed like an interaction with cofactors involved in the protein (mal-)formation and or aggregation, potential anti-oxidative effects and/or an influence on neuroinflammatory processes.

In addition, the effect of the traditional medicinal herb *Scutellaria lateriflora* was evaluated in a mouse model which resulted in a significant prolongation of the incubation period after oral application. Moreover, a direct inhibition of PrP-accumulation was observed *in vitro*, which can be attributed to two of the ingredients, the flavonoids Baicalin and Baicalein.

In conclusion new high effective substance classes against prion disease were identified *in vitro* and confirmed by *in vivo* testing. The evaluated substance classes may also represent the basis for the development of effective inhibitors of other neurodegenerative diseases like Alzheimer's Disease or Morbus Huntington. Consequential the new group of diphenylpyrazoles was already successfully tested in a mouse model for Parkinson disease (WAGNER et al. 2013).

10 Literaturverzeichnis

ANSAR, S., J. A. BURLISON, M. K. HADDEN, X. M. YU, K. E. DESINO, J. BEAN, L. NECKERS, K. L. AUDUS, M. L. MICHAELIS u. B. S. BLAGG (2007):
A non-toxic Hsp90 inhibitor protects neurons from Abeta-induced toxicity.
Bioorg Med Chem Lett. 17, 1984-90

BERINGUE, V., D. VILETTE, G. MALLINSON, F. ARCHER, M. KAISAR, M. TAYEBI, G. S. JACKSON, A. R. CLARKE, H. LAUDE, J. COLLINGE u. S. HAWKE (2004):
PrPSc binding antibodies are potent inhibitors of prion replication in cell lines.
J Biol Chem. 279, 39671-39676

BERTSCH, U., K. F. WINKLHOFFER, T. HIRSCHBERGER, J. BIESCHKE, P. WEBER, F. U. HARTL, P. TAVAN, J. TATZELT, H. A. KRETZSCHMAR u. A. GIESE (2005):
Systematic identification of antiprion drugs by high-throughput screening based on scanning for intensely fluorescent targets.
J. Virol. 79, 7785-7791

BREYDO, L., O. V. BOCHAROVA u. I. V. BASKAKOV (2005):
Semiautomated cell-free conversion of prion protein: applications for high-throughput screening of potential antiprion drugs.
Anal. Biochem. 339, 165-173

BROWN, D. S., J. G. CUMMING, P. BETHEL, J. FINLAYSON, S. GERHARDT, I. NASH, R. A. PAUPTIT, K. G. PIKE, A. REID, W. SNELSON, S. SWALLOW u. C. THOMPSON (2012):
The discovery of N-cyclopropyl-4-methyl-3-[6-(4-methylpiperazin-1-yl)-4-oxoquinazolin-3(4H)-yl]benzamide (AZD6703), a clinical p38 α MAP kinase inhibitor for the treatment of inflammatory disease.
Bioorg. Med. Chem. Lett. 22, 3879-3883

BRUCE, M. E., I. MCCONNELL, H. FRASER u. A. G. DICKINSON (1991):
The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis.
J Gen Virol. 72, 595-603

BRUCE, M. E., R. G. WILL, J. W. IRONSIDE, I. MCCONNELL, D. DRUMMOND, A. SUTTIE, L. MCCARDLE, A. CHREE, J. HOPE, C. BIRKETT, S. COUSENS, H. FRASER u. C. J. BOSTOCK (1997):
Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent.
Nature 389, 498-501

BURGER, D. u. G. R. HARTSOUGH (1965):
Encephalopathy of mink. II. Experimental and natural transmission.

J Infect Dis. 115 393-399

CAIATI, M. D., V. F. SAFIULINA, G. FATTORINI, S. SIVAKUMARAN, G. LEGNAME u. E. CHERUBINI (2013):

PrPC controls via protein kinase A the direction of synaptic plasticity in the immature hippocampus.

J Neurosci 33 2973-2983

CAUGHEY, B. u. R. E. RACE (1992):

Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red.

J Neurochem. 59,768-771

CAUGHEY, B. u. G. J. RAYMOND (1993):

Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells.

J. Virol. 67, 643-650

CAUGHEY, W. S., L. D. RAYMOND, M. HORIUCHI u. B. CAUGHEY (1998):

Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines.

Proc Natl Acad Sci U S A. 95, 12117-12122

CAUGHEY, B. u. P. T. LANSBURY (2003):

Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders.

Annu. Rev. Neurosci. 26, 267-298

CAUGHEY, B., L. D. RAYMOND, G. J. RAYMOND, L. MAXSON, J. SILVEIRA u. G. S. BARON (2003):

Inhibition of Protease-Resistant Prion Protein Accumulation in Vitro by Curcumin.

J. Virol. 77, 5499-5502

CAUGHEY, W. S., S. A. PRIOLA, D. A. KOCISKO, L. D. RAYMOND, A. WARD u. B. CAUGHEY (2007):

Cyclic tetrapyrrole sulfonation, metals, and oligomerization in antiprion activity.

Antimicrob Agents Chemother 51, 3887-3894

CEPEK, P. S. DOEHLINGER, I. BOEKHOFF, J. WILTFANG, E. IRLE, G. PERGANDE, B. ELLERS-LENZ, O. WINDL, H. A. KRETZSCHMAR, S. POSER u. H. PRANGE (2004):

Efficacy of flupirtine on cognitive function in patients with CJD: A double-blind study. Neurology 62, 714-718

CHERNOFF, Y. O. (2007):

Stress and prions: lessons from the yeast model.

FEBS Lett. 581,3695–3701

CHIMENTI, F., A. BOLASCO, F. MANNA, D. SECCI, P. CHIMENTI, O. BEFANI, P. TURINI, V. GIOVANNINI, B. MONDOVI, R. CIRILLI u. F. LA TORRE (2004):
Synthesis and selective inhibitory activity of 1-acetyl-3,5-diphenyl-4,5-dihydro-(1H)-
pyrazole derivatives against monoamine oxidase.
J Med Chem. 47, 2071-2074

COLLINGE, J., K. C. SIDLE, J. MEADS, J. IRONSIDE u. A. F. HILL (1996):
Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD.
Nature 383 685-90

COLLINS, S. J., V. A. LAWSON u. C. L. MASTERS (2004):
Transmissible spongiform encephalopathies.
Lancet 363:51-61

DAUDE, N., M. MARELLA u. J. CHABRY (2003):
Specific inhibition of pathological prion protein accumulation by small interfering
RNAs.
J. Cell Sci. 116, 2775-2779

DAVID, A. S., R. GRANT u. J. P. BALLANTYNE (1984):
Unsuccessful treatment of Creutzfeldt-Jakob disease with acyclovir.
Lancet 1, 512-513

DE LUIGI, A., L. COLOMBO, L. DIOMEDE, R. CAPOBIANCO, M. MANGIERI, C.
MICCOLO, L. LIMIDO, G. FORLONI, F. TAGLIAVINI u. M. SALMONA (2008):
The efficacy of tetracyclines in peripheral and intracerebral prion infection.
Plos One 3, e1888

DEMAIMAY, R., J. HARPER, H. GORDON, D. WEAVER, B. CHESEBRO u. B.
CAUGHEY (1998):
Structural aspects of Congo red as an inhibitor of protease-resistant prion protein
formation.
J Neurochem. 71, 2534-2541

DEMAIMAY, R., B. CHESEBRO u. B. CAUGHEY (2000):
Inhibition of formation of protease-resistant prion protein by Trypan Blue, Sirius Red
and other Congo Red analogs.
Arch Virol Suppl. 16, 277-283

DOH-URA, K., T. IWAKI u. B. CAUGHEY (2000):
Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated
prion protein accumulation.
J Virol. 74, 4894-4897

DOH-URA, K., K. ISHIKAWA, I. MURAKAMI-KUBO, K. SASAKI, S. MOHRI, R. RACE
u. T. IWAKI (2004):

Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models.

J. Virol. 78, 4999-5006

ENARI, M., E. FLECHSIG u. C. WEISSMANN (2001):

Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody.

Proc Natl Acad Sci U S A. 98, 9295-9299

ERTMER, A., S. GILCH, S. W. YUN, E. FLECHSIG, B. KLEBL, M. STEINGERLACH, M. A. KLEIN u. H. M. SCHÄTZL (2004):

The tyrosine kinase inhibitor STI571 induces cellular clearance of PrP^{Sc} in prion-infected cells.

J Biol Chem. 279, 41918-41927

FARQUHAR, C., A. DICKINSON u. M. BRUCE (1999):

Prophylactic potential of pentosan polysulphate in transmissible spongiform encephalopathies.

Lancet. 353, 117

FÉRAUDET, C., N. MOREL, S. SIMON, H. VOLLAND, Y. FROBERT, C. CRÉMINON, D. VILETTE, S. LEHMANN u. J. GRASSI (2004):

Screening of 145 anti-PrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrP^{Sc} replication in infected cells.

J Biol Chem. 280, 11247-11258

FISCHER, M., T. RULICKE, A. RAEBER, A. SAILER, M. MOSER, B. OESCH, S. BRANDNER, A. AGUZZI u. C. WEISSMANN (1996):

Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie.

Embo J. 15, 1255-1264

FOSTER, J. D., D. PARNHAM, A. CHONG, W. GOLDMANN u. N. HUNTER (2001):

Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats.

Vet Rec. 10 165-171

GERSTMANN, J., E. STRÄUSSLER u. J. SCHEINKER (1936):

Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems; zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns.

Z Ges Neurol Psychiat 154 736-762

HAFNER-BRATKOVIČ, I., M. BENČINA, K. A. FITZGERALD, D. GOLENBOCK u. R. JERALA (2012):

NLRP3 inflammasome activation in macrophage cell lines by prion protein fibrils as the source of IL-1 β and neuronal toxicity.

Cell Mol Life Sci. 69, 4215-4228

HAIK, S., J. P. BRANDEL, D. SALOMON, V. SAZDOVITCH, N. DELASNERIE-LAUPRÊTRE, J. L. LAPLANCHE, B. A. FAUCHEUX, C. SOUBRIÉ, E. BOHER, C. BELORGEY, J. J. HAUW u. A. ALPÉROVITCH (2004):

Compassionate use of quinacrine in Creutzfeldt-Jakob disease fails to show significant effects.

Neurology 63, 2413-2415

HARTSOUGH, G. R. u. D. BURGER (1965):

Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations.

J Infect Dis. 115 387-392

HILL, A. F., M. DESBRUSLAIS, S. JOINER, K. C. SIDLE, I. GOWLAND, J. COLLINGE, L. J. DOEY u. P. LANTOS (1997):

The same prion strain causes vCJD and BSE.

Nature 389, 448-450, 526.

HOFFMANN, C., U. ZIEGLER, A. BUSCHMANN, A. WEBER, L. KUPFER, A. OELSCHLEGEL, B. HAMMERSCHMIDT u. M. H. GROSCHUP (2007):

Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy.

J Gen Virol. 88 1048-1055

INGROSSO, L., A. LADOGANA u. M. POCCHIARI (1995):

Congo red prolongs the incubation period in scrapie-infected hamsters.

J. Virol. 69, 506-508

JAKOB, A. (1921):

Über eine der multiplen Sklerose klinisch nahestehende Erkrankung des Zentralnervensystems (spastische Pseudosklerose) mit bemerkenswertem anatomischem Befund.

Med. Klin. 17 372-376

JACKSON, G. S. u. J. COLLINGE (2001):

The molecular pathology of CJD: old and new variants.

Mol Pathol. 54 393-399

JEFFREY, M. u. G. A. WELLS (1988):

Spongiform encephalopathy in a nyala (*Tragelaphus angasi*)

Vet Pathol. 25:398-399

KAATZ, M., C. FAST, U. ZIEGLER, A. BALKEMA-BUSCHMANN, B. HAMMERSCHMIDT, M. KELLER, A. OELSCHLEGEL, L. MCINTYRE u. M. H. GROSCHUP (2012):

Spread of classic BSE prions from the gut via the peripheral nervous system to the brain.

Am J Pathol. 181 515-524

KEMPSTER, S., C. BATE u. A. WILLIAMS (2007):

Simvastatin treatment prolongs the survival of scrapie-infected mice.

Neuroreport. 18, 479-482

KIRKWOOD, J. K., G. A. WELLS, J. W. WILESMITH, A. A. CUNNINGHAM u. S. I. JACKSON (1990):

Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*Oryx leucoryx*) and a greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*).

Vet Rec. 127:418-420

KIRKWOOD, J. K. u. A. A. CUNNINGHAM (1994):

Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles.

Vet Rec. 135 296-303

KNIGHT, R. S. u. R. G. WILL (2006):

Unsuccessful intraventricular pentosan polysulphate treatment of variant Creutzfeldt-Jakob disease.

Acta. Neurochir. 148, 677-679

KOCISKO, D. A., G. S. BARON, R. RUBENSTEIN, J. CHEN, S. KUIZON u. B. CAUGHEY (2003):

New Inhibitors of Scrapie-Associated Prion Protein Formation in a Library of 2,000 Drugs and Natural Products.

J. Virol. 77, 10288-10294

KOCISKO, D. A., J. D. MORREY, R. E. RACE, J. CHEN u. B. CAUGHEY (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., A. L. ENGEL, K. HARBUCK, K. M. ARNOLD, E. A. OLSEN, L. D. RAYMOND, D. VILETTE u. B. CAUGHEY (2005):

Comparison of protease-resistant prion protein inhibitors in cell cultures infected with two strains of mouse and sheep scrapie

Neurosci. Lett. 388, 106-111

KOCISKO, D. A. u. B. CAUGHEY (2006):

Mefloquine, an antimalaria drug with antiprion activity in vitro, lacks activity in vivo.

J Virol 80, 1044-1046

KOCISKO, D. A. u. B. CAUGHEY (2006):

Searching for anti-prion compounds: cell-based high throughput in vitro assays and animal testing strategies.

Methods Enzymol. 412, 223-234

KOCISKO, D. A., W. S. CAUGHEY, R. E. RACE, G. ROPER, B. CAUGHEY u. J. D. MORREY (2006): A porphyrin increases survival time of mice after intracerebral prion infection.

Antimicrob. Agents Chemother. 50, 759-761

LADOGANA, A., P. CASACCIA, L. INGROSSO, M. CIBATI, M. SALVATORE, Y. G. XI, C. MASULLO u. M. POCCHIARI (1992):

Sulphate polyanions prolong the incubation period of scrapie-infected hamsters.

J. Gen. Virol. 73, 661-665

LADOGANA, A., M. PUOPOLO, E. A. CROES, H. BUDKA, C. JARIUS, S. COLLINS, G. M. KLUG, T. SUTCLIFFE, A. GIULIVI, A. ALPEROVITCH, N. DELASNERIE-LAUPRETRE, J. P. BRANDEL, S. POSER, H. KRETZSCHMAR, I. RIETVELD, E. MITROVA, P. CUESTA JDE, P. MARTINEZ-MARTIN, M. GLATZEL, A. AGUZZI, R. KNIGHT, H. WARD, M. POCCHIARI, C. M. VAN DUJN, R. G. WILL u. I. ZERR (2005):

Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada.

Neurology. 64:1586-1591

LASMÉZAS, C. I., J. P. DESLYS, R. DEMAIMAY, K. T. ADJOU, F. LAMOURY, D. DORMONT, O. ROBAIN, J. IRONSIDE u. J. J. HAUW (1996):

BSE transmission to macaques.

Nature 381, 743-744

LUGARESÍ, E., R. MEDORI, P. MONTAGNA, A. BARUZZI, P. CORTELLI, A. LUGARESÍ, P. TINUPER, M. ZUCCONI u. P. GAMBETTI (1986):

Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei.

N Engl J Med. 315 997-1003

MAYS, C. E., S. JOY, L. LI, L. YU, S. GENOVESI, F. G. WEST u. D. WESTAWAY (2012):

Prion inhibition with multivalent PrP^{Sc} binding compounds.

Biomaterials. 33, 6808-6822

MANGE, A., O. MILHAVET, H. E. MCMAHON, D. CASANOVA u. S. LEHMANN (2000):

Effect of amphotericin B on wild-type and mutated prion proteins in cultured cells: putative mechanism of action in transmissible spongiform encephalopathies.

J. Neurochem. 74, 754-762

MANNA, F., F. CHIMENTI, A. BOLASCO, D. SECCI, B. BIZZARRI, O. BEFANI, P. TURINI, B. MONDOVI, S. ALCARO u. A. TAFI (2002):

Inhibition of amine oxidases activity by 1-acetyl-3,5-diphenyl-4,5-dihydro-(1H)-pyrazole derivatives.

Bioorg Med Chem Lett 12, 3629-3633

MARSH, R. F. u. W. J. HADLOW (1992):

Transmissible mink encephalopathy

Rev Sci Tech. 11 539-550

MCGOWAN, J. (1922):

Scrapie in sheep.

Scottish Journal of Agriculture 5:365-375

MOK, S. W., K. M. THELEN, C. RIEMER, T. BAMME, S. GÜLTNER, D. LÜTJOHANN u. M. BAIER (2006):

Simvastatin prolongs survival times in prion infections of the central nervous system.

Biochem Biophys Res Commun.

348, 697-702

MURAKAMI-KUBO, I., K. DOH-URA, K. ISHIKAWA, S. KAWATAKE, K. SASAKI, J. KIRA, S. OHTA u. T. IWAKI (2004):

Quinoline derivatives are therapeutic candidates for transmissible spongiform encephalopathies.

J. Virol. 78, 1281-1288

NEWMAN, P. K. (1984):

Acyclovir in Creutzfeldt-Jakob disease.

Lancet 1, 793

NUNZIANTE, M., C. KEHLER, E. MAAS, M. U. KASSACK, M. GROSCHUP u. H. M. SCHÄTZL (2005):

Charged bipolar suramin derivatives induce aggregation of the prion protein at the cell surface and inhibit PrP^{Sc} replication.

J Cell Sci. 118, 4959-4973

POCCHIARI, M., S. SCHMITTINGER u. C. MASULLO (1987):

Amphotericin B delays the incubation period of scrapie in intracerebrally inoculated hamsters.

J. Gen. Virol. 68, 219-223

POCCHIARI, M., P. CASACCIA u. A. LADOGANA (1989):

Amphotericin B: a novel class of antiscrapie drugs.

J. Infect. Dis. 160, 795-802

POGGIOLINI, I., D. SAVERIONI u. P. PARCHI (2013):

Prion Protein Misfolding, Strains, and Neurotoxicity: An Update from Studies on Mammalian Prions.

Int J Cell Biol. 2013:910314

PRIOLA, S. A., A. RAINES u. W. S. CAUGHEY (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. (1998):

The prion diseases.

Brain Pathol. 8, 499-513

SENATORE, A., E. RESTELLI, R. CHIESA (2013):

Synaptic Dysfunction in Prion Diseases: A Trafficking Problem?

Int J Cell Biol. 2013:543803

SERRANO, C., R. BOLEA, J. LYAHYAI, H. FILALI, L. VARONA, A. MARCOS-CARCAVILLA, C. ACÍN, J. H. CALVO, M. SERRANO, J. J. BADIOLA, P. ZARAGOZA u. I. MARTÍN-BURRIEL (2011):

Changes in HSP gene and protein expression in natural scrapie with brain damage.

Vet. Res. 42, 13

SKOVRONSKY, D. M. u. V. M. LEE (2006):

Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications.

Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 1, 151–170

STANTON, J. B., D. A. SCHNEIDER, K. D. DINKEL, B. F. BALMER, T. V. BASZLER, B. A. MATHISON, D. W. BOYKIN u. A. KUMAR (2012):

Discovery of a novel, monocationic, small-molecule inhibitor of scrapie prion accumulation in cultured sheep microglia and rov cells.

PLoS One 7, e51173

STEWART, L. A., L. H. RYDZEWSKA, G. F. KEOGH u. R. S. KNIGHT (2008):

Systematic review of therapeutic interventions in human prion disease.

Neurology. 70 1272-1281

TERZANO, M. G., E. MONTANARI, S. CALZETTI, D. MANCIA u. A. LECHI (1983):

The effect of amantadine on arousal and EEG patterns in Creutzfeldt-Jakob disease.

Arch. Neurol. 40, 555-559

-
- THOMPSON, M. J., J. C. LOUTH, S. FERRARA, F. J. SORRELL, B. J. IRVING, E. J. COCHRANE, A. J. MEIJER u. B. CHEN (2011):
Structure-activity relationship refinement and further assessment of indole-3-glyoxylamides as a lead series against prion disease.
ChemMedChem. 3, 115-130
- TILLY, G., J. CHAPUIS, D. VILETTE, H. LAUDE u. J. L. VILOTTE (2003):
Efficient and specific down-regulation of prion protein expression by RNAi.
Biochem Biophys Res Commun. 305, 548-551
- TREVITT, C. R. u. J. COLLINGE (2006):
A systematic review of prion therapeutics in experimental models.
Brain 29, 2241-2265
- TUITE, M. F. u. B. S. COX (2003):
Propagation of yeast prions.
Nat Rev Mol Cell Biol. 4, 878-890
- VETRUGNO, V., M. A. DI BARI, R. NONNO, M. PUOPOLO, C. D'AGOSTINO, M. POCCHIARI u. U. AGRIMI (2009):
Oral Pravastatin prolongs survival time of scrapie-infected mice.
J. Gen. Virol. 90, 1775-80
- VILETTE, D. (2008):
Cell models of prion infection.
Vet Res. 39, 10
- WHITE, A. R., P. ENEVER, M. TAYEBI, R. MUSHENS, J. LINEHAN, S. BRANDNER, D. ANSTEE, J. COLLINGE u. S. HAWKE (2003):
Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease.
Nature 422, 80-83
- WELLS, G. A., A. C. SCOTT, C. T., JOHNSON, R. F. GUNNING, R. D. HANCOCK, M. JEFFREY, M. DAWSON u. R. BRADLEY (1987):
A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle.
Vet Rec. 121:419-420
- WHITE, A. R. u. S. H. HAWKE (2003):
Immunotherapy as a therapeutic treatment for neurodegenerative disorders.
J. Neurochem. 87, 801-808
- WILL, R. G., J. W. IRONSIDE, M. ZEIDLER, S. N. COUSENS, K. ESTIBEIRO, A. ALPEROVITCH, S. POSER, M. POCCHIARI, A. HOFMAN u. P. G. SMITH (1996a):
A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK.
Lancet. 347:921-925.

WILL, R. G., J. W. IRONSIDE, B. HORNLIMANN u. M. ZEIDLER (1996b):
Creutzfeldt-Jakob disease.
Lancet 347, 65-66

WILLIAMS, E. S. u. S. YOUNG (1980):
Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy.
J Wildl Dis. 16 89-98

WILLIAMS, E. S. u. S. YOUNG (1992):
Spongiform encephalopathies in Cervidae.
Rev Sci Tech. 11:551-567

WILLOUGHBY, K., D. F. KELLY, D. G. LYON u. G. A. WELLS (1992):
Spongiform encephalopathy in a captive puma (*Felis concolor*).
Vet Rec. 131 431-434

WONG, C., L. W. XIONG, M. HORIUCHI, L. RAYMOND, K. WEHRLY, B. CHESEBRO u. B. CAUGHEY (2001):
Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP(Sc)-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein.
EMBO. J. 20, 377-386

WYATT, J. M., G. R. PEARSON, T. N. SMERDON, T. J. GRUFFYDD-JONES u. G. A. WELLS (1990):
Spongiform encephalopathy in a cat.
Vet Rec. 126 513

ZHANG, Y., S. CASAS-TINTO, D. E. RINCON-LIMAS u. P. FERNANDEZ-FUNEZ (2014):
Combined pharmacological induction of hsp70 suppresses prion protein neurotoxicity in *Drosophila*
PLoS One. 9, e88522

ZHU, M., S. RAJAMANI, J. KAYLOR, S. HAN, F. ZHOU u. A. L. FINK (2004):
The flavonoid baicalein inhibits fibrillation of alpha-synuclein and disaggregates existing fibrils.
J Biol Chem. 279, 26846-26857

ZIGAS, V. u. D. C. GAJDUSEK (1957):
Kuru: clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea.
Med J Aust. 44 745-754

11 Anhang

11.1 Erklärungen über die erbrachten Eigenleistungen gemäß § 8 Promotionsordnung der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Gemäß § 8 Absatz 3 der Promotionsordnung der Tierärztlichen Hochschule Hannover hat der Promovent bei einer Dissertation die auf Veröffentlichungen basiert (kumulative Dissertation) an denen mehrere Autoren beteiligt waren den selbstständigen Anteil an den vorgelegten Publikationen darzulegen.

Der eigene Anteil an der vorliegenden Arbeit besteht in folgenden Beiträgen:

Manuskript !:

- Erstellen von Dosis-Wirkungs-Kurven und Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀).
- Planung, Durchführung und Auswertung der Toxizitätsprüfungen *in vitro* (MTT-Test)
- weiterführende *in vitro* Untersuchungen zur Bestimmung der molekularen Wirkungsmechanismen der PrP^{Sc} inhibierenden Substanzen/Substanzklassen
- Testung der Substanzen in N₂a-Zellen, „Proteasome-Glo-Cell-Based-Assay“, zellfreier Konversions-Versuch
- Tierversuchsplanung
- Durchführung der Tierversuche:
- Erfassung der Daten des Tierversuches
- Auswertung der Tierversuche
- Beurteilung der Tierversuchs- Ergebnisse
- Statistische Bearbeitung der erhobenen Parameter
- Beteiligung an der Auswahl der Publikations-Themen
- Beteiligung an der Anfertigung der Publikationen

Manuskript II und III:

- Planung, Durchführung und Auswertung der Zellkulturexperimente (zellkulturbasiertes Hochdurchsatzverfahren: Primär- und Sekundärscreen)
- Identifizierung von PrP^{Sc} inhibierenden Substanzen *in vitro*
- Erstellen von Dosis-Wirkungs-Kurven und Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀).
- Ermittlung PrP^{Sc} inhibitorischer Substanzklassen
- Planung, Durchführung und Auswertung der Toxizitätsprüfung *in vitro* (MTT-Test)
- weiterführende *in vitro* Untersuchungen zur Bestimmung der molekularen Wirkungsmechanismen der PrP^{Sc} inhibierenden Substanzen/Substanzklassen
- Testung der Substanzen in N₂a-Zellen, „Proteasome-Glo-Cell-Based-Assay“, zellfreier Konversions-Versuch
- Tierversuchsplanung
- Durchführung der Tierversuche:
- Erfassung der Daten des Tierversuches
- Auswertung der Tierversuche
- Beurteilung der Tierversuchs- Ergebnisse
- Statistische Bearbeitung der erhobenen Parameter
- Auswahl der Publikations-Themen
- Anfertigung der Publikationen

Manuskript IV:

- Durchführung und Auswertung von Zellkulturexperimenten
- Erstellen von Dosis-Wirkungs-Kurven und Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}).
- Planung, Durchführung und Auswertung der Toxizitätsprüfungen *in vitro* (MTT-Test)
- weiterführende *in vitro* Untersuchungen zur Bestimmung der molekularen Wirkungsmechanismen der PrP^{Sc} inhibierenden Substanzen/Substanzklassen
- Tierversuchsplanung
- Durchführung der Tierversuche:
- Erfassung der Daten des Tierversuches
- Auswertung der Tierversuche
- Beurteilung der Tierversuchs- Ergebnisse
- Statistische Bearbeitung der erhobenen Parameter
- Beteiligung an der Auswahl der Publikations-Themen
- Beteiligung an der Anfertigung der Publikationen

Manuskript V:

- Durchführung und Auswertung von zellkulturbasierten und zellfreien *in vitro* Untersuchungen
- Planung, Durchführung und Auswertung der Toxizitätsprüfung *in vitro* (MTT-Test)
- Erstellen von Dosis-Wirkungs-Kurven und Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}).

12 Danksagung

Mein allerherzlichster Dank gilt allen Menschen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Prof. Dr. Martin H. Groschup gilt mein allerbesten Dank für die Überlassung des interessanten Themas und das Vertrauen, dass er in mich gesetzt hat, als er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Promotion am Friedrich-Loeffler-Institut anzufertigen. Außerdem möchte ich mich herzlich für die konstruktive fachliche Unterstützung und die Möglichkeit bedanken, die Ergebnisse der Arbeit publizieren zu dürfen

Dr. Martin Eiden danke ich für die hervorragende thematische und emotionale Betreuung meiner Arbeit, seine fortwährende Geduld, seinen konstruktiven fachlichen Rat, seine immer freundlichen Anmerkungen und die schönen Erinnerungen an Unternehmungen außerhalb des Institutes. Durch seine gelassene und stets gut gelaunte Unterstützung hat er mir den Einstieg in die *in vitro und in vivo*-Welt, mein wissenschaftliches Arbeiten, die Anfertigung von Publikationen und letztlich die Dissertation ermöglicht. Dank Ihm gab es für jedes Problem eine Lösung und für mich ein Happy End. Das werde ich Ihm nie vergessen.

Dr. Christine Fast danke ich herzlich für ihr immer offenes Ohr, die konstruktiven Gespräche und die vielen schönen Momente, an die ich mich sehr gerne erinnere.

Bärbel, meiner Mäusefee, danke ich von Herzen für die tatkräftige und herausragende Unterstützung im ISG und den Zauber ihrer Freundschaft: „Wer etwas will findet Wege; wer etwas nicht will, findet Gründe“: Danke für die Begleitung meines Weges.

Dr. Anne Balkema-Buschmann und Dann Balkema gilt mein Dank für ihre stete Unterstützung und die unvergesslichen Momente der Ruhe in ihrem tierischen Naturparadies.

Katrin Werner und **Gerda Busch** gilt ein großes Dankeschön für die Unterstützung und die freundliche Atmosphäre im Zelllabor.

Ein großes Dankeschön an meine „**Mit-Doktoranden**“, insbesondere Imke, Diana, Leila, Katja, Martin, Barbara, Anja, Jule, und Marc für das schöne Arbeitsklima, die Freude im und außerhalb des Labors, ihre Freundschaft und die treue Begleitung meiner Zeit auf dem Riems

Darüber hinaus möchte ich ein großes Dankeschön an **Markus Geissen** und alle **Kollegen des INNT** für die tolle Unterstützung und das freundliche Klima richten.

Mein größter Dank gilt **meinen Eltern, meinen Großeltern** und allen Mitgliedern meiner lieben Familie! Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt, mir ermöglicht habt, meinen Lebensweg frei zu bestimmen und mich in jeder Lebenslage unterstützt und getragen habt.

„Unsere Familie ist das Maß unserer Stabilität und sie bestimmt unsere Loyalitäten.“
Danke für eure Liebe und euer Vertrauen!