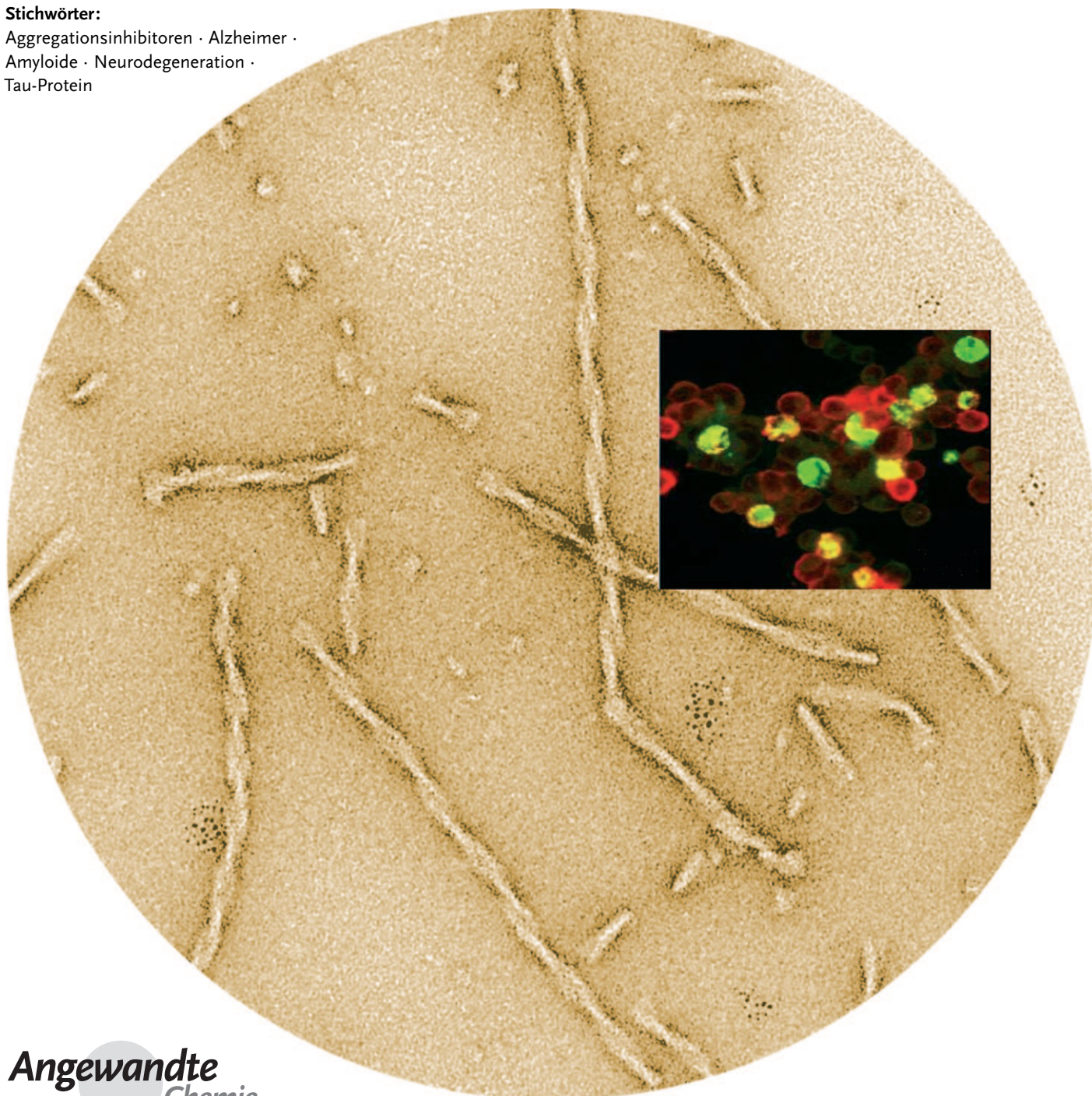


# Entwicklung von Inhibitoren der Tau-Aggregation bei Morbus Alzheimer

*Bruno Bulic,\* Marcus Pickhardt, Boris Schmidt, Eva-Maria Mandelkow, Herbert Waldmann und Eckhard Mandelkow\**

**Stichwörter:**

Aggregationsinhibitoren · Alzheimer ·  
Amyloide · Neurodegeneration ·  
Tau-Protein



**E**ine Vielzahl humaner Erkrankungen steht vermutlich in direkter Verbindung mit der Fehlfaltung von Proteinen. Hierbei werden typischerweise hochorganisierte Proteinaggregate, so genannte Amyloidfibrillen, sowie deren Aggregationsintermediate beobachtet. Diese gelten allgemein als Vermittler der Zytotoxizität und stehen demzufolge im Fokus der Forschung. Die pathologische Aggregation des Tau-Proteins ist ein Hauptmerkmal einiger neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimerkrankheit. Im vergangenen Jahrzehnt hat man sich daher verstärkt der Suche nach Inhibitoren der Tau-Aggregation als potenzielle krankheitsmodifizierende Wirkstoffe bei Morbus Alzheimer und anderen „Tauopathien“ gewidmet. Der jüngste Bericht einer klinischen Phase-II-Studie des Tau-Aggregationsinhibitors MTC stellt eine Validierung des Konzepts in Aussicht. In diesem Aufsatz fassen wir die verfügbaren Daten über niedermolekulare Inhibitoren der Tau-Aggregation von einem medizinisch-chemischen Standpunkt heraus zusammen.

## 1. Einleitung

Die Suche nach niedermolekularen Inhibitoren der Bildung von Amyloidfibrillen ist von großer Bedeutung in der akademischen und industriellen Forschung. So werden mehr als einhundert Amyloiderkrankungen, darunter Morbus Alzheimer, Tauopathien, Diabetes Mellitus Typ II und BSE, mit der Aggregation eines von zwanzig nichthomologen humanen Proteinen in Verbindung gebracht.<sup>[1,2]</sup> Es überrascht daher, dass ein Mangel an klinisch geprüften Inhibitoren der Amyloidbildung zu verzeichnen ist.<sup>[3-6]</sup> Der fehlende Erfolg ist zum einen der Zurückhaltung von Entscheidungsträgern bei unbestätigten Targets, zum anderen der Komplexität der der Fibrillenbildung und Pathogenität zugrunde liegenden Prozesse an der Grenze zwischen Biologie und Physik zuzuschreiben. Tatsächlich fehlt es an präzisen Strukturinformationen der Fibrillen auf atomarer Ebene,<sup>[7]</sup> ebenso wie an einem grundsätzlichen Verständnis der fibrillären Selbstorganisation. Die direkteste Strategie, um diese Herausforderung anzugehen, ist das Screening von Substanzbibliotheken von ausreichender struktureller Diversität. Die Identifizierung von Treffern schafft die Grundlage für nachfolgende medizinisch-chemische Studien, um Substanzen mit den erwünschten Eigenschaften, d.h. optimierter inhibitorischer Aktivität und Pharmakokinetik zugänglich zu machen.

In diesem Aufsatz betrachten wir im Schwerpunkt Inhibitoren der Tau-Aggregation. Diese Art der Aggregation ist charakteristisch für „Tauopathien“, d.h. Gehirnerkrankungen, bei denen es zu einer Assemblierung des Tau-Proteins zu abnormen Fasern („paarigen helicalen Filamenten“, PHFs) kommt, die wiederum in Neuronen und anderen zerebralen Zelltypen höher vernetzte Aggregate („neurofibrilläre Bündel“) bilden.<sup>[8-10]</sup> Elektronenmikroskopische Untersuchungen von PHFs aus dem Tau-Protein wurden erstmals durch Kidd et al. beschrieben.<sup>[11]</sup> Die PHFs bestehen aus zwei umeinander geschlungenen, im Abstand von 80 nm repetitiv überkreuzenden Filamenten und haben eine Breite zwischen

## Aus dem Inhalt

1. Einleitung	1773
2. Inhibitoren der Tau-Aggregation	1775
3. Aggregationsinhibitoren für andere amyloidogene Proteine	1781
4. Bindungsmodus	1782
5. Zusammenfassung und Ausblick	1783

8 und 20 nm. Die Filamente werden von Tau-Proteinen mit einer gekreuzten  $\beta$ -Faltblattkonformation aufgebaut.<sup>[12,13]</sup>

Die Alzheimerkrankheit (AD) ist die am weitesten verbreitete Tauopathie, daneben treten Tau-Ablagerungen

auch bei frontotemporaler Demenz (FTDP-17), der Pickschen Krankheit, Morbus Parkinson, progressiver supranukleärer Blickparese und anderen Krankheiten auf.<sup>[14,15]</sup> Bei AD bilden sich im Gehirn zwei Typen von Aggregaten: intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (Tau-Protein) und extrazelluläre senile oder amyloide Plaques bestehend aus dem A $\beta$ -Peptid, einem Spaltungsprodukt des Membranproteins APP.<sup>[16]</sup> Beide Arten von Aggregaten sind für Neuronen toxisch und basieren auf dem Prinzip der Amyloidaggregation, wonach Fasern aus Proteinuntereinheiten durch die axiale Stapelung von  $\beta$ -Strängen entstehen und so im Kern der Filamente ein gekreuztes  $\beta$ -Faltblatt aufbauen.

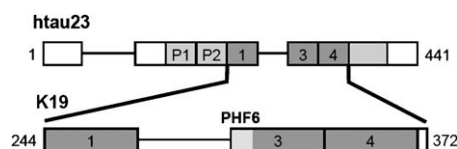
Das Tau-Protein an sich ist hoch löslich, da es größtenteils hydrophile Seitenketten enthält. Seine hauptsächliche Funktion besteht in der Stabilisierung von Mikrotubuli in neuronalen Axonen. Sie gewährleisten so die Funktion der Mikrotubuli beim axonalen Transport und als zytoskelettale Elemente beim Aufbau der Axone. Im adulten menschlichen Zentralnervensystem (ZNS) tritt Tau in sechs Hauptisoformen auf, die durch alternatives Spleißen eines Gens in

[\*] Dr. B. Bulic, Prof. H. Waldmann  
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund  
und  
Zentrum für Angewandte Chemische Genomik, Dortmund  
und  
Technische Universität Dortmund  
Fax: (+49) 231-133-2499  
E-mail: bruno.bulic@mpi-dortmund.mpg.de  
Dr. M. Pickhardt, Dr. E.-M. Mandelkow, Prof. E. Mandelkow  
Max-Planck-Arbeitsgruppe für Strukturelle Molekularbiologie  
c/o DESY, Notkestraße 85, 22607 Hamburg  
Fax: (+49) 8971-6810  
E-Mail: mand@mpasmb.desy.de  
Prof. B. Schmidt  
Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie  
Technische Universität Darmstadt  
Petersenstraße 22, 64287 Darmstadt



Chromosom 17 generiert werden und in der Länge zwischen 352 und 441 Aminosäuren variieren. Verglichen mit anderen Amyloidproteinen ist Tau insofern ungewöhnlich, als nur ein kleiner Teil des Moleküls am Prozess der abnormen Aggregation beteiligt ist. Dieser Teil, bestehend aus ein oder zwei Hexapeptidmotiven, befindet sich innerhalb der Repeat-Domäne, die aus drei oder vier Abschnitten unvollkommener Repeatsequenzen von je 31 Aminosäuren Länge besteht (je nach Isoform kann die Repeatsequenz R2 aufgrund alternativen Spleißens fehlen; Abbildung 1).<sup>[17]</sup> Da es sich bei Tau um ein nativ ungefaltetes Protein ohne definierte 3D-Struktur handelt, ist es röntgenkristallographisch nicht zugänglich, die Repeat-Domäne konnte jedoch mittels NMR-Spektroskopie analysiert werden.<sup>[18,19]</sup>

Der exakte Degenerationsweg der bei Alzheimer betroffenen Neuronen ist bisher nur mäßig verstanden und ist Gegenstand intensiver Forschungen. Dennoch besteht der allgemeine Konsens, dass Proteinaggregation ein grundlegendes



**Abbildung 1.** Im PHF-Inhibitionsassay verwendete Tau-Isoform. Konstrukt K19 (Repeat-Domäne mit drei Wiederholungen, R2 fehlt.)

Element der Zytotoxizität darstellt, weswegen verschiedene Arbeitsgruppen die Möglichkeit untersuchen, die Aggregation mithilfe niedermolekularer Wirkstoffe zu inhibieren, die zu Medikamenten weiterentwickelt werden könnten. Im Fall des Tau-Proteins sind zwei Hauptansätze zu unterscheiden: 1) Suche nach Inhibitoren der Tau-phosphorylierenden Kinasen, basierend auf der Annahme, dass abnorm phosphoryliertes Tau eher zur Aggregation neigt.<sup>[20,21]</sup> 2) Suche nach Inhibitoren des eigentlichen Aggregationsprozesses.



Eckhard Mandelkow studierte Physik in Braunschweig, New Orleans und Hamburg und promovierte am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg über die Röntgenstrukturanalyse des Tabakmosaikvirus (bei Prof. K. C. Holmes). Nach einem Postdoktorat an der Brandeis University habilitierte er am MPI in Heidelberg mit zeitaufgelösten Synchrotronstudien von Zytoskelettstrukturen. 1986 wurde er Direktor der Max-Planck-Arbeitsgruppe für Strukturelle Molekularbiologie am DESY in Hamburg und Professor an der Universität Hamburg.



Marcus Pickhardt, geboren 1966 in Cuxhaven, studierte Mikrobiologie an der Universität Göttingen (Diplom bei Prof. H. G. Schlegel) und promovierte bei Prof. R. Thomssen am Institut für Medizinische Mikrobiologie in Göttingen über die Strukturanalyse des Oberflächenproteins des Hepatitis-C-Virus. Seit 2000 ist er wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Gruppe von Prof. E. Mandelkow am Max-Planck-Institut für Strukturelle Molekularbiologie in Hamburg. Seine Forschungen gelten der Struktur des Mikrotubuli-assoziierten Tau-Proteins.



Herbert Waldmann, geboren in Neuwied, studierte Chemie an der Universität Mainz, wo er 1985 unter der Leitung von Prof. H. Kunz in organischer Chemie promovierte. Nach einem Postdoktorat bei Prof. G. Whitesides an der Harvard University habilitierte er 1991 an der Universität Mainz. Nach Professuren an den Universitäten Bonn und Karlsruhe wurde er 1999 Direktor des Max-Planck-Instituts für Molekulare Physiologie und Professor für organische Chemie an der Universität Dortmund. Seine Forschungen gelten Signaltransduktionsmodulatoren und naturstoffinspirierten Substanzbibliotheken.



Bruno Bulic, geboren in Paris, studierte Chemie und Biochemie an der Universität Paris VI (MSc bei Prof. J.-P. Genet) und promovierte 2004 bei Prof. A. Pfaltz in Basel über palladium- und kupferkatalysierte C-C-Kupplungen. Es folgte ein Postdoktorat bei Prof. H. Waldmann am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund, wo er 2006 zum Gruppenleiter ernannt wurde. Sein Forschungsschwerpunkt ist die Entwicklung von Tau-Aggregationsinhibitoren gegen Alzheimer.



Boris Schmidt, geboren 1962 in Trinidad, studierte Chemie an der Universität Hannover und am Imperial College in London und promovierte 1991 bei Prof. H. M. R. Hoffmann. Nach Forschungsaufenthalten an der Universität Uppsala und dem Scripps-Institut in La Jolla wechselte er 1999 zu Novartis CNS Research, bevor er 2002 eine Professur in medizinischer Chemie an der Technischen Universität Darmstadt annahm. Sein Hauptforschungsgebiet sind neurodegenerative Erkrankungen.



Eva-Maria Mandelkow studierte Medizin in Heidelberg und Hamburg und promovierte am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg über die Enzymkinetik des Motorproteins Myosin (bei Prof. K. C. Holmes). Es folgten Forschungsaufenthalte an der Brandeis University, am Scripps Research Institute (La Jolla) und am MPI in Heidelberg mit Schwerpunkt auf Kryo-Elektronenmikroskopie und Selbstorganisation von Mikrotubuli. 1986 wurde sie Gruppenleiterin bei den Max-Planck-Arbeitsgruppen für Strukturelle Molekularbiologie am DESY, Hamburg.

Diesen zweiten Ansatz werden wir im Folgenden behandeln. Es ist anzumerken, dass aktuelle Daten einer klinischen Phase-II-Studie mit dem Wirkstoffkandidaten MTC das Konzept einer Tau-Aggregationshemmung zur Behandlung der Alzheimerkrankheit untermauern.<sup>[95]</sup>

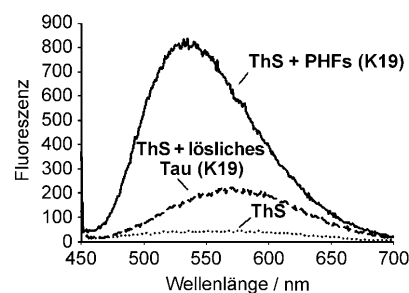
## 2. Inhibitoren der Tau-Aggregation

Für den Tau-Aggregationsassay in Gegenwart von Thioflavin S wurde das Konstrukt K19 des Tau-Proteins verwendet, das aus drei Repeat-Domänen der fetalen humanen Isoform hTau23 besteht (Abbildung 1). Dieses Protein aggregiert hoch reproduzierbar über Nacht zu PHFs und eignet sich daher für ein automatisiertes Screeningsystem. Das drei Repeat-Domänen enthaltende Tau-Konstrukt entspricht dem Kern der PHF-Struktur und enthält das Hexapeptidmotiv VQIVYK, dessen Umwandlung in ein  $\beta$ -Faltblatt zur Aggregation führt.<sup>[17]</sup>

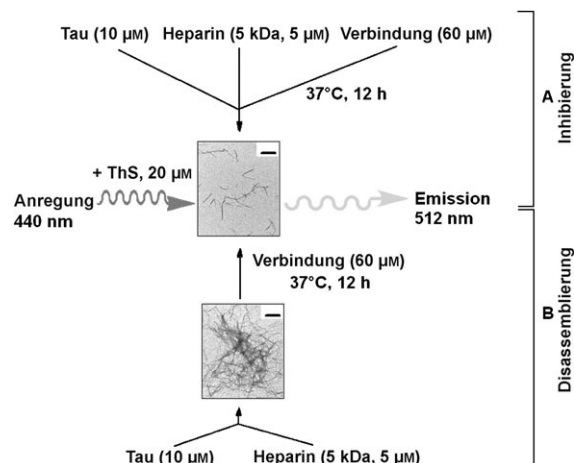
In einem Screening wurde eine Substanzbibliothek aus 200 000 Verbindungen sowohl auf die Inhibition der Tau-Aggregation als auch auf eine induzierte Disassemblierung von Tau-Aggregaten untersucht.<sup>[22]</sup> Diese zusätzliche Eigenschaft weisen nur wenige der üblichen Screeningverbindungen auf (Abbildung 2). Der für das Primärscreening verwendete Satz von Verbindungen wurde anhand der Lipinski-Regeln ausgewählt.

Das erste Screening nach aktiven Substanzen und die Validierung der Ergebnisse wurde mithilfe eines Fluoreszenzassays mit Thioflavin S durchgeführt.<sup>[24]</sup> Die Fluoreszenzemission von Thioflavin S bei 521 nm ist in der Gegenwart von PHF-Fasern deutlich erhöht (Anregung: 440 nm), und die Fluoreszenzerhöhung ist proportional zum Ausmaß der Aggregation (Abbildung 3).

Das Primärscreening wurde von Pickardt et al. beschrieben.<sup>[22, 25]</sup> Das Tau-Protein wurde unter aggregationsfördernden Bedingungen in Gegenwart der jeweiligen Testsubstanz



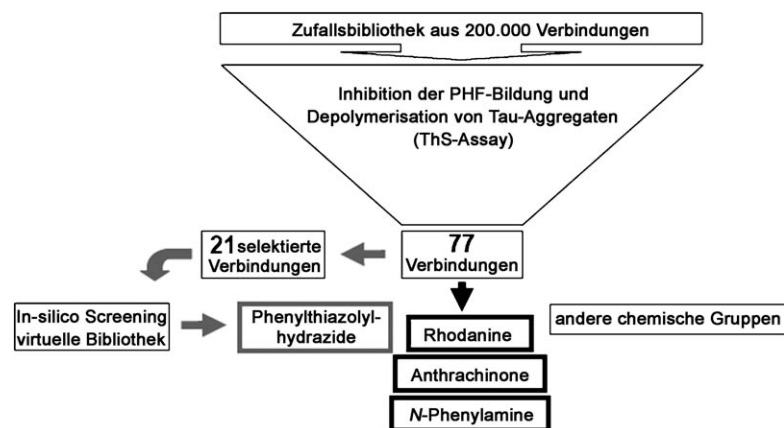
**Abbildung 3.** Die Fluoreszenz von Thioflavin S (ThS) kann zur Quantifizierung der Aggregation von Tau zu PHF-Fasern verwendet werden.



**Abbildung 4.** ThS-Fluoreszenzassays für A) Verbindungen, die die Tau-Aggregation in PHF-Fasern inhibieren, und B) Verbindungen, die zu einer Disassemblierung vorliegender PHF-Fasern führen.<sup>[27]</sup> Skalierungen in den Mikroskopiebildern: 500 nm.

über Nacht inkubiert (Abbildung 4). Nach Zugabe von Thioflavin S wurde die Aggregation durch Messung der Emission bei 521 nm quantifiziert (Anregungswellenlänge 440 nm). Typische Fluoreszenzspektren von ThS in Gegenwart löslicher oder aggregierter Proteine sind in Abbildung 3 gezeigt. Das Sekundärscreening (Disassemblierung vorliegender Tau-Fibrillen) wurde durch Inkubation von PHF-Fasern bei 37°C über Nacht in Gegenwart oder in Abwesenheit von Testverbindungen mit anschließender ThS-Fluoreszenzmessung der verbleibenden Fibrillen durchgeführt.<sup>[26]</sup> Der Z-Faktor von 0.81 bestätigt die Zuverlässigkeit des Assays, dessen Ergebnisse durch andere Methoden (Elektronenmikroskopie, Filter-/Pelletierungsassay) sowie mit anderen Tau-Konstrukten und Isoformen reproduziert werden konnten.

Generell sind die Eigenschaften des Tau-Proteins in Bezug auf die Dissoziation von Mikrotubuli und die Aggregation zu Fibrillen von seinem Phosphorylierungszustand abhängig.<sup>[28]</sup> Da das Protein bereitwillig zu paarigen helicalen Fasern polymerisiert, wurde das Screening mit unphosphoryliertem rekombi-



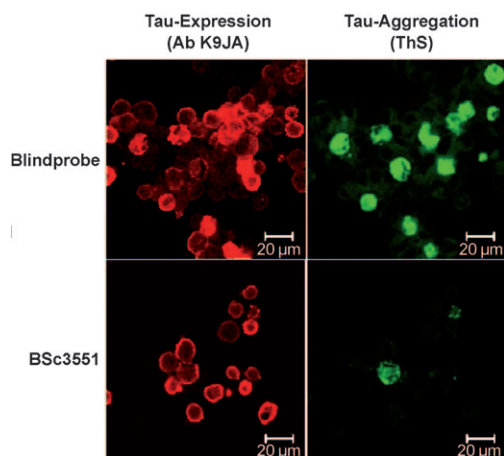
**Abbildung 2.** Screeningschema, das zu den Phenylthiazolylhydrazid- und Rhodanin-Leitstrukturen führte. Ausgehend von 200 000 Verbindungen wurden 77 Substanzen gefunden, die eine Tau-Aggregation inhibieren und vorliegende PHF-Fasern auflösen. Die chemische Klasse der Rhodanine wurde als aktiver Treffer identifiziert. Mit 21 der 77 Verbindungen wurde ein In-silico-Screening durchgeführt, aus dem die Phenylthiazolylhydrazide als erster Treffer hervorgingen.<sup>[23]</sup>

nantem Tau durchgeführt. Durch Elektronenmikroskopie und spektroskopische Methoden konnte nachgewiesen werden, dass diese Fasern den aus dem Gewebe von Alzheimergehirnen aufgereinigten Fasern ausreichend ähnlich sind, um ihre In-vitro-Aggregation als verlässliches PHF-Modell verwenden zu können.<sup>[29]</sup>

Die im primären ThS-Screening eingesetzten Substanzen wurden auf ihre mögliche Eigenfluoreszenz bei der verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlänge untersucht. Alle Verbindungen, die in Abwesenheit des Proteins ein stärkeres Fluoreszenzsignal aufwiesen als in dessen Gegenwart, wurden von den weiteren Tests ausgeschlossen. Um Effekte wie Fluoreszenzlöschung oder ThS-Fluoreszenzänderung auszuschließen, wurden die Substanzen zusätzlich mit „farbstofffreien“ Methoden wie Pelletierungs- und Filterassays, intrinsischer Tryptophanfluoreszenz oder Elektronenmikroskopie untersucht.

Unter den gefundenen Treffern waren 77 Verbindungen (=0.04% der Bibliothek) in der Lage, die PHF-Disassemblierung mit 80% Effizienz bei einer Substanzkonzentration von 60  $\mu\text{M}$  zu induzieren. Die Treffer können anhand ihrer chemischen Strukturen in wenige Gruppen unterteilt werden. Detaillierte Daten über die inhibitorische Aktivität von *N*-Phenylaminen, Anthrachinonen, Phenylthiazoylhydraziden (PTHs) und Thioxothiazolidinonen (Rhodaninen) sind an anderer Stelle beschrieben.<sup>[22,23,27,30,31]</sup>

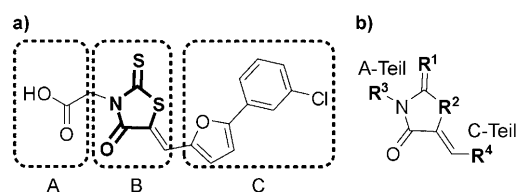
Eine erste Analyse der Struktur-Aktivitäts-Beziehung (structure-activity relationship, SAR) der PTHs und Rhodanine wurde aus In-vitro-Aktivitäten eines Syntheseprogramms abgeleitet, dessen vorrangiges Ziel es war, die Voraussetzungen für eine verbesserte inhibitorische Wirkung aufzuklären. Anschließend wurden die Verbindungen auf ihre Wirksamkeit in einem neuronalen Zellmodell der Tau-Aggregation überprüft (Abbildung 5).



**Abbildung 5.** Tau-Expression, -Aggregation und -Inhibierung in einem zellulären Modell.<sup>[23]</sup>

### 2.1. Rhodanin-Inhibitoren

Die als Treffer identifizierten Rhodanine (Abbildung 6) bilden eine interessante Klasse von Inhibitoren. Obwohl vermutet wird, dass Rhodaninderivate in vivo konjugierte



**Abbildung 6.** Strukturvariation der Rhodanin-Inhibitoren. a) Struktur der Trefferverbindung; Variationen an flankierenden Regionen des zentralen Rhodaninkerns (B-Teil) sind in den A- und C-Teilen möglich. b) Variationen am Kern ( $R^1$  und  $R^2$ ) und den flankierenden Substituenten ( $R^3$  und  $R^4$ ).<sup>[27]</sup>

Additionen durchlaufen,<sup>[32]</sup> kommen sie in der medizinischen Chemie häufig zum Einsatz, da ihre chemische Struktur mit keinerlei Nebenwirkung (z.B. Mutagenität) korreliert ist. Eine Langzeitstudie mit Epalrestat, einem Aldose-Reduktase-Inhibitor mit Indikation bei diabetischer Neuropathie, bescheinigt der Struktur eine potenzielle Bioverfügbarkeit mit hoher Toleranz.<sup>[33]</sup> Um die Relevanz des Thio-carbonylheterocyclus der Rhodaninderivate zu untersuchen, wurde der Heterocyclus unter Beibehaltung der Substituenten  $R^3$  und  $R^4$  (entspricht Teil A bzw. C in Abbildung 6a) variiert (Substitution von  $R^1$  und  $R^2$ , Abbildung 6b). Hierbei wurden Rhodanine ( $R^1 = S$  und  $R^2 = S$ ), Thiohydantoine ( $R^1 = S$  und  $R^2 = N$ ), Thioxooxazolidine ( $R^1 = S$  und  $R^2 = O$ ), Oxazolidindione ( $R^1 = O$  und  $R^2 = O$ ) und Hydantoine ( $R^1 = O$  und  $R^2 = N$ ) synthetisiert und getestet, die bei der Depolymerisation von Tau-Aggregaten folgenden Trend ergaben: Rhodanin ( $IC_{50}/DC_{50}$  (in  $\mu\text{M}$ ): 0.8/0.1) > Thiohydantoin (6.1/0.4) > Oxazolidindion (3.5/2.2) = Thioxooxazolidinon (3.1/2.4) > Hydantoin (22.6/54.3). Die  $IC_{50}$ - und  $DC_{50}$ -Werte entsprechen jeweils der In-vitro-Konzentration, bei der eine halbmaximale Inhibition der Assemblierung bzw. halbmaximale Induktion der Disassemblierung beobachtet wird. Dass sich der Rhodanin-Heterocyclus dabei am wirksamsten erwies, unterstreicht die Relevanz der Thioxogruppe der Rhodanine, die durch ihre Größe, geringe Elektronegativität und Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken als Bio-isoster der Carboxylgruppe bekannt ist.<sup>[34]</sup> Außerdem könnte die Hydrophobie des Schwefels eine entscheidende Rolle spielen, da hierdurch die Amidgruppe des Rhodanin-Heterocyclus die Fähigkeit zur Wasserstoffbrückenbildung bewahrt.

Das Substitutionsmuster am Heterocyclus war entscheidend für die Aktivität. Wasserstoffbrücken-Akzeptoren in Form von Nitrogruppen, Carboxylgruppen, Phenolen oder Sulfonaten/Sulfonamiden treten in Amyloid-Aggregationsinhibitoren häufig auf. Über die Bedeutung der Carboxylgruppe (A-Teil in Abbildung 6a), des Substitutionsmusters und der Kohlenstoffkette zwischen dem zentralen Kern und der Carboxylfunktion ist berichtet worden.<sup>[27]</sup> Die Veresterung der Carbonsäure oder ihr Ersatz durch eine Imidazol- oder Benzimidazolgruppe führten zu einer reduzierten Disassemblierungsaktivität in vitro (Tabelle 1, Verbindungen 1–4). Die Länge der Kohlenstoffkette zwischen Carboxylgruppe und Rhodaninkern (B-Teil in Abbildung 6a) wurde ebenfalls variiert, und es wurde gefunden, dass eine Verlängerung der Kette auf zwei Kohlenstoffbindungen die Inhibitorwirkung

**Tabelle 1:** Strukturen, IC<sub>50</sub>- und DC<sub>50</sub>-Werte, Zytotoxizität, PHF-Inhibition in Zellen und clogP-Werte von Rhodanin-Inhibitoren.<sup>[a]</sup>

Substanz	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>[b]</sup> [μM]	DC <sub>50</sub> <sup>[b]</sup> [μM]	LDH <sup>[c]</sup> [%]	Inhibition in Zellen <sup>[d]</sup> [%]	clogP <sup>[e]</sup>
1			0.82	0.10	12.85 ± 20.82	20.40 ± 5.37	0.59
2			4.36	1.80	24.55 ± 3.83	n.b.	4.35
3			0.67	0.94	6.14 ± 5.55	70.47 ± 4.49	5.30
4			1.09	0.80	5.91 ± 3.19	n.b.	3.82
5			0.47	0.30	3.10 ± 7.80	21.55 ± 13.82	0.60
6			1.22	1.04	13.19 ± 9.55	n.b.	0.65
7			0.97	0.77	n.b.	n.b.	1.07
8			5.03	1.66	7.58 ± 2.76	n.b.	1.15
9			7.92	1.40	59.57 ± 4.52	n.b.	1.26
10			0.17	0.13	16.49 ± 4.38	n.b.	1.77

[a] Die Substituenten R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> entsprechen den flankierenden Regionen in Abbildung 6b; R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = S. [b] Die IC<sub>50</sub>- und DC<sub>50</sub>-Werte sind die Konzentrationen für die halbmaximale Inhibition der Assemblierung bzw. Induktion der Disassemblierung (in vitro bestimmt durch ThS-Assays). Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert dreier Experimente. Die aus den Kurven bestimmte Standardabweichung der IC<sub>50</sub>- und DC<sub>50</sub>-Werte betrug 10–20%. [c] Die LDH-Werte (Lactatdehydrogenase-Freisetzung) wurden nach 24 h Inkubation mit 10 μM Substanz bestimmt und sind ein Maß für die Zytotoxizität der Substanzen in N2a-Zellen im Vergleich zur Dimethylsulfoxid(DMSO)-Negativkontrolle (gesetzt auf 0%). [d] Die nach der Inkubation mit 15 μM Substanz ermittelten Werte entsprechen dem auf Kontrollen ohne Inhibitor (0%) normierten Grad an Inhibition der Tau-Aggregation in Zellen. n.b.: Nicht bestimmt. [e] Die Logarithmen der theoretischen Wasser-Octanol-Verteilungskoeffizienten (clogP) wurden mithilfe von ChemDraw Ultra 10.0 (CambridgeSoft) berechnet.<sup>[35]</sup>

der Verbindung merklich erhöhte (Tabelle 1, Verbindungen **1**, **5** und **6**). Diese Strukturmodifikationen, die vermutlich durch eine optimierte Positionierung an der Bindungsstelle zu einer verbesserten Inhibitorwirkung führten, bewirkten bemerkenswerterweise keine Erhöhung der Disassemblierungsaktivität. Der Biarylteil C der Substanz (Abbildung 6a) wurde ebenfalls variiert, wobei die Modifikation des Furanheterocyclus zur Verringerung der Inhibitorwirkung führte (Tabelle 1, Verbindungen **1**, **7–9**). Dies ist vermutlich auf sowohl elektronische als auch sterische Faktoren zurückzuführen, da der Ersatz des Furanrings in **5** durch Thiophen in **7** ebenso eine verringerte Wirksamkeit ergab wie der Ersatz des Furans in **10** durch Pyridin in **8** (Tabelle 1).

Insgesamt scheint die Anwesenheit einer aromatischen Seitenkette, die hydrophobe und/oder Stapelwechselwirkun-

gen unterstützt, notwendig zu sein.<sup>[36]</sup> Sehr große Substituenten wie Adamantyl oder Ferrocen wurden am Ende der Seitenkette C gut toleriert und führten nur zu geringen Verlusten in der Gesamteffizienz der Verbindungen. Ebenso beeinflusste die Einführung einer Carbonsäure am Ende der Seitenkette C die Wirksamkeit nicht merklich, was die strukturelle Adaptionsfähigkeit an dieser Position unterstreicht.<sup>[27]</sup> Nach Optimierung konnte mit 0.17 μM ein interessanter IC<sub>50</sub>-Wert erzielt werden (Verbindung **10**, Tabelle 1). Die Diskrepanzen zwischen den in vitro und im zellbasierten Assay erhaltenen Wirksamkeiten (siehe auch Abbildung 12 in Abschnitt 2.3) zeigen die Notwendigkeit weiterer Optimierungen dieser Substanzklasse in Bezug auf ADME-Parameter (absorption distribution metabolism excretion), die für die In-vivo-Aktivität relevant sind. Während die festge-



stellte Toxizität in einem sicheren Bereich lag (2–8 %, LDH-Assay in N2A-Zellen, 24 h Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Substanz; siehe Abbildung 12), könnte die negativ geladene Carboxylatgruppe, die in den meisten Verbindungen vorhanden ist, die Membranpermeabilität einschränken ( $\text{clog}P$ , Tabelle 1). Unter den erhaltenen Rhodaninderivaten ist die ungeladene, Benzimidazol-substituierte Verbindung **3** am vielversprechendsten. Sie reduziert die Aggregation in Zellen um 70 %. Die hohe Effizienz könnte mit der höheren Permeabilität der Verbindung korrelieren, wodurch sich die Option ergibt, die anderen Inhibitoren durch Ersatz der Carboxylate gegen ladungsneutrale Bioisostere zu optimieren.

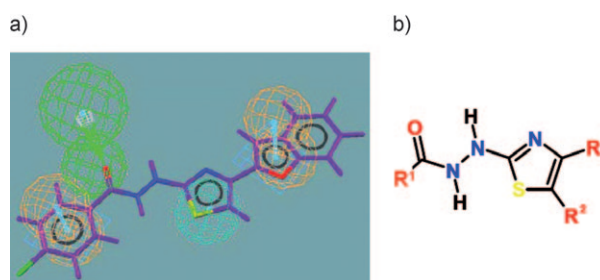
Es ist erwähnenswert, dass die Substanzen zur Disassemblierung vorhandener Fibrillen in der Lage waren. Der Mechanismus, der dieser seltenen Eigenschaft zugrundeliegt, beruht vermutlich auf dem Abfangen des Monomers oder eines Assemblierungsintermediats aus dem dynamischen Gleichgewicht zwischen Fibrille und Monomer. Ein solches Verhalten wurde auch für A $\beta$ -Fibrillen beschrieben.<sup>[37–39]</sup> Außerdem besteht die Möglichkeit, dass Verbindungen mit der aggregierten Struktur wechselwirken, sodass die Orientierung der  $\pi$ -Stapelwechselwirkungen zwischen den Proteinen gestört würde. Auf dem komplizierten Pfad von nativen, nicht-toxischen Peptiden zu Fibrillen könnten daher ein alternativer Bindungsmodus sowie die Existenz verschiedener Targets für die Inhibition und Disaggregation die lose Korrelation der ermittelten  $\text{IC}_{50}$ - und  $\text{DC}_{50}$ -Werte erklären.

Es könnte Bedenken geben, dass die aus der Fibrillendisassemblierung hervorgehenden Fragmente toxisch sind, da dies bei kleinen Oligomeren beobachtet worden ist.<sup>[40,41]</sup> Gleichwohl gelang es in Studien mit Verbindung **3** (Tabelle 1), einen Effekt der Disassemblierung von Tau-Filamenten auf die zelluläre Lebensfähigkeit festzustellen, wobei eine eindeutige Aufhebung der durch die zytosolische Tau-Aggregation verursachten toxischen Effekte beobachtet wurde.<sup>[31]</sup> Außerdem zeigen aktuelle Berichte über an A $\beta$ -Fibrillen bindende Substanzen, dass diese auch an Oligomere binden und neuroprotektive Effekte verursachen können.<sup>[42]</sup>

## 2.2. Phenylthiazolylhydrazid-Inhibitoren

Die im ursprünglichen Hochdurchsatz-Screening von 200 000 Verbindungen gewonnenen Daten wurden in silico durch Grundgerüstwechsel (Scaffold-Hopping) analysiert, wobei das Phenylthiazolylhydrazid-Gerüst neben zwei anderen Leitstrukturen, die aus dem anfänglichen Screening nicht hervorgingen, identifiziert wurde. Thiazolylhydrazid wurde für eine Leitstrukturoptimierung sowie für SAR-Untersuchungen ausgewählt.<sup>[23]</sup> Durch synthetische Derivatisierung von  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  und  $\text{R}^3$  (Abbildung 7b) wurde eine Reihe von Thiazolylhydraziden erzeugt. Das durch Grundgerüstwechsel erhaltene Pharmakophormodell legt zwei aromatische Ringe an  $\text{R}^1$  und  $\text{R}^3$ , eine hydrophobe Region am Thiazolring und einen Wasserstoffbrückenakzeptor am Carboxylamid fest (Abbildung 7a).

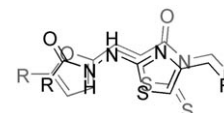
Das virtuelle Pharmakophor wurde durch experimentelle Daten, die aus Aggregations- und Disaggregationsassays des Tau-Proteins gewonnen wurden und mit den SAR-Daten der



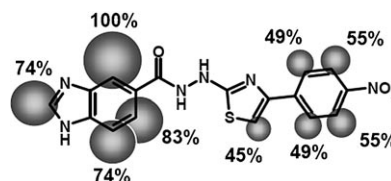
**Abbildung 7.** a) Vierteiliges Pharmakophormodell der Thiazolylhydrazide: zwei aromatische Ringe (braun), hydrophobe Region (blau), Wasserstoffbrückenakzeptor (grün).<sup>[23]</sup> b) Struktur des Thiazolylhydrazid-Motivs.

Rhodaninderivate in Einklang waren, bestätigt und verfeinert. Eine Überlagerung der Rhodanin- mit der Thiazolylhydrazin-Struktur lässt eine sterische Übereinstimmung erkennen, was die gemeinsamen strukturellen Anforderungen für die Bindung an ähnliche oder identische Bindungsstellen an Tau-Aggregaten oder Tau-Monomeren widerspiegelt (Abbildung 8).

Ein weiteres Strukturmerkmal des Modells, das eine Verbesserung der Inhibitorwirkung impliziert, ist das Vorliegen eines Wasserstoffbrücken bildenden Substituenten an  $\text{R}^3$ , z. B. die Nitrogruppe in BSc3094 (Abbildung 9). Parallel dazu



**Abbildung 8.** Die Überlagerung der Grundgerüste von Rhodaninen und Phenylthiazolylhydraziden lässt eine enge Überlappung erkennen.



**Abbildung 9.** Bindungssepitop des Inhibitors BSc3094 (Klasse der Phenylthiazolylhydrazide) am Tau-Konstrukt K18, abgeleitet aus dem STD-NMR-Spektrum.<sup>[43]</sup> Die Prozentangaben beziehen sich auf die relativen Sättigungstransferdifferenzen (STD), die die Bindungsaffinitäten zum Proteintarget repräsentieren.

schielen die hydrophoben oder  $\pi$ -Stapelwechselwirkungen an  $\text{R}^1$  zur Bindung des Targets beizutragen, da in STD-NMR-Experimenten bestätigt werden konnte, dass eine starke Wechselwirkung zwischen dem Tau-Konstrukt K18 und dem aromatischen Ring  $\text{R}^1$  besteht (Abbildung 9). Durch STD-NMR-Spektroskopie wurde weiterhin gezeigt, dass die Bindung mit einer Dissoziationskonstanten von 62  $\mu\text{M}$  spezifisch ist.<sup>[43]</sup>

Obwohl die Phenylthiazolylhydrazide in vitro eine geringere Wirksamkeit als die oben diskutierten Rhodanine aufwiesen, liegt ihre Aktivität in Zellen in der Größenordnung der Rhodaninderivate (siehe Abbildung 12 in Abschnitt 2.3). Die vermutliche Ursache hierfür ist die höhere Zellpermeabilität der Phenylthiazolylhydrazide, die dennoch nur eine mäßig höhere Zytotoxizität aufweisen (Abbildung 12).

2.3. *N*-Phenylamine und Anthrachinone

Weitere Tau-Aggregationsinhibitoren kommen aus den Substanzgruppen der *N*-Phenylamine und Anthrachinone.<sup>[25,30]</sup> Beide Klassen überlappen nur teilweise mit den oben beschriebenen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen: Die Wasserstoffbrücken bildenden Substituenten der Rhodanine und Phenylthiazolylhydrazide sind in den *N*-Phenylaminen durch Nitro- und Carboxylgruppen und in den Anthrachinonen durch azide Arylhydroxygruppen ersetzt (Abbildungen 10 und 11). Die hydrophoben Bindedomänen werden von aromatischen Ringen bereitgestellt.

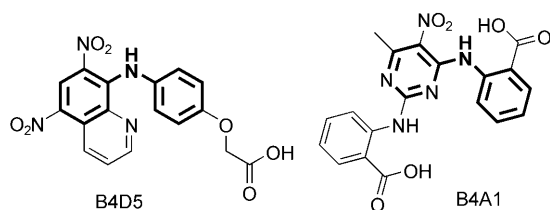
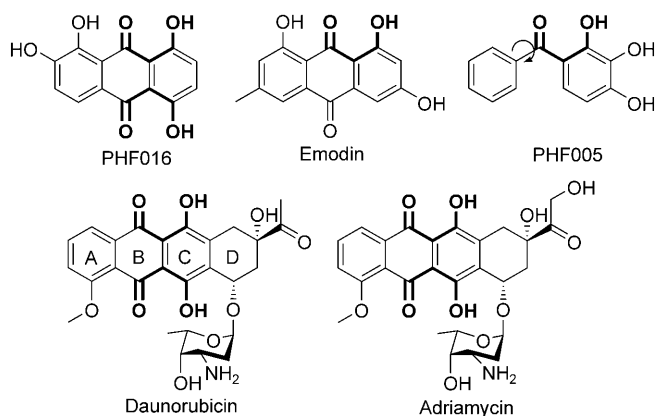
Abbildung 10. Strukturen von *N*-Phenylaminen.

Abbildung 11. Strukturen von Anthrachinonen.

Die *N*-Phenylamine wiesen in vitro und in Zellen weitaus geringere Wirksamkeiten als die Rhodanine und Phenylthiazolylhydrazide auf und haben außerdem eine Zytotoxizität von 20 % (Abbildung 12), was ihre Verwendung in vivo stark einschränkt.

Die Anthrachinone weisen eine tricyclische Struktur (Abbildung 11) mit einer oder mehreren  $\beta$ -Hydroxyenon-Seitenketten auf (Abbildung 11). Das letztere Strukturmerkmal könnte eine wichtige Rolle spielen, da solche Seitenketten auch in anderen Inhibitorklassen wie Flavonoiden und Naphthochinonen (siehe unten) häufig auftreten. Catechine ohne die Keto-Funktionalität zeigen eine verringerte Wirksamkeit.<sup>[44]</sup> Daunorubicin und Adriamycin sind höher anelliert und tragen eine zusätzliche Daunosamingruppe an Ring D (Abbildung 11). Beide sind als interkalierende Zytostatika bekannt und weisen daher ein gefährliches toxikologisches Profil auf, das von den Zytotoxizitätsdaten bestätigt wird (Abbildung 12).

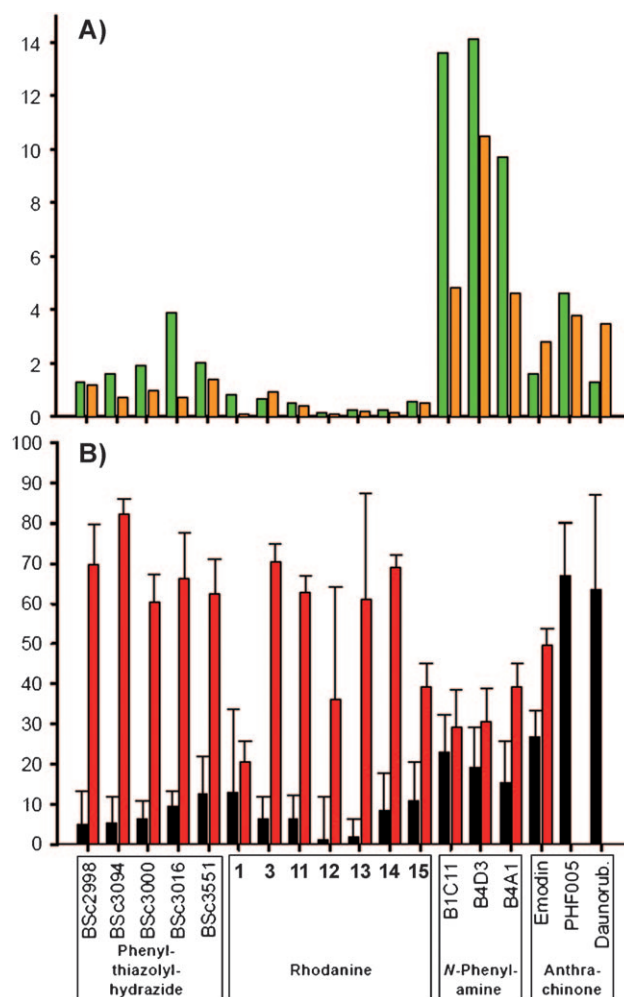


Abbildung 12. A) IC<sub>50</sub>-Werte (grün; in  $\mu$ M) und DC<sub>50</sub>-Werte (orange; in  $\mu$ M) sowie B) Zytotoxizität (schwarz; in %) und aggregations-inhibitorische Aktivitäten in Zellen (rot; in %). Die Zytotoxizitätsassays (LDH) wurden über 24 h in Gegenwart von 10  $\mu$ M Substanz durchgeführt. Zum Testen der inhibitorischen Aktivität in Zellen wurden induzierte Zellen 5 Tage mit 15  $\mu$ M Substanz inkubiert. Die verbleibenden aggregatpositiven Zellen wurden durch ThS-Färbung quantifiziert.<sup>[25,27,31,43]</sup>

Die fünf in Abbildung 11 gezeigten Verbindungen waren sowohl in der Lage, die Aggregation des Tau-Konstrukts K19 mit IC<sub>50</sub>-Werten zwischen 1.1 und 2.4  $\mu$ M zu inhibieren, als auch vorgebildete Aggregate mit DC<sub>50</sub>-Werten zwischen 2.2 und 3.8  $\mu$ M aufzulösen.<sup>[25]</sup> Eine Ausnahme bildet Verbindung PHF005, die, vermutlich wegen einer höheren Strukturflexibilität im Vergleich zu den geschlossenen tricyclischen Strukturen, eine merklich geringere Aktivität aufwies (Rotationsachse durch den Pfeil in Abbildung 11 angedeutet). Das Substitutionsmuster an Ring A schien keine ausschlaggebende Rolle zu spielen, da unterschiedliche Muster zu ähnlichen inhibitorischen Wirkungen führten. Der zuckertragende Ring D in Daunorubicin und Adriamycin verleiht keinerlei Vorteil gegenüber PHF016, was vermuten lässt, dass die Verbindungen nur moderat auf Substitutionen an diesem Ring ansprechen und sogar große Substituenten wie Zucker beherbergen können. Dies lässt einen von Rhodaninen und



Phenylthiazolylhydraziden verschiedenen Bindungsmodus vermuten, der große Substituenten an den äußeren Rändern des Moleküls toleriert.

#### 2.4. Benzothiazole

Zusätzlich zu den oben erwähnten Daten, die aus dem Screening der 200000 Verbindungen großen Substanzbibliothek gewonnen wurden,<sup>[22]</sup> berichteten einige Arbeitsgruppen über die Identifizierung weiterer neuartiger Tau-Aggregationsinhibitoren, deren Disassemblierungswirkungen aber nur in seltenen Fällen erwähnt wurden. Benzothiazol-Inhibitoren wurden von Necula et al. beschrieben,<sup>[45]</sup> wobei das Thiocarbocyanin N744 als Beispiel genannt sei ( $IC_{50}$  = 300 nM, Abbildung 13). Die Thiocarbocyanine weisen eine charakteris-

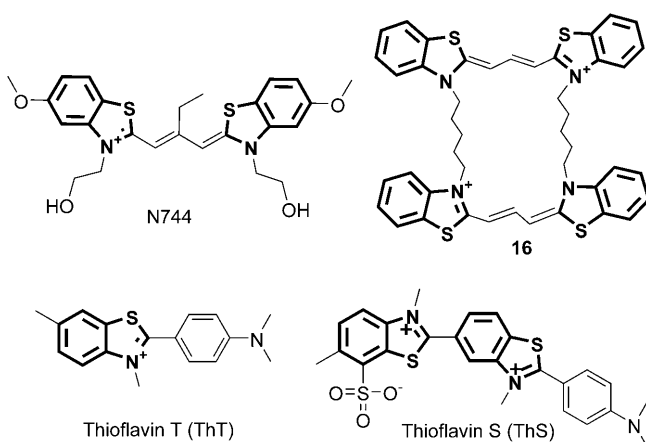


Abbildung 13. Strukturen von Benzothiazolen.

tische kationische Ladung auf, über die sie, vermutlich durch Ladungswechselwirkungen, mit dem Target wechselwirken können, und die zur Planarität der Struktur beiträgt. An der anderen Seite des Moleküls könnte der Benzothiazol-Heterocyclus hydrophobe Wechselwirkungen beisteuern. Letztere Eigenschaft ist vermutlich der Grund für die ausgeprägte inhibitorische Aktivität im Vergleich zu Thioflavinen wie ThS oder ThT, die als Reporter für die  $\beta$ -Faltblattstruktur im assemblierten Zustand verwendet werden, ohne die Assemblierung als solche zu beeinflussen.<sup>[45]</sup>

Andere Studien berichten über den Verlust der inhibitorischen Aktivität von N744 bei hohen Konzentrationen, hervorgerufen durch die Aggregation der Substanz. Dieser Selbstassemblierungsprozess führt zu *H*-Aggregaten, die aus säulenartigen Stapeln von Inhibitormolekülen mit großen Neigungswinkeln zwischen benachbarten Molekülebenen bestehen. In geringen Konzentrationen liegt der Inhibitor N744 dagegen als monomere oder dimere Struktur vor, die als die inhibitorisch aktive Form angesehen wird.<sup>[46]</sup> Eine „divalente“ Modifikation von Verbindung N744 ist in der Lage, mittels intramolekularer Wechselwirkungen die Dimerstruktur zu simulieren (Verbindung 16, Abbildung 13). Obwohl

Verbindung 16 *H*-Aggregate bilden oder die Konformation einer „geschlossenen Muschel“ annehmen kann, war die vierfache Erhöhung der Aktivität mit der offenen monomeren Form korreliert. Dies demonstriert, dass die Steigerung der Wirksamkeit aus der Multivalenz der Substanz und nicht aus ihrer Aggregation resultiert.<sup>[47]</sup>

#### 2.5. Phenothiazine, Porphyrine und Polyphenole

Taniguchi et al.<sup>[44]</sup> beschrieben drei Substanzklassen, die als Aggregationsinhibitoren der Isoform htau34 (412 Aminosäuren, erste Insertsequenz, vier Repeatsequenzen) mit  $IC_{50}$ -Werten zwischen 1.2  $\mu$ M (Myrcetin, Abbildung 14) und

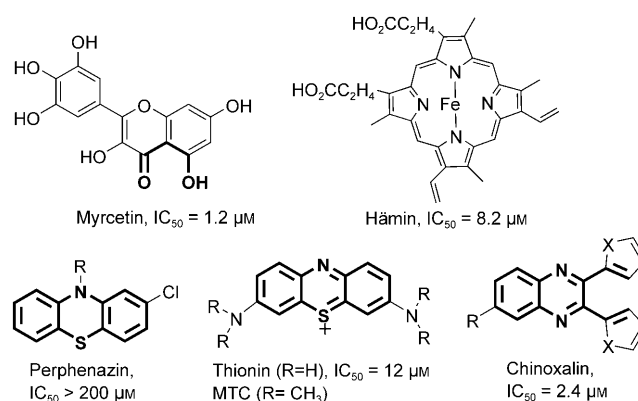


Abbildung 14. Inhibitoren der Tau-Aggregation.<sup>[44]</sup>

12  $\mu$ M (Thionin) aktiv waren: Phenothiazine (Thionin, Perphenazin), Porphyrine (Häm) und flavonoide Polyphenole (Myrcetin). Die Polyphenole weisen die oben bereits für Anthrachinone beschriebene Struktur-Wirkungs-Beziehung mit dem charakteristischen  $\beta$ -Hydroxyenon-Muster auf (Myrcetin, Abbildung 14), das auch in einem Tautomer des Naphthachinons Rifamycin vorhanden ist.<sup>[44]</sup>

Phenothiazine sind tricyclische Strukturen (Thionin, Abbildung 14), die im zentralen Heterocyclus Schwefel und Stickstoff enthalten und aufgrund der positiv geladenen Zentren und der hydrophoben Arenringe den oben diskutierten Benzothiazol-Inhibitoren sehr ähnlich sind. Die ungeladenen Phenothiazine haben eine gute Blut-Hirn-Permeabilität und finden Anwendung als antipsychotische Medikamente. Die Planarität und Aromatizität des zentralen Heterocyclus scheint der entscheidende Faktor für die Inhibition der Tau-Aggregation zu sein, da nicht-konjugierte und nicht-planare Analoga wie Perphenazin eine drastisch geringere Aktivität haben (Abbildung 14). Die positive Ladung beim Thionin und Methylthioniniumchlorid (MTC, auch bekannt als Methylenblau) spielt höchstwahrscheinlich eine untergeordnete Rolle, da ungeladene Chinoxaline, die starke Überlappungen mit Phenothiazinen aufweisen (Abbildung 14), ebenfalls als wirksame Tau-Aggregationsinhibitoren identifiziert wurden.<sup>[48]</sup> MTC wurde kürzlich als wirksamer Tau-Aggregationsinhibitor mit einem submikromolaren  $IC_{50}$ -Wert in Zellen beschrieben.<sup>[49,50]</sup> Darüber hinaus zeigen

die Ergebnisse einer klinischen Phase-II-Studie eine signifikant langsamere Abnahme kognitiver Funktionen im Vergleich zum Placebo. Hierbei wurde MTC oral in einer randomisierten, parallel geführten Phase-II-Doppelblindstudie über 84 Wochen an 321 Teilnehmern getestet. Die nach 50 Wochen beschriebenen Ergebnisse bei Patienten mit milder bis moderater kognitiver Beeinträchtigung zeigten einen Rückgang des ADAS-cog-Wertes um sieben Punkte in der Placebo- und um einen Punkt in der MTC-Gruppe, entsprechend einer Abschwächung der kognitiven Abnahmerate um 81 % unter MTC ( $p < 0.0001$ ). Die Resultate konnten durch SPECT- und PET-Scans des Gehirns untermauert werden. Obwohl bisher keine Daten zur Pharmakodynamik und Pharmakokinetik veröffentlicht sind, würde die Bestätigung dieser Ergebnisse einen Durchbruch bei der Linderung der Alzheimerkrankheit darstellen und die Eignung dieser Strategie für die Tau-Aggregationsinhibition nachweisen.

Porphyrine (Hämin, Abbildung 14) sind die einzigen metallorganischen Beispiele für Tau-Aggregationsinhibitoren, und sie weisen vermutlich einen anderen Bindungsmodus als die bisher beschriebenen Substanzen auf. Dabei hängt die inhibitorische Aktivität vom zentralen Metall (Eisen oder Zink) ab, da das Phthalocyanin in Abwesenheit des Metallzentrums ein um ein bis zwei Größenordnungen schwächerer Inhibitor ist.<sup>[44,51]</sup> Howlett et al. hatten über die inhibitorische Wirkung von Porphyrinen gegen die A $\beta$ 42-Amyloidaggregation berichtet<sup>[51]</sup> und postuliert, dass das Eisenzentrum an Histidinseitenketten des Targets koordiniert – ein Mechanismus, der auf die Inhibition der Tau-Aggregation übertragen werden könnte.

In der Tat sprechen Ähnlichkeiten in der Ultrastruktur der Amyloide dafür, dass diese Inhibitoren einen teilweise gemeinsamen Bindungsmodus haben. So zeigen Amyloidfibrillen unabhängig von ihrer Aminosäuresequenz das gleiche Röntgenbeugungsmuster mit einem charakteristischen meridionalen Reflex bei 4.6–4.8 Å. Dieser Wert entspricht den Abständen der Peptidketten innerhalb der gekreuzten  $\beta$ -Struktur, in der die  $\beta$ -Faltblätter des Proteins senkrecht zur Fibrillenachse angeordnet sind. Außerdem wurde durch Rasterkraftmikroskopie an A $\beta$ 42-Aggregaten in rekonstituierten Membranen eine bemerkenswerte supramolekulare, Ionenkanal-ähnliche Struktur nachgewiesen<sup>[52,53]</sup> – eine eindrucksvolle Struktureigenschaft der meisten Amyloide wie  $\alpha$ -Synuclein, A $\beta$ 42 oder IAPP. Unabhängig von ihrer Aminosäuresequenz weisen einige lösliche Amyloid-Oligomere ebenfalls gleiche Strukturen auf. In der Tat gibt es oligomerspezifische Antikörper, die sequenzunabhängig Oligomere erkennen und deren Toxizität neutralisieren.<sup>[54]</sup> Der gleiche konformationsabhängige Antikörper erkannte auch Oligomere von IAPP,  $\alpha$ -Synuclein, A $\beta$ 42, Polyglutamin und anderen Proteinen. Dies impliziert, dass zwischen den Oligomeren eine strukturelle Verbindung besteht, die an die entstehenden Aggregate „vererbt“ werden könnte.<sup>[55,56]</sup> Dies trifft mit der Beobachtung zusammen, dass Aggregationsinhibitoren einer bestimmten Amyloidklasse auch potenzielle Inhibitoren einer Vielfalt weiterer Amyloide sein können<sup>[44,57–59]</sup> und dass histologische Farbstoffe wie ThS und Kongorot an unterschiedliche Aggregate binden, die bei mindestens 15 genetisch nicht verwandten Erkrankungen auftreten.<sup>[60]</sup>

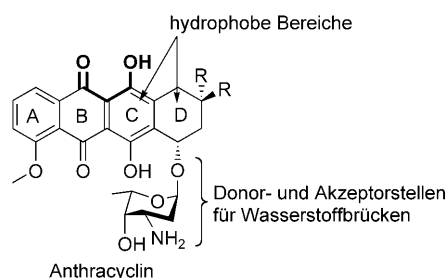
Die detaillierte Erforschung der A $\beta$ -Aggregation ist daher eine wichtige Voraussetzung für ein umfangreiches Verständnis der Amyloidose. Strategien zur Prävention der Fehlfaltung und Aggregation von A $\beta$  sind in der Literatur gut dokumentiert.<sup>[61–63]</sup>

### 3. Aggregationsinhibitoren für andere amyloidogene Proteine

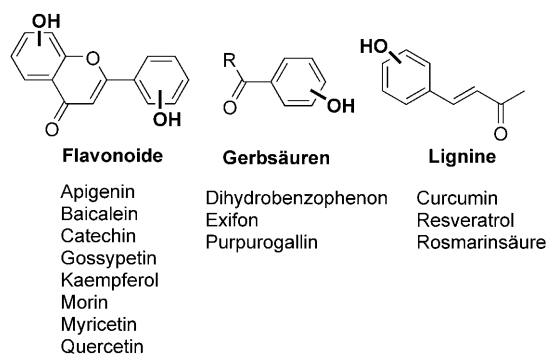
Untersuchungen des Fibrillenbildungspfadens von A $\beta$ 42 ergaben, dass das Gleichgewicht zwischen den Aggregatformen durch niedermolekulare Substanzen beeinflusst werden kann.<sup>[40]</sup> Mithilfe eines oligomerspezifischen Antikörpers war es möglich, den Einfluss bekannter Inhibitoren der Amyloidaggregation zu analysieren. Die Verbindungen wurden in drei Kategorien unterteilt: 1) Inhibitoren der Oligomerisierung, nicht aber der Fibrillenbildung, 2) Inhibitoren sowohl der Oligomerisierung als auch der Fibrillenbildung und 3) Inhibitoren der Fibrillenbildung, nicht aber der Oligomerisierung. Bemerkenswerterweise schienen die Oligomerisierungsinhibitoren (erste Kategorie) eine Fibrillenbildung sogar zu begünstigen. In der Gruppe der vollen Inhibitoren (zweite Kategorie) finden sich Meclocyclinsulfosalicylat, Hämin und *ortho*-Vanillin (mit  $IC_{50} < 10 \mu M$ ) aus den Substanzklassen der Anthrachinone, Porphyrine bzw. Polyphenole, die oben bereits als Tau-Aggregationsinhibitoren beschrieben wurden.

Die Aktivitätsunterschiede zwischen den Amyloidaggregationsinhibitoren könnten in der Affinität der Verbindungen zu den Seitenketten der Fibrillen begründet sein. Generell sind Inhibitoren der Tau-Aggregation weniger verbreitet als  $\beta$ -Amyloidinhibitoren, wie Taniguchi et al. durch Vergleich der Inhibitionswirkungen von acht Substanzklassen zeigen konnten.<sup>[44]</sup> Ein Grund hierfür könnte sein, dass das Tau-Protein über weniger aromatische Seitenketten verfügt als A $\beta$  und daher weniger hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Inhibitor eingehen kann. Ein Vergleich der Aktivitäten von Anthracyclinen offenbart ein Beispiel für unterschiedliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen Tau- und A $\beta$ 40-Inhibitoren: Während die Tau-Aggregation vom Substituenten am Ring D unbeeinflusst bleibt (siehe Abbildung 11), schienen bei A $\beta$ 40 nur solche Anthracycline aktiv zu sein, die mit dem Dausosamin-Zucker substituiert sind (z. B. Doxorubicin).<sup>[64]</sup> Eine Pharmakophorkartierung der Anthracycline als Aggregationsinhibitoren von A $\beta$  ergab ein Drei-Punkte-Modell, in dem die aromatischen Ringe als hydrophobe Regionen und die Zuckerseitenkette als Wasserstoffbrückendonator und -akzeptor fungierte (Abbildung 15).

Die Polyphenole, z. B. Myrcetin (Abbildung 14), wurden bereits in Abschnitt 2.5 als Tau-Aggregationsinhibitoren vorgestellt. Ihre inhibitorische Aktivität erstreckt sich auf eine Vielzahl von Amyloiden, z. B.  $\alpha$ -Synuclein, IAPP, A $\beta$ 40 und PrPsc.<sup>[58]</sup> Polyphenole finden sich häufig in höheren Pflanzen wie dem Ginkgobaum, dem Teestrauch, in Weintrauben und in der Gelbwurze. Man teilt sie entsprechend ihrer Struktur in Flavonoide, Gerbsäuren und Lignine ein (Abbildung 16). Obwohl die Diskussion weiter andauert, ob ihre Aktivität in vivo nicht ihren antioxidativen Eigenschaften



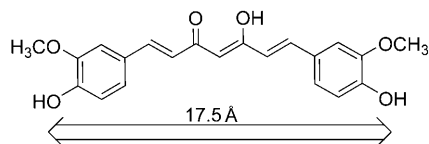
**Abbildung 15.** Struktur-Wirkungs-Beziehungen für Anthracycline bei der Inhibition der A $\beta$ 40-Aggregation.



**Abbildung 16.** Polyphenolinhibitoren.

zuzuschreiben sei, zeigen in vitro erhaltenen Daten deutlich, dass sie in die Elongationsphase der Fibrillenassemblierung eingreifen.<sup>[64,65]</sup> Ein Nachteil der Polyphenole ist ihre meist sehr schnelle Verstoffwechselung, oft einhergehend mit einer verringerten oralen Bioverfügbarkeit und einer geringen Blut-Hirn-Gängigkeit, was das Potenzial dieser Substanzklasse als Leitstruktur deutlich einschränkt.

Eine strukturelle Voraussetzung für die Aktivität von Tau- und A $\beta$ -Aggregationsinhibitoren sind die Hydroxygruppen der Phenolfunktion (Abbildung 16), da entsprechende Etherderivate geringere Aktivitäten aufwiesen. Phenolische Hydroxygruppen sind azider als aliphatische Hydroxygruppen und können stärkere Wasserstoffbrücken bilden. Eine wichtige Rolle der Wasserstoffbrückenbildung oder Hydrophilie wurde auch für den Scylloinosit-Inhibitor beschrieben.<sup>[66]</sup> Die meisten Lignine sind symmetrische Moleküle (z.B. Rosmarinsäure und Curcumin), wobei für A $\beta$ 40 ein optimaler Abstand von 16–19 Å zwischen den Phenolringen angegeben wurde (Abbildung 17).<sup>[67]</sup>



**Abbildung 17.** Struktur von Curcumin (Enol-Form).

In zellulären Assays wurde ermittelt, dass Curcumin mehrere für neurodegenerative Erkrankungen relevante Prozesse beeinflusst. Die geringe orale Absorption und Blut-Hirn-Gängigkeit schränken jedoch die mögliche Anwendung

von Curcumin in vivo beträchtlich ein. Ein Austausch der  $\beta$ -Hydroxyenongruppe des Curcumins gegen substituierte Pyrazolgruppen ergab wirksame Tau- und A $\beta$ -Aggregationsinhibitoren.<sup>[68]</sup> Die Wechselwirkung mit A $\beta$  erforderte lineare Pyrazole, sodass die Y-förmigen Derivate eine erhöhte Selektivität für Tau-Aggregate erhielten. Die Aktivitäten zweigeteilter Derivate, die *N*-Aryl-Substituenten enthielten, wichen daher voneinander ab, wobei die aktivsten 4-Nitrophenyl- und 3-Nitrophenyl-substituierten Curcuminpyrazole die Tau-Aggregation im niedrigen mikromolaren Bereich inhibierten. Die Einführung einer elektronenziehenden Gruppe am *N*-Arylpyrazol verbesserte die Inhibition der Tau-Aggregation gegenüber dem unsubstituierten *N*-Phenylpyrazol um den Faktor 100. Für die Disaggregation des Tau-Proteins konnte eine ähnliche Struktur-Wirkungs-Beziehung beobachtet werden, wobei die Einführung einer Nitrogruppe am *N*-Arylpyrazol die Depolymerisationsaktivität gegenüber dem unsubstituierten *N*-Phenylpyrazol 18- bis 70fach erhöhte.<sup>[68]</sup>

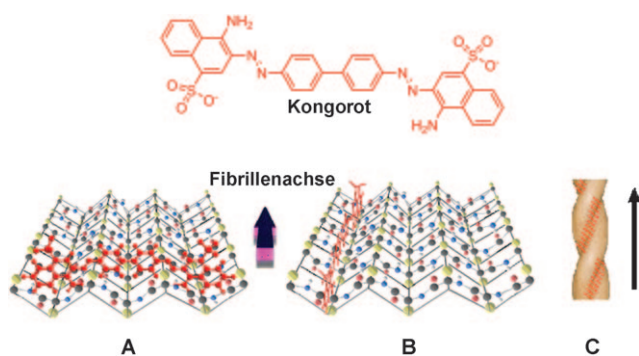
#### 4. Bindungsmodus

Die komplexen Faltungswege, die ausgehend von nicht-toxischen, nativen Peptidmonomeren zu Fibrillen durchlaufen werden, implizieren das Vorhandensein mehrerer potenzieller Angriffspunkte für Wirkstoffe zur Aggregationsinhibition und Disaggregation.<sup>[2,69]</sup> Allerdings befinden sich die Studien zu den Strukturen früher Aggregationsintermediate und ihren Komplexen mit niedermolekularen Bindungspartnern noch in den Anfängen. Die durch STD-NMR-Spektroskopie identifizierten Bindungssepitope für die Wechselwirkung zwischen einem Phenylthiazolylhydrazid als Inhibitor und einem Tau-Monomer (siehe Abbildung 9 in Abschnitt 2.2) lassen den Schluss zu, dass diese Art der Wechselwirkung ein gemeinsames Merkmal von Aggregationsinhibitoren und Disaggregationspromotoren sein könnte.

Die Bindung an gereifte Fibrillen scheint hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken mit den Fibrillen einzubeziehen. Ein Modell für die Bindung von Kongorot an A $\beta$  wurde aus der Röntgenkristallstruktur von Kongorot im Komplex mit den  $\beta$ -Faltblättern von Insulindimeren abgeleitet.<sup>[70]</sup> Obwohl Kongorot und ThS oder ThT nur als schwache Aggregationsinhibitoren beschrieben wurden,<sup>[46]</sup> konnte mithilfe von Verdrängungsexperimenten gezeigt werden, dass ihre Bindungsstelle auch Liganden anderer Stoffklassen aufnimmt,<sup>[71]</sup> sodass sie mit bekannten Inhibitoren, etwa N744, überlappen könnten.<sup>[45]</sup> Der Befund, dass die Bindung des Tau-Aggregationsinhibitors N744 mit gängigen  $\beta$ -Amyloidbindern wie ThS konkurriert, lässt darüber hinaus vermuten, dass die Bindung von Thioflavinen und Kongorot an Tau- und  $\beta$ -Amyloidfibrillen über ähnliche Bindungsmodi erfolgt. Die aromatischen Wechselwirkungen spielen in diesem Modell eine vorherrschende Rolle, da der Inhibitor parallel zur Peptidkette interkaliert (Abbildung 18, Modell A).

Eine ebenfalls vorgeschlagene, senkrechte Anordnung<sup>[72,73]</sup> wird durch Ladungswchselwirkungen zwischen den positiv geladenen Seitenketten der Fibrille und den negativ geladenen Sulfonsäureresten von Kongorot stabilisiert.





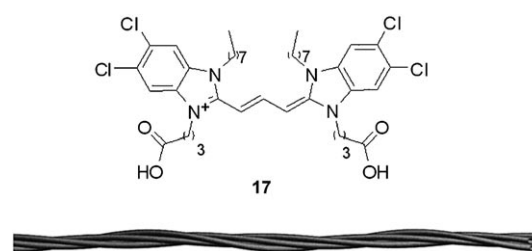
**Abbildung 18.** Struktur von Kongorot und Modelle für die Bindung an Amyloidfibrillen. A) Bindung parallel zu den  $\beta$ -Faltblättern. B) Bindung senkrecht zu den  $\beta$ -Faltblättern. C) Aggregation von Kongorot (rote Striche) entlang der helikalen Fibrillenstruktur.

Basierend auf dem Abstand zwischen den Sulfonsäuregruppen (19 Å) wurde eine Bindung über fünf Polypeptidketten hinweg vorgeschlagen (Abbildung 18, Modell B). Dieser Optimalabstand stimmt mit der optimierten Größe überein, wie sie für Curcumin-Analoga beschrieben wurde. Lineare Doppelbrechungsaufnahmen von mit Kongorot angefärbten Amyloidplaques, die eine zum Peptid rechtwinklige Bindung zeigten (ähnlich wie Modell B, Abbildung 18), stützen diesen transversalen Bindungsmodus.<sup>[59]</sup> Durch konfokale Mikroskopie mit polarisiertem Laserlicht wurde ein ähnlicher Bindungsmodus für die Bindung von ThT an bovines Insulin und  $\beta$ -Lactoglobulin nachgewiesen.<sup>[74]</sup> Das Modell ist in Einklang mit der Veränderung des Fluoreszenzspektrums bei der Fibrillenbindung, wobei die verringerte Flexibilität des in der fibrillären Furche (Modell B) gebundenen Moleküls die Fluoreszenzquantenausbeute der Verbindung erhöht.<sup>[74]</sup>

Basierend auf der pH-Abhängigkeit der Bindung von Kongorot an A $\beta$ 40-Amyloidpeptide wurde ein drittes Modell vorgeschlagen, demzufolge unter physiologischen Bedingungen elektrostatische Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Histidinresten des Proteins und den anionischen Sulfonatresten am Kongorot auftreten.<sup>[75]</sup> Das Modell sieht eine regelmäßige Anordnung von Histidinseitenketten vor, die aus der Peripherie einer  $\beta$ -helikalen Nanoröhre oder eines Protofilaments paralleler  $\beta$ -Faltblätter ragen und somit eine Matrize für den Einbau von Kongorot bilden (Modell C, Abbildung 18). Die resultierenden Wechselwirkungen würden die Selbstorganisation des Kongorots begünstigen und zu einer für *J*-Aggregate charakteristischen bathochromen Verschiebung der UV/Vis-Absorption führen. Die von anziehenden Wechselwirkungen zwischen  $\pi$ -Systemen getriebene Selbstorganisation der Carbocyanine und Porphyrine zu *H*- oder *J*-Aggregaten ist in der Literatur gut dokumentiert. Durch Cryo-TEM erzeugte Aufnahmen solcher Aggregate enthüllen eindrucksvolle supramolekulare Superhelixstrukturen (Abbildung 19).<sup>[76]</sup>

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Identifizierung von Aggregationsinhibitoren und die Untersuchung ihrer Bindungsmodi ist ein entscheidender



**Abbildung 19.** Aus dem Carbocyanin 17 gebildete *J*-Aggregate, rekonstruiert aus Cryo-TEM-Aufnahmen.<sup>[76]</sup>

Aspekt bei der Erforschung der Amyloidbildung und ihrer pathologischen Folgen. Faszinierend ist unter anderem, dass sogar extrazelluläre A $\beta$ -Oligomere und -Aggregate, die gemeinhin als Hauptverursacher der Alzheimerkrankheit gelten, ihre toxische Funktion über das Tau-Protein als grundlegende intrazelluläre Komponente ausüben.<sup>[77–81]</sup> Ein Verständnis der komplexen Selbstorganisationsprozesse bei der Fibrillenbildung und der Wirkung niedermolekularer Inhibitoren erfordert interdisziplinäre Anstrengungen. Zunehmend treten gemeinsame Struktureigenschaften zwischen unterschiedlichen Substanzklassen zum Vorschein, so etwa aromatische/hydrophobe Bereiche und Wasserstoffbrückenmotive entlang flach ausgedehnter Strukturen.

Die nanomolaren IC<sub>50</sub>-Werte, die von N744, Rhodaninen und Phenylthiazolylhydrazid in vitro erreicht werden, ermutigen zur Suche nach verbesserten Aggregationsinhibitoren, wobei ein besonderes Augenmerk auf Disaggregationsvermögen, Permeabilität und Zytotoxizität liegt. Der gezielte Entwurf zellgängiger Substanzen wird ein maßgeblicher Schritt bei der Entwicklung neuer Generationen von Aggregationsinhibitoren sein. Vor allem erschwert der ionische Aufbau der meisten Inhibitoren die Membrangängigkeit, sodass die Entwicklung ladungsneutraler Inhibitoren ein vordergründiges Ziel sein wird. Die erfolgreiche Substanzoptimierung hin zu ladungsneutralen zellgängigen Strukturen wird anhand der Entwicklung diagnostischer Imaging-Substanzen wie Pittsburgh B (PIB) und Methoxy-X04 illustriert, die von schwach permeablen Thioflavinen und Kongorot abgeleitet sind.<sup>[73, 82–86]</sup> In ersten Studien mit ladungsneutralen Substanzen moderater In-vitro-Aktivität, z. B. 3 (Tabelle 1), konnten die bei der Disassemblierung von Tau-Filamenten auftretenden Effekte auf die zelluläre Lebensfähigkeit charakterisiert werden, was in der Verhinderung oder Umkehr der durch Tau-Aggregation hervorgerufenen Toxizität im Zytosol resultierte.<sup>[31]</sup> Diese Beobachtung unterstreicht die Rolle von Tau als Schlüsselkomponente bei neurodegenerativen Prozessen.<sup>[87, 88]</sup>

Eine beeindruckende Fähigkeit vieler Aggregationsinhibitoren ist die Bildung von *H*- und *J*-Aggregaten. Mehr noch als promiskuitive nichtspezifische Inhibitoren, die aus ungeordneten Micellen hervorgehen,<sup>[89, 90]</sup> könnten diese Selbstorganisationseigenschaften eine Möglichkeit zur Optimierung von Amyloidinhibitoren in Form supramolekularer Strukturen mit verbesserter Spezifität und Wirksamkeit aufzeigen. Allerdings könnten sich Arzneiformulierung und ADME-Optimierung als problematisch herausstellen.<sup>[76, 91–93]</sup>

In der aktuellen Diskussion um die neurotoxischen Eigenschaften kleiner Oligomere<sup>[40,41]</sup> wurde die Vermutung geäußert, dass Eingriffe, die die Amyloidkonzentration verringern, gleichzeitig aber die Konzentration kleiner Oligomere erhöhen, schädlich sein könnten.<sup>[94]</sup> Daher ist es notwendig, die Bindung der Inhibitorsubstanzen an oligomere Amyloidvorstufen zu bestimmen. Die kürzlich gewonnene Erkenntnis, dass ThT und Kongorot an A $\beta$ -Oligomere binden und damit neuroprotektive Wirkungen hervorrufen, ist ermutigend und unterstreicht das therapeutische Potenzial dieser Substanzen gegen amyloide Pathologien.<sup>[42]</sup>

Die Autoren danken dem Institute for the Study of Aging (New York), der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Europäischen Union („Europäischer Fonds für regionale Entwicklung“ und Memosad-Projekt), der Volkswagenstiftung und dem Land Nordrhein-Westfalen für finanzielle Förderung. Weiterer Dank geht an Gregor Larbig (Darmstadt), Atilla Coksezen (Hamburg) und Inna Khlistunova (Hamburg) für die Durchführung einiger Experimente sowie an Bernd Meyer (Hamburg) für anregende Diskussionen.

Eingegangen am 4. Juni 2008,  
veränderte Fassung am 6. August 2008  
Online veröffentlicht am 2. Februar 2009

Übersetzt von Florian Buhr, Frankfurt

- [1] J. W. Kelly, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, 9, 323.
- [2] H. LeVine, *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 1121.
- [3] M. Townsend, J. P. Cleary, T. Mehta, J. Hofmeister, S. Lesne, E. O'Hare, D. M. Walsh, D. J. Selkoe, *Ann. Neurol.* **2006**, 60, 668.
- [4] L. Lecanu, W. Yao, G. L. Teper, Z. X. Yao, J. Greeson, V. Papadopoulos, *Steroids* **2004**, 69, 1.
- [5] L. Jenagaratnam, R. McShane, *Cochrane Database Syst. Rev.* **2006**, CD005380.
- [6] E. Sampson, L. Jenagaratnam, R. McShane, *Cochrane Database Syst. Rev.* **2008**, CD005380.
- [7] M. R. Sawaya, S. Sambashivan, R. Nelson, M. I. Ivanova, S. A. Sievers, M. I. Apostol, M. J. Thompson, M. Balbirnie, J. J. Wiltzius, H. T. McFarlane, A. O. Madsen, C. Riekel, D. Eisenberg, *Nature* **2007**, 447, 453.
- [8] M. N. Vieira, L. Forny-Germano, L. M. Saraiva, A. Sebollela, A. M. Martinez, J. C. Houzel, F. G. De Felice, S. T. Ferreira, *J. Neurochem.* **2007**, 103, 736.
- [9] K. Leroy, A. Bretteville, K. Schindowski, E. Gilissen, M. Authalet, R. De Decker, Z. Yilmaz, L. Buee, J. P. Brion, *Am. J. Pathol.* **2007**, 171, 976.
- [10] C. Ballatore, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, 8, 663.
- [11] M. Kidd, *Nature* **1963**, 197, 192.
- [12] P. Friedhoff, M. von Bergen, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2000**, 1502, 122.
- [13] H. Inouye, D. Sharma, W. J. Goux, D. A. Kirschner, *Biophys. J.* **2005**, 90, 1774.
- [14] K. Arima, *Neuropathology* **2006**, 26, 475.
- [15] R. Guerrero, P. Navarro, E. Gallego, J. Avila, J. G. de Yébenes, M. P. Sanchez, *J. Alzheimer's Dis.* **2008**, 13, 161.
- [16] C. Haass, D. J. Selkoe, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8, 101.
- [17] M. von Bergen, P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 5129.
- [18] M. D. Mukrasch, P. Markwick, J. Biernat, M. Bergen, P. Bernado, C. Griesinger, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, M. Blackledge, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 5235.
- [19] M. D. Mukrasch, M. von Bergen, J. Biernat, D. Fischer, C. Griesinger, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 12230.
- [20] I. Kelleher, C. Garwood, D. P. Hanger, B. H. Anderton, W. Noble, *J. Neurochem.* **2007**, 103, 2256.
- [21] K. S. Kosik, H. Shimura, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2005**, 1739, 298.
- [22] M. Pickhardt, M. von Bergen, Z. Gazova, A. Hascher, J. Biernat, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Curr. Alzheimer Res.* **2005**, 2, 219.
- [23] G. Larbig, M. Pickhardt, D. G. Lloyd, B. Schmidt, E. Mandelkow, *Curr. Alzheimer Res.* **2007**, 4, 315.
- [24] P. Friedhoff, A. Schneider, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Biochemistry* **1998**, 37, 10223.
- [25] M. Pickhardt, Z. Gazova, M. von Bergen, I. Khlistunova, Y. Wang, A. Hascher, E. M. Mandelkow, J. Biernat, E. Mandelkow, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 3628.
- [26] J. H. Zhang, T. D. Chung, K. R. Oldenburg, *J. Biomol. Screening* **1999**, 4, 67.
- [27] B. Bulic, M. Pickhardt, I. Khlistunova, J. Biernat, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 9375; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 9215.
- [28] A. Schneider, J. Biernat, M. von Bergen, E. Mandelkow, E. M. Mandelkow, *Biochemistry* **1999**, 38, 3549.
- [29] S. Barghorn, P. Davies, E. Mandelkow, *Biochemistry* **2004**, 43, 1694.
- [30] M. Pickhardt, J. Biernat, I. Khlistunova, Y. P. Wang, Z. Gazova, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Curr. Alzheimer Res.* **2007**, 4, 397.
- [31] I. Khlistunova, M. Pickhardt, J. Biernat, Y. Wang, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Curr. Alzheimer Res.* **2007**, 4, 544.
- [32] E. E. Carlson, J. F. May, L. L. Kiessling, *Chem. Biol.* **2006**, 13, 825.
- [33] N. Hotta, Y. Akanuma, R. Kawamori, K. Matsuoka, Y. Oka, M. Shichiri, T. Toyota, M. Nakashima, I. Yoshimura, N. Sakamoto, Y. Shigeta, *Diabetes Care* **2006**, 29, 1538.
- [34] G. A. Patani, E. J. LaVoie, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 3147.
- [35] A. J. Leo, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 1281.
- [36] M. L. Waters, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 736.
- [37] M. von Bergen, S. Barghorn, J. Biernat, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2005**, 1739, 158.
- [38] J. D. Harper, P. T. Lansbury, Jr., *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, 66, 385.
- [39] Y. Matsuoka, M. Saito, J. LaFrancois, K. Gaynor, V. Olm, L. Wang, E. Casey, Y. Lu, C. Shiratori, C. Lemere, K. Duff, *J. Neurosci.* **2003**, 23, 29.
- [40] M. Nuclea, R. Kaye, S. Milton, C. G. Glabe, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 10311.
- [41] H. A. Lashuel, D. Grillo-Bosch, *Methods Mol. Biol.* **2005**, 299, 19.
- [42] I. Maezawa, H. S. Hong, R. Liu, C. Y. Wu, R. H. Cheng, M. P. Kung, H. F. Kung, K. S. Lam, S. Oddo, F. M. Laferla, L. W. Jin, *J. Neurochem.* **2008**, 104, 457.
- [43] M. Pickhardt, G. Larbig, I. Khlistunova, A. Coksezen, B. Meyer, E. M. Mandelkow, B. Schmidt, E. Mandelkow, *Biochemistry* **2007**, 46, 10016.
- [44] S. Taniguchi, N. Suzuki, M. Masuda, S. Hisanaga, T. Iwatsubo, M. Goedert, M. Hasegawa, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 7614.
- [45] M. Nuclea, C. N. Chirita, J. Kuret, *Biochemistry* **2005**, 44, 10227.
- [46] E. E. Congdon, M. Nuclea, R. D. Blackstone, J. Kuret, *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, 465, 127.
- [47] N. S. Honson, J. R. Jensen, M. V. Darby, J. Kuret, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, 363, 229.

- [48] A. Crowe, C. Ballatore, E. Hyde, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, 358, 1.
- [49] „Preparation of phenothiazine derivatives for treatment of tauopathy“: C. M. Wischik, J. E. Rickard, C. R. Harrington, D. Horsley, J. M. D. Storey, C. Marshall, J. P. Sinclair, PCT Int. Appl. WO 2007110630, **2007**.
- [50] C. M. Wischik, P. C. Edwards, R. Y. Lai, M. Roth, C. R. Harrington, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 11213.
- [51] D. Howlett, P. Cutler, S. Heales, P. Camilleri, *FEBS Lett.* **1997**, 417, 249.
- [52] A. Quist, I. Doudevski, H. Lin, R. Azimova, D. Ng, B. Frangione, B. Kagan, J. Ghiso, R. Lal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 10427.
- [53] H. A. Lashuel, P. T. Lansbury, Jr., *Q. Rev. Biophys.* **2006**, 39, 167.
- [54] R. Kaye, E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman, C. G. Glabe, *Science* **2003**, 300, 486.
- [55] R. Kaye, E. Head, F. Sarsoza, T. Saing, C. W. Cotman, M. Neula, L. Margol, J. Wu, L. Breydo, J. L. Thompson, S. Rasool, T. Gurlo, P. Butler, C. G. Glabe, *Mol. Neurodegener.* **2007**, 2, 18.
- [56] C. G. Glabe, *Trends Biochem. Sci.* **2004**, 29, 542.
- [57] V. Heiser, S. Engemann, W. Brocker, I. Dunkel, A. Boeddrich, S. Waelter, E. Nordhoff, R. Lurz, N. Schugardt, S. Rautenberg, C. Herhaus, G. Barnickel, H. Bottcher, H. Lehrach, E. E. Wanker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 16400.
- [58] Y. Porat, A. Abramowitz, E. Gazit, *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, 67, 27.
- [59] L. W. Jin, K. A. Claborn, M. Kurimoto, M. A. Geday, I. Maezawa, F. Sohraby, M. Estrada, W. Kaminsky, B. Kahr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 15294.
- [60] J. W. Kelly, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 11.
- [61] L. D. Estrada, C. Soto, *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, 7, 115.
- [62] C. Soto, L. Estrada, *Subcell. Biochem.* **2005**, 38, 351.
- [63] S. Bieler, C. Soto, *Curr. Drug Targets* **2004**, 5, 553.
- [64] D. R. Howlett, A. R. George, D. E. Owen, R. V. Ward, R. E. Markwell, *Biochem. J.* **1999**, 343, 419.
- [65] F. Yang, G. P. Lim, A. N. Begum, O. J. Ubeda, M. R. Simmons, S. S. Ambegaokar, P. P. Chen, R. Kaye, C. G. Glabe, S. A. Frautschy, G. M. Cole, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 5892.
- [66] J. McLaurin, R. Golomb, A. Jurewicz, J. P. Antel, P. E. Fraser, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 18495.
- [67] A. A. Reinke, J. E. Gestwicki, *Chem. Biol. Drug Des.* **2007**, 70, 206.
- [68] R. Narlawar, M. Pickhardt, S. Leuchtenberger, K. Baumann, S. Krause, T. Dyrks, S. Weggen, E. Mandelkow, B. Schmidt, *ChemMedChem* **2008**, 3, 165.
- [69] D. R. Howlett, *Curr. Med. Chem. Immunol. Endocr. Metab. Agents* **2001**, 1, 25.
- [70] D. B. Carter, K. C. Chou, *Neurobiol. Aging* **1998**, 19, 37.
- [71] L. Ye, J. L. Morgenstern, A. D. Gee, G. Hong, J. Brown, A. Lockhart, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 23599.
- [72] W. E. Klunk, M. L. Debnath, J. W. Pettegrew, *Neurobiol. Aging* **1994**, 15, 691.
- [73] W. E. Klunk, J. W. Pettegrew, D. J. Abraham, *J. Histochem. Cytochem.* **1989**, 37, 1273.
- [74] M. R. Krebs, E. H. Bromley, A. M. Donald, *J. Struct. Biol.* **2005**, 149, 30.
- [75] H. Inouye, D. A. Kirschner, *Subcell. Biochem.* **2005**, 38, 203.
- [76] H. Von Berlepsch, C. Böttcher, A. Ouart, C. Burger, S. Dähne, S. Kirstein, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 5255.
- [77] P. Talaga, L. Quere, *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* **2002**, 1, 567.
- [78] S. Y. Park, A. Ferreira, *J. Neurosci.* **2005**, 25, 5365.
- [79] E. D. Roberson, K. Searce-Levie, J. J. Palop, F. Yan, I. H. Cheng, T. Wu, H. Gerstein, G. Q. Yu, L. Mucke, *Science* **2007**, 316, 750.
- [80] M. E. King, H. M. Kan, P. W. Baas, A. Erisir, C. G. Glabe, G. S. Bloom, *J. Cell Biol.* **2006**, 175, 541.
- [81] M. Rapoport, H. N. Dawson, L. I. Binder, M. P. Vitek, A. Ferreira, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 6364.
- [82] B. P. Kinsian, E. Stallard, J. H. Lee, M. A. Woodbury, A. S. Zbrozek, H. A. Glick, *J. Am. Geriatr. Soc.* **2000**, 48, 631.
- [83] W. E. Klunk, B. J. Lopresti, M. D. Ikonovic, I. M. Lefterov, R. P. Koldamova, E. E. Abrahamson, M. L. Debnath, D. P. Holt, G. F. Huang, L. Shao, S. T. DeKosky, J. C. Price, C. A. Mathis, *J. Neurosci.* **2005**, 25, 10598.
- [84] C. A. Mathis, B. J. Lopresti, W. E. Klunk, *Nucl. Med. Biol.* **2007**, 34, 809.
- [85] W. E. Klunk, B. J. Bacskai, C. A. Mathis, S. T. Kajdasz, M. E. McLellan, M. P. Frosch, M. L. Debnath, D. P. Holt, Y. Wang, B. T. Hyman, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2002**, 61, 797.
- [86] L. Cai, R. B. Innis, V. W. Pike, *Curr. Med. Chem.* **2007**, 14, 19.
- [87] M. Meyer-Luehmann, T. L. Spires-Jones, C. Prada, M. Garcia-Alloza, A. de Calignon, A. Rozkalne, J. Koenigsknecht-Talboo, D. M. Holtzman, B. J. Bacskai, B. T. Hyman, *Nature* **2008**, 451, 720.
- [88] K. F. Winkhofer, J. Tatzelt, C. Haass, *EMBO J.* **2008**, 27, 336.
- [89] S. L. McGovern, B. T. Helfand, B. Feng, B. K. Shoichet, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 4265.
- [90] B. Y. Feng, B. H. Toyama, H. Wille, D. W. Colby, S. R. Collins, B. C. May, S. B. Prusiner, J. Weissman, B. K. Shoichet, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, 4, 197.
- [91] B. Pierkarska, M. Skowronek, J. Rybarska, B. Stopa, I. Roterman, L. Konieczny, *Biochimie* **1996**, 78, 183.
- [92] M. Skowronek, I. Roterman, L. Konieczny, B. Stopa, J. Rybarska, B. Piekarska, A. Gorecki, M. Krol, *Comput. Chem.* **2000**, 24, 429.
- [93] P. Spolnik, B. Stopa, B. Piekarska, A. Jagusiak, L. Konieczny, J. Rybarska, M. Krol, I. Roterman, B. Urbanowicz, J. Zieba-Palus, *Chem. Biol. Drug Des.* **2007**, 70, 491.
- [94] I. H. Cheng, K. Searce-Levie, J. Legleiter, J. J. Palop, H. Gerstein, N. Bien-Ly, J. Puolivali, S. Lesne, K. H. Ashe, P. J. Muchowski, L. Mucke, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 23818.
- [95] „Tau Aggregation Inhibitors (TAI) Therapy with Rember Arrests Disease Progression in Mild and Moderate Alzheimer's Disease over 50 Weeks“: C. M. Wischik, P. Bentham, D. J. Wischik, K. M. Seng, Abstract 03-04-07, International Conference on Alzheimer's Disease, Chicago, **2008**.