

Mechanismus der Phenothiazin-induzierten Hemmung der Tau-Aggregation**

Elias Akoury, Marcus Pickhardt, Michal Gajda, Jacek Biernat, Eckhard Mandelkow und Markus Zweckstetter*

Die Alzheimer-Krankheit (AK) ist die häufigste Art von Demenz. Sie ist charakterisiert durch eine fortschreitende Ansammlung von extrazellulären β -Amyloid-Polypeptid(A β)-Ablagerungen und intrazellulären neurofibrillären Bündeln (NFTs), die vorwiegend aus dem Tau-Protein bestehen.^[1,2] Das Tau-Protein ist intrinsisch ungeordnet und kommt verstärkt in neuronalen Axonen vor. Dort fördert und stabilisiert es den Aufbau der Mikrotubuli.^[3] Mit dem Fortschreiten der AK aggregiert Tau und reichert sich in NFTs an.^[2] Da es bisher keine kausale Therapie für die AK und andere Tauopathien gibt, ist das Ziel der Tau-Proteinforschung, die pathologischen Konsequenzen der Amyloid-Bildung zu untersuchen und neue therapeutische Strategien zu entwickeln. In diesem Bestreben spielen Aggregationsinhibitoren als potenzielle krankheitsmodifizierende Arzneimittel und die Untersuchung ihrer Wirkweise eine wichtige Rolle.^[4]

Methylenblau (MB), ein tricyclisches Phenothiazin, das auch als Methylthionin-hydrochlorid bekannt ist,^[5] wird schon seit mehr als 100 Jahren für diverse medizinische Anwendungen und für spezifische zelluläre Ziele genutzt.^[6] MB kann die Tau-Aggregation in vitro verhindern,^[6–8] und es reduzierte die Menge von Tau-Aggregaten in einem *C. elegans*-Modell.^[9] Zudem hat diese Behandlung Tau-induzierte Toxizität bei den behandelten Würmen gelindert.^[9] Darüber

hinaus hat MB in einer klinischen Studie der Phase 2 an Alzheimer-Patienten zu vielversprechenden Ergebnissen geführt,^[10] und wie vor kurzem angekündigt, wird es bald in Phase 3 übergehen.^[11] Trotz dieser positiven Ergebnisse ist zu Vorsicht zu raten, da MB und seine Derivate, Azur A und Azur B, bei erhöhten Konzentrationen toxische Nebenwirkungen haben können.^[12] In Modellsystemen (z. B. Tau-exprimierenden neuronalen Zellen, Tau-V337M-exprimierendem *C. elegans*^[9] und Tau-P301S-exprimierendem Zebrafisch)^[13] gibt es keine nachweisbaren toxischen Wirkungen bei den in den Experimenten verwendeten Konzentrationen.

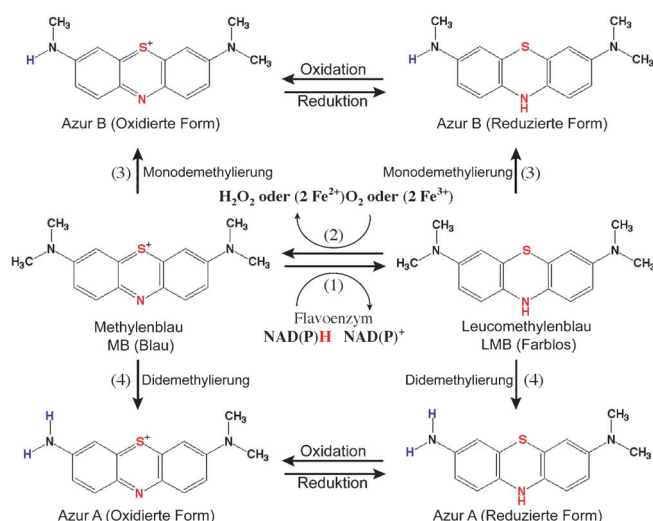
Neben der Hemmung der Tau-Aggregation wurden andere Wirkungsweisen, wie z. B. eine antioxidative Wirkung, für MB bei der AK vorgeschlagen.^[6] Darüber hinaus inhibiert MB die Oligomerisierung des Amyloid- β -Peptids durch eine Verstärkung der Fibrillenbildung und stört die Aggregation des Prionproteins.^[14,15] Mono- und Di-N-Demethylierung von MB ergeben Azur B bzw. Azur A (Schema 1), die auch aggregationshemmende und pharmakologische Effekte zeigen.^[8,12] Hier enthüllen wir einen spezifischen Wirkmechanismus von MB und seinen Metaboliten Azur A und Azur B bei der Hemmung der Tau-Aggregation. Wir zeigen, dass der Mechanismus der Tau-Aggregationshemmung auf dem Zusammenspiel von Reduktion und Oxidation der nativen Cysteinreste von Tau basiert. MB und seine Metaboliten verhindern die Bildung von Filamenten und deren toxischen Vorstufen, indem sie Tau in seiner monomeren ungeordneten Konformation bewahren.

[*] Prof. Dr. M. Zweckstetter
Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE),
Göttingen, und
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)
E-Mail: Markus.Zweckstetter@dzne.de
E. Akoury,^[‡] Dr. M. Gajda
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)
Dr. M. Pickhardt,^[‡] Dr. J. Biernat, Prof. Dr. E. Mandelkow
DZNE, Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen
Ludwig-Erhard-Allee 2, 53175 Bonn (Deutschland)
Dr. M. Pickhardt,^[‡] Dr. J. Biernat, Prof. Dr. E. Mandelkow
CAESAR Forschungszentrum,
Ludwig-Erhard-Allee 2, 53175 Bonn (Deutschland)

[†] Die Autoren trugen gleichermaßen zu dieser Arbeit bei.

[**] Wir danken Dr. Andrei Leonov, Prof. Dr. Christian Griesinger, Dr. Eva-Maria Mandelkow, Prof. Dr. R. Heiner Schirmer, Dr. Bruno Bulic und Dr. Dmitri Svergun für Diskussionen, Ilka Lindner für technische Unterstützung, dem DFG-Forschungszentrum „Nanoscale Microscopy and Molecular Physiology of the Brain“, dem MPG-Konsortium „Toxic Protein Conformation“, dem Tau-Konsortium und der DFG (ZW 71/2-2, 3–2 an M.Z.).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201208290> zu finden.



Schema 1. Die Reduktion von MB ergibt Leucomethylenblau (1). MB wird in oxidierenden Bedingungen regeneriert (2). Mono- und Di-N-Demethylierung führen zu Azur B (3) und Azur A (4).

Die berichteten IC₅₀-Werte für die Hemmung der Tau-Aggregation durch MB variieren von ca. 2 μM für Tau mit vier Wiederholungseinheiten (4-Repeat-Tau) bis ca. 30 μM für Tau mit drei Wiederholungseinheiten (3-Repeat-Tau).^[6,8,16] Zur Identifizierung der Tau-Aminosäuren, welche für die Interaktion mit MB zuständig sind, verwendeten wir NMR-Spektroskopie. Bei steigenden MB-Konzentrationen wurden Veränderungen der NMR-Signalfrequenz und der Intensität in zweidimensionalen ¹H-¹⁵N-Korrelations(HSQC)-Spektren des 441 Aminosäuren langen Volllängen-Tau-Proteins, htau40, beobachtet (Abbildung 1a und Abbildung S1, Hin-

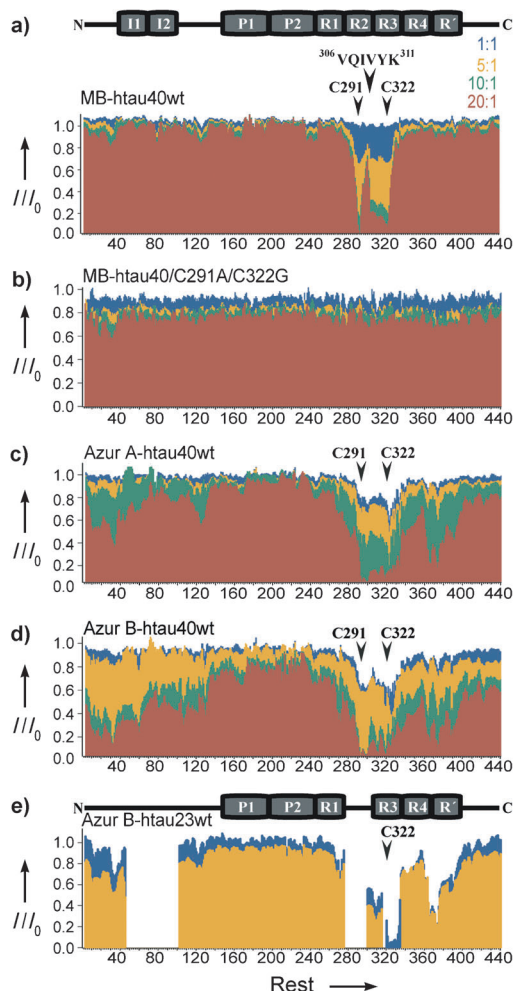


Abbildung 1. Die Interaktion von MB mit Tau. NMR-Intensitätsverhältnisse I/I_0 (I = Intensität der Tau-Resonanzen in Anwesenheit der Verbindung; I_0 = Signalintensitäten von ungebundenem Tau) in 2D-¹H-¹⁵N-HSQC Spektren von htau40 (a, b, c, d). Der Austausch von Tau zwischen dem ungebundenen und gebundenen Zustand führt zu Signalverbreiterungen ($I/I_0 < 1.0$). (a) und (b) zeigen die NMR-Verbreiterungsprofile des Wildtyp-Proteins und der Cystein-freien Variante bei steigenden MB-Konzentrationen (die Ligand/Protein-Verhältnisse sind farblich markiert). Eine entsprechende Titrationsanalyse wurde mit Wildtyp-htau40 und Azur A (c) und Azur B (d) durchgeführt. Die Domänenstruktur von htau40 ist oberhalb gezeigt (I = Insert, P = prolinreiche Region, R = Pseudo-Repeat). e) NMR-Signal-Verbreiterung in ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren von htau23 (fehlende I1, I2 und R2) in der Gegenwart von Azur B. Alle NMR-Experimente enthielten 100 μM Protein und 1 mM DTT in 50 mM Phosphatpuffer, pH 6.8.

tergrundinformationen). Änderungen in den chemischen Verschiebungen traten in den Wiederholungseinheiten (Repeats) R2 und R3 in der Mikrotubulibindungsdomäne auf und umfassten das zweite Hexapeptid ³⁰⁶VQIVYK³¹¹, das essenziell für die Tau-Aggregation ist. Außerdem wurden Veränderungen des NMR-Signals am N-Terminus in Nachbarschaft der aromatischen Reste Y18 und Y29 festgestellt. Am auffälligsten war die starke Signalverbreiterung der Reste in der Nähe der beiden Cysteine C291 und C322 (Abbildung 1a). Substitution der beiden Cysteine durch Alanin oder Glycin führte zu einem Verschwinden der NMR-Linienv Verbreiterung in der Repeat-Region (Abbildung 1b). Gleichzeitig verlor MB seine hemmende Wirkung auf die Tau-Aggregation (Abbildung 2a,b, Abbildung S2).

Um einen Einblick in die Bedeutung des Oxidations/Reduktionszustandes der Tau-Cysteinreste zu erhalten, haben wir einen Überschuss Dithiothreitol (DTT) zur Tau-MB Probe gegeben. Dies führte zu einer verminderten Signalverbreiterung (siehe Abbildung S3) und deutet auf eine MB-induzierte Oxidation der nativen Cysteinreste hin. Durch NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie wurde ferner nachgewiesen, dass MB Cysteine zu Sulfensäure, Sulfinsäure und Sulfonsäure modifiziert (Abbildung 3a–c und Abbildung S4).

Wichtig ist auch, dass MB und seine Derivate einen zentralen Thiazinring enthalten und somit in der Lage sind,

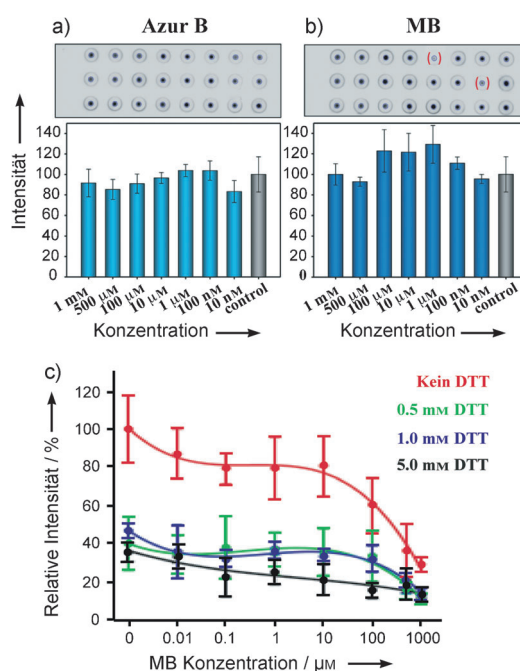


Abbildung 2. a, b) Filter-Assay und immunologischer Nachweis von htau40/C291A/C322A (siehe auch Abbildung S2) mit Azur B (a) und MB (b). Es ist zu beachten, dass Azur B und MB die ThS-Fluoreszenz stören und daher eine Verwendung der ThS-Fluoreszenz zum Fibrillennachweis nicht geeignet ist. c) Aggregation des 3-Repeat-Tau-Konstrukts K19 in Gegenwart verschiedener DTT- und MB-Konzentrationen. Der Nachweis erfolgte mittels eines Filter-Assays (siehe auch Abbildung S5). Hinweise zur Probenaufarbeitung finden sich in den Hintergrundinformationen. Die Intensität bezieht sich auf die Menge an aggregiertem Tau-Protein.

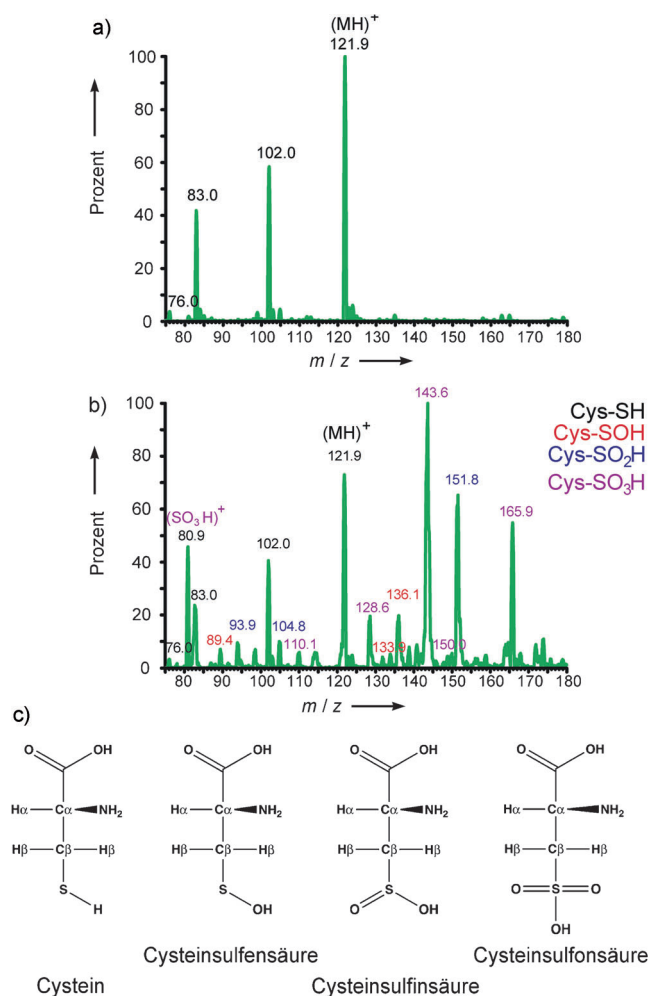


Abbildung 3. a,b) Massenspektrometrische Analyse der ESI-MS-Spektren der freien Aminosäure Cystein in Abwesenheit (a) und Anwesenheit von MB (b). Die farbkodierten Fragmente entsprechen verschiedenen Oxidationsstufen der Sulfhydrylgruppe entsprechend den in (c) gezeigten chemischen Strukturen.

Oxidations-Reduktions-Reaktionen einzugehen. Obwohl bei neutralem pH-Wert die Autoxidation der reduzierten Form von MB, Leucomethylenblau (LMB), sehr schnell ist und LMB nicht stabil ist, können Dithiolverbindungen LMB unter quasi-physiologischen Bedingungen erzeugen (Abbildung S4).^[17] Da wir 1 mM DTT verwendet haben, um die nativen Cysteinreste von Tau in einem reduzierten Zustand zu halten, befand sich bei Erhöhung der MB-Konzentration ein steigender Anteil von MB in der oxidierten Form.

Mit NMR-Spektroskopie wurde eine verminderte Bindungsfähigkeit von MB an Tau in Gegenwart von DTT gemessen (Abbildung S3). Um die Frage zu beantworten, ob MB auch unter diesen reduzierenden Bedingungen eine hemmende Wirkung auf die Tau-Aggregation hat, wurde ein Filter-Assay mit dem 3-Repeat-Tau-Konstrukt K19 (enthält nur ein Cystein) in Gegenwart unterschiedlicher DTT- und MB-Konzentrationen durchgeführt. K19-Protein (10 μ M) wurde mit Heparin₃₀₀₀ (2.5 μ M) über einen Zeitraum von 168 h mit DTT (0, 0.5, 1 und 5 mM) inkubiert. Der Aggregationsstatus dieser MB-freien Probe wurde in einem Thiofla-

vin S(ThS)-Assay untersucht (Abbildung S5). Diese Messungen zeigten, dass die Anwesenheit von DTT zu einer verminderten Tau-Aggregation führt. Das ThS-Signal sank auf 36 % der DTT-freien Kontrolle, was im Einklang mit einer verringerten Konzentration von K19-Dimeren durch eine DTT-vermittelte Zerstörung intermolekularer Disulfidbrücken ist.

Im nächsten Schritt untersuchten wir die Aggregationsfähigkeit von K19 unter verschiedenen reduzierenden Bedingungen. MB wurde im Bereich zwischen 0 und 1 mM eingesetzt, die Probe wurde über einen Zeitraum von 168 Stunden aggregiert und mittels eines Filter-Assays analysiert (Abbildung 2c und Abbildung S5). In der DTT-freien Kontrolle senkte MB die Aggregationseffizienz des K19-Proteins um ca. 70 %. Mit Zugabe von steigenden DTT-Konzentrationen sank der Einfluss von MB auf die Tau-Aggregation: bei 0.5 mM und 1 mM DTT senkte MB die Aggregationseffizienz um ca. 30 %, und mit 5 mM DTT um 25 %. Diese Experimente zeigen jedoch, dass MB die Aggregation von 3-Repeat-Tau selbst unter reduzierenden Bedingungen und bei DTT-Konzentrationen bis 5 mM hemmen kann.

In lebenden Zellen wird die reduzierende Funktion durch Glutathion (GSH) vermittelt, ein Antioxidans, das Schäden an wichtigen Zellbestandteilen verhindert. Für die korrekte Funktion im Zytosol der Zelle erreicht GSH oft niedrige millimolare Konzentrationen.^[18] Die in unseren In-vitro-Experimenten verwendeten DTT-Konzentrationen sind daher vergleichbar mit einer relativ hohen zellulären GSH-Konzentration. Jedoch ist bekannt, dass die GSH-Konzentration mit zunehmenden Alter und bei altersbedingten, neurodegenerativen Erkrankungen abnimmt.^[19] Als Konsequenz wird das reduzierende Potential im Zytosol schwächer, und die Aggregation des Tau-Proteins wird begünstigt. Ein weiterer Faktor, der die Aggregation des Tau-Proteins unterstützen kann, ist oxidativer Stress. Dieser ist in Neuronen, die von neurodegenerativen Erkrankungen betroffen sind, erhöht und führt zu einer Verschiebung des Redoxgleichgewichts von GSH zu weniger antioxidativen Werten und damit zu schwächeren antioxidativen Eigenschaften.^[20]

In vitro und in vivo wird die Demethylierung von MB begünstigt.^[5] Um den Einfluss der Demethylierung von MB auf die Wechselwirkung mit Tau zu verstehen, haben wir die Bindung der didemethylierten und monodemethylierten Derivate von MB, Azur A und Azur B (Schema 1), mit htau40 untersucht. Bei niedrigen Konzentrationen führten die beiden Derivate zu NMR-Signalverbreiterungen in der Nähe der htau40-Cysteine (Abbildungen 1c,d), was im Einklang mit deren Oxidation ist. Bei höheren Konzentrationen und im starken Gegensatz zu MB traten jedoch bei Azur A und Azur B starke Signalverbreiterungen auch in Regionen mit aromatischen Resten auf, wie z.B. am N-Terminus und im Bereich der Reste 360–400 (¹⁶GTYG¹⁹, ²⁷GGYT³⁰, ¹¹⁴LEDEAAGHVT¹²³, ³⁶²HVPGGG³⁶⁷, ³⁷¹IETH³⁷⁴ und ³⁸⁶TDHGAEIVYK³⁹⁶). Zudem wurde ein ähnlicher Effekt bei der Tau-Isoform mit drei Repeats, welche nur das Cystein C322 enthält, beobachtet: Starke Signalverbreiterungen für die Reste ³⁶²HVPGGG³⁶⁷ und ³⁷¹IETH³⁷⁴ (Abbildung 1e). Der Grund dafür, dass Azur A und Azur B, nicht aber MB an die aromatischen Reste des Tau-Proteins binden, liegt ver-

mutlich in der hydrophilen Natur des MB-Moleküls. So wurde der hydrophile Charakter von MB in früheren Studien dafür verantwortlich gemacht, dass es sich nicht für eine effiziente Färbung normaler Blutzellen eignet, Azur B hingegen schon.^[5] Somit erlaubt die Demethylierung von MB neue Arten der Wechselwirkung im Einklang mit dem Befund, dass Azur A und Azur B die Tau-Aggregation 30-fach stärker als MB hemmen.^[7]

In Gegenwart von MB, Azur A und Azur B behält das ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von ht40 eine geringe Dispersion der chemischen Verschiebungen – ein charakteristisches Merkmal eines ungeordneten Proteins. Um weitere Einblicke in die von MB stimulierten Tau-Konformere zu erhalten, wurden Circular dichroismus(CD)-Messungen und Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) durchgeführt. Auf Basis der CD-Messungen wird klar, dass die Bindung von Azur B nicht die Bildung regelmäßiger Sekundärstrukturen in Tau hervorruft (Abbildung 4a). SAXS zeigte ferner, dass auch bei großem Überschuss an Azur B Tau ein ungeordnetes Protein ist (Abbildung 4b,c). So war der mittels SAXS bei fünffachem Überschuss an Azur B bestimmte Gyrationradius R_g von (6.7 ± 0.3) nm vergleichbar mit dem R_g von monomeren Tau.^[21] Dies zeigt, dass die MB-Tau-Wechselwirkung nicht in der Bildung von Tau-Aggregaten resultiert. Die Bestimmung des hydrodynamischen Radius durch NMR-Spektroskopie mit gepulsten Feldgradienten (PFG)^[22] und dynamische Lichtstreuung (DLS) wies zudem auf eine leichte Verdich-

tung des Tau-Konformerensembles hin. Diese Verdichtung wurde in Gegenwart von überschüssigem DTT aufgelöst (Abbildung 4d). Wir schlussfolgern, dass MB und seine Derivate Azur A und Azur B das Tau-Protein in einer monomeren, zur Aggregation unfähigen Form halten.

Ein großes Problem bei Aggregationshemmern ist, dass diese die physiologische Funktion des Proteins stören können. Bei Tau wäre dies die Fähigkeit, den Mikrotubuluaufbau zu fördern.^[23] Azur A stört jedoch die Tau-Tubulin-Wechselwirkung nicht einmal, wenn Azur A in 1000-fachem Überschuss gegenüber Tau vorliegt.^[7] Zudem beeinflusst MB nicht den Tau-geförderten Mikrotubuluaufbau.^[8,24] Diese Ergebnisse zeigen, dass die durch MB und seine Derivate hervorgerufenen Tau-Konformationen in der Lage sind, effizient mit Mikrotubuli zu interagieren.

Unsere Messungen beweisen, dass MB und seine N-demethylierten Derivate Azur A und Azur B die beiden nativen Tau-Cysteine zu Sulfensäure, Sulfinsäure und Sulfonsäure des Cysteins verändern. Die Modifizierung von Cysteinresten durch reversible Oxidation der Sulfhydrylgruppe und die Bildung von Sulfensäuren spielen eine wichtige regulatorische Rolle in biologischen Systemen.^[25] Der nukleophile Charakter der Sulfhydrylgruppe ermöglicht mehrere verschiedene Redoxreaktionswege und spielt eine fördernde Rolle bei Elektronenabgabe, Hydrid-Transfer-Reaktionen und Reaktionen mit freien Radikalen. Hierbei ist die Disulfidbrückenbildung die dominierende chemische Reaktion, welche die Proteinestabilität erhöht. Im Fall von Tau wurde gezeigt, dass eine intramolekulare Vernetzung der beiden in den 4-Repeat-Isoformen vorhandenen Cysteinresten die Aggregation stark hemmt, während die Bildung von intermolekularen Disulfidbindungen in 3-Repeat-Isoformen die Aggregation fördert.^[26] Dagegen zeigt unsere Studie, dass eine MB-vermittelte Modifikation der Cysteine zu Sulfensäure, Sulfinsäure und Sulfonsäure sowohl 4-Repeat-Tauisoformen als auch 3-Repeat-Tau in einen aggregationsunfähigen, monomeren Zustand überführt (Abbildungen 3, 4): MB hemmt die Aggregation von 4-Repeat-Tau und 3-Repeat-Tau mit IC_{50} -Werten von ca. $2 \mu\text{M}$ ^[8,16] und ca. $30 \mu\text{M}$.^[6] Ein niedrigerer IC_{50} -Wert für 3-Repeat-Tau steht im Einklang mit der Tatsache, dass 3-Repeat-Tau nur das Cystein C322 enthält und damit im Gegensatz zu 4-Repeat-Tau nur eine einzige Modifizierungsstelle besitzt. Die spezifische Modifikation der Cysteinreste ist entscheidend für die Aggregationshemmung, da ein Ersetzen der Cysteinreste durch Alanin die Filamentbildung nicht stört (Abbildung S2), jedoch die hemmende Wirkung von MB auf die Tau-Aggregation aufhebt (Abbildungen 2 a, b).

Unsere Studie erlaubt mechanistische Einblicke in die Hemmung der Tau-Aggregation durch Phenothiazine. Eine spezifische Modifikation der nativen Cysteinreste bewahrt das Tau-Protein in einer monomeren Konformation und verhindert die Bildung von Filamenten und deren toxischen Vorstufen. Demethylierung von Methylblau

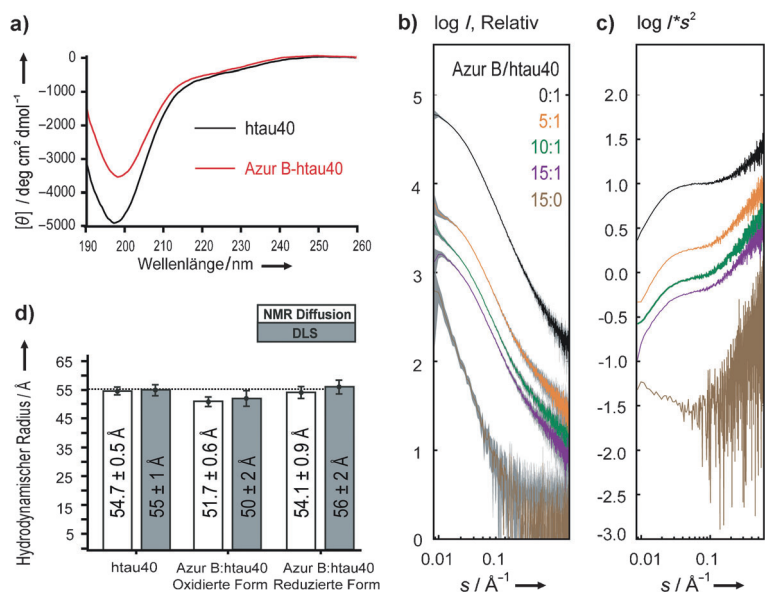


Abbildung 4. MB und seine Metaboliten halten Tau im monomeren ungeordneten Zustand. a) Fern-UV-CD Spektren von ht40 in Abwesenheit (schwarz) und Anwesenheit von Azur B (20:1, rot). b) SAXS-Profil und c) Kratky-Diagramme von ht40 allein (schwarz) und zusammen mit Azur B bei steigenden Ligand/Protein Verhältnissen (farbkodiertes Panel). $s = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$, wobei θ der Streuwinkel ist und $\lambda = 1.5 \text{\AA}$ die Wellenlänge an der EMBL-Strahlführung X33. Zur besseren Visualisierung sind die Kurven gegeneinander verschoben (mit normierten y-Werten). d) Hydrodynamischer Radius von ht40 in Abwesenheit und Anwesenheit eines 20-fachen Überschusses an Azur B und nach Zugabe von 8 mM DTT (rechts). Es handelt sich um NMR- und DLS-Messungen. Details zur Probenvorbereitung finden sich in den Hintergrundinformationen.

schaft neue Interaktionen mit Tau und ermöglicht zusätzliche Wege zur Modulierung der Tau-Aggregation.

Experimentelles

Die Expression, Aufreinigung und Isotopenmarkierung von Wildtyp-htau40 und mutiertem Protein wurde entsprechend etablierter Protokolle durchgeführt.^[27] MB, Azur A und B wurden von MP Biomedicals (MP Biomedicals S.A. Heidelberg, Deutschland) gekauft. Die NMR-Experimente wurden bei 5°C an einem Bruker Avance 700 MHz oder Avance III 800 MHz Spektrometer durchgeführt. Die NMR-Proben enthielten ¹⁵N-markiertes Tau (100 µM) in Phosphatpuffer (50 mM, pH 6.8), DTT (1 mM) und D₂O (10%, v/v). SAXS-Daten wurden bei X33 am European Molecular Biology Laboratory DORIS III (DESY) bei einer Wellenlänge von 1.5 Å bei 25°C mit einem Pilatus 1M Photonen-zähl-detektor gemessen. Die Proben wurden in Phosphatpuffer (50 mM) hergestellt und enthielten htau40 (100 µM, 4.5 mgmL⁻¹) und DTT (1 mM). Vollständige Methoden finden sich in den Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 15. Oktober 2012,
veränderte Fassung am 14. Dezember 2012
Online veröffentlicht am 11. Februar 2013

Stichwörter: Aggregation · Alzheimer-Krankheit · Inhibitoren · NMR-Spektroskopie · Tau-Protein

- [1] J. Hardy, D. J. Selkoe, *Science* **2002**, 297, 353–356.
- [2] M. Goedert, M. G. Spillantini, *Science* **2006**, 314, 777–781.
- [3] D. G. Drubin, M. W. Kirschner, *J. Cell Biol.* **1986**, 103, 2739–2746.
- [4] B. Bulic, M. Pickhardt, B. Schmidt, E. M. Mandelkow, H. Waldmann, E. Mandelkow, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 1772–1785; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 1740–1752.
- [5] M. Wainwright, L. Amaral, *Trop. Med. Int. Health* **2005**, 10, 501–511.
- [6] R. H. Schirmer, H. Adler, M. Pickhardt, E. Mandelkow, *Neurobiol. Aging* **2011**, 32, 2325, e7–16.
- [7] C. M. Wischik, P. C. Edwards, R. Y. Lai, M. Roth, C. R. Harrington, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 11213–11218.
- [8] S. Taniguchi, N. Suzuki, M. Masuda, S. Hisanaga, T. Iwatsubo, M. Goedert, M. Hasegawa, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 7614–7623.
- [9] C. Fatouros, G. J. Pir, J. Biernat, S. P. Koushika, E. Mandelkow, E. M. Mandelkow, E. Schmidt, R. Baumeister, *Hum. Mol. Genet.* **2012**, 21, 3587–3603.
- [10] C. Wischik, R. Staff, *J. Nutr. Health Aging* **2009**, 13, 367–369.
- [11] C. Wischik, TauRX Therapeutics: Sept 10-th, 2012, Pressemitteilung, die den Beginn einer globalen klinischen Studie der Phase 3 bei einer Art von frontotemporaler Demenz (FTD), auch bekannt als Pick-Krankheit, ankündigt.
- [12] F. Culo, D. Sabolovic, L. Somogyi, M. Marusic, N. Berbiguier, L. Galey, *Agents Actions* **1991**, 34, 424–428.
- [13] F. van Bebber, D. Paquet, A. Hruscha, B. Schmid, C. Haass, *Neurobiol. Dis.* **2010**, 39, 265–271.
- [14] M. Necula, L. Breydo, S. Milton, R. Kaye, W. E. van der Veer, P. Tone, C. G. Glabe, *Biochemistry* **2007**, 46, 8850–8860.
- [15] P. Cavaliere, J. Torrent, S. Prigent, V. Granata, K. Pauwels, A. Pastore, H. Rezaei, A. Zagari, *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, 1832, 20–28.
- [16] E. Chang, E. E. Congdon, N. S. Honson, K. E. Duff, J. Kuret, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 3539–3547.
- [17] K. Buchholz, R. H. Schirmer, J. K. Eubel, M. B. Akoachere, T. Dandekar, K. Becker, S. Gromer, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 183–191.
- [18] P. M. Kidd, *Altern. Med. Rev.* **1997**, 2, 155–176.
- [19] H. Liu, H. Wang, S. Shenvi, T. M. Hagen, R. M. Liu, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2004**, 1019, 346–349.
- [20] G. Perry, A. D. Cash, M. A. Smith, *J. Biomed. Biotechnol.* **2002**, 2, 120–123.
- [21] E. Mylonas, A. Hascher, P. Bernado, M. Blackledge, E. Mandelkow, D. I. Svergun, *Biochemistry* **2008**, 47, 10345–10353.
- [22] E. O. Stejskal, J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.* **1965**, 42, 288–292.
- [23] M. D. Weingarten, A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, M. W. Kirschner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, 72, 1858–1862.
- [24] W. Li, J. B. Sperry, A. Crowe, J. Q. Trojanowski, A. B. Smith III, V. M. Lee, *J. Neurochem.* **2009**, 110, 1339–1351.
- [25] N. J. Kettenhofen, M. J. Wood, *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, 23, 1633–1646.
- [26] O. Schweers, E. M. Mandelkow, J. Biernat, E. Mandelkow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 8463–8467.
- [27] M. D. Mukrasch, J. Biernat, M. von Bergen, C. Griesinger, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 24978–24986.