

DIE ALZHEIMERSCHES DEMENZ ALS FOLGE VON CHRONISCHER PARODONTITIS MIT PORPHYROMONAS GINGIVALIS ALS URSÄCHLICHER VERBINDUNG ZWISCHEN BEIDEN ERKRANKUNGEN

AKRONYM: GUMS&BRAINS

FÖRDERKENNZEICHEN: 01ED2012

Schlussbericht zum Förderprogramm:

JPND “Multinational Research Projects in Personalised Medicine for Neurodegenerative Diseases”

JPND-2019-466-285

Laufzeit: 01.05.2020 – 31.12.2023

Jun.-Prof. Dr. Holger Cynis

Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie | IZI
Abteilung für Molekulare Wirkstoffbiochemie und Therapieentwicklung | MWT
Weinbergweg 22
06120 Halle

Interne Projektnummer: 172-100218

Projektpartner:

Polen: Jan Potempa, Jagiellonen-Universität, Krakau
Tschechien: Jan Konvalinka, IOCB, Prag
Dänemark: Jan J. Enghild, Universität Aarhus
Norwegen: Piotr Mydel, Universität Bergen

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung

Im Rahmen des Gesamtprojektes: „Gums&Brains“ sollten die Zusammenhänge zwischen chronischer Parodontitis und der Pathologie der Alzheimerschen Erkrankung (AD), mit Fokus auf Infektionen mit dem Parodontiserreger *Porphyromonas gingivalis* (Pg), genauer untersucht werden. Die Arbeiten von Fraunhofer IZI-MWT waren im WP2: „Toxikologische und pharmakologische Testung von pgQC-Inhibitoren“ aufgeführt.

Für die nationale Beantragung wurden in der vorhabenbezogenen Ressourcenplanung zwei Teilarbeitspakete formuliert:

1. Charakterisierung von pgQC-Inhibitoren *in vitro*
2. Machbarkeitsstudien unter Verwendung von pgQC-Inhibitoren in AD-Mäusen

Zusammenfassend war die Zielsetzung der am Fraunhofer IZI-MWT durchgeführten Arbeiten die Untersuchung des Einflusses chronischer Parodontitis auf die Ausprägung der Alzheimer-Pathologie in entsprechenden Mausmodellen unter Testung eines neuartigen pgQC-Inhibitors, der spezifisch die Virulenzfaktoren von *P. gingivalis* blockiert. Hier sollte zunächst ein geeigneter Inhibitor identifiziert und *in vitro* charakterisiert werden. Parallel wurde ein Mausmodell der chronischen, Pg-abhängigen Parodontitis etabliert. Ziel dieser Etablierungsversuche war, die mindestens erforderliche Infektionsdauer, sowie die geeignetste Methode zur Beurteilung des Parodontitis-Status der Versuchstiere zu bestimmen. Die Identifizierung eines Inhibitors und die Etablierung des Parodontitismausmodells dienten im Projektverlauf der Überprüfung des Einflusses einer Pg-Infektion auf die Alzheimer-typische Pathologie im AD-Mausmodell und zur Testung der Effektivität der Behandlung mit pgQC-Inhibitoren. Dazu wurden mehrerer Behandlungsversuche durchgeführt und analysiert.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Voraussetzung für die Durchführung des Vorhabens waren Erfahrungen des Fraunhofer IZI-MWT in den drei wesentlichen Bereichen des Projektantrages: (I) Entwicklung von spezifischen Inhibitoren bakterieller Glutaminyl Cyclasen (pgQC-Inhibitoren) als orale Antiinfektiva zur Behandlung von *P. gingivalis*-Infektionen, (II) Pharmakologische Charakterisierung von kleinen Wirkstoffmolekülen und (III) Generierung, Charakterisierung und Behandlung von Alzheimer-Mausmodellen.

Aufbauend auf früheren Arbeiten zu Inhibitoren humaner Glutaminyl Cyclasen basierte das Design der Hemmstoffe für *P. gingivalis* Glutaminyl Cyclase auf Imidazol- bzw. Benzimidazol-Derivaten (**Abbildung 1**). Hier wurden vor allem das Tetrahydroimidazopyrimidin (**1**) und das Aminobenzimidazol (**2a**) bzw. Aminoimidazo[4,5-*b*]pyridin (**2b**) als vielversprechende Grundstrukturen identifiziert. Durch weitere strukturelle Modifikationen konnten vor Projektstart für beide Substanzklassen Derivate erhalten werden, die eine hohe *in vitro* Aktivität gegenüber dem Zielenzym aufwiesen. Während die Derivate des Tetrahydroimidazopyridins (**3**) recht unspezifisch auch die humane Glutaminyl Cyclase hemmten, wiesen die Aminobenzimidazol-derivate (**4a**) und Aminoimidazo[4,5-*b*]pyridine (**4b**) eine vergleichsweise hohe Selektivität für das bakterielle Enzym auf. Beide Substanzklassen wurden von Fraunhofer IZI-MWT bereits zum Patent angemeldet (WO 2018100159 und WO 2019162458).

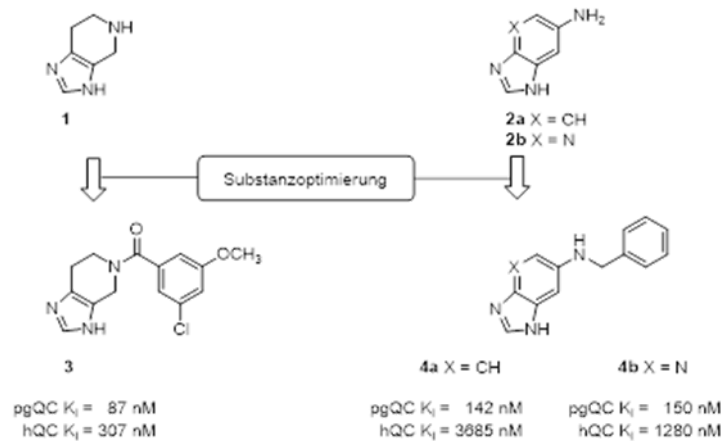


Abbildung 1 Eigene Arbeiten zur Generierung pgQC-spezifischer Inhibitoren. Die Arbeiten wurden im Rahmen des EU-FP7-Projektes „TRIGGER“ durchgeführt.

Weitere Voraussetzung für die Durchführung der Arbeiten waren die vorangegangene intensive Charakterisierung des Alzheimer-Mausmodells 5xFAD, so dass das jeweilige Auftreten der Pathologie und entsprechende Verhaltensveränderungen im Zeitverlauf gut bekannt waren.

5xFAD Mäuse wurden erstmals 2006 von Oakley und Kollegen beschrieben. Das Modell überexprimiert die 695 Aminosäure lange Form des humanen APP mit den familiären Alzheimermutationen: Schwedische Mutation (K670N, M671L), Florida Mutation (I716V) und London Mutation (V717I). Außerdem exprimieren die Tiere humanes PS1 mit 2 familiären Alzheimermutationen: M146L und L286V. Die Tiere entwickeln eine sehr früh beginnende und im Alter stark ausgeprägte zerebrale Amyloidose (**Abbildung 2**)

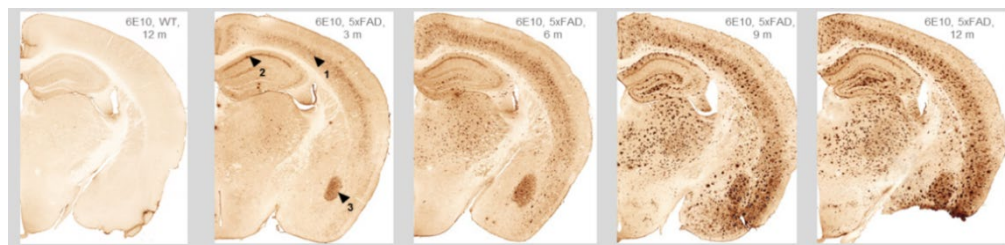


Abbildung 2 Immunhistochemische Färbungen von beta-Amyloid-Ablagerungen in Gehirnen von 5xFAD Mäusen im Vergleich zum WT im Alter von 12 Monaten (12 m). Die Färbung erfolgte mit einem Amyloid-spezifischen Antikörper (6E10). Dargestellt ist der Zeitverlauf der Pathologie beginnend im Alter von 3 Monaten (3 m) im Abstand von 3 Monaten bis zu einem Alter von 12 Monaten (12 m). Die Pfeile zeigen eine frühe Reaktion des verwendeten Antikörpers mit Zellen des Kortex, des Hippocampus und der Amygdala.

5xFAD Mäuse entwickeln außerdem, verursacht durch die zerebrale Amyloidose, im Alter von ca. 11 Monaten einen robusten Verhaltensphänotyp, welcher sich durch Veränderungen des Explorations- und Angstverhaltens und des Lernens und Gedächtnisses auszeichnet (**Abbildung 3**).

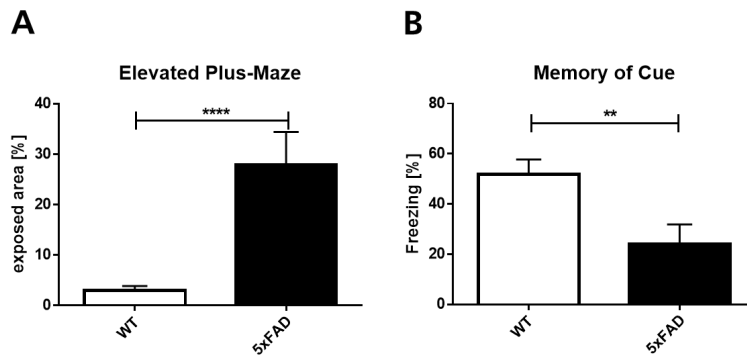


Abbildung 3 Verhaltensuntersuchungen in 5xFAD im Alter von 12 Monaten. **(A)** Explorations- und Angstverhalten analysiert im *Elevated Plus Maze*. 5xFAD-Mäuse zeigen ein signifikant verändertes Angstverhalten im Vergleich zu WT-Mäusen ($p < 0.0001$). **(B)** Gedächtnisleistung analysiert im *Contextual Fear Conditioning*. 5xFAD zeigen eine signifikant schlechtere Gedächtnisleistung als WT-Mäuse ($p < 0.01$).

Auf Basis von Verhaltensuntersuchungen, histologischen Färbungen und biochemischen Assays waren wir vor Projektstart in der Lage, neuartige Behandlungskonzepte für AD in diesen Tieren zu überprüfen. Exemplarisch ist in **Abbildung 4** der Effekt der Behandlung von 5xFAD mit einem therapeutischen Antikörper gezeigt.

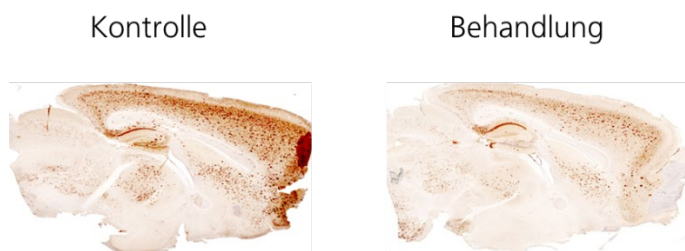


Abbildung 4 Behandlung von 5xFAD-Mäusen mittels eines therapeutischen Antikörpers. Unter Behandlung ist eine verringerte Intensität der Amyloidablagerungen sichtbar.

Zusammenfassend, Fraunhofer IZI-MWT hatte bereits vor Projektstart gezeigt, dass es in der Lage ist, Studien zu Alzheimer-Behandlungskonzepten durchzuführen, auszuwerten und die notwendigen Schlüsse zu ziehen. In Zusammenhang mit der pharmakologischen Expertise aus *in vitro* Versuchen und pharmakokinetischen Assays bildete dies die Basis für die weiteren Arbeiten im Projekt „Gums&Brains“.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens,

Wir möchten voranstellen, dass mit Genehmigung des Vorhabens im Jahr 2020 die Corona-Pandemie ausbrach, was Einfluss auf alle Bereiche unseres Forschungsbetriebes hatte. Unter widrigen Bedingungen haben wir es geschafft die vorgesehenen Arbeiten durchzuführen. Es waren aber Anpassungen notwendig, auf die wir in diesem Bericht an späterer Stelle eingehen werden.

Das Projekt war unterteilt in einen *in vitro* – Teil, in dem pgQC-Inhibitoren charakterisiert werden sollten und in einen *in vivo*-Teil, in dem der Einfluss von Pg auf die zerebrale Amyloidpathologie und der Einfluss einer Behandlung mit PgQC-Inhibitor untersucht werden sollte. Die Aufteilung in diese zwei Bereiche sollte

es ermöglichen die notwendigen Tierversuchsgenehmigungen für die Alzheimerstudien einzuholen, während die Voraussetzungen für die Behandlung *in vitro* geschaffen wurden.

Am Ende der *in vitro* Charakterisierung wurde eine Substanz selektiert.

Diese wurde zunächst für pharmakokinetische Untersuchungen in der Ratte verwendet. Dabei wurde die Bioverfügbarkeit der Substanz nach oraler Applikation mit der nach intravenöser Applikation verglichen.

Für die Etablierung eines Tiermodells für die chronische Parodontitis wurden in einem weiteren Schritt Wildtyp-Mäuse (Stamm C57BL6/J) eingesetzt, da es sich bei diesem Stamm um den genetischen Hintergrund der Alzheimer-Mauslinie 5xFAD handelte. Es wurden zwei aufeinanderfolgende Teilversuche mit jeweils n=15 Tieren durchgeführt, in denen die Tiere oral mit *Porphyromonas gingivalis* infiziert wurden. Das Protokoll für die oralen Applikationen beinhaltete drei Applikationen pro Woche. Um die notwendige Infektionsdauer zu bestimmen, wurden die Tiere über unterschiedlich lange Zeiträume (8, 12, 16, 20, 22 Wochen) oral infiziert. Nach dem jeweiligen Zeitraum wurden jeweils drei Tiere euthanasiert, um anschließend Parodontitis-relevante Parameter zu beurteilen. Pro Zeitpunkt wurden zwei Tiere für histologische Untersuchungen des Zahnhalteapparats (Zielparameter: inflammatorisches Zellinfiltrat) verwendet, während ein Tier pro Zeitpunkt mittels Micro-Computer-Tomographie (μ CT, Zielparameter: alveolärer Knochenverlust) verwendet wurde. Dabei sollte in erster Linie die Eignung der jeweiligen Methode für die Fragestellung beurteilt werden. Aufbauend auf den Ergebnissen des ersten Teilversuchs wurde der zweite Teilversuch durchgeführt, um die Ergebnisse zu validieren.

Nach Abschluss der Etablierungsversuche wurden basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen Behandlungsversuche zunächst in 3 Monate alten 5xFAD-Mäusen (Frühbehandlung der AD-Pathologie) und nachfolgend in 6 Monate alten 5xFAD-Mäusen (Spätbehandlung der AD-Pathologie) durchgeführt. In diesem Versuchsteil wurden das etablierte Behandlungsprotokoll, sowie die optimierte Methode zur Quantifizierung Parodontitis-relevanter Parameter eingesetzt. Die Behandlung der chronischen Parodontitis erfolgte mit dem zuvor selektierten pgQC-Inhibitor. Untersucht wurde im Anschluss an die tierexperimentellen Arbeiten sowohl der Einfluss der oralen Infektion mit *Porphyromonas gingivalis* als auch der Einfluss der Pathogen-spezifischen Behandlung auf die Pathologie am Zahnhalteapparat, die Amyloid- β Plaque-Pathologie im Gehirn und auf den AD-typischen Verhaltensphänotypen von 5xFAD-Mäusen.

4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere

- **Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden,**

Die Arbeiten zur Inhibition von pgQC basierten auf vorhergehenden Arbeiten des Fraunhofer IZI-MWT im Rahmen des EU-FP7-Projektes „TRIGGER“. Die Fraunhofer-Gesellschaft ist Inhaberin der Schutzrechtsanmeldungen WO 2018100159 und WO 2019162458, welche pgQC-spezifische Inhibitoren und deren Anwendung in der Behandlung von Parodontose beschreiben. Projektmitarbeitende des Gums&Brains-Projektes sind zum Teil Miterfinder dieser Patente.

- **Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste,**

Für die Etablierung eines Mausmodells für die chronische Parodontitis am Fraunhofer IZI-MWT wurden aus der Literatur bekannte Protokolle angewendet (1, 2). Des Weiteren fand ein reger Austausch mit dem Projektpartner in Krakau, Polen statt, bei dem entsprechende Modelle bereits im Labor etabliert waren. Für die Optimierung der μ CT-Untersuchungen wurden in der Literatur beschriebene Verfahren verwendet und z.T. angepasst (3–5). Das 5xFAD-Mausmodell wurde erstmals von Oakley und Kollegen (6) beschrieben und bereits im Vorfeld dieses Projekts am Fraunhofer IZI-MWT etabliert umfassend charakterisiert.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Das Projekt ist Bestandteil des Verbundvorhabens („Gums&Brains“) mit Partnern in Polen, Dänemark, Norwegen und Tschechien. Insbesondere mit den Partnern an der **Universität Krakau**, **Universität Aarhus** und **Universität Bergen** fand ein reger Austausch statt. So war die **Universität Krakau** beratend an der Etablierung des Parodontitismodells in der Maus in unserer Tierhaltung beteiligt. Weiterhin stellten wir Probenmaterial aus den tierexperimentellen Arbeiten der **Universität Bergen** und der **Universität Aarhus** zu weiteren Untersuchungen zur Verfügung. Hierbei lag der Fokus auf der detaillierten Untersuchung des Einflusses der Infektion mit *Porphyromonas gingivalis* auf die Gehirnphysiologie. Der Projektpartner an der **Universität Aarhus** führte dazu Massenspektrometrie-basierte Untersuchungen zum Proteom der von uns zur Verfügung gestellten Gehirnproben durch. Der Projektpartner wird diese in seinem Schlussbericht für seinen nationalen Fördermittelgeber aufführen. Beim Projektpartner an der **Universität Bergen** wurde anhand unserer Proben die Massenzytometrie („CyTOF“) etabliert, die durch diesen Partner in seinem Bericht aufgeführt wird.

Die benötigten größeren Mengen pgQC-Inhibitor für den Behandlungsversuch sowie die Bereitstellung der benötigten Bakterien erfolgten in Zusammenarbeit mit der Fraunhofer-Ausgründung **PerioTrap Pharmaceuticals GmbH**, die bereits während der Projektbeantragung die Bereitschaft zur Zusammenarbeit mittels LOI signalisiert hatte.

Im Projektverlauf wurde zudem klar, dass zur Beurteilung der erfolgreichen Etablierung einer Parodontitis in der Maus Untersuchungen mittels μ CT vorgenommen werden müssen. Die Untersuchung des alveolären Knochenverlusts zur Bestimmung des Parodontitis-Status mussten daher extern stattfinden. Das **Fraunhofer Institut für Mikrostruktur von Werkstoffen und Systemen (Fraunhofer IMWS)**, welches kein Projektpartner im Konsortium war, aber ein entsprechendes Gerät am Standort Halle (Saale) betreibt, wurde daher um Hilfe gebeten. Die Optimierung der technischen Durchführung der μ CT-Scans wurde dabei vom Fraunhofer IMWS beaufsichtigt, die entsprechenden Messungen wurden vom Fraunhofer IZI-MWT unter Anleitung durchgeführt.

II. Eingehende Darstellung

1. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele,

Nachfolgend gehen wir auf die Arbeitsergebnisse in der Reihenfolge der der ursprünglichen vorhabenbezogenen Ressourcenplanung ein.

Teilarbeitspaket 1: Charakterisierung von pgQC-Inhibitoren *in vitro*

Bestimmung physikochemischer Parameter, Löslichkeit und Stabilität

Meilenstein: Identifizierung eines oder mehrerer geeigneter Vehikel für die Substanzapplikation *in vivo*

Es wurden 2 potentielle Wirkstoffkandidaten für die geplanten Tierstudien selektiert: Diese wurden zunächst hinsichtlich ihrer Hemmkonstante auf Glutaminyl Cyclasen verschiedener Bakterien analysiert, um später die Löslichkeit in verschiedenen Vehikeln gezielt bestimmen zu können. Die Einschränkungen im Zuge der Covid-19 Pandemie erlaubten nur die Charakterisierung einer kleineren Auswahl von pgQC-Inhibitoren. Die zwei potenziellen Verbindungen wurden anhand ihrer selektiven inhibitorischen Wirkung ausgewählt. Dabei inhibieren beide Verbindungen die enzymatische Aktivität der Glutaminyl Cyclase aus *P. gingivalis* (pgQC) selektiv und weisen eine inhibitorische Konstante von ca. 20 nM auf. Im Vergleich dazu wird die enzymatische Aktivität der Glutaminyl Cyclase des Oralpathogens *Tannerella forsythia* (TfQC) um den Faktor 8 bzw. im Fall der bakteriellen QC aus *Prevotella intermedia* (PiQC), um den Faktor 30 schlechter inhibiert (Tabelle 1).

Tabelle1: Inhibierung der enzymatischen QC-Aktivität aus *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *P. intermedia* in Anwesenheit der Verbindung 1/2

<u>Enzym</u>	<u>Verbindung 1 - Ki [nM]</u>	<u>Verbindung 2 - Ki [nM]</u>
pgQC	<u>26.5 ± 2.12</u>	<u>14.15 ± 0.07</u>
tfQC	<u>316.5 ± 51.62</u>	<u>123 ± 15.56</u>
piQC	<u>815 ± 4.24</u>	<u>349 ± 16.57</u>

Zur weiteren Charakterisierung der Verbindungen, wurde die Löslichkeit im Puffersystem (Assay-Puffer) nephelometrisch bestimmt und beträgt für beide Verbindungen ca. 500 µM. Zur Bestimmung der Stabilität wurden das UV-Spektrum beider Verbindungen in PBS und 1% DMSO (v/v) für 16 h bei 30°C analysiert und deutet auf keine Instabilität der Verbindungen hin.

Arbeitsergebnis: Es wurden 2 potentiell interessante Wirkstoffkandidaten identifiziert.

Bestimmung der Zytotoxizität ausgewählter Verbindungen

Meilenstein: Bescheinigung der Unbedenklichkeit für mindestens 1 Verbindung

Zur Bestimmung der zytotoxischen Eigenschaften der ausgewählten Verbindungen wurden Hep-G2 Zellen und SH-SY5Y Zellen in Anwesenheit verschiedene Wirkstoffkonzentrationen (3 und 30 µM) kultiviert. Dadurch, dass keine der Verbindung in den getesteten Konzentrationen die Vitalität der Hep-G2 Zellen und SH-SY5Y Zellen beeinflusste, ist die Wahrscheinlichkeit einer späteren potenziellen Lebertoxizität oder neuronalen Toxizität nach Applikation *in vivo* eher als gering anzusehen (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Bestimmung zytotoxischer Eigenschaften der Verbindungen 1 und 2 *in vitro*

<u>Zelllinie</u>	<u>Zell-Vitalität [%] –</u> 3 µM Verbindung 1/2	<u>Zell-Vitalität [%] –</u> 30 µM Verbindung 1/2
Hep-G2	97 / 90	93 / 88
SH-SY5Y	96 / 94	93 / 93

Darüber hinaus wurde das Wachstum des *E. coli* Wildtyps W3110, ein K12 Derivat, in Anwesenheit von bis zu 500 µM Inhibitor untersucht. Auch hier wurde das Wachstum nicht negativ beeinflusst.

Arbeitsergebnis: Beide bisher untersuchten Verbindungen erfüllen das Selektionskriterium einer kaum beeinflussten zellulären Vitalität zweier verschiedener Säugerzelllinien. Des Weiteren beeinflussen diese Substanzen nicht das Wachstum eines nicht-pathogenen Bakterienstammes.

Beide vorselektierten Verbindungen waren demnach gleich geeignet und es wurde sich im weiteren Projektverlauf auf die Charakterisierung einer Verbindung konzentriert.

Methodenentwicklung ausgewählter Verbindungen für massenspektrometrische Analysen

Meilenstein: Methodenentwicklung für ausgewählte Verbindungen abgeschlossen

Für die Durchführung von PK-Untersuchungen in Ratten wurde ein LC-MRM-basiertes Verfahren zur Quantifizierung der Verbindung 2, u.a. in Li-Heparin-Plasmaproben entwickelt. LC-MRM-Verfahren beruhen auf der Auftrennung der Probenkomponenten mittels Flüssigkeitschromatographie (LC) und der anschließenden Detektion mittels Massenspektrometrie, wobei das sog. *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) zum Einsatz kommt. Bei diesem wird das Zielmolekül zunächst isoliert und im Anschluss gezielt fragmentiert. Die für das Zielmolekül charakteristischen Fragmente werden dann detektiert und die entsprechende Signalfläche für die Quantifizierung genutzt. Die Kombination des Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) von intaktem Molekül-Ion (Vorläufer-Ion) und Fragment-Ion wird als Massen- oder MRM-Übergang bezeichnet. MRM-basierte Quantifizierungsverfahren zeichnen sich durch eine sehr hohe Empfindlichkeit und Selektivität aus.

Das für die Quantifizierung der Verbindung 2 in Li-Heparin-Plasmaproben von Ratten entwickelte Verfahren umfasste die Isolation des Analyten durch Proteinfällung sowie die anschließende Filtration des Überstands, welcher final im Verhältnis von 1:4 mit Wasser verdünnt wurde. Das verdünnte Filtrat wurde in HPLC-Probenfläschchen pipettiert und in den Probengeber des LC-Systems überführt. Die LC-MRM-Analyse erfolgte grundsätzlich vollständig automatisiert, wobei die nachfolgenden Parameter genutzt wurden.

Tabelle 3 MRM-Übergänge

#	m/z ($[M+H]^+$)		Bezeichnung	Bemerkungen	
	Vorläufer-Ion	Fragment-Ion			
1	326,2	86,1	Verbindung 2_326.2-86.1	Analyt	Quantifier
2	326,2	192,2	Verbindung 2_326.2-192.2	Analyt	Qualifier
3	330,1	86,0	Standard_330.1-86.0	Interner Standard	Quantifier
4	330,1	196,1	Standard_330.1-196.1	Interner Standard	Qualifier

Beispielhaft sind in der nachfolgenden Abbildung die extrahierten Ionenchromatogramme (EIC) der Kalibrierprobe mit 0,05 $\mu\text{g/ml}$ für Verbindung 2 (**Abbildung 5**) sowie den internen Standard (**Abbildung 6**) dargestellt.

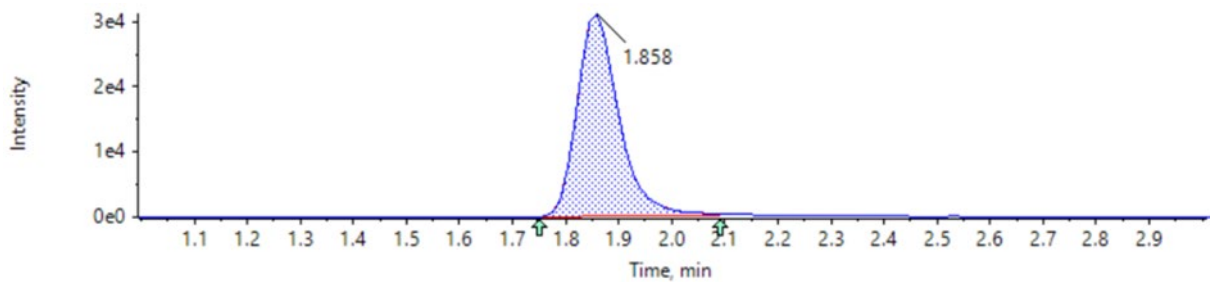


Abbildung 5: Ionenchromatogramm für Verbindung 2

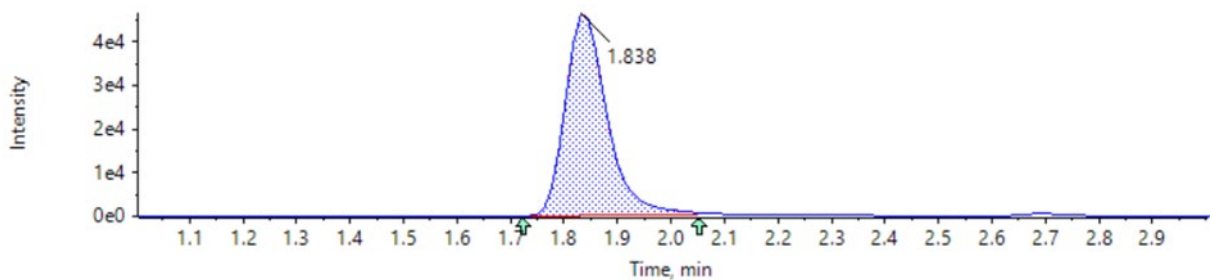


Abbildung 6: Ionenchromatogramm für den internen Standard

Unter Verwendung von Leermatrix (Li-Heparin-Plasma aus Ratte, Assaypuffer des CaCo-2 Transportassays) wurden Kalibrierproben hergestellt, die eine Quantifizierung der Verbindung 2 in den Studienproben im Konzentrationsbereich von 0,001 $\mu\text{g/ml}$ bis 1 $\mu\text{g/ml}$ ermöglichten. Die Auswertung der Kalibriergerade erfolgte mit Hilfe einer linearen Regression, die nachfolgend dargestellt ist (**Abbildung 7**).

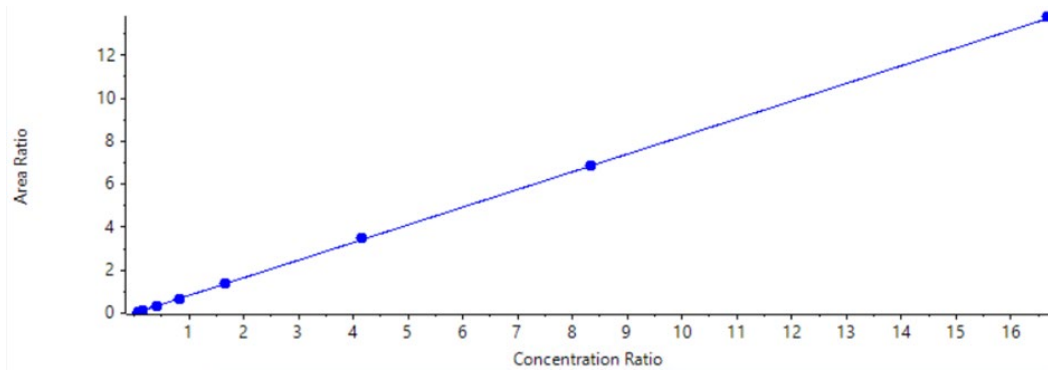


Abbildung 7: Kalibriergerade für Verbindung 2

Arbeitsergebnis: Die Methodenentwicklung zur Quantifizierung von Verbindung 2 wurde erfolgreich abgeschlossen. Die Methode ermöglichte die Untersuchung von Verbindung 2 in verschiedenen Matrices, u.a. Assaypuffer des nachfolgend dargestellten Transportassays und in li-Heparinplasma der Ratte.

Bestimmung des epithelialen Transports mittels CaCo-2 Zellen

Meilenstein: Bestimmung des apparenten Permeabilitätskoeffizienten für ausgewählte Verbindungen

Ein wichtiger Punkt bei der präklinischen Entwicklung von Wirkstoffen ist die Analyse ihrer Membranpermeabilität. Dafür wird beim Fraunhofer IZI-MWT das Modell der Caco-2-Zellen verwendet, um den transepithelialen Transport von Wirkstoffprototypen zu untersuchen und die transepitheliale Transportrate bestimmen zu können.

Die Aussaat der Caco-2-Zellen erfolgte auf Membranen in sogenannten Transwellkammern (siehe **Abbildung 8**). Die Zellen wurden auf den Membranen 21-23 Tage kultiviert, um einen konfluenten Monolayer zu bilden und sich differenzieren zu können.

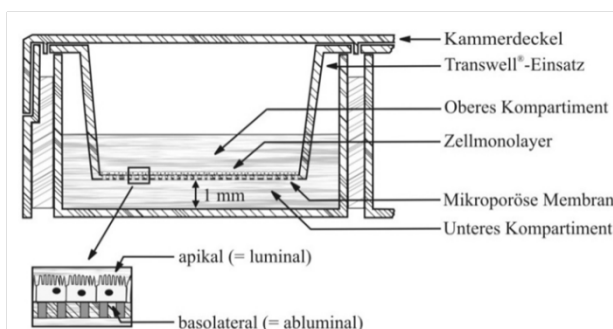


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Transwellkammer

Als Kontrollsubstanzen wurden Atenolol und Propranolol mitgeführt. Atenolol ist durch die FDA als Substanz mit einer niedrigen Transportgeschwindigkeit ($P_{app} < 1 \times 10^{-6}$ cm/s) und Propranolol ($P_{app} > 10 \times 10^{-6}$ cm/s) als Substanz mit einer hohen Transportgeschwindigkeit kategorisiert.

Alle genommenen Proben wurden hinsichtlich ihrer Konzentration mittels LC-MS/MS analysiert. Die erhobenen Werte sind in den **Tabellen 4-6** zusammengefasst

Tabelle 4: Konzentration von Atenolol in den Proben

Sample	Final Concentration (ng/ml)	Final Concentration (µM)
ab_D0	7829,83	29,40
	8239,68	30,94
ab_A18	11,41	0,04
	5,13	0,02
ab_A30	14,39	0,05
	8,12	0,03
ab_A60	29,08	0,11
	17,71	0,07
ab_A90	39,31	0,15
	27,38	0,10
ab_A120	57,36	0,22
	38,91	0,15
ab_D120	7521,36	28,24
	7770,83	29,18
ab_M	11,07	0,04
	13,00	0,05

LLOQ = 0.004 µM

Tabelle 5: Konzentration von Propranolol in den Proben

Sample	Final Concentration (ng/ml)	Final Concentration (µM)
ab_D0	3263,37	12,58
	3613,82	13,93
ab_A5	32,76	0,13
	50,12	0,19
ab_A11	168,46	0,65
	173,49	0,67
ab_A15	242,79	0,94
	263,02	1,01
ab_A20	355,37	1,37
	348,60	1,34
ab_A25	395,84	1,53
	374,00	1,44
ab_A30	447,99	1,73
	446,14	1,72
ab_D30	2203,58	8,50
	1812,39	6,99
ab_M	562,20	2,17
	543,44	2,10

LLOQ = 0.01 µM

Tabelle 6: Konzentration von Verbindung 2 in den Proben

Sample	Final Concentration (ng/ml)	Final Concentration (µM)
ab_D0	7917,19	24,33
	8413,61	25,86
ab_A18	4,02	0,01
	7,52	0,02
ab_A30	7,78	0,02
	13,18	0,04
ab_A60	19,39	0,06
	29,44	0,09
ab_A90	35,67	0,11
	53,22	0,16
ab_A120	47,41	0,15
	95,76	0,29
ab_D120	7476,98	22,98
	7605,06	23,37
ab_M	382,36	1,18
	392,93	1,21

LLOQ = 0.003 µM

Zur Berechnung der apparenten Permeabilität (P_{app}) der Kontroll- und Testsubstanzen wurde folgende Formel verwendet:

$$P_{app} \left[\frac{cm}{s} \right] = \frac{(dQ/dt)}{A \times C_0}$$

dQ/dt pro Zeiteinheit transportierte Stoffmenge [nmol/s]
 C₀ initiale Konzentration im Donor [µM]
 A Fläche der Membran [cm²]

Mithilfe der Formel wurden für die Kontroll- und Testsubstanzen die in **Tabelle 7** gezeigten apparenten Permeabilitätskoeffizienten (P_{app} -Werte) berechnet.

Tabelle 7: P_{app} -Werte von Atenolol, Propranolol und Verbindung 2

Substanz	P_{app} [$\cdot 10^{-6}$ cm/s]
Atenolol	0,45 ± 0,07
Propranolol	39,84 ± 2,01
Verbindung 2	0,73 ± 0,13

Arbeitsergebnis: Entsprechend der Literaturwerte, permeierte Propranolol mit einer hohen Transportrate ($> 10 \times 10^{-6}$ cm/s) durch die Caco-2 Zellen und Atenolol passierte die Zellen mit einer niedrigen Transportrate ($< 1 \times 10^{-6}$ cm/s). Der Assay war demnach valide. Der Wirkstoffprototyp Verbindung XX gehört entsprechend seines P_{app} -Wertes ebenfalls zu den Substanzen mit einer niedrigen transepithelialen Transportgeschwindigkeit.

Teilarbeitspaket 2: Machbarkeitsstudien unter Verwendung von pgQC-Inhibitoren in AD-Mäusen

Erstellung eines Tierversuchsantrages und Einholung der Tierversuchsgenehmigung nach §8 Abs. 1 TschG

Meilenstein: Erhalt der behördlichen Genehmigung zur Durchführung der entsprechenden Versuche nach §8 Abs. 1 TschG.

Arbeitsergebnis: Ein Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes wurde von uns verfasst, mit der verantwortlichen Tierschutzbeauftragten abgestimmt und am 28.10.2020 der verantwortlichen Behörde (Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt) übermittelt. Die Behörde hatte den Eingang des Antrages für den 02.12.2020 bestätigt. Das Vorhaben ist in der Kommission nach §15 TschG besprochen und entsprechende Rückfragen von uns in 2 separaten Runden beantwortet worden. Das Tierversuchsvorhaben wurde von der verantwortlichen Behörde (Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt) mit Wirkung vom 07.06.2021 genehmigt.

Wie bereits in der Beantragung des Projektes dargelegt, ist das Verwaltungsverfahren zur Beantragung von Tierversuchen in Deutschland ineffizient und von langer Dauer. Diese Annahme hat sich auch in diesem Projekt bestätigt. Im Vergleich mit europäischen Partnern innerhalb dieses Konsortiums, ist das deutsche Verfahren nicht konkurrenzfähig, obwohl alle Partner dem gleichen europäischen Rechtsrahmen unterliegen. Die Überführung der Richtlinie 2010/63/EU in die deutsche Gesetzgebung und die vom Gesetzgeber gewollte, mehrmalige Verschärfung des Tierschutzgesetzes, führt aktuell dazu, dass Projekte mit beabsichtigter Verwendung von Versuchstieren massiven Verzögerungen unterliegen.

Anzeige der durchzuführenden tierexperimentellen Arbeiten unter Sicherheitsstufe 2 (S2) bei der zuständigen Behörde

Meilenstein: Anzeige der S2-Arbeiten unter Verwendung von *Porphyromonas gingivalis* in AD-Mäusen in der Versuchstierhaltung des Fraunhofer IZI-MWT.

Arbeitsergebnis: Laut Biostoffverordnung (BioStoffV) handelt es sich bei einer oralen Applikation von *Porphyromonas gingivalis* (laut TRBA 466, zugehörig der Risikogruppe 2) in verschiedene AD-Mauslinien um gezielte Tätigkeiten der Schutzstufe 2. Die entsprechenden Räumlichkeiten in unser Tierhaltung wurden geschaffen und gezielte Tätigkeiten mit Biostoffen der Schutzstufe 2 gemäß der TRBA 400 und TRBA 120 dürfen dort durchgeführt werden. Die verpflichtende „Anzeige von Tätigkeiten mit Krankheitserregern nach § 49 oder § 50 Infektionsschutzgesetz (IfSG) und Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen nach § 16 Biostoffverordnung wurde dem Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt erfolgte entsprechend. Die tierexperimentellen Versuche konnten daraufhin geplant und durchgeführt werden.

Pharmakokinetische Untersuchung ausgewählter Verbindungen

Meilenstein: Bestimmung der Pharmakokinetik von ausgewählten Verbindungen

Im Laufe des Versuchsvorhabens wurden verschiedene pgQC-Inhibitoren von der PerioTrap Pharmaceuticals GmbH synthetisiert. Die Verbindungen wurden, entgegen der Annahmen während der Projektbeantragung, nicht hinsichtlich einer oralen Bioverfügbarkeit entwickelt. Stattdessen sollen diese Wirkstoffe später im Mundraum appliziert werden und dort lokal wirken. Deshalb hatten wir in einem vorhergehenden Zwischenbericht geschrieben, dass im Rahmen dieses Vorhabens keine PK-Untersuchungen notwendig sind. Für die Mehrzahl potentieller Wirkstoffkandidaten gilt dies weiterhin. Die hier ausgewählte Verbindung 2 wurde in den nachfolgend beschriebenen Tierstudien in Alzheimer-Mäusen tatsächlich lokal verabreicht. Da

den Versuchstieren der Wirkstoff in den Mundraum appliziert worden ist, war es jedoch sehr wahrscheinlich, dass Wirkstoff durch die Versuchstiere verschluckt wird. In diesem Fall war es interessant pharmakokinetische Parameter, u.a. die orale Bioverfügbarkeit, zu ermitteln, um abschätzen zu können, wieviel Prozent der verschluckten Substanz aufgenommen wird.

Dafür wurden pharmakokinetische Parameter in katheterisierten männlichen Sprague–Dawley (RjHan:SD) Ratten bestimmt. Für schmerzfreie Blutentnahmen wurde den Versuchstieren vor Versuchsbeginn zwei Katheter, einer in die rechte *V. jugularis* und einer in die linke *A. carotis communis*, implantiert. Dabei diente der Katheter in der *V. jugularis* der intravenösen Substanzapplikation und der Katheter in der *A. carotis communis* der Blutentnahme. Nach einer Heilungsperiode von mehreren Tagen wurde Verbindung 2 sowohl intravenös (IV, 3 mg/kg) als auch oral (PO, 10 mg/kg) appliziert. Pro Analysezeitpunkt wurden 50–70 µL heparinisertes Blut gewonnen. Vollständige pharmakokinetische Profile wurden so von Einzeltieren über eine Zeitspanne von 7h erhalten (**Abbildung 9**). Die Wirkstoffspiegel wurden mittels LC-MS/MS unter Verwendung der oben beschriebenen Methode ermittelt.

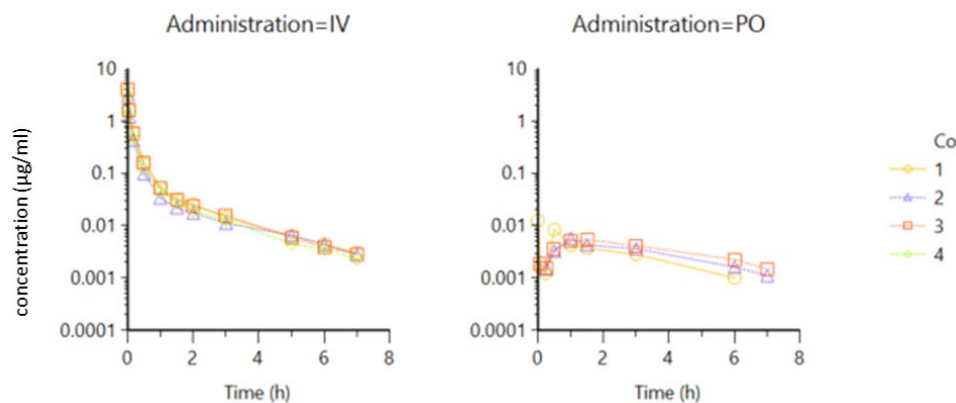


Abbildung 9: Darstellung der Konzentrations-/Zeitkurven nach intravenöser (IV) und oraler (PO) Gabe von Verbindung 2 in Sprague-Dawley Ratten. IV: n=4, PO: n=3

Aus den Konzentrations-/Zeitkurven wurden die Parameter c_{max} und t_{max} für jedes Versuchstier abgeleitet und die *area under the curve* als Voraussetzung für die Berechnung der oralen Bioverfügbarkeit mithilfe der Software Pheonix WinNonlin (Certara) berechnet.

Tabelle 8: Pharmakokinetische Parameter individueller Versuchstiere. Darstellung von terminaler Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2}$), Zeitpunkt der höchsten Plasmakonzentration (t_{max}), höchste Plasmakonzentration (c_{max}) und dosisnormalisierte *area under the curve* (AUC) von Zeitpunkt 0 bis Unendlich (AUCINF_D_obs).

Ratte #	Dosis µg	$t_{1/2}$ h	t_{max} h	c_{max} µg/ml	AUCINF_D_obs h*µg/ml/µg
1 IV	3000	1,86	0,016	3,44	0,00017
2 IV	3000	1,63	0,016	3,04	0,00013
3 IV	3000	1,56	0,016	3,86	0,00017
4 IV	3000	1,56	0,016	2,81	0,00013
1 PO	10000	2,42	0	0,017	$2,12 \times 10^{-06}$
2 PO	10000	2,41	1	0,0056	$2,45 \times 10^{-06}$
3 PO	10000	2,82	1,5	0,0054	$3,02 \times 10^{-06}$

Arbeitsergebnis: Die orale Bioverfügbarkeit der Verbindung 2 beträgt 1,6 %. Wie oben beschrieben wurden die Substanzen für eine lokale Applikation und Wirksamkeit optimiert. Die orale Bioverfügbarkeit ist daher

sehr gering. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass wirksame Dosen die Zirkulation erreichen, insbesondere wenn hohe Dosen im Mundraum verabreicht werden.

Etablierung der oralen Pg Applikation und Analyse

Meilenstein: Auswahl einer Inokulation für die Behandlungsversuche

Für die pharmakologische Testung der PgQC-Inhibitoren sollten 2 verschiedene in der Literatur beschriebene Verfahren zur Infektion von Mäusen mit Pg getestet werden. Zum einen war ein Langprotokoll publiziert, welches die wöchentliche Applikation (Montag, Mittwoch, Freitag) von Pg beschrieb und über 22 Wochen durchgeführt wurde. Dies sollte zu einer Infektion des Zahnhalteapparates durch die Bakterien und außerdem zu messbaren Veränderungen der Gehirnphysiologie, u.a. in Bezug auf zentralnervöse Proteinexpression verschiedener Markerproteine führen. Diese chronifizierte Form der Parodontitis entsprach auch am ehesten dem menschlichen Krankheitsverlauf und wurde daher von uns favorisiert.

Des Weiteren waren vor Projektstart auch eine Reihe von kürzeren Infektionsprotokollen bekannt, die jeweils ca. 6 Wochen in Anspruch nahmen. Auch dieses Verfahren sollen auf Ihre Eignung getestet werden. Die Schwierigkeit war hier allerdings, dass diese Kurzprotokolle mit der langsam fortschreitenden Entwicklung der Alzheimer-typischen Pathologie in den verwendeten AD-Mäusen (Stamm 5xFAD) in Übereinstimmung zu bringen war. Daher entscheiden wir uns während der Etablierungsphase für eine Applikation im Langprotokoll über 22 Wochen, bei der auch zu früheren Zeitpunkten die Induktion der Parodontitis untersucht worden ist.

Zielgröße war eine messbare Induktion Parodontose-relevanter Parameter, wie Gingivitis und Knochenverlust im Kiefer, um in späteren Versuchen den Effekt der Parodontose auf die der zerebralen Amyloidose von 5xFAD Mäusen beurteilen zu können.

Zur Beurteilung inflammatorischer Zellinfiltrate wurde die Mandibula für die histologische Untersuchung aufgearbeitet und die Schnitte mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt. Histologisch konnte kein inflammatorisches Zellinfiltrat nachgewiesen werden.

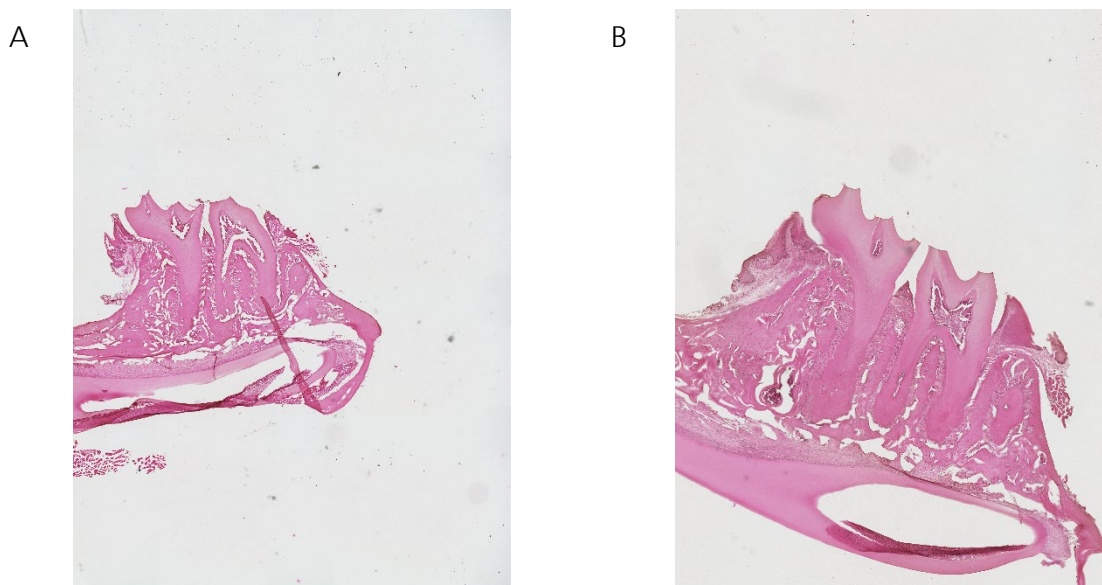


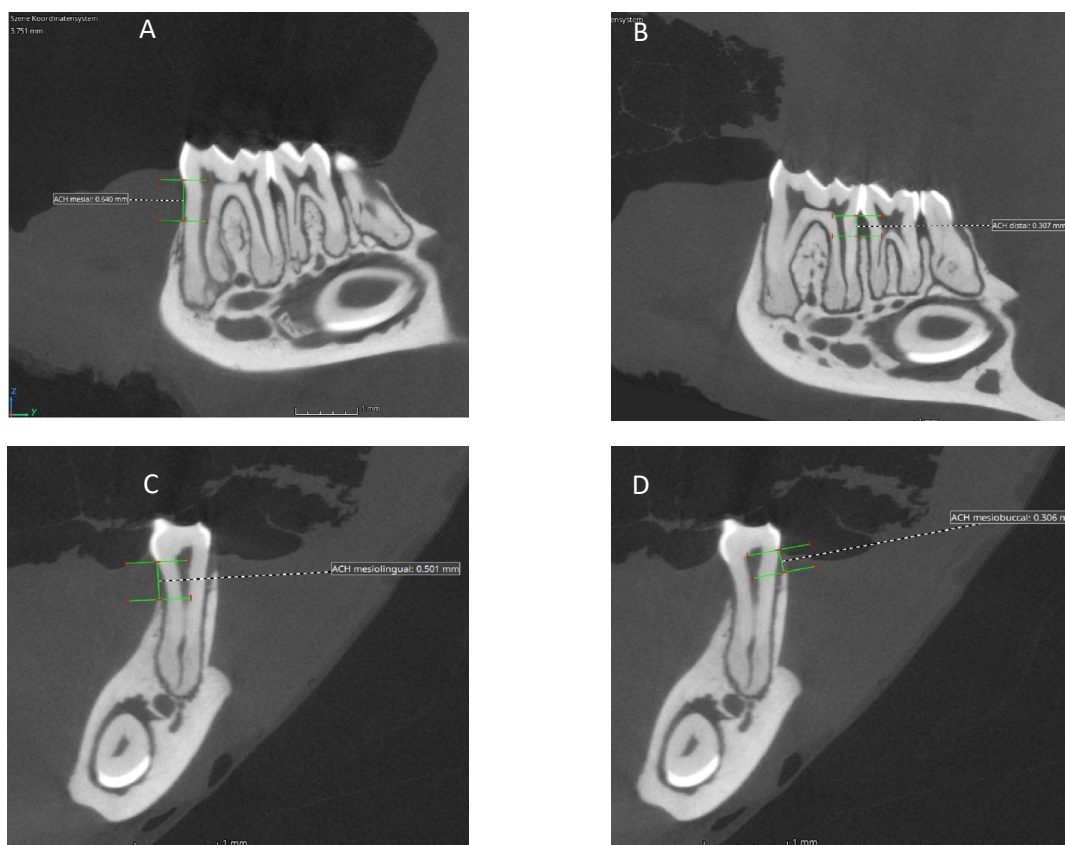
Abbildung 10: Histologischer Schnitt der linken Hemimandibula der A) Kontrollgruppe und B) infizierten Gruppe. Dargestellt sind die beiden ersten Molaren und das zwischenliegende Parodontium.

Arbeitsergebnis: Bei der histologischen Untersuchung der Unterkiefer infizierter Tiere konnte bei keinem der infizierten Tiere inflammatorisches Zellinfiltrat festgestellt werden. Die histologische Untersuchung erschien daher als Methode zur Beurteilung der chronischen Parodontitis nicht geeignet zu sein. In den weiteren Versuchsteilen wurde aus diesem Grund auf die histologische Untersuchung verzichtet.

Dies machte die externe Untersuchung der Kiefer aller Versuchstiere mittels μ CT-Untersuchungen notwendig, was bei Projektbeantragung nicht Teil der Kostenkalkulation war und für dessen Durchführung Fraunhofer-internen Mittel verwendet werden mussten. Die μ CT-Scans erfolgten am Fraunhofer-Institut für Mechanik von Werkstoffen und Systemen (IMWS), welches ebenfalls am Standort Halle angesiedelt ist.

Die Etablierung wurde in 2 Teilversuche von je 15 Tieren gegliedert, wobei bei den μ CT-Untersuchungen des ersten Teilversuches alle relevanten Strukturen dargestellt werden konnten. Ebenfalls gelang die Orientierung der zweidimensionalen Schnittbilder und die Festlegung der Messebenen, sodass die Untersuchung mittels μ CT als die Methode der Wahl für die Folgeversuche bewertet wurde. Wir haben uns im 2. Etablierungsteilversuch entschieden, statt des Kurzprotokolls, ein zweites Experiment mittels Langprotokoll im Mausstamm C57Bl/6J durchzuführen. Dies hatte folgende Gründe: (I) eine Wiederholung sollte der Überprüfung und Verifizierung des Modells dienen, (II) die Parodontitis ist im Patienten eine chronische Entzündung und wird durch das Langprotokoll besser wiedergespiegelt und (III) die Pathologie entwickelt sich in den AD-Mäusen über Monate, so dass das Langprotokoll eher dem Verlauf der AD-Pathologie in den Mäusen entspricht.

Mittels μ CT wurde der alveoläre Knochenverlust durch Messung der ACH (Alveolarkammhöhe, engl. *Alveolar Crest Height*) beurteilt. Die ACH wurde am ersten Molaren der linken Unterkieferhälfte mesial, distal, mesiolingual, mesiobuccal, mittel-lingual, mittel-buccal, distolingual and distobuccal gemessen. Die Ergebnisse des zweiten Etablierungsversuches sind in **Abbildung 11** dargestellt.



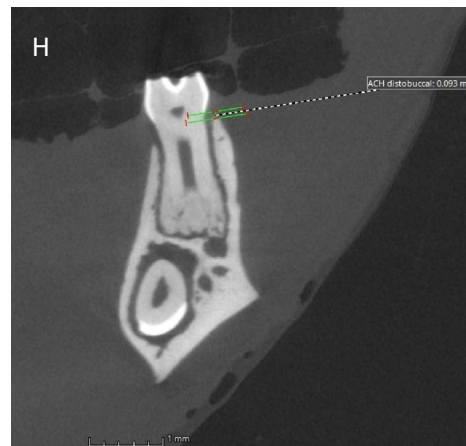
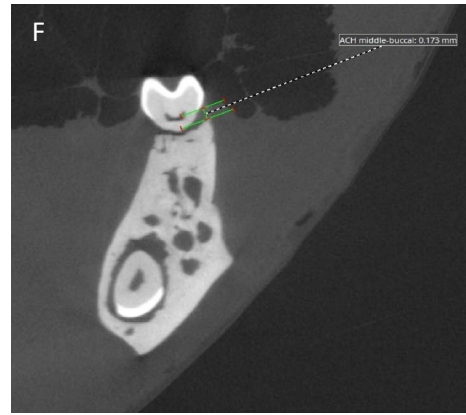
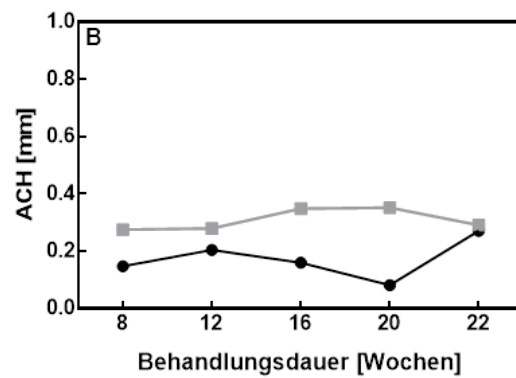
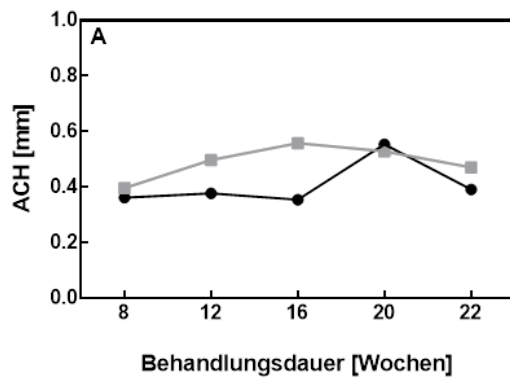


Abbildung 11: Beispiel für Messungen der Alveolarkammhöhe (ACH) in der linken Mandibularhälfte. A) mesial. B) distal. C) mesiolingual. D) mesiobuccal. E) mittel-lingual. F) mittel-buccal. G) distolingual. H) distobuccal.

Anschließend konnte der Knochenverlust am Alveolarkamm quantifiziert werden. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 12** dargestellt.



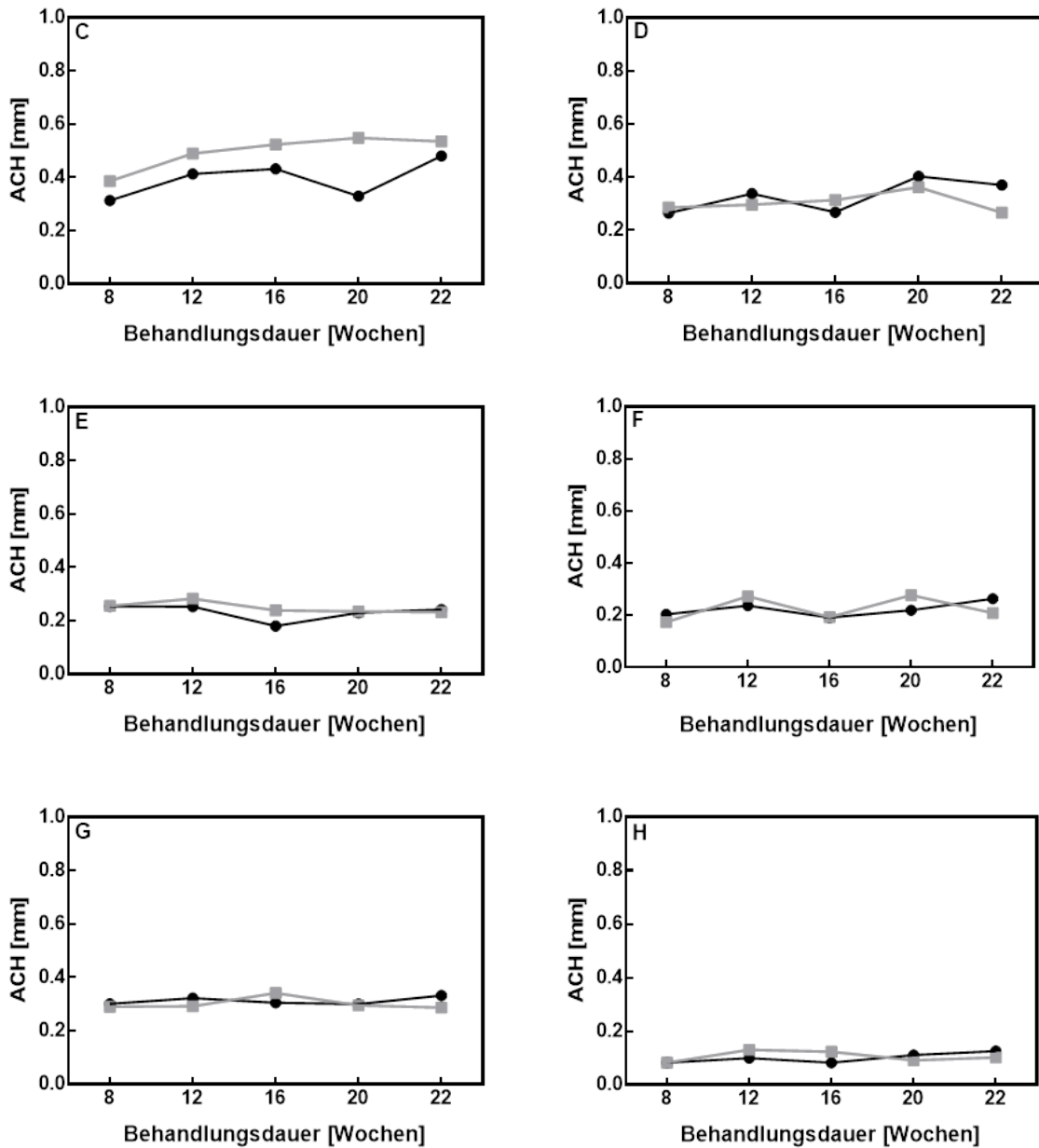


Abbildung 12: Alveolarkammhöhe (ACH) in mm A) mesial, B) distal, C) mesiolingual, D) mesiobuccal, E) mittel-lingual, F) mittel-buccal, G) distolingual, H) distobuccal am ersten Molaren der linken Unterkieferhälfte, gemessen in der zweidimensionalen Ebene. Stichprobengröße pro Zeitpunkt n=1. Kontrollgruppe schwarz, infizierte Gruppe grau dargestellt.

Arbeitsergebnis: In der mesialen, distalen und der mesiolingualen Messung war nach einer Behandlungsdauer von 12 Wochen bereits eine deutlich höhere ACH in der infizierten Gruppe als beim jeweiligen Kontrolltier zu erkennen. Dies weist auf durch chronische Parodontitis induzierten Knochenverlust hin. Nach einer Behandlungsdauer von 16 Wochen waren die mesial, mesiolingual und distal gemessene ACH vergleichbar mit den in der Literatur nach erfolgreicher Induktion einer Parodontitis publizierten Werten (3). Im Summe halten wir fest, dass durch die orale Applikation von *Porphyromonas gingivalis* über einen Zeitraum von mindestens 12 Wochen eine chronische Parodontitis induziert werden konnte. Da die Distanz von der Zement-Schmelz-Grenze bis zum Alveolarkamm noch bis zu einer Infektionsdauer von 16 Wochen zunimmt, wurden 16 Wochen als mindestens benötigte Infektionsdauer für nachfolgende Versuche angenommen. Auch dieses Ergebnis sprach gegen die Durchführung des zuvor geplanten Kurzprotokolls.

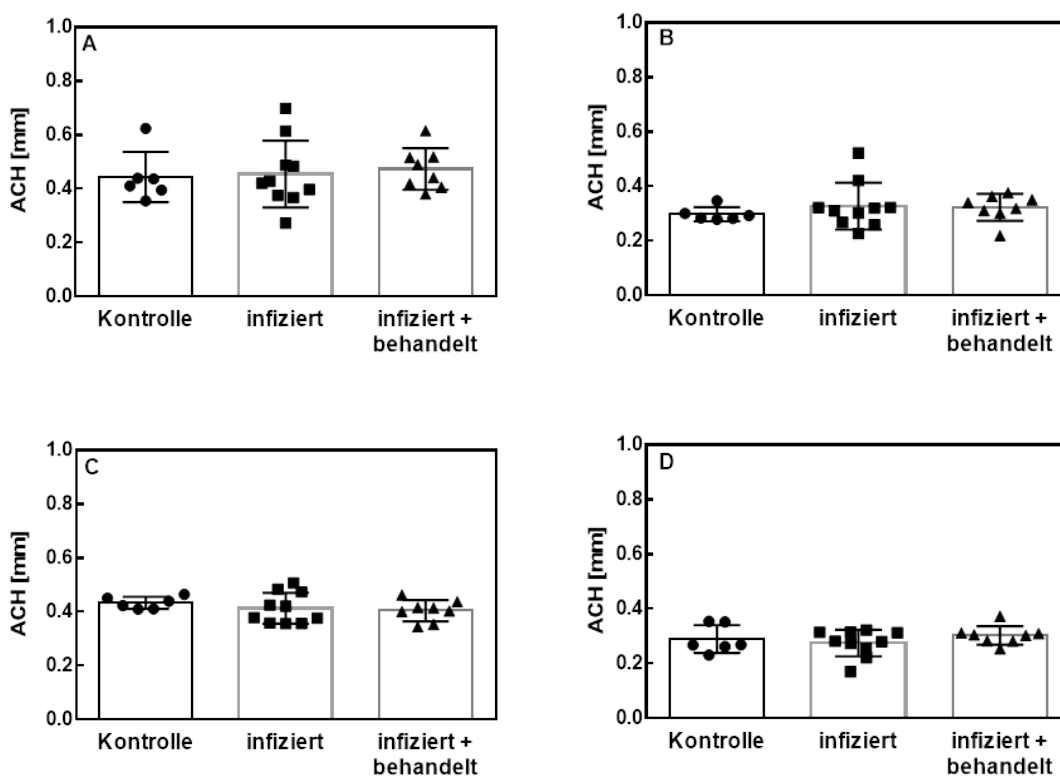
Behandlungsstudien und Analysen

Meilenstein: Durchgeführte Behandlungsstudien

Dieser Teil der tierexperimentellen Arbeiten bestand aus zwei Teilversuchen. Beide Teilversuche wurden mit dem oben beschriebenen Langprotokoll durchgeführt. Der zeitliche Mehraufwand im Vergleich zu einer Durchführung im Parodontitis-Kurzprotokoll wurde durch Priorisierung der Untersuchung der Linie 5xFAD und entsprechender De-Priorisierung der Linie 5xFAD x tau-KI ermöglicht.

Im erste Teilversuch sollte die Frühbehandlung um den Zeitpunkt des Auftretens pathologischer ZNS-Befunde ohne kognitive Einschränkungen untersucht werden. Der Versuch wurde daher in bei Versuchsbeginn vier Monate alten 5xFAD-Mäusen (N=28) durchgeführt. Die Tiere wurden in drei Gruppen aufgeteilt. Gruppe 1 (N=10) wurde oral mit *Porphyromonas gingivalis* infiziert. Gruppe 2 (N=10) wurde zusätzlich oral mit dem pgQC-Inhibitor behandelt. Hierzu wurde *Porphyromonas gingivalis* vor der Applikation für eine Stunde zusammen mit dem pgQC-Inhibitor inkubiert, sodass auch in dieser Gruppe ein Volumen von 50µL appliziert wurde. Gruppe 3 (N=8) diente als Kontrollgruppe und erhielt nur 50µL 2% Methylcellulose in PBS. Allen Tieren wurde über einen Zeitraum von 16 Wochen dreimal wöchentlich Erreger zusammen mit Verbindung 2 oral appliziert. Nach 16 Wochen wurden die Tiere euthanasiert und die Organe für die weitere Untersuchung aufgearbeitet. Im nächsten Schritt sollte die Plaquepathologie im Gehirn immunhistochemisch untersucht werden.

Die Ergebnisse der µCT-Untersuchungen für Behandlungsversuch 1 (3 Monate alte Tiere, Frühbehandlung) sind in **Abbildung 13** dargestellt. In den Messungen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. Da auch zwischen der Kontrollgruppe und der infizierten Gruppe keine signifikanten Unterschiede bestanden, muss davon ausgegangen werden, dass eine Induktion der chronischen Parodontitis in jungen 5xFAD-Tieren nicht gelungen ist. In den mesialen, distalen und mesiolingualen Messungen fällt dennoch eine gegenüber der Kontrollgruppe breitere Streuung der Einzelwerte in den beiden infizierten Gruppen auf. Dies kann ein Anzeichen für einen beginnenden alveolären Knochenverlust sein. Eine Infektionsdauer von 16 Wochen scheint allerdings im 5xFAD-Mausmodell nicht ausreichend, um eine chronische Parodontitis sicher zu induzieren. Daher kann an dieser Stelle keine Aussage hinsichtlich der Wirksamkeit des hier eingesetzten QC-Inhibitors getroffen werden.



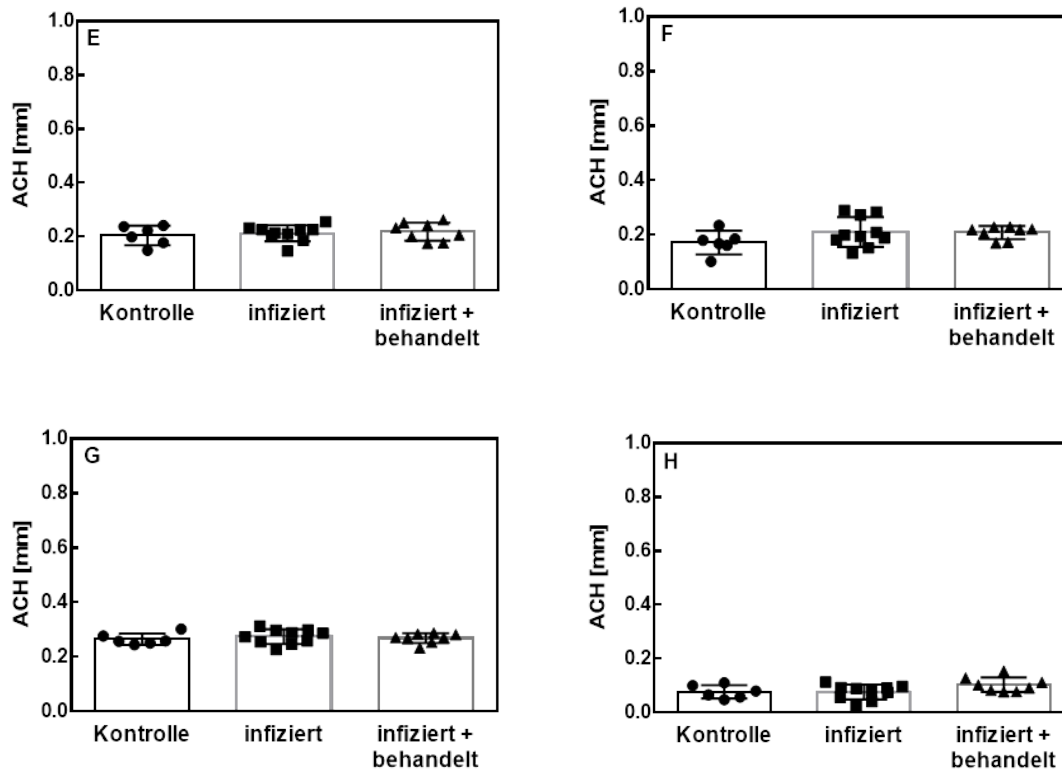


Abbildung 13: Behandlungsversuch 1, Untersuchungen in jungen Tieren. Alveolarkammhöhe (ACH) in mm A) mesial, B) distal, C) mesiolingual, D) mesiobuccal, E) mittel-lingual, F) mittel-buccal, G) distolingual, H) distobuccal am ersten Molaren der linken Unterkieferhälfte. Stichprobengrößen: Kontrolle n=6, infiziert n=10, infiziert + behandelt n=8. Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Post-hoc Test (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

Der zweite Teilversuch sollte im Sinne einer Spätbehandlung bei bereits etablierten pathologischen Veränderungen im ZNS durchgeführt werden. Die Untersuchung kognitiver Einschränkungen konnte zu diesem späteren Zeitpunkt Teil des Versuches sein, da die Tiere am Ende alt genug waren, um einen Verhaltensphänotyp zu zeigen. Daher wurden für diesen Versuchsteil bei Versuchsbeginn sechs Monate alte 5xFAD-Mäuse verwendet. Da 5xFAD-Mäuse im Alter von 12 Monaten einen charakteristischen Verhaltensphänotypen zeigen, sollten die Tiere bis zum Erreichen dieses Alters behandelt werden. Daher wurde für diesen Teilversuch eine Infektions-/Behandlungsdauer von 22 Wochen gewählt, die am längsten mögliche, behördlich genehmigte Infektions- und Behandlungsdauer.

Die Gruppeneinteilung und das Infektions-/Behandlungsprotokoll waren analog zum ersten Teilversuch (N=15 pro Gruppe). Nach 22 Wochen wurden die Tiere umfassend verhaltensbiologisch untersucht. Hierfür wurden sowohl das *Elevated Plus Maze* als auch das *Morris Water Maze* durchgeführt. Nach Abschluss der verhaltensbiologischen Untersuchungen wurden die Tiere euthanasiert und die Organe ebenfalls für die weitere Untersuchung aufgearbeitet.

Die Ergebnisse der μ CT-Untersuchungen für Behandlungsversuch 2 (6 Monate alte Tiere, Spätbehandlung) sind in **Abbildung 14** dargestellt. In diesem Teilversuch konnten in der mesialen, der mesiolingualen und mesiobuccalen, der mittig-lingualen, der mittig-buccalen und der distobuccalen Messung signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der infizierten Gruppe festgestellt werden. Eine Induktion der chronischen Parodontitis hat in diesem Studienteil funktioniert. Weiterhin wurden in keiner Messung signifikante Unterschiede zwischen infizierter und mittels pgQC-Inhibitor behandelter Gruppe festgestellt. Distal, mesiolingual, mesiobuccal, mittig-lingual, mittig-buccal und distolingual (**Abbildung 14, B-G**) sind außerdem keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und pgQC-Inhibitor-Behandlungsgruppe nachweisbar, so dass hier von einem Behandlungseffekt ausgegangen werden kann.

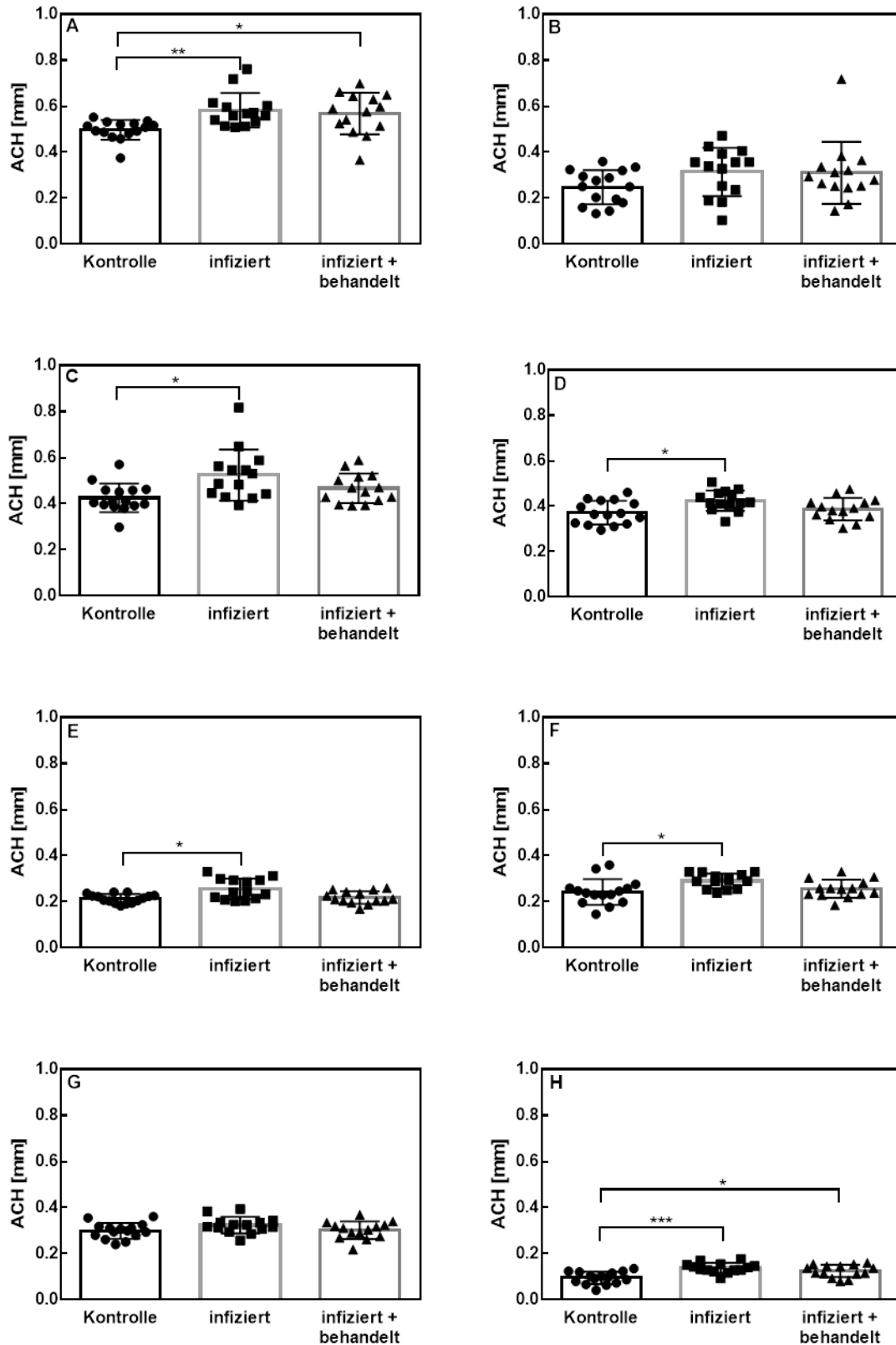


Abbildung 14: Behandlungsversuch 2, Untersuchung in alten Tieren. Alveolarkammhöhe (ACH) in mm A) mesial, B) distal, C) mesiolingual, D) mesiobuccal, E) mittel-lingual, F) mittel-buccal, G) distolingual, H) distobuccal am ersten Molaren der linken Unterkieferhälfte. Stichprobengrößen: Kontrollgruppe n=15, infiziert n=14, infizierte + behandelt n=14. Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Post-hoc Test (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

Zur Beurteilung der Amyloid- β -Plaue-Pathologie wurde sowohl im Cortex als auch im Hippocampus der Anteil der Plauefläche der beurteilten Gesamfläche dargestellt. Weder für die Frühbehandlung, noch für die Spätbehandlung sind signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nachweisbar. Allerdings fällt v.a. bei der Spätbehandlung eine gegenüber der sehr homogenen Kontrollgruppe breite Streuung der Einzelwerte in der infizierten und in der behandelten Gruppe auf. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 15** dargestellt.

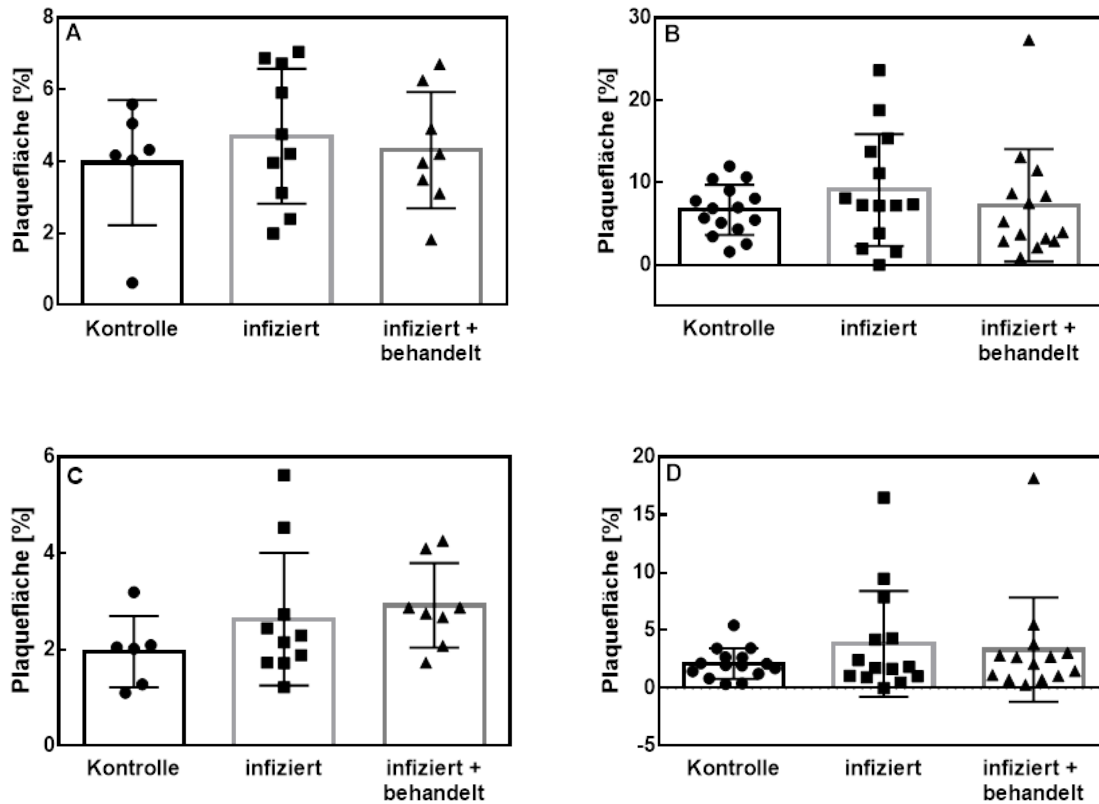


Abbildung 15: A β -Plauefläche, dargestellt als prozentualer Anteil der Gesamfläche des Cortex A) nach Frühbehandlung (Behandlungsversuch 1) und B) nach Spätbehandlung (Behandlungsversuch 2) bzw. des Hippocampus C) nach Frühbehandlung und D) nach Spätbehandlung. Stichprobengrößen Frühbehandlung: Kontrolle n=6, infiziert n=10, infiziert + behandelt n=8. Stichprobengrößen Spätbehandlung: Kontrolle n=15, infiziert n=14, infiziert + behandelt n=14. Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Post-hoc Test (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

In Behandlungsversuch 2 (Spätbehandlung) wurde außerdem verhaltensbiologische Untersuchungen durchgeführt, um Veränderungen der Alzheimer-typischen Pathologie durch die Infektion mit *Porphyromonas gingivalis* sowie Behandlungseffekte zu beurteilen. Es wurden das *Elevated Plus Maze* (EPM) und das *Morris Water Maze* (MWM) durchgeführt. Das EPM dient als Test für Angst-assoziiertes Verhalten, wobei der Zielparameter die von den Tieren in den offenen Armen des Maze verbrachte Zeit als Anteil der Gesamttestzeit von 10 Minuten ist. Hierbei zeigte sich eine gegenüber der Kontrollgruppe eine deutlich erhöhte Streuung innerhalb der Datensätze sowohl der infizierten, als auch der infizierten und mittels pgQC-Inhibitor behandelten Gruppe. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen konnten nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse des EPM sind in **Abbildung 16** dargestellt.

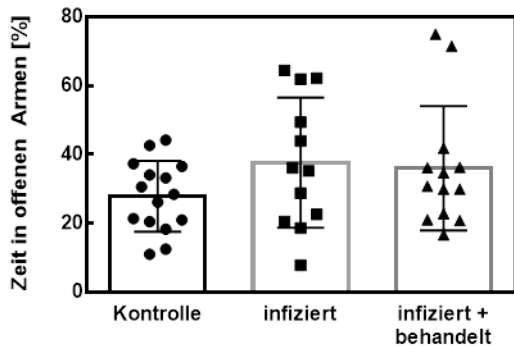


Abbildung 16: Während des *Elevated Plus Maze* in den offenen Armen verbrachte Zeit, dargestellt als prozentualer Anteil der Gesamtdauer des Tests. Gruppengrößen: Kontrolle n=15, infiziert n=12, infiziert + behandelt n=13. Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Post-hoc Test (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

Das MWM stellt einen Test für die Untersuchung des räumlichen Lernens dar. Das MWM wurde über eine Dauer von vier Testtagen, an denen die Tiere jeweils vier Testläufe durchliefen, durchgeführt. Zielparameter war die Zeit, die die Tiere bis zum Auffinden einer nicht sichtbaren Plattform benötigten (Latenz). Aus den ermittelten Latenzen konnte für jede Versuchsgruppe eine Lernkurve erstellt werden, die in **Abbildung 17** dargestellt ist. Die Lernkurven der Kontrolltiere und der mit pgQC-Inhibitor behandelten Tiere verlaufen wesentlich steiler als die der infizierten Tiere. Dies spricht für einen nachteiligen Effekt der Infektion auf die räumliche Lernfähigkeit.

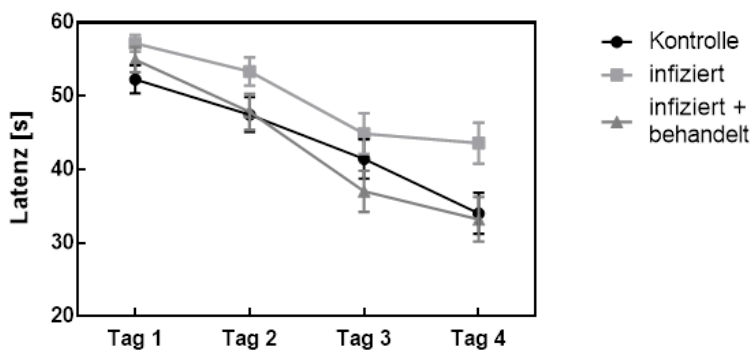


Abb.17: Lernkurve aller drei Versuchsgruppen im Morris Water Maze. Stichprobengrößen: Kontrolle n=14, infiziert n=13, infiziert + behandelt n=14. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

Für jede Versuchsgruppe wurde zunächst der individuelle Lernfortschritt der Gruppe anhand eines Vergleichs der Mittelwerte des ersten und des letzten Testtags beurteilt (**Abbildung 18**). Für alle Gruppen war ein signifikanter Unterschied und somit ein Lernfortschritt nachweisbar.

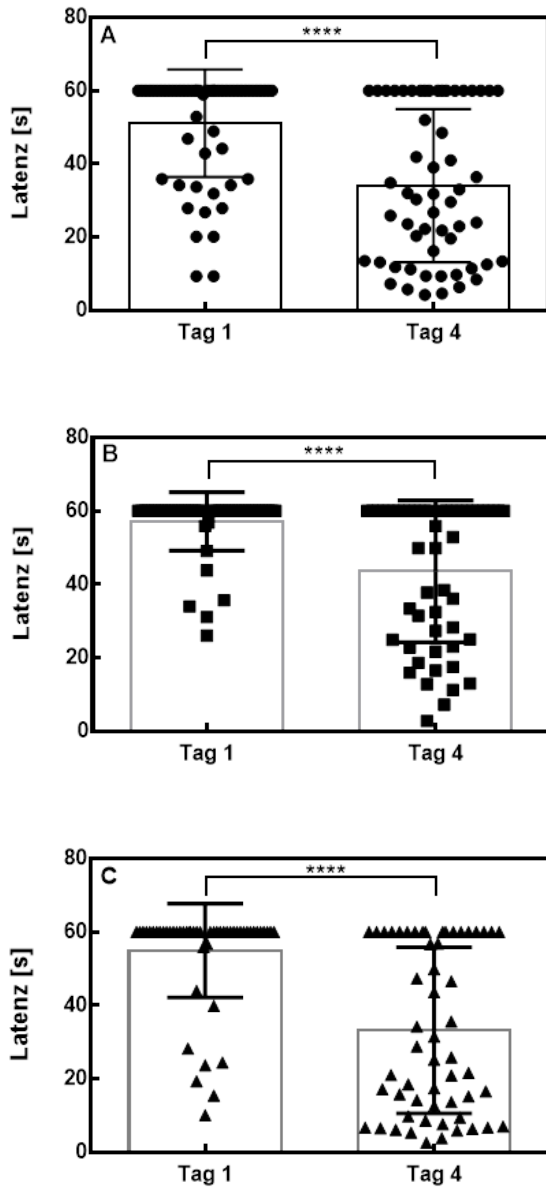


Abbildung 18: Vergleich der Leistung der Tiere im *Morris Water Maze* am ersten und letzten Versuchstag. A) Kontrollgruppe, B) infizierte Gruppe, C) infizierte und mittels pgQC-Inhibitor behandelte Gruppe. Stichprobengrößen: Kontrolle $n=14$, infiziert $n=13$, infiziert + behandelt $n=14$. Wilcoxon-Test, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

Zuletzt wurden die Mittelwerte der drei Versuchsgruppen jeweils am ersten und am letzten Testtag (**Abbildung 19**) miteinander verglichen. Für den ersten Testtag konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Für den letzten Testtag wurde ein signifikanter Unterschied zwischen dem Mittelwert der infizierten und dem der infizierten und mittels pgQC-Inhibitor behandelten Gruppe festgestellt.

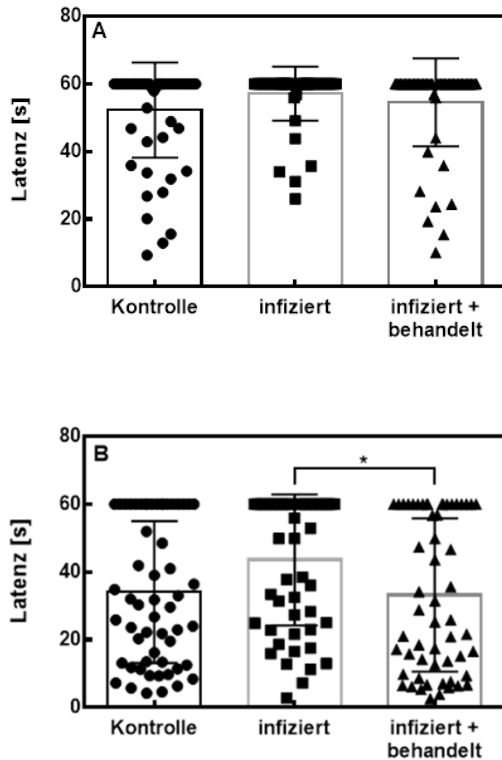


Abbildung 19: Vergleich aller Gruppen an A) Tag 1 des Morris Water Maze und B) an Tag 4 des Moris Water Maze. Stichprobengrößen: Kontrolle $n=14$, infiziert $n=13$, infiziert + behandelt $n=14$. Wilcoxon-Test, $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

Die Ergebnisse, insbesondere des MWM, legen nahe, dass die chronische Infektion mit *Porphyromonas gingivalis* einen Effekt auf die Gehirnphysiologie hat. Neben der Ablagerung von parenchymalen A β -Peptiden und der Akkumulation von intraneuronalem hyperphosphoryliertem Tau-Protein liegt bei der Alzheimerschen Erkrankung auch eine schwerwiegende Neuroinflammation vor. Aus diesem Grund wurden histologische Präparate der Gehirne aus Behandlungsstudie 2 auch im Hinblick auf neuroinflammatorische Prozesse untersucht. Dazu wurde der Gesamtanteil der Mikrogliazellen in der beurteilten Gesamtfläche sowie der Anteil der MHC II-exprimierenden Mikroglia bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 20** dargestellt.

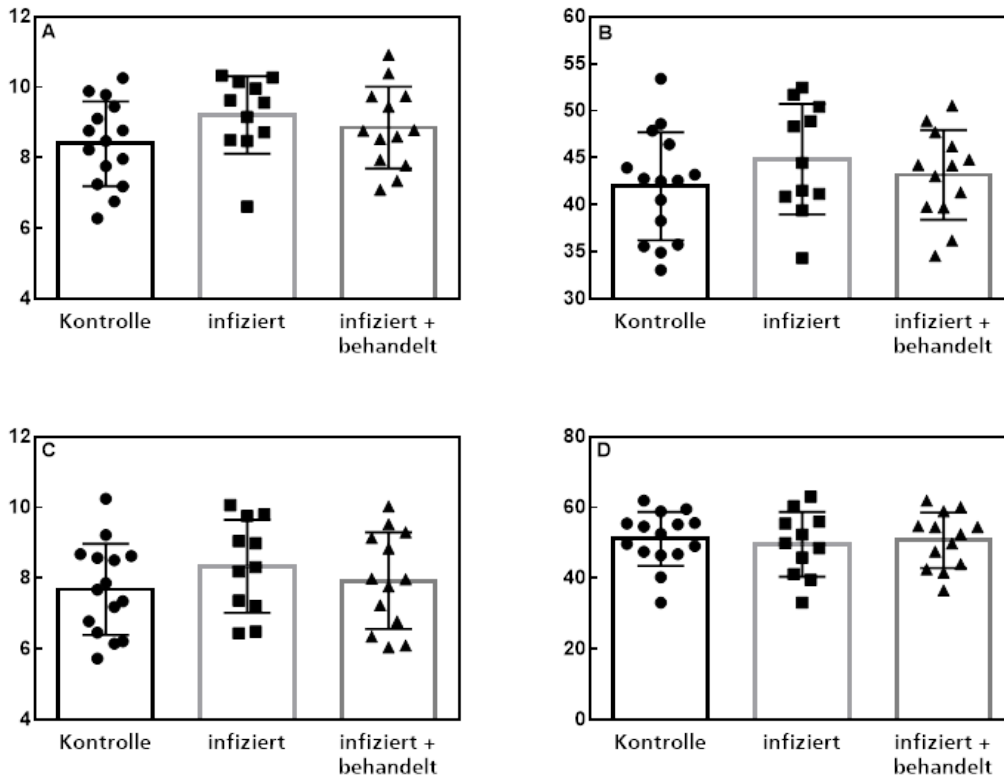


Abbildung 20: Anteil der Mikrogliazellen dargestellt als prozentualer Anteil der beurteilten Gesamtfläche im A) Cortex und C) Hippocampus. Prozentualer Anteil MHC-II-positiver Mikrogliazellen in B) Cortex und D) Hippocampus. Stichprobengrößen: Kontrolle n=15, infiziert n=11, infiziert + behandelt n=13. Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Post-hoc Test (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

Das formulierte Projektziel, den Einfluss einer chronischen Parodontitis auf die Alzheimer-Pathologie im Mausmodell zu untersuchen und außerdem die Eignung von 1-2 pgQC-Inhibitoren zur Behandlung der chronischen Parodontitis *in vivo* einerseits und zur Behandlung der Alzheimer-Pathologie im Mausmodell andererseits zu testen, wurde für das 5xFAD-Mausmodell erreicht.

Die Untersuchung der Mikroglia diente dazu, Hinweise darauf zu erhalten, ob möglicherweise neuroinflammatorische Prozesse Auslöser für die Veränderungen des Verhaltensphänotypen sein können. Weitere und detailliertere Untersuchungen dieses Zusammenhangs sollen mittels CyTOF im Rahmen des Verbundprojekts an der **Universität Bergen** durchgeführt werden. Die dafür notwendigen Vorarbeiten sind dort abgeschlossen und Probenmaterial wurde bereits transferiert.

2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises,

Die Projektarbeit war geprägt durch die Einschränkungen der Corona-Pandemie in den Jahren 2020-2022. Daher wurden im Jahr 2020 ca. 35K Euro weniger als geplant verwendet. Dies setzte sich im Jahr 2021 fort, wo 121k Euro weniger ausgegeben worden sind. Im Jahr 2021 wurde zusätzliche Investmittel (445K) durch den FG bewilligt, die für die Anschaffung eines Biolumineszenz-Imaginggerätes und eines Massenspektrometers verwendet worden sind. Das Projekt wurde im Jahr 2022 bis Ende 2023 kostenneutral verlängert und die übertragenen Mittel vollständig für die Projektarbeit eingesetzt.

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,

Wie oben dargestellt konnte hier erstmals der Einfluss von *P. gingivalis* auf die Entwicklung einer Alzheimer-typischen Plauepathologie untersucht werden. Die *in vitro*-Charakterisierung des verwendeten, experimentellen PgQC-Inhibitors basierte auf etablierten Assays und war notwendig, um eine nicht-toxische und wirksame Verbindung im Tiermodell testen zu können. Dazu wurde die Substanz jedoch nicht umfassend untersucht, wie es für eine Entwicklung in der pharmazeutischen Industrie notwendig wäre aber die neuralgischen Punkte einer solchen Entwicklung wurden von uns adressiert, nämlich: Nachweis der Verbindung in Zellkulturen und Körperflüssigkeiten von Versuchstieren, Untersuchung der Toxizität und der Bioverfügbarkeit. Die Ausschöpfung von *in vitro*-Methoden zur Substanzcharakterisierung ist auch im Hinblick auf die Durchführung von Tierversuchen gesetzlich vorgeschrieben und daher notwendig und im durchgeführten Maß angemessen.

Die Untersuchung von komplexen Zusammenhängen wie der bakteriellen Infektion des Zahnhalteapparates und deren Einfluss auf die Physiologie des Gehirns machte Untersuchungen im Gesamtorganismus notwendig, da dafür keine Zellmodelle zur Verfügung stehen. Die Alzheimersche Demenz ist eine im Wesentlichen auf den Menschen begrenzte Erkrankung des Zentralen Nervensystems, welches in seiner Komplexität nicht mittels Zellkulturen nachempfunden werden kann. Auch die verwendeten Versuchstiere bilden dabei immer nur einen Teil der menschlichen Pathologie nach. Will man den Einfluss einer Pg-Infektion auf die Plauepathologie und auf Kognition untersuchen, sind transgene Tierversuche die Methode der Wahl. Wir konnten dadurch einen Zusammenhang zwischen Pg-Infektion und gestörter räumlicher Orientierung und auf das Lernen und Gedächtnis der Versuchstiere beobachten. Insofern waren die gewählten Versuche angemessen, die gewählte Forschungsfragestellung zu untersuchen.

4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans,

Der voraussichtliche Nutzen definiert sich auf mehreren Ebenen. Wir konnten im Rahmen des Projektes einen weiteren wissenschaftlichen Beleg für die Hypothese eines Einflusses von primären Infektionen des Zahnhalteapparates auf die neuronale Physiologie erbringen. Insbesondere die Erkenntnisse zur Gesundheit peripherer Organe und Strukturen und deren Einfluss auf die Gesundheit des Gehirns sind in den letzten Jahren stark angewachsen. Entsprechende Ansätze, wie der hier verfolgte, erfahren also eine positive Aufnahme in der Öffentlichkeit. Dies stärkt kurz- und mittelfristig, die wirtschaftliche Situation des Fraunhofer IZI-MWT über erfolgte die Lizenzierung von pgQC-Inhibitoren an die Fraunhofer-Ausgründung PerioTrap Pharmaceuticals GmbH.

Weiterhin werden durch die vorliegenden Ergebnisse die Entwicklungsbemühungen der PerioTrap Pharmaceuticals GmbH im Bereich lokal wirkender Antiinfektiva gestärkt, da neben der direkten Parodontosebehandlung das Feld „Prävention der Alzheimerschen Erkrankung“ weiter exploriert werden

kann. Dies hat mittel- bis langfristige positive Arbeitsplatzeffekte für Fraunhofer IZI-MWT und die PerioTrap Pharmaceuticals GmbH. Die hier erhaltenen Ergebnisse können langfristig zu einem besseren Management der Alzheimerschen Erkrankung durch eine einfache periphere Intervention führen. Dafür muss dieser Ansatz aber zukünftig in die klinische Entwicklung/Testung überführt werden.

Insbesondere die Anstrengungen in der Entwicklung eines molekularen Verständnisses der Alzheimerschen Erkrankungen und, damit verbunden, der Ableitung effektiver Therapien hat in der Vergangenheit noch nicht zu durchschlagenden Erfolgen geführt. Ein erster monoklonaler Antikörper zur Behandlung von AD wird voraussichtlich in Kürze die Zulassung in Europa erhalten. Die Kosten einer solchen Therapie sind aber um ein Vielfaches höher als die hier aufgezeigten präventiven Maßnahmen. Der medizinische Bedarf ist jedenfalls auch am Projektende noch sehr hoch. Allein in Deutschland leben über 1 Millionen Patienten mit einer Alzheimer-Diagnose. Durch die alternde Gesellschaft werden diese Zahlen weiter steigen. Dieser Anstieg fällt in westlichen Ländern jedoch noch relativ moderat aus. Besonders Schwellenländer werden durch den sprunghaften Anstieg der Lebenserwartung vor immense Probleme gestellt. Die entsprechenden Gesundheitskosten können von diesen Ländern, realistisch gesehen, nicht gestemmt werden, was zur Prognose von größeren sozialen und monetären Verwerfungen in diesen Ländern führt. Eine effektive Alzheimer-Therapie hat einen prognostizierten jährlichen Umsatz von mehr als 10 Mrd. € pro Jahr.

Die Ergebnisse unseres Projektteils zeigen auf, dass ein konsequentes Management von oralen Infektionen einen Einfluss auf die Gehirnphysiologie Betroffener haben könnte. Dies muss durch weitere Studien und epidemiologische Erhebungen weiter untersucht werden. Das Potential über kostengünstige Prävention eine Reduktion von potentiellen Gesundheitskosten für zukünftige Alzheimer-Patienten zu erreichen ist jedoch mit dieser Studie nachvollziehbarer geworden.

5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen,

Während der Projektlaufzeit sind keine weiteren Arbeiten von anderen Stellen veröffentlicht wurden, die sich mit einer Behandlung peripherer Entzündungen des Zahnhalteapparates beschäftigen und deren primäres Target die PgQC ist.

Nichtsdestotrotz wird der Einfluss oraler Pathogene, insbesondere *P. gingivalis*, auf die Gehirnphysiologie und deren Rolle bei der Entstehung der Alzheimerschen Erkrankung auch an anderer Stelle untersucht. So verfolgte die US-amerikanische Firma Cortexyme einen Ansatz, bei dem Gingipaine, d.h. von *P. gingivalis* sezernierte Virulenzfaktoren mittels eines Inhibitors blockiert werden sollten. Der Ansatz beruhte auf der Annahme, dass Bakterien oder Gingipaine in das Gehirn gelangen und dort die Funktion von Nervenzellen stören. Dieser Ansatz wurde während der klinischen Entwicklung aufgrund aufgetretener Lebertoxizität gestoppt und verfehlte in der nachfolgenden Analyse die gesetzten Ziele zur Behandlung von AD. Zum einen zeigte diese Entwicklung, dass *P. gingivalis* auch an anderer Stelle als Ziel für die Wirkstoffentwicklung wahrgenommen wird, der Ansatz unterschied sich jedoch von dem hier getesteten Ansatz hinsichtlich des molekularen Zielenzym und dem Ort der vermuteten Wirkung. Wir konnten hier nochmals bestätigen, dass eine Pg-Infektion einen messbaren Einfluss auf Plaquepathologie und Verhalten von Versuchstieren hat. Das Scheitern der Firma Cortexyme zeigt aber, dass die Auswahl eines geeigneten Wirkstoffkandidaten von entscheidender Bedeutung ist. Insofern ist der hier verfolgte Ansatz basierend auf einer lokalen Wirksamkeit im Mundraum insofern vielversprechender, da ggf. auftretende systemische Lebertoxizität umgangen werden könnte. Den Erfolg unseres Ansatzes müssen aber zukünftige klinische Studien zeigen.

6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.

Die Ergebnisse sind aktuell noch nicht veröffentlicht. Die Ergebnisse unserer Studie sollen Ende 2024 mit Ergebnissen, insbesondere der Partner aus Norwegen und Dänemark, zusammengelegt und als Manuskript eingereicht werden.

7. Wenn zur Wahrung berechtigter Interessen des ZE oder Dritter oder aus anderen sachlichen Gesichtspunkten bestimmte Einzelheiten aus dem Bericht vertraulich zu behandeln sind (z.B. zur Wahrung der Priorität bei Schutzrechtsanmeldungen), so hat der ZE den ZG ausdrücklich darauf hinzuweisen.

Einer Veröffentlichung von Einzelheiten dieses Berichtes steht aus unserer Sicht nichts entgegen.

Referenzen

1. Ilievski V, Zuchowska PK, Green SJ, Toth PT, Ragozzino ME, Le K et al. Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation, neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice. *PLoS One* 2018; 13(10):e0204941.
2. Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, Tada H, Funaki-Kato Y, Hagiwara M et al. Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice. *NPJ Aging Mech Dis* 2017; 3:15.
3. Li CH, Amar S. Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model. *J Periodontol* 2007 [cited 2021 Aug 9]; 78(6):1120–8.
4. Chavez MB, Chu EY, Kram V, Castro LF de, Somerman MJ, Foster BL. Guidelines for Micro-Computed Tomography Analysis of Rodent Dentoalveolar Tissues. *JBMR Plus* 2021; 5(3):e10474-e10474. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33778330>.
5. Catunda RQ, Ho KK-Y, Patel S, Febbraio M. A 2-plane micro-computed tomographic alveolar bone measurement approach in mice. *Imaging Sci Dent* 2021; 51(4):389–98. Available from: URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34987999>.
6. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 2006; 26(40):10129–40.