

**Synthese und elektrophysiologische Testung
hochwirksamer Psoralenderivate
als nicht-peptidische Blocker
des lymphozytären Kaliumkanals Kv1.3**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Julia Vennekamp

Kiel 2002

Referent:

Prof. Dr. W. Hänsel

Korreferent:

Prof. Dr. S. Grissmer, Ulm

Tag der mündlichen Prüfung:

06.11.2002

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den 06.11.2002

Prof. Dr. W. Depmeier
(Dekan)

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Mechanismen der Immunabwehr	1
1.1.1.1	Unspezifische Abwehrmechanismen	1
1.1.1.2	Spezifische Abwehrmechanismen	2
1.1.2	Die Signaltransduktion in der T-Zelle	3
1.1.3	Gegenwärtig in der Therapie verwendete Immunsuppressiva	5
1.1.3.1	Einsatzgebiete	5
1.1.3.2	Glucocorticoide als Regulatoren der Genexpression	5
1.1.3.3	Cyclophosphamid und Antimetabolite als zytotoxische Agenzien	6
1.1.3.4	Inhibitoren des T-Zell-Rezeptorsignales	8
1.1.3.5	Peptidwirkstoffe	11
1.2	Kaliumkanäle	12
1.2.1	Allgemeines	12
1.2.2	Spannungsabhängige Kaliumkanäle	13
1.2.2.1	Struktur	13
1.2.2.2	Inaktivierungsmechanismen	15
1.2.2.3	Bedeutung der Kv1-Kanäle	16
1.2.3	Der lymphozytäre Kaliumkanal Kv1.3 als potentieller Angriffspunkt neuartiger Immunsuppressiva	17
1.2.3.1	Vorkommen und Struktur des Kv1.3-Kanals	17
1.2.3.2	Bedeutung lymphozytärer Kaliumkanäle	19
1.2.3.3	Mechanismus der immunsuppressiven Wirkung von Kv1.3-Blockern	20
1.2.3.4	Bekannte Blocker des Kv1.3-Kanals	22
1.3	Psoralene als Kaliumkanalblocker – Von Extrakten aus <i>Ruta graveolens</i> zu wirksamen Einzelverbindungen	25
1.4	Chirale Verbindungen als pharmakologisch wirksame Agenzien	27
1.4.1	Allgemeines	27
1.4.2	Stereoselektive Blocker von Kaliumkanälen	29
1.4.2.1	Lokalanästhetika vom Amid-Typ	29
1.4.2.2	<i>cis/trans</i> -Cyclohexan-Isomere	30

2 ZIELSETZUNG	31
3 SYNTHESE	32
3.1 Nomenklatur des Furocumarin-Grundkörpers	32
3.2 Synthese der Psoralenderivate	32
3.2.1 Allgemeiner Syntheseweg	32
3.2.2 (<i>RS</i>)-5-(2-Hydroxy-1-phenylethoxy)psoralen als Nebenprodukt der Synthese von (<i>S</i>)- bzw. (<i>R</i>)-5-(2-Hydroxy-2-phenylethoxy)psoralen	33
3.3 Übersicht über die synthetisierten Verbindungen	35
4 ANALYTIK	38
4.1 Spektroskopie	38
4.1.1 IR-Spektroskopie	38
4.1.2 NMR-Spektroskopie	38
4.1.2.1 ¹ H-NMR-Spektroskopie	39
4.1.2.2 ¹³ C-NMR-Spektroskopie	44
4.1.3 Massenspektrometrie	49
4.2 Hochleistungsflüssigchromatographie an chiralen stationären Phasen	52
4.2.1 Stationäre Phase (<i>S,S</i>)-Whelk-O1	53
4.2.2 Stationäre Phasen Nucleodex beta-OH und Nucleodex gamma-PM	56
5 ELEKTROPHYSIOLOGIE	57
5.1 Die <i>patch-clamp</i> -Technik	57
5.1.1 Entwicklung der Elektrophysiologie	57
5.1.2 Aufbau des <i>patch-clamp</i> -Messplatzes	58

5.2 Material und Methoden	60
5.2.1 Zellkultur	60
5.2.1.1 Material und Geräte	60
5.2.1.2 Verwendete Zelllinien	60
5.2.1.3 Kulturbedingungen	61
5.2.2 cRNA-Transfektion der RBL-Zellen	63
5.2.2.1 Material und Geräte	63
5.2.2.2 Durchführung	63
5.2.3 <i>Patch-clamp</i> -Messungen	64
5.2.3.1 Material und Geräte	64
5.2.3.2 Lösungen	66
5.2.3.3 Durchführung	67
5.2.3.4 Messprotokolle und Auswertung	68
5.3 Elektrophysiologische Untersuchungen	70
5.3.1 Untersuchungen am Kv1.3-Kanal	70
5.3.1.1 Chirale Verbindungen	70
5.3.1.2 Achirale Verbindungen	72
5.3.1.3 Untersuchungen zum Blockademechanismus	77
5.3.2 Untersuchung der Selektivität gegenüber Natrium- und Kaliumkanälen von Neuroblastom-Zellen	81
5.3.3 Untersuchung der Selektivität ausgewählter Verbindungen gegenüber Kanälen der Kv1- und Kv3-Familien	83
5.3.3.1 Testung an Kv1.2	83
5.3.3.2 Testung an Kv1.1	86
5.3.3.3 Testung an Kv1.5	87
5.3.3.4 Testung an Kv1.4	88
5.3.3.5 Testung an Kv1.7	89
5.3.3.6 Testung an Kv3.1	90
5.4 Bestimmung der Wiederfindungsrate der Testsubstanzen im <i>patch-clamp</i>-Experiment	92
5.4.1 Material und Geräte	92
5.4.2 Methode	92
5.4.3 Ergebnisse	94

6	UNTERSUCHUNGEN AM LYMPHOZYTEN	97
6.1	<i>Patch-clamp</i> -Untersuchungen am lymphozytären Kv1.3-Kanal	97
6.2	Lymphozyten-Proliferation	97
6.2.1	Methode	98
6.2.2	Ergebnisse	98
7	DISKUSSION	100
7.1	Struktur-Wirkungs-Beziehungen	100
7.1.1	Bedeutung der Chiralität enantiomerer Psoralene am Kv1.3-Kanal	100
7.1.2	Struktur-Wirkungs-Beziehungen der neuen Psoralene am Kv1.3-Kanal	101
7.1.3	Lipophilie-Wirkungs-Beziehungen der neuen Psoralene	104
7.1.4	Das Modell der Bivalenz	106
7.2	Selektivität der neuen Psoralene gegenüber weiteren Ionenkanälen	108
7.3	Überlegungen zum Blockademechanismus	110
7.4	Funktionelle Untersuchungen am Lymphozyten	111
7.4.1	Lymphozytenproliferation	111
7.4.2	Zytotoxizität der Psoralene	111
7.4.3	Einfluss auf die TZR/CD3-induzierte Tyrosinphosphorylierung	112
7.4.4	Einfluss auf die intrazelluläre Calciumionen-Konzentration	112
8	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	113
8.1	Zusammenfassung	113
8.2	Ausblick	114

9 EXPERIMENTELLER TEIL	116
9.1 Material und Geräte	116
9.2 Allgemeine Synthesevorschrift der Veretherung von Bergaptol	118
9.3 Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen	119
10 LITERATURVERZEICHNIS	147

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

1.1.1 Mechanismen der Immunabwehr

Das Immunsystem dient der Abwehr endogener oder exogener Pathogene. Zu seinen Aufgaben gehören die Neutralisation eingedrungener Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Parasiten oder Pilze, die Erhaltung körpereigener Strukturen bei Stress- oder Entzündungsreaktionen, die Eliminierung entartender Zellen sowie regulatorische Funktionen über das Neuroendokrinum. Im Laufe der Evolution entwickelten sich hierzu komplexe Mechanismen, die nach phylogenetischen und funktionellen Aspekten den Komponenten des angeborenen, unspezifischen oder des erworbenen (adaptiven), spezifischen Immunsystems zugeordnet werden können.

Das Immunsystem setzt sich aus einer Anzahl primärer oder sekundärer lymphatischer Gewebe zusammen. Die Reifung der immunkompetenten Zellen findet in den primären Geweben Knochenmark und Thymus ausgehend von pluripotenten, hämatopoietischen Stammzellen statt. In den sekundären Organen Milz, Lymphknoten, Tonsillen und im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe erfolgt anschließend die Aktivierung und Differenzierung der Lymphozyten.

1.1.1.1 Unspezifische Abwehrmechanismen

Physikalische, chemische und biochemische Barrieren wie Haut und Schleimhäute, Magensäure und reaktive Sauerstoffspezies können als erste Abwehrmechanismen angesehen werden. Werden diese überwunden, greifen zunächst zelluläre und humorale Komponenten des angeborenen Immunsystems.

Makrophagen und neutrophile Granulozyten eliminieren Pathogene mittels Phagozytose. Gleichzeitig gebildete humorale Faktoren tragen durch Aktivierung der Komplementkaskade und Markierung der Pathogene (Opsonisierung) zu einer schnelleren und effizienteren Beseitigung bei. Weiterhin sezernieren die Zellen des unspezifischen Systems lösliche Faktoren (Zytokine, Monokine), die als Alarmsignal für Zellen des adaptiven Immunsystems verstanden werden können und wesentlich an der Initiierung der spezifischen Antwort beteiligt sind.

Dem angeborenen System werden auch einige Zelltypen (manche T-Zellen, Natürliche Killerzellen) zugeordnet, die eine Art Zwitterposition einnehmen. Sie binden keine spezifischen Antigene, sondern Muster von Pathogenen wie z. B. Zellwand-

bestandteile oder Stoffwechselmetabolite, reagieren aber wie Zellen des adaptiven Systems mit Zytokinproduktion oder zytolytischer Aktivität.

1.1.1.2 Spezifische Abwehrmechanismen

Das adaptive Immunsystem ist durch die Spezifität der Antwort und die Ausprägung eines immunologischen Gedächtnisses charakterisiert.

Die erworbene Abwehr wird auf humoraler Ebene von Antikörpern getragen, welche von zu Plasmazellen differenzierten B-Lymphozyten produziert und sezerniert werden. Einige dieser Plasmazellen können als Gedächtniszellen über viele Jahre im Organismus verbleiben und führen im Falle eines erneuten Kontaktes mit dem gleichen Antigen zu einer schnelleren und effizienteren Sekundärantwort.

T-Lymphozyten sind die Schlüsselzellen der zellulären Immunabwehr. Sie lassen sich aufgrund funktioneller und phänotypischer Eigenschaften klassischerweise in CD8⁺-zytotoxische Zellen (CD: *cluster of differentiation*) und CD4⁺-Helferzellen unterscheiden.

T-Zellen erkennen die von den Pathogenen stammenden Antigene prozessiert in Form kleiner Peptide, die auf individuell verschiedenen Molekülen des so genannten Hauptgewebsverträglichkeits-Komplexes = MHC (*major histocompatibility complex*) auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) dargeboten werden.

Zytotoxische CD8-positive T-Lymphozyten eliminieren überwiegend Zellen, die durch Viren oder intrazelluläre Bakterien infiziert sind. Entsprechend prozessierte endogene Antigene werden im Kontext mit MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert. Die zytolytische Funktion basiert auf einer Reihe von unterschiedlichen Mechanismen, die darauf abzielen, in der Zielzelle einen für das Immunsystem ungefährlichen Zelltod (Apoptose) zu induzieren. Dieser Zelltod wird durch Zytolysine (Perforin, Granzyme) oder durch die Freisetzung von Todesfaktoren über eine Interaktion mit Todesrezeptoren auf den Zielzellen ausgelöst.

Exogene Antigene werden in der Regel MHC-Klasse-II-assoziiert auf so genannten professionellen APZ, d. h. vor allem auf Makrophagen und dendritischen Zellen präsentiert. Sie werden von CD4-positiven T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) erkannt. Aufgrund verschiedener Funktionen lassen sich die Helferzellen weiter in zwei Gruppen unterscheiden: Th1-Zellen aktivieren Makrophagen und T-Zellen über Schlüssel-Zytokine wie Interleukin 2 und Interferon- γ . Th2-Zellen steuern die T-Zell-abhängige Antikörperantwort der B-Lymphozyten, hauptsächlich über Interleukin 4.

Neben dem auch als Signal 1 bezeichneten Erkennen des Antigens im Kontext mit dem entsprechenden MHC-Molekül, sind als Signal 2 verschiedene andere akzes-

sorische (CD4 oder CD8) oder kostimulatorische (CD28) Moleküle an der Initiierung der zellbiologischen Aktivierung beteiligt.

1.1.2 Die Signaltransduktion in der T-Zelle

Nach Antigenkontakt laufen in T-Lymphozyten komplexe Signaltransduktionswege über eine Vielzahl von Enzymen und Mediatoren ab, die letztlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen. Diese bewirken unter anderem die Synthese des Interleukin-2 (IL-2), welches autokrin als wichtigster T-Zell-Wachstumsfaktor die Proliferation und Differenzierung der T-Lymphozyten fördert.

Die Signaltransduktionswege sollen im Folgenden in ihren Grundzügen erläutert und durch Abbildung 1.1 veranschaulicht werden.

Im Zentrum des T-Zell-Rezeptor (TZR)-Komplexes befindet sich ein Heterodimer aus den TZR α - und TZR β - (oder γ - und δ -) Ketten mit der hochvariablen Antigen-Bindungsstelle. Die positiv geladenen α - und β -Ketten sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden, sie sind nicht-kovalent mit negativ geladenen invarianten Ketten des CD3-Komplexes assoziiert (CD3 γ , CD3 δ und CD3 ϵ). Zwei ζ -Ketten sind in Form eines Homodimers intrazellulär assoziiert. Sie stellen die wesentlichen Komponenten des Komplexes zur Signalweiterleitung dar. In ihnen sind Sequenzmotive lokalisiert, so genannte ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*), über die die Signale letztlich ans Zellinnere weitergeleitet werden.

Die ITAMs und damit die ζ -Ketten stellen die Substrate für zwei T-Zell-spezifische Tyrosinkinassen der Src-Familie (p56^{Lck} und p59^{Fyn(T)}) dar. Lck und Fyn sind assoziiert mit den Co-Rezeptoren CD4/CD8 respektive den CD3-Untereinheiten. Nach Aktivierung phosphorylieren die Src-Kinasen zunächst die ζ -Ketten und schaffen damit die Voraussetzung zur Rekrutierung der Syk-Kinase ZAP-70. ZAP-70 wird ebenfalls von den Src-Kinasen phosphoryliert und damit aktiviert, was wiederum zur Phosphorylierung und Rekrutierung einer Reihe von Enzymen und Adapterproteinen führt. Es entsteht ein multifaktorieller Signalkomplex, in dem schließlich die Verteilung der verschiedenen Proteine entscheidet, welches Signal zum Zellkern gelangt, um dort Gene an- oder abzuschalten.

Die intrazelluläre Signaltransduktion zum Zellkern verläuft über drei Hauptwege:

Die Phospholipase C γ (PLC γ) initiiert über die Spaltung des Membranbestandteils PIP₂ (Phosphatidylinositoldiphosphat) zwei der Wege durch Bereitstellung von Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃). DAG verbleibt an der Membran

Einleitung

und ist über die Proteinkinase C (PKC) an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B beteiligt. IP₃ diffundiert ins Zytosol und bindet an die IP₃-Rezeptoren in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Daraufhin kommt es zu einer Calciumausschüttung aus intrazellulären Speichern, die wiederum die Öffnung von Calciumkanälen (CRAC: *Ca*²⁺ release-activated *Ca*²⁺ channel) in der Zellmembran triggert. Das einströmende Calcium bindet an Calmodulin und aktiviert in dieser Form die Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin. Diese vermag nun den zytosolischen Transkriptionsfaktor NFATc (*nuclear factor of activated T cells*) zu dephosphorylieren, der daraufhin in den Zellkern einwandert. Dort interagiert er mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 (*activator protein 1*), einem Heterodimer aus den Proteinen Jun und Fos.

Das G-Protein Ras startet den dritten Hauptmechanismus der Signaltransduktion, dabei handelt es sich um die MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinasen-Kaskade. Diese Kinasen aktivieren z. B. den Transkriptionsfaktor AP-1.

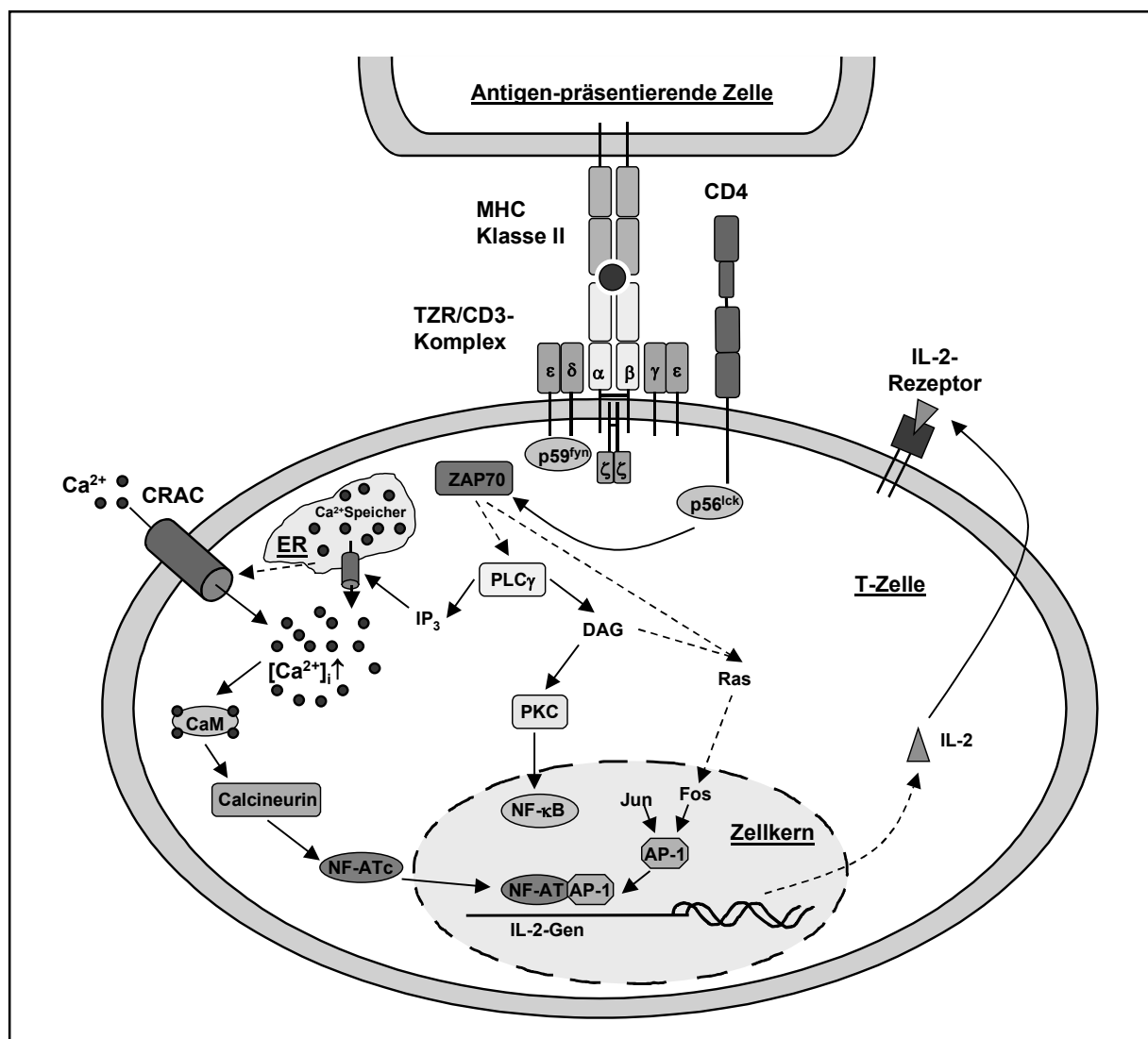


Abb. 1.1: Vereinfachte Darstellung der Signaltransduktionsmechanismen in T-Lymphozyten, Erklärung im Text.

1.1.3 Gegenwärtig in der Therapie verwendete Immunsuppressiva

1.1.3.1 Einsatzgebiete

Als erste Substanz mit immunsuppressiver Wirkung wurde vor gut einem halben Jahrhundert das Glucocorticoid Cortison beschrieben (Hench et al., 1949). Seitdem sind große Anstrengungen unternommen worden, potente und gut verträgliche Arzneistoffe für die immunsuppressive Therapie zu entwickeln. Erst Fortschritte auf diesem Gebiet ermöglichten den Durchbruch in der Transplantationsmedizin.

Transplantationen fremder Organe wie Niere, Herz, Leber, Lunge, Pankreas usw. erfordern eine lebenslange immunsuppressive Behandlung zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen („*Host-versus-Graft*“-Reaktion). Bei Knochenmarks- oder Stammzelltransplantationen schützen Immunsuppressiva den Empfänger vor immunologischen Reaktionen übertragener reifer Lymphozyten des Spenders („*Graft-versus-Host*“-Reaktion).

Ebenfalls körpereigene Strukturen werden bei Autoimmunprozessen durch eine Überreaktion des Abwehrsystems angegriffen. Zu diesen Erkrankungen gehören z.B. der systemische Lupus erythematodes, die Colitis ulcerosa, der Morbus Crohn, die Myasthenia gravis, die rheumatoide Arthritis, der insulin-abhängige Diabetes mellitus und die Multiple Sklerose. Erst allmählich werden die dabei ablaufenden pathogenen Mechanismen verstanden und die immunologischen Ursprünge klar, so dass sich das Einsatzgebiet für Immunsuppressiva noch immer ausweitet.

Die folgende Übersicht über die gegenwärtig eingesetzten Immunsuppressiva belegt trotz aller bisherigen Erfolge den Bedarf an neuen Ansatzpunkten in der immunsuppressiven Therapie und an Arzneistoffen mit günstigerem Nutzen-Risiko-Profil. Die verschiedenen Wirkstoffe werden meist in Kombination verwendet werden. Sie bergen aufgrund der verursachten Schwächung des körpereigenen Abwehrsystems generell das Risiko einer erhöhten Infektionsneigung und bösartiger Erkrankungen. Die Strukturformeln der vorgestellten niedermolekularen Verbindungen sind in Abbildung 1.2 (Seite 10) dargestellt.

1.1.3.2 Glucocorticoide als Regulatoren der Genexpression

Glucocorticoide interagieren mit zytosolischen Steroid-Rezeptoren. Die entstehenden Komplexe wandern in den Zellkern ein und modifizieren dort die Transkriptionsrate zahlreicher Proteine. Glucocorticoide wirken entzündungshemmend und in höherer Dosierung immunsuppressiv, hauptsächlich durch Hemmung der Expression der

Gene für IL-2 und andere Mediatoren. Steroide wirken nicht selektiv und besitzen ein breites Spektrum unerwünschter Wirkungen.

1.1.3.3 Cyclophosphamid und Antimetabolite als zytotoxische Agenzien

Cyclophosphamid

Cyclophosphamid, welches sich historisch vom Schwefel-Lost (Senfgas) ableitet, wird in erster Linie als Zytostatikum verwendet, in geringer Dosierung kommt es jedoch auch in der Therapie von Autoimmunerkrankungen zum Einsatz. Die Substanz muss zunächst metabolisch aktiviert werden, bevor sie in ihrer Wirkform (Chlor-ethylphosphorsäureamid) in der Lage ist, DNA-Basen zu alkylieren und damit die Zellteilung zu unterdrücken.

Die Effekte auf B-Lymphozyten sind ausgeprägter als diejenigen auf T-Zellen, so dass hauptsächlich die Bildung von Antikörpern gehemmt wird. Deshalb wird Cyclophosphamid trotz des erheblichen Nebenwirkungspotentials noch immer bei Erkrankungen eingesetzt, bei denen Autoantikörper die entscheidende pathogenetische Rolle spielen, wie es z. B. beim systemischen Lupus erythematoses der Fall ist. Zu den unerwünschten Wirkungen zählt neben Leukopenie, hämorrhagischer Zystitis, Kardiotoxizität, Alopezie auch ein erhöhtes Krebsrisiko aufgrund der Mutagenität der Substanz.

Methotrexat

Bei Methotrexat (MTX) handelt es sich um ein Derivat der Folsäure, es hemmt das Enzym Dihydrofolatreduktase. Als Folge wird aus Dihydrofolsäure weniger Tetrahydrofolsäure gebildet. Letztere wird zur Übertragung von Methylengruppen durch die Thymidylat-Synthase benötigt, so dass die Bildung vor allem von Thymin und von Purinbasen vermindert ist. Nach Aufnahme in die Zellen erfährt das MTX eine Modifizierung durch Anheftung von zwei bis fünf Polyglutamatresten. Derart metabolisiertes MTX kumuliert in den Zellen und vermag weitere Folsäure-abhängige Enzyme zu hemmen.

Wie das Cyclophosphamid wurde Methotrexat für die zytostatische Therapie entwickelt, im immunologischen Bereich besitzt es in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis eine große Bedeutung. Schwerwiegende Nebenwirkungen betreffen hauptsächlich Leber und Lunge.

Azathioprin (Imurek®)

Azathioprin wurde vor der Einführung des Cyclosporin A neben den Steroiden routinemäßig bei Nierentransplantationen eingesetzt. Aus dem Prodrug Azathioprin entsteht nicht-enzymatisch das aktive 6-Mercaptopurin (6-MP). 6-MP wird zu 6-Thioguanin-Nukleotiden verstoffwechselt, die sowohl die Synthese von RNA und DNA als auch verschiedene Enzyme der Purinsynthese inhibieren.

Unvorteilhaft ist die nicht selektive, breite Wirkung auch auf viele weitere Körperzellen. Dadurch führt die Substanz schon nahe der therapeutischen Dosis zu Knochenmarksdepressionen und hepatotoxischen Effekten, weiterhin besitzt sie mutagenes Potential.

Mycophenolatmofetil (CellCept®)

Das Prodrug Mycophenolatmofetil (MMF) wird hydrolysiert zur wirksamen Mycophenolsäure. Diese ist ein potenter Hemmstoff der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase und blockiert dadurch die *de novo*-Purinbiosynthese. Proliferierende Lymphozyten sind auf diesen Syntheseweg angewiesen, während andere Zellen im Gegensatz dazu einen großen Teil ihrer Purine über den *salvage pathway* wiederverwerten können.

MMF besitzt ein relativ geringes Nebenwirkungspotential, beobachtet werden vor allem unerwünschte Wirkungen auf das hämatologische System und den Gastrointestinaltrakt. Nephrotoxische, hepatotoxische und metabolische Effekte spielen kaum eine Rolle. Mycophenolatmofetil wurde 1996 in Deutschland zur Prävention und Behandlung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen zugelassen und hat seitdem den Purin-Antimetaboliten der ersten Generation, das Azathioprin, aus vielen Anwendungen verdrängt.

Leflunomid (Arava®)

Das Isoxazolderivat Leflunomid agiert durch Inhibierung der Dihydroorotat-Dehydrogenase als Hemmstoff der *de novo* Pyrimidin-Nukleotid-Synthese. Aktivierte Lymphozyten werden selektiv beeinträchtigt, da sie ein Vielfaches der Pyrimidinmenge der ruhenden Zellen benötigen und ihren Bedarf nicht über den *salvage pathway* decken können. Die Substanz ist ein Prodrug mit geringerer Toxizität auf den Gastrointestinaltrakt als das Malonnitrilamid, die aktive Wirkform mit geöffnetem Isoxazol-Ring.

Seit September 1999 wird Leflunomid in Deutschland als Basistherapeutikum bei der aktiven rheumatoiden Arthritis eingesetzt, die Anwendung im Anschluss an Organtransplantationen wird derzeit untersucht. Als unerwünschte Wirkungen werden relativ häufig Blutdruckerhöhungen beobachtet (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 2002).

1.1.3.4 Inhibitoren des T-Zell-Rezeptorsignales

Cyclosporin A (Sandimmun[®] Optoral)

Bei Cyclosporin A (CsA) handelt es sich um ein lipophiles zyklisches Undecapeptid aus dem Bodenpilz *Tolypocladium inflatum gams*. Seine immunsuppressive Aktivität wurde Mitte der 70er Jahre entdeckt (Borel et al., 1976), es besitzt eine deutlich geringere Knochenmarkstoxizität als die Antimetabolite und ist das wichtigste Immunsuppressivum der letzten Jahrzehnte. Nach wie vor gilt es als Goldstandard, an dem sich Neuentwicklungen messen müssen.

Erst Jahre nach Einführung des CsA in die Therapie wurde die Wirkweise der Substanz aufgeklärt. Sie bildet einen Komplex mit dem Immunophilin Cyclophilin, der eine Hemmung der Phosphatase-Aktivität von Calcineurin bewirkt (Liu et al., 1991). Dadurch wird die Calcineurin-abhängige Dephosphorylierung von NFAT und dessen anschließende Translokation vom Zytoplasma in den Kern aktivierter T-Zellen verhindert (Schreiber und Crabtree, 1992). Mittlerweile wurde ein zweiter Wirkmechanismus identifiziert, CsA blockiert auch Signaltransduktionswege, die über die MAP-Kinasen JNK und p38 ablaufen (Matsuda et al., 1998). Insgesamt hemmt Cyclosporin A die Aktivierung von T-Zellen und die Expression von Lymphokinen wie IL-2.

Ein schwerwiegender Nachteil des Cyclosporins ist seine enge therapeutische Breite. Im Vordergrund steht dabei eine erhebliche Nierentoxizität (Übersicht bei Olyaei et al., 2001) in Form einer reversiblen dosisabhängigen renalen Vasokonstriktion mit verminderter glomerulärer Filtrationsrate und systemischer Hypertension. Offenbar stehen diese Vorgänge in Verbindung mit einer vermehrten Bildung des mitogen und pressorisch wirkenden Peptids Endothelin-1. Weiterhin fördert CsA die Expression des TGF (*transforming growth factor*)- β 1, damit verbunden ist das nicht-dosisabhängige Auftreten einer tubulären interstitiellen Fibrose in der Niere. Neben der Nephrotoxizität kann Cyclosporin A zu Hypertrichosen und neuro-, hepato- und kardiotoxischen Effekten führen.

Tacrolimus (FK506, Prograf®)

Das makrozyklische Lacton und Trien Tacrolimus wurde aus dem Kulturfiltrat von *Streptomyces tsukubaensis* isoliert, für den klinischen Einsatz wurde es erstmals 1994 zugelassen. Wie das Cyclosporin A gehört diese Substanz in die Klasse der Calcineurin-Inhibitoren, allerdings bildet es einen Komplex mit einem anderen zytoplasmatischen Immunophilin, es bindet an das so genannte FK506-bindende Protein. Darüber hinaus greift es ebenfalls in den Signaltransduktionsweg über die Kinasen JNK und p38 ein. Tacrolimus ist *in vitro* 10 bis 100fach wirksamer als Cyclosporin A, die klinische Relevanz dieser Tatsache ist jedoch noch nicht abschließend zu beurteilen. FK506 besitzt ein vergleichbares Nebenwirkungsspektrum wie das Cyclosporin A, hervorzuheben sind die Nephro- und die Neurotoxizität.

FK506 hat sich in der Transplantationsmedizin etabliert, außerdem wurde es in Deutschland im April 2002 als Protopic® in die topische Therapie der Neurodermitis eingeführt. Hiermit verbunden sind Hoffnungen auf einen Durchbruch in der Behandlung dieser Erkrankung.

Sirolimus (Rapamycin, Rapamune®)

Die Verbindung Sirolimus aus *Streptomyces hygroscopicus* besitzt eine große strukturelle Ähnlichkeit zum Tacrolimus. Es hat zunächst auch den gleichen Bindungspartner in der Zelle, das FK506-bindende Protein, allerdings wirkt dieser Komplex nicht als Inhibitor des Calcineurins, sondern gänzlich verschieden als Hemmstoff der mTOR (*mammalian target of rapamycin*)-Proteine. Diese Kinasen spielen eine bedeutende Rolle im Zellzyklus beim Übergang von der G1- in die S-Phase. Sie aktivieren unter anderem die p70 S6-Kinase, die durch Regulation der Translation für die Synthese ribosomaler Proteine verantwortlich ist. Während Calcineurin-Inhibitoren also die Produktion von Zytokinen unterbinden, hemmt Sirolimus die proliferative Antwort der Zelle auf die Wirkung von Zytokinen.

Der seit 1999 (in Deutschland seit 2001) für die Prävention von Abstoßungsreaktionen zugelassene Arzneistoff besitzt eine wesentlich geringere Nephrotoxizität als Cyclosporin A oder Tacrolimus und könnte die Calcineurin-Inhibitoren in der Zukunft ablösen, allerdings gibt das breite Auftreten von Hyperlipidämien Anlass zur Besorgnis.

Einleitung

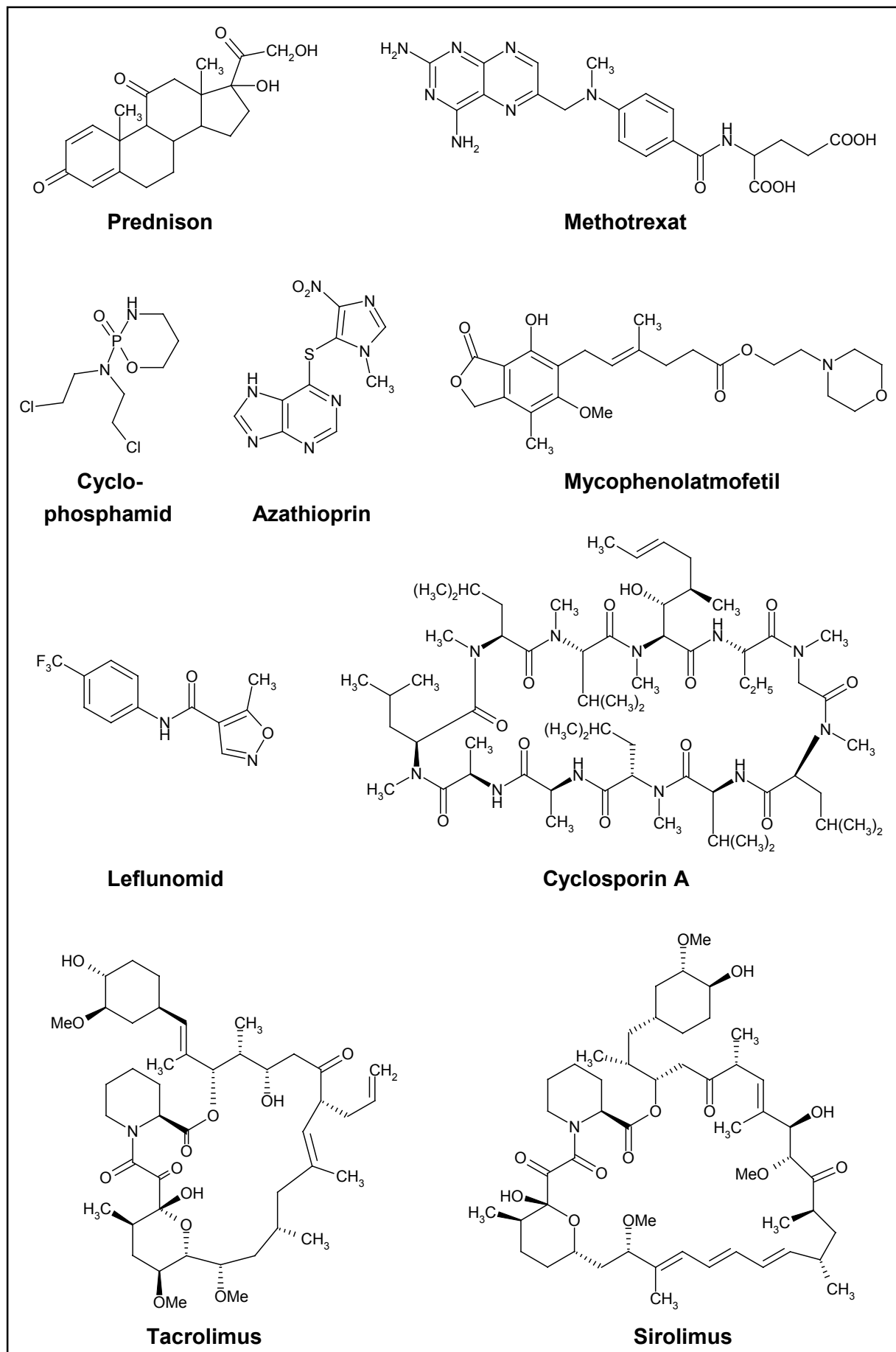


Abb. 1.2: Strukturformeln gegenwärtig in der Therapie eingesetzter niedermolekularer Immunsuppressiva.

1.1.3.5 Peptidwirkstoffe

Auch peptidische Arzneistoffe werden in der immunsuppressiven Therapie eingesetzt. Grundsätzliche Nachteile der Behandlung mit Proteinmolekülen sind die fehlende orale Bioverfügbarkeit und das eigene immunogene Potential der Substanzen.

Seit langer Zeit werden polyvalente Antilymphozytenserum verwendet, die eine Vielzahl von Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenproteine von Lymphozyten enthalten. Sie werden durch Immunisierung eines Tieres mit humanen Lymphozyten gewonnen.

Bei Muromonab-CD3 (Orthoclone[®] OKT 3) handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper aus der Maus, der gegen die CD3-Untereinheiten des T-Zell-Rezeptor-Komplexes gerichtet ist.

Seit Ende der 90er Jahre kommen zwei chimäre humanisierte, monoklonale Antikörper in der Therapie zum Einsatz, Basiliximab (Simulect[®]) und Daclizumab (Zenapax[®]). Sie binden beide an die α -Kette (CD25, Tac) des Interleukin-2-Rezeptors, die nur in aktivierten Lymphozyten exprimiert wird.

1.2 Kaliumkanäle

1.2.1 Allgemeines

Kaliumkanäle sind in großer Zahl sowohl in erregbaren als auch in nicht-erregbaren Zellen zu finden, so spielen sie eine wichtige Rolle bei der Neurotransmitter- und Insulin-Freisetzung, der Herzfunktion, der neuronalen Erregbarkeit, dem epithelialen Elektrolyt-Transport, der Kontraktion glatter Muskeln oder der Regulation des Zellvolumens. Zu ihren Aufgaben gehören die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials und die Repolarisation depolarisierter Zellmembranen (Hille, 1992).

Veränderte Kanalfunktionen, hervorgerufen z. B. durch Mutationen in den kodierenden Genen, werden mit zahlreichen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Immer neue Modulatoren an Kaliumkanälen werden im Hinblick auf eine mögliche klinische Verwendung untersucht (Übersichten bei Coghlan et al., 2001 und Shieh et al., 2000).

Bei Kaliumkanälen handelt sich um integrale Membranproteine, die Kaliumionen mit Raten von 10^6 - 10^8 Ionen/s entlang eines elektrochemischen Gradienten durch die Membran leiten (Hille, 1992). Die intrazelluläre Kaliumionenkonzentration übertrifft die extrazelluläre um ein Vielfaches, so dass der Ionenfluss meist von innen nach außen verläuft. Kaliumkanäle besitzen ein Selektivitätsfilter, das bevorzugt Kaliumionen den Durchtritt durch die wassergefüllte Pore erlaubt, und einen *gating*-Mechanismus, der den Wechsel zwischen geschlossener und offener Konformation des Kanals reguliert. Darüber hinaus unterliegen die Kanäle verschiedenen Inaktivierungsprozessen (Kapitel 1.2.2.2, Seite 15).

Kaliumkanäle sind aus α -Untereinheiten aufgebaut, aufgrund derer sie in drei Superfamilien eingeteilt werden können. Die einwärts-gleichrichtenden Kir-Kanäle (*inward-rectifier*) besitzen vier α -Untereinheiten mit jeweils zwei transmembranären Segmenten und einer porenbildenden Region (2TM1P). Weiterhin existiert eine Gruppe von Kanälen, deren α -Untereinheiten von vier transmembranären Einheiten und einer „Tandempore“, bestehend aus zwei porenbildenden Regionen, gebildet werden (4TM2P). Sie besitzen ebenfalls schwache *inward-rectifier*-Eigenschaften.

Die α -Untereinheiten der zahlreichen übrigen Kaliumkanäle bestehen aus sechs transmembranären Segmenten und einer porenbildenden Region (6TM1P), jeweils vier dieser Untereinheiten sind zu einem Tetramer zusammengeschlossen und bilden einen funktionstüchtigen Kanal. Zu dieser Superfamilie gehören z. B. die spannungsabhängigen (Kv, für *voltage gated*) und die Calcium-aktivierbaren Kaliumkanäle (KCa).

1.2.2 Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Innerhalb der Gruppe der spannungsabhängigen Kaliumkanäle werden vier Subfamilien aufgrund ihrer Homologie zu Kaliumkanälen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Wei et al., 1990) unterschieden: *Shaker* (Kv1), *Shab* (Kv2), *Shaw* (Kv3) und *Shal* (Kv4). Die einzelnen Mitglieder dieser Familien können neben Homotetrameren auch heterotetramere Kanäle mit anderen α -Untereinheiten ihrer Subfamilie bilden (z. B. Ruppersberg et al., 1990). Durch veränderte biophysikalische und pharmakologische Eigenschaften wird damit die Kanal-Vielfalt beträchtlich erhöht.

Neben den Kv1- bis Kv4-Kanälen existieren als weitere Familien Kv5, Kv6, Kv8 und Kv9, mögliche erste Mitglieder von Kv10 und Kv11 sind aktuell beschrieben worden (Ottschytsch, 2002).

1.2.2.1 Struktur

Die Kanaltopologie spannungsabhängiger Kaliumkanäle ist in Abbildung 1.3 dargestellt. Die sechs Segmente S1 bis S6 einer α -Untereinheit durchspannen die Zellmembran, die C- und N-terminalen Enden der Aminosäuresequenz ragen in den Intrazellulärraum. Die so genannte P-Schleife zwischen den Domänen S5 und S6 liefert den wichtigsten Beitrag zur porenbildenden Struktur.

Ende der 90er Jahre gelang erstmals die Röntgenstrukturanalyse eines Kaliumkanals, des KcsA aus dem Bakterium *Streptomyces lividans* (Doyle et al., 1998; Zhou et al., 2001). Die α -Untereinheit des KcsA-Kanals ist aus zwei transmembranären Segmenten und einer porenbildenden Region aufgebaut, die in enger Homologie mit den Domänen S5, S6 und der P-Schleife in *Shaker*-Kanälen stehen (MacKinnon et al., 1998). Obwohl sich die Porenlängen von KcsA- bzw. Kv-Kanälen offenbar unterscheiden (del Camino et al., 2000), konnte ein recht genaues Bild des Mechanismus entstehen, welcher für die Selektivität verantwortlich ist.

Kaliumionen sind erst nach Verlust ihrer Hydrathülle in der Lage, das Selektivitätsfilter zu passieren. Dieser Vorgang erfordert Energie. Carbonylsauerstoffe angrenzender Aminosäuren ermöglichen die Dehydratisierung, indem sie in koordinativen Bindungen die fehlenden Wassermoleküle ersetzen. Natriumionen befinden sich aufgrund ihres kleineren Ionenradius in größerer Entfernung zu den Aminosäuren und werden energetisch weniger günstig komplexiert. Sie besitzen deshalb eine um den Faktor 10^4 geringere Permeabilität (Doyle et al., 1998).

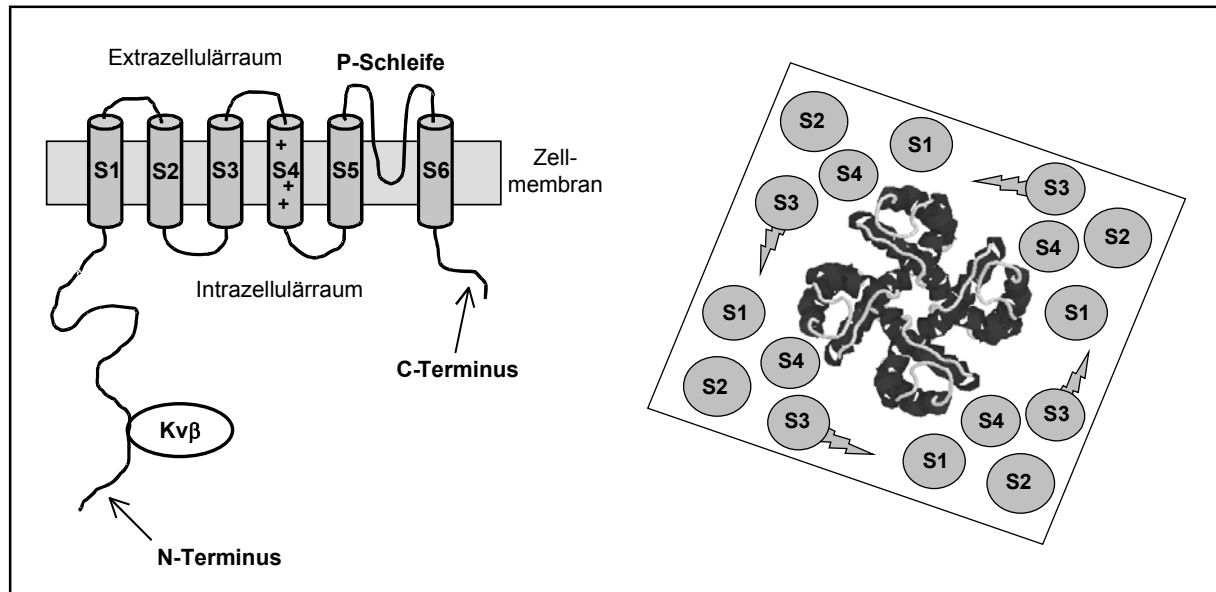


Abb. 1.3: Kanaltopologie spannungsabhängiger Kaliumkanäle. Links: Aufbau einer α -Untereinheit. Rechts: Aufsicht auf ein Kanaltetramer.

Spannungsabhängige Kaliumkanäle öffnen bei Membrandepolarisation. Der Hauptbestandteil des Spannungssensors ist das S4-Segment (Papazian et al., 1991). Dieses Segment enthält vier bis acht positiv geladene basische Aminosäurereste (Arginin oder Lysin), die jeweils durch zwei hydrophobe Reste voneinander getrennt sind. Im geschlossenen Zustand stehen vier dieser Aminosäuren in Kontakt mit dem intrazellulären Medium. Eine Depolarisation verursacht eine rotierende Bewegung des S4-Segments, durch die sich die positiv geladenen Reste dem Extrazellulärraum zuwenden. Als Folge ändert sich auch die Position der Segmente S5 und S6, so dass der Kanal sich öffnet (Übersicht bei Bezanilla, 2000).

Neben den α -Untereinheiten existieren zytoplasmatische Strukturen, die an diese Poren-formenden Elemente assoziiert sein können und Einfluss auf Funktion und Expression der Kanäle nehmen. Schon länger bekannt sind drei Familien von K_vβ-Untereinheiten (K_vβ1 bis K_vβ3, Übersicht bei Pongs et al., 1999), die in 1:1-Stöchiometrie mit Kanälen aus der K_v1-Familie interagieren. Sie binden dabei an das N-terminale Ende der α -Untereinheit (Sewing et al., 1996). K_vβ1- und K_vβ3-Untereinheiten können K_v1-Kanälen neue Inaktivierungseigenschaften verleihen, indem sie den Peptid-„Ball“ der schnellen N-Typ-Inaktivierung (s. Kapitel 1.2.2.2) imitieren. Darüber hinaus sind β-Untereinheiten in der Lage, die Expression funktionstüchtiger Kanäle an der Membranoberfläche zu erhöhen.

Als weiteres modulierendes Molekül ist das Protein KChAP (*K⁺ channel-associated protein*) beschrieben worden (Wible et al., 1998), welches vorübergehend an N-

terminale Enden einiger Kv- α -Untereinheiten binden kann. Interaktionen von KChAP mit Kv1.3, Kv2.1, Kv2.2 und Kv4.3 führen zu einer verstärkten Expression der Kanäle an der Membranoberfläche (Kuryshv et al., 2000).

1.2.2.2 Inaktivierungsmechanismen

Unter Inaktivierung wird der Übergang aus der geöffneten Kanalkonfiguration in einen nicht-leitenden Zustand während einer langandauernden Depolarisation des Membranpotentials verstanden. Es sind verschiedene Inaktivierungsvorgänge charakterisiert worden.

Die N-Typ-Inaktivierung läuft innerhalb weniger Millisekunden ab, sie wird auch als *ball and chain*-Mechanismus bezeichnet. Hierbei bindet ein Peptid-„Ball“, der aus den ersten etwa 20 Aminosäuren des N-Terminus besteht (Hoshi et al., 1990; Zagotta et al., 1990), an Rezeptorstellen der intrazellulären Schleife zwischen den transmembranären Segmenten S4 und S5 und verschließt auf diese Weise die Pore von innen (Isacoff et al., 1991; Holmgren et al., 1996). Kanäle, die diesen schnellen Inaktivierungsmechanismus aufweisen, werden als A-Typ-Kanäle bezeichnet.

Sehr viel langsamer als die N-Typ-Inaktivierung findet die C-Typ-Inaktivierung statt. Hieraus resultiert die Stromcharakteristik der *delayed rectifier* (verzögerte Gleichrichter)-Kanäle. Die C-Typ-Inaktivierung beruht auf kooperativen Konformationsänderungen aller vier Untereinheiten und führt zum Verschluss der äußeren Öffnung der Kanalpore (Übersicht bei Rasmusson et al., 1998).

In jüngster Zeit ist ein weiterer langsamer Inaktivierungsmechanismus für einige spannungsabhängige Kaliumkanäle, z. B. Kv2.1 und Kv3.1, beschrieben worden, der aufgrund einer U-förmigen Beziehung zwischen Inaktivierung und Spannung die Bezeichnung U-Typ-Inaktivierung erhalten hat (Klemic et al., 2001). Die Kanäle scheinen dabei den inaktivierten Zustand bevorzugt ausgehend von der geschlossenen Konfiguration zu erreichen, die zugrunde liegenden Änderungen der Konformation sind bislang jedoch noch unklar.

1.2.2.3 Bedeutung der Kv1-Kanäle

Aus der Familie der *Shaker*-Familie sind bisher 7 Mitglieder charakterisiert worden, Kv1.1 bis Kv1.7 (Chandy und Gutman, 1995). Die Mehrzahl von ihnen liegt vor allem in neuronalen Geweben vor.

Der Kv1.3-Kanal, der in der vorliegenden Arbeit im Mittelpunkt der Untersuchungen steht, wird im Kapitel 1.2.3 detailliert betrachtet.

Untersuchungen an Strukturen des humanen zentralen Nervensystems zeigen, dass in Gehirn und Rückenmark überwiegend die α -Untereinheiten Kv1.1, Kv1.2 und Kv1.4 präsent sind (Coleman et al., 1999). Sie bilden in verschiedenen Zusammensetzungen heterotetramere Kanäle, es existieren aber auch Kv1.2 bzw. Kv1.4-Homotetramere. Darüber hinaus wurde in der grauen Substanz des Gehirns ein Heterotetramer aus Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4 und zusätzlich Kv1.3 nachgewiesen. Zum Teil sind die Kanäle mit Kv β 1.1 oder Kv β 2.1-Untereinheiten assoziiert.

Die komplexen elektrophysiologischen Vorgänge im Herzen sind durch eine schnelle Depolarisation und eine charakteristische langsame Repolarisation gekennzeichnet, sie beruhen auf einem Zusammenspiel zahlreicher Ionenkanäle (Übersicht bei Roden et al., 2002). An der Repolarisation sind auch spannungsabhängige Kaliumkanäle der *Shaker*-Familie beteiligt.

In den meisten Herzzellen leistet der sehr schnell inaktivierende Strom I_{to} (*transient outward*) einen Beitrag zur frühen Phase der Repolarisation. Für diesen Strom wurde zunächst der Kv1.4-Kanal verantwortlich gemacht, der einen A-Typ-Strom generiert. Mittlerweile scheint jedoch sicher, dass der Strom zumindest in humanen Zellen hauptsächlich vom Kv4.3-Kanal getragen wird (McKinnon, 1999).

Der Kaliumausstrom späterer Phasen des Aktionspotentials wird durch verschiedene *delayed rectifier*-Kanäle vermittelt. Die atriale Stromkomponente I_{Kur} (*ultra-rapid*) wird vornehmlich dem homotetrameren Kv1.5-Kanal zugeschrieben (z. B. Fedida et al., 1993; Feng et al., 1997), möglicherweise liegen ihr aber auch noch andere α -Untereinheiten zugrunde. Kv1.5-Blocker sollten selektiv nur die atriale Refraktärphase verlängern und werden als Kandidaten für die Entwicklung von Antiarrhythmika mit einem reduzierten ventrikulären proarrhythmischen Potential angesehen. Erste Untersuchungen stützen dieses Konzept, z. B. verlängert die Verbindung S9947 (Abbildung 1.4) das Aktionspotential in Kardiomyozyten der Ratte. S9947 blockiert den Kv1.5-Kanal halbmaximal in der Konzentration 0.42 μ M, den I_{Kur} -Strom in humanen atrialen Kardiomyozyten in der Konzentration 0.07 μ M (Bachmann et al., 2001).

Neben dem Kv1.5-Kanal wird auch die α -Untereinheit Kv1.7 im Zusammenhang mit dem I_{Kur} -Strom diskutiert. Kv1.7 könnte als Homotetramer oder als Heterotetramer zusammen mit Kv1.5 einen Beitrag zu diesem Strom leisten (Bardien-Kruger et al., 2002).

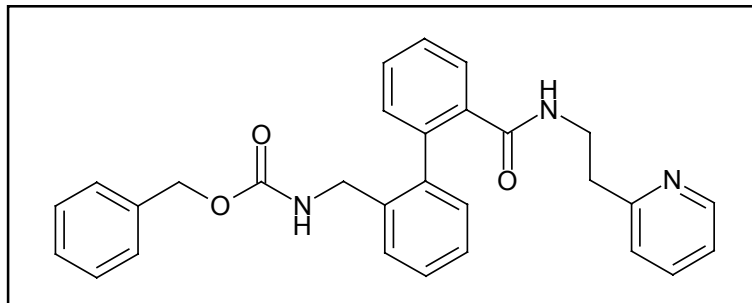


Abb. 1.4: Strukturformel des Kv1.5-Blockers S9947.

1.2.3 Der lymphozytäre Kaliumkanal Kv1.3 als potentieller Angriffspunkt neuartiger Immunsuppressiva

1.2.3.1 Vorkommen und Struktur des Kv1.3-Kanals

Die Kv1.3- α -Untereinheit findet sich nur in relativ wenigen Geweben bzw. Zell-Arten, hauptsächlich in T-Lymphozyten, daneben in Milz, Niere, Fibroblasten, B-Zellen, Makrophagen, Plättchen und neuronalem Gewebe (Grissmer et al., 1990; Slaughter et al., 1996). Die detektierten mRNA-Level außerhalb der T-Zellen sind gering, darüber hinaus bildet Kv1.3 dort zusammen mit anderen Kv1-Untereinheiten heterotetramere Kanäle mit veränderten elektrophysiologischen Eigenschaften im Vergleich mit dem homotetrameren Kv1.3-Kanal.

In Form eines Homotetramers liegt Kv1.3 nur in T-Zellen vor, deshalb können Modulatoren dieses Kanals selektiv die Funktion von T-Lymphozyten beeinflussen, ohne bedeutende Effekte auf andere Strukturen auszuüben.

Jede der Kv1.3- α -Untereinheiten besitzt eine Masse von etwa 64 kDa, die Gesamtmasse des lymphozytären Kanaltetramers beträgt 270 kDa; die Dimensionen des Kanals bemessen sich auf ungefähr 65 x 65 Å (Spencer et al., 1997). Der Pore ist auf der externen Seite eine 30 Å weite und 4-6 Å tiefe Öffnung (Vestibül) vorgelagert. Der eigentliche Poreneingang ist auf etwa 9 Å verengt, das Selektivitätsfilter auf 5 Å. Das Vestibül ist mit einem Ring aus jeweils vier alternierenden Histidin (404)- und Asparaginsäure (402)-Resten ausgekleidet (Aiyar et al., 1995 und 1996).

Einleitung

An der Membran steht der Kv1.3-Kanal in einem komplexen strukturellen Kontext (Abbildung 1.5). Interaktionen mit der Kv β 2.1-Untereinheit führen zu einer verstärkten Kv1.3-Expression an der Zelloberfläche, die Inaktivierung wird durch die β -Untereinheit jedoch nicht beeinflusst (McCormack et al., 1999).

Untersuchungen hinsichtlich einer Beteiligung von Ionenkanälen an apoptotischen Vorgängen in T-Lymphozyten zeigten ferner, dass durch Stimulation des Fas-Todesrezeptors der Kv1.3-Strom sinkt. Dies geschieht durch eine Tyrosinphosphorylierung der Kanäle, vermittelt durch die Kinase Lck (Szabò et al., 1996). Das Molekül hDlg aus der Familie der MAGUK (*membrane-associated guanylate kinases*)-Proteine fungiert dabei wahrscheinlich als Adaptermolekül, da der Kv1.3-Kanal offensichtlich keine direkte Bindungsstelle für Lck besitzt (Hanada et al., 1997). Bislang gibt es keine Erkenntnisse darüber, ob der phosphorylierte Kanal internalisiert wird oder nach einer Dephosphorylierung seine volle Funktionstüchtigkeit wiedererlangt.

Als weitere Bindeglieder können die Proteine ZIP (*PKC-zeta interacting protein*) 1 und 2 agieren, sie verbinden die Kv β 2-Untereinheit mit der Proteinkinase C (Gong et al., 1999).

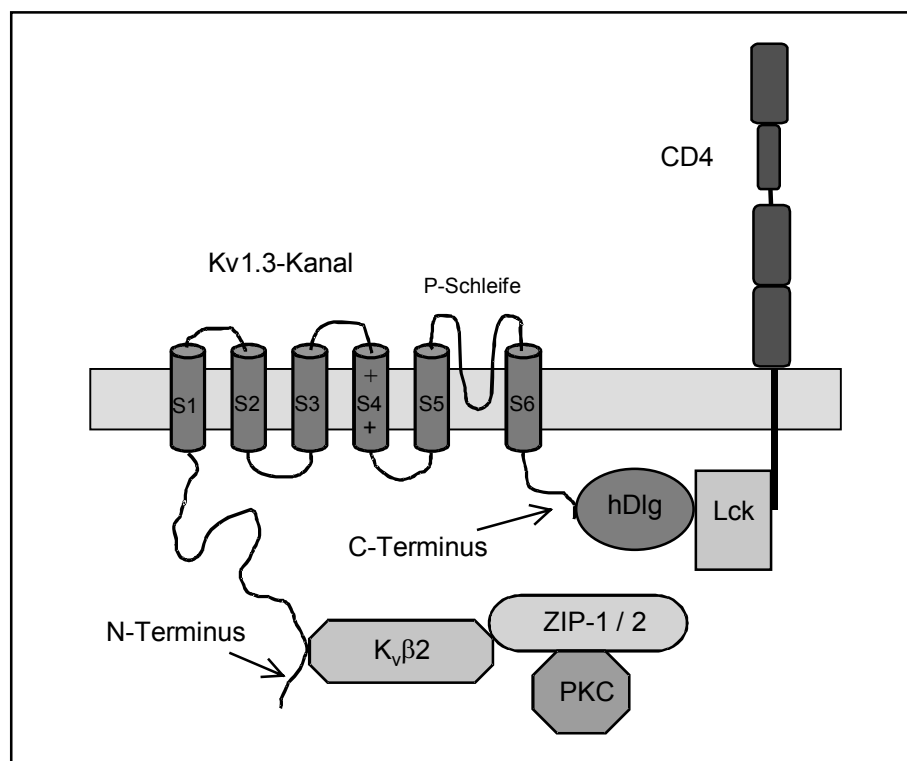


Abb. 1.5: Kv1.3 und assoziierte Strukturen (nach Cahalan et al., 2001).

1.2.3.2 Bedeutung lymphozytärer Kaliumkanäle

Erste Untersuchungen zur Funktion spannungsabhängiger Kaliumkanäle in T-Zellen erwiesen sich als Startsignal für die intensive Erforschung lymphozytärer Kaliumkanäle (Übersicht bei Cahalan et al., 2001). Diese frühen Studien zeigten, dass klassische Kaliumkanalblocker wie 4-Aminopyridin oder Tetraethylammonium neben der Blockade des Kv-Kaliumionenstroms auch eine Mitogen-induzierte $^3\text{[H]}$ -Thymidininkorporation unterdrücken (DeCoursey et al., 1984), welche ein Maß für die proliferative Leistung der T-Zellen ist. Da die Effekte einer Kanalblockade nur innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aktivierung der T-Lymphozyten auftraten und zu einer verminderten Interleukin-2-Produktion führten, wurde postuliert, dass Kaliumkanäle an der frühen Phase der T-Zell-Aktivierung beteiligt sein müssen (Chandy et al., 1984).

Die lymphozytären Kaliumkanäle wurden später als der homotetramere, spannungsabhängige Kv1.3-Kanal (Übersicht bei Slaughter et al., 1996) und der Calciumaktivierbare IKCa1 (*intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel*)-Kanal (Khanna et al., 1999) identifiziert, daneben existieren keine weiteren Kaliumkanäle auf humanen T-Lymphozyten.

Nach zahlreichen *in vitro*-Studien wurde Ende der 90er Jahre erstmals der Beweis erbracht, dass Kv1.3-Blocker tatsächlich *in vivo* eine immunsuppressive Wirkung besitzen. An Minischweinen gelang es, durch das Peptid Margatoxin aus dem Skorpion *Centruroides margaritatus* die Tuberkulinreaktion, eine verzögerte allergische Reaktion des Typs IVb, zu unterdrücken (Koo et al., 1997). Kurze Zeit später konnte dieses Ergebnis auch für potente niedermolekulare Blocker, das Norriterpen Correalide und analoge Verbindungen, bestätigt werden (Koo et al., 1999).

Jüngste Untersuchungen wurden von Beeton und Wulff an Ratten durchgeführt, bei denen eine experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) induziert wurde. Die EAE ist eine entzündliche und demyelinisierende Autoimmun-Erkrankung, sie gilt als Modell der Multiplen Sklerose. Die Tiere wurden entweder mit dem Peptid ShK aus der Seeanemone *Stichodactyla helianthus*, einem Blocker von sowohl Kv1.3 als auch IKCa1, dessen Kv1.3-selektivem Derivat ShK-DAP²², dem IKCa1-Blocker TRAM-34 oder einer Kombination aus ShK-DAP²² und TRAM-34 behandelt.

Mit Ausnahme des alleinigen Einsatzes von TRAM-34 konnten alle Therapieregime bei präventiver Gabe eine letale EAE verhindern. Eine therapeutische Anwendung von ShK oder der Kombination ShK-DAP²²/TRAM-34 nach Einsetzen der Symptome milderte den Verlauf der Erkrankung ebenfalls deutlich (Beeton und Wulff et al., 2001).

In dieser Studie ist die mangelnde Wirksamkeit des TRAM-34 in Abwesenheit eines Kv1.3-Blockers auf den Kanalbesatz der chronisch aktivierten Ratten-T-Zellen zurückzuführen, neben etwa 1500 Kv1.3-Kanälen lagen nur 50 bis 120 IKCa1-Kanäle vor. Im Stadium der akuten Aktivierung war das Mengenverhältnis der beiden Kaliumkanäle wesentlich ausgeglichener, so dass die Kv1.3-Blockade möglicherweise einen Ansatzpunkt für die Therapie von Autoimmunerkrankungen darstellt, die die normale Lymphozytenfunktion nicht wesentlich beeinträchtigt (Beeton und Wulff et al., 2001).

1.2.3.3 Mechanismus der immunsuppressiven Wirkung von Kv1.3-Blockern

Ein zentrales Ereignis während der Aktivierung von T-Lymphozyten ist die langfristige Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Eine hohe Ca^{2+} -Konzentration muss für ein bis zwei Stunden aufrechterhalten werden, um die Interleukin-2-Produktion sicherzustellen (Negulescu et al.; 1994). Die Blockade lymphozytärer Kaliumkanäle reduziert den Ca^{2+} -Einstrom von außen und unterbricht damit die Ca^{2+} -abhängigen Signaltransduktionswege. Diese Zusammenhänge sind in Abbildung 1.6 dargestellt und werden im Folgenden ausführlicher erläutert (Übersichten bei Lewis und Cahalan, 1995; Slaughter et al., 1996; Cahalan und Chandy, 1997; Cahalan et al., 2001).

Im Ruhezustand liegt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bei ungefähr 100 nM (Grinstein und Dixon, 1989), sowohl CRAC- als auch IKCa1-Kanäle sind geschlossen. Das Membranpotential beträgt etwa -50 mV und wird über die Kv1.3-Kanäle aufrechterhalten (Defarias et al., 1995). Die T-Zell-Aktivierung wird durch Bindung von MHC-gebundenem Antigen an den T-Zell-Rezeptor initiiert. Entstehendes Inositoltriphosphat (IP_3) bewirkt eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern, wodurch wiederum der Einstrom von extrazellulärem Calcium durch CRAC-Kanäle getriggert wird. Sobald die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration 200 bis 300 nM erreicht, beginnen die IKCa1-Kanäle zu öffnen. Die Aktivierung der Kanäle wird dabei über das Ca^{2+} -bindende Protein Calmodulin vermittelt, das fest an jede der vier Kanaluntereinheiten assoziiert ist (Fanger et al., 1999). Der K^+ -Ausstrom hyperpolarisiert die Membran auf bis zu -80 mV und erhöht bzw. unterhält dadurch den Ca^{2+} -Einstrom durch die CRAC-Kanäle (Grissmer et al., 1993).

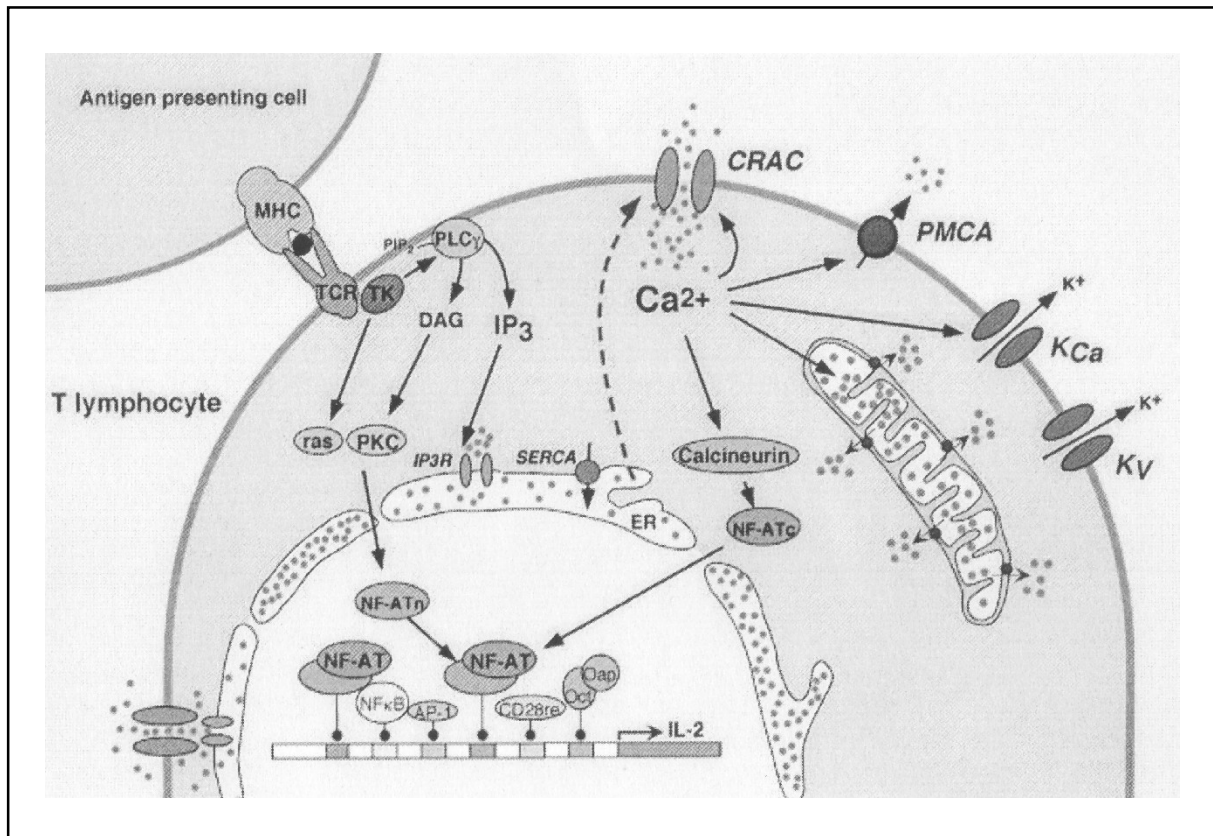


Abb. 1.6: Überblick über die Calcium-Signaltransduktionswege in T-Lymphozyten (aus Lewis, 2001). CRAC: Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel; K_{Ca} : Ca^{2+} -aktivierbarer Kaliumkanal (IKCa1); K_V : spannungsabhängiger Kaliumkanal (Kv1.3); PMCA: plasma membran Ca^{2+} -ATPase; SERCA: sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase; weitere Abkürzungen siehe Kapitel 1.1.2.

Humane T-Lymphozyten exprimieren im Ruhezustand etwa 300 bis 400 Kv1.3-Kanäle und 8 IKCa1-Kanäle, nach Aktivierung steigt die Zahl auf ca. 600 respektive 300 bis 800 (DeCoursey et al., 1984; Deutsch et al., 1986; Ghanshani et al., 2000). Die Anzahl der CRAC-Kanäle wird bei Aktivierung von 15 um den Faktor 10 auf etwa 140 hochreguliert (Fomina et al., 2000).

Aus diesen Daten ist abzuleiten, dass Kv1.3-Kanäle für die initiale Phase der Immunantwort wichtig sind und IKCa1-Kanäle für die Aufrechterhaltung des akuten Aktivierungsprozesses. Untersuchungen bestätigen diese Theorie: Kv1.3-Blocker unterdrücken in ruhenden Zellen die Mitogen-stimulierte Zellproliferation, sind in prä-aktivierten Zellen aber ohne Einfluss; umgekehrtes gilt für die IKCa1-Blockade (Ghanshani et al., 2000).

Die molekulare Identität des CRAC-Kanals ist ebenso wenig aufgeklärt wie der Mechanismus seiner Aktivierung. Der Kanal öffnet zwar nach IP_3 -induzierter Ca^{2+} -Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum, ist aber nicht direkt IP_3 - oder

Ca²⁺-abhängig. Hierzu werden drei Theorien diskutiert, von denen jedoch keine den Aktivierungsmechanismus vollständig erklären kann (Übersicht bei Lewis, 2001).

Das erste Modell beschreibt einen löslichen Botenstoff (CIF: *calcium influx factor*), der bei der Speicherentleerung freigesetzt werden und zur Zellmembran diffundieren soll. Als zweite Möglichkeit wird der Einbau fertig vorhandener Kanäle in die Zellmembran (*depletion-activated insertion*) in Betracht gezogen. Die dritte Überlegung favorisiert das Vorliegen einer direkten physikalischen Kopplung (*conformational coupling*). Demnach soll eine Konformationsänderung des IP₃-Rezeptors am ER zur Öffnung der CRAC-Kanäle führen.

Mitochondrien besitzen im Zusammenhang mit der Aktivität des CRAC-Kanals offenbar als Calcium-Puffer eine Bedeutung. Sie nehmen Ca²⁺-Ionen auf und sorgen damit für eine Umverteilung des Calciums. Konzentrations-Spitzen werden reduziert und die Rückkehr der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration zum Grundniveau wird verlängert (Hoth et al., 1997 und 2000).

1.2.3.4 Bekannte Blocker des Kv1.3-Kanals

Die Suche nach potenten und selektiven Blockern der lymphozytären Kaliumkanäle führte zunächst zu peptidischen Strukturen. Aus verschiedenen Skorpiongiften wurden unter anderen die Verbindungen Charybdotoxin, Margatoxin und Kaliotoxin isoliert, die den Kaliumionenstrom zwar sehr effektiv im pico- bis nanomolaren Konzentrationsbereich blockieren, aber keine Selektivität für einzelne Kaliumkanäle besitzen. Erst ausgehend von dem Toxin ShK aus der Seeanemone *Stichodactyla helianthus* konnte mit der Mutante ShK-Dap²² der erste potente und hochselektive Kv1.3-Blocker entwickelt werden. Die Mutante wurde durch Austausch einer Aminosäure erzeugt, sie blockiert den Kv1.3-Strom halbmaximal mit der Konzentration 23 pM (Kalman et al., 1998).

Die ersten niedermolekularen Kv1.3-Blocker (Abbildung 1.7) wurden mithilfe umfangreicher Screening-Untersuchungen entdeckt. Mitte der 90er Jahre wurden zwei Dihydrochinolin-Derivate beschrieben, WIN 17317-3 (Hill et al., 1995) und CP-339,818 (Nguyen et al., 1996). Beide blockieren den Kv1.3-Kanal mit vergleichbaren EC₅₀-Werten (EC₅₀ = halbmaximal inhibitorische Substanzkonzentration) von 335 nM bzw. 230 nM. Allerdings sind die Substanzen nicht selektiv, WIN 17317-3 ist ein hochpotenter Natriumkanal-Blocker (Wanner et al., 1999), CP-339,818 hemmt den Kv1.4-Kanal mit einer EC₅₀ von 300 nM ähnlich stark wie Kv1.3 (Nguyen et al., 1996). Ähnliches gilt für die Piperidin-Struktur UK-78,282, sie inhibiert die Ströme

durch Kv1.3 bzw. Kv1.4 mit EC_{50} -Werten von 280 nM bzw. 170 nM (Hanson et al., 1999).

Das bereits erwähnte pentazyklische Norriterpen Correolide aus dem Baum *Spachea correae* besitzt an Kv1.3 eine EC_{50} von 86 nM und eine immerhin 4- bis 14fache Selektivität gegenüber den anderen Kanälen der *Shaker*-Familie (Felix et al., 1999), in Minischweinen verursacht es jedoch eine Hyperaktivität (Koo et al., 1999).

Als neue hochwirksame Kv1.3-Inhibitoren wurden kürzlich disubstituierte Cyclohexanone publiziert, die Verbindung PAC blockt Kv1.3 mit einer EC_{50} von 310 nM, ein PAC-Derivat sogar mit 29 nM (Schmalhofer et al., 2002). Diese Werte unterschätzen die tatsächliche Wirksamkeit wahrscheinlich, da sie vor Einstellung eines Blockadegleichgewichts ermittelt wurden. Ein Nachteil zumindest des PAC ist die mangelnde Selektivität gegenüber weiteren Kv1-Kanälen, Kv1.1, Kv1.2, Kv1.5 und Kv1.6 werden im gleichen Konzentrationsbereich wie Kv1.3 blockiert.

Zwei weitere Substanzklassen mit inhibitorischer Wirkung an Kv1.3 wurden in Patenten niedergelegt, zum einen Phenyloxoazapropylcycloalkane (Baker et al., 2000) und zum anderen Sulfimidbenzamidindan ($EC_{50} = 100$ nM) und verwandte Verbindungen (Castle et al., 2000), beide hemmen jedoch auch den Kv1.5-Strom.

Das Triarylmethanderivat TRAM-34 steht als potenter ($EC_{50} = 20$ nM) und hochselektiver Blocker des IKCa1-Kanals zur Verfügung. Diese Verbindung wurde ausgehend von Clotrimazol entwickelt, besitzt aber nicht dessen inhibitorischen Effekt auf Cytochrom-P450-Enzyme, der hauptverantwortlich für die Nebenwirkungen des Clotrimazols ist (Wulff et al., 2000).

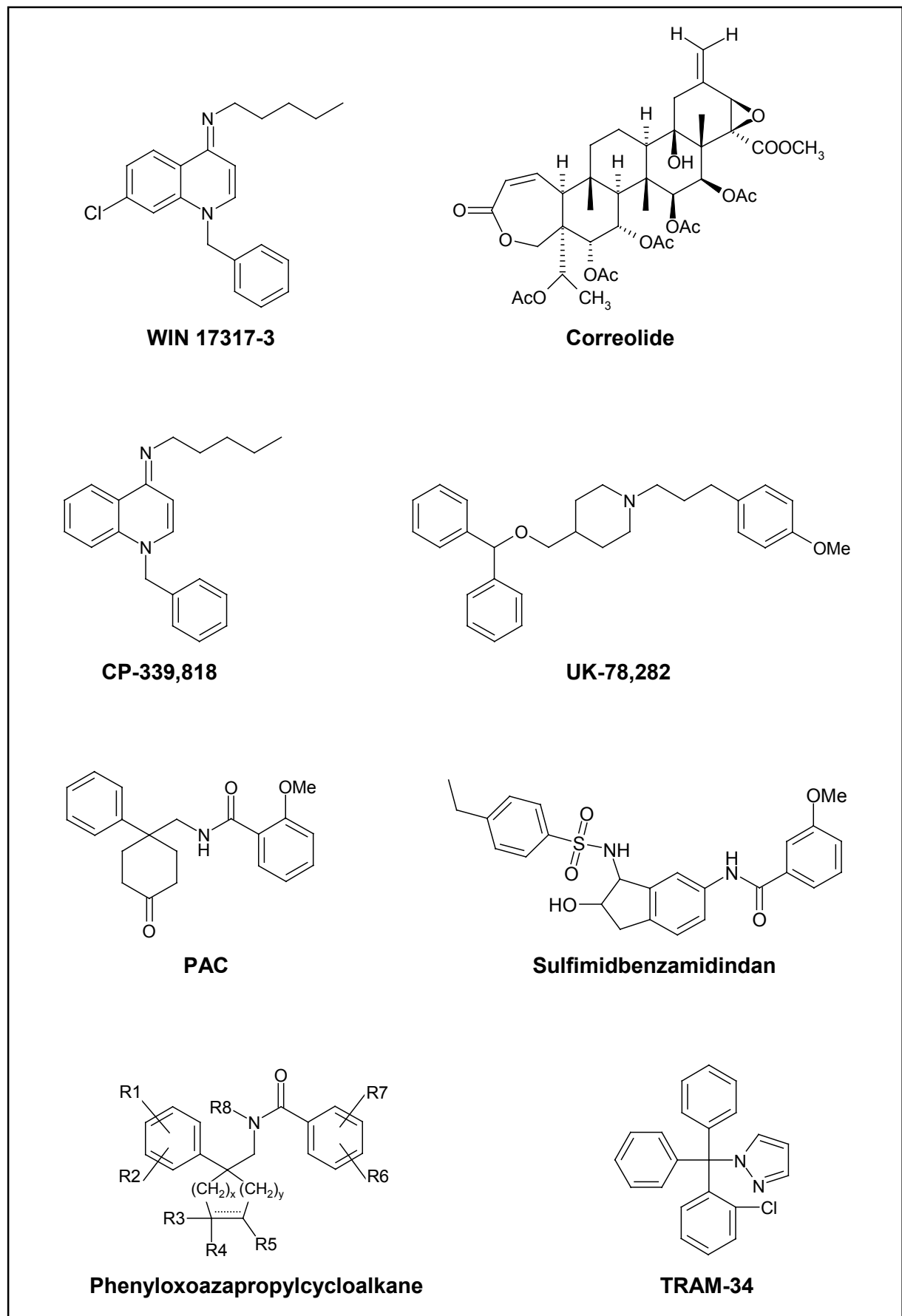


Abb. 1.7: Strukturformeln niedermolekularer Kv1.3- und IKCa1-Blocker (Übersicht bei Chandy et al., 2001).

1.3 Psoralene als Kaliumkanalblocker – Von Extrakten aus *Ruta graveolens* zu wirksamen Einzelverbindungen

Wässrige Auszüge der Gartenraute *Ruta graveolens* wurden Ende der 80er Jahre erstmals im Hinblick auf ihre Ionenstrom-modulierende Wirkung untersucht (Bautz et al., 1989), Anlass dazu gaben mündliche Berichte aus Südamerika über eine günstige Wirkung von *Ruta*-Tee bei der Multiplen Sklerose (MS).

Am Ranvierschen Schnürring lebender, myelinisierter Nervenfasern des Frosches *Xenopus laevis* wurde tatsächlich eine deutliche Blockade der Kaliumkanäle festgestellt, Natriumkanäle wurden hingegen wesentlich schwächer beeinflusst. Im Rahmen von Einzelfall-Beobachtungen wurde darüber hinaus ein günstiger Effekt von *Ruta*-Tee auf die Symptomatik von MS-bedingten visuellen Funktionsausfällen beobachtet (Bohuslavizki et al., 1993a). In der Folge wurde eine systematische Suche nach den dem wirksamen Prinzip zugrunde liegenden Inhaltsstoffen begonnen.

5-Methoxypsoralen (Bergapten, Abbildung 1.8) erwies sich als vielversprechende Substanz, sie vereinigte eine gute Wirksamkeit an Kaliumkanälen mit einer großen Selektivität gegenüber dem Natriumionenstrom (Bohuslavizki et al., 1993b). Als Psoralenderivat besitzt Bergapten jedoch phototoxisches und photomutagenes Potential aufgrund des Vermögens, nach UV-A-Bestrahlung einerseits Photoaddukte mit Makromolekülen wie DNA und Proteinen zu bilden und andererseits Singulett-Sauerstoff zu produzieren (Übersicht bei Averbek, 1989). Dieser schwerwiegende Nachteil macht einen langfristigen Einsatz, wie er bei chronischen Erkrankungen nötig wäre, unmöglich.

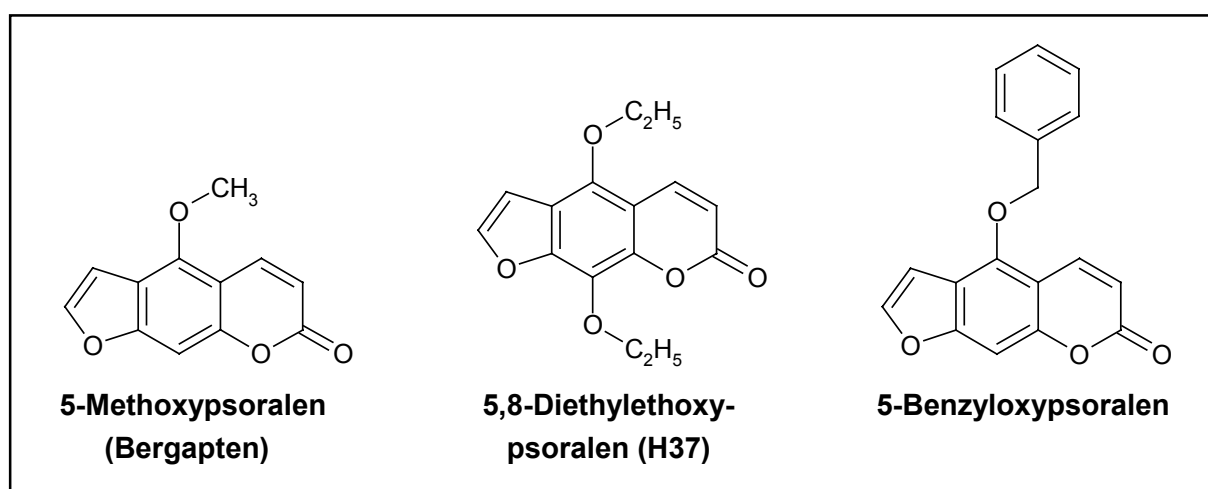


Abb. 1.8: Strukturformeln der untersuchten Psoralenderivate.

Durch synthetische Abwandlung gelang es, ein Psoralenderivat, 5,8-Diethoxyypsoralen (H37, Abbildung 1.8), zu entwickeln, bei dem die Kaliumkanal-blockierende von der phototoxischen Wirkung getrennt werden konnte. H37 inhibiert mit nahezu identischer Potenz die Kaliumkanäle Kv1.2 und Kv1.3 (23 bzw. 28 μM) und zeigt nach UV-A-Bestrahlung keine oder nur geringe Effekte auf das DNA-Phasenübergangsverhalten, die Singulett-Sauerstoff-Produktion und in einem *in vitro*-Phototoxizitätstest an *Artemia salina*-Flusskrebsschnecken (Wulff et al., 1998). Das DNA-Phasenübergangsverhalten wird mittels eines Temperaturgradienten bestimmt. Die Temperatur des Phasenübergangs ändert sich in dem Maße, wie die Testsubstanz kovalent an die DNA gebunden ist.

Funktionelle *in vitro*-Studien wurden an T-Lymphozyten von Ratten mit induzierter EAE durchgeführt. In diesem Modell unterdrückte H37 sowohl die Zell-Proliferation als auch die Interferon- γ -Produktion (Strauss et al., 2000).

Ein weiteres Psoralenderivat, 5-Benzoyloxyypsoralen (Abbildung 1.8), wurde im Rahmen der Dissertationen von Sanmann und Herzog untersucht (Sanmann, 1995; Herzog, 2000). Bereits am Froschaxon besaß die Verbindung die beste Wirksamkeit aller untersuchten Cumarine, Benzofurane und Furocumarine (Sanmann, 1995). Weiterführende Testungen zeigten anschließend eine außerordentlich potente Blockadewirkung am Kv1.3-Kanal ($\text{EC}_{50} = 270 \text{ nM}$) mit guter Selektivität gegenüber Natrium-, Kv1.2- und Kv3.1-Kanälen. In Studien an humanen T-Lymphozyten konnte die Zellproliferation nach Stimulation außerdem in nahezu ähnlichem Maß wie durch die Vergleichssubstanz Correolide unterdrückt werden (Herzog, 2000).

Ermutigende Ergebnisse lieferten auch Untersuchungen zur Phototoxizität. 5-Benzoyloxyypsoralen induziert weder die Singulett-Sauerstoff-Bildung in nennenswerter Weise, noch zeigt es phototoxische Effekte im *Artemia salina*-Test. Ein Effekt auf das DNA-Phasenübergangsverhalten ist zwar vorhanden, aber deutlich geringer ausgeprägt als beim Bergapten (Herzog, 2000; Wulff, 1998).

1.4 Chirale Verbindungen als pharmakologisch wirksame Agenzien

1.4.1 Allgemeines

Die Stereoisomerie beschreibt Verbindungen mit gleicher Summenformel, deren Atome in gleicher Folge verknüpft sind; lediglich die räumliche Anordnung der Atome unterscheidet sich. Bei Enantiomeren handelt es sich um chirale stereoisomere Strukturen, d. h. sie verhalten sich wie Bild und Spiegelbild, sind also nicht deckungsgleich. Dieses Phänomen kann in Biologie und Pharmakologie von großer Bedeutung sein, denn die kleinsten Bausteine vieler Biomoleküle wie Proteine und Nucleinsäuren sind die natürlicherweise fast ausschließlich vorkommenden L-Aminosäuren und Zucker der D-Reihe. In dieser chiralen Umgebung können pharmakokinetische und –dynamische Prozesse bei enantiomeren Arzneistoffen in unterschiedlicher Art und Weise oder mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ablaufen.

Easson und Stedman postulierten 1933, dass enantiomere Wirkstoffe dann unterschiedliche Aktivitäten aufweisen, wenn drei der Substituenten des chiralen Zentrums an der Rezeptor-Bindung beteiligt sind (Abbildung 1.9, Easson und Stedman, 1933). Dieses Dreipunkt-Interaktionsmodell, das lediglich Vorgänge an mehr oder weniger flachen Oberflächen beschreiben kann, wurde in jüngster Zeit von Mesecar und Koshland erweitert. Sie fanden, dass Wechselwirkungen über vier Punkte für stereospezifische Effekte verantwortlich sind, wenn sich die Bindungsstellen z. B. in Protein-Taschen oder –spalten befinden (Mesecar und Koshland, 2000).

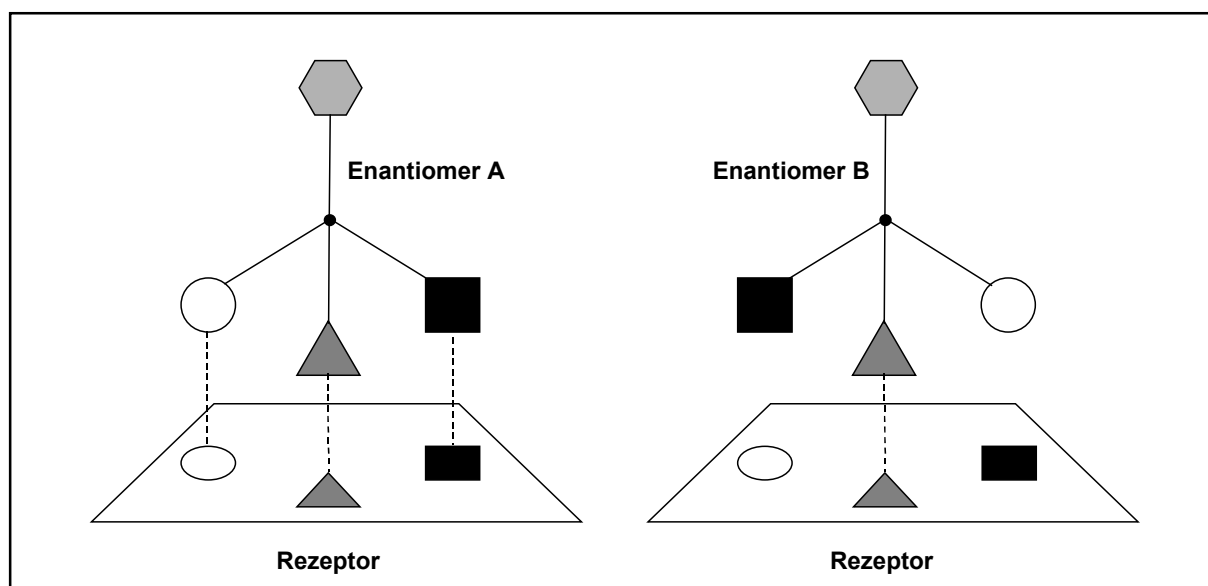


Abb. 1.9: Dreipunkt-Interaktionsmodell für Enantiomere nach Easson und Stedman.

Die Pharmakokinetik beschreibt den Einfluss des Organismus auf den Arzneistoff und umfasst die vier Prozesse Absorption, Verteilung, Metabolismus und Eliminierung. Unter Pharmakodynamik wird die Wirkung des Pharmakons auf den Organismus verstanden, im Hinblick auf chirale Substanzen können dabei im Wesentlichen zwei Grenzfälle unterschieden werden. Zum einen können beide Enantiomere gleiche pharmakodynamische Eigenschaften bei lediglich unterschiedlicher Wirkstärke besitzen, sie können andererseits jedoch auch qualitativ verschiedene, sogar gegensätzliche Effekte auf den Organismus haben. Weiterhin kann ein Enantiomer alle pharmakodynamischen Effekte in sich vereinen, während das andere Isomer biologisch inaktiv ist. Diese dritte Möglichkeit ist allerdings eher als hypothetisch zu bewerten.

In der Arzneistoffentwicklung rückte die Bedeutung der Chiralität seit den frühen 60er Jahren immer mehr in den Blickpunkt des Interesses, nicht zuletzt aufgrund der Erkenntnisse aus der Contergan[®]-Katastrophe. 1961 wurde das Schlafmittel wegen seines erheblichen teratogenen Potentials vom Markt genommen, verantwortlich für die Fruchtschädigung war vermutlich nur ein Enantiomer des racemisch vorliegenden Inhaltsstoffes Thalidomid (Übersicht bei Mujagić et al., 2002).

Erst im Jahr 1987 forderte die japanische Arzneimittelzulassungsbehörde als erste eine komplette pharmakologische und toxikologische Untersuchung beider Enantiomere neuer racemischer Wirkstoffe. Die Europäische Union und die nordischen Länder folgten mit Richtlinien (Übersicht bei Tomaszewski und Rumore, 1994). Die Arzneimittelzulassungsbehörde der USA (FDA, *Food and Drug Administration*) veröffentlichte 1992 eine Erklärung bezüglich der Entwicklung neuer stereoisomerer Arzneistoffe (FDA, 1992). Mittlerweile steht die ICH (*International Conference on Harmonisation*)-Guideline Q6A (*Q6A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances*) als internationale Richtlinie zur Verfügung (FDA, 1997).

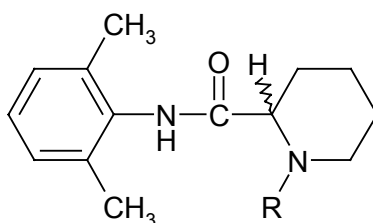
In den vergangenen Jahren ist der Anteil enantiomerenreiner Arzneistoffe stetig gewachsen, in den Jahren 1998/99 kamen etwa 55 % der in den USA neu zugelassenen Arzneistoffe in enantiomerenreiner Form auf den Markt und nur noch 10 % in Form von Racematen; der Anteil der achiralen Arzneistoffe betrug 35 % (Miller, 1999).

1.4.2 Stereoselektive Blocker von Kaliumkanälen

1.4.2.1 Lokalanästhetika vom Amid-Typ

Aus der Wirkstoffklasse der Lokalanästhetika existiert mit Mepivacain, Ropivacain, Bupivacain und IQB-9302 eine Gruppe von chiralen, strukturell eng verwandten Verbindungen. Ihren anästhesierenden Effekt erzielen die Substanzen über eine Blockade von Natriumkanälen, als unerwünschte Begleiterscheinung kann eine Kardiotoxizität auftreten, für die zumindest teilweise eine Hemmung von kardialen Kaliumkanälen verantwortlich gemacht wird. Aus diesem Grund wurden die Verbindungen am Kv1.5-Kanal untersucht (Valenzuela et al., 1995; Longobardo et al., 1998; González et al., 2001). Die Ergebnisse belegen beispielhaft, wie unterschiedlich sich eine vorhandene Chiralität in physiologischer Umgebung auswirken kann (Tabelle 1.1).

Es ist zu erkennen, dass beide Enantiomere des Mepivacains an Kv1.5 annähernd gleich wirken. Mit zunehmender Länge der Seitenkette am Stickstoff nimmt jedoch nicht nur die Blockadepotenz zu, es kommt auch zu einer deutlich stereoselektiven Interaktion mit dem Kaliumkanal. So besitzt das (*R*)-Enantiomer des Bupivacains eine um den Faktor sieben kleinere EC_{50} als das (*S*)-Enantiomer, welches im Übrigen auch eine geringere Kardiotoxizität aufweist. Das neue Derivat IQB-9302 mit einer kürzeren Cyclopropylmethylfunktion als dem n-Butylrest ist in seinen Eigenschaften dem Ropivacain am ähnlichsten.



	Mepivacain	Ropivacain	Bupivacain	IQB-9302
R =	-CH ₃	-C ₃ H ₇	-C ₄ H ₉	-CH ₂ C ₃ H ₅
EC₅₀ (<i>R</i>)-Enantiomer	379 μM	32 μM	4 μM	18 μM
EC₅₀ (<i>S</i>)-Enantiomer	287 μM	81 μM	27 μM	59 μM
EC₅₀ (<i>R</i>)/EC₅₀ (<i>S</i>)	0.75	2.5	6.8	3.3

Tab. 1.1: Strukturen der Lokalanästhetika Mepivacain, Ropivacain, Bupivacain und IQB-9302 und Daten zur Kv1.5-Blockade.

1.4.2.2 *cis/trans*-Cyclohexan-Isomere

Ein zweites Beispiel für Stereoisomere, die verschiedene Eigenschaften an Kv1-Kanälen besitzen, sind Derivate der schon erwähnten Substanz PAC (Kapitel 1.2.3.4, Seite 23), die nach Reduktion der Cyclohexanonfunktion hergestellt wurden (Schmalhofer et al., 2002). Es handelt sich dabei um *cis*- und *trans*-N-Carbamoyloxy-substituierte Verbindungen (Abbildung 1.10).

Für alle Substanzen wurde der $^{86}\text{Rb}^+$ -Efflux am Kv1.3-Kanal untersucht. Dieses Testsystem stellt eine nicht-elektrophysiologische *Screening*-Methode dar, bei welcher der $^{86}\text{Rb}^+$ -Ionen-Efflux ein Maß für den K^+ -Ionen-Ausstrom ist. Die Abnahme der gemessenen Radioaktivität ist damit proportional zur Blockade des Kv1.3-Kanals.

Die *cis*-Derivate inhibieren den $^{86}\text{Rb}^+$ -Efflux durch den Kv1.3-Kanal im gleichen Konzentrationsbereich, die EC_{50} -Werte bewegen sich zwischen 95 und 205 nM. Die Natur des Substituenten hat damit keinen wesentlichen Einfluss auf die Wirksamkeit. Im Gegensatz dazu hemmen die *trans*-Derivate den $^{86}\text{Rb}^+$ -Efflux in Abhängigkeit von ihrer N-Carbamoyloxy-Substitution. Die halbmaximal wirksamen Konzentrationen reichen von 50 nM bis weit in den μM -Bereich hinein. In Abbildung 1.10 sind die EC_{50} -Werte ausgewählter Beispiele angegeben.

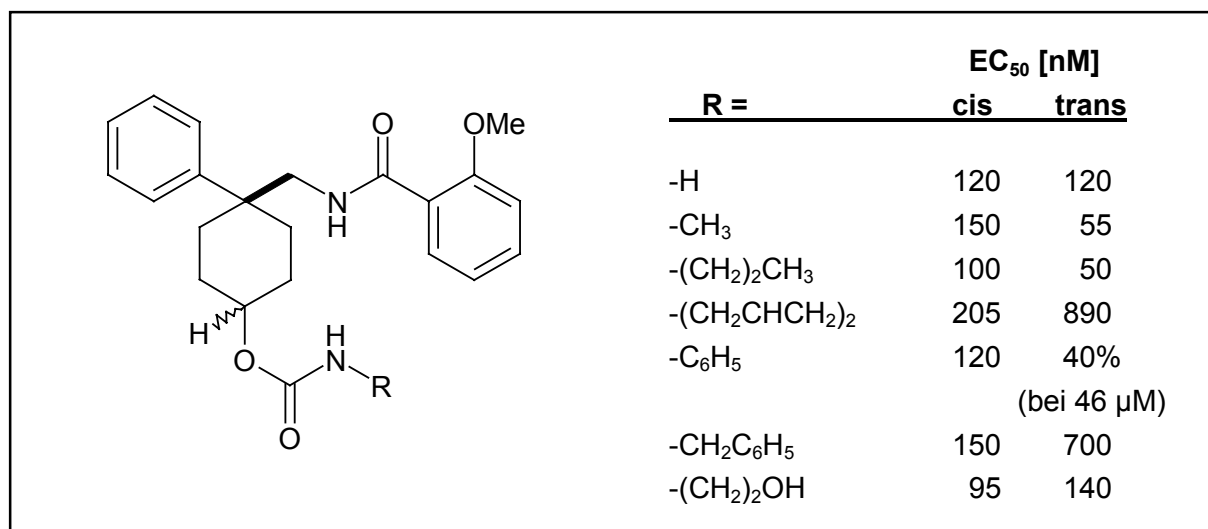


Abb. 1.10: Strukturen einiger vom PAC abgeleiteter *cis/trans*-Isomere und Angabe ihrer EC_{50} -Werte im $^{86}\text{Rb}^+$ -Efflux (aus Schmalhofer et al., 2002).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass nur die *trans*-Verbindungen eine höhere Affinität zu Kv1.3 und Kv1.4 im Vergleich mit anderen Kv1-Kanälen aufweisen, verantwortlich ist dafür offenbar die Fähigkeit dieser beiden Kanäle, einer C-Typ-Inaktivierung zu unterliegen. Die *cis*-Isomere besitzen keine stereoselektive Affinität zu einzelnen Kanälen innerhalb der Kv1-Familie.

2 Zielsetzung

Die Blockade des lymphozytären Kaliumkanals Kv1.3 gilt als vielversprechendes Wirkprinzip neuartiger Immunsuppressiva (Cahalan und Chandy, 1997). Die Entwicklung von Inhibitoren dieses Kanals soll zum einen zu einem besseren Verständnis der Interaktionen zwischen dem Kanal und seinen Modulatoren führen und zum anderen weiterführende *in vitro*- und *in vivo*-Studien ermöglichen, um das tatsächliche therapeutische Potential der Kv1.3-Blockade abzuklären.

Verschiedene nicht-peptidische Hemmstoffe des Kv1.3-Kanals werden in der Literatur beschrieben (Übersicht bei Chandy et al., 2001). Sie alle weisen jedoch Defizite entweder in Stärke oder Selektivität ihrer Wirkung auf und können somit nicht die Anforderungen erfüllen, die an potentielle neue Wirkstoffe gestellt werden.

Verbindungen aus der Gruppe der Psoralene werden seit einigen Jahren in Bezug auf ihre Kaliumkanal-blockierende Wirkung untersucht. Einblicke in deren Struktur-Wirkungs-Beziehungen konnten dadurch bereits gewonnen werden (Sanmann, 1995; Wulff, 1998; Herzog, 2000).

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht zunächst die Frage nach möglichen stereoselektiven Wechselwirkungen chiraler Psoralenderivate mit dem Kv1.3-Kanal. Es soll geklärt werden, ob mithilfe reiner Enantiomere möglicherweise wirksamere und selektivere Inhibitoren erhalten werden können. Enantiomerenreine Psoralene sollen zu diesem Zweck durch eine stereoselektive Synthese dargestellt, analytisch charakterisiert und abschließend mithilfe der *patch-clamp*-Technik elektrophysiologisch untersucht werden.

Die Untersuchung achiraler Psoralenderivate bildet den zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit. Diese Strukturen sollen parallel neben den chiralen Derivaten zur Darstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen synthetisiert werden.

Die wirksamsten Verbindungen sollen im Rahmen der gegebenen Möglichkeiten umfassend beschrieben werden. Sie sollen zur Ermittlung ihrer Selektivität neben Kv1.3 an verschiedenen anderen Ionenkanälen elektrophysiologisch getestet und darüber hinaus in funktionellen Studien an humanen Lymphozyten untersucht werden. Außerdem sollen Vorschläge zum Blockademechanismus der neuen Psoralenderivate entwickelt werden.

3 Synthese

3.1 Nomenklatur des Furocumarin-Grundkörpers

Die Bezifferung des Psoralengerüsts erfolgt in der Literatur sehr uneinheitlich. Wie zuvor in den Dissertationen von Wulff und Herzog (Wulff, 1998, ausführliche Diskussion; Herzog, 2000), wird im Folgenden die Nomenklatur verwendet, die überwiegend in der biochemisch-medizinischen Literatur zum Gebrauch kommt. Dabei wird der Cumarinbicyklus in üblicher Weise beziffert und der Furanring als annelierter Ring betrachtet (Abbildung 3.1).

Die vollständigen IUPAC-Bezeichnungen aller Verbindungen sind im experimentellen Teil angegeben.

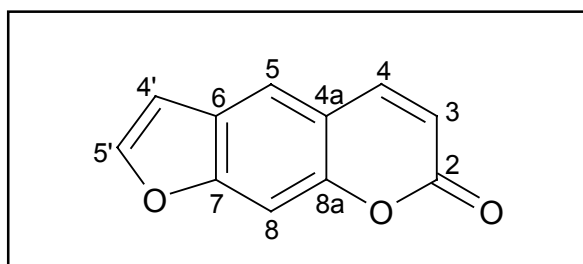


Abb. 3.1: Bezifferung des Psoralengerüsts.

3.2 Synthese der Psoralenderivate

3.2.1 Allgemeiner Syntheseweg

Die Synthese der in der vorliegenden Arbeit untersuchten 5-O-substituierten Bergapolderivate bzw. eines 8-O-substituierten Xanthotoxolderivates erfolgte in zwei Stufen.

Zunächst wurden die Methoxypsoralene Bergapten bzw. Xanthotoxin nach der Methode von Schönberg und Aziz in absolutem Ether unter Zusatz von Magnesium und Iod zu Bergaptol bzw. Xanthotoxol demethyliert (Schönberg und Aziz, 1955). Der Mechanismus dieser Reaktion wurde bereits im Jahre 1944 beschrieben (Schönberg und Moubasher, 1944).

Eine Variante der Williamson-Ethersynthese führte im zweiten Schritt durch Alkylierung der phenolischen Hydroxylgruppe zu den gewünschten Produkten. Unter Stickstoffatmosphäre wurden hierbei Bergaptol bzw. Xanthotoxol in Aceton in Gegenwart von Kaliumcarbonat mit Alkylhalogeniden umgesetzt.

Das Syntheschema ist in Abbildung 3.2 beispielhaft für die Bergaptolderivate angegeben, die genauen Reaktionsbedingungen aller Synthesen werden im experimentellen Teil beschrieben.

Eine Auflistung aller dargestellten Verbindungen einschließlich der zugewiesenen Nummerierung ist in Kapitel 3.3 in tabellarischer Form angefügt.

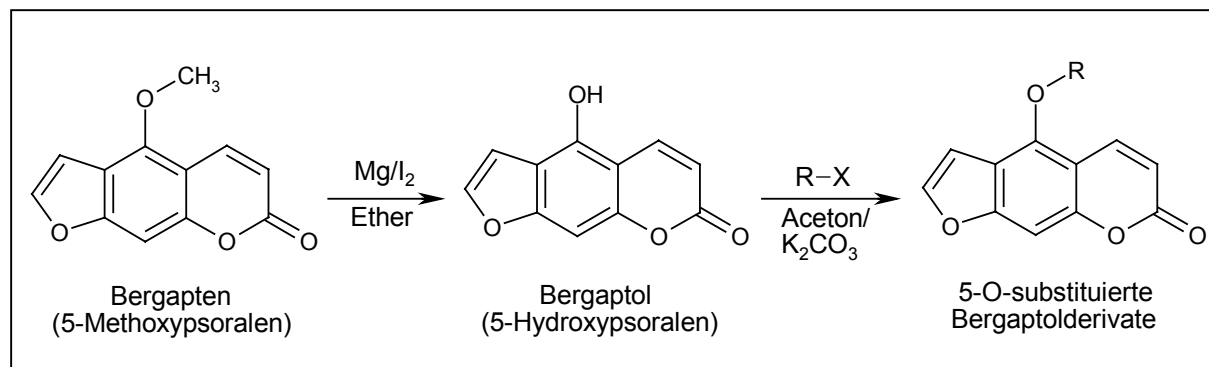


Abb. 3.2: Syntheschema der Darstellung von 5-O-alkylierten Bergaptolderivaten.

Die Substanz (*RS*)-5-(2-Hydroxy-2-phenylethoxy)psoralen (**6**) wurde abweichend nicht durch eine Alkylierung von Bergaptol erhalten, sondern mithilfe des komplexen Metallhydrids Natriumborant auf reduktivem Weg aus der Verbindung 5-Phenacyloxy-psoralen (**5**).

Eine disubstituierte Verbindung, 5,8-Dibenzoyloxy-psoralen (**20**), wurde analog zu 5,8-Diethoxy-psoralen (Wulff, 1998) hergestellt und bereits im Rahmen der Dissertation von Herzog elektrophysiologisch untersucht (Herzog, 2000). In dieser Arbeit wird daher nicht weiter auf die Substanz eingegangen.

3.2.2 (*RS*)-5-(2-Hydroxy-1-phenylethoxy)psoralen als Nebenprodukt der Synthese von (*S*)- bzw. (*R*)-5-(2-Hydroxy-2-phenylethoxy)psoralen

Die Verbindungen (*R*)- und (*S*)-5-(2-Hydroxy-2-phenylethoxy)psoralen (**R-6** und **S-6**) sollten mithilfe der enantiomerenrein erhältlichen Alkylierungsreagenzien (*R*)-(+)- bzw. (*S*)-(-)-2-Chlor-1-phenylethanol dargestellt werden. Die gewünschten Derivate wurden bei den Umsetzungen jedoch nur in geringen Ausbeuten erhalten, während als Hauptprodukt eine weitere Substanz gleichen Molekulargewichts anfiel, die säulenchromatographisch abgetrennt werden konnte. Spektroskopische und chromatographische Untersuchungen zeigten, dass es sich bei dieser Verbindung um ein racemisches Gemisch aus (*R*)- und (*S*)-5-(2-Hydroxy-1-phenylethoxy)psoralen (**7**) handelte (siehe Kapitel 4).

Vermutlich fand an den eingesetzten Alkylierungsreagenzien teilweise eine Reaktion im Sinne einer aliphatischen nukleophilen Substitution statt, die durch Abspaltung von Chlorwasserstoff zu 2-Phenyloxiran führte, welches sich als sehr reaktionsfähige Verbindung in einer Additionsreaktion ebenfalls mit Bergaptol unter Etherbildung umsetzen konnte (Abbildung 3.3).

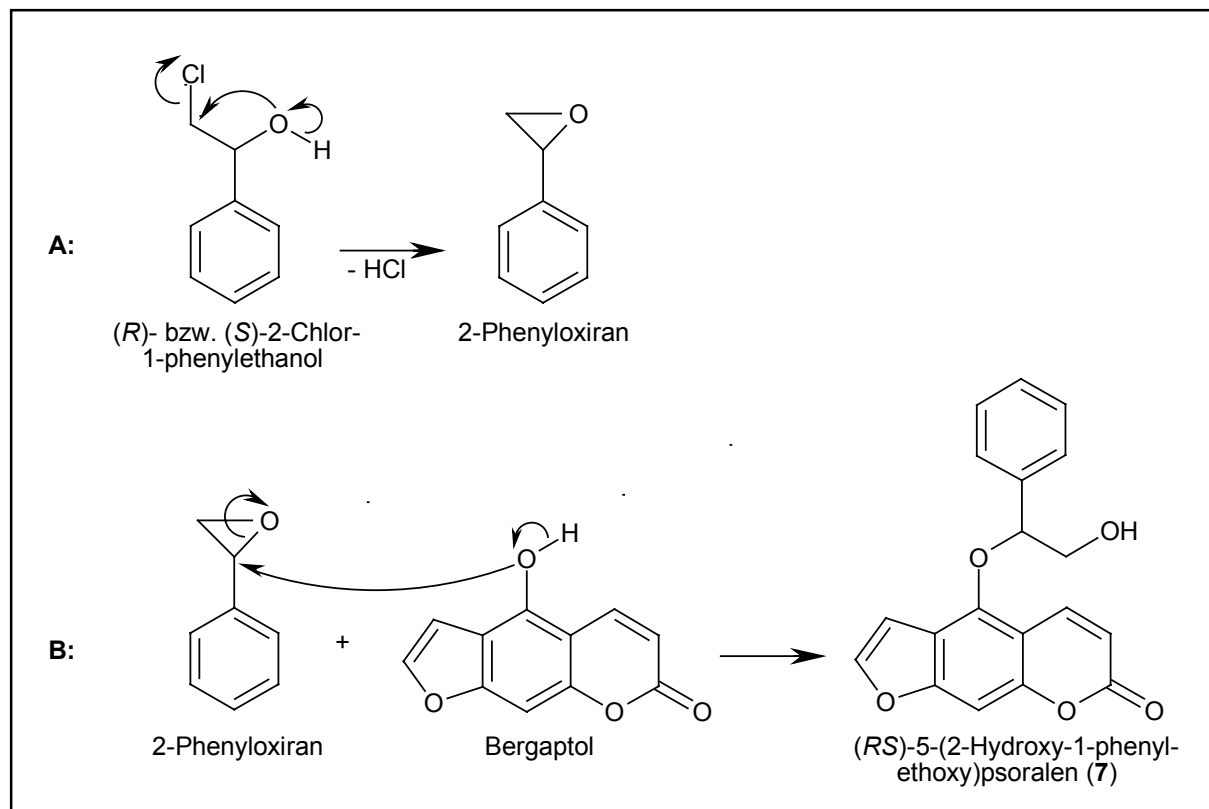
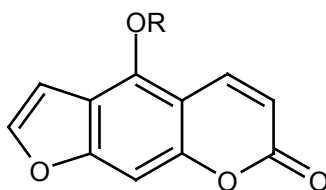


Abb. 3.3: Vermuteter Entstehungsweg der Verbindung 7: A: Bildung des Epoxids durch Abspaltung von Chlorwasserstoff, B: Addition von Bergaptol an das Epoxid.

Die Abspaltung von Halogenwasserstoff aus 1,2-Halogenhydrinen, wie dem in der Synthese eingesetzten 2-Chlor-1-phenylethanol, mittels Alkalien ist eine allgemein anwendbare Darstellungsmethode für zyklische Ether und kann, wie dieses Beispiel bestätigt, auch schon durch alkalisch reagierende Salze wie Kaliumcarbonat erfolgen (Dittus, 1965). Mehrfach in der Literatur beschrieben ist darüber hinaus die Umsetzung von *(R)*- bzw. *(S)*-2-Chlor-(oder Brom-)1-phenylethanol in Natronlauge (Corey et al., 1988) oder Mischungen aus Natron- bzw. Kalilauge und einem organischen Lösungsmittel (Noyori et al., 1984; Imuta et al., 1980) zu den synthetisch wertvollen enantiomerenreinen Phenyloxiranen unter Beibehaltung der Konfiguration.

Möglicherweise verlief auch die Chlorwasserstoff-Abspaltung in Aceton unter Kaliumcarbonatzusatz stereoselektiv, spätestens die anschließende Reaktion mit Bergaptol führte jedoch zu einem Gemisch aus *(R)*- und *(S)*-konfigurierter Form des 5-(2-Hydroxy-1-phenylethoxy)psoralens.

3.3 Übersicht über die synthetisierten Verbindungen



5- und 8- Hydroxyalkoxy-psoralene

Struktur	Bezeichnung	Nummer
	(RS)-8-(2-Hydroxypropoxy)psoralen	1
R = $-(\text{CH}_2)_3\text{OH}$	5-(3-Hydroxypropoxy)psoralen	2
R = $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	(RS)-5-(2-Hydroxypropoxy)psoralen	3
R = $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$	(R)-5-(3-Hydroxy-2-methylpropoxy)-psoralen	R-4
R = $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$	(S)-5-(3-Hydroxy-2-methylpropoxy)-psoralen	S-4

5-Hydroxy- und 5-Oxophenylalkoxy-psoralene

Struktur	Bezeichnung	Nummer
R = $-\text{CH}_2\text{COC}_6\text{H}_5$	5-Phenacyloxy-psoralen	5
R = $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_5$	(RS)-5-(2-Hydroxy-2-phenylethoxy)-psoralen	6
R = $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_5$	(R)-5-(2-Hydroxy-2-phenylethoxy)-psoralen	R-6
R = $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_5$	(S)-5-(2-Hydroxy-2-phenylethoxy)-psoralen	S-6
R = $-\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)\text{CH}_2\text{OH}$	(RS)-5-(2-Hydroxy-1-phenylethoxy)-psoralen	7

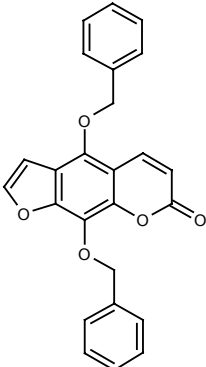
5-Phenylalkoxy-psoralene

Struktur	Bezeichnung	Nummer
R = -CH ₂ C ₆ H ₅	5-Benzylxy-psoralen	8
R = -(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅	5-(2-Phenylethoxy)-psoralen	9
R = -(CH ₂) ₃ C ₆ H ₅	5-(3-Phenylpropoxy)-psoralen	10
R = -(CH ₂) ₄ C ₆ H ₅	5-(4-Phenylbutoxy)-psoralen	11
R = -(CH ₂) ₅ C ₆ H ₅	5-(5-Phenylpentoxy)-psoralen	12
R = -CH ₂ CH(CH ₃)C ₆ H ₅	(<i>RS</i>)-5-(2-Phenylpropoxy)-psoralen	13
R = -CH ₂ CHCHC ₆ H ₅	(<i>E</i>)-5-(3-Phenyl-2-propenyloxy)-psoralen	14
R = -CH(C ₆ H ₅) ₂	5-Diphenylmethoxy-psoralen	15
R = -CH ₂ C ₆ H ₄ C ₆ H ₅	5-(4-Biphenyl)methoxy-psoralen	16

5-Cyclohexylalkoxy-psoralene

Struktur	Bezeichnung	Nummer
R = -CH ₂ C ₆ H ₆	5-Cyclohexylmethoxy-psoralen	17
R = -(CH ₂) ₂ C ₆ H ₆	5-(2-Cyclohexylethoxy)-psoralen	18
R = -(CH ₂) ₃ C ₆ H ₆	5-(3-Cyclohexylpropoxy)-psoralen	19

5,8-Diphenylalkoxy-psoralen

Struktur	Bezeichnung	Nummer
	5,8-Dibenzylloxypsoralen	20

4 Analytik

4.1 Spektroskopie

4.1.1 IR-Spektroskopie

Die zur Charakterisierung der Verbindungen im experimentellen Teil aufgeführten IR-Banden entsprechen hauptsächlich Signalen, die durch Schwingungen im Psoralen-Grundkörper entstehen. Murray gibt einen Überblick über die IR-Signale von Cumarinen und unterschiedlich substituierten Furocumarinen (Murray et al., 1982).

Werden die Substanzen in Form eines KBr-Presslings vermessen, liegt die C=O-Valenzschwingung der Pyron-Carbonylgruppe in Cumarinen etwa bei 1720 cm^{-1} . In Furocumarinen führt eine Alkoxygruppe in Position 5 zu einer Verschiebung zu höheren Frequenzen als 1720 cm^{-1} , während eine Alkoxy substitution am Kohlenstoffatom 8 ein Signal bei einer geringeren Frequenz hervorruft.

Charakteristisch für C-5-substituierte Psoralene ist weiterhin eine Zwillingsbande im Bereich von $1600\text{-}1625\text{ cm}^{-1}$, die durch C=C-Schwingungen zustande kommt. Im Unterschied hierzu weisen die C-8-substituierten Isomere nur ein Signal bei $1620\text{-}1625\text{ cm}^{-1}$ auf.

Ebenfalls deutlich erkennbar in den Spektren der synthetisierten Furocumarinderivate ist eine Bande bei $740\text{-}760\text{ cm}^{-1}$, die auf in-plane-Deformationsschwingungen der C-H-Bindungen des Furanringes beruht.

Die IR-Spektren der drei Verbindungen **17** bis **19** weisen darüber hinaus eine ausgeprägte Doppelbande im Bereich von etwa 2850 bis 2950 cm^{-1} auf, welche kennzeichnend für den Cyclohexyl-Rest ist (Günzler und Böck, 1983).

4.1.2 NMR-Spektroskopie

Zur NMR-Spektroskopie von Cumarinen existieren ausführliche Übersichtsarbeiten ($^1\text{H-NMR}$: Steck und Mazurek, 1972; $^{13}\text{C-NMR}$: Duddeck und Kaiser, 1982). Außerdem wurde die NMR-Spektroskopie einiger Cumarin- und 5,8-disubstituierter Psoralenderivate bereits in der Arbeit von Wulff diskutiert (Wulff, 1998).

Deshalb werden an dieser Stelle die Spektren der 5-O-substituierten Bergaptol-Verbindungen am Beispiel der Substanzen **6** und **7** nur ergänzend erläutert. Dabei soll gleichzeitig die postulierte Struktur der Verbindung **7** bestätigt werden.

Die NMR-Daten aller dargestellten Derivate sind im experimentellen Teil angegeben.

4.1.2.1 ^1H -NMR-Spektroskopie

Protonen des Psoralengerüsts

Lineare Furocumarine wie die synthetisierten Verbindungen sind gekennzeichnet durch zwei Paare von Dublett-Signalen, die den vier Pyron- bzw. Furanprotonen entsprechen. Zusätzlich zu den ^3J -Kopplungen können Fernkopplungen über fünf Bindungen zwischen 8-H und 4-H bzw. 8-H und 4'-H erkennbar sein, die Signale der Protonen 4 und 4' werden dadurch zu doppelten Dubletts aufgespalten (Steck und Mazurek, 1972). Eine allgemeine Übersicht über Lage der vier Signale und Größe der Kopplungskonstanten zeigt Tabelle 4.1. Die chemische Verschiebung des Protons 8 liegt im unsubstituierten Psoralen bei 7.41 ppm, im 5-Methoxy-Derivat Bergapten bei 7.21 ppm.

Proton	Chemische Verschiebung	Signalaufspaltung	Kopplungskonstante
3-H	$\delta = 6.1-6.4$ ppm	Dublett	$^3\text{J} = 9.5$ Hz
4-H	$\delta = 7.9-8.2$ ppm	Dublett / z.T. Dublett eines Dublett	$^3\text{J} = 9.5$ Hz z.T. $^5\text{J} = 0.6-1.0$ Hz
4'-H	$\delta = 6.7-7.2$ ppm	Dublett / z.T. Dublett eines Dublett	$^3\text{J} = 2.5$ Hz z.T. $^5\text{J} = 1.0$ Hz
5'-H	$\delta = 7.5-7.7$ ppm	Dublett	$^3\text{J} = 2.5$ Hz

Tab. 4.1: Übersicht der ^1H -NMR-Daten von linearen Furocumarinen in CDCl_3 (Steck und Mazurek, 1972).

Die ^1H -NMR-Spektren der isomeren Verbindungen **6** und **7** sind in den Abbildungen 4.1 und 4.2 dargestellt. Die Signale der aromatischen Protonen der Substanzen liegen alle in den in Tabelle 4.1 angegebenen ppm-Bereichen und weisen nur geringfügige Unterschiede in den chemischen Verschiebungen auf.

Im hohen Feld zwischen 2.5 und 5.7 ppm besitzt das Spektrum des als Nebenprodukt entstandenen Derivates (**7**) jedoch ein deutlich anderes Erscheinungsbild als das (*RS*)-5-(2-Hydroxy-2-phenylethoxy)psoralen (**6**). Das bestätigt, dass sich das durch eine mögliche Umlagerung des Alkylierungsreagenzes entstandene Derivat tatsächlich nur in der Seitenkette von der Substanz **6** unterscheidet.

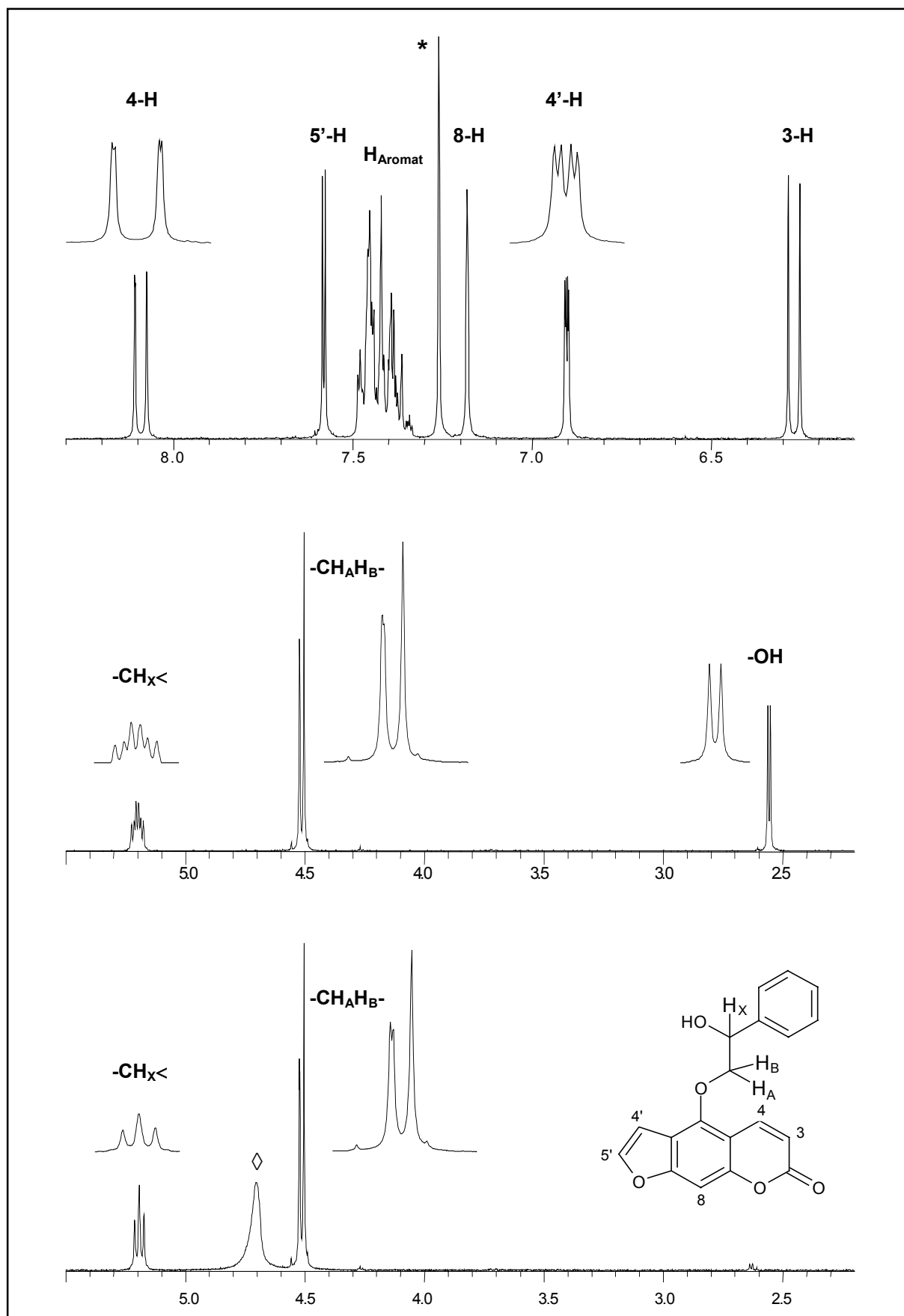


Abb. 4.1: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung 6. Oben: Aromatenbereich; mitte: Protonen der Seitenkette; unten: D_2O -Austausch (* : Lösungsmittel CDCl_3 ; \diamond : HDO).

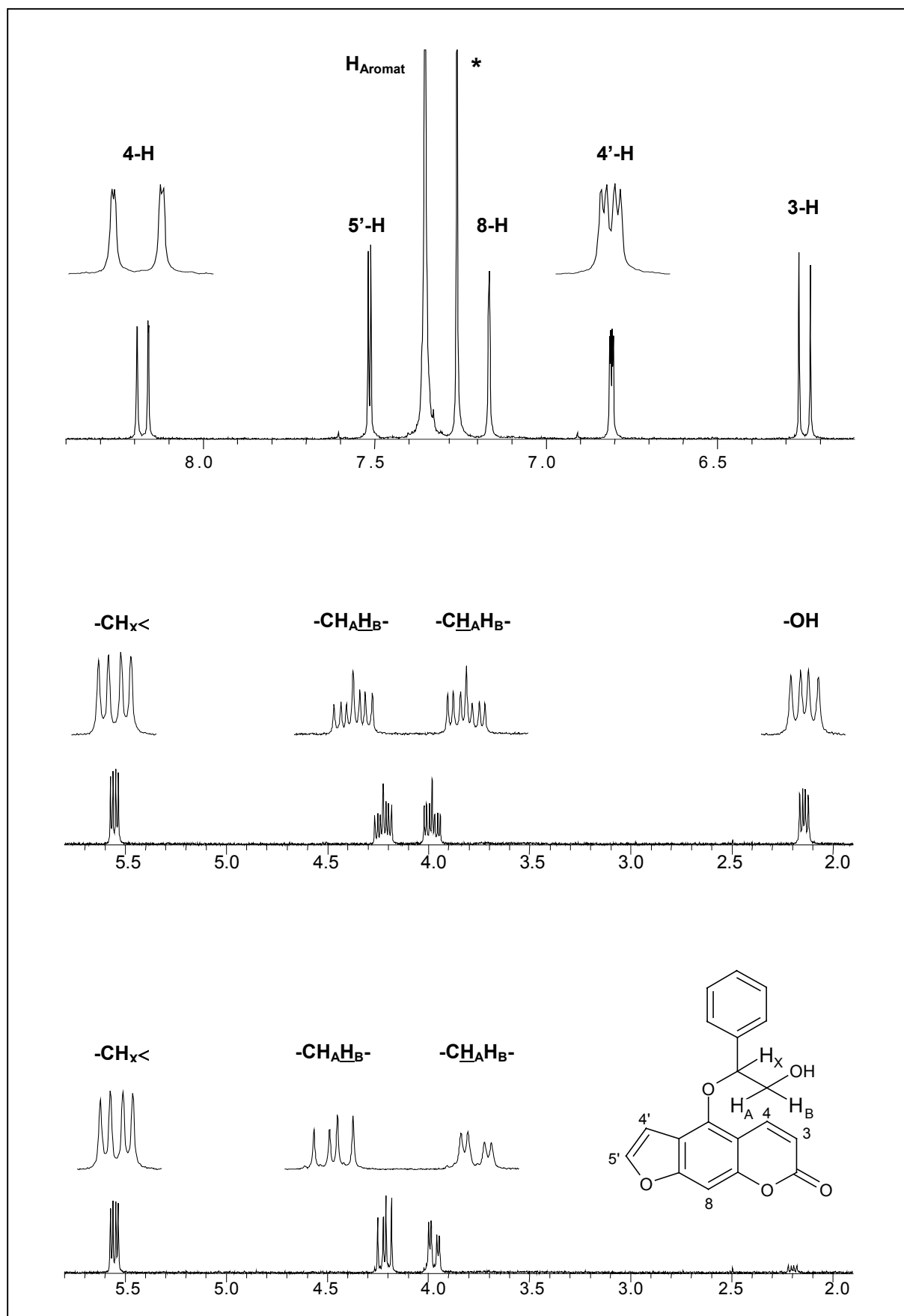


Abb. 4.2: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 7. Oben: Aromatenbereich; mitte: Protonen der Seitenkette; unten: D₂O-Austausch (* : Lösungsmittel CDCl₃).

Protonen der Seitenkette

Vergleichend werden im Folgenden die Signale der Seitenketten-Protonen für die chiralen Isomere **6** und **7** erläutert, um den Strukturvorschlag für die Verbindung (*RS*)-5-(2-Hydroxy-1-phenylethoxy)psoralen (**7**) zu überprüfen.

Beide Derivate enthalten ABX-Systeme, die jeweils aus den Methylenprotonen und dem Methinproton des Stereozentrums bestehen. Prinzipiell dürfen die Kopplungskonstanten der zugehörigen Signale nicht mit den Regeln für Spektren erster Ordnung ausgewertet werden. Eine exakte Analyse des komplexen Spinsystems der Verbindung **6** soll an dieser Stelle nicht durchgeführt werden, zur Vorgehensweise sei auf Günther verwiesen (Günther, 1973). Im Gegensatz dazu ist für die Substanz **7** eine vollständige Auswertung erster Ordnung jedoch möglich.

(*RS*)-5-(2-Hydroxy-2-phenylethoxy)psoralen (**6**)

Die Verbindung **6** wurde durch achirale Reduktion aus 5-Phenacyloxypsoralen (**5**) hergestellt.

Bei 5.20 ppm ist für das Methinproton im ¹H-NMR-Spektrum (Abbildung 4.1) durch Kopplung mit den Protonen der Methylengruppe scheinbar ein Triplett zu erkennen, wenn durch H/D-Tausch eine weitere Kopplung zum Proton der Hydroxylgruppe unterbunden wird; anderenfalls erfolgt eine Aufspaltung zu einem Dublett des „Triplets“. Letzteres darf korrekterweise nicht als Triplett bezeichnet werden, da es als AB-Teil des ABX-Systems aus zwei ab-Teilspektren besteht.

Im unsymmetrischen Erscheinungsbild des Signals der Methylengruppe bei etwa 4.5 ppm zeigt sich sehr deutlich der AB-Charakter (Günther, 1973). Das Proton der Hydroxylgruppe ist bei 2.56 ppm als Dublett zu finden, es entfällt im H/D-Tausch.

Die Daten der Seitenketten-Protonen des (*RS*)-5-(2-Hydroxy-2-phenylethoxy)psoralens (**6**) sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Proton	Chemische Verschiebung	Signalaufspaltung	Kopplungskonstante
-OH	$\delta = 2.56$ ppm	Dublett / H/D-Tausch: kein Signal	$^3J = 3.2$ Hz
-CH _A H _B -	$\delta = 4.49-4.56$ ppm	AB-Teil des ABX-Systems	-
-CH _X <	$\delta = 5.20$ ppm	Dublett eines „Triplets“ / H/D-Tausch: „Triplett“ (X-Teil des ABX-Systems)	$^3J_{\text{XOH}} = 3.2$ Hz

Tab. 4.2: ¹H-NMR-Daten der Protonen der Seitenkette für die Verbindung **6**.

(RS)-5-(2-Hydroxy-1-phenylethoxy)psoralen (7)

Die Substanz **7** entstand, wie bereits erwähnt, als zweites Produkt gleicher Masse bei der Synthese der Verbindungen **R-6** und **S-6**, welche abgetrennt und eindeutig durch Vergleich spektroskopischer Daten mit denen der Verbindung **6** identifiziert werden konnten.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des (RS)-5-(2-Hydroxy-1-phenylethoxy)psoralens (**7**) (Abbildung 4.2) sind zwischen 2.1 und 5.6 ppm vier Signale mit einem Integral von jeweils 1 vorhanden. Das Signal bei 2.14 ppm, ein Dublett eines Dubletts, tritt im H/D-Tausch nicht mehr auf, stammt also von der Hydroxylgruppe, die mit zwei magnetisch nicht äquivalenten Protonen koppelt. Ebenfalls ein Dublett eines Dubletts findet sich bei 5.55 ppm, im H/D-Tausch liegt es unverändert vor.

Bei 3.98 und 4.22 ppm treten zwei Signale mit komplexem Aufspaltungsmuster (jeweils ein Dublett eines Dubletts eines Dubletts) und deutlichem Dacheffekt auf, der H/D-Tausch führt jeweils zu einem doppelten Dublett. Die beiden zugehörigen Protonen koppeln also miteinander, ebenso wie mit den beiden Protonen bei 2.14 bzw. 5.55 ppm.

Insgesamt folgt aus diesen Daten das Vorliegen einer $>\text{CH-CH}_2\text{-OH}$ -Teilstruktur, die über die Methingruppe mit dem Psoralengerüst und dem Phenylrest verknüpft sein muss. Im Vergleich mit der Struktur **6** stützen auch die Tieffeldverschiebung der Methingruppe, die sich nun nicht mehr neben einer einfachen Hydroxylgruppe, sondern in Nachbarschaft eines Arylethersauerstoffes mit stärker entschirmendem Effekt befindet, und umgekehrt die Hochfeldverschiebung der Methylengruppe den Strukturvorschlag für die Verbindung **7**.

Tabelle 4.3 enthält die Daten der Seitenketten-Protonen, Abbildung 4.3 eine Vergrößerung des Aufspaltungsmusters der Methylenprotonen H_A und H_B .

Proton	Chemische Verschiebung	Signalaufspaltung	Kopplungskonstante
-OH	$\delta = 2.14$ ppm	Dublett eines Dubletts / H/D-Tausch: kein Signal	$^3J_{\text{AOH}} = 8.3$ Hz $^3J_{\text{BOH}} = 4.6$ Hz
$-\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B}-$	$\delta = 3.98$ ppm	Dublett eines Dubletts eines Dubletts / H/D-Tausch: Dublett eines Dublett	$^2J_{\text{AB}} = 12.1$ Hz $^3J_{\text{AOH}} = 8.3$ Hz $^3J_{\text{AX}} = 3.5$ Hz
$-\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B}-$	$\delta = 4.22$ ppm	Dublett eines Dubletts eines Dubletts / H/D-Tausch: Dublett eines Dublett	$^2J_{\text{AB}} = 12.1$ Hz $^3J_{\text{BOH}} = 4.6$ Hz $^3J_{\text{BX}} = 8.1$ Hz
$-\text{CH}_\text{X}<$	$\delta = 5.55$ ppm	Dublett eines Dubletts	$^3J_{\text{AX}} = 3.6$ Hz $^3J_{\text{BX}} = 8.1$ Hz

Tab. 4.3: $^1\text{H-NMR}$ -Daten der Protonen der Seitenkette für die Verbindung **7**.

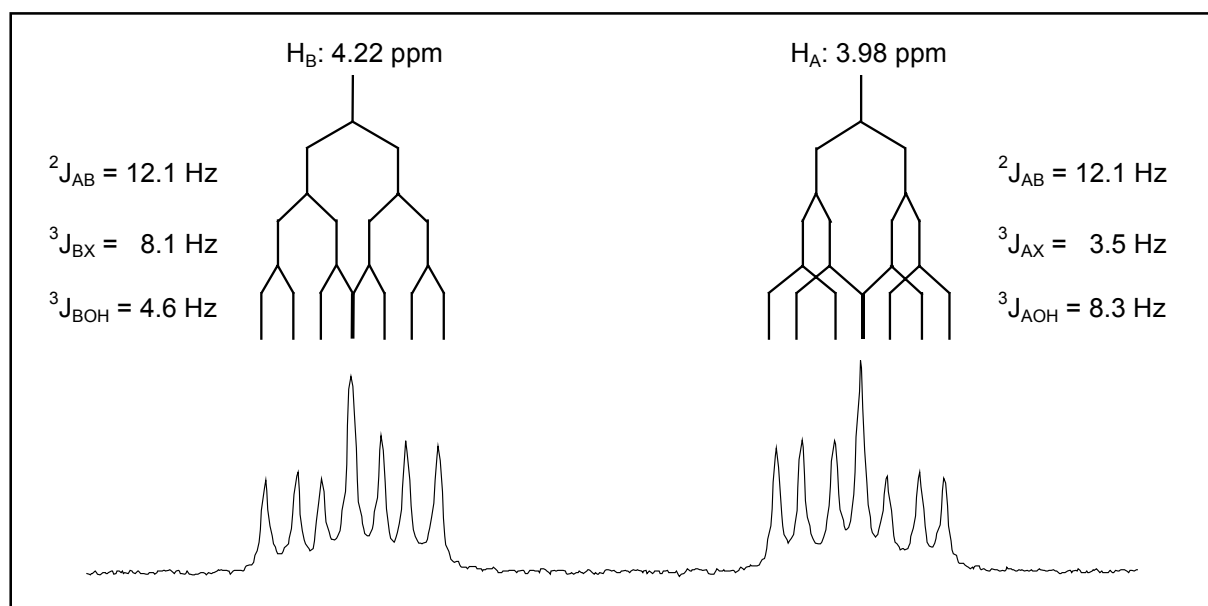


Abb. 4.3: Aufspaltungsmuster der Methylenprotonen H_A und H_B der Verbindung **7**.

4.1.2.2 ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Für alle erstmals dargestellten Substanzen sind sowohl ^1H -Breitband-entkoppelte ^{13}C -NMR- als auch DEPT-135-Spektren (DEPT: *distortionless enhancement by polarization transfer*) aufgenommen worden.

Durch Ausschaltung der komplexen C,H-Kopplungen werden in ^1H -Breitband-entkoppelten ^{13}C -NMR-Spektren einfache Singulettlinien erhalten. In DEPT-135-Spektren sind nur die wasserstofftragenden Kohlenstoffe zu erkennen, die Signale der quartären Kohlenstoffe entfallen. CH- und CH_3 -Gruppen werden mit positiver Amplitude angezeigt, Methylen-Kohlenstoffe weisen negative Signale auf.

Die zweidimensionale NMR-Spektroskopie wurde exemplarisch für die Verbindung **7** verwendet, um die heteronuklearen C,H-Kopplungen der Atome zu untersuchen und dadurch die Signale der Kohlenstoffatome des Psoralengerüsts genau zuzuordnen.

Im C,H-COSY-Spektrum (COSY: *correlated spectroscopy*) sind die ^1J -Kopplungen der wasserstofftragenden Kohlenstoffatome zu erkennen, während das C,H-COLOC-Experiment (COLOC: *correlation via long-range couplings*) zur Beobachtung von ^2J - und ^3J -Kopplungen quartärer Kohlenstoffatome dient.

C,H-COSY-Spektroskopie

Abbildung 4.4 zeigt das C,H-COSY-Spektrum der Verbindung **7**. Da im ^1H -NMR-Spektrum alle Signale der Protonen sicher bestimmt werden konnten, sind die

chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome 3, 4', 8, 5' und 4 dem zweidimensionalen Spektrum zweifelsfrei zu entnehmen.

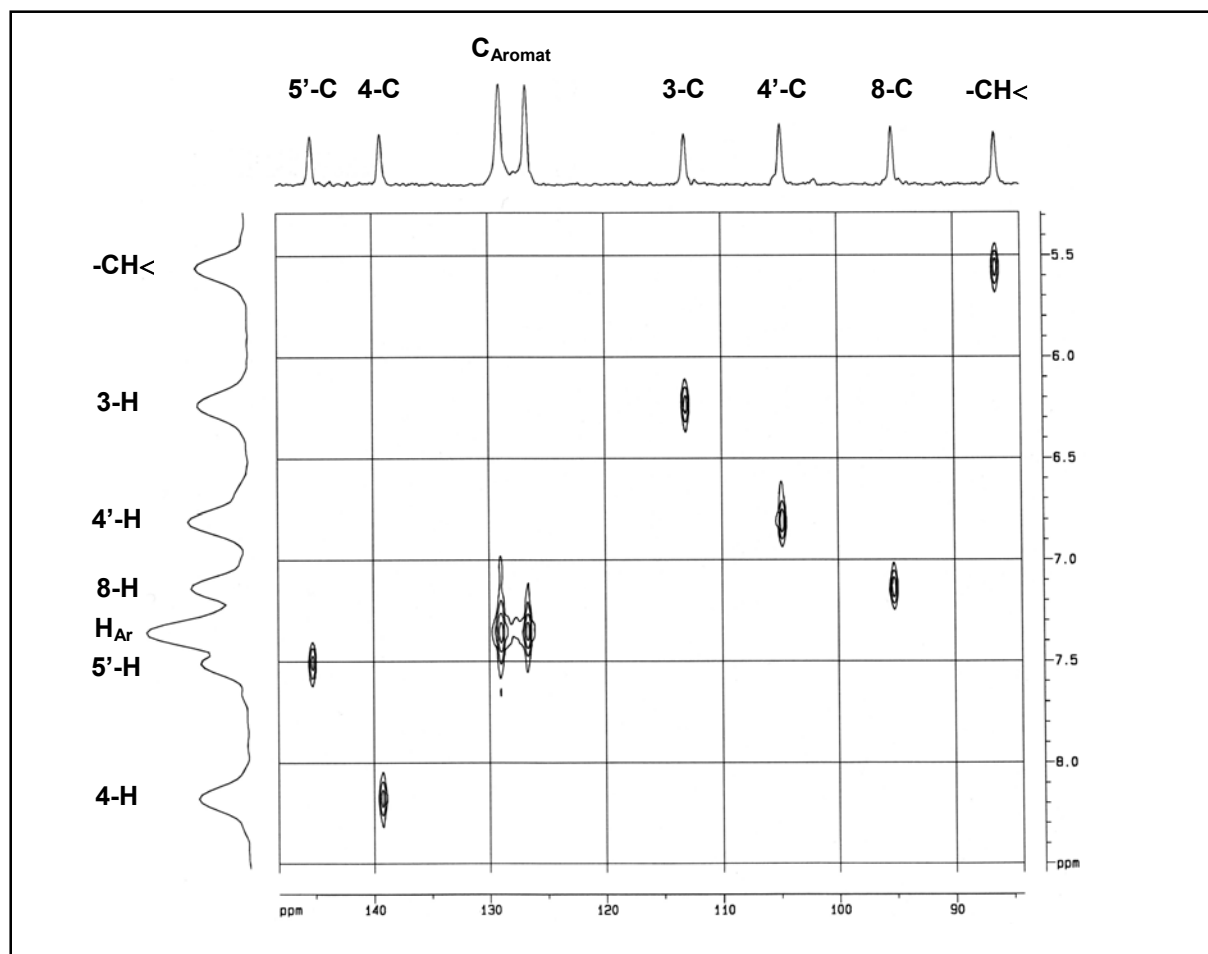


Abb. 4.4: C,H-COSY-Spektrum der Verbindung 7.

C,H-COLOC-Spektroskopie

Zahl und Lage der quartären Kohlenstoffatome sind bereits durch Vergleich der ^1H -Breitband-entkoppelten ^{13}C -NMR- mit DEPT-135-Spektren zu ermitteln, die genaue Zuordnung der chemischen Verschiebung zu den einzelnen Atomen erlaubt dann allerdings im nächsten Schritt erst ein C,H-COLOC-Experiment.

In Abbildung 4.5 ist das COLOC-Spektrum der Verbindung 7 dargestellt. Die Formeln A bis F verdeutlichen, wie die Kohlenstoffe mit Hilfe der ^2J - und ^3J -Kopplungen zu benachbarten Wasserstoffatomen zugeordnet wurden.

Es sei darauf hingewiesen, dass in einem entsprechenden Ausschnitt des COLOC-Spektrums der Verbindung 7 für den Methinwasserstoff Kopplungen zu Kohlenstoffen sowohl des Phenylrestes als auch der Methylengruppe zu erkennen sind, wodurch erneut ihre postulierte Struktur bestätigt wird.

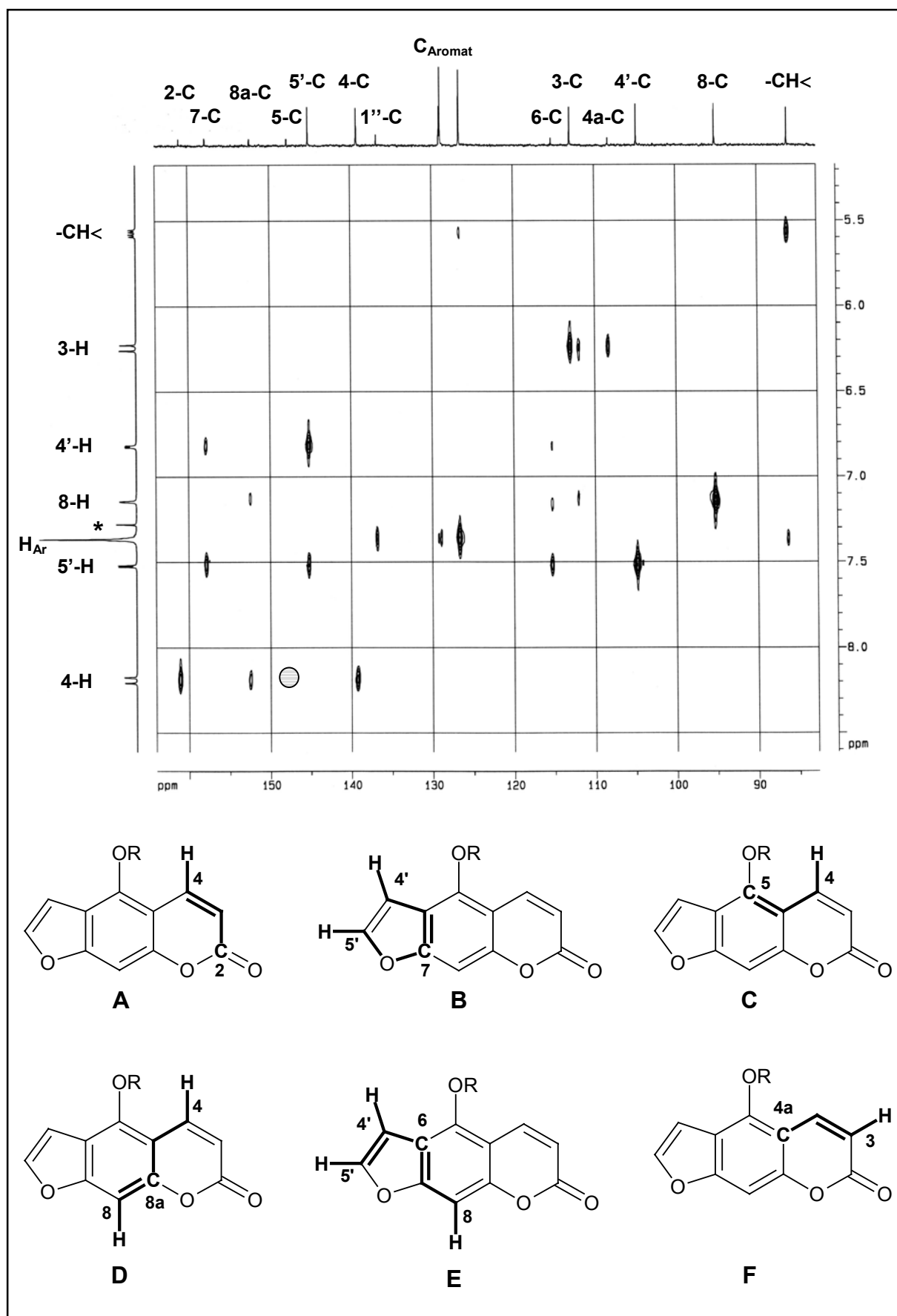


Abb. 4.5: C,H-COLOC-Spektrum der Verbindung 7 (* : CDCl₃); der Kreis markiert ein Signal, welches vorhanden, in der gezeigten Intensitätsebene jedoch nicht erkennbar ist.

In Tabelle 4.4 sind die durch C,H-COSY- und COLOC-Experimente ermittelten Werte der chemischen Verschiebungen für die Kohlenstoffatome des Psoralengerüsts aufgelistet.

Der Vergleich mit den Daten des Bergaptens (Duddeck und Kaiser, 1982) zeigt, dass die unterschiedlichen 5-O-Substitutionen hierbei zu keinen nennenswerten Veränderungen führen. Somit können die ^{13}C -Signale aller weiteren Verbindungen analog zugeordnet werden.

Kohlenstoffatom	Chemische Verschiebung [ppm]	Chemische Verschiebung [ppm]
	Verbindung 7	Bergapten
8	95.2	94.0
4'	104.8	105.3
4a	108.3	106.7
3	113.1	112.8
6	115.3	113.0
4	139.2	139.4
5'	145.2	145.0
5	147.8	149.6
8a	152.5	152.7
7	157.9	158.5
2	161.1	160.3

Tab. 4.4: Übersicht über die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome im Psoralengerüst für die Verbindung 7 und Bergapten.

^1H -Breitband-entkoppelte ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Die ^{13}C -NMR-Spektren und zusätzlich Ausschnitte aus den DEPT-135-Spektren der Isomere **6** und **7** sind in Abbildung 4.6 gegenübergestellt.

Wie schon in der ^1H -NMR-Spektroskopie ist deutlich zu erkennen, dass sich nur die Seitenketten der beiden Substanzen unterscheiden. Das Signal der Methingruppe ist im Umlagerungsprodukt durch stärkere Abschirmung deutlich tieffeldverschoben, während die Methylengruppe weiter im hohen Feld liegt.

Abschließend bleibt festzustellen, dass sämtliche NMR-spektroskopische Daten den Strukturvorschlag der Substanz **7** stützen.

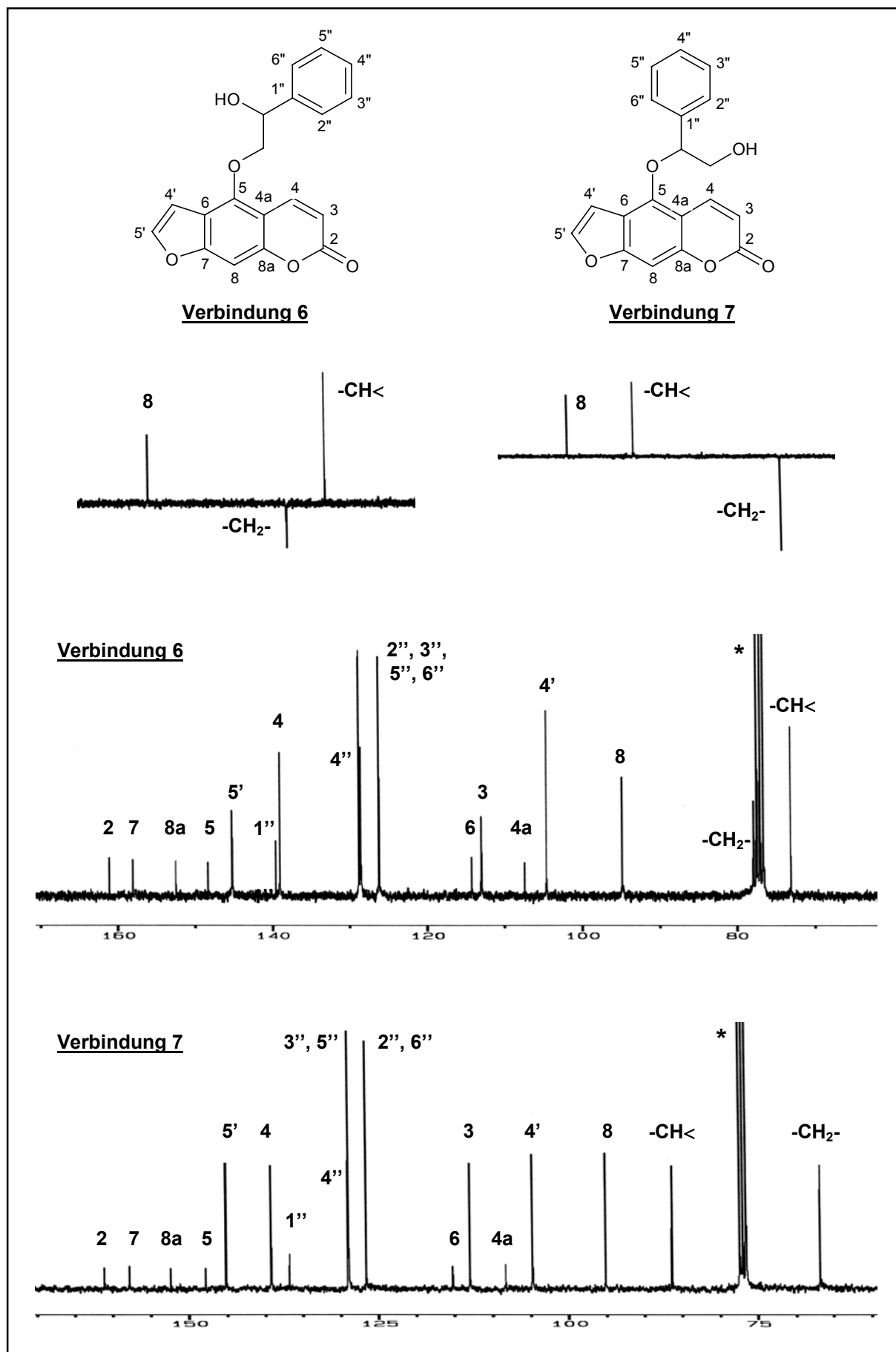


Abb. 4.6: Ausschnitte aus den ¹H-Breitband-entkoppelten ¹³C-NMR-Spektren und den DEPT-135-Spektren (oben) der Verbindungen 6 und 7 (* : Lösungsmittel CDCl₃).

4.1.3 Massenspektrometrie

Bereits 1964 wurden die 5- bzw. 8-Methoxyfurocumarine Bergapten und Xanthotoxin massenspektrometrisch untersucht. Unter den Bedingungen der Elektronenstoß-ionisation (EI) entstehen aus beiden Substanzen neben dem Molekülpeak M^+ ($m/z = 216$, 100%) durch Verlust von CH_3 (15 amu) und die wiederholte Abspaltung von Kohlenmonoxid (28 amu) Fragmente bei $m/z = 201$, 173 und 145, im Falle des Bergapten zu Anteilen von 36 %, 79 % bzw. 37 % (Barnes und Occolowitz, 1964).

Im Gegensatz dazu bildet sich bei den neu synthetisierten Verbindungen zunächst ein Bergaptoiradikal-Kation mit $m/z = 202$, welches durch Abspaltung der Seitenketten in Form von neutralen Alkenen entsteht (Abbildung 4.8, A) und in vielen Fällen den Basispeak liefert. Ausgehend von diesem Radikal-Kation werden nachfolgend ebenfalls CO-Gruppen abgespalten, was zur Bildung der Fragmente $m/z = 174$ und 146 führt. Abb. 4.7 zeigt exemplarisch das Massenspektrum der Verbindung **6**.

Eine Ausnahme stellen die Derivate 5-Phenacyloxy-psoralen (**8**) und 5-(4-Biphenyl)-methoxy-psoralen (**16**) dar, dort kann die Seitenkette nicht als Olefin eliminiert werden, es entsteht wie bei Bergapten und Xanthotoxin das Fragment $m/z = 201$, allerdings nur in geringem Ausmaß.

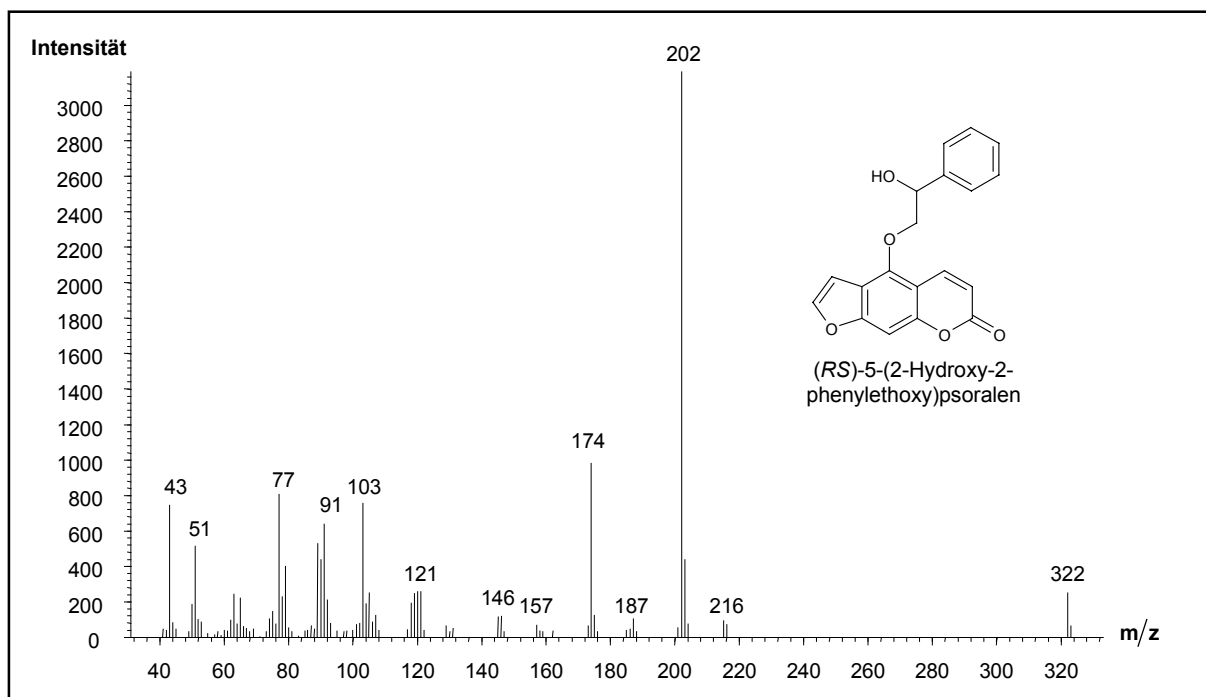


Abb. 4.7: EI-Massenspektrum der Verbindung **6**.

Zusätzlich zu den Zerfallsprodukten, die aus dem Psoralen-Grundkörper stammen, sind in vielen Spektren mit schwacher Intensität Fragmente zu erkennen, die mit

jeweils $m/z = M^+ - 201$ den abgespaltenen Seitenketten in kationischer Form entsprechen und in einem konkurrierenden Vorgang parallel zur Alkenbildung entstehen (Abbildung 4.8, B).

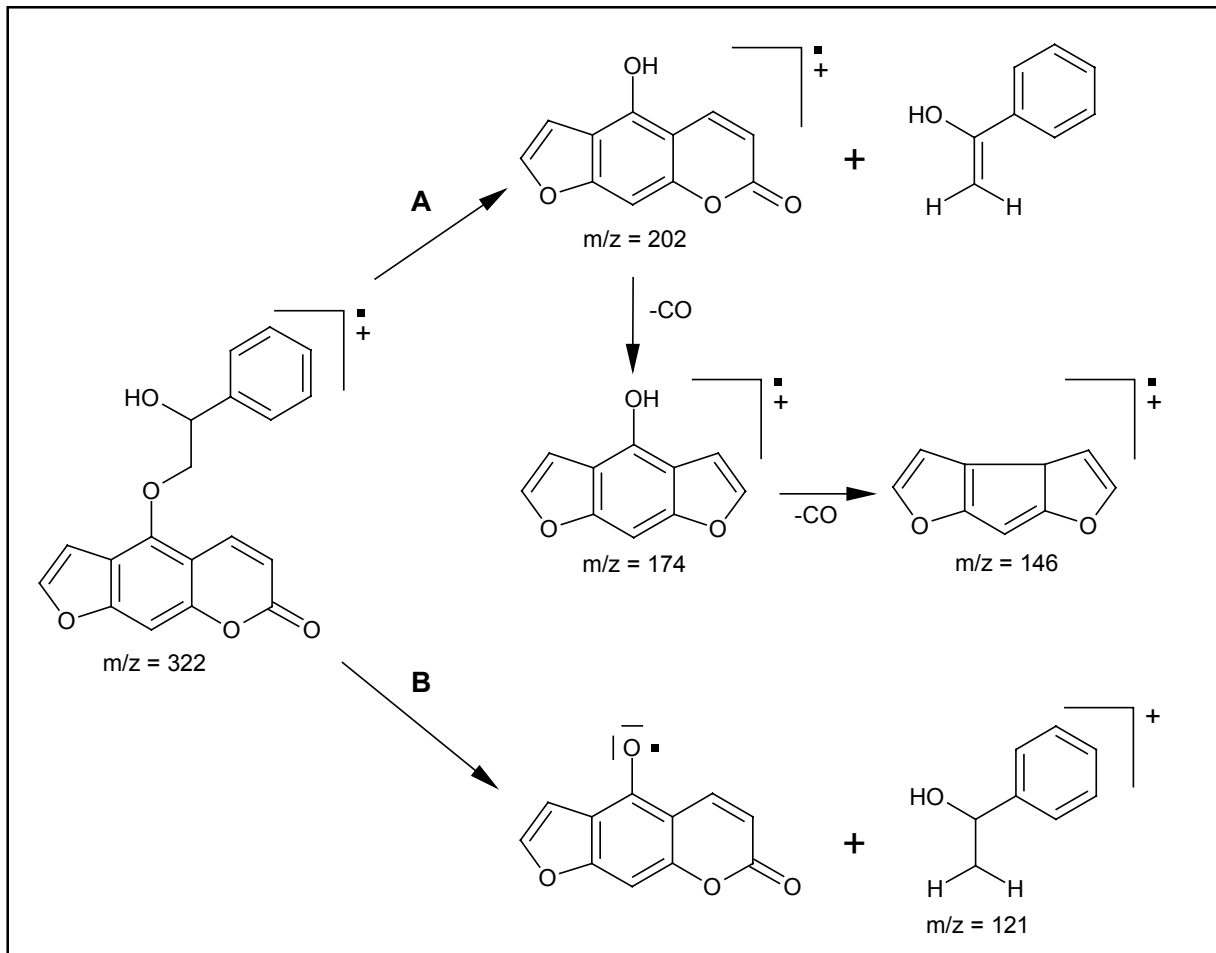


Abb. 4.8: Exemplarisches Fragmentierungsschema der Verbindung 6 (Bruchstücke postuliert): Bildung eines Bergaptonradikal-Kations (A) oder eines Phenolradikals (B)

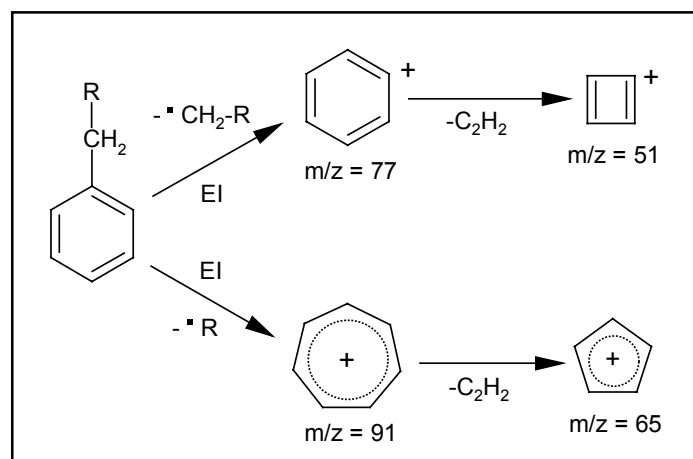


Abb. 4.9: Benzyl- und Phenylspaltung an monosubstituierten Alkyl-Aromaten (nach Hesse et al., 1991).

Bei den Phenylalkoxy-Derivaten bildet sich als Basispeak häufig durch eine Benzyl-Spaltung das Fragment $m/z = 91$ ($[C_7H_7]^+$). Durch Verlust von Acetylen entsteht hieraus das Zerfallsprodukt $m/z = 65$ ($[C_5H_5]^+$).

Ebenfalls typisch für monosubstituierte Alkyl-Aromaten ist die Phenylspaltung, die zu den Fragmenten $m/z = 77$ ($[C_6H_6]^+$) und 51 ($[C_4H_4]^+$) führt (Abbildung 4.9) (Hesse et al., 1991).

Die MS-Daten aller synthetisierten Verbindungen sind im experimentellen Teil angegeben.

4.2 Hochleistungsflüssigchromatographie an chiralen stationären Phasen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige chirale Verbindungen synthetisiert, welche zum Teil in enantiomerenreiner Form in der physiologischen Testung eingesetzt werden sollten.

Zur Darstellung der Substanzen **S-4**, **R-4**, **S-6** und **R-6** wurden die (*R*)- bzw. (*S*)-konfigurierten Derivate der entsprechenden Alkylierungsreagenzien verwendet. Es war nicht auszuschließen, dass während der Synthese eine unerwünschte Raze-misierung aufgetreten war. Daher war es erforderlich, eine Analytik zur Überprüfung der Enantiomerenreinheit der Produkte zu entwickeln. Neben den Enantiomeren wurden auch die Razemate **3**, **7** und **13** untersucht.

Für die Analytik bot sich die Hochleistungsflüssigchromatographie an chiralen stationären Phasen an, die eine Fülle von Möglichkeiten zur Trennung chiraler Substanzen bereitstellt. In den letzten Jahren sind derartige Säulenmaterialien in großer Auswahl für vielfältige Trennprobleme entwickelt worden. Zu diesen Materialien zählen vor allem die so genannten Säulen vom Bürsten- oder Pirkle-Typ, zahlreiche Cellulose- und Cyclodextrinderivate, Polyacrylate, makrozyklische Antibiotika wie z. B. Ticoplanin, Proteine wie das humane Serumalbumin, diverse Kronenether und Ligandenaustausch-Phasen.

Durch verschiedene Arten von Wechselwirkungen (polare/ionische Interaktionen, π - π -Interaktionen, hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen) bilden sich aus Analyten und den immobilisierten chiralen Selektoren diastereomere Komplexe, deren unterschiedliche Stabilität für die Retention der Substanzen und somit für die Trennung verantwortlich ist.

Chromatographische Kenngrößen

Zur Charakterisierung HPL-chromatographischer Trennungen existiert eine Reihe von Parametern. Da eine rein qualitative Analytik durchgeführt wurde, sollen an dieser Stelle nur die Größen α und R betrachtet werden.

Der Wert α beschreibt die Selektivität der Trennsäule und wird über die Kapazitätsfaktoren k'_1 und k'_2 aus Bruttorententionszeit (Retentionszeit $t_R - t_0$) und Totzeit (t_0) ermittelt:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \qquad k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Ein Maß für die Güte der Trennung ist die Auflösung R , für eine Basislinientrennung sollte mindestens $R = 1.4$ erreicht werden. R wird nach folgender Gleichung errechnet ($b_{0.5}$ = Halbwertsbreite der Peaks):

$$R = 1.18 \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{b_{0.5_1} + b_{0.5_2}}$$

4.2.1 Stationäre Phase (S,S)-Whelk-O1

Für die Untersuchung der dargestellten chiralen Substanzen konnte eine stationäre Phase vom Pirkle-Typ überwiegend erfolgreich eingesetzt werden. Die verwendete (S,S)-Whelk-O1-Säule besitzt als chirale Komponente (3S,4S)-4-(3,5-Dinitrobenz-amido)-1,2,3,4-tetrahydrophenanthren-Gruppen, welche an Kieselgel gebunden sind (Abbildung 4.10). Für Interaktionen mit den Analyten stehen damit sowohl π -Elektronendonator- als auch -akzeptorfunktionen zur Verfügung, weiterhin können über die Amidstruktur Wasserstoffbrücken ausgebildet werden.

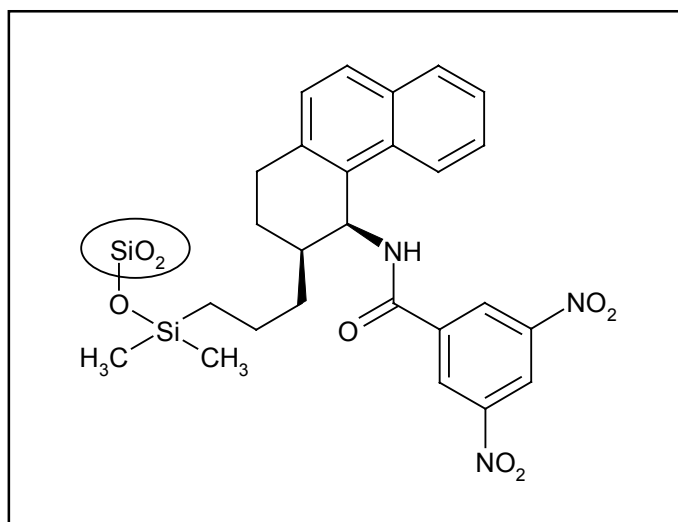


Abb. 4.10: Chiraler Selektor der (S,S)-Whelk-O1-Säule.

Die Chromatographie wurde unter Normalphasen-Bedingungen durchgeführt, als Fließmittel wurden Mischungen aus n-Hexan und Isopropanol verwendet. Die Detektion erfolgte fluorimetrisch bei $\lambda_{Ex} = 314$ nm und $\lambda_{Em} = 460$ nm. Messbedingungen und chromatographische Kenngrößen sind in Tabelle 4.5 aufgeführt.

Substanz	Fließmittel (n-Hexan/ Isopropanol)	Flußrate [ml/min]	Retentionszeit [min]	Selektivität α	Auflösung R
3	70 / 30 80 / 20	1.0 bzw. 0.6 0.8	17.8 bzw. 30.2 45.1	-	-
R-4, S-4	85 / 15	0.8	R-4: 54.7 S-4: 52.0	Gemisch R-4+S-4: 1.04	Gemisch R-4+S-4: 0.43
6, R-6, S-6	80 / 20	1.0	R-6: 26.3 S-6: 28.9	6: 1.11	6: 0.65
7	60 / 40	1.3	16.1 und 20.1	1.40	1.50
13	98 / 2	1.2	59.4 und 61.8	1.04	0.50

Tab. 4.5: Daten zur chiralen HPLC unter Verwendung der Säule (S,S)-Whelk-O1.

5-(2-Hydroxy-1-phenylethoxy)- (6, R-6 und S-6) und 5-(2-Hydroxy-2-phenylethoxy)-psoralen (7)

Bei den 5-Hydroxyphenylalkoxy-psoralenen konnten befriedigende (**6, S-6, R-6**) bzw. sehr gute (**7**) Ergebnisse erzielt werden.

Abbildung 4.11 zeigt, dass die Verbindung **7**, das Nebenprodukt der Synthesen von **R-6** und **S-6**, als racemisches Gemisch vorliegt. Mit einer Auflösung von 1.50 ließen sich die Enantiomere nahezu vollständig trennen.

Die Trennung der Substanz **6** gelingt zwar weniger gut ($R = 0.65$), doch ist deutlich zu erkennen, dass die Verbindungen **R-6** und **S-6** für eine physiologische Untersuchung in ausreichender Enantiomerenreinheit vorliegen (Abbildung 4.11). Ein Grund für die schlechtere Trennung mag möglicherweise die Tatsache sein, dass sich die Hydroxylgruppe im Gegensatz zum Derivat **7** direkt neben dem Phenylring befindet und somit weniger ungehindert eine Wasserstoffbrücke zum chiralen Selektor der stationären Phase ausbilden kann.

5-(3-Hydroxy-2-methylpropoxy)- (R-4 und S-4), 5-(2-Hydroxypropoxy)- (3) und 5-(2-Phenylpropoxy)psoralen (13)

Die Enantiomere des 5-(3-Hydroxy-2-methylpropoxy)psoralens (**R-4** und **S-4**) lassen sich in dem gewählten System kaum voneinander unterscheiden, erst bei sehr langen Analysenzeiten erfolgt eine geringfügige Trennung der beiden Substanzen (R

= 0.43). Trotzdem ist erkennbar, dass auch bei diesen Verbindungen während der Synthese keine Razemisierung aufgetreten ist (Chromatogramme nicht abgebildet). Ebenfalls schlechte Resultate liefern die Razemate **3** und **13**, (*RS*)-5-(2-Hydroxypropoxy)psoralen (**3**) lässt sich nicht auftrennen, bei (*RS*)-5-(2-Phenylpropoxy)psoralen (**13**) sind Laufzeiten von etwa 1 Stunde erforderlich, um eine leichte Trennung zu erreichen.

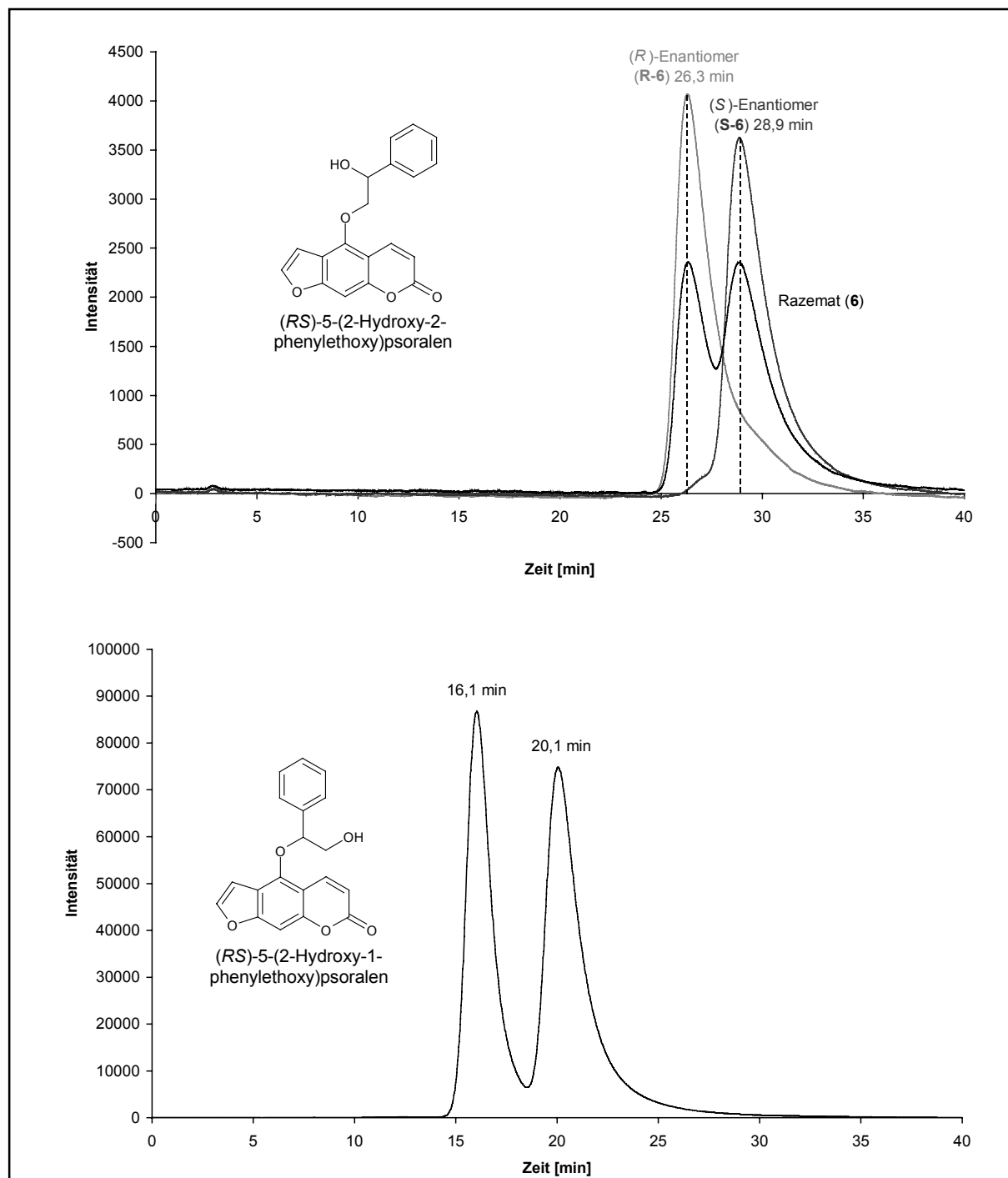


Abb. 4.11: Chromatogramme der Verbindungen **6**, **R-6**, **S-6** (oben, die Chromatogramme der drei Substanzen sind übereinandergelegt) und **7** (unten)

Den Substanzen **3**, **R-4**, **S-4** und **13** ist gemein, dass sie nicht die strukturellen Voraussetzungen für eine optimale Trennung durch die Säule (S,S)-Whelk-O1 besitzen. Günstig für eine gute Diskriminierung der Enantiomere sind allgemein Wechselwirkungen mit dem chiralen Selektor über drei Kontaktpunkte (Dalgliesh, 1958).

Die Verbindungen besitzen am Stereozentrum jedoch zusätzlich zu dem Furocumarin-Substituenten entweder nur eine Hydroxylgruppe, die Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann, oder einen Phenylrest, der als π -Elektronendonator zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu ist das chirale Zentrum der Derivate **6**, **R-6**, **S-6** und **7** sowohl mit einer Hydroxylfunktion als auch mit einem Phenylring substituiert, wodurch die besseren Ergebnisse bei deutlich geringeren Analysenzeiten erklärbar sind.

4.2.2 Stationäre Phasen Nucleodex beta-OH und Nucleodex gamma-PM

Die Substanzen **R-4** und **S-4** wurden auch an HPLC-Säulen vom Cyclodextrin-Typ untersucht, die freundlicherweise von Herrn Dr. K. Wiethoff (Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr, Kiel) zur Verfügung gestellt wurden.

Bei diesen stationären Phasen kommt es aufgrund der Bildung von Inklusionskomplexen zu einer Trennung chiraler Substanzen. Cyclodextrine sind chirale zyklische Oligosaccharide, in denen 6 bis 8 Glucoseeinheiten α -1,4-glykosidisch verknüpft sind (α -, β -, γ -Cyclodextrin). Die Anzahl der Glucoseeinheiten bestimmt den Durchmesser der Cyclodextrine, ihre räumliche Anordnung ähnelt einem Kegelstumpf, dessen Innenraum lipophil ist, während die beiden Öffnungen durch primäre und sekundäre Hydroxylgruppen hydrophil sind. Bei den verwendeten Nucleodex-Säulen liegen als chirale Selektoren entweder underivatisiertes β -Cyclodextrin oder permethyliertes γ -Cyclodextrin vor, die über einen *spacer* kovalent an eine Kieselgelmatrix gebunden sind.

Als Fließmittel wurde eine Mischung aus gleichen Teilen Methanol und einem 0.1%-igen Triethylammoniumacetat-Puffer pH 4 (wässrige Lösung aus Triethylamin, pH-Wert-Einstellung mit Eisessig) eingesetzt. Unter den gewählten Bedingungen konnte keine Trennung der Enantiomere **R-4** und **S-4** erreicht werden. Bei der β -OH-Säule betragen die Retentionszeiten 32 min (Fluß 0.6 ml/min), bei der γ -PM-Säule 9 min (Fluß 0.8 ml/min). Eine Optimierung der Methode wurde nicht weiter verfolgt.

5 Elektrophysiologie

5.1 Die *patch-clamp*-Technik

5.1.1 Entwicklung der Elektrophysiologie

Die *patch-clamp* (Membranfleck-Klemme)-Technik gehört heute zu den wichtigsten elektrophysiologischen Arbeitsmethoden. Sie wurde von Erwin Neher und Bert Sakmann in den 70er Jahren entwickelt und ermöglicht es, Ionenströme durch Zellmembranen mit hoher Auflösung zu messen. Im Jahre 1991 erhielten die beiden Wissenschaftler für ihre Arbeiten den Nobelpreis für Medizin und Physiologie.

Die Technik geht zurück auf die Spannungsklemme von Cole und Curtis (Cole und Curtis, 1939). Dabei werden der Zellmembran definierte Potentiale aufgezwungen und die daraus resultierenden Ströme gemessen. Über einen Rückkopplungsverstärker wird die Ist-Spannung der Membran mit der vorgegebenen Soll-Spannung verglichen. Das Membranpotential wird konstant gehalten, indem eine Elektrode im Ausgleich so viel Strom in die Zelle injiziert, wie über die Membran abfließt. Somit ist der Klemmstrom ein Maß für die transmembranären Ströme.

Hodgkin und Huxley gelang es 1952 erstmals, mittels intrazellulärer Mikroelektroden ein Aktionspotential abzuleiten. Durch ihre Arbeiten am Riesenaxon des Tintenfisches konnten sie zeigen, dass der Gesamtstrom des Aktionspotentials aus zwei eindeutig voneinander getrennten Ionenströmen besteht (Hodgkin und Huxley, 1952). Sie bewiesen damit die Existenz selektiver, von der Zelle unterschiedlich gesteuerter Ionenkanäle.

Der große Fortschritt der extrazellulären *patch-clamp*-Technik besteht in einer dramatischen Steigerung der Empfindlichkeit der Messungen. Neher und Sakmann konnten das starke Hintergrundrauschen, welches die Experimente bis dahin begleitet hatte, so weit reduzieren, dass Stromableitungen durch einzelne Kanäle möglich wurden (Neher und Sakmann, 1976). Sie isolierten kleine Membranflecken durch vorsichtiges Aufsetzen feiner Glaskapillaren auf die Zellen und stellten fest, dass durch anschließendes leichtes Ansaugen der Zellmembran Abdichtwiderstände im Gigaohm-Bereich erreichbar waren („*giga-seal*“) (Neher, 1982). Dieser sogenannte *cell-attached*-Zustand zeichnet sich neben der Erzeugung einer elektrischen Abgrenzung auch durch eine relativ hohe mechanische Stabilität aus. Ausgehend von dieser Konfiguration werden die in Abbildung 5.1 dargestellten Messkonfigurationen der *patch-clamp*-Technik erreicht (Hamill et al., 1981).

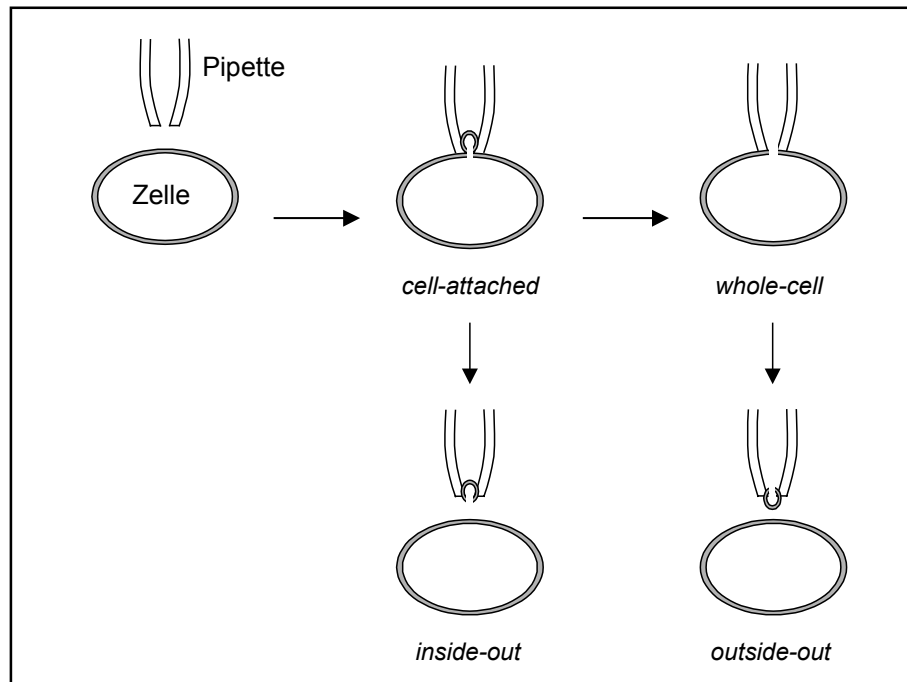


Abb. 5.1: Messkonfigurationen der *patch-clamp*-Technik.

Die am häufigsten verwendete Messart ist der *whole-cell*-Modus. Durch kurzes Saugen wird dabei die Membran unterhalb der Pipettenöffnung aufgebrochen, wodurch alle Kanäle der Zellmembran einer Messung zugänglich gemacht werden. Das Abziehen der Pipette ausgehend von der *cell-attached*- bzw. der *whole-cell*-Konfiguration führt zum Herauslösen des Membranflecks. Dieses Vorgehen ermöglicht Einzelkanalableitungen, wobei wahlweise die Membraninnen (*inside-out*)- oder -außenseite (*outside-out*) für einen Lösungswechsel zur Verfügung steht.

5.1.2 Aufbau des *patch-clamp*-Messplatzes

Zwei wichtige Anforderungen an den Aufbau eines *patch-clamp*-Arbeitsplatzes müssen erfüllt sein, um Experimente problemfrei durchführen zu können.

Zum einen muss eine hohe mechanische Stabilität gewährleistet sein, da schon geringste Erschütterungen und Vibrationen spürbare Störungen bei den Messungen hervorrufen können. Zu diesem Zweck befand sich die Messeinrichtung auf einer schweren Granitplatte, die auf einem durch Styroporblöcke schwingungsgedämpften Tisch gelagert war. Zusätzlich waren passive Schwingungsdämpfer zwischen Tisch und Granitplatte angebracht.

Neben der mechanischen Stabilität ist eine elektrische Abschirmung des Arbeitsplatzes zur Reduzierung des 50-Hz-Brummens elektrischer Geräte notwendig. Dies wurde durch Einsatz eines Faradaykäfig erreicht, der den gesamten Aufbau umschloss.

Zu den Komponenten der eigentlichen Messeinrichtung gehörten ein inverses Mikroskop, ein hydraulischer Mikromanipulator für die Patchpipette und die aus Vor- und Hauptverstärker bestehende Verstärkungseinrichtung EPC 9, über die auch eine Signalfilterung erfolgte. Das Funktionsprinzip eines *patch-clamp*-Verstärkers veranschaulicht das vereinfachte Schaltbild in Abbildung 5.2.

Nach Analog/Digital-Wandlung wurden die Messsignale in den Rechner eingespeist, mithilfe der Software Pulse/PulseFit wurden die Daten erfasst und ausgewertet. Als Bad- bzw. Messelektroden wurden Ag/AgCl-Elektroden verwendet. Zum Lösungswechsel wurde eine peristaltische Pumpe eingesetzt.

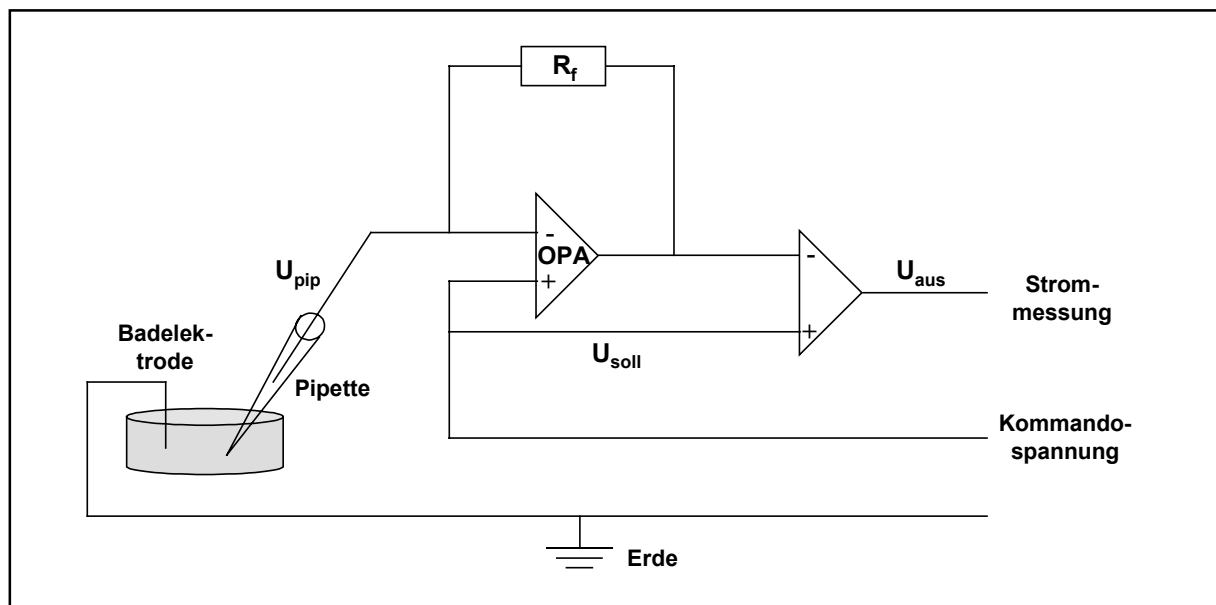


Abb. 5.2: Vereinfachtes Schaltbild eines *patch-clamp*-Verstärkers. OPA: Operationsverstärker; R_f : Rückkopplungswiderstand; U_{soll} : Sollspannung; U_{pip} : Pipettenpotential; U_{aus} : Ausgangsspannung proportional zum Strom (nach Numberger & Draguhn, 1996).

Sowohl der Aufbau des verwendeten Messplatzes als auch Vorbereitung und Durchführung der Experimente sind in den Arbeiten von Herzog und Möller ausführlich beschrieben (Herzog, 2000 und Möller, 2000).

Eine hervorragende Übersicht zu diesem Thema bietet die Monographie „Patch-Clamp-Technik“ von Numberger und Draguhn (1996).

5.2 Material und Methoden

5.2.1 Zellkultur

5.2.1.1 Material und Geräte

Sterilbank Klasse 2 Herasafe, Typ HS12	Heraeus, Hanau
Begasungsbrutschrank, Typ BB16	Heraeus, Hanau
Gefrierröhrchen 2.0 ml, Nr. 430 289	Corning, USA
Einfrierbehälter für Zellkulturen, Nr. 5100-0001	Corning, USA
Sterile wattierte Pipetten 5 und 10 ml	Sarstedt
Gewebekulturschälchen 35 x 10 mm	Sarstedt
Gewebekulturflaschen 25 cm ² , belüftet	Sarstedt
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Nr. D-6046	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (High Glucose), Nr. 41966	Gibco BRL
Minimum Essential Medium (MEM), Nr. 31095	Gibco BRL
Fetales Kälberserum (FBS), Nr. F-2442	Sigma
Geneticin-Lösung (G 418), 50 mg/ml, Nr. G-7034	Sigma
Kanamycin-Lösung, 10 mg/ml, Nr. K-0129	Sigma
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), Nr. D-8537	Sigma
Trypsin/EDTA-Lösung (1x), Nr. T-3924	Sigma
Sylgard (Zweikomponenten-Silikonelastomer, hitzehärtend)	Dow Corning, Belgien
Poly-L-Lysin	Sigma

5.2.1.2 Verwendete Zelllinien

In Tabelle 5.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien aufgeführt. Die N1E-115-Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. B. Hamprecht, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt.

Die stabil transfizierten L-929-, NIH-3T3-, B-82- und MEL-C88-Zellen stammen von Herrn Prof. Dr. S. Grissmer, Abteilung Angewandte Physiologie der Universität Ulm. In seinem Labor konnten ferner die Messungen an den Zelllinien MEL-C88 und RBL-2H3 durchgeführt werden. Die RBL-2H3-Zellen wurden transient mit der cRNA für xKv1.4 (x: *Xenopus laevis*) bzw. für die H404T-mKv1.3-Mutante transfiziert.

Bezeichnung der Zelllinien	Ursprung der Zelllinien	Kanalbesatz	Literatur
N1E-115	Neuroblastomzellen der Maus	Nav- und Kv-Kanäle	s. Abschnitt 5.3.2
NIH-3T3	Embryonale Fibroblasten der Maus	mKv1.1	Grissmer et al., 1994
B-82	Gewebsfibroblasten der Maus	rKv1.2	Werkman et al., 1992
L-929	Gewebsfibroblasten der Maus	mKv1.3 oder mKv3.1	Grissmer et al., 1994
MEL-C88	Leukämiezellen der Maus (MEL: <i>murine erythroleukaemia</i>)	hKv1.5	Shelton et al., 1993
RBL-2H3	Leukämiezellen der Ratte (RBL: <i>rat basophilic leukemic</i>)	s. Abschnitt 5.2.2	s. Abschnitt 5.2.2

Tab. 5.1: Charakterisierung der verwendeten Zelllinien (m: *mouse*; r: *rat*; h: *human*).

5.2.1.3 Kulturbedingungen

Sämtliche Zelllinien wurden zweimal wöchentlich passagiert, d. h. jeweils ein Teil der Zellen wurde in frisches Medium überführt und weiterkultiviert. Dabei wurden gleichzeitig Zellen für die *patch-clamp*-Messungen in kleine Petrischälchen ausgesät.

Bei geringer Zelldichte erfolgte bei den adhärennten Zellen nur ein Mediumwechsel, die in Suspension wachsenden MEL-C88-Zellen wurden in einem solchen Fall unverändert weiterkultiviert.

Zelllinien Kiel

Zur Passage wurde bei den adhärennten Zellen der Linien N1E-115, NIH-3T3, B-82 und L-929 zunächst das Medium abgesaugt, und die Zellen wurden einmal mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde für einige Minuten Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben, um die Zellen vom Boden zu lösen. Danach konnten sie in frischem DMEM-Medium mit einem Zusatz von 10 % FBS aufgenommen und in eine neue Kulturflasche bzw. die Zellschälchen für die *patch-clamp*-Messungen überführt werden.

Das Splitverhältnis (Verdünnungsverhältnis) betrug je nach Zelldichte 1:5 bis 1:10. Das Medium wurde für ein Endvolumen von 10 ml in den Kulturflaschen bzw. 2 ml in den Petrischälchen in entsprechender Menge vorgelegt.

Die Zellen wurden in einem wasserbefeuchteten Brutschrank bei 36.5 °C in 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert und konnten an den folgenden zwei bis drei Tagen für Messungen verwendet werden.

Zur Verhinderung einer Verkeimung wurden die N1E-115-Zellen mit 50 µg/ml des Antibiotikums Kanamycin versetzt, zu den Zelllinien L-929 und NIH-3T3 wurden 300 µg/ml Geneticin gegeben. Die B-82-Zellen wurden ohne Geneticin-Zusatz kultiviert, da ihnen das Resistenzgen für dieses Antibiotikum fehlt.

Bei den NIH-3T3-Zellen war einige Tage vor und während der Messung eine Zugabe von 2 % DMSO in das Kulturmedium erforderlich. Hierdurch wurde offensichtlich erst die Synthese bzw. Exprimierung der Kanäle in ausreichendem Maße induziert.

Die maximale Nutzungsdauer einer Zellkultur betrug sechs Monate. Danach wurden die Zellen vernichtet und neue Zellen aufgetaut. Hierfür wurde der Inhalt eines Gefrier Röhrchens aufgetaut und mit Medium unter 10 % FBS-Zusatz in eine Kulturflasche überführt. Einen Tag nach dem Auftauen wurde das Medium gewechselt, um das vorhandene DMSO zu entfernen.

Sobald möglich, d. h. bei ausreichendem Wachstum, wurde ein Teil der frisch aufgetauten Zellen wieder eingefroren. Dazu wurden die Zellen in Medium unter Zusatz von jeweils 10 % FBS und DMSO aufgenommen, in Gefrier Röhrchen überführt und zunächst mit einer Kühlrate von 1 °C/min auf –80 °C abgekühlt. Nach vier Stunden konnten die Zellen in flüssigen Stickstoff gebracht und dort langfristig gelagert werden.

Zelllinien Ulm

Bei den MEL-C88-Zellen handelt es sich um eine Suspensionskultur, als Medium wurde DMEM (High Glucose) unter Zusatz von 10 % FBS verwendet. Auch bei dieser Zelllinie war einige Tage vor und während der Messung die Zugabe von 2 % DMSO notwendig. Das Splitverhältnis bei der Passagierung betrug 1:10 mit DMSO-Zusatz und 1:20 ohne DMSO-Zusatz.

Zur elektrophysiologischen Messung wurden die Zellen direkt auf die aus einem Deckgläschen und einem mit Sylgard befestigten Teflonring (Durchmesser 2 cm) bestehenden Messkammern aufgebracht. Dazu wurden die Deckgläschen zuvor mit Poly-Lysin-Lösung beschichtet, was zur Bildung eines Polymergeflechts auf dem Glas führte. Nach drei Minuten wurde das Poly-Lysin mit Wasser abgewaschen und

der Teflonring mit Zellsuspension befüllt. Nach einigen Minuten hafteten die Zellen fest genug auf dem Polymergrund, so dass sie bei einem Lösungswechsel während der Messung nicht fortgespült werden konnten.

Die RBL-2H3-Zellen wurden in MEM-Medium mit 10 % FBS kultiviert. Die Passagierung erfolgte wie oben für die weiteren in Bodenkultur wachsenden Zelllinien beschrieben, das Splitverhältnis betrug 1:10.

Für Untersuchungen an den RBL-Zellen wurden 3 ml Medium und 100 µl Zellsuspension auf ein mit einem Teflonring versehenes Deckgläschen in einem Petrischälchen pipettiert, welches über Nacht inkubiert wurde. Nach cRNA-Injektion und erneuter Inkubation konnten dann die Messungen durchgeführt werden.

5.2.2 cRNA-Transfektion der RBL-Zellen

5.2.2.1 Material und Geräte

Fluorescein Isothiocyanat (FITC)- Dextran (MW 10000)	Sigma
Microloader und Femtotips	Eppendorf, Hamburg
Micromanipulator 5171	Eppendorf, Hamburg
Transjector 5246	Eppendorf, Hamburg

5.2.2.2 Durchführung

Für die Kanäle xKv1.4 (Kerschbaum et al., 2002) und H404T-Kv1.3 (Aiyar et al., 1995; Rauer und Grissmer, 1996) existieren keine permanent transfizierten Zelllinien. Deshalb erfolgten die Untersuchungen an RBL-Zellen, die durch zytoplasmatische c(*complementary*)RNA-Mikroinjektion transient transfiziert wurden. Diese Methode wurde erstmals von Ikeda beschrieben (Ikeda et al., 1992). RBL-Zellen sind elektrophysiologisch gut charakterisiert und zeichnen sich durch die Abwesenheit konstitutiver spannungsabhängiger, auswärts-gleichrichtender Kaliumkanäle aus (McCloskey und Cahalan, 1990).

Die verwendete cRNA wurde freundlicherweise von Frau Dr. H. Jäger (xKv1.4) und Herrn T. Dreker (H404T-Kv1.3) zur Verfügung gestellt.

Um bei der späteren Messung diejenigen Zellen sichtbar zu machen, die mit RNA beladen worden waren, erfolgte die Injektion der jeweiligen cRNA im Gemisch mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-Dextran. Die RNA wurde mit der FITC-Lösung (0.5 % FITC in 100 mM KCl) bis zu einer Konzentration von 0.5 bis 1 µg/µl verdünnt. Durch Zentrifugation (5 min, 12000 x g, 1 °C) wurden Verunreinigungen sedimentiert.

Vor Beginn der RNA-Injektion wurden alle Arbeitsflächen mit Ethanol desinfiziert. Eine sterile Injektionspipette (Femtotip) wurde mit 2 µl der Farbstofflösung mithilfe von speziell ausgezogenen Pipettenspitzen (Microloader) befüllt. Die Pipette wurde dann am Micromanipulator befestigt, welcher wiederum mit dem Transjector verbunden war. Der Transjector war sowohl für den Injektionsdruckstoß als auch für die Erzeugung eines permanent anliegenden Druckes verantwortlich, wodurch ein Verstopfen der Pipette verhindert wurde. Die Pipettenspitze wurde zentral über einer ausgewählten Zelle positioniert. Bei Auslösung des Injektionsimpulses senkte sich die Pipette zunächst ab, dann erfolgte die Injektion für eine vorgegebene Zeit mit einem definierten Druck. Anschließend wurde der Femtotip automatisch wieder in die Ausgangsposition gebracht. Auf diese Weise wurden 20 bis 30 Zellen behandelt. Die Durchführung der cRNA-Injektion ist in ausführlicher Form in der Dissertation von Rauer beschrieben (Rauer, 1997).

Nach der Injektion wurden die Zellschälchen für mindestens vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wurden die jeweiligen Kanalproteine synthetisiert und in die Zellmembran eingebaut. Bei der elektrophysiologischen Untersuchung konnten die transfizierten Zellen aufgrund der Fluoreszenzmarkierung mittels eines 490-nm-Filters, der in den Strahlengang des inversen Mikroskopes geschoben wurde, identifiziert werden. Dabei war die geringe Stabilität des Farbstoffes zu berücksichtigen, die ein zügiges Vorgehen erforderlich machte.

5.2.3 Patch-clamp-Messungen

5.2.3.1 Material und Geräte

Kiel

Sterilfilter Filtropur S 0.2, Nr. 831826.001
pH-Meter 605
Halbautomatisches Mikroosmmometer
Agar, Nr. 05040

Sarstedt
Metrohm, Schweiz
Knauer, Berlin
Fluka

Kapillaren aus Borosilikatglas ohne Filament, Meterware, AD = 1.5 mm, ID = 0.15 mm, Nr. 11 411 50	Hilgenberg, Malsfeld
Pipettenziehgerät PIP 5	HEKA Elektronik, Lambrecht
Inverses Mikroskop CK-2	Olympus, Hamburg
Poliergerät Microforge CPM-2	ALA Scientific Instruments, USA
Ag-Draht rein, Durchmesser = 0.5 mm	Juwelier Schmidt, Kiel
Peristaltische Pumpe Reglo Digital, ISM 834	Ismatec, Wertheim
Pumpenschlauch Silikon Platin, ID = 1.65 mm, SC 0114	Ismatec, Wertheim
Inverses Mikroskop IX-50	Olympus, Hamburg
Transformator TH-3	Olympus, Hamburg
Mikromanipulatoren ONW-131 und ONM-1, Befestigungsadapter ON-IXP	Narishige, Japan
Pipettenhalter	HEKA Elektronik, Lambrecht
Verstärker EPC-9	HEKA Elektronik, Lambrecht
Styropor-Blöcke zur Schwingungsdämpfung	
Passive Schwingungsdämpfer SLM-3A	Newport, USA
Granitplatte, Gewicht ca. 250 kg	
Faraday-Käfig	Werkstatt des Pharm. Instituts, Kiel
Software Pulse/PulseFit, Version 8.11	HEKA Elektronik, Lambrecht
Software GraphPad Prism, Version 2.00	GraphPad Software, USA

Die zur Herstellung der Pufferlösungen verwendeten Chemikalien besaßen alle den höchsten Reinheitsgrad und wurden von Merck oder Fluka bezogen.

Ulm

Glaskapillaren mit Filament	Clark Electromedical Instruments, England
Pipettenziehgerät DMZ-Puller	Zeitz, Augsburg
Inverses Mikroskop	
Verstärker EPC-9	HEKA Elektronik, Lambrecht
Schwingungsgedämpfter Tisch IsoStation™	Newport, USA
Software Pulse/PulseFit	HEKA Elektronik, Lambrecht

5.2.3.2 Lösungen

Die Zusammensetzungen der verwendeten internen Lösungen für die Pipette und der externen Badlösungen sind in den Tabellen 5.2 und 5.3 aufgelistet. Die Lösungen wurden aus bidestilliertem Wasser hergestellt und konnten im Kühlschrank mit Ausnahme der glucosehaltigen Quandt-Lösung problemlos über einige Wochen gelagert werden. Direkt vor dem Gebrauch wurden sie sterilfiltriert. Die Osmolarität der Lösungen wurde stichprobenartig überprüft, sie lag zwischen 290 und 330 mosm/l. Die externen Lösungen wurden für die Messungen auf einen DMSO-Gehalt von 2 % eingestellt, da die Stammlösungen der untersuchten Substanzen aufgrund deren Lipophilie in DMSO hergestellt werden mussten.

	Neuroblastomzellen	Stabil transfizierte Zellen	RBL-Zellen
NaCl	10.0 mM	-	-
KCl	10.0 mM	20.0 mM	-
KF	120.0 mM	120.0 mM	145.0 mM
MgCl₂	-	-	2.0 mM
HEPES	10.0 mM	10.0 mM	10.0 mM
EGTA	10.0 mM	10.0 mM	10.0 mM
1N-KOH	Einstellung auf pH 7.2	Einstellung auf pH 7.2	Einstellung auf pH 7.2

Tab. 5.2: Zusammensetzung der internen Lösungen.

	Lösung nach Quandt	Na⁺-Ringerlösung	K⁺-Ringerlösung
	Neuroblastomzellen	Stabil transfizierte und RBL-Zellen	Stabil transfizierte Zellen
NaCl	125.0 mM	160.0 mM	-
KCl	5.5 mM	4.5 mM	164.5 mM
CaCl₂	1.5 mM	2.0 mM	2.0 mM
MgCl₂	2.0 mM	1.0 mM	1.0 mM
Glucose	25.0 mM	-	-
HEPES	5.0 mM	5.0 mM	5.0 mM
2N-NaOH	Einstellung auf pH 7.4	Einstellung auf pH 7.4	Einstellung auf pH 7.4

Tab. 5.3: Zusammensetzung der externen Lösungen.

5.2.3.3 Durchführung

Die Messpipetten wurden aus Borosilikatglas-Rohlingen in zwei Schritten ausgezogen (1. Stufe: 1300 °C, 2. Stufe: 915 bis 930 °C). Anschließend wurden sie hitzepoliert, so dass sie in Lösung einen Pipettenwiderstand von 2 bis 3.5 MΩ besaßen. Die Pipetten wurden bis zur Benutzung staubfrei gelagert.

Die Silberdrähte der Mess- und der Badelektrode wurden regelmäßig in 0.1N-Salzsäure chloridiert, um einen gleichmäßigen AgCl-Überzug sicherzustellen.

Die Messkammer bestand aus einem der Petrischälchen, in die die jeweiligen Zellen zuvor ausgesät worden waren. Das Schälchen wurde vor dem Experiment mit externer Lösung gespült und anschließend mit 2 ml dieser Lösung befüllt. Eine befüllte Kunststoff-Pipettenspitze diente als Elektrolyt-Agarbrücke und verband die Badelektrode leitend mit der Flüssigkeit im Zellschälchen.

Zum Lösungswechsel wurden durch eine peristaltische Pumpe jeweils 16 ml externe bzw. Substanzlösung perfundiert, so dass davon auszugehen war, dass der Mediumwechsel vollständig verlief (Herzog, 2000; Möller, 2000).

Alle Untersuchungen wurden in der *whole-cell*-Konfiguration durchgeführt. Dazu wurde die mit interner Lösung gefüllte und am Vorverstärker befestigte Messpipette mithilfe des Mikromanipulators unter Anlegen eines geringen Überdrucks (erzeugt durch eine 20 ml-Einwegspritze in Kiel bzw. eine automatische Druckluft-/Vakuumeinheit in Ulm) und optischer Kontrolle über ein Inversmikroskop zunächst dicht über der ausgewählten Zelle positioniert.

Die Stromantwort auf einen repetitiven 5 mV-Impuls war sofort nach Eintauchen in die Flüssigkeit sichtbar und entsprach dem Pipettenwiderstand. Das *offset*-Potential wurde abgeglichen. Nun wurde die Pipette näher an die Zellmembran herangeführt, wobei der Widerstand zunahm. Bei etwa 5 bis 6 MΩ wurde ein leichter Unterdruck angelegt. Dadurch entstand zwischen Membran und Pipette eine Abdichtung mit Widerständen im GΩ-Bereich. Nach Einstellen des Haltepotentials von -80 mV wurde die Membran durch einen kurz andauernden stärkeren Unterdruck durchbrochen und damit der *whole-cell*-Modus erreicht.

Die auftretenden Kapazitäten durch die Kondensatoreigenschaften der Glaspipette (schnelle Kapazität) bzw. der Zellmembran (langsame Kapazität) wurden automatisch kompensiert.

Der Serienwiderstand R_S entspricht dem Widerstand zwischen Silberdraht und Zellsoma, eine wichtige Komponente ist der Pipettenwiderstand. R_S wurde bei Messungen an N1E-115-Zellen zu 60 %, bei allen anderen Zellen zu 80 % kompensiert, falls der Strom einer Zelle über 2 nA lag.

Für die Leckstromkompensation wurde ein p/10-Protokoll verwendet (Armstrong und Bezanilla, 1974). Die Signale wurden über einen Bessel-4-Pol-Filter, 2.8 kHz, und einen Bessel-3-Pol-Filter, 10 kHz, gefiltert.

5.2.3.4 Messprotokolle und Auswertung

Stabil transfizierte und RBL-Zellen

Zur Erfassung der Kaliumionenströme wurde ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV für die Dauer von 200 ms auf $+40$ mV depolarisiert.

Die Depolarisationspulse wurden bei Messungen an Wildtyp-Kv1.3- und Kv1.2-Kanälen in Natrium-Ringerlösung in einem 30 s-Intervall wiederholt, bei der Verwendung von Kalium-Ringerlösung alle 10 s. Beim Kv1.4-Kanal betrug die Depolarisationsfrequenz 20 s, bei den Kv1.1-, H404T-Kv1.3-, Kv1.5- und Kv3.1-Kanälen 10 s. Die längere Pause ist bei den Kv1.3- und Kv1.4-Kanälen aufgrund ihrer langsamen Rückkehr aus dem inaktivierten Zustand notwendig.

Für alle Konzentrationen bzw. für den Kontrollwert wurden jeweils 20 Depolarisationspulse durchgeführt, der Mittelwert der letzten fünf Stromantworten wurde für die Auswertung herangezogen.

Zur Berechnung der Stromblockaden wurde für den Kalium-Peakstrom der maximale Stromwert zwischen 0.6 und 40 ms, für den Kalium-Endstrom der Mittelwert zwischen 190 und 199 ms ermittelt. Eine Ausnahme stellte der langsam aktivierende Kv1.2-Kanal dar, hier war es erforderlich, den Peakstrom als Maximum zwischen 0.6 und 199 ms anzusehen.

N1E-115-Zellen

An den N1E-115-Zellen wurde direkt aufeinander folgend von -80 auf 0 mV für die Messung des Natriumeinstroms bzw. von -80 auf $+40$ mV für die Ermittlung des Kaliumausstroms depolarisiert, die Länge der Pulse betrug jeweils 100 ms. Diese Pulsfolge wurde alle 60 s wiederholt.

Für den Kontrollwert bzw. jede der untersuchten Konzentrationen gelang der Mittelwert der letzten drei von mindestens neun Messungen zur Auswertung. Die Größe des Natriumstroms wurde am Minimum zwischen 0.3 und 5 ms ermittelt, der

Kalium-Peakstrom entsprach dem maximalen Stromwert zwischen 3 und 20 ms, der Kalium-Endstrom dem Mittelwert zwischen 95 und 99.5 ms.

Ermittlung der halbmaximal inhibitorischen Substanzkonzentration (EC_{50})

Für alle Substanzen werden die Effekte auf die untersuchten Kanäle in Form von EC_{50} -Werten beschrieben, welche aus Konzentrations-Wirkungs-Kurven berechnet wurden.

Für die Erstellung der Kurven wurden mindestens vier verschiedene Konzentrationen jeweils an mindestens drei verschiedenen Zellen untersucht. Hierzu wurde, sobald nach einigen Spülgängen mit Pufferlösung der Strom konstant blieb und nicht mehr stieg, zunächst ein Kontrollwert in der jeweiligen externen Lösung aufgenommen. Anschließend wurden an einer Zelle alle Konzentrationen, beginnend mit der niedrigsten, aufeinander folgend und ohne zwischenzeitliches Spülen mit substanzfreier Lösung untersucht.

Für weitere Experimente wurde das Zellschälchen danach durch ein neues ersetzt, da die Zellen während der Messung bereits eine lange Zeit einer unphysiologischen Umgebung ausgesetzt waren und darüber hinaus viele Substanzen in der zuletzt eingesetzten hohen Konzentration nicht mehr vollständig auswaschbar waren.

Der EC_{50} -Wert wurde mithilfe des Programmes GraphPad Prism berechnet. Folgende Rechenoperation beschreibt die Abhängigkeit des prozentualen (bezogen auf den Kontrollwert) Blockadeeffektes E von der eingesetzten Substanzkonzentration:

$$E = E_{\min} + \frac{(E_{\max} - E_{\min})}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{\text{Konzentration}} \right)^{\text{Hillkoeffizient}}}$$

E_{\min} und E_{\max} (in diesem Fall 0 und 100 % Blockade) definieren die Grenzen der sigmoidalen Kurve, der Hillkoeffizient gibt die Steigung der Kurve an.

5.3 Elektrophysiologische Untersuchungen

5.3.1 Untersuchungen am Kv1.3-Kanal

Alle synthetisierten Verbindungen (Kapitel 3.3, Seite 35) wurden am Kv1.3-Kanal hinsichtlich ihrer blockierenden Eigenschaften getestet.

Wie bereits erwähnt, gehört dieser Kanal wie alle Mitglieder der *Shaker*-Familie mit Ausnahme von Kv1.4 zu den *delayed rectifier*-Kanälen. Bei den durchgeführten *patch-clamp*-Untersuchungen steigt der Strom nach Aktivierung durch Depolarisation rasch an und nimmt dann während des 200 ms andauernden Depolarisationspulses aufgrund einer C-Typ-Inaktivierung kontinuierlich ab.

Ein charakteristisches Merkmal des Kv1.3-Kanals ist die so genannte *use-dependence*, eine kumulative Inaktivierung und damit einhergehende starke Abnahme der Stromamplitude bei repetitiver Aktivierung mit hoher Frequenz (1 Hz) (Grissmer et al., 1990). Aus diesem Grund ist es erforderlich, bei der Untersuchung von Kv1.3-Kanälen die einzelnen Depolarisationspulse im Abstand von 30 s zu setzen, damit eine Rückkehr aus dem inaktivierten Zustand ermöglicht wird.

Im Folgenden sind Konzentrationsangaben grundsätzlich als Darstellung der Peakstromblockade zu verstehen, da diese Größe der entscheidende Parameter ist.

5.3.1.1 Chirale Verbindungen

Die Ergebnisse der Untersuchungen der chiralen Verbindungen am Kv1.3-Kanal sind in Tabelle 5.4 aufgeführt. Unabhängig von der Chiralität der Substanzen kann Folgendes beobachtet werden:

Zum einen inhibiert das 8-O-alkylierte Xanthotoxolderivat **1** den Kaliumionenstrom weit schwächer als sein Stellungsisomer (*RS*)-5-(2-Hydroxypropoxy)psoralen (**3**), welches den Kanal mit einer EC_{50} von 15 μ M blockiert; für (*RS*)-8-(2-Hydroxypropoxy)psoralen (**1**) wurde auf die Bestimmung der halbmaximal wirksamen Konzentration verzichtet, da eine 50 μ M-Lösung lediglich zu einer Stromreduktion von 13 % führte.

Im Hinblick auf die Chemie der Seitenkette kann eine klare Abgrenzung zwischen dem sauerstofffreien Derivat **13** und den übrigen sauerstoffhaltigen Verbindungen

gezogen werden. (*RS*)-5-(2-Phenylpropoxy)psoralen (**13**) hemmt den Kv1.3-Strom mit einer EC_{50} von 72 nM, alle anderen Substanzen sind erst bei wesentlich höheren Konzentrationen im μM -Bereich wirksam.

Bei den Derivaten **1**, **3**, **R-4** und **S-4** übt neben der vorhandenen Sauerstoff-Funktion möglicherweise das Fehlen eines anderen Strukturelementes einen zusätzlichen negativen Einfluss auf die Wirksamkeit aus. So enthalten diese Verbindungen im Gegensatz zu den besseren Blockern **6**, **7** und **13** keinen Phenylrest in der Seitenkette.

Substanz	Peakstrom	Endstrom
1	13 % (50 μM)	47 % (50 μM)
3	15 μM	7 μM
R-4	6.7 μM	5.4 μM
S-4	5.7 μM	4.7 μM
6	2.0 μM	1.1 μM
R-6	1.8 μM	1.1 μM
S-6	1.7 μM	1.0 μM
7	1.6 μM	0.9 μM
13	72 nM	61 nM

Tab. 5.4: EC_{50} -Werte der Stromblockaden der chiralen Substanzen am Kv1.3-Kanal.

Zwei Enantiomerenpaare wurden getestet, um Aussagen bezüglich möglicher stereodiskriminierender Wechselwirkungen zwischen der untersuchten Substanzklasse und dem Kanalprotein treffen zu können.

Die experimentellen Daten (Tabelle 5.4) belegen, dass zumindest die ausgewählten Derivate **R-4/S-4** und **R-6/S-6** stereoselektiv mit ihrer Bindungsstelle interagieren.

Die zwei 5-(3-Hydroxy-2-methylpropoxy)psoralene **R-4** und **S-4** inhibieren den Kaliumionenstrom mit EC_{50} -Werten von 6.7 μM bzw. 5.7 μM , dieser Unterschied ist nicht signifikant.

Noch eindeutiger sind die Untersuchungen der 5-(2-Hydroxy-2-phenylethoxy)psoralene. Zusätzlich zu den beiden Enantiomeren **R-6** und **S-6** stand auch das Razemat **6** zur Verfügung. Alle drei Verbindungen blockieren den Kv1.3-Kanal halbmaximal in nahezu identischen Konzentrationen (1.8 μM , 1.7 μM bzw. 2.0 μM). Sehr anschaulich dargestellt wird dieses Resultat durch die Konzentrations-Wirkungskurven in Abbildung 5.3.

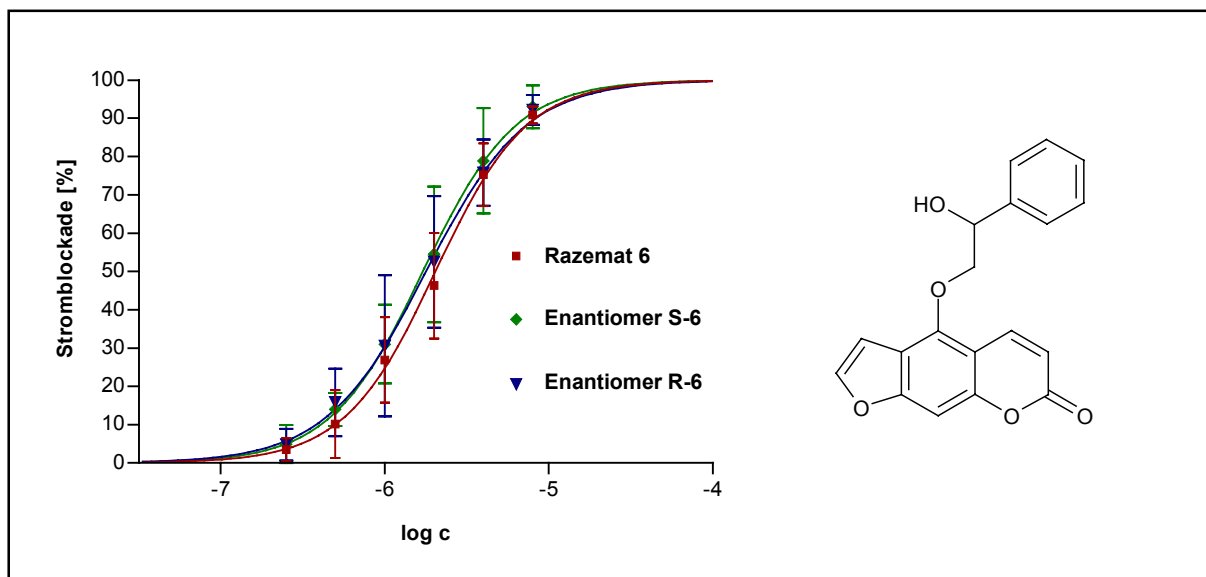


Abb. 5.3: Konzentrations-Wirkungs-Kurven des Razemates 6 und der Enantiomere R-6 und S-6 am Kv1.3-Kanal.

5.3.1.2 Achirale Verbindungen

Die ermittelten EC_{50} -Werte der Blockaden von Peak- und Endstrom am Kv1.3-Kanal sind für die achiralen Psoralene in Tabelle 5.5 aufgeführt.

Auffällig ist der weite Konzentrationsbereich, in dem die unterschiedlichen Substanzen den Kaliumionenstrom zu hemmen vermögen. Zwischen der wirksamsten Verbindung **11**, 5-(4-Phenylbutoxy)psoralen mit einer EC_{50} von 2.9 nM, und dem am wenigsten potenten Derivat 5-(3-Hydroxypropoxy)psoralen (**2**), welches den Kanal erst in einer Konzentration von 38 μ M halbmaximal blockiert, erstreckt sich der Wirkungsbereich etwa über den Faktor 10^4 .

Zwei Effekte bestätigen Beobachtungen, die schon bei den chiralen Derivaten gemacht wurden. Auch bei den achiralen Derivaten hat eine Sauerstoff-Funktion in der Seitenkette negative Auswirkungen auf die Wirksamkeit. Die 5-Phenylalkoxy-psoralene **8** bis **16** und die 5-Cyclohexylalkoxy-psoralene **17** bis **19** mit sauerstofffreier Seitenkette blockieren den Kaliumionenstrom halbmaximal mit geringeren Konzentrationen als 300 nM. In großem Abstand dazu bewegen sich die EC_{50} -Werte der Psoralene **2** (5-(3-Hydroxypropoxy)psoralen) und **5** (5-Phenacyloxy-psoralen), sie wirken beide erst im μ M-Bereich.

Ebenso hat die Abwesenheit einer Phenylsubstitution in der Seitenkette bei der Substanz **2** einen ungünstigen Effekt auf die Blockadepotenz, betrachtet im Vergleich mit dem deutlich besseren Blocker 5-Phenacyloxy-psoralen (**5**).

Substanz	Peakstrom	Endstrom
2	38 μM	26 μM
5	2.2 μM	1.4 μM
8	280 nM	212 nM
9	169 nM	103 nM
10	6.3 nM	5.0 nM
11	2.9 nM	2.4 nM
12	6.1 nM	5.3 nM
14	172 nM	146 nM
15	68 nM	63 nM
16	3.5 nM	3.5 nM
17	138 nM	117 nM
18	132 nM	111 nM
19	144 nM	133 nM

Tab. 5.5: EC_{50} -Werte der Stromblockaden der achiralen Substanzen am Kv1.3-Kanal.

Ein massiver Anstieg der Wirksamkeit zeigt sich innerhalb der homologen Reihe der 5-Phenylalkoxy-psoralene (**8** bis **12**). Die Verlängerung der Alkylkette von zwei auf drei und mehr Methylengruppen führt zu Substanzen, die den Kv1.3-Kanal im einstelligen nanomolaren Bereich (2.9 bis 6.3 nM) inhibieren. Exemplarisch sind die Strom-Zeit-Kurven einer Konzentrationsreihe des 5-(3-Phenylpropoxy)psoralens (**10**) am Kv1.3-Kanal in Abbildung 5.4 dargestellt. Die jeweiligen Spuren entsprechen dem Strom nach Erreichen des *steady-states*, d. h. des Blockade-Gleichgewichts, das sich für den Kontrollwert nach fünf bis zehn Depolarisationspulsen und unter Einfluss der Verbindung **10** nach etwa 15 Pulsen einstellt.

Zu den hochpotenten Verbindungen gehört mit einer EC_{50} von 3.5 nM außerdem 5-(4-Biphenyl)methoxy-psoralen (**16**).

Die dramatische Verbesserung der Blockadepotenz innerhalb der Gruppe der homologen 5-Phenylalkoxyderivate **8** bis **12** veranschaulicht die Graphik der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der fünf Derivate (Abbildung 5.5).

Deutlich sichtbar in der Darstellung ist ferner die große Steigung der Kurven. Für die hochwirksamen Psoralene ergeben sich daraus Hillkoeffizienten um 2. Dieser Parameter ist ein Maß für die Kooperativität von Bindungen zwischen Ligand und Rezeptor. Eine Interpretation dieses Ergebnisses erfolgt in der Diskussion (Kapitel 7.1.4, Seite 107).

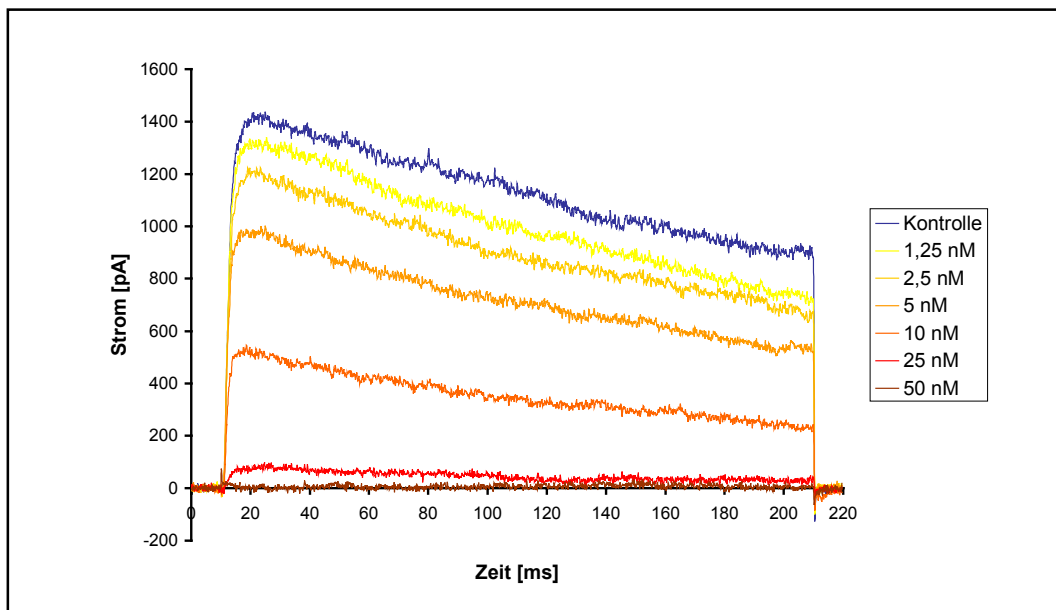


Abb. 5.4: Strom-Zeit-Kurven der Verbindung 10 am Kv1.3-Kanal. Dargestellt sind jeweils die Stromspuren nach Einstellung des Blockade-Gleichgewichts.

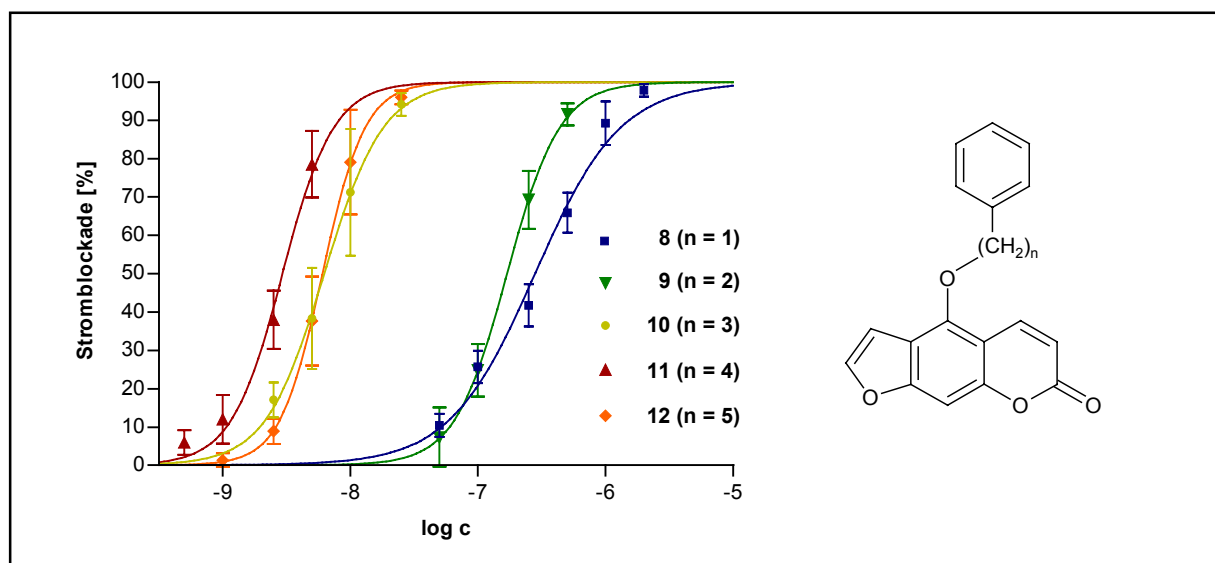


Abb. 5.5: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der homologen 5-Phenylalkoxy-psoralene **8** bis **12** am Kv1.3-Kanal.

Blockadekinetik der neuen Psoralene

Hinsichtlich der Blockadekinetik weisen die drei hochpotenten Derivate **11**, **12** und **16** Unterschiede gegenüber den übrigen Psoralenen auf (Abbildung 5.6). Bei den schwächer wirksamen Verbindungen sind zwei Vorgänge zu beobachten, und zwar besonders deutlich bei Konzentrationen oberhalb der EC_{50} .

Zum einen erfordert die Entfaltung der vollen Blockadewirkung ein wiederholtes Öffnen der Kanäle, d. h. bei jedem neuen Depolarisationspuls nimmt die Stromamplitude zunächst ab. Bei den schwächer wirksamen Psoralenen werden dabei die Differenzen in den Spitzenströmen von Puls zu Puls stetig kleiner, bis nach spätestens 15 Aktivierungen schließlich ein Gleichgewicht erreicht ist.

Weiterhin kommt es während der jeweils ersten drei bis vier Depolarisationen zu einer beschleunigten Stromabnahme, die Kurven fallen steiler ab. Beim Erreichen des Blockadegleichgewichts ist dieser Effekt nicht mehr sichtbar.

Beispielhaft sind in Abbildung 5.6 (oben) für 5-(2-Phenylethoxy)psoralen (**9**) jeweils die ersten fünf von zwanzig Strom-Zeit-Kurven für die Kontrolle (Natrium-Ringerlösung) und zwei Konzentrationen dargestellt.

Die mittlere Graphik in Abbildung 5.6 soll die Blockadekinetik der stärker wirksamen Verbindungen **11**, **12** und **16** verdeutlichen.

Bei diesen Substanzen nimmt die Stromamplitude in den meisten Experimenten über die Dauer aller zwanzig Depolarisationspulse nahezu gleichmäßig ab. Weder die Steigung der Strom-Zeit-Kurven verändert sich gegenüber der Kontrolle signifikant, noch stellt sich ein eindeutiges Gleichgewicht ein. Um eine Vergleichbarkeit aller ermittelten EC_{50} -Werte zu gewährleisten, wurden die Messungen jedoch trotzdem nach 20 Depolarisationspulsen beendet.

Ein weiterer Unterschied zu den schwächer wirksamen Psoralenen fällt bei Betrachtung der ersten Stromkurve einer neuen Konzentration auf. Sie liegt bei den weniger potenten Psoralenen erheblich, bei den drei Derivaten **11**, **12** und **16** jedoch meist nur geringfügig über dem Gleichgewichtsstrom der vorhergehenden Konzentration.

Die Verbindung **10**, welche ebenfalls zu den hochpotenten Derivaten zählt, kann bezüglich ihrer Blockadekinetik nicht den Psoralenen **11**, **12** und **16** zugeordnet werden, sie ähnelt eher der Mehrzahl der übrigen Substanzen.

Die untere Graphik in Abbildung 5.6 stellt das Verhältnis von Peak- und Endstrom für alle 20 Depolarisationspulse jeweils einer Konzentration der Verbindungen **9** und **12** dar. Die Daten entsprechen den Mittelwerten verschiedener Messungen. Die eingezeichneten Ausgleichskurven veranschaulichen in erster Linie die unterschiedlichen Verläufe bzw. Steigungen der Stromspuren während der ersten vier Pulse.

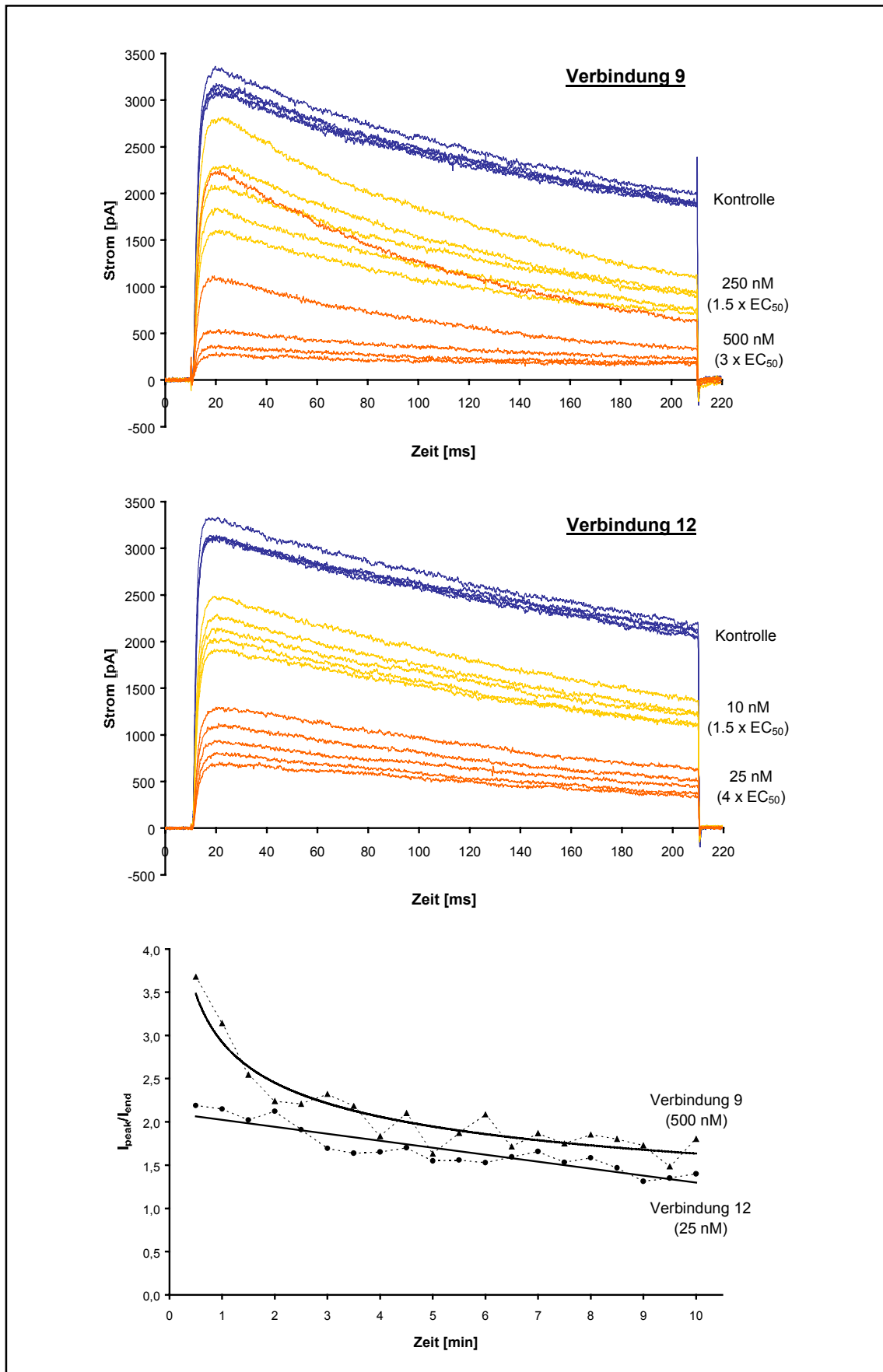


Abb. 5.6: Strom-Zeit-Kurven der Verbindungen 9 (oben) und 12 (mitte) am Kv1.3-Kanal. Dargestellt sind jeweils die ersten fünf von zwanzig Stromspuren für die angegebenen Konzentrationen. Unten: Quotient aus Peak- und Endstrom ausgewählter Konzentrationen der Derivate 9 und 12 für jeweils 20 Depolarisationspulse.

Allen Substanzen, d. h. sowohl den achiralen als auch den chiralen Derivaten, gemein ist eine mäßige Auswaschbarkeit in den hohen Konzentrationen, welche am Ende jeder Konzentrationsreihe getestet wurden. Der Blockadeeffekt, der dann etwa zwischen 80 und 100 % liegt, ist selbst durch ausgiebiges Spülen mit substanzfreier Ringerlösung nur teilweise reversibel.

5.3.1.3 Untersuchungen zum Blockademechanismus

Charakteristik der Blockade des inaktivierten Kanalzustands

Ein Großteil der bekannten nichtpeptidischen Kv1.3-Blocker hemmt den Kaliumionenstrom auf eine Weise, die als *use-dependent*-Blockade bezeichnet wird. Dabei binden die Substanzen offensichtlich an eine Konformation des Kanals, die nach Aktivierung erreicht wird, also an den offenen oder inaktivierten Zustand. Das führt dazu, dass die Stromabnahme bei jedem neuen Depolarisationspuls und damit verbundener wiederholter Öffnung der Kanäle zunimmt, bis sie schließlich ein Gleichgewicht erreicht. Ausführlich beschrieben und untersucht ist dieses Wirkprinzip unter anderem für die Verbindungen CP-339,818 (Nguyen et al., 1996) und UK-78,282 (Hanson et al., 1999), beide interagieren mit dem inaktivierten Kanal.

Auch die in dieser Arbeit getesteten Psoralenderivate zeigen eine Blockadekinetik, die auf eine zumindest teilweise stattfindende Wechselwirkung mit dem inaktivierten Zustand schließen läßt. Zur näheren Untersuchung dieses Phänomens existieren verschiedene Möglichkeiten, von denen zwei im Folgenden beschrieben werden.

1) Die Verwendung von Kalium-Ringerlösung mit 164.5 mM Kalium als externe Lösung verlangsamt die C-Typ-Inaktivierung, ohne die Aktivierung des Kanals zu verändern (Grissmer und Cahalan, 1989; López-Barneo et al., 1993), und stellt eine einfache Methode dar, den Einfluss der getesteten Substanzen auf die Inaktivierung des Kv1.3-Kanals zu untersuchen.

2) Durch Variation der Pulsdauer wird der Anteil der Kanalpopulation verändert, welcher sich im inaktivierten Zustand befindet. Eine Verlängerung des Depolarisationspulses von 200 ms auf 2 s erhöht die Zahl der inaktivierten Kanäle und sollte dazu führen, dass das auf gleichem Niveau verbleibende Blockadegleichgewicht schneller, also nach weniger Pulsen erreicht wird. Umgekehrt wirkt sich eine kürzere Pulsdauer von 20 ms aus. Dieses Phänomen ist sowohl beim CP-339,818 (Nguyen et al., 1996) als auch beim UK-78,282 (Hanson et al., 1999) zu beobachten.

Bekannte Untersuchungen zum Blockademechanismus von 5-Benzyloxypsoralen (8)

Die beiden bisher beschriebenen Experimente wurden für ein Phenylalkoxy-psoralen-derivat, 5-Benzyloxypsoralen (**8**), bereits durchgeführt (Herzog, 2000). Herzog konnte zeigen, dass die Verbindung bei verminderter Inaktivierung in Kalium-Ringerlösung deutlich schwächere Blockadeigenschaften am Kv1.3-Kanal besitzt als in Natrium-Ringerlösung.

Im Gegensatz dazu spricht die Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Blockade allerdings gegen eine alleinige Interaktion der Substanz mit dem inaktivierten Zustand des Kanals. Das Derivat **8** blockt den Kanal bei einer Pulsdauer sowohl von 200 ms als auch von 20 ms mit einer ähnlichen Kinetik, das Gleichgewicht wird nahezu gleich schnell erreicht.

Außerdem verschiebt sich das Blockadegleichgewicht. Die Substanz hemmt den Kaliumionenstrom bei einem 20 ms-Puls weniger effektiv als bei einem Puls von 200 ms.

Insgesamt folgerte Herzog aus ihren Beobachtungen, dass 5-Benzyloxypsoralen (**8**) verschiedene Konformationen des Kanals angreift. Vermutlich sind Wechselwirkungen mit dem offenen und dem inaktivierten Zustand für die blockierende Wirkung der Verbindung verantwortlich.

Untersuchung von 5-(3-Phenylpropoxy)psoralen (10) am H404T-Kv1.3-Kanal

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mit 5-(3-Phenylpropoxy)psoralen (**10**) als eine der hochwirksamen, zu 5-Benzyloxypsoralen (**8**) homologen Substanzen eine Testung an einer Mutante des Kv1.3-Kanals durchgeführt werden, um der Frage näher nachzugehen, inwieweit die neuen potenten Psoralenderivate mit dem inaktivierten Zustand des Kanals interagieren.

Leider gelang nur eine einzelne Messung; in Verbindung mit Untersuchungen am Wildtyp-Kanal in Kalium-Ringerlösung soll das Ergebnis dieses Experiments jedoch trotzdem vorgestellt werden.

In der untersuchten Kanalmutante ist im externen Porenbereich die Aminosäure Histidin in Position 404 durch Threonin ersetzt. Der Kanal ist gekennzeichnet durch eine wesentlich geringere C-Typ-Inaktivierung als der Wildtyp, während das Aktivierungsverhalten unverändert ist.

Es tritt keine kumulative Inaktivierung auf, nach 10 Depolarisationspulsen der Frequenz 1 Hz sinkt der Strom nur auf 98 % des Ausgangswertes ab, im Gegensatz zu einer Reduktion auf 26 % beim Wildtyp-Kv1.3 (Rauer und Grissmer, 1996). Aus diesem Grund konnten die Depolarisationspulse im Experiment alle 10 s ausgelöst werden, es war nicht wie beim Wildtyp notwendig, eine Erholung aus der Inaktivierung abzuwarten.

An einer Zelle wurden nacheinander die Konzentrationen 2.5 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 100 nM, 500 nM und 1 μ M vermessen. Abbildung 5.7 zeigt die Strom-Zeit-Kurven des H404T-Kanals unter Einfluss der Verbindung **10**.

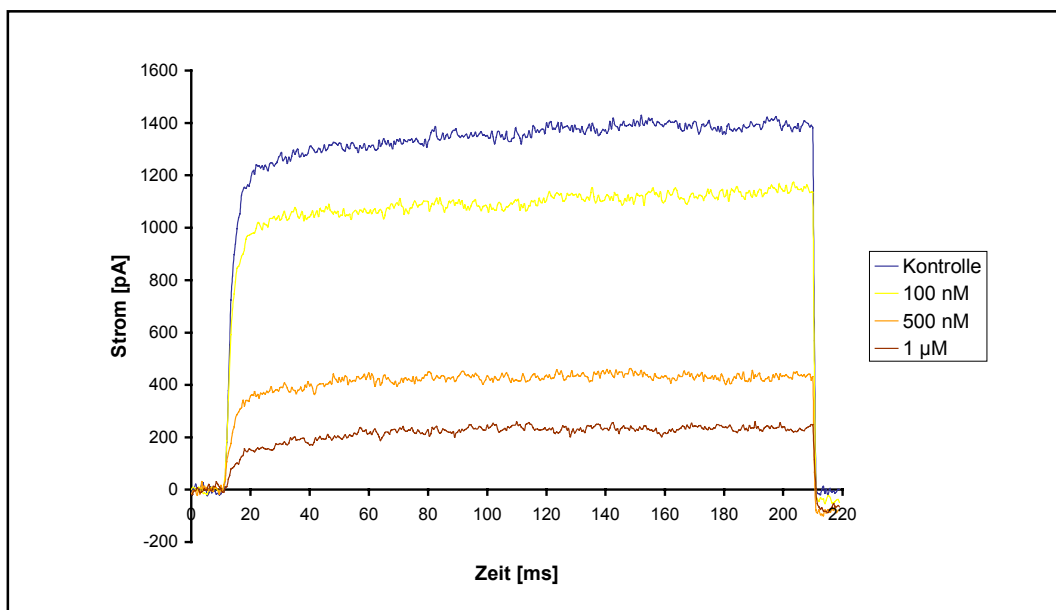


Abb. 5.7: Strom-Zeit-Kurven der Verbindung 10 an der H404T-Mutante des Kv1.3-Kanals. Dargestellt sind jeweils die Stromspuren nach Einstellung des Blockade-Gleichgewichts.

Nach jeweils etwa 10 bis 15 Pulsen erreicht die Stromabnahme ein Gleichgewicht, die Blockadekinetik ähnelt derjenigen am Wildtyp-Kanal. Es ist zu erkennen, dass 5-(3-Phenylpropoxy)psoralen (**10**) an der Mutante deutlich schwächer wirkt. Erst ab 100 nM, einer Konzentration, die dem 15fachen der EC_{50} für den Wildtyp-Kv1.3 entspricht, tritt durch Stromreduktion von etwa 16 % ein erster Effekt auf. Am Wildtyp würde diese Konzentration eine vollständige Stromblockade bewirken, am H404T-Kanal gelingt dies nicht einmal mit der Konzentration 1 μ M.

Untersuchung von 5-(3-Phenylpropoxy)psoralen (**10**) am Kv1.3-Wildtyp in Kalium-Ringerlösung

Zur Absicherung des Ergebnisses der Messung an der H404T-Kv1.3-Mutante wurde die Verbindung **10** am Wildtyp-Kv1.3-Kanal in Kalium-Ringerlösung untersucht. Die Stromantwort des Kv1.3-Kanals auf depolarisierende Pulse führt unter diesen Bedingungen zu charakteristischen Unterschieden im Vergleich mit Messungen in Natrium-Ringerlösung (Cahalan et al., 1985; Grissmer und Cahalan, 1989). Neben der Verringerung der C-Typ-Inaktivierung treten während der Deaktivierung im Anschluß an den Depolarisationspuls einwärts gerichtete *tail*-Ströme auf (Abbildung 5.8).

Die Kinetik der Blockade ist in Kalium-Ringerlösung gegenüber den Messungen in Natrium-Ringerlösung unverändert. Ein Gleichgewicht der Stromamplitude stellt sich nach etwa 15 Pulsen ein. Der Strom wird durch die Konzentration 100 nM durchschnittlich zu etwa 13 % blockiert, also mit ähnlicher Potenz wie beim H404T-Kanal. Strom-Zeit-Kurven der Testung sind exemplarisch in Abbildung 5.8 dargestellt.

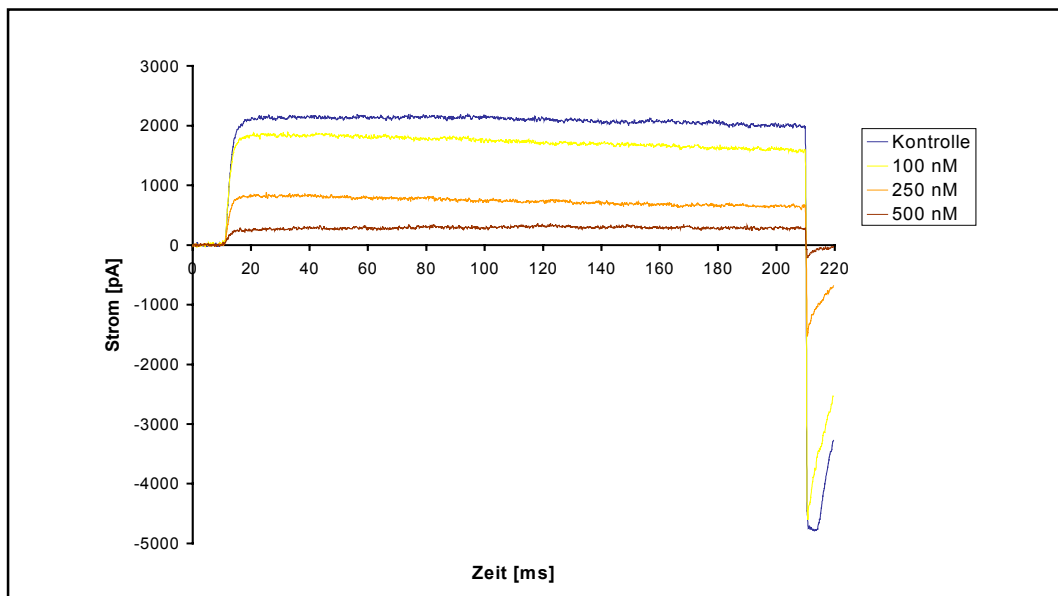


Abb. 5.8: Strom-Zeit-Kurven der Verbindung 10 am Kv1.3-Kanal in Kalium-Ringerlösung. Dargestellt sind jeweils die Stromspuren nach Einstellung des Blockade-Gleichgewichts.

5.3.2 Untersuchung der Selektivität gegenüber Natrium- und Kaliumkanälen von Neuroblastom-Zellen

Bei den N1E-115-Zellen handelt es sich um einen adrenergen Klon, der aus dem Neuroblastom-Tumor C1300 der Maus stammt. Die Zellen exprimieren eine Reihe verschiedener Ionenkanäle.

Aus der Familie der spannungsabhängigen Kaliumkanäle sind bisher zwei Mitglieder mit unterschiedlichen Einzelkanal-Leitfähigkeiten beschrieben worden (Quandt, 1988), in einem Fall handelt es sich dabei offensichtlich um Kv2.1 (Quandt, persönliche Mitteilung, 1998). Weiterhin wurde mRNA für Kv3.1 (Hirsh und Quandt, 1996) und den *Shaker*-Kanal Kv1.4 (Quandt, persönliche Mitteilung, 1998) gefunden. Als Repräsentanten calciumabhängiger Kaliumkanäle wurden ein BKCa- (Diserbo et al., 1994) und ein SKCa-Kanal (Hugues et al., 1982) nachgewiesen.

Hirsh und Quandt identifizierten einen spannungsabhängigen Natriumkanal als Typ II-Kanal (Hirsh und Quandt, 1996; Nav1.2 nach Goldin, 1999). Weiterhin wurden zwei spannungsabhängige Calciumkanäle beschrieben (Narahashi et al., 1987).

Substanz	Natriumstrom	Selektivität für Kv1.3	Kaliumpeakstrom	Kaliumendstrom	Selektivität für Kv1.3
8	11.9 µM	43	1.9 µM	0.7 µM	7
9	6.9 µM	41	1.5 µM	0.4 µM	9
10	2.5 µM	397	0.8 µM	0.2 µM	127
11	1.4 µM	483	0.9 µM	0.3 µM	310
12	1.6 µM	262	0.8 µM	0.5 µM	131
13	1.8 µM	25	0.5 µM	0.2 µM	7
14	7.0 µM	41	2.0 µM	0.5 µM	12
15	2.6 µM	38	1.1 µM	0.4 µM	16
16	> 1 µM	> 286	> 0.5 µM	> 0.5 µM	> 143
17	6.6 µM	48	1.6 µM	0.6 µM	12
18	1.5 µM	11	1.1 µM	0.4 µM	8
19	1.2 µM	8	0.9 µM	0.5 µM	6

Tab. 5.6: EC₅₀-Werte der Stromblockaden der 5-Phenyl- und 5-Cyclohexylalkoxy-psoralene an Natrium- und Kaliumkanälen von N1E-115-Zellen und Selektivitäten für Kv1.3 (EC₅₀ Natrium N1E-115 / EC₅₀ Kv1.3 bzw. EC₅₀ Kalium N1E-115 / EC₅₀ Kv1.3, ermittelt aus den Peakströmen).

Die Testungen an N1E-115-Zellen wurden in erster Linie durchgeführt, um die Selektivität der Psoralenderivate **8** bis **19** gegenüber einem spannungsabhängigen Natriumkanal zu untersuchen. Auf die Vermessung der an Kv1.3 schwächer wirkenden Verbindungen **1** bis **7** wurde verzichtet. Neben den Effekten auf den Natriumkanal wurden in den Experimenten parallel auch die Wirkungen auf die spannungsabhängigen Kaliumströme ermittelt.

Alle Ergebnisse sind in Tabelle 5.6 zusammengefasst. Sämtliche Substanzen blockieren die Natrium- und Kaliumkanäle der N1E-115-Zellen im μM -Bereich und damit deutlich schlechter als den Kv1.3-Kanal.

Auffällig ist, dass sich die an Kv1.3 außerordentlich wirksamen Verbindungen **10**, **11**, **12** und **16** in ihrem Effekt an den Neuroblastomzellen nicht spürbar von den übrigen Psoralenen unterscheiden. Die sprunghafte Zunahme der Blockadeaktivität, wie sie am Kv1.3-Kanal zu beobachten war, wiederholt sich nicht. Daraus resultieren für die vier 5-Phenylalkoxy-psoralene hervorragende Selektivitäten für den *Shaker*-Kanal. Für 5-(4-Biphenyl)methoxy-psoralen (**16**) konnten keine EC_{50} -Werte ermittelt werden, da alle eingesetzten Konzentrationen zu ähnlichen Blockaden führten, was wahrscheinlich an der schlechten Löslichkeit der Substanz lag. Maximal wurde eine Stromreduktion von etwa 40 % erreicht.

Exemplarisch für die Verbindung **10** sind in der Abbildung 5.9 die Strom-Zeit-Kurven verschiedener Konzentrationen am Natriumkanal der Neuroblastomzellen dargestellt.

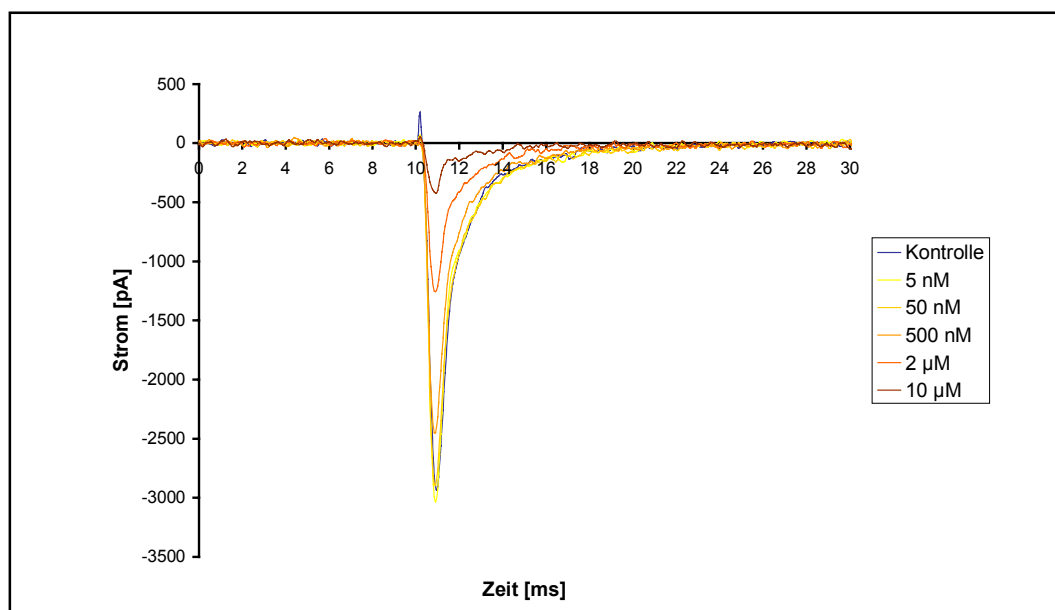


Abb. 5.9: Strom-Zeit-Kurven der Verbindung 10 am spannungsabhängigen Natriumkanal von N1E-115-Zellen.

5.3.3 Untersuchung der Selektivität ausgewählter Verbindungen gegenüber Kanälen der Kv1- und Kv3-Familien

5.3.3.1 Testung an Kv1.2

Die Elektrophysiologie des Kv1.2-Kanals unterscheidet sich markant von derjenigen des Kv1.3-Kanals: Erstens läuft die Aktivierung mit deutlich geringerer Geschwindigkeit ab, zweitens steigt bei einer Folge von 1 Hz-Pulsen der Strom stetig bis zum Erreichen eines Gleichgewichts an (nicht abgebildet).

Eine Erklärung für das zweite Phänomen kann die Existenz verschiedener geschlossener Zustände des Kanals sein, die dieser nach Depolarisation durchlaufen muss, um seine offene Konformation zu erreichen. Es ist vorstellbar, dass die Zeit der Repolarisation nicht ausreicht, um wieder in den Ausgangszustand zu gelangen, falls mindestens einer der darauf folgenden geschlossenen Zustände eine längere Lebensdauer als dieser besitzt. Das würde bei einer weiteren Depolarisation zu einer schnelleren Öffnung des Kanals führen (Grissmer et al., 1994).

Die vier potentesten Blocker an Kv1.3, die drei Verbindungen **10** bis **12** der homologen Phenylalkoxy-psoralen-Reihe und 5-(4-Biphenyl)methoxy-psoralen (**16**), die gleichzeitig hochselektiv gegenüber spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanälen der N1E-115-Zellen sind, wurden am Kv1.2-Kanal untersucht, um erste Erkenntnisse im Hinblick auf die Selektivität der Substanzen gegenüber einem anderen Mitglied der Kv1-Familie zu gewinnen. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 5.7 aufgeführt.

Substanz	Peakstrom	Endstrom	Selektivität für Kv1.3
10	259 nM	137 nM	41
11	49 nM	48 nM	17
12	37 nM	34 nM	6
16	18 nM	17 nM	5

Tab. 5.7: EC₅₀-Werte der Stromblockaden der 5-Phenylalkoxy-psoralene **10 und **11** am Kv1.2-Kanal und Selektivitäten für Kv1.3 (EC_{50 Kv1.2}/EC_{50 Kv1.3}, ermittelt aus den Peakströmen).**

Alle vier Verbindungen sind gut wirksame Antagonisten am Kv1.2-Kanal, besitzen aber ungeachtet dessen eine Präferenz für den Kv1.3-Kanal.

5-(3-Phenylpropoxy)psoralen (**10**) hebt sich mit einer EC_{50} von 259 nM von den anderen drei Psoralenen ab und besitzt eine ausgeprägte, über 40fache Selektivität für den Kv1.3-Kanal. Die übrigen Derivate blockieren den Kv1.2-Kanal alle in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich zwischen 18 und 49 nM. Für die Verbindung **11** ergibt sich daraus zwar eine Selektivität von 17, im Falle der Substanzen **12** und **16** sind die Wirkunterschiede zwischen den Kanälen mit Faktoren von 6 bzw. 5 jedoch deutlich geringer.

Wie schon an Kv1.3 können für die vier Substanzen unterschiedliche Blockadekinetiken beobachtet werden. Bei drei von vier Messungen der Verbindung **10** werden Stromspuren erhalten, wie sie im oberen Teil der Abbildung 5.10 dargestellt sind. Der Strom fällt während der ersten Depolarisationspulse in größeren Sprüngen ab und erreicht nach etwa 15 Pulsen ein Gleichgewicht.

Die untere Graphik in Abbildung 5.10 zeigt Strom-Zeit-Kurven des Psoralens **11**, die repräsentativ für alle der insgesamt 13 Experimente der Derivate **11**, **12** und **16** sind. Der Spitzenstrom sinkt gleichmäßig während der gesamten Messdauer.

Somit unterscheidet sich dasjenige Psoralenderivat mit abweichender Wirkstärke an Kv1.2 (**10**) auch charakteristisch im Zeitverlauf der Blockade von den übrigen drei Substanzen.

Aufgrund der Ergebnisse der Untersuchungen am Kv1.2-Kanal wurden die Substanzen **10** und **11** für die Testung an weiteren Kanälen ausgewählt.

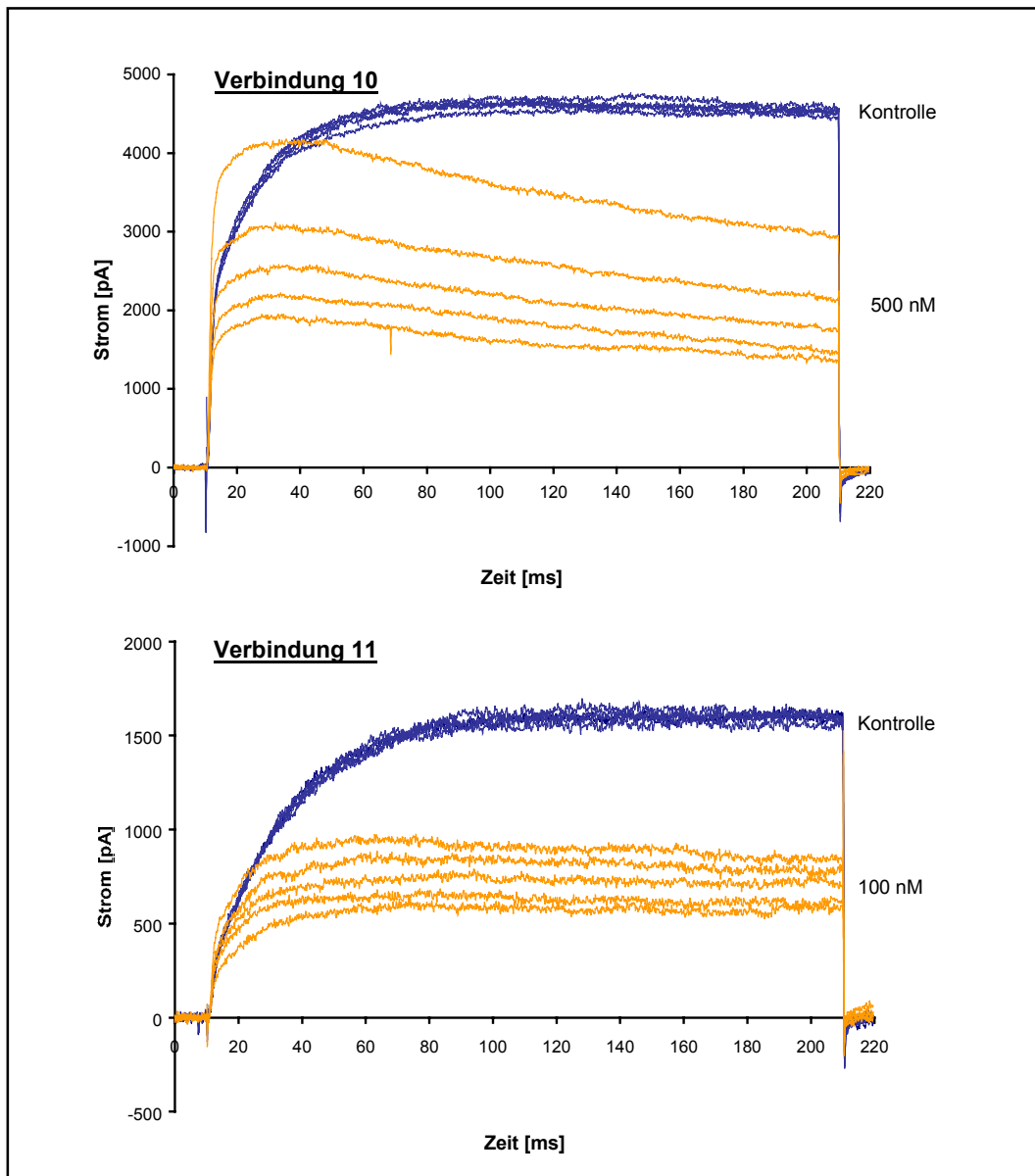


Abb. 5.10: Strom-Zeit-Kurven der Verbindungen 10 (oben) und 11 (unten) am Kv1.2-Kanal. Dargestellt sind die ersten fünf von zwanzig Stromspuren für Konzentrationen, die jeweils etwa der doppelten EC_{50} entsprechen.

5.3.3.2 Testung an Kv1.1

Die Verbindungen **10** und **11** blockieren den Kv1.1-Kanal etwa 20fach schwächer als Kv1.3 (Tabelle 5.8). Hinsichtlich der Blockadekinetik der beiden Psoralene ergeben sich ähnliche Beobachtungen wie in den Testungen an Kv1.3 und Kv1.2 (Abb. 5.11).

Substanz	Peakstrom	Endstrom	Selektivität für Kv1.3
10	150 nM	137 nM	24
11	62 nM	61 nM	21

Tab. 5.8: EC₅₀-Werte der Stromblockaden der Psoralene **10** und **11** am Kv1.1-Kanal und Selektivitäten für Kv1.3 ($EC_{50\text{ Kv1.1}}/EC_{50\text{ Kv1.3}}$; ermittelt aus den Peakströmen).

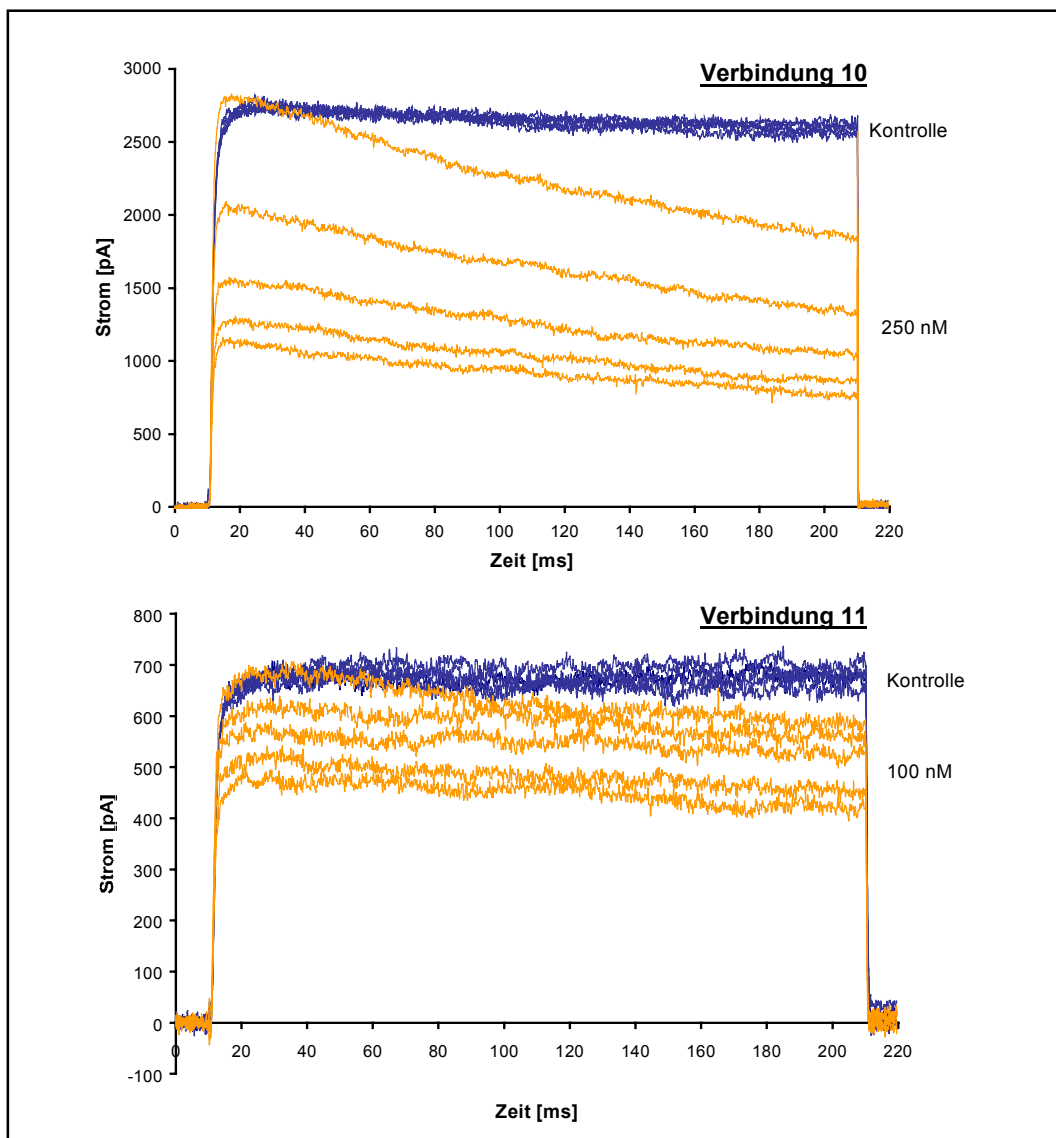


Abb. 5.11: Strom-Zeit-Kurven der Verbindungen **10** (oben) und **11** (unten) am Kv1.1-Kanal. Dargestellt sind die ersten fünf von zwanzig Stromspuren für Konzentrationen, die jeweils etwa der doppelten EC₅₀ entsprechen.

5.3.3.3 Testung an Kv1.5

Die Untersuchung der Psoralene **10** und **11** am Kv1.5-Kanal führte nur zu gering ausgeprägten Präferenzen zugunsten des Kv1.3-Kanals. Beide Verbindungen blockieren Kv1.5 mit EC₅₀-Werten von 24 nM bzw. 7.4 nM sehr potent, für die Selektivität resultieren daraus lediglich Faktoren kleiner 5 (Tabelle 5.9).

Substanz	Peakstrom	Endstrom	Selektivität für Kv1.3
10	24 nM	20 nM	3.8
11	7.4 nM	6.3 nM	2.6

Tab. 5.9: EC₅₀-Werte der Stromblockaden der 5-Phenylalkoxy-psoralene **10** und **11** am Kv1.5-Kanal und Selektivitäten für Kv1.3 ($EC_{50\text{ Kv1.5}}/EC_{50\text{ Kv1.3}}$, ermittelt aus den Peakströmen).

In Bezug auf die Blockade kinetik an Kv1.5 konnten für die beiden Verbindungen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Abbildung 5.12 zeigt exemplarisch die Strom-Zeit-Kurven einer Konzentrationsreihe des 5-(3-Phenylpropoxy)-psoralens (**10**).

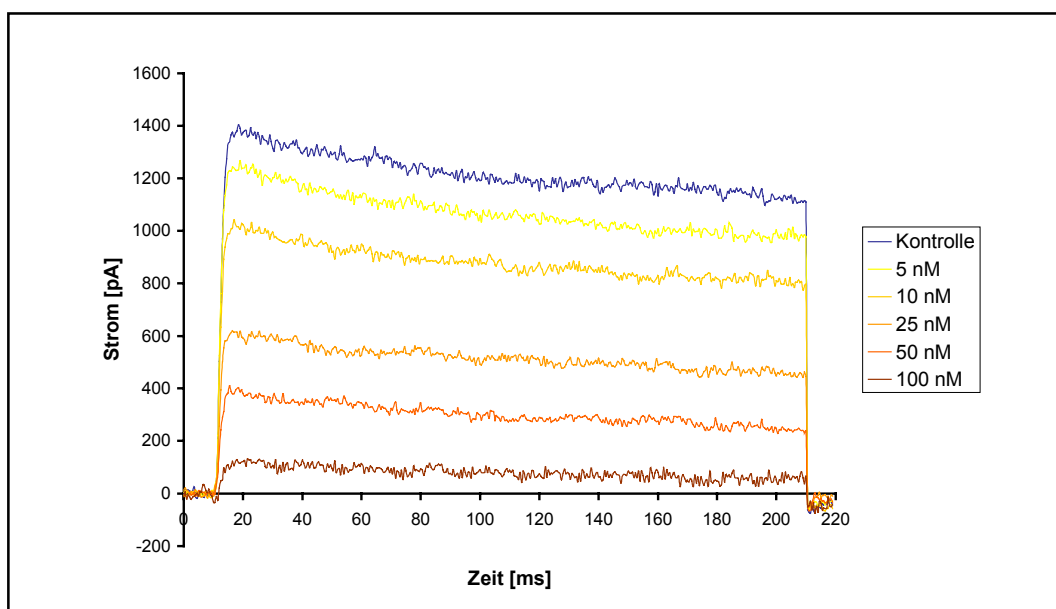


Abb. 5.12: Strom-Zeit-Kurven der Verbindung **10** am Kv1.5-Kanal. Dargestellt sind jeweils die Stromspuren nach Einstellung des Blockade-Gleichgewichts.

5.3.3.4 Testung an Kv1.4

Die Untersuchung von Kv1.4-Strömen war nur an injizierten RBL-Zellen im Labor von Prof. Dr. S. Grissmer in Ulm möglich. Mangels Routine in dieser Technik gelang während des zeitlich begrenzten Aufenthalts nur eine einzelne Messung der Substanz **10**, das Ergebnis ist deshalb nicht abgesichert.

Die zur transienten Transfektion verwendete cRNA kodiert für den Kv1.4-Kanal des Afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*, dieser Kanal entspricht in seinen biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften aber den bekannten Säugtier-Analoga aus Mensch, Ratte und Maus (Kerschbaum et al., 2002). Die Frequenz der Depolarisationsimpulse betrug wegen der kumulativen Inaktivierung des Kanals 20 s.

Als einziges Mitglied der Kv1-Familie zeigt der Kv1.4-Kanal einen Strom vom A-Typ. Der Stromverlauf zeichnet sich also üblicherweise neben einer schnellen Aktivierung auch durch eine schnelle Inaktivierung aus, hervorgerufen durch eine N-Typ-Inaktivierung, die zusätzlich zur C-Typ-Inaktivierung abläuft.

Bei dem durchgeführten Experiment (Abbildung 5.13) zeigte der Strom allerdings nicht den charakteristischen Zeitverlauf; ein A-Typ-Strom hätte bereits nach wenigen Millisekunden mit großer Geschwindigkeit abfallen müssen. Offensichtlich wird jedoch das *gating* bzw. die Inaktivierung des Kv1.4-Kanals vom Redoxstatus beeinflusst (Ruppersberg et al., 1991). Untersuchungen mit Cystein-modifizierenden Reagenzien zeigten, dass oxidierende Manipulationen zu einer Stabilisierung des offenen Zustands führen, dabei wird die Inaktivierung zurückgedrängt und die Deaktivierung verlangsamt (Stephens et al., 1996). Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem gemessenen Strom trotz der unerwarteten Kinetik um einen Kv1.4-Strom handelt.

Abbildung 5.13 vermittelt einen Eindruck des Blockadevermögens des Psoralens **10** an Kv1.4. Nach diesen Daten würde sich die Selektivität der Substanz gegenüber dem Kv1.3-Kanal in einem ausreichenden Bereich bewegen. Durch die Konzentration 100 nM, die etwa dem 15fachen der EC_{50} an Kv1.3 entspricht, wird der Strom an Kv1.4 um weit weniger als 50 % reduziert.

Auf eine Interpretation der Blockadekinetik wird verzichtet, da es sich lediglich um eine Einzelmessung handelt.

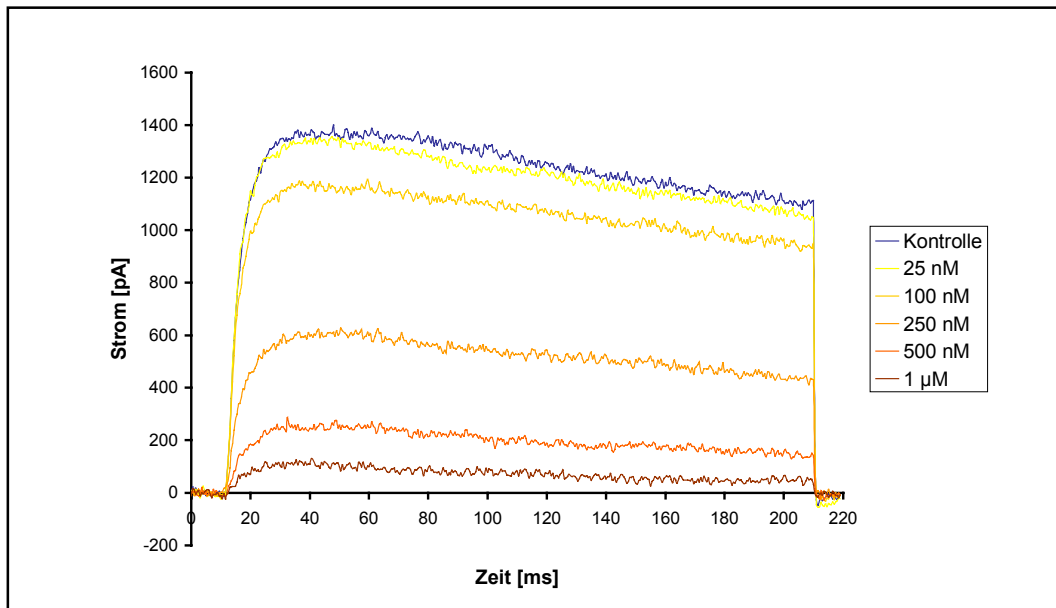


Abb. 5.13: Strom-Zeit-Kurven der Verbindung 10 am Kv1.4-Kanal. Dargestellt sind jeweils die Stromspuren nach Einstellung des Blockade-Gleichgewichts.

5.3.3.5 Testung an Kv1.7

Die Testung der Psoralene **10** und **11** an Kv1.7 wurde freundlicherweise von Frau Dr. H. Wulff, Department of Physiology and Biophysics, Universität Irvine, USA, an transient transfizierten COS-7-Zellen (Bardien-Kruger et al., 2002) durchgeführt. Das Messprotokoll entsprach dem in Kapitel 5.2.3.4 (Seite 68) beschriebenen, die Depolarisationspulse wurden alle 30 s ausgelöst. Der Strom zeigt ein schnelles Aktivierungsverhalten und eine langsame Inaktivierung (Bardien-Kruger et al., 2002).

Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 5.10 aufgeführt. Die Verbindungen besitzen mit Faktoren über 30 gute Selektivitäten für den Kv1.3-Kanal.

Substanz	Peakstrom	Selektivität für Kv1.3
10	200 nM	32
11	100 nM	34

Tab. 5.10: EC₅₀-Werte der Stromblockaden der 5-Phenylalkoxy-psoralene 10 und 11 am Kv1.7-Kanal und Selektivitäten für Kv1.3 (EC₅₀ Kv1.7/EC₅₀ Kv1.3, ermittelt aus den Peakströmen).

5.3.3.6 Testung an Kv3.1

Als ein Vertreter der *Shaw*-Familie wurde der neuronale Kv3.1b-Kanal untersucht. Neben diesem Kanal existiert auch eine Kv3.1a-Variante, die beiden Isoformen unterscheiden sich jedoch lediglich im C-Terminus des Kanalproteins. Die elektrophysiologischen Eigenschaften beider Kanäle gleichen sich, offensichtlich werden die *Splice*-Varianten aber in verschiedenen Regionen neuronaler Gewebe oder sogar einzelner Nervenzellen exprimiert (Ozaita et al., 2002).

Der Kv3.1-Stromverlauf ist gekennzeichnet durch eine schnelle Aktivierung und langsame Inaktivierung des Kanals. Eine kumulative Inaktivierung findet nicht statt.

Die beiden Testsubstanzen **10** und **11** blockieren den Kv3.1-Strom auf gänzlich verschiedene Weise als es zuvor bei den Kv1-Kanälen zu beobachten war. Die Stromreduktion erfordert kein mehrmaliges Öffnen der Kanäle, das Blockadegleichgewicht ist sofort beim ersten Depolarisationspuls erreicht.

Diese unmittelbare Aktivität der Verbindungen lässt auf einen Blockademechanismus schließen, der unabhängig vom inaktivierten oder geschlossenen Zustand des Kanals ist. Offensichtlich interagieren die Psoralene während der Depolarisation mit der offenen Konformation und lösen sich zwischen den einzelnen Pulsen wieder vom Kanal.

Weiterhin ist auffällig, dass die Stromabnahme während der Depolarisation konzentrationsabhängig eine Beschleunigung erfährt. Abbildung 5.14 veranschaulicht dieses Phänomen durch Darstellung einer Konzentrationsreihe des Derivates **10**.

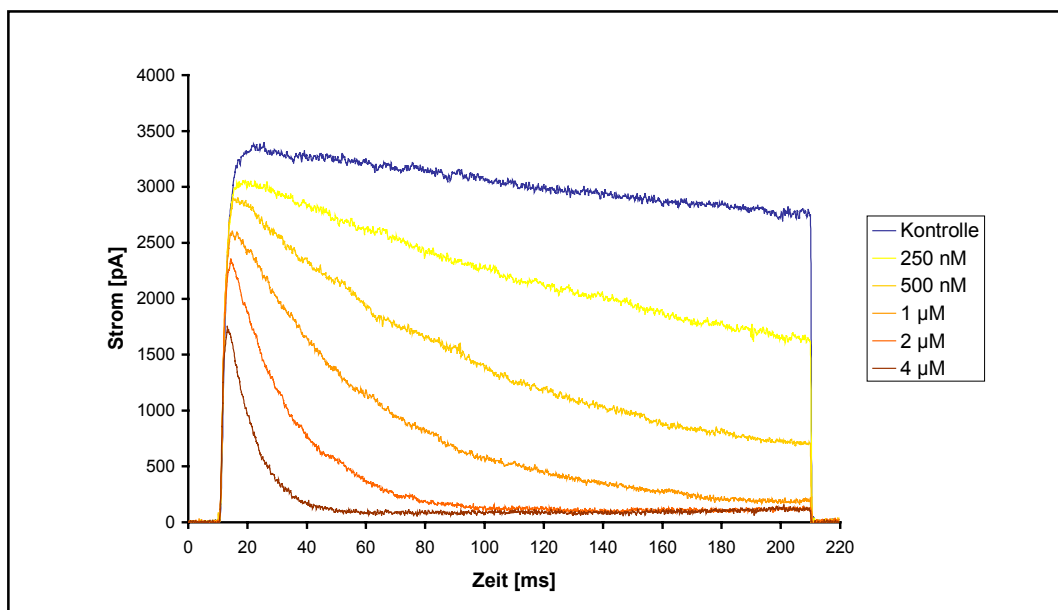


Abb. 5.14: Strom-Zeit-Kurven der Verbindung 10 am Kv3.1-Kanal.

Beide Substanzen blockieren den Kv3.1-Peakstrom wenig potent, so dass ausgeprägte Selektivitäten für den Kv1.3-Kanal resultieren (Tabelle 5.11).

Aufgrund der geringen Wirksamkeit und der eingeschränkten Löslichkeit der Verbindungen im μM -Bereich konnten für den Peakstrom keine EC_{50} -Werte ermittelt werden.

Substanz	Peakstrom	Endstrom	Selektivität für Kv1.3
10	> 1 μM	0.5 μM	> 159
11	> 1 μM	0.5 μM	> 345

Tab. 5.11: EC_{50} -Werte der Stromblockaden der 5-Phenylalkoxy-psoralene 10 und 11 am Kv3.1-Kanal und Selektivitäten für Kv1.3 ($\text{EC}_{50 \text{ Kv3.1}}/\text{EC}_{50 \text{ Kv1.3}}$, ermittelt aus den Peakströmen).

5.4 Bestimmung der Wiederfindungsrate der Testsubstanzen im *patch-clamp*-Experiment

In der elektrophysiologischen Testung wurden viele recht lipophile Verbindungen untersucht. In den Arbeiten von Herzog und Möller wurde bereits beschrieben, dass derartige Substanzen zu einem gewissen Anteil an das Schlauchmaterial des verwendeten Perfusionssystems oder die Wandungen der Petrischälchen adsorbiert werden (Herzog, 2000; Möller, 2000).

Aus diesem Grund wurden exemplarisch für die 5-Phenylalkoxy-psoralene **10** und **11** die Wiederfindungsraten im Petrischälchen (ohne Zellen) mithilfe der Hochleistungsflüssigchromatographie im Konzentrationsbereich von 1 nM bis 3 μ M (**10**) bzw. 4 μ M (**11**) ermittelt. Die Durchführung der Perfusionsuntersuchung wurde bei den beiden Verbindungen in einigen Punkten variiert, um den Einfluss verschiedener Parameter auf die im *patch-clamp*-Experiment an den Zellen vorliegende Substanzkonzentration einschätzen zu können.

5.4.1 Material und Geräte

Pump 600	Waters
Scanning Fluorescence Detector 474	Waters
Controller 600	Waters
Säule: Hypersil-ODS, 5 μ m, 25 cm	Thermo Hypersil, Kleinostheim

Für die Herstellung des Fließmittels wurden bidestilliertes Wasser und Acetonitril in HPLC-Qualität (J.T. Baker) verwendet.

5.4.2 Methode

Die Hochleistungsflüssigchromatographie erfolgte isokratisch an einer Umkehrphase und bei einer Temperierung auf 20 °C. Als Fließmittel wurde eine Mischung aus Wasser und Acetonitril in der Zusammensetzung 30/70 gewählt, die Flussrate betrug 1.0 ml/min. Die Substanzen wurden fluorimetrisch bei $\lambda_{\text{EX}} = 312$ nm und $\lambda_{\text{EM}} = 489$ nm detektiert; gegenüber einer UV-Detektion bei 312 nm konnte die Bestimmungsgrenze damit von 5 nM auf 100 pM gesenkt werden. Die Substanzlösungen wurden mit Natrium-Ringerlösung pH 7.4 hergestellt, der DMSO-Gehalt betrug 2 %.

Zunächst wurden für die beiden Verbindungen durch eine Vierfach-Bestimmung Kalibriergeraden erzeugt, d. h. jeweils zwei Proben aus zwei verschiedenen gleich konzentrierten Testlösungen wurden vermessen. Da ein sehr großer Konzentrationsbereich untersucht wurde, musste die Verstärkung in der chromatographischen Analytik ab einer gewissen Konzentration geändert werden. Deshalb war es erforderlich, mit zwei Kalibriergeraden zu arbeiten, zum einen im Bereich 1 nM bis 50 nM, zum anderen im Bereich 100 nM bis 3 μ M (**10**) bzw. 4 μ M (**11**).

Die Linearität der Kalibriergeraden verschlechterte sich bei Konzentrationen oberhalb 1 μ M. Es ist davon auszugehen, dass eine vollständige Lösung der Substanzen in diesem Bereich nicht mehr gegeben ist, weswegen solche Konzentrationen in den *patch-clamp*-Untersuchungen nur begrenzt eingesetzt wurden.

Vor den einzelnen Perfusionen zur Bestimmung der Wiederfindung wurde das Schlauchsystem zur Entfernung von Substanzresten mit jeweils 30 ml Methanol und 30 ml Wasser gereinigt. Als Untersuchungslösungen wurden Proben aus denselben Lösungen verwendet, wie sie schon für die Kalibrierung genutzt worden waren, ebenfalls in Form von zwei Doppelbestimmungen.

Das perfundierte Volumen der Testlösungen betrug, wie auch im *patch-clamp*-Experiment, 16 ml. Zu- und Ablauf des Petrischälchens wurden so eingestellt, dass jeweils ein Volumen von mindestens 2 ml im Schälchen vorlag. Die Lösungen wurden über eine 500 μ l-Injektionsschleife in das HPLC-System injiziert. Zu diesem Zweck wurde die Injektionsschleife mit dem gesamten Inhalt der Petrischälchen (2 bis 2.5 ml) gespült.

Zur Auswertung wurde aus den Geradengleichungen der Kalibriergeraden der Soll-Wert der einzelnen Konzentrationen ermittelt, zu dem der gefundene Ist-Wert aus den Perfusionsexperimenten prozentual ins Verhältnis gesetzt wurde.

Verbindung 11:

Für die Substanz **11** wurden zwei Perfusionsreihen durchgeführt. Vor Einspülen der Testlösungen wurde das Schlauchsystem in der ersten Versuchsreihe mit Natrium-Ringerlösung pH 7.4 (2 % DMSO) vorgespült. Auf diese Weise sollte die maximale Substanzmenge, die durch Adsorption verloren geht, bestimmt werden.

In der zweiten Versuchsreihe wurde das Schlauchsystem mit einer Substanzlösung in der nächstgeringeren Konzentration vorbehandelt, z. B. mit 100 nM bei Untersuchung der Konzentration 500 nM. Hierdurch sollten die Bedingungen im *patch-clamp*-Experiment möglichst nah imitiert werden. Dort wurden bei der Ermittlung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven die Substanzlösungen zunehmender Konzentration ebenfalls ohne zwischenzeitliche Spülschritte mit Ringerlösung appliziert.

Die Proben für die chromatographische Gehaltsbestimmung wurden nach einer Einwirkzeit von 15 min (einschließlich der Perfusionsdauer) aus dem Petrischälchen entnommen, da bei der Testung an Kv1.3-Kanälen 20 Depolarisationsimpulse in einem Abstand von je 30 s gesetzt wurden und damit bis zum Ende der Messung ebenfalls mehr als 10 min vergingen.

Verbindung 10:

Auch für das Derivat **10** wurde die Wiederfindung in zwei Versuchsreihen untersucht. In beiden Durchläufen wurde das Schlauchsystem vor Applikation der zu untersuchenden Konzentration mit einer Substanzlösung in der nächstgeringeren Konzentration vorgespült.

Die Probennahme aus dem Petrischälchen erfolgte dann allerdings zu zwei verschiedenen Zeitpunkten, entweder direkt im Anschluss an die Perfusion oder nach einer Wartezeit von 15 min. Dadurch sollte festgestellt werden, wie stark eine Anlagerung der Verbindungen an das Petrischälchen neben der Adsorption an das Schlauchmaterial zu dem Substanzverlust in der Testlösung beiträgt.

5.4.3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Perfusionsuntersuchungen sind in den Tabellen 5.12 und 5.13 zusammengefasst. Es fällt auf, dass sich die Wiederfindung der Substanzen zu den eingesetzten Konzentrationen direkt proportional verhält. Bei höheren Konzentrationen ist der prozentuale Verlust durch Adsorptionsprozesse geringer, es kommt also offenbar zu einer Absättigung des Systems.

Die Daten in den rechten Spalten beider Tabellen sind unmittelbar miteinander vergleichbar, sie wurden nach Vorspülen des Perfusionssystems mit der jeweils nächstgeringer konzentrierten Substanzlösung und einer Wartezeit von 15 min ermittelt.

Beide Derivate werden den Lösungen zu einem beträchtlichen Teil entzogen. Die Wiederfindung des Psoralens **10** bewegt sich zwischen 41 und 62 %, die des lipophileren Derivates **11** ist mit 35 bis 72 % überwiegend sogar noch geringer. Diese Tendenz wird bestätigt durch vergleichbare Ergebnisse für das weniger lipophile 5-Benzyloxypsoralen **8**, im Konzentrationsbereich von 250 nM bis 5 µM konnten dort 47 bis 66 % der Substanz detektiert werden (Herzog, 2000).

Konzentration [nM]	Wiederfindung [%] Substanz 10	
	Messung sofort nach Perfusion	Messung nach 15 min Einwirkzeit
1	49 ± 3	41 ± 6
5	50 ± 6	44 ± 1
10	50 ± 3	44 ± 3
50	52 ± 2	41 ± 2
100	53 ± 1	49 ± 4
500	61 ± 1	50 ± 1
1000	63 ± 2	52 ± 2
2000	65 ± 4	59 ± 3
3000	68 ± 1	62 ± 1

Tab. 5.12: Wiederfindungsrate der Substanz 10. Das Perfusionssystem wurde vor Einspülen der Testlösung mit der jeweils nächstgeringer konzentrierten Lösung vorgespült.

Konzentration [nM]	Wiederfindung [%] Substanz 11	
	Nur Reinigung mit Methanol und Wasser	Nach Reinigung Vorspülen mit der nächstgeringer konzentrierten Lösung
1	27 ± 8	38 ± 1
5	27 ± 3	35 ± 8
10	23 ± 3	39 ± 2
50	27 ± 1	36 ± 5
100	29 ± 4	36 ± 4
500	28 ± 5	38 ± 1
1000	33 ± 8	43 ± 7
2000	43 ± 3	59 ± 4
4000	-	72 ± 1

Tab. 5.13: Wiederfindungsrate der Substanz 11 nach 15 min Einwirkzeit.

Erwartungsgemäß ist die Wiederfindung größer, wenn sie ohne Wartezeit direkt nach der Perfusion bestimmt wird (Tabelle 5.12), die Differenz beider Versuchsreihen des Derivates **10** entspricht dem an das Petrischälchen adsorbierten Substanzanteil. Im

Falle der Verbindung **11** steigt der Substanzverlust durch Anlagerung an eine unbelastete, noch nicht beladene Oberfläche, wenn das Schlauchsystem vor der Perfusion nicht mit Substanzlösung vorgespült wird (Tabelle 5.13).

Diese Ergebnisse belegen, dass die erhaltenen EC_{50} -Werte der elektrophysiologischen Testungen nicht als Absolutwerte verstanden werden dürfen, sie müssen im Zusammenhang mit den Versuchsbedingungen gesehen werden.

Denn neben einer offensichtlichen Unterbewertung der Blockadepotenz durch zu geringe Substanzkonzentrationen im Petrischälchen muss auf der anderen Seite berücksichtigt werden, dass für die Konzentrations-Wirkungs-Kurven aus Zeitgründen mehrere Konzentrationen ohne Auswaschen direkt hintereinander vermessen wurden. Dieses Vorgehen führte wahrscheinlich zu additiven Effekten, wenngleich im *patch-clamp*-Experiment in stichprobenhaften Einzelmessungen hoher Konzentrationen vergleichbare Stromblockaden wie innerhalb der Konzentrations-Wirkungs-Kurven ermittelt wurden.

6 Untersuchungen am Lymphozyten

Die Untersuchungen der an Kv1.3 hochwirksamen 5-Phenylalkoxy-psoralene **10** und **11** an humanen T-Lymphozyten wurden freundlicherweise von Frau Dr. H. Wulff, Department of Physiology and Biophysics, Universität Irvine, USA, durchgeführt.

6.1 *Patch-clamp*-Untersuchungen am lymphozytären Kv1.3-Kanal

Zum Vergleich mit den Messungen am Kv1.3-Klon wurden *patch-clamp*-Untersuchungen an humanen T-Lymphozyten durchgeführt.

Zur Gewinnung der Zellen (Details bei Wulff et al., 2000) wurden zunächst periphere mononukleäre Zellen aus heparinisierten Blutproben mittels eines Separationsmediums abgetrennt. Nach einer Ruhephase von 24 Stunden wurden die Zellen mit anti-CD3-Antikörper aktiviert. Direkt vor der elektrophysiologischen Messung wurden die T-Lymphozyten durch Reinigung über Nylon-Wolle isoliert. Das Pulsprotokoll entspricht dem der Testungen am Kv1.3-Klon.

Die Ergebnisse am Lymphozyten bestätigen die am Kv1.3-Klon erhaltenen Daten, es werden nahezu identische EC_{50} -Werte für die Peakstromblockaden erhalten (Tabelle 6.1).

Substanz	Kv1.3 Lymphozyt	Kv1.3 Klon
10	7 nM	6.3 nM
11	3 nM	2.9 nM

Tab. 6.1: EC_{50} -Werte der Peakstromblockaden der 5-Phenylalkoxy-psoralene **10 und **11** am lymphozytären bzw. am klonierten Kv1.3-Kanal.**

6.2 Lymphozyten-Proliferation

Die [3 H]Thymidin-Inkorporation in Lymphozyten ist ein Maß für die Proliferationsleistung dieser Zellen. Die aktivierten Lymphozyten bauen während ihres Teilungszyklus das [3 H]Thymidin in Form radioaktiv markierter Nukleotide in die neu synthetisierte DNA ein. Der hemmende Einfluss der 5-Phenylalkoxy-psoralene **10** und **11** auf den [3 H]Thymidin-Einbau wurde untersucht.

6.2.1 Methode

Periphere mononukleäre Zellen wurden mittels eines Lymphozyten-Separations-Mediums (Histopaque-1077, Sigma) aus frischem heparinisiertem Vollblut isoliert und in RPMI-1640-Medium aufgenommen. Dem Medium waren 10 % fetales Kälberserum (FBS), 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt.

Die ruhenden Zellen wurden in eine 96 *well*-Flachboden-Platte in der Zahl 2×10^5 Zellen pro *well* (Vertiefung) ausgesät und mit den Testsubstanzen für 1 h inkubiert. Zusätzlich zu den Psoralen-Derivaten wurde das Seeanemonen-Toxin ShK als Vergleichssubstanz getestet. Anschließend wurden die Zellen für 48 h mit 50 ng/ml löslichem Anti-CD3-Antikörper (Biomeda) stimuliert, die [3 H]Thymidin-Zugabe erfolgte für die letzten 8 h in der Konzentration 1 µCi/*well*. Danach wurden die Zellen mit Wasser lysiert und die Fragmente auf Glasfiber-Filtern gesammelt. Die Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler ermittelt.

Als Blindwert für den Stoffwechsel nicht aktivierter Zellen dienten unstimulierte, ruhende Zellen, für den 100 %-Wert wurden aktivierte Zellen herangezogen; in beiden Fällen wurde keine Testsubstanz zugesetzt. Zur Ermittlung der korrigierten Werte des [3 H]Thymidin-Einbaus wurde jeweils der Blindwert abgezogen.

6.2.2 Ergebnisse

Alle drei Verbindungen inhibieren sehr potent die Proliferation der Lymphozyten. Der [3 H]Thymidin-Einbau wird halbmaximal mit Konzentrationen gehemmt, die etwa der 40fachen EC_{50} der Kv1.3-Blockade entsprechen. Dieser bei allen Substanzen vergleichbare Faktor der Proportionalität zwischen Kanalblockade und Hemmung der Proliferation weist darauf hin, dass die Psoralene genau wie ShK allein durch Interaktion mit Kv1.3 die [3 H]Thymidin-Inkorporation unterbinden, zusätzliche Effekte können ausgeschlossen werden.

Substanz	Kv1.3-Blockade (EC_{50})	[3 H]Thymidin-Einbau (EC_{50})	EC_{50} Kv1.3 / EC_{50} Proliferation
ShK	11 pM (Kalman et al., 1998)	400 pM	36
Psoralen 10	7 nM	250 nM	36
Psoralen 11	3 nM	125 nM	42

Tab. 6.2: Vergleich der Effekte des Toxins ShK und der Verbindungen 10 und 11 auf den Kv1.3-Strom und die Proliferation von T-Lymphozyten.

Die Ergebnisse der Bestimmung des [³H]Thymidin-Einbaus unter Einfluss der Verbindungen **10** und **11** sind in Tabelle 6.2 und Abbildung 6.1 dargestellt.

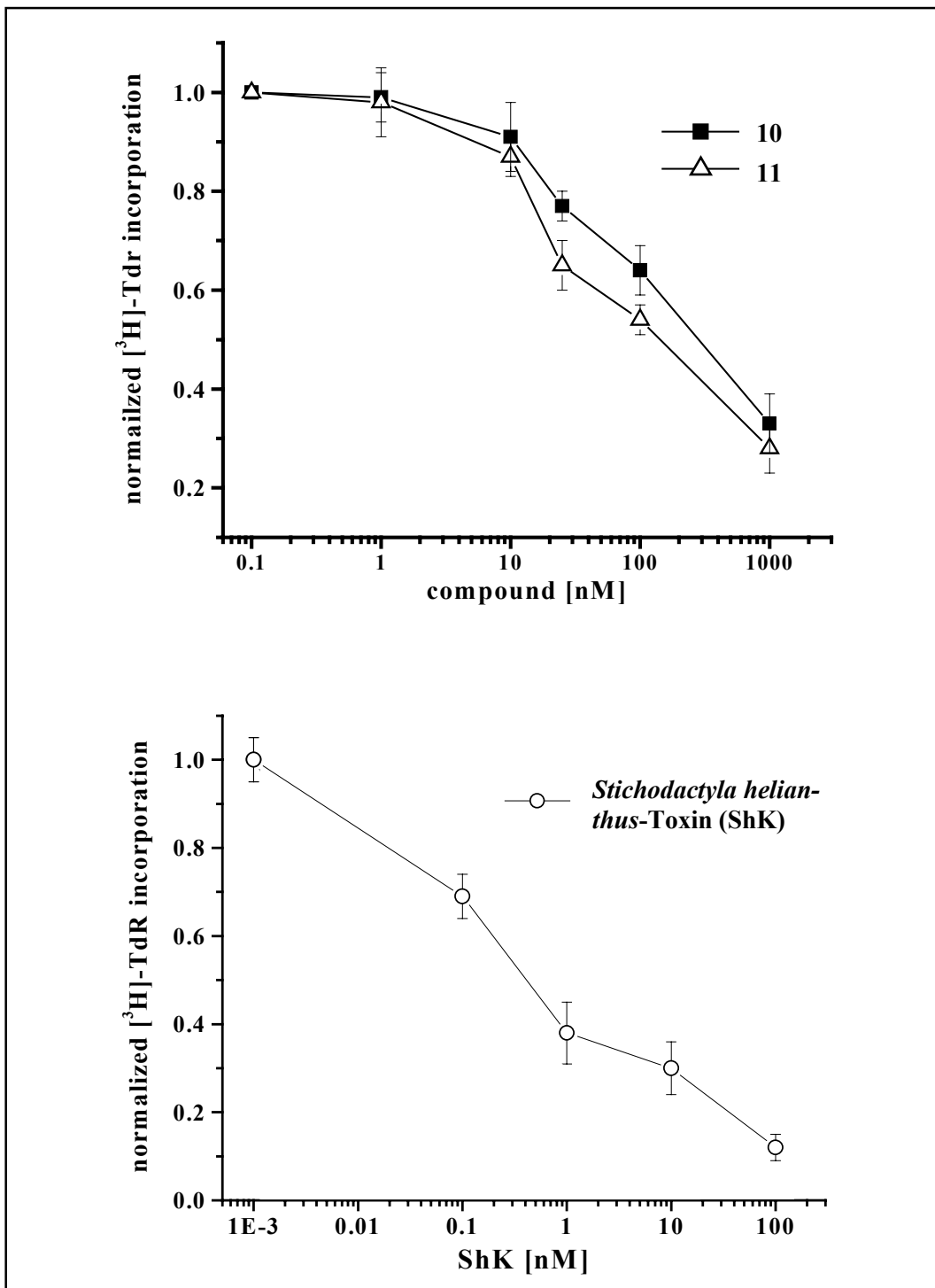


Abb. 6.1: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Hemmung der [³H]Thymidin-Inkorporation durch die Psoralene 10 und 11 (oben) und das Peptid ShK (unten). Auf der Ordinate sind die Werte für die normalisierte [³H]Thymidin-Inkorporation aufgetragen, d. h. die Quotienten aus den jeweiligen Messergebnissen der einzelnen Konzentrationen und des 100 %-Wertes.

7 Diskussion

7.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

7.1.1 Bedeutung der Chiralität enantiomerer Psoralene am Kv1.3-Kanal

In der vorliegenden Arbeit wurden für die zwei Enantiomerenpaare **R-4/S-4** und **R-6/S-6** die Blockadeigenschaften am Kv1.3-Kanal bestimmt, in beiden Fällen konnte kein stereoselektiver Effekt festgestellt werden. Die Substanzen blockieren den Kanal mit EC₅₀-Werten von 6.7 und 5.7 µM (**R-4/S-4**) bzw. 1.8 und 1.7 µM (**R-6/S-6**).

Die chirale Information der untersuchten Psoralene befindet sich in der Seitenkette. Ein Grund für die nicht vorhandene Stereoselektivität kann deshalb sein, dass die Seitenketten dieser vier Derivate nicht an einer Bindung mit dem Kanalprotein beteiligt sind.

Weiterhin ist es denkbar, dass die Chiralität der Verbindungen zu gering ausgeprägt ist, und dass z. B. sterisch anspruchsvollere Substituenten am Stereozentrum zu diskriminierenden Effekten am Rezeptor führen würden. Mit Substanz **7** könnte dieser Aspekt untersucht werden. Im Vergleich zu den Enantiomeren **R-6** und **S-6** enthält das Derivat **7** am asymmetrischen Kohlenstoffatom eine Hydroxymethyl- statt einer einfachen Hydroxylfunktion. Allerdings ist zu bedenken, dass sich eine Sauerstoff-Funktion in der Seitenkette ungünstig auf die Bindung an den Kv1.3-Kanal auswirkt, wie in Abschnitt 7.1.2 diskutiert, so dass stereoselektive Effekte möglicherweise auch deshalb nicht zum Tragen kommen.

Das racemische Gemisch der Verbindung **7** ließ sich in der HPLC-Analytik mit guter Auflösung trennen, eine präparative Isolierung der Enantiomere zur Untersuchung dieser Frage war aus Kostengründen jedoch nicht möglich.

Mit (*RS*)-5-(2-Phenylpropoxy)psoralen (**13**) existiert ein weiteres chirales Derivat. Es ist an Kv1.3 sehr wirksam (EC₅₀ = 72 nM) und besitzt keine Sauerstoff-Funktion in der Seitenkette. Die Untersuchung der beiden Enantiomere könnte deshalb zu anderen Ergebnissen führen als für **R-4/S-4** und **R-6/S-6** beschrieben. Die reinen Enantiomere waren jedoch weder auf synthetischem Weg noch durch eine Razemat-Trennung zugänglich.

Das in der Einführung erläuterte Beispiel der am Kv1.5-Kanal wirksamen Lokal-anästhetika (Kapitel 1.4.2.1, Seite 29) zeigt, dass bereits geringe strukturelle Unter-

schiede darüber entscheiden können, ob eine chirale Verbindung am Rezeptor zu stereoselektiven Effekten führt oder nicht.

Die Untersuchung der zwei Enantiomerenpaare **R-4/S-4** und **R-6/S-6** kann deshalb nur erste Hinweise auf die Struktur-Wirkungs-Beziehungen chiraler Psoralene am Kv1.3-Kanal liefern, eine abschließende Beurteilung ist aus dem begrenzten Datensatz nicht möglich.

7.1.2 Struktur-Wirkungs-Beziehungen der neuen Psoralene am Kv1.3-Kanal

Die Untersuchungen der neuen Psoralenderivate an Kv1.3 bestätigen einige grundlegende Ergebnisse, die schon aus vorangegangenen Arbeiten bekannt waren (Sanmann, 1995; Wulff, 1998; Herzog, 2000), Abbildung 7.1 soll diese Zusammenhänge verdeutlichen.

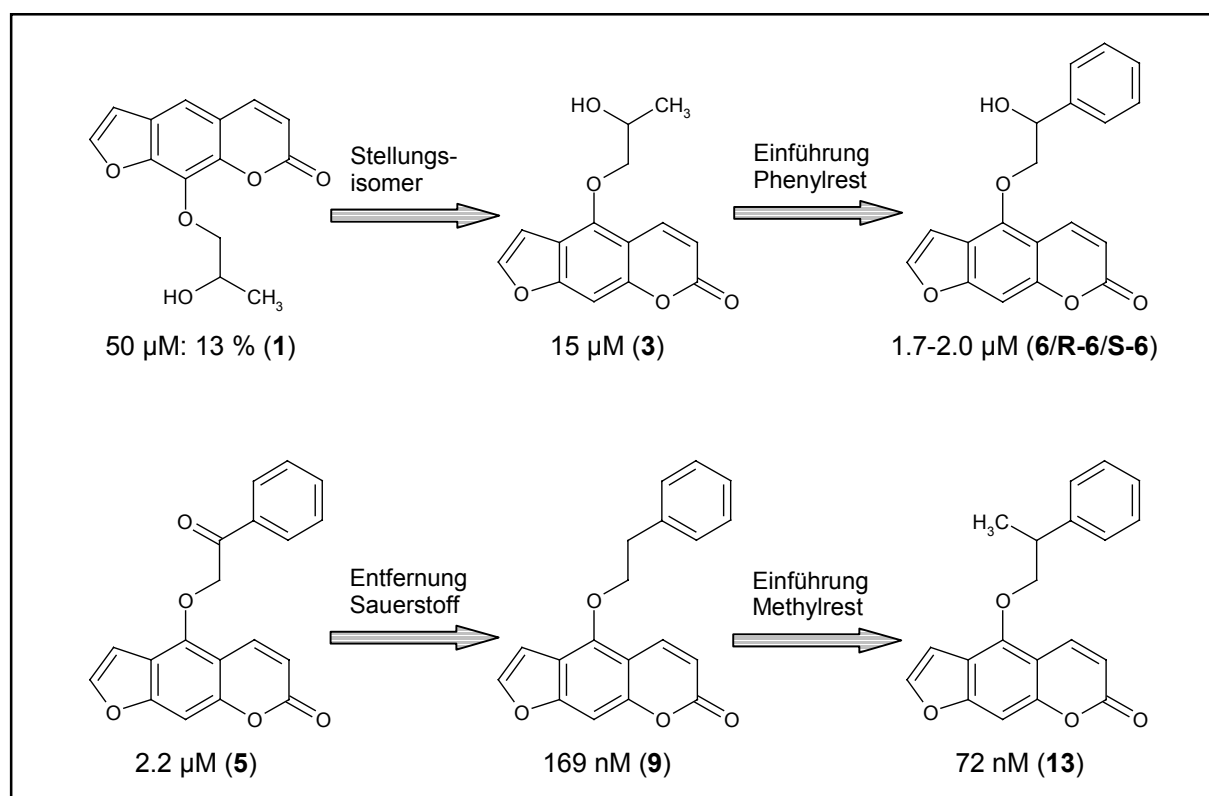


Abb. 7.1: Struktur-Wirkungs-Beziehungen ausgesuchter Psoralenderivate mit Angabe der EC_{50} -Werte an Kv1.3. Die Beschriftung der Pfeile beschreibt keine Synthesewege, sie soll lediglich die strukturellen Unterschiede der Verbindungen verdeutlichen.

5-O-substituierte Psoralene sind potentere Kaliumkanalblocker als die jeweiligen 8-O-substituierten Stellungsisomere (Sanmann, 1995). Auch die Verbindungen **1** und **3** zeigen diese Charakteristik in deutlicher Weise. 5-(2-Hydroxypropoxy)psoralen (**3**)

hemmt den Kv1.3-Strom mit einer EC_{50} von 15 μM , das Isomer **1** inhibiert im Gegensatz dazu den Strom in der etwa dreifachen Konzentration lediglich zu 13 %.

Ein weiterer Aspekt betrifft die Lipophilie der untersuchten Substanzen. Polare Substituenten führen sowohl bei Psoralenen als auch bei Cumarinen zu einem Verlust oder einer Verminderung der Wirksamkeit (Wulff, 1998). Gleichzeitig führt eine zunehmende Lipophilie häufig zu einer Steigerung der kanalblockierenden Fähigkeiten. Die Reihe der dargestellten Psoralene untermauert dieses Erkenntnis. Durch Entfernung von Hydroxyl- bzw. Oxofunktionen der Seitenkette einerseits und Einführung von Phenyl- und Methylgruppen andererseits kann die Wirksamkeit sukzessive von 15 μM (**3**) auf 72 nM (**13**), also insgesamt um den Faktor 20, gesteigert werden.

Mit Blick auf diese bekannten Struktur-Wirkungs-Beziehungen ist es nicht überraschend, dass es sich bei den neu synthetisierten 5-Phenylalkoxy- und 5-Cyclohexylalkoxy-psoralenen um gute Kv1.3-Inhibitoren handelt, ihre außerordentlich hohe Blockadepotenz konnte dennoch nicht erwartet werden. Besonders die vier Verbindungen **10**, **11**, **12** und **16** sind in diesem Zusammenhang zu erwähnen, sie hemmen den Kaliumionenstrom halbmaximal mit Konzentrationen im einstelligen nanomolaren Bereich und übertreffen damit alle bekannten Kv1.3-Blocker.

Diese vier Derivate besitzen eine strukturelle Gemeinsamkeit, die offenbar für den sprunghaften Anstieg ihrer Wirksamkeit verantwortlich ist. Sie sind alle in 5-Position mit einem unpolaren Rest gewisser Länge substituiert, dessen Abschluss ein Phenylring bildet. Abbildung 7.2 veranschaulicht die Notwendigkeit genau dieser zwei strukturellen Eigenschaften für eine herausragende Wirksamkeit.

In den ersten beiden Reihen der Abbildung 7.2 sind jeweils die ersten drei Mitglieder der homologen 5-Phenylalkoxy- (**8** bis **10**) bzw. 5-Cyclohexylalkoxy-psoralene (**17** bis **19**) dargestellt. Während bei den 5-Phenylalkoxy-Derivaten aus der Verlängerung der Alkylkette von zwei auf drei Methylengruppen eine über 25fache Zunahme der Wirksamkeit resultiert, bleibt das identische Vorgehen bei den Cyclohexylverbindungen ohne positiven Effekt. Das Psoralen **19** blockiert den Kv1.3-Kanal lediglich im vergleichbaren Konzentrationsbereich wie die homologen Substanzen **17** und **18** bzw. deren analoge 5-Phenylalkoxy-psoralene **8** und **9**.

Ein Cyclohexylring kann demnach nicht in ähnlicher Weise mit dem Kanalprotein interagieren wie ein Phenylrest. Es bleibt zu klären, ob sterische oder elektronische Gründe hierfür verantwortlich sind.

Der Vergleich mit den in Reihe drei aufgeführten Verbindungen **13** bis **15** zeigt, wie entscheidend die Chemie des verbindenden Strukturelements zwischen Psoralengerüst und Phenylsubstituent für die Wirkung ist. In allen drei Verbindungen kommt der positive Einfluss des Phenylringes nicht zum Tragen, die Kette ist offensichtlich zu

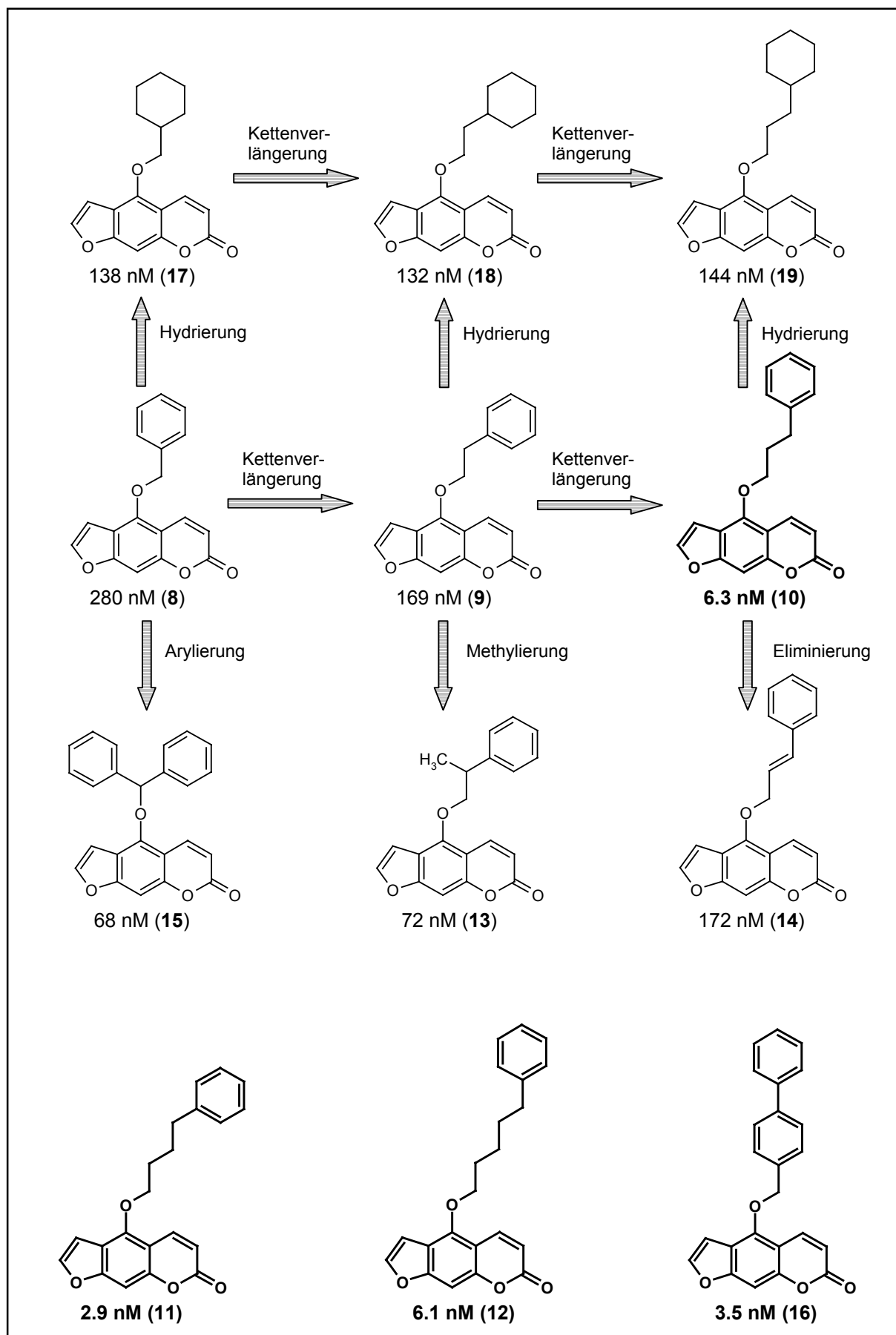


Abb. 7.2: Struktur-Wirkungs-Beziehung der 5-Phenyl- und 5-Cyclohexylalkoxy-psoralene mit Angabe der EC₅₀-Werte an Kv1.3. Die Beschriftung der Pfeile beschreibt keine Synthesewege, sie soll die strukturellen Unterschiede der Derivate verdeutlichen.

Diskussion

kurz. Trotzdem sind die Derivate **13** und **15**, wahrscheinlich aufgrund ihrer höheren Lipophilie, wirksamer als die verwandten Psoralene **8** und **9**.

Offen bleibt, warum die Verbindung **14** trotz gegebener Länge der ungesättigten Alkylkette kein hochpotenter Blocker ist, vor allem im Gegensatz zur gut wirksamen Substanz **16**, die ebenfalls keine leicht bewegliche Alkylkette, sondern einen großvolumigen Biphenylrest besitzt.

7.1.3 Lipophilie-Wirkungs-Beziehungen der neuen Psoralene

Aus den bisherigen Erläuterungen ist deutlich geworden, dass die Lipophilie einen wichtigen Einfluss auf die Blockadepotenz der untersuchten Psoralene ausübt. Deshalb wurde für alle Verbindungen der log P-Wert als Maß der Lipophilie ermittelt. P entspricht dem Verteilungskoeffizienten für das System n-Oktanol/Wasser. Je größer der log P-Wert, desto höher ist die Lipophilie der untersuchten Substanz.

Derivate mit Sauerstoff-Funktion in der Seitenkette	log P	5-Phenylalkoxy-psoralene	log P
1	1.85	8	3.27
2	1.88	9	3.55
3	1.89	10	3.97
R-4/S-4	2.03	11	4.33
5	2.80	12	4.71
6/R-6/S-6	2.49	13	3.87
7	2.32	14	3.79
5-bzw. 8-Methoxy-psoralen	log P	15	4.12
		16	4.40
Bergapten	2.15	5-Cyclohexylalkoxy-psoralene	log P
Xanthotoxin	2.03		
5,8-Diphenylalkoxy-psoralen	log P	17	4.41
		18	4.82
20	4.27	19	5.34

Tab. 7.1: Lipophilie-Daten der elektrophysiologisch untersuchten Psoralene.

Die Daten wurden mittels der Hochleistungsflüssigchromatographie im Vergleich mit Literatur-bekannten Standardsubstanzen erhalten. Sie wurden freundlicherweise von Frau I. Carstens zur Verfügung gestellt (Carstens, Dissertation in Vorbereitung).

Die ermittelten log P-Werte sind in Tabelle 7.1 aufgeführt. Aus den Daten kann der Schluss gezogen werden, dass der Anstieg der Wirksamkeit der vier Derivate **10**, **11**, **12** und **16** nicht allein durch eine zunehmende Lipophilie zu begründen ist. Zwei wichtige Ergebnisse sprechen gegen diese These.

Erstens gehören die drei 5-Cyclohexylalkoxy-psoralene **17** bis **19** mit log P-Werten zwischen 4.41 und 5.34 zu den lipophilsten Verbindungen, dennoch sind sie deutlich schwächer wirksam.

Zweitens nimmt in der homologen Reihe der 5-Phenylalkoxy-psoralene **8** bis **12** die Lipophilie mit steigender Anzahl der Kohlenstoffatome nahezu linear zu, während die Abhängigkeit zwischen Kohlenstoffzahl und log EC₅₀ der Kv1.3-Blockade keiner Proportionalität folgt (Abbildung 7.3). Es ist zu erkennen, dass die log EC₅₀-Kurve im Bereich zwischen zwei und drei Kohlenstoffatomen eine wesentlich größere Steilheit besitzt als im übrigen Verlauf. Das Wirkmaximum liegt bei der Verbindung **11**, die eine Butylkette besitzt. Eine Kettenverlängerung darüber hinaus führt trotz größerer Lipophilie zu keiner weiteren Verbesserung der Blockadepotenz.

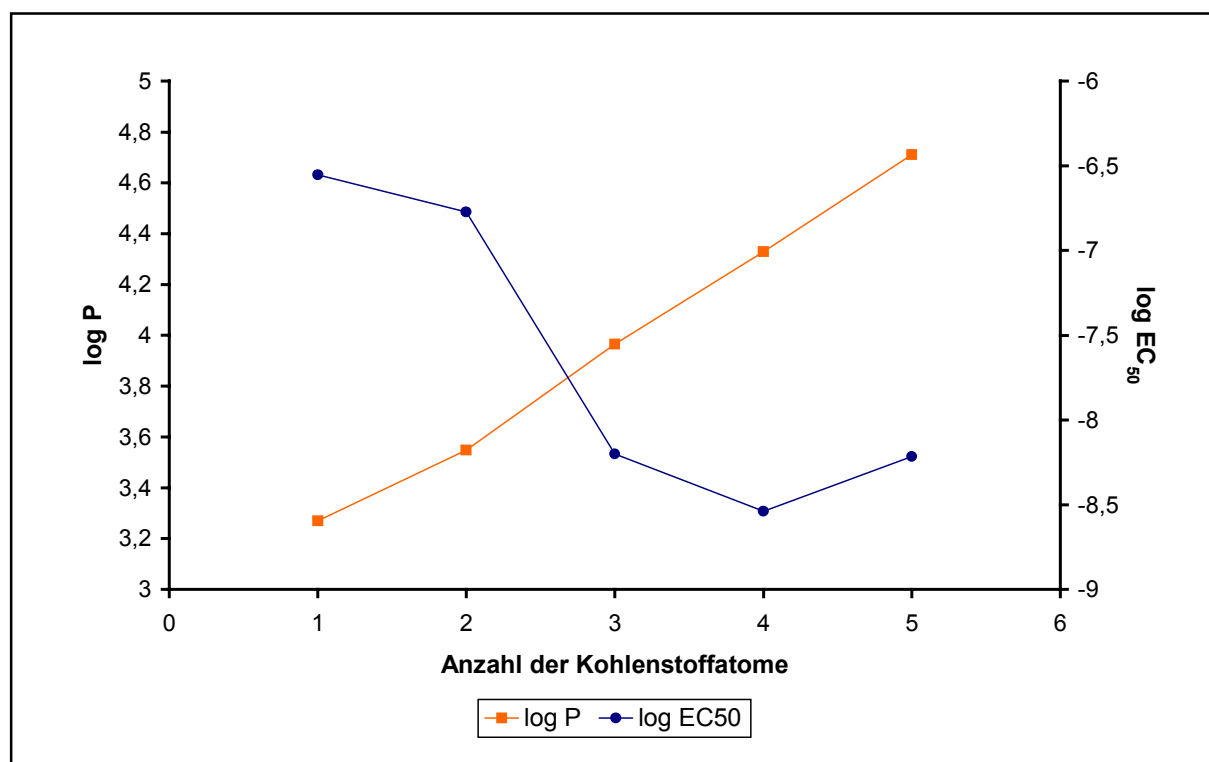


Abb. 7.3: Abhängigkeit der log P- und log EC₅₀-Werte von der Anzahl der Kohlenstoffatome in der Seitenkette der homologen 5-Phenylalkoxy-psoralene **8** bis **12**.

7.1.4 Das Modell der Bivalenz

Neben dem Kriterium der Lipophilie müssen zusätzliche Faktoren für die hohe Wirksamkeit der vier Psoralene **10**, **11**, **12** und **16** von Bedeutung sein. Das Modell der Bivalenz bietet eine weitere naheliegende Erklärungsmöglichkeit.

Nach dieser Vorstellung können von einem Wirkstoff zwei Bindungsstellen erreicht werden, wenn zwei pharmakophore Teilstrukturen über ein Verbindungsstück (*spacer*) miteinander verknüpft sind. Hierdurch kann die Aktivität gegenüber monovalenten Verbindungen in vielen Fällen erheblich gesteigert werden (Übersicht bei Mammen et al., 1998).

In der Literatur gibt es zahlreiche Beispiele für bivalent oder gar multivalent wirksame peptidische oder niedermolekulare Strukturen. Stellvertretend sollen bivalente Liganden an Opioid- oder Serotonin-Rezeptoren (Portoghese, 1992; Halazy et al., 1996) und Monoamin-Transportern (Tamiz et al., 2001) genannt sein. Einige dieser Verbindungen besitzen in Abhängigkeit von dem gewählten *spacer* neben einer verbesserten Wirksamkeit auch eine veränderte Rezeptorsubtypen-Spezifität.

Bei Anwendung des Bivalenz-Prinzips auf die 5-Phenylalkoxy-psoralene wird postuliert, dass der Phenylring in der Lage ist, zusätzlich zu Wechselwirkungen zwischen Psoralen Grundgerüst und Kanal eine zweite Interaktion mit dem Kanalprotein einzugehen.

Der Phenylrest kann diese zweite Rezeptorstelle allerdings nur dann erreichen, wenn er sich in einem ausreichenden Abstand zum ersten Pharmakophor, dem Trizyklus, befindet (Abbildung 7.4, A und B). Dadurch könnte der sprunghafte Anstieg der Wirksamkeit beim Übergang der Ethyl- zur Propyl-Kette in den Derivaten **9** und **10** verursacht werden. Ein zu langer *spacer* kann andererseits zu sterischen Behinderungen führen (Abbildung 7.4, C), was möglicherweise die geringere Wirksamkeit des Pentylderivates **12** im Vergleich mit der Butylverbindung **11** erklärt.

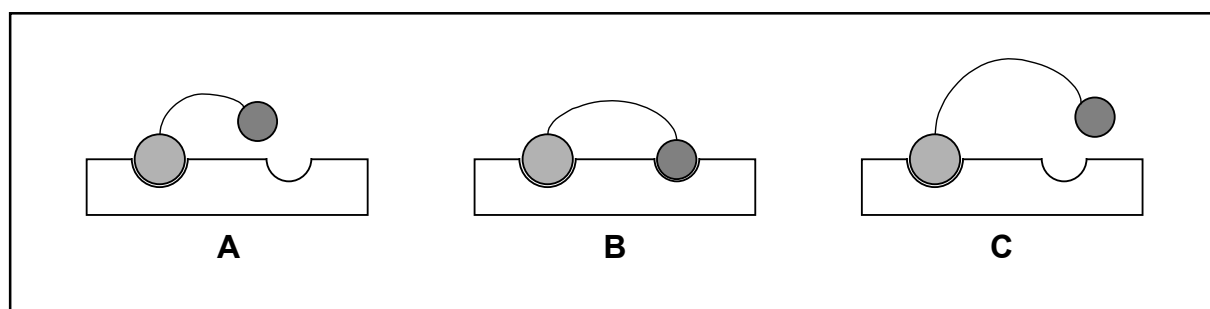


Abb. 7.4: Das Modell der Bivalenz, Erläuterung im Text.

Bei der Darstellung der Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen ist der Hillkoeffizient als Maß der Kooperativität von Bindungen zwischen Ligand und

Rezeptor bereits erwähnt worden (Kapitel 5.3.1.2, Seite 74). Im Zusammenhang mit möglichen bivalenten Wechselwirkungen der neuen Psoralene mit dem Kv1.3-Kanal kommt diesem Parameter eine besondere Bedeutung zu.

Ein Hillkoeffizient von 1 weist auf eine 1:1-Stöchiometrie der Interaktion hin. Eine derartige Wechselwirkung mit dem Kanaltetramer wird für das Correolide beschrieben (Felix et al., 1999; Schmalhofer et al., 2002). Das kürzlich publizierte PAC und verwandte Verbindungen (Kapitel 1.2.3.4, Seite 23) besitzen einen Hillkoeffizienten von 1.9, dieser Wert wird dahingehend interpretiert, dass mehr als ein PAC-Molekül zur Blockade eines einzelnen Kanals beiträgt (Schmalhofer et al., 2002).

Für die vier hochwirksamen Psoralene **10**, **11**, **12** und **16** wurde in den elektrophysiologischen Testungen ein Hillkoeffizient von knapp über 2 ermittelt, die experimentellen Daten stützen also die für sie vorgeschlagene bivalente Wechselwirkung mit dem Kv1.3-Tetramer.

Am Beispiel von 5-Methoxypsoralen wurde bereits eine andere Variante des Prinzip bivalenter Liganden untersucht (Herzog, 2000). Bis-Bergapten, bestehend aus zwei über eine *para*-Phenylen-Brücke verknüpften Bergapten-Molekülen, wurde im Vergleich mit dem monovalenten Bergapten am Kv1.3-Kanal getestet. Durch diese Manipulation konnte die Wirksamkeit an Kv1.3 um etwa den Faktor 50 gesteigert werden (Abbildung 7.5).

Es ist leicht vorstellbar, dass die beiden Bergapten-Teilstrukturen der Bis-Verbindung möglicherweise mit identischen Bindungsstellen zweier Untereinheiten des Kanaltetramers interagieren und dadurch die Kanalpore überbrücken (Herzog, 2000). Ob die zwei potentiellen Pharmakophore der neuen 5-Phenylalkoxypsoralene in ähnlicher Weise an den Kanal binden, oder ob sie Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Bindungsstellen eingehen, ist unklar und muss Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben.

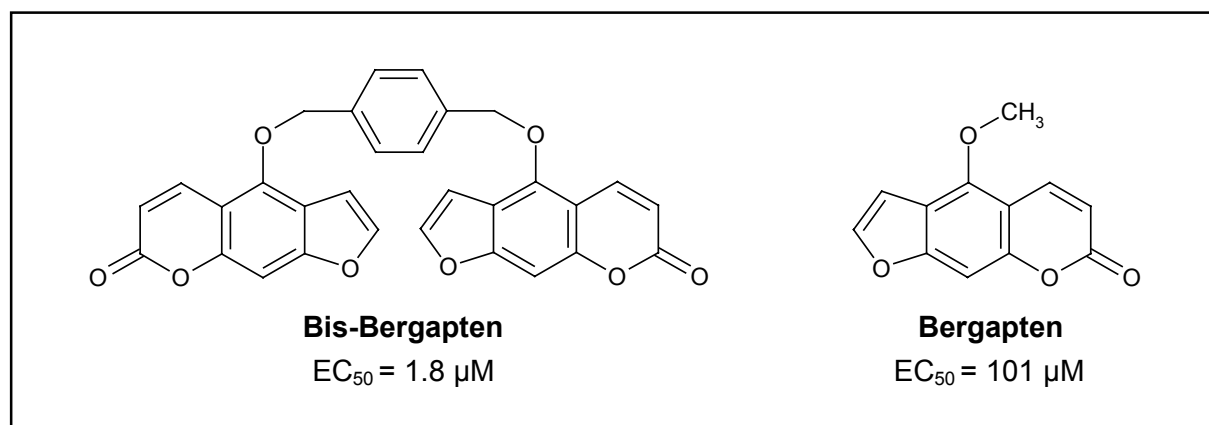


Abb. 7.5: Strukturformeln von Bergapten und Bis-Bergapten und EC_{50} -Werte am Kv1.3-Kanal (Herzog, 2000).

7.2 Selektivität der neuen Psoralene gegenüber weiteren Ionenkanälen

Alle Psoralene der 5-Phenylalkoxy- und 5-Cyclohexylalkoxy-Reihen (**8** bis **19**) wurden zur ersten Einschätzung der Selektivität gegenüber weiteren Ionenkanälen an Neuroblastomzellen der Linie N1E-115 untersucht. Sowohl Natrium- als auch Kaliumströme werden von sämtlichen Verbindungen in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich mit geringer Affinität gehemmt. Das bedeutet, dass diese Psoralene unspezifische Wechselwirkungen mit den Kanälen der N1E-115-Zellen eingehen. Wirkverstärkende Interaktionen im Sinne einer Bivalenz kommen hier offenbar auch bei den vier Derivaten **10**, **11**, **12** und **16** nicht zustande.

Die Verbindungen **10** und **11** wurden darüber hinaus stellvertretend für die neuen hochwirksamen Psoralene an verschiedenen Kv-Kanälen getestet, die Ergebnisse sind in Tabelle 7.2 zusammengefasst.

Kanaltyp	5-(3-Phenylpropoxy)- psoralen (10)		5-(4-Phenylbutoxy)- psoralen (11)	
	EC ₅₀ [nM]	Selektivität für Kv1.3	EC ₅₀ [nM]	Selektivität für Kv1.3
Kv1.1	150	24	62	21
Kv1.2	259	41	49	17
Kv1.3 (Klon)	6.3	-	2.9	-
Kv1.3 (Lymphozyt)	7	-	3	-
Kv1.4	(243)	(39)	n.b.	n.b.
Kv1.5	24	3.8	7.7	2.6
Kv1.7	200	32	100	34
Kv3.1	> 1000	> 150	> 1000	> 340
Kv (N1E-115)	800	131	900	318
Nav (N1E-115)	2500	396	1400	476

Tab. 7.2: Ergebnisse der elektrophysiologischen Testungen der Derivate **10 und **11**. Angabe der EC₅₀-Werte für die Stromblockaden und der Selektivitäten als Quotient EC₅₀ Ionenkanal / EC₅₀ Kv1.3. Das Resultat für Kv1.4 entstammt einer Einzelmessung.**

Beide Substanzen hemmen den Kaliumstrom durch den *Shaw*-Kanal Kv3.1 ähnlich schwach wie die Ionenströme der Neuroblastomzellen. Aus der *Shaker*-Familie wurden mit Ausnahme von Kv1.6 alle Mitglieder untersucht, in ihrer Selektivität gegenüber diesen Kanälen übertreffen die Verbindungen **10** und **11** die meisten der bekannten Kv1.3-Blocker.

Kein Kanal wird mit identischer Potenz wie Kv1.3 geblockt, wie es z. B. für die Ver-

bindungen CP-339,818 bzw. UK-78,282 und Kv1.4 beschrieben ist (Nguyen et al., 1996; Hanson et al., 1999). Auch die neuen PAC-Derivate, die als einzige in ihrer Wirksamkeit an Kv1.3 mit den Psoralenen vergleichbar sind, scheinen gegenüber Kv1.1, Kv1.2, Kv1.5 und Kv1.6 nicht oder wenig selektiv zu sein (Schmalhofer et al., 2002). Correolide weist zwar eine 4- bis 14fache Selektivität gegenüber den Kanälen der Kv1-Familie auf (Felix et al., 1999), im Gegensatz dazu sind die Psoralene an Kv1.3 aber 17- bis 41fach stärker wirksam als an Kv1.1, Kv1.2, Kv1.7 und wahrscheinlich auch Kv1.4.

Eine erhebliche Querempfindlichkeit besteht jedoch zum Kv1.5-Kanal, die EC_{50} -Konzentrationen an Kv1.3 und Kv1.5 unterscheiden sich nur um den Faktor 3.8 (**10**) bzw. 2.6 (**11**). Dieses Merkmal haben die Psoralene mit Sulfimidbenzamidindan (Castle et al., 2000) und den Phenyloxoazapropylcycloalkanen (Baker et al., 2000) gemein (Kapitel 1.2.3.4, Seite 24). Die *in vivo*-Relevanz dieser Tatsache kann bislang nicht beurteilt werden, da noch nicht abschließend geklärt ist, ob der für den kardialen I_{Kur} -Strom verantwortliche Kanal tatsächlich ein Homotetramer aus Kv1.5 ist oder möglicherweise noch andere Untereinheiten beteiligt sind.

In Abb. 7.6 sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven des Derivates **10** an verschiedenen Kv1-Kanälen dargestellt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass Kv1.1 und Kv1.2 durch Konzentrationen blockiert werden, die sich in einem ausreichenden Abstand zu der an Kv1.3 wirksamen Konzentration bewegen. Der inhibierende Effekt setzt an diesen Kanälen erst ein, wenn der Kv1.3-Strom bereits nahezu vollständig gehemmt ist. Nur an Kv1.5 kommt es zu überlappenden Effekten, die an Kv1.3 halbmaximal wirksame Konzentration führt hier schon zu einer merklichen Stromreduktion.

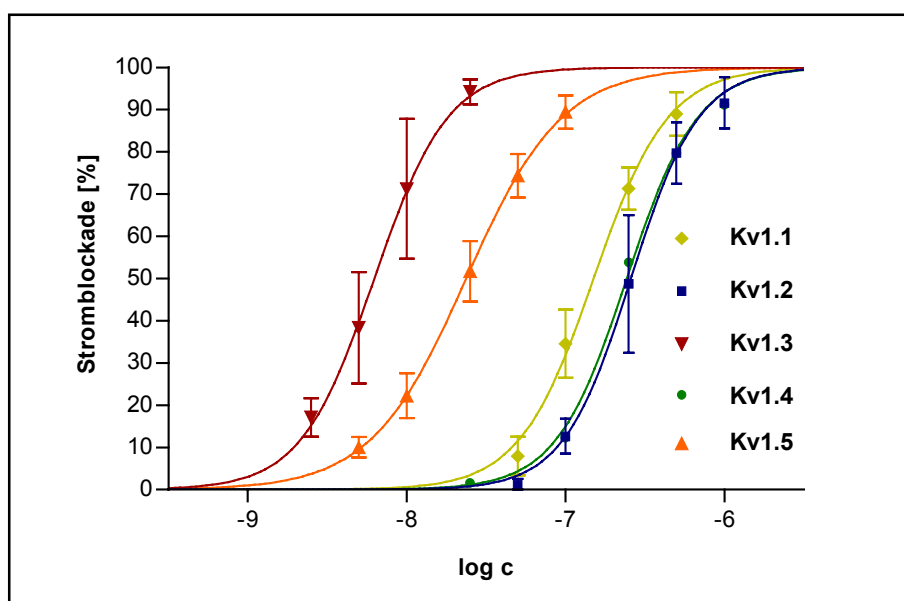


Abb. 7.6: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Psoralen (**10**) an verschiedenen Kanälen der *Shaker*-Familie.

7.3 Überlegungen zum Blockademechanismus

Konkrete Aussagen zum Mechanismus der Kv1.3-Blockade können anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht gemacht werden, hierzu sind weitere Studien erforderlich. Es gibt jedoch zahlreiche Hinweise darauf, dass der Kanal in seinem inaktivierten Zustand inhibiert wird.

Hierfür spricht vor allem, dass das Blockadegleichgewicht erst nach einigen Minuten erreicht wird. Die volle Blockadewirkung ist dabei allein abhängig von der Zahl der Depolarisationspulse, nicht von der Kontaktzeit des Kanals mit der Substanz.

Exemplarisch wurde überprüft, wie sich eine 10minütige Inkubation der Zellen mit Substanz vor Beginn des Experiments auswirkt. Der Blockadeverlauf war unter diesen Bedingungen identisch mit Messungen, die sofort nach Perfusion der Testlösungen gestartet wurden. Die Stromantworten auf den ersten Depolarisationspuls waren vergleichbar groß. Eine Stromreduktion erfolgte erst im Verlauf der Messung. Der Kanal muss also öffnen bzw. inaktivieren, damit die Substanz ihre Bindungsstelle erreichen kann.

In zwei Modellen konnte eine mögliche Interaktion mit der inaktivierten Kanalkonformation überprüft werden. Die Verbindung **10** wurde einerseits an der H404T-Kv1.3-Mutante, andererseits in Kalium-Ringerlösung am Kv1.3-Wildtyp getestet. In beiden Systemen ist die C-Typ-Inaktivierung des Kv1.3-Kanals zurückgedrängt. Übereinstimmend reduziert das Psoralen in den Untersuchungen den Kaliumionenstrom deutlich schlechter als am Kv1.3-Wildtyp-Kanal in Natrium-Ringerlösung. Für die volle Wirksamkeit ist also die Existenz inaktivierter Kanäle erforderlich.

Den *Shaw*-Kanal Kv3.1 hemmen die Derivate **10** und **11** nicht nur mit wesentlich geringerer Affinität, sondern auch mit einer anderen Charakteristik als die *Shaker*-Kanäle. Die volle Blockadewirkung ist bereits beim ersten Depolarisationspuls erreicht. Offensichtlich interagieren die Verbindungen an diesem Kanal nicht mit dem inaktivierten Zustand.

Bemerkenswert ist, dass die drei hochwirksamen Psoralene **11**, **12** und **16** an Kv1.3 eine andere Blockadekinetik als die übrigen Derivate besitzen (Kapitel 5.3.1.2, Seite 75). Für die Verbindung **11** konnte diese Beobachtung im Vergleich mit Substanz **10** auch an Kv1.1 und Kv1.2 gemacht werden (Kapitel 5.3.3, Seite 83).

Eine abweichende Lipophilie kann nicht zur Erklärung dieses Phänomens herangezogen werden (Kapitel 7.1.3, Seite 104). Es ist denkbar, wenn auch unwahrscheinlich, dass die unterschiedlich wirksamen Psoralene verschiedene Bindungsstellen angreifen. Vermutlich steht erneut das Prinzip der Bivalenz und damit das Erreichen einer zweiten, zusätzlichen Bindungsdomäne hinter der veränderten Blockadekinetik.

7.4 Funktionelle Untersuchungen am Lymphozyten

Zusätzlich zu den elektrophysiologischen Testungen wurden *in vitro*-Untersuchungen an humanen T-Lymphozyten durchgeführt, um festzustellen, ob die neuen hochpotenten Kv1.3-Blocker die postulierte Wirkung auf Funktion und Proliferation dieser Zellen besitzen.

Neben der [³H]Thymidin-Inkorporation werden Versuche beschrieben, die zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen sind. Die Tendenzen dieser Untersuchungen sollen jedoch nicht unerwähnt bleiben (Abschnitte 7.4.2 bis 7.4.4).

7.4.1 Lymphozytenproliferation

Die Studien zur [³H]Thymidin-Inkorporation belegen, dass die Psoralene **10** und **11** sehr wirksam die Lymphozyten-Proliferation unterdrücken können. Hinter diesem Effekt scheint eine reine Blockade des Kv1.3-Kanals zu stehen, ohne dass darüber hinaus unspezifische Vorgänge ablaufen. Denn im Vergleich mit dem ebenfalls getesteten Toxin ShK, welches sein immunsuppressives Potential bereits *in vivo* an EAE-Ratten unter Beweis gestellt hat (Beeton und Wulff, 2001), liegt eine strenge Parallelität der wirksamen Konzentrationen von Kanalblockade bzw. der Hemmung des [³H]Thymidin-Einbaus vor.

Die im Folgenden beschriebenen ersten Hinweise aus den weiteren Messungen stützen diese These.

7.4.2 Zytotoxizität der Psoralene

Der Einfluss ausgewählter Substanzen auf die Vitalität peripherer mononukleärer Zellen wurde untersucht. Aus der Gruppe der Psoralene kamen Bergapten (Abbildung 7.5, Seite 107) und die Derivate **9**, **10**, **11** in jeweils mindestens fünf verschiedenen Konzentrationen zum Einsatz. Als maximale Konzentration wurde für die Verbindungen **10** und **11** die 100fache EC₅₀-Konzentration der Kv1.3-Blockade gewählt. Bergapten und das Psoralen **9** wurden geringer konzentriert verwendet, um ihre vollständige Lösung sicherzustellen.

Die Zellen wurden mit den Testsubstanzen für 17 Stunden inkubiert. Anschließend wurden sie mit Propidiumiodid versetzt und mithilfe der Durchflusszytometrie unter-

sucht. Der Farbstoff wird von toten Zellen aufgrund deren Membrandysfunktion aufgenommen und interkaliert in die DNA. Die Fluoreszenzintensität des interkalierten Propidiumiodids ist wesentlich größer als die des freien Farbstoffes.

Wesentlich ist, dass in den eingesetzten Konzentrationen für die vier untersuchten Psoralene keine nennenswerte zytotoxische Wirkung beobachtet werden konnte.

7.4.3 Einfluss auf die TZR/CD3-induzierte Tyrosinphosphorylierung

Die Aktivierung des T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplexes induziert eine schnelle Tyrosinphosphorylierung zahlreicher zellulärer Proteine sowie der CD3-Untereinheiten und der TZR-assoziierten ζ -Ketten. Über einen Anti-Phosphotyrosin Western Blot können diese Reaktionen nachgewiesen werden.

In diesem Assay wurden die Psoralene **9**, **10**, **11** und Bergapten getestet. Die Verbindungen wurden in den Maximal-Konzentrationen eingesetzt, die bei der Untersuchung der Zytotoxizität verwendet worden waren. Es wurde kein Effekt auf die Tyrosinphosphorylierung und damit kein möglicher weiterer Wirkmechanismus neben der Kv1.3-Blockade festgestellt.

7.4.4 Einfluss auf die intrazelluläre Calciumionen-Konzentration

Unter Verwendung der Durchflusszytometrie und eines Calcium-sensitiven Farbstoffes wurde die Wirkung einiger Kv1.3- bzw. IKCa1-Blocker auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration nach Stimulation untersucht

Die Testungen wurden unter anderem an einem α : β -T-Zell-Klon durchgeführt, eine Stimulation erfolgte über OKT 3 oder Staphylococcus-Enterotoxin A (SEA). Am Ende jeder Messung wurde als Positiv-Kontrolle der Calcium-Ionophor Ionomycin in den Ansatz gegeben. Dieser bewirkt eine Entleerung intrazellulärer Calcium-Speicher und triggert zusätzlich den Calcium-Einstrom von außen.

Für das Psoralen **11** (eingesetzt in 100facher EC_{50} -Konzentration der Kv1.3-Blockade) konnte am α : β -T-Zell-Klon ein deutlicher Effekt auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration beobachtet werden, der durch die Kv1.3-Blockade zu erklären ist. Sowohl das OKT 3- bzw. SEA- als auch das Ionomycin-induzierte Calcium-Signal wurde erheblich vermindert.

8 Zusammenfassung und Ausblick

8.1 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neue chirale und achirale Psoralen-derivate synthetisiert und elektrophysiologisch mithilfe der *patch-clamp*-Technik charakterisiert.

Zwei Enantiomerenpaare wurden durch stereoselektive Synthesen dargestellt. Ihre Enantiomerenreinheit konnte mithilfe der Hochleistungsflüssigchromatographie an einer chiralen stationären Phase bewiesen werden. Stereoselektive Effekte am Kv1.3-Kanalprotein konnten nicht festgestellt werden.

Mit den achiralen Derivaten 5-(3-Phenylpropoxy)psoralen (**10**), 5-(4-Phenylbutoxy)psoralen (**11**), 5-(5-Phenylpentoxy)psoralen (**12**) und 5-(4-Biphenyl)methoxy-psoralen (**16**) ist es gelungen, hochpotente und vielversprechende Blocker des lymphozytären Kaliumkanals Kv1.3 zu entwickeln. Diese Verbindungen inhibieren den Kaliumionenstrom durch Kv1.3 im einstelligen nanomolaren Konzentrationsbereich und überragen damit alle bisher bekannten Kv1.3-Blocker.

Verschiedene Hinweise deuten darauf hin, dass die Verbindungen ihren blockierenden Effekt durch Wechselwirkungen mit dem inaktivierten Kanal erreichen.

Durch Synthese strukturell verwandter Verbindungen konnten Erkenntnisse zu den Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Psoralene gewonnen werden. Der Vergleich von Lipophilie und Wirksamkeit zeigt, dass die Kv1.3-Blockade durch die hochpotenten Derivate aus einer spezifischen Wechselwirkung mit dem Kanalprotein resultiert und nicht in einem einfachen Lipophilie-Effekt gründet.

Für die hochwirksamen Substanzen wird eine bivalente Interaktion mit dem Kv1.3-Kanal postuliert, bei der ein Psoralenmolekül zwei Bindungsstellen erreicht. Bei den für diese Wechselwirkungen notwendigen Teilstrukturen handelt es sich zum einen um das Psoralengrundgerüst und zum anderen um den Phenylsubstituenten, der über einen *spacer* (eine Alkylkette oder ein weiterer Phenylrest) mit dem Trizyklus verknüpft ist. Aus experimenteller Sicht wird dieser Vorschlag durch einen Hillkoeffizienten von 2 und einer gegenüber den schwächer wirksamen Derivaten veränderten Blockadekinetik gestützt.

Für die Substanzen **10** und **11** wurden exemplarisch die Selektivitäten gegenüber weiteren Ionenkanälen bestimmt, um erste Hinweise auf mögliche unerwünschte *in vivo*-Nebeneffekte zu erhalten.

Die Verbindungen besitzen hervorragende Selektivitäten gegenüber den Natrium- und Kaliumkanälen von Neuroblastomzellen und dem *Shaw*-Kanal Kv3.1. Innerhalb der *Shaker*-Kanal-Familie ergeben sich zufriedenstellende Selektivitäten für die Kanäle Kv1.1, Kv1.2, Kv1.7 und wahrscheinlich auch Kv1.4. Lediglich der kardiale Kv1.5-Kanal wird ähnlich potent wie Kv1.3 blockiert, die *in vivo*-Relevanz dieser Tatsache ist noch unklar. Insgesamt übertreffen die Psoralene auch hinsichtlich der Selektivität die meisten der bislang bekannten Kv1.3-Blocker. Die übrigen Verbindungen besitzen zwar vergleichbare, jedoch keinesfalls bessere Selektivitäten.

Erste funktionelle Untersuchungen an humanen Lymphozyten belegen weiterhin, dass es sich bei den neuen Psoralenen auch *in vitro* um gut wirksame Substanzen mit möglichem immunsuppressivem Potential handelt. Toxische Effekte konnten bisher nicht festgestellt werden.

Die vorgestellten 5-Phenylalkoxy-psoralene könnten als die bislang besten nicht-peptidischen Kv1.3-Inhibitoren dabei helfen, das Konzept der Blockade lymphozytärer Kaliumkanäle weiterzuentwickeln. Möglicherweise können sie sogar als Leitstrukturen für die Entwicklung einer Klasse neuartiger Immunsuppressiva dienen.

8.2 Ausblick

Zahlreiche neue Fragestellungen ergeben sich aus den vorgestellten Ergebnissen, einerseits im Hinblick auf erwünschte, andererseits aber auch im Zusammenhang mit möglichen unerwünschten Wirkungen der Psoralenderivate. Weiterführende Untersuchungen sind sowohl im chemischen, biologischen, molekularbiologischen als auch im immunologischen Bereich geplant.

In nächster Zukunft werden in Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. Dr. G. Chandy, Department of Physiology and Biophysics, Universität Irvine, USA, *in vivo*-Studien an EAE-Ratten durchgeführt. Die Verbindungen **10** und **11** sollen dabei in Bezug auf ihr Potential bei präventiver Gabe untersucht werden. Die Testungen werden für dieses *in vivo*-Modell erstmals Daten eines nicht-peptidischen Kv1.3-Inhibitors liefern. Hierbei könnten auch Erkenntnisse bezüglich der *in vivo*-Relevanz der möglicherweise ungünstigen Blockade des kardialen Kv1.5-Kanals erhalten werden.

Ferner wird Frau Dr. H. Wulff, Irvine, voraussichtlich Mutations-Studien am Kv1.3-Kanal zur Identifizierung der Bindungsstelle der neuen Psoralene durchführen.

Die vor kurzem begonnenen immunologischen Untersuchungen werden weiterverfolgt und wahrscheinlich ausgeweitet (Carstens und Wildschek, Dissertationen in Vorbereitung).

Die Synthese weiterer Psoralenderivate wird das Verständnis der Struktur-Wirkungs-Beziehungen vertiefen und möglicherweise zu noch besseren Verbindungen führen, auch der Aspekt der Chiralität soll in diesem Kontext abschließend betrachtet werden (Schmidt-Lassen und Schmitz, Dissertationen in Vorbereitung).

Die Problematik einer möglichen Toxizität der Psoralene, erinnert sei vor allem an ihr phototoxisches Potential, darf nicht außer Acht gelassen werden. Auch diese Thematik wird zum Zeitpunkt bearbeitet (Bode, Dissertation in Vorbereitung). Als wichtigster Mechanismus einer solchen Toxizität kann eine Interkalation der Verbindungen in die DNA angesehen werden, von der ausgehend und initiiert durch UV-Licht es nachfolgend zur Bindungsbildung zu der Pyrimidinbase Thymin kommt. Erste Hinweise lassen erwarten, dass die neuen Phenylalkoxy-Verbindungen aufgrund der langen Seitenketten in 5-Position weniger gut in der Lage sind, derartigen Prozessen zu unterliegen, als die bekanntermaßen erheblich phototoxische Substanz Bergapten.

9 Experimenteller Teil

9.1 Material und Geräte

Die nachfolgend aufgeführten Geräte und Materialien wurden für die Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen verwendet.

Schmelzpunkte: Mikroheiztisch Thermovar (Reichert, Wien); die Werte wurden nicht korrigiert.

Dünnschichtchromatographie: DC-Folien POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄ aus Kieselgel (Macherey-Nagel, Düren), Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat (3/2);

R_f = Verhältnis der Laufstrecke der Verbindung zur Laufstrecke der Fließmittelfront.

IR-Spektroskopie: 16 PC FTIR (Perkin Elmer)

Zur Charakterisierung der Banden werden folgende Abkürzungen verwendet: s = stark, m = mittel, w = schwach, br = breites Signal, ν = Valenzschwingung, δ = Deformationsschwingung.

Fluorimetrie: Luminescence Spectrometer LS 50 B (Perkin Elmer)

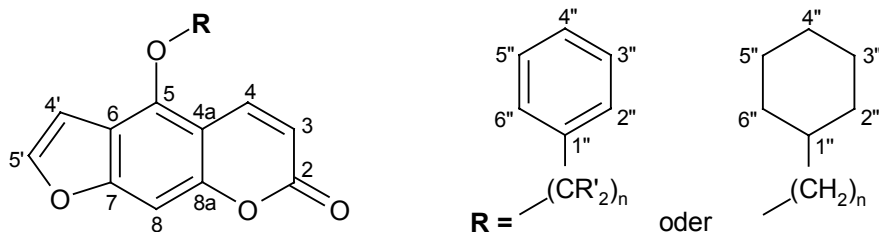
NMR-Spektroskopie: Kernresonanzspektrometer ARX 300 (Bruker, Rheinstetten); ¹H-NMR: Messfrequenz 300.13 MHz, ¹³C-NMR: Messfrequenz 75.47 MHz; Innerer Standard: Tetramethylsilan (TMS).

Zur Charakterisierung der Signale werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett eines Dubletts, ddd = Dublett eines Dubletts eines Dubletts, t = Triplett, dt = Dublett eines Triplets, quint = Quintett, sext = Sextett, m = Multiplett, br = breites Signal; J = Kopplungskonstante (²J: geminal, ³J: vicinal, ⁴J und ⁵J: Fernkopplung); H_A/H_B/H_X = H-Atome in komplexen Spinsystemen.

Die Auswertung der ¹H-NMR-Spektren erfolgte, soweit möglich, nach den Regeln für Spektren 1. Ordnung.

Für die Zuordnung der Kohlenstoffatome in der ¹³C-NMR-Spektroskopie wurden für nahezu alle Verbindungen DEPT-135-Experimente durchgeführt. Kohlenstoffatome der Phenyl- und Cyclohexylringe wurden darüber hinaus ggf. durch Vergleich mit Literaturdaten näher zugeordnet (Hesse et al., 1991).

Für die Zuordnung der NMR-Signale wurden die Strukturen wie folgt beziffert:



Massenspektrometrie: HP 5989A-MS Engine (70 eV) (Hewlett-Packard, Waldbronn); Direkteinlass: Schubstange IGT (Instrumente und Geräte Technik GmbH), Wolfram-Wendel; Ionenquellentemperatur: 250°C, Quadrupoltemperatur: 120°C; Lösungsmittel: Aceton.

Hochauflösende Massenspektrometrie: Institut für Organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Finnigan MAT 8230, 70 eV); HRMS: High resolution mass spectrum.

Elementaranalyse: Institut für Anorganische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Hewlett-Packard CHN-Autoanalyser); Ilse Beetz – Mikroanalytisches Laboratorium, Industriestr. 10, Kronach.

Hochleistungsflüssigchromatographie:

1. Analytik der chiralen Verbindungen:

Pumpe: Waters 600 Pump; Säulen: LiChroCART 250-4 (S,S)-Whelk-O1 5 µm (Merck, Darmstadt), CC 200/4 Nucleodex gamma-PM und CC 200/4 Nucleodex beta-OH (Macherey-Nagel, Düren); Detektor: Waters 474 Scanning Fluorescence Detector; Waters 600 Controller.

2. Bestimmung der Lipophilie:

Pumpe: Waters 1525 Binary HPLC Pump; Säulenofen: Peltier-Kolonnenthermostat „jetstream“, temperiert auf 25°C; Säule: Kromasil 100 C18, 5 µm, 60 x 4.6 mm (Kromasil, Schweden); Detektoren: Waters 2475 Multi λ Fluorescence Detector, Waters 486 Tunable Absorbance Detector; Fließmittel: Acetonitril (A) / Sörensen-Phosphat-Puffer 11 mM pH 7.4 (B), Gradient über 70 min: 30% A / 70% B bei t = 0 min bis 78% A / 22% B bei t = 70 min; Standardsubstanzen: 4-Methylbenzaldehyd, Toluol, Ethyl-, n-Propyl-, n-Butyl-, n-Pentyl-, n-Hexyl-, n-Heptyl- und n-Octylbenzol.

Alle für die Synthese verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen, einschließlich Fluka), Lancaster (Mühlheim), Merck (Darmstadt) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen, ebenso die Lösungsmittel für die Hochleistungsflüssigchromatographie, welche HPLC-Qualität besaßen. Die Lösungsmittel für die Synthese stammten aus Industrielieferungen an das pharmazeutische Institut.

Bislang nicht in der Literatur beschriebene Verbindungen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

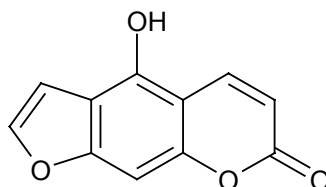
9.2 Allgemeine Synthesevorschrift der Veretherung von Bergaptol

Die angegebenen Mengen 5-Hydroxypsoralen (Bergaptol), getrocknetes Kaliumcarbonat und eine Spatelspitze Kaliumiodid werden in trockenem Aceton unter Rühren und Stickstoffbegasung im Dreihalskolben zum Rückfluss erhitzt, das Alkylans wird nach und nach zugegeben. Nach der jeweils genannten Reaktionszeit wird das Kaliumcarbonat abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt (**Variante A**); oder der Ansatz wird auf Wasser gegeben, mit konzentrierter Salzsäure auf pH 1 gebracht, und der entstehende Niederschlag wird abgesaugt (**Variante B**). Der Rückstand bzw. der Niederschlag wird in Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit 2%iger Natronlauge gewaschen, um nicht umgesetztes Bergaptol zu entfernen. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und der Destillationsrückstand aus dem angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

9.3 Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

5-Hydroxypsoralen (Bergaptol)

4-Hydroxy-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-on



1.0 g Iod (3.9 mmol) und 0.2 g (8.3 mmol) frisch angeriebene Magnesiumspäne werden in 30 ml absolutem Ether unter Rückfluss bis zur vollständigen Entfärbung der Lösung gerührt. 1.0 g (4.6 mmol) 5-Methoxypsoralen (Bergapten) werden in einem Erlenmeyerkolben mit etwas absolutem Ether suspendiert und quantitativ in die entfärbte Lösung überführt. Der Ansatz wird 45 min unter Erwärmen gerührt. Der Ether wird abrotiert und der Rückstand im Luftbad bei 120°C zunächst 30 min getrocknet und dann für 90 min auf 160-165°C Innentemperatur erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der Rückstand mit 25%iger Schwefelsäure aufgenommen. Das Produkt wird abgesaugt, mit Natriumthiosulfatlösung gewaschen, getrocknet und ohne weitere Aufreinigung für die nachfolgenden Synthesen eingesetzt.

Ausbeute: 0.79 g Rohprodukt (3.9 mmol, 84 % der Theorie)

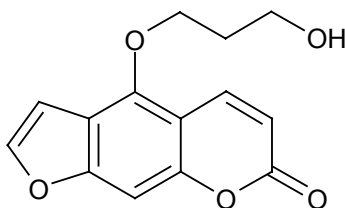
Schmelzpunkt: 273 °C (Rohprodukt); Lit.: 276 °C (Schönberg und Aziz, 1955)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ [ppm]): 6.24 (d, 1H, ³J=9.7 Hz, 3-H); 7.14 (s, 1H, 8-H); 7.19 (dd, 1H, ³J=2.3 Hz, ⁵J=0.9 Hz, 4'-H); 7.90 (d, 1H, ³J=2.3 Hz, 5'-H); 8.26 (d, 1H, ³J=9.7 Hz, 4-H)

C₁₁H₆O₄ (202.17)

5-(3-Hydroxypropoxy)psoralen (2) *

4-(3-Hydroxypropoxy)-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on



150 mg (0.75 mmol) Bergapton und 2.0 ml (23 mmol) 3-Brom-1-propanol werden unter Zusatz von 0.8 g Kaliumcarbonat in 50 ml Aceton nach Variante A umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 10 h. Das Rohprodukt wird aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 138 mg (0.53 mmol, 71 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 136 °C (Methanol); weiß, kristallin

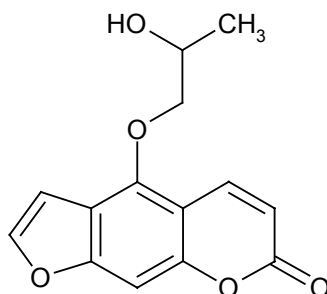
IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3469 (s, ν_{OH}); 1711 (s, br, $\nu_{\text{C=O}}$); 1625 und 1600 (s, $\nu_{\text{C=C}}$); 757 (m, δ_{CH})

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 2.15 (quint, 2H, ³J=6.0 Hz, 5-OCH₂CH₂-CH₂OH); 3.96 (t, 2H, ³J=5.9 Hz, 5-O(CH₂)₂CH₂OH); 4.60 (t, 2H, ³J=6.1 Hz, 5-OCH₂-(CH₂)₂OH); 6.27 (d, 1H, ³J=9.8 Hz, 3-H); 7.01 (d, 1H, ³J=2.3 Hz, 4'-H); 7.15 (s, 1H, 8-H); 7.59 (d, 1H, ³J=2.3 Hz, 5'-H); 8.15 (d, 1H, ³J=9.8 Hz, 4-H)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 32.74 (5-OCH₂CH₂CH₂OH); 59.29 (5-O(CH₂)₂CH₂OH); 69.96 (5-OCH₂(CH₂)₂OH); 94.10 (8-C); 105.12 (4'-C); 106.82 (4a-C); 112.64 (3-C); 113.55 (6-C); 139.24 (4-C); 144.93 (5'-C); 148.86 (5-C); 152.66 (8a-C); 158.27 (7-C); 161.28 (2-C)

MS (70 eV, m/z, I [% B]): 260 (45, M⁺); 203 (14); 202 (100, [M-C₃H₆O]⁺); 174 (51, [202-CO]⁺); 145 (11); 118 (10, [174-2CO]⁺); 89 (17); 63 (11); 51 (17, [C₄H₃]⁺); 41 (13)

C₁₄H₁₂O₅ (260.25): HRMS [m/z] C₁₄H₁₂O₅: ber.: 260.06848 gef.: 260.06850
C₁₃¹³CH₁₂O₅: ber.: 261.07184 gef.: 261.07185

(RS)-5-(2-Hydroxypropoxy)psoralen (3) ***(RS)-4-(2-Hydroxypropoxy)-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on**

150 mg (0.75 mmol) Bergaptol und 3.0 ml (33 mmol) 1-Brom-2-propanol werden unter Zusatz von 0.8 g Kaliumcarbonat in 50 ml Aceton nach Variante A umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 15 h. Abweichend wird der bei der Entfernung des Acetons verbleibende ölige Destillationsrückstand nach dem Abkühlen mit Petrolether versetzt. Der entstehende Niederschlag wird abgesaugt.

Ausbeute: 60 mg (0.23 mmol, 31 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 144 °C; hellgelb, pulvrig

IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3316 (m, br, ν_{OH}); 1721 (s, $\nu_{\text{C=O}}$); 1622 und 1606 (m, $\nu_{\text{C=C}}$); 758 (m, δ_{CH})

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, δ [ppm]): 1.21 (d, 3H, ³J=6.4 Hz, 5-OCH₂CH(OH)-CH₃); 4.02-4.09 (m, 1H, 5-OCH₂CH(OH)CH₃); 4.27 (dd, 1H, ²J_{AB}=9.5 Hz, ³J_{AX}=6.3 Hz, 5-OCH_AH_BCH_X(OH)CH₃); 4.37 (dd, 1H, ²J_{AB}=9.5 Hz, ³J_{BX}=4.1 Hz, 5-OCH_AH_B-CH_X(OH)CH₃); 5.04 (d, H/D-Tausch, 1H, ³J=4.9 Hz, 5-OCH₂CH(OH)CH₃); 6.35 (d, 1H, ³J=9.8 Hz, 3-H); 7.31 (d, 1H, ³J=2.3 Hz, 4'-H); 7.37 (s, 1H, 8-H); 8.04 (d, 1H, ³J=2.3 Hz, 5'-H); 8.37 (d, 1H, ³J=9.8 Hz, 4-H)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 19.15 (5-OCH₂CH(OH)CH₃); 66.82 (5-OCH₂CH(OH)CH₃); 78.37 (5-OCH₂CH(OH)CH₃); 94.79 (8-C); 104.71 (4'-C); 107.27 (4a-C); 113.12 (3-C); 114.21 (6-C); 138.93 (4-C); 145.20 (5'-C); 148.51 (5-C); 152.63 (8a-C); 158.13 (7-C); 161.07 (2-C)

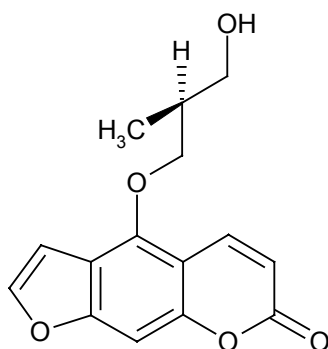
MS (70 eV, m/z, I [% B]): 260 (35, M⁺); 203 (13); 202 (100, [M-C₃H₆O]⁺); 174 (49, [202-CO]⁺); 118 (8, [174-2CO]⁺); 89 (11); 63 (8); 59 (24, [C₃H₇O]⁺); 51 (15, [C₄H₃]⁺); 41 (14)

C₁₄H₁₂O₅ (260.25): HRMS [m/z] C₁₄H₁₂O₅: ber.: 260.06848 gef.: 260.06850
 C₁₃¹³CH₁₂O₅: ber.: 261.07184 gef.: 261.07185

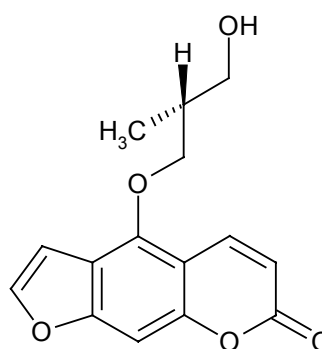
(S)-5-(3-Hydroxy-2-methylpropoxy)psoralen (S-4) * und

(R)-5-(3-Hydroxy-2-methylpropoxy)psoralen (R-4) *

(S)- bzw. (R)-4-(3-Hydroxy-2-methylpropoxy)-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on



S-4



R-4

Ansatzgröße **S-4**: 150 mg (0.75 mmol) Bergaptol, 550 µl (5.3 mmol) (S)-(+)-3-Brom-2-methyl-1-propanol; **R-4**: 200 mg (1.0 mmol) Bergaptol, 1 ml (9.6 mmol) (R)-(-)-3-Brom-2-methyl-1-propanol.

Die angegebenen Mengen Bergaptol und Alkylans werden unter Zusatz von 2 g Kaliumcarbonat in 50 ml Aceton nach Variante A umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 9.5 h.

Ausbeute: S-4: 65 mg (0.24 mmol, 32 % der Theorie)

R-4: 95 mg (0.35 mmol, 35 % der Theorie)

Schmelzpunkt: S-4: 131 °C; weiß, pulvrig

R-4: 130.5 °C; weiß, pulvrig

Die spektroskopischen Daten der beiden Verbindungen entsprechen sich und sind deshalb nur einmal exemplarisch aufgeführt.

IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3467 (s, ν_{OH}); 1713 (s, $\nu_{C=O}$); 1623 und 1604 (s, $\nu_{C=C}$); 746 (m, δ_{CH})

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, δ [ppm]): 1.04 (d, 3H, ³J=6.9 Hz, 5-OCH₂CH(CH₃)-CH₂OH); 2.09 (sext, 1H, mittlere ³J=6.2 Hz, 5-OCH₂CH(CH₃)CH₂OH); 3.48-3.52 (AB-Teil eines ABX-Systems, H/D-Tausch: d, 2H, ³J_{AX}=³J_{BX}=6.1 Hz, 5-OCH₂CH_X(CH₃)-

$\text{CH}_A\text{H}_B\text{OH}$); 4.38 (dd, 1H, $^2J_{AB}=9.1$ Hz, $^3J_{AX}=5.9$ Hz, 5-O $\text{CH}_A\text{H}_B\text{CH}_X(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$); 4.48 (dd, 1H, $^2J_{AB}=9.1$ Hz, $^3J_{BX}=5.5$ Hz, 5-O $\text{CH}_A\text{H}_B\text{CH}_X(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$); 4.67 (t, H/D-Tausch, 1H, mittlere $^3J=5.1$ Hz, 5-O $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$); 6.35 (d, 1H, $^3J=9.8$ Hz, 3-H); 7.34 (d, 1H, $^3J=2.4$ Hz, 4'-H); 7.35 (s, 1H, 8-H); 8.03 (d, 1H, $^3J=2.3$ Hz, 5'-H); 8.22 (d, 1H, $^3J=9.8$ Hz, 4-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , δ [ppm]): 13.66 (5-O $\text{CH}_2\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)\text{CH}_2\text{OH}$); 36.50 (5-O $\text{CH}_2\text{C}\underline{\text{H}}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$); 64.68 (5-O $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OH}$); 74.94 (5-O $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$); 94.08 (8-C); 105.13 (4'-C); 106.79 (4a-C); 112.66 (3-C); 113.53 (6-C); 139.11 (4-C); 144.85 (5'-C); 148.92 (5-C); 152.65 (8a-C); 158.26 (7-C); 161.22 (2-C)

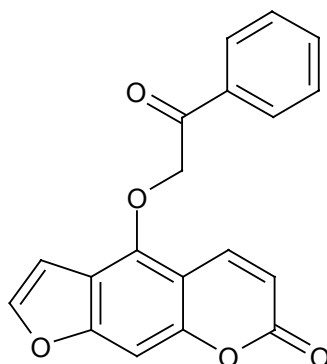
MS (70 eV, m/z, I [% B]): 274 (22, M^+); 203 (16); 202 (100, $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8\text{O}]^+$); 174 (43, $[\text{202}-\text{CO}]^+$); 145 (10, $[\text{174}-\text{CHO}]^+$); 89 (13); 55 (20); 51 (15, $[\text{C}_4\text{H}_3]^+$); 49 (12); 43 (14)

$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_5$ (274.27): S-4: HRMS [m/z] $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_5$ ber.: 274.08141 gef.: 274.08390
 $\text{C}_{14}^{13}\text{CH}_{14}\text{O}_5$ ber.: 275.08746 gef.: 275.08720

R-4: Elementaranalyse ber.: C 65.69% H 5.14% O 29.17%
 gef.: C 65.44% H 5.26%

5-Phenacyloxy-psoralen (5) *

4-Phenacyloxy-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on



350 mg (1.7 mmol) Bergaptol und 350 mg (2.3 mmol) Phenacylchlorid werden unter Zusatz von 1.2 g Kaliumcarbonat in 35 ml Aceton nach Variante B umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 1.5 h. Das Rohprodukt wird aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 280 mg (0.87 mmol, 51 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 142.5 °C (Methanol); weiß, watteartig

IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 1724 (s, $\nu_{C=O}$); 1687 (s, $\nu_{C=O}$); 1622 und 1606 (m, $\nu_{C=C}$); 751 (m, δ_{CH})

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 5.69 (s, 2H, 5-OCH₂COC₆H₅); 6.34 (d, 1H, ³J=9.8 Hz, 3-H); 6.84 (dd, 1H, ³J=2.4 Hz, ⁵J=1.0 Hz, 4'-H); 7.22 (s, 1H, 8-H); 7.60 (d, 1H, ³J=2.4 Hz, 5'-H); 7.51-7.56, 7.63-7.69 und 7.94-7.97 (3 m, 2H, 1H und 2H, 5-OCH₂COC₆H₅); 8.37 (dd, 1H, ³J=9.8 Hz, ⁵J=0.5 Hz, 4-H)

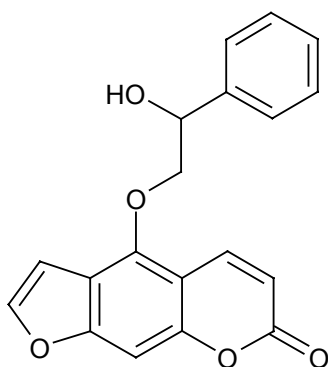
¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 74.31 (5-OCH₂COC₆H₅); 95.12 (8-C); 104.05 (4'-C); 107.66 (4a-C); 113.20 (3-C); 113.68 (6-C); 127.84 und 129.10 (2''-C, 3''-C, 5''-C, 6''-C); 134.03 (1''-C); 134.32 (4''-C); 139.45 (4-C); 145.49 (5'-C); 148.08 (5-C); 152.60 (8a-C); 157.98 (7-C); 161.02 (2-C); 193.30 (5-OCH₂COC₆H₅)

MS (70 eV, m/z, I [% B]): 321 (6); 320 (28, M⁺); 201 (6); 119 (25, [C₈H₇O]⁺); 106 (8); 105 (100, [C₇H₅O]⁺); 91 (30, [C₇H₇]⁺); 77 (31, [C₆H₅]⁺); 65 (7, [C₅H₅]⁺); 51 (14, [C₄H₃]⁺)

C₁₉H₁₂O₅ (320.30): HRMS [m/z] C₁₉H₁₂O₅: ber.: 320.06848 gef.: 320.06850
C₁₈¹³CH₁₂O₅: ber.: 321.07184 gef.: 321.07180

(RS)-5-(2-Hydroxy-2-phenylethoxy)psoralen (6) *

(RS)-4-(2-Hydroxy-2-phenylethoxy)-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on



150 mg (0.47 mmol) 5-Phenacyloxypsoralen (Verbindung **5**) werden in 15 ml trockenem Ethanol gelöst. Die Lösung wird unter Rühren bei Raumtemperatur tropfenweise mit 9 mg (0.24 mmol) Natriumborhydrid (gelöst in 5 ml trockenem Ethanol) versetzt. Nach 1.5 h wird das überschüssige Natriumborhydrid mit 4N-

Salzsäure zersetzt. Die Lösung wird im Vakuum eingedampft, dabei beginnt **6** bereits auszufallen. Der Rückstand wird mit Wasser versetzt und nach einigen Stunden Kühlung abgesaugt. Das Produkt wird aus Methanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 116 mg (0.36 mmol, 77 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 156 °C (Methanol/Wasser); weiß, watteartig

IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3575 und 3435 (m, br, ν_{OH}); 1720 (s, br, $\nu_{\text{C=O}}$); 1624 und 1604 (m, $\nu_{\text{C=C}}$); 750 (m, δ_{CH})

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 2.56 (d, H/D-Tausch, 1H, ³J=3.2 Hz, 5-CH₂CH(OH)C₆H₅); 4.49-4.56 (AB-Teil des ABX-Systems, 2H, 5-CH_AH_BCH_X(OH)-C₆H₅); 5.20 (dt, H/D-Tausch: t, 1H, ³J_{AX}=³J_{BX}= 5.8 Hz, ³J_{XOH}=3.2 Hz, 5-CH_AH_BCH_X(OH)C₆H₅); 6.27 (d, 1H, ³J=9.8 Hz, 3-H); 6.90 (dd, 1H, ³J=2.4 Hz, ⁵J=0.9 Hz, 4'-H); 7.18 (s, 1H, 8-H); 7.34-7.49 (m, 5H, 5-CH₂CH(OH)C₆H₅); 7.58 (d, 1H, ³J=2.4 Hz, 5'-H); 8.09 (dd, 1H, ³J=9.8 Hz, ⁵J=0.5 Hz, 4-H)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 73.15 (5-OCH₂CH(OH)C₆H₅); 77.91 (5-OCH₂CH(OH)C₆H₅); 94.86 (8-C); 104.65 (4'-C); 107.42 (4a-C); 113.03 (3-C); 114.32 (6-C); 126.26 und 128.84 (2''-C, 3''-C, 5''-C, 6''-C); 128.61 (4''-C); 139.07 (4-C); 139.58 (1''-C); 145.22 (5'-C); 148.36 (5-C); 152.56 (8a-C); 158.05 (7-C); 161.10 (2-C)

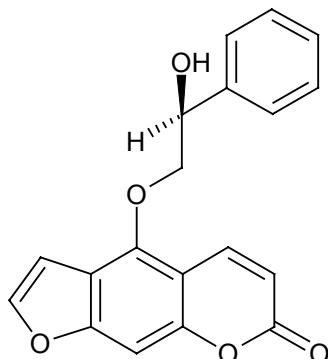
MS (70 eV, m/z, I [% B]): 322 (9, M⁺); 203 (14); 202 (100, [M-C₈H₈O]⁺); 174 (31, [202-CO]⁺); 103 (19); 91 (13, [C₇H₇]⁺); 89 (10); 79 (12); 77 (23, [C₆H₅]⁺); 51 (20, [C₄H₃]⁺); 43 (33)

C₁₉H₁₄O₅ (322.32): HRMS [m/z] C₁₉H₁₄O₅: ber.: 322.08414 gef.: 322.08410
C₁₈¹³CH₁₄O₅: ber.: 323.08746 gef.: 323.08890

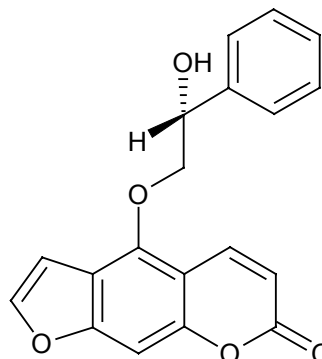
(S)-5-(2-Hydroxy-2-phenylethoxy)psoralen (S-6) * und

(R)-5-(2-Hydroxy-2-phenylethoxy)psoralen (R-6) *

(S)- bzw. (R)-4-(2-Hydroxy-2-phenylethoxy)-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on



S-6



R-6

Ansatzgröße **S-6**: 180 mg (0.9 mmol) Bergaptol, 1.5 ml (11 mmol) (S)-(+)-2-Chlor-1-phenylethanol; **R-6**: 250 mg (1.2 mmol) Bergaptol, 2.0 ml (15 mmol) (R)-(-)-2-Chlor-1-phenylethanol.

Die angegebenen Mengen Bergaptol und Alkylans werden unter Zusatz von 0.6 g Kaliumcarbonat in 15 ml Aceton nach der beschriebenen Methode umgesetzt (Variante A für **S-6**, Variante B für **R-6**). Die Reaktionszeit beträgt 20 h (**S-6**) bzw. 72 h (**R-6**).

Als Hauptprodukt entsteht bei der Umsetzung Verbindung **7**, welche von dem gewünschten Produkt abgetrennt werden muss. Mit dem nach Entfernen des Dichlormethans erhaltenen Destillationsrückstand wird eine Säulenchromatographie über 80 g Kieselgel durchgeführt (Merck Kieselgel 60 (0.063-0.200 mm); Fließmittel: Ethylacetat/Dichlormethan (1/5)). Als erstes Produkt mit einem R_f -Wert von 0.46 wird die Substanz **S-6** bzw. **R-6** eluiert, danach folgt mit einem R_f -Wert von 0.36 die umgelagerte Verbindung **7**. Die gesammelten Fraktionen werden jeweils im Vakuum zur Trockene eingengt. Alle erhaltenen Rohprodukte werden aus Ethanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: S-6: 11 mg (0.03 mmol, 4 % der Theorie)

R-6: 25 mg (0.08 mmol, 7 % der Theorie)

Schmelzpunkt: S-6: 155 °C (Ethanol/Wasser); weiß, watteartig

R-6: 154.5 °C (Ethanol/Wasser); weiß, watteartig

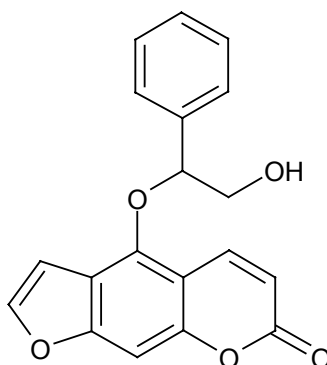
Die spektroskopischen Daten der Substanzen entsprechen denen der Verbindung **6** und sind dort zu entnehmen.

C₁₉H₁₄O₅ (322.32): S-6: HRMS [m/z] C₁₉H₁₄O₅: ber.: 322.08414 gef.: 322.08410
 C₁₈¹³CH₁₄O₅: ber.: 323.08746 gef.: 323.08730

S-6: HRMS [m/z] C₁₉H₁₄O₅: ber.: 322.08414 gef.: 322.08410
 C₁₈¹³CH₁₄O₅: ber.: 323.08746 gef.: 323.08890

(RS)-5-(2-Hydroxy-1-phenylethoxy)psoralen (7) *

(RS)-4-(2-Hydroxy-1-phenylethoxy)-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on



Die Verbindung **7** entsteht als Umlagerungsprodukt bei der Synthese der Substanzen **S-6** bzw. **R-6**; Herstellungsvorschrift siehe dort.

Ausbeute: 49 mg (0.15 mmol, 17 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 148.5 °C (Ethanol/H₂O); hellgelb, watteartig

IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3379 (m, br, ν_{OH}); 1732 (s, $\nu_{C=O}$); 1620 und 1605 (s, $\nu_{C=C}$); 750 (s, δ_{CH})

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 2.14 (dd, H/D-Tausch, 1H, ³J_{AOH}=8.3 Hz, ³J_{BOH}=4.6 Hz, 5-CH(C₆H₅)CH_AH_BOH); 3.98 (ddd, H/D-Tausch: dd, 1H, ²J_{AB}=12.1 Hz, ³J_{AOH}=8.3 Hz, ³J_{AX}=3.5 Hz, 5-CH_X(C₆H₅)CH_AH_BOH); 4.22 (ddd, H/D-Tausch: dd, 1H, ²J_{AB}=12.1 Hz, ³J_{BX}=8.1 Hz, ³J_{BOH}=4.6 Hz, 5-CH_X(C₆H₅)CH_AH_BOH); 5.55 (dd, 1H, ³J_{AX}=3.6 Hz, ³J_{BX}=8.1 Hz, 5-CH_X(C₆H₅)CH_AH_BOH); 6.25 (d, 1H, ³J=9.8 Hz, 3-H); 6.81 (dd, 1H, ³J=2.4 Hz, ⁵J=0.9 Hz, 4'-H); 7.17 (s, 1H, 8-H); 7.35 (s, 5H, 5-CH(C₆H₅)-CH₂OH); 7.51 (d, 1H, ³J=2.4 Hz, 5'-H); 8.18 (dd, 1H, ³J=9.8 Hz, ⁵J=0.5 Hz, 4-H)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 66.84 (5-OCH(C₆H₅)CH₂OH); 86.34 (5-OCH(C₆H₅)CH₂OH); 95.22 (8-C); 104.79 (4'-C); 108.34 (4a-C); 113.06 (3-C); 115.29

Experimenteller Teil

(6-C); 126.69 und 128.98 (2"-C, 3"-C, 5"-C, 6"-C); 129.10 (4"-C); 136.79 (1"-C); 139.24 (4-C); 145.21 (5'-C); 147.82 (5-C); 152.46 (8a-C); 157.87 (7-C); 161.07 (2-C)

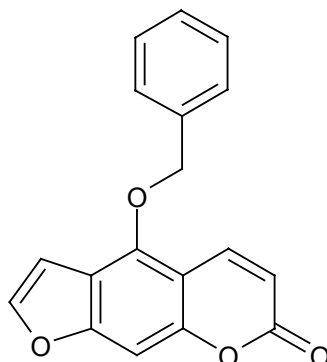
Die Struktur des Umlagerungsproduktes wurde mithilfe einer direkten CH-Korrelation und eines CH-COLOC bestätigt (siehe Kapitel 3).

MS (70 eV, m/z, I [% B]): 322 (2, M⁺); 203 (14); 202 (100, [M-C₈H₈O]⁺); 174 (22, [202-CO]⁺); 122 (22, [C₈H₁₀O]⁺); 103 (33); 91 (26, [C₇H₇]⁺); 89 (13); 77 (16, [C₆H₅]⁺); 51 (16, [C₄H₃]⁺)

C₁₉H₁₄O₅ (322.32): HRMS [m/z] C₁₉H₁₄O₅: ber.: 322.08414 gef.: 322.08540
C₁₈¹³CH₁₄O₅: ber.: 323.08746 gef.: 323.08760

5-Benzylloxypsoralen (8)

4-Benzyloxy-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-on



200 mg (1.0 mmol) Bergapten und 4.3 g (25 mmol) Benzylbromid werden unter Zusatz von 0.6 g Kaliumcarbonat in 15 ml Aceton nach Variante B umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 24 h. Das Produkt wird aus Methanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 240 mg (0.82 mmol, 82 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 136 °C (Methanol/Wasser); hellgelb, kristallin

Lit.: 142 °C (Caporale und Antonella, 1958)

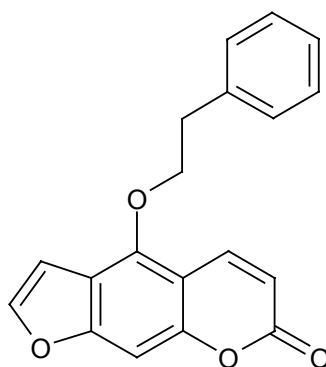
IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 1734 (s, $\nu_{C=O}$); 1626 und 1606 (m, $\nu_{C=C}$); 744 (s, δ_{CH})

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ [ppm]): 5.44 (s, 2H, 5- $\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 6.22 (d, 1H, $^3J=9.8$ Hz, 3-H); 6.93 (d, 1H, $^3J=2.3$ Hz, 4'-H); 7.17 (s, 1H, 8-H); 7.38-7.41 (m, 5H, 5- $\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 7.58 (d, 1H, $^3J=2.3$ Hz, 5'-H); 8.07 (d, 1H, $^3J=9.8$ Hz, 4-H)

$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_4$ (292.29)

5-(2-Phenylethoxy)psoralen (9) *

4-(2-Phenylethoxy)-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on



150 mg (0.7 mmol) Bergapton und 2.0 ml (14.8 mmol) 2-Phenylethylbromid werden unter Zusatz von 0.2 g Kaliumcarbonat in 10 ml Aceton nach Variante B umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 5 h. Das Rohprodukt wird aus Methanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 90 mg (0.29 mmol, 40 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 154.5 °C (Methanol/Wasser); hellgelb, kristallin

IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 1720 (s, $\nu_{\text{C=O}}$); 1624 und 1604 (m, $\nu_{\text{C=C}}$); 749 (s, δ_{CH})

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ [ppm]): 3.18 (t, 2H, $^3J=6.7$ Hz, 5- $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 4.65 (t, 2H, $^3J=6.7$ Hz, 5- $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 6.21 (d, 1H, $^3J=9.8$ Hz, 3-H); 6.84 (dd, 1H, $^3J=2.4$ Hz, $^5J=0.9$ Hz, 4'-H); 7.14 (s, br, 1H, 8-H); 7.28-7.38 (m, 5H, 5- $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{C}_6\text{H}_5$); 7.56 (d, 1H, $^3J=2.4$ Hz, 5'-H); 7.94 (d, 1H, $^3J=9.8$ Hz, 4-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , δ [ppm]): 36.50 (5- $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 73.62 (5- $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 94.28 (8-C); 104.89 (4'-C); 107.12 (4a-C); 112.68 (3-C); 113.76 (6-C); 126.90 (4''-C); 128.74 und 129.00 (2''-C, 3''-C, 5''-C, 6''-C); 137.54 (1''-C); 139.24 (4-C); 144.93 (5'-C); 148.69 (5-C); 152.66 (8a-C); 158.16 (7-C); 161.18 (2-C)

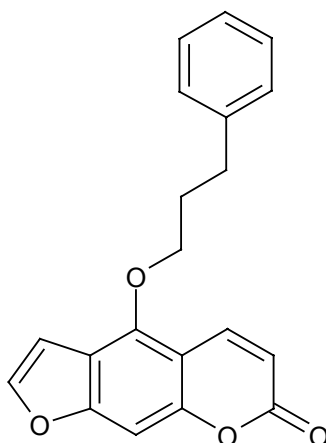
Experimenteller Teil

MS (70 eV, m/z, I [% B]): 306 (6, M⁺); 106 (9); 105 (100, [C₈H₉]⁺); 103 (7); 89 (3); 79 (16); 78 (2); 77 (13, [C₆H₅]⁺); 63 (2); 51 (6, [C₄H₃]⁺)

C₁₉H₁₄O₄ (306.32): berechnet: C 74.50% H 4.61% O 20.89%
gefunden: C 74.43% H 4.67%

5-(3-Phenylpropoxy)psoralen (10) *

4-(3-Phenylpropoxy)-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-on



300 mg (1.5 mmol) Bergapton und 0.3 ml (2.0 mmol) 3-Phenylpropylbromid werden unter Zusatz von 0.6 g Kaliumcarbonat in 15 ml Aceton nach Variante B umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 8 h. Das Rohprodukt wird aus Ethanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 120 mg (0.37 mmol, 25 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 109 °C (Ethanol/Wasser); hellgelb, kristallin

IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 1726 (s, $\nu_{C=O}$); 1620 und 1607 (s, $\nu_{C=C}$); 757 und 746 (m, δ_{CH})

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 2.22 (quint, 2H, mittlere ³J=6.9 Hz, 5-OCH₂CH₂CH₂C₆H₅); 2.88 (t, 2H, ³J=7.5 Hz, 5-O(CH₂)₂CH₂C₆H₅); 4.46 (t, 2H, ³J=6.3 Hz, 5-OCH₂(CH₂)₂C₆H₅); 6.27 (d, 1H, ³J=9.8 Hz, 3-H); 6.85 (dd, 1H, ³J=2.2 Hz, ⁵J=0.8 Hz, 4'-H); 7.13 (s, 1H, 8-H); 7.21-7.34 (m, 5H, 5-O(CH₂)₃C₆H₅); 7.55 (d, 1H, ³J=2.4 Hz, 5'-H); 8.10 (d, 1H, ³J=9.8 Hz, 4-H)

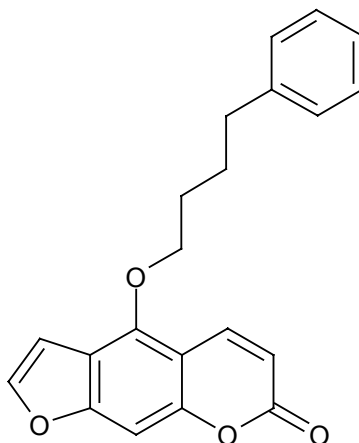
^{13}C -NMR (75.5 MHz, CDCl_3 , δ [ppm]): 31.45 und 32.17 (5-OCH₂(CH₂)₂C₆H₅); 71.91 (5-OCH₂(CH₂)₂C₆H₅); 93.90 (8-C); 105.10 (4'-C); 106.73 (4a-C); 112.59 (3-C); 113.21 (6-C); 126.25 (4''-C); 128.45 und 128.62 (2''-C, 3''-C, 5''-C, 6''-C); 139.29 (4-C); 140.86 (1''-C); 144.77 (5'-C); 148.91 (5-C); 152.72 (8a-C); 158.28 (7-C); 161.23 (2-C)

MS (70 eV, m/z, I [% B]): 320 (16, M⁺); 202 (25, [M-C₉H₁₀]⁺); 174 (7, [202-CO]⁺); 119 (10, [C₉H₁₁]⁺); 92 (8); 91 (100, [C₇H₇]⁺); 89 (5); 65 (8, [C₅H₅]⁺); 51 (7, [C₄H₃]⁺); 41 (13)

C₂₀H₁₆O₄ (320.34): berechnet: C 74.99% H 5.03% O 19.98%
 gefunden: C 74.20% H 5.14%

5-(4-Phenylbutoxy)psoralen (11) *

4-(4-Phenylbutoxy)-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on



300 mg (1.5 mmol) Bergapton und 0.5 ml (3.0 mmol) 4-Phenylbutylchlorid werden unter Zusatz von 0.6 g Kaliumcarbonat in 15 ml Aceton nach Variante B umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 31 h. Das Rohprodukt wird aus Ethanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 109 mg (0.33 mmol, 22 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 98 °C (Ethanol/Wasser); weiß, pulvrig

IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 1727 (s, $\nu_{\text{C=O}}$); 1622 und 1604 (s, $\nu_{\text{C=C}}$); 757 und 750 (m, δ_{CH})

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ [ppm]): 1.86-1.91 (m, 4H, 5-OCH₂(CH₂)₂CH₂C₆H₅); 2.73 (t, 2H, $^3\text{J}=7.2$ Hz, 5-O(CH₂)₃CH₂C₆H₅); 4.44 (t, 2H, $^3\text{J}=6.0$ Hz, 5-OCH₂(CH₂)₃-

Experimenteller Teil

C_6H_5); 6.27 (d, 1H, $^3J=9.8$ Hz, 3-H); 6.89 (dd, 1H, $^3J=2.4$ Hz, $^5J=1.0$ Hz, 4'-H); 7.13 (dd, 1H, $^5J=0.9$ Hz, $^5J=0.7$ Hz, 8-H); 7.18-7.23 und 7.27-7.33 (2 m, 3H und 2H, 5-O(CH₂)₄C₆H₅); 7.57 (d, 1H, $^3J=2.4$ Hz, 5'-H); 8.12 (dd, 1H, $^3J=9.8$ Hz, $^5J=0.7$ Hz, 4-H)

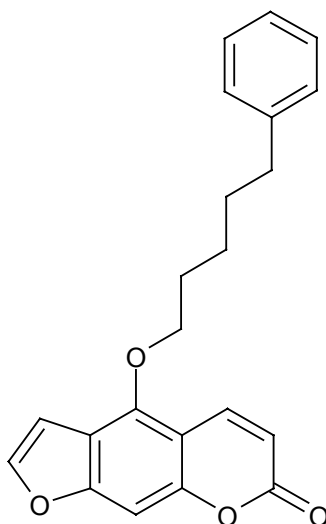
^{13}C -NMR (75.5 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 27.70 und 29.56 (5-OCH₂(CH₂)₂CH₂C₆H₅); 35.52 (5-O(CH₂)₃CH₂C₆H₅); 72.82 (5-OCH₂(CH₂)₃C₆H₅); 93.95 (8-C); 105.10 (4'-C); 106.83 (4a-C); 112.62 (3-C); 113.35 (6-C); 126.03 (4''-C), 128.41 und 128.46 (2''-C, 3''-C, 5''-C, 6''-C); 139.31 (4-C); 141.78 (1''-C); 144.78 (5'-C); 149.01 (5-C); 152.74 (8a-C); 158.28 (7-C); 161.25 (2-C)

MS (70 eV, m/z I [% B]): 334 (5, M⁺); 203 (5); 202 (33, [M-C₁₀H₁₂]⁺); 174 (6, [202-CO]⁺); 133 (7, [C₁₀H₁₃]⁺); 92 (8); 91 (100, [C₇H₇]⁺); 65 (7, [C₅H₅]⁺); 51 (6, [C₄H₃]⁺); 44 (6)

C₂₁H₁₈O₄ (334.37): berechnet: C 75.43% H 5.43% O 19.14%
gefunden: C 75.34% H 5.41%

5-(5-Phenylpentoxy)psoralen (12) *

4-(5-Phenylpentoxy)-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on



300 mg (1.5 mmol) Bergaptol und 0.7 ml (3.9 mmol) 5-Phenylpentylchlorid werden unter Zusatz von 0.6 g Kaliumcarbonat in 15 ml Aceton nach Variante B umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 27 h. Das Rohprodukt wird aus Ethanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 125 mg (0.36 mmol, 24 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 94.5 °C (Ethanol/H₂O); weiß, kristallin

IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 1720 (s, $\nu_{C=O}$); 1622 und 1605 (s, $\nu_{C=C}$); 749 (s, δ_{CH})

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 1.53-1.59, 1.69-1.77 und 1.85-1.95 (3 m, 3 x 2H, 5-OCH₂(CH₂)₃CH₂C₆H₅); 2.67 (t, 2H, ³J=7.5 Hz, 5-O(CH₂)₄CH₂C₆H₅); 4.43 (t, 2H, ³J=6.4 Hz, 5-OCH₂(CH₂)₄C₆H₅); 6.25 (d, 1H, ³J=9.8 Hz, 3-H); 6.91 (dd, 1H, ³J=2.4 Hz, ⁵J=1.0 Hz, 4'-H); 7.12 (t, 1H, ⁵J=0.8 Hz, 8-H); 7.17-7.21 und 7.25-7.31 (2 m, 3H und 2H, 5-O(CH₂)₄C₆H₅); 7.57 (d, 1H, ³J=2.4 Hz, 5'-H); 8.08 (dd, 1H, ³J=9.8 Hz, ⁵J=0.6 Hz, 4-H)

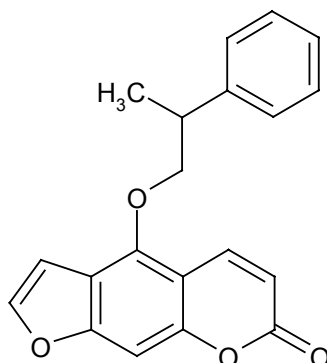
¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 25.50 (5-O(CH₂)₂CH₂(CH₂)₂C₆H₅); 29.88 und 31.01 (5-OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂C₆H₅); 35.72 (5-O(CH₂)₄CH₂C₆H₅); 72.82 (5-OCH₂(CH₂)₄C₆H₅); 93.86 (8-C); 105.14 (4'-C); 106.79 (4a-C); 112.56 (3-C); 113.27 (6-C); 125.84 (4''-C); 128.36 und 128.40 (2''-C, 3''-C, 5''-C, 6''-C); 139.32 (4-C); 142.15 (1''-C); 144.75 (5'-C); 149.03 (5-C); 152.73 (8a-C); 158.28 (7-C); 161.26 (2-C)

MS (70 eV, m/z I [% B]): 348 (10, M⁺); 203 (7); 202 (49, [M-C₁₁H₁₄]⁺); 174 (8, [202-CO]⁺); 105 (8); 91 (100, [C₇H₇]⁺); 65 (7, [C₅H₅]⁺); 51 (6, [C₄H₃]⁺); 49 (5); 41 (9)

C₂₂H₂₀O₄ (348.40): berechnet: C 75.84% H 5.79% O 18.37%
 gefunden: C 75.93% H 5.75%

(RS)-5-(2-Phenylpropoxy)psoralen (13) *

(RS)-4-(2-Phenylpropoxy)-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on



300 mg (1.5 mmol) Bergaptol und 0.6 ml (3.8 mmol) β -Bromcumol werden unter Zusatz von 0.6 g Kaliumcarbonat in 15 ml Aceton nach Variante B umgesetzt. Die

Experimenteller Teil

Reaktionszeit beträgt 28 h. Das Rohprodukt wird aus Ethanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 97 mg (0.30 mmol, 20 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 141.5 °C (Ethanol/Wasser); hellgelb, kristallin

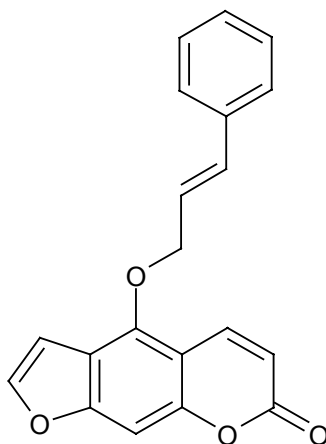
IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 1717 (s, $\nu_{C=O}$); 1624 und 1605 (m, $\nu_{C=C}$); 750 (m, δ_{CH})

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 1.47 (d, 3H, ³J=7.0 Hz, 5-OCH₂CH(CH₃)C₆H₅); 3.34 (sext, 1H, ³J=7.0 Hz, 5-OCH₂CH(CH₃)C₆H₅); 4.48 und 4.52 (2 dd, 2 x 1H, ²J_{AB}=9.0 Hz, ³J_{AX}=7.0 Hz, ³J_{BX}=6.8 Hz, 5-OCH_AH_BCH_X(CH₃)C₆H₅); 6.17 (d, 1H, ³J=9.8 Hz, 3-H); 6.84 (dd, 1H, ³J=2.4 Hz, ⁵J=0.9 Hz, 4'-H); 7.13 (dd, 1H, ⁵J=0.9 Hz, ⁵J=0.7 Hz, 8-H); 7.28-7.39 (m, 5H, 5-OCH₂CH(CH₃)C₆H₅); 7.56 (d, 1H, ³J=2.4, 5'-H); 7.82 (dd, 1H, ³J=9.8 Hz, ⁵J=0.7 Hz, 4-H)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 18.03 (5-OCH₂CH(CH₃)C₆H₅); 40.42 (5-OCH₂CH(CH₃)C₆H₅); 78.21 (5-OCH₂CH(CH₃)C₆H₅); 94.17 (8-C); 104.94 (4'-C); 107.02 (4a-C); 112.60 (3-C); 113.68 (6-C); 127.03 (4''-C); 127.37 und 128.75 (2''-C, 3''-C, 5''-C, 6''-C); 139.18 (4-C); 142.91 (1''-C); 144.86 (5'-C); 148.78 (5-C); 152.64 (8a-C); 158.15 (7-C); 161.17 (2-C)

MS (70 eV, m/z, I [% B]): 320 (11, M⁺); 203 (6); 202 (45, [M-C₉H₁₀]⁺); 174 (5, [202-CO]⁺); 119 (36, [C₉H₁₁]⁺); 92 (8); 91 (100, [C₇H₇]⁺); 77 (6, [C₆H₅]⁺); 51 (6, [C₄H₃]⁺); 41 (17)

C₂₀H₁₆O₄ (320.34): berechnet: C 74.99% H 5.03% O 19.98%
gefunden: C 74.85% H 5.03%

(E)-5-(3-Phenyl-2-propenyloxy)psoralen (14) **(E)*-4-(3-Phenyl-2-propenyloxy)-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-on

300 mg (1.5 mmol) Bergaptol und 400 mg (2.0 mmol) Cinnamylbromid werden unter Zusatz von 0.6 g Kaliumcarbonat in 15 ml Aceton nach Variante B umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 7 h. Das Rohprodukt wird aus Ethanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 104 mg (0.33 mmol, 22 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 140 °C (Ethanol/Wasser); hellgelb, kristallin

IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 1715 (m, br, $\nu_{C=O}$); 1622 und 1606 (s, $\nu_{C=C}$); 746 (m, δ_{CH})

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 5.09 (dd, 2H, ³J=6.0 Hz, ⁴J=1.2 Hz, 5-OCH₂-CHCHC₆H₅); 6.29 (d, 1H, ³J=9.8 Hz, 3-H); 6.45 (dt, 1H, ³J=15.9 Hz, ³J=6.0 Hz, 5-OCH₂CHCHC₆H₅); 6.76 (d, br, 1H, ³J=15.8 Hz, 5-OCH₂CHCHC₆H₅); 6.98 (dd, 1H, ³J=2.4 Hz, ⁵J=0.9 Hz, 4'-H); 7.19 (s, br, 1H, 8-H); 7.29-7.43 (m, 5H, 5-OCH₂CHCHC₆H₅); 7.61 (d, 1H, ³J=2.4 Hz, 5'-H); 8.21 (d, 1H, ³J=9.8 Hz, 4-H)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 73.71 (5-OCH₂CHCHC₆H₅); 94.55 (8-C); 104.90 (4'-C); 107.48 (4a-C); 112.89 (3-C); 114.13 (6-C); 123.36 (5-OCH₂CHCHC₆H₅); 126.70 und 128.75 (2''-C, 3''-C, 5''-C, 6''-C); 128.41 (4''-C); 134.45 (5-OCH₂CHCHC₆H₅); 135.91 (1''-C); 139.35 (4-C); 145.12 (5'-C); 148.59 (5-C); 152.67 (8a-C); 158.15 (7-C); 161.18 (2-C)

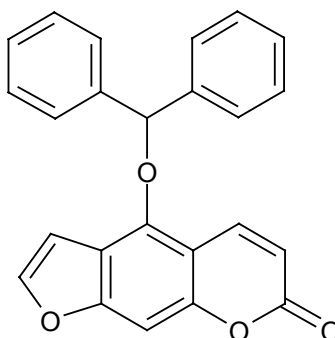
MS (70 eV, m/z, I [% B]): 318 (3, M⁺); 202 (11, [M-C₉H₈]⁺); 174 (7, [202-CO]⁺); 118 (14); 117 (100, [C₉H₉]⁺); 116 (11); 115 (34); 91 (13, [C₇H₇]⁺); 89 (8); 63 (8); 51 (11, [C₄H₃]⁺)

Experimenteller Teil

C₂₀H₁₄O₄ (318.33): HRMS [m/z] C₂₀H₁₄O₄: ber.: 318.08920 gef.: 318.08900
C₁₉¹³CH₁₄O₄: ber.: 319.09256 gef.: 319.09240

5-Diphenylmethoxyypsoralen (15) *

4-Diphenylmethoxy-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on



200 mg (1.0 mmol) Bergapton und 0.4 g (1.6 mmol) Diphenylmethylbromid werden unter Zusatz von 0.4 g Kaliumcarbonat in 15 ml Aceton bei Raumtemperatur nach Variante B umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 45 h. Das Rohprodukt wird aus Aceton/Wasser umkristallisiert.

Unter Rückflussbedingungen entsteht ein anderes Produkt gleicher Masse. Die phenolische Hydroxylgruppe ist an dieser Reaktion nicht beteiligt, stattdessen wird lt. Deutung der Spektren in Position 8 eine Bindung im Sinne einer elektrophilen aromatischen Substitution geknüpft (Spektren nicht gezeigt).

Ausbeute: 132 mg (0.36 mmol, 36 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 173 °C (Aceton/Wasser); weiß, kristallin

IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 1726 (s, $\nu_{C=O}$), 1619 und 1604 (s, $\nu_{C=C}$), 745 (s, δ_{CH})

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 6.29 (d, 1H, ³J=9.8 Hz, 3-H); 6.43 (s, 1H, 5-OCH(C₆H₅)₂); 6.57 (dd, 1H, ³J=2.4 Hz, ⁵J=1.0 Hz, 4'-H); 7.18 (t, 1H, ⁵J=0.8 Hz, 8-H); 7.30-7.41 (m, 10H, 5-OCH(C₆H₅)₂); 7.49 (d, 1H, ³J=2.4 Hz, 5'-H); 7.88 (dd, 1H, ³J=9.8 Hz, ⁵J=0.6 Hz, 4-H)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 87.15 (5-OCH(C₆H₅)₂); 95.24 (8-C); 104.65 (4'-C); 108.63 (4a-C); 113.01 (3-C); 115.64 (6-C); 127.02 und 128.76 (2''-C, 3''-C, 5''-C)

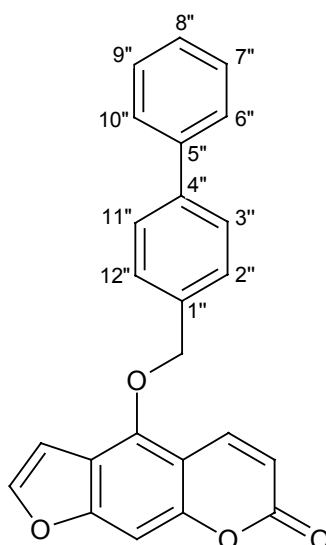
C, 6''-C); 128.40 (4''-C); 139.37 (4-C); 140.35 (1''-C); 145.24 (5'-C); 148.10 (5-C); 152.49 (8a-C); 157.86 (7-C); 161.05 (2-C)

MS (70 eV, m/z, I [% B]): 368 (1, M⁺); 202 (100, [M-C₁₃H₁₀]⁺); 174 (71, [202-CO]⁺); 167 (20, [C₁₃H₁₁]⁺); 118 (38, [174-2CO]⁺); 90 (40); 89 (45); 51 (50, [C₄H₃]⁺); 50 (35); 49 (38); 44 (46)

C₂₄H₁₆O₄ (368.39): berechnet: C 78.25% H 4.38% O 17.37%
 gefunden: C 78.17% H 4.38%

5-(4-Biphenylyl)methoxypsoralen (16) *

4-(4-Biphenylyl)methoxy-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-on



200 mg (1.0 mmol) Bergaptol und 250 mg (1.2 mmol) Biphenylmethylchlorid werden unter Zusatz von 0.4 g Kaliumcarbonat in 10 ml Aceton nach Variante B umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 6 h. Das Rohprodukt wird aus Aceton umkristallisiert.

Ausbeute: 120 mg (0.33 mmol, 33 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 187 °C (Aceton); weiß, kristallin

IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 1732 (s, $\nu_{C=O}$); 1628 und 1600 (m, $\nu_{C=C}$); 749 (m, δ_{CH})

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 5.49 (s, 2H, 5-OCH₂C₆H₄C₆H₅); 6.24 (d, 1H, ³J=9.8 Hz, 3-H); 6.97 (dd, 1H, ³J=2.4 Hz, ⁵J=1.0 Hz, 4'-H); 7.19 (s, br, 1H, 8-H); 7.34-7.66 (m, 10H, 5-OCH₂C₆H₄C₆H₅ und 5'-H); 8.11 (dd, 1H, ³J=9.8 Hz, ⁵J=0.6 Hz, 4-H)

Experimenteller Teil

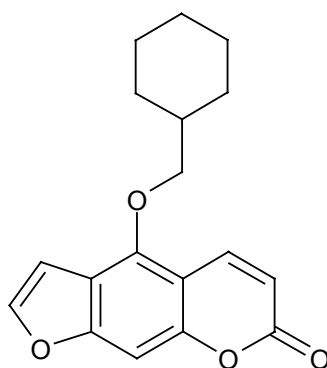
^{13}C -NMR (75.5 MHz, CDCl_3 , δ [ppm]): 74.86 (5- $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_5$); 94.64 (8-C); 104.94 (4'-C); 107.49 (4a-C); 112.92 (3-C); 114.14 (6-C); 127.13, 127.57, 128.30 und 128.89 (2''-C, 3''-C, 6''-C, 7''-C, 9''-C, 10''-C, 11''-C, 12''-C); 127.65 (8''-C), 135.01 (1''-C); 139.30 (4-C); 140.42 und 141.72 (4''-C, 5''-C); 145.15 (5'-C); 148.67 (5-C); 152.68 (8a-C); 158.18 (7-C); 161.12 (2-C)

MS (70 eV, m/z, I [% B]): 368 (0.2, M^+); 168 (15); 167 (100, $[\text{C}_{13}\text{H}_{11}]^+$); 166 (5); 165 (17); 152 (11); 145 (4); 115 (4); 89 (9); 63 (8); 51 (11, $[\text{C}_4\text{H}_3]^+$)

$\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{O}_4$ (368.39): berechnet: C 78.25% H 4.38% O 17.37%
gefunden: C 78.28% H 4.34%

5-Cyclohexylmethoxypsoralen (17) *

4-Cyclohexylmethoxy-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on



150 mg (0.7 mmol) Bergapton und 1.0 ml (7.2 mmol) Cyclohexylmethylbromid werden unter Zusatz von 0.2 g Kaliumcarbonat in 10 ml Aceton nach Variante B umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 23 h. Das Rohprodukt wird aus Ethanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 79 mg (0.26 mmol, 36 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 153.5 °C (Ethanol/Wasser); weiß, kristallin

IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 2929 und 2848 (s, ν_{CH}); 1721 (s, $\nu_{\text{C=O}}$); 1620 und 1603 (s, $\nu_{\text{C=C}}$); 750 (s, δ_{CH})

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ [ppm]): 1.13-1.38 und 1.73-1.94 (2 m, 5H und 6H, 5- $\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_{11}$); 4.24 (d, 2H, $^3\text{J}=5.9$ Hz, 5- $\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_{11}$); 6.28 (d, 1H, $^3\text{J}=9.8$ Hz, 3-H);

6.95 (dd, 1H, $^3J=2.4$ Hz, $^5J=0.9$ Hz, 4'-H); 7.13 (s, br, 1H, 8-H); 7.57 (d, 1H, $^3J=2.4$ Hz, 5'-H); 8.17 (d, 1H, $^3J=9.8$ Hz, 4-H)

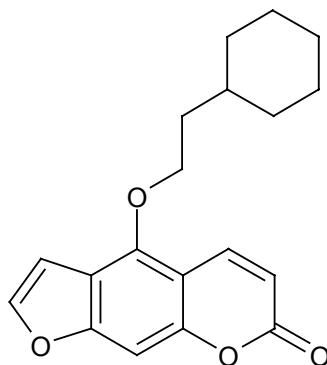
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , δ [ppm]): 25.76 (3''-C, 5''-C); 26.41 (4''-C); 29.81 (2''-C, 6''-C); 38.55 (1''-C); 78.33 (5-OCH₂C₆H₁₁); 93.76 (8-C); 105.27 (4'-C); 106.73 (4a-C); 112.52 (3-C); 113.24 (6-C); 139.37 (4-C); 144.67 (5'-C); 149.31 (5-C); 152.78 (8a-C); 158.34 (7-C); 161.32 (2-C)

MS (70 eV, m/z, I [% B]): 298 (12, M⁺); 203 (14); 202 (94, [M-C₇H₁₂]⁺); 174 (15, [202-CO]⁺); 97 (12, [C₇H₁₃]⁺); 69 (7); 55 (100, [C₄H₇]⁺); 51 (6, [C₄H₃]⁺); 43 (8); 41 (26)

C₁₈H₁₈O₄ (298.34): berechnet: C 72.47% H 6.08% O 21.45%
gefunden: C 72.35% H 5.99%

5-(2-Cyclohexylethoxy)psoralen (18) *

4-(2-Cyclohexylethoxy)-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on



300 mg (1.5 mmol) Bergapton und 0.5 ml (3.3 mmol) 2-Cyclohexylethylbromid werden unter Zusatz von 0.6 g Kaliumcarbonat in 15 ml Aceton nach Variante B umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 24 h. Das Rohprodukt wird aus Ethanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 263 mg (0.84 mmol, 57 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 117 °C (Ethanol/Wasser); weiß, pulvrig

IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 2919 und 2845 (s, ν_{CH}); 1723 (s, $\nu_{\text{C=O}}$); 1625 und 1603 (s, $\nu_{\text{C=C}}$); 748 (s, δ_{CH})

Experimenteller Teil

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ [ppm]): 0.95-1.81 (m, 13H, 5-OCH₂CH₂C₆H₁₁); 4.49 (t, 2H, $^3\text{J}=6.6$ Hz, 5-OCH₂CH₂C₆H₅); 6.28 (d, 1H, $^3\text{J}=9.8$ Hz, 3-H); 6.95 (dd, 1H, $^3\text{J}=2.4$ Hz, $^5\text{J}=1.0$ Hz, 4'-H); 7.13 (s, br, 1H, 8-H); 7.58 (d, 1H, $^3\text{J}=2.4$ Hz, 5'-H); 8.15 (dd, 1H, $^3\text{J}=9.8$ Hz, $^5\text{J}=0.5$ Hz, 4-H)

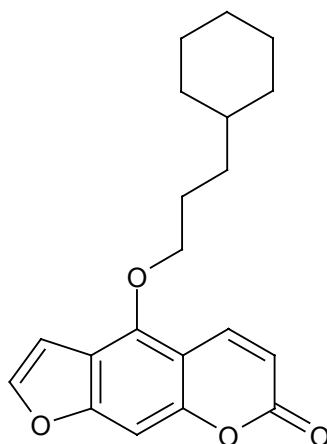
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , δ [ppm]): 26.21 (3''-C, 5''-C); 26.43 (4''-C); 33.31 (2''-C, 6''-C); 34.60 (1''-C); 37.35 (5-OCH₂CH₂C₆H₁₁); 71.07 (5-OCH₂CH₂C₆H₁₁); 93.79 (8-C); 105.24 (4'-C); 106.79 (4a-C); 112.52 (3-C); 113.23 (6-C); 139.42 (4-C); 144.71 (5'-C); 149.16 (5-C); 152.77 (8a-C); 158.33 (7-C); 161.30 (2-C)

MS (70 eV, m/z, I [% B]): 312 (13, M⁺); 203 (18); 202 (98, [M-C₈H₁₄]⁺); 174 (13, [202-CO]⁺); 111 (12, [C₈H₁₅]⁺); 69 (100); 67 (10); 55 (71, [C₄H₇]⁺); 43 (9); 41 (54)

C₁₉H₂₀O₄ (312.36): berechnet: C 73.06% H 6.45% O 20.49%
gefunden: C 73.11% H 6.52%

5-(3-Cyclohexylpropoxy)psoralen (19) *

4-(3-Cyclohexylpropoxy)-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on



300 mg (1.5 mmol) Bergapton und 0.9 ml (5.4 mmol) 3-Cyclohexylpropylchlorid werden unter Zusatz von 0.6 g Kaliumcarbonat in 15 ml Aceton nach Variante B umgesetzt. Die Reaktionszeit beträgt 38 h. Das Rohprodukt wird aus Ethanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 223 mg (0.68 mmol, 46 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 115 °C (Ethanol/Wasser); weiß, kristallin

IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]): 2921 und 2849 (s, ν_{CH}); 1720 (s, $\nu_{\text{C=O}}$); 1618 und 1604 (m, $\nu_{\text{C=C}}$); 754 (m, δ_{CH})

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ [ppm]): 0.87-1.93 (m, 15H, 5-OCH₂(CH₂)₂C₆H₁₁); 4.43 (t, 2H, $^3\text{J}=6.5$ Hz, 5-OCH₂(CH₂)₂C₆H₁₁); 6.28 (d, 1H, $^3\text{J}=9.8$ Hz, 3-H); 6.94 (dd, 1H, $^3\text{J}=2.4$ Hz, $^5\text{J}=1.0$ Hz, 4'-H); 7.13 (t, 1H, $^5\text{J}=0.8$ Hz, 8-H); 7.58 (d, 1H, $^3\text{J}=2.4$ Hz, 5'-H); 8.18 (dd, 1H, $^3\text{J}=9.8$ Hz, $^5\text{J}=0.6$ Hz, 4-H)

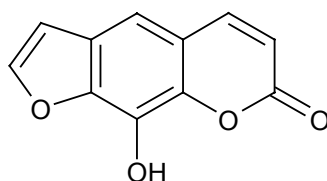
$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3 , δ [ppm]): 26.33 (3''-C, 5''-C); 26.60, 27.44 und 33.66 (4''-C und 5-OCH₂(CH₂)₂C₆H₁₁); 33.36 (2''-C, 6''-C); 37.47 (1''-C); 73.42 (5-OCH₂(CH₂)₂C₆H₁₁); 93.83 (8-C); 105.19 (4'-C); 106.82 (4a-C); 112.53 (3-C); 113.31 (6-C); 139.41 (4-C); 144.73 (5'-C); 149.15 (5-C); 152.76 (8a-C); 158.31 (7-C); 161.31 (2-C)

MS (70 eV, m/z, I [% B]): 326 (19, M⁺); 203 (17); 202 (100, [M-C₉H₁₆]⁺); 174 (15, [202-CO]⁺); 83 (30); 69 (57); 57 (11); 55 (71, [C₄H₇]⁺); 43 (11); 41 (63)

C₂₀H₂₂O₄ (326.39): berechnet: C 73.60% H 6.79% O 19.61%
 gefunden: C 73.64% H 6.86%

8-Hydroxypsoralen (Xanthotoxol)

9-Hydroxy-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on



Die Synthese erfolgt analog zu der Darstellung von Bergaptol in der fünffachen Ansatzgröße. Statt 5-Methoxypsoralen wird 8-Methoxypsoralen (Xanthotoxin) eingesetzt.

Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung für die Synthese der Verbindung **1** und von Psoralenchinon verwendet.

Ausbeute: 4.2 g Rohprodukt (20.77 mmol, 89 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 243 °C; Lit.: 245-247 °C (Abu-Mustafa et al., 1967); 242 °C (Schönberg und Aziz, 1953)

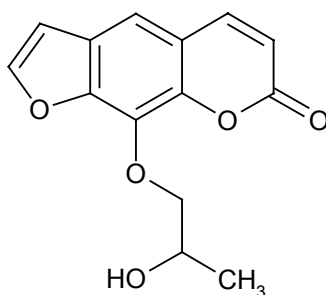
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, δ [ppm]): 6.40 (d, 1H, ³J=9.5 Hz, 3-H); 7.04 (d, 1H, ³J=1.9 Hz, 4'-H); 7.45 (s, 1H, 5-H); 8.07 (d, 1H, ³J=1.9 Hz, 5'-H); 8.12 (d, 1H, ³J=9.7 Hz, 4-H); 10.56-10.79 (br, H/D-Tausch, 1H, 8-OH)

Die Zuordnung der Signale erfolgte nach Razdan et al., 1987.

C₁₁H₆O₄ (202.17)

8-(2-Hydroxypropoxy)psoralen (1) *

9-(2-Hydroxypropoxy)-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on



1.0 g (5 mmol) Xanthotoxol und 3.0 ml (33 mmol) 1-Brom-2-propanol werden unter Zusatz von 10 g Kaliumcarbonat in 300 ml Aceton analog der für Bergaptol beschriebenen Methode umgesetzt (Variante A). Die Reaktionszeit beträgt 23.5 h. Der bei Entfernung des Dichlormethans verbleibende ölige Destillationsrückstand wird kühl gestellt. Der entstehende Niederschlag wird abgesaugt.

Ausbeute: 95 mg (0.37 mmol, 7.4 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 95 °C; weiß, pulvrig

IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 3376 (m, br, ν_{OH}); 1716 (s, $\nu_{\text{C=O}}$); 1624 (m, $\nu_{\text{C=C}}$); 754 (m, δ_{CH})

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, δ [ppm]): 1.23 (d, 3H, ³J=6.3 Hz, 8-OCH₂CH(OH)-CH₃); 3.96-4.02 (m, 1H, 8-OCH₂CH(OH)CH₃); 4.17 (dd, 1H, ²J_{AB}=9.8 Hz, ³J_{AX}= 5.5 Hz, 8-OCH_AH_BCH_X(OH)CH₃); 4.33 (dd, 1H, ²J_{AB}=9.8 Hz, ³J_{BX}=5.8 Hz, 8-OCH_AH_B-CH_X(OH)CH₃); 4.86 (d, H/D-Tausch, 1H, ³J=5.0 Hz, 8-OCH₂CH(OH)CH₃); 6.44 (d, 1H, ³J=9.6 Hz, 3-H); 7.10 (d, 1H, ³J=2.2 Hz, 4'-H); 7.68 (s, 1H, 5-H); 8.12 (d, 1H, ³J=2.2 Hz, 5'-H); 8.15 (d, 1H, ³J=9.7 Hz, 4-H)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 18.08 (8-OCH₂CH(OH)CH₃); 66.51 (8-OCH₂-CH(OH)CH₃); 79.61 (8-OCH₂CH(OH)CH₃); 106.86 (4'-C); 113.69 (5-C); 114.80 (3-C);

116.52 (4a-C); 125.99 (6-C); 131.68 (8-C); 143.48 (8a-C); 144.30 (4-C); 146.78 (5'-C); 148.15 (7-C); 160.25 (2-C)

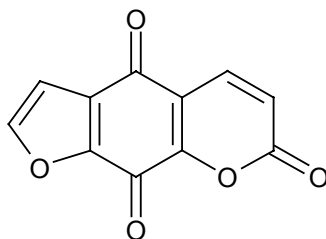
Die Zuordnung der Signale erfolgte analog zu Xanthotoxol (Duddeck und Kaiser, 1982).

MS (70 eV, m/z, I [% B]): 260 (16, M⁺); 215 (11, [260-C₂H₅O]⁺); 203 (13); 202 (100, [M-C₃H₆O]⁺); 174 (39, [202-CO]⁺); 146 (7, [174-CO]⁺); 90 (10); 89 (20); 63 (15); 51 (8, [C₄O₃]⁺)

C₁₄H₁₂O₅ (260.25): HRMS [m/z] C₁₄H₁₂O₅: ber.: 260.06848 gef.: 260.06850
C₁₃¹³CH₁₂O₅: ber.: 261.07184 gef.: 261.07189

Psoralenchinon

7-Oxo-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-4,9-chinon



3.5 g (17 mmol) Xanthotoxol werden in 175 ml Eisessig unter leichtem Erwärmen gelöst. Der Lösung werden 105 ml wässrige, 15%ige Chromtrioxid-Lösung zugesetzt. Die Mischung wird unter starkem Rühren kurz bis zum Kochen erhitzt. Der Ansatz wird dann sofort auf 1000 g Eis gegossen, wobei sich das Chinon als sandiger, oranger Niederschlag abzuscheiden beginnt. Das Chinon wird abgesaugt.

Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung für die Synthese von 5,8-Dihydroxy-psoralen verwendet.

Ausbeute: 1.4 g (6.48 mmol, 38 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 273 °C; Lit.: 272-276 °C (Abu-Mustafa et al., 1967)

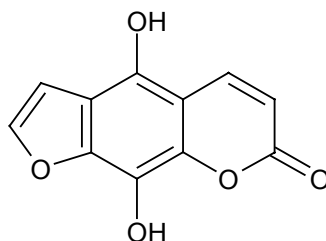
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, δ [ppm]): 6.76 (d, 1H, ³J=9.6 Hz, 3-H); 7.18 (s, 1H, 4'-H); 8.03 (d, 1H, ³J=9.6 Hz, 4-H); 8.35 (s, 1H, 5'-H)

Die Zuordnung der Signale erfolgte nach Abou Elzahab, 1993.

C₁₁H₄O₅ (216.15)

5,8-Dihydroxypsoralen

4,9-Dihydroxy-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-on



1.0 g (4.5 mmol) Psoralenchinon und 6 g Zinkstaub werden in einer Mischung aus 60 ml Aceton mit 200 ml Wasser bei Raumtemperatur suspendiert. Über 4 h werden 20 ml konzentrierte Salzsäure tropfenweise zugesetzt. Nach 5 h, wenn der Ansatz sich von orange nach grüngelb verfärbt hat, wird der überschüssige Zinkstaub abfiltriert und der Ansatz auf etwa die Hälfte unter Vakuum eingeeengt. Nach 2 h im Kühlschrank fällt das Hydrochinon in feinen gelben Nadeln aus.

Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung für die Synthese der Verbindung **20** eingesetzt.

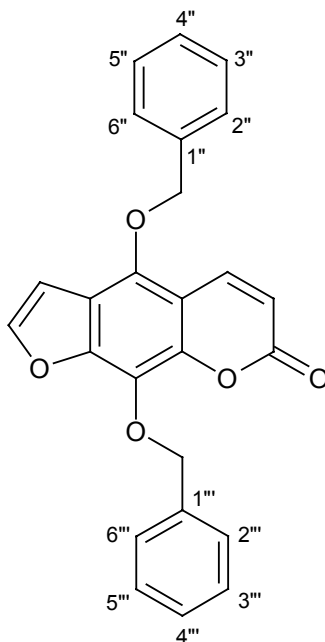
Ausbeute: 714 mg (3.27 mmol, 71 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 266 °C; Lit.: 270 °C (Brokke und Christensen, 1959)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ [ppm]): 6.22 (d, 1H, ³J=9.9 Hz, 3-H); 7.15 (s, 1H, 4'-H); 7.91 (s, 1H, 5'-H); 8.23 (d, 1H, ³J=9.9 Hz, 4-H); 9.63 und 10.45 (2 s, H/D-Tausch, 2 x 1H, 5- und 8-OH)

Die Zuordnung der Signale erfolgte nach Wulff, 1998.

C₁₁H₆O₅ (218.17)

5,8-Dibenzyloxypsoralen (20) *4,9-Dibenzyloxy-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-on

400 mg getrocknetes Kaliumcarbonat und eine Spatelspitze Kaliumiodid werden in 20 ml trockenem Aceton im Dreihalskolben suspendiert. 150 mg (0.7 mmol) 5,8-Dihydroxypsoralen und 3.0 ml (25 mmol) Benzylbromid werden zu der Suspension gegeben. Die Mischung wird 2.75 h unter Rühren und Stickstoffbegasung zum Rückfluss erhitzt. Danach wird der Ansatz auf 50 ml Wasser gegeben und mit konzentrierter Salzsäure auf pH 1 gebracht. Aceton wird im Vakuum aus dem Ansatz entfernt, der verbleibende ölige Destillationsrückstand wird nach dem Abkühlen mit Petrolether versetzt. Nach einigen Stunden im Kühlschrank scheidet sich der Niederschlag ab. Er wird abgesaugt und in Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wird durch Waschen mit 2%iger Natronlauge gereinigt, anschließend mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 134 mg (0.34 mmol, 48 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 154.5 °C (Methanol); weiß, kristallin

IR (KBr, $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]): 1723 (s, $\nu_{C=O}$); 1618 (m, $\nu_{C=C}$); 756 (s, δ_{CH})

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 5.32 und 5.41 (2 s, 2 x 2H, 5- und 8-OCH₂-C₆H₅); 6.22 (d, 1H, ³J=10.1 Hz, 3-H); 6.88 (d, 1H, ³J=2.3 Hz, 4'-H); 7.30-7.39 und

Experimenteller Teil

7.54-7.56 (2 m, 8H und 2H, 5- und 8-OCH₂C₆H₅); 7.61 (d, 1H, ³J=2.3 Hz, 5'-H); 7.99 (d, 1H, ³J=10.1 Hz, 4-H)

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃, δ [ppm]): 75.67 und 75.90 (5- und 8-OCH₂C₆H₅); 104.98 (4'-C); 108.80 (4a-C); 113.09 (3-C); 116.15 (6-C); 127.35 (8-C); 128.01, 128.37, 128.39 und 128.81 (2''-C, 3''-C, 5''-C, 6''-C, 2'''-C, 3'''-C, 5'''-C, 6'''-C); 128.26 und 128.72 (4''-C, 4'''-C); 136.12 und 136.82 (1''-C, 1'''-C); 139.42 (4-C); 143.35 (5-C); 144.06 (8-C); 145.37 (5'-C); 150.23 (7-C); 160.35 (2-C)

Die Zuordnung der Signale erfolgte analog zu der Verbindung 5,8-Diethoxypsoralen (Wulff, 1998).

MS (70 eV, m/z, I [% B]): 398 (14, M⁺); 307 (45, [M-C₇H₇]⁺); 182 (14); 160 (13); 104 (14); 92 (83); 91 (1000%, [C₇H₇]⁺); 89 (13); 65 (91, [C₅H₅]⁺); 63 (13)

C₂₅H₁₈O₅ (398.41): berechnet: C 75.37% H 4.55% O 20.08%
gefunden: C 75.30% H 4.56%

10 Literaturverzeichnis

Abou Elzahab, M. Photooxygenation of some potentially skin-photosensitizing hydroxyfurocoumarins, Part 2: Xanthotoxol and bergaptol. *Pharmazie*. **1993**, *48*, 144-145

Abu-Mustafa, E. A.; El-Tawil, B. A. H.; Fayez, M. B. E. Natural coumarins: Part VIII-Some reactions of imperatorin & related products. *Indian J. Chem.* **1967**, *5*, 283-286

Aiyar, J.; Withka, J. M.; Rizzi, J. P.; Singleton, D. H.; Andrews, G. C.; Lin, W.; Boyd, J.; Hanson, D. C.; Simon, M.; Dethlefs, B.; Lee, C.; Hall, J. E.; Gutman, G. A.; Chandy, K. G. Topology of the pore-region of a K⁺ channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. *Neuron*. **1995**, *15*, 1169-1181

Aiyar, J.; Rizzi, J. P.; Gutman, G. A.; Chandy, K. G. The signature sequence of voltage-gated potassium channels projects into the external vestibule. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 31013-31016

Armstrong, C. M.; Bezanilla, F. Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the Na channels. *J. Gen. Physiol.* **1974**, *63*, 533-552

Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft. "Aus der UAW-Datenbank" Hypertonie unter Leflunomid. *Dtsch. Arztebl.* **2002**, *99*, A-1990

Averbeck, D. Recent advances in psoralen phototoxicity mechanism. *Photochem. Photobiol.* **1989**, *50*, 859-882

Bachmann, A.; Gutcher, I.; Kopp, K.; Brendel, J.; Bosch, R. F.; Busch, A. E.; Gögelein, H. Characterization of a novel Kv1.5 channel blocker in *Xenopus* oocytes, CHO cells, human and rat cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2001**, *364*, 472-478

Baker, R.; Chee, J.; Bao, J.; Garcia, M. L.; Kaczorowski, G.; Kotliar, A.; Kayser, F.; Liu, C.; Miao, S.; Rupprecht, K. M.; Parsons, W. H.; Schmalhofer, W.; Liver-ton, N.; Clairborne, C. F.; Claremon, D. A.; Wayne, J. Carbocyclic potassium channel inhibitors. *PCT Int. Appl. WO. 0025770*. **2000**

- Bardien-Kruger, S.; Wulff, H.; Arieff, Z.; Brink, P.; Chandy, K. G.; Corfield, V.** Characterisation of the human voltage-gated potassium channel gene, *KCNA7*, a candidate gene for inherited cardiac disorders, and its exclusion as cause of progressive familial heart block I (PFHBI). *Eur. J. Hum. Genet.* **2002**, *10*, 36-43
- Barnes, C. S.; Occolowitz, J. L.** The mass spectra of some naturally occurring oxygen heterocycles and related compounds. *Aust. J. Chem.* **1964**, *17*, 975-986
- Bautz, C.; Bohuslavizki, K. H.; Koppenhöfer, E.** Über die Wirkung wäßriger Auszüge von *Ruta graveolens* auf die Ionenströme der Nervenmembran. *therapeutikon.* **1989**, *3*, 571-575
- Beeton, C.; Wulff, H.; Barbaria, J.; Clot-Faybesse, O.; Pennington, M.; Bernard, D.; Cahalan, M. D.; Chandy, K. G.; Béraud, E.** Selective blockade of T lymphocyte K⁺ channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2001**, *98*, 13942-13947
- Bezanilla, F.;** The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 555-592
- Bohuslavizki, K. H.; Hinck-Kneip, C.; Kneip, A.; Koppenhöfer, E.; Reimers, A.** Reduction of MS-related scotomata by a new class of potassium channel blockers from *Ruta graveolens*. *Neuro-ophthalmol.* **1993a**, *13*, 191-198
- Bohuslavizki, K. H.; Hänsel, W.; Kneip, A.; Koppenhöfer, E.; Reimers, A.; Sanmann, K.** Blocking of potassium channels in Ranvier nodes by 4,5,6,7-substituted benzofurans and its significance on demyelinating diseases. *Gen. Physiol. Biophys.* **1993b**, *12*, 293-301
- Borel, J. F.; Feurer, C.; Gubler, H. U.; Stähelin, H.** Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions.* **1976**, *6*, 468-475
- Brokke, M. E.; Christensen, B. E.** Psoralene II: Certain reactions of xanthotoxin. *J. Org. Chem.* **1959**, *24*, 523-526
- Cahalan, M. D.; Chandy, K. G.; DeCoursey, T. E.; Gupta, S.** A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes. *J. Physiol.* **1985**, *358*, 197-237
- Cahalan, M. D.; Chandy, K. G.** Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, *8*, 749-756

Cahalan, M. D.; Wulff, H.; Chandy, K. G. Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system. *J. Clin. Immunol.* **2001**, *21*, 235-252

Caporale, G.; Antonello, C. Sintesi di alcuni derivati furocumarinici. *Il Farmaco, Ed. Sci.* **1958**, *13*, 363-367

Castle, N. A.; Hollinshead, S. P.; Hughes P. F.; Mendoza, J. S.; Wilson, J. W.; Amato, G. S.; Beaudoin, S.; Gross, M.; McNaughton-Smith, G. Potassium channel inhibitors. *US patent 6083986.* **2000**

Chandy, K. G.; DeCoursey, T. E.; Cahalan, M. D.; McLaughlin, C.; Gupta, S. Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **1984**, *160*, 369-385

Chandy, K. G.; Gutman, G. A. Voltage-gated K⁺ channel genes. *Handbook of Receptors and Channels: Ligand and Voltage-gated Ion Channels.* (CRC Press, Boca Raton). **1995**, 1-71

Chandy, K. G.; Cahalan, M.; Pennington, M.; Norton, R. S.; Wulff, H.; Gutman, G. A. Potassium channels in T lymphocytes: toxins to therapeutic immunosuppressants. *Toxicon.* **2001**, *39*, 1269-1276

Coghlan, M. J.; Carroll, W. A.; Gopalakrishnan, M. Recent developments in the biology and medicinal chemistry of potassium channel modulators: update from a decade of progress. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1627-1653

Cole, K. S.; Curtis, H. J. Electrical impedance of the squid giant axon during activity. *J. Gen. Physiol.* **1939**, *22*, 649-670

Coleman, S. K.; Newcombe, J.; Pryke, J.; Dolly, J. O. Subunit composition of Kv1 channels in human CNS. *J. Neurochem.* **1999**, *73*, 849-858

Corey, E. J.; Shibata, S.; Bakshi, R. K. An efficient and catalytically enantioselective route to (S)-(-)-phenyloxirane. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2861-2863

Dalgliesh, C. E. The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms. *J. Chem. Soc.* **1952**, *137*, 3940-3942

DeCoursey, T. E.; Chandy, K. G.; Gupta, S.; Cahalan, M. D. Voltage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis? *Nature*. **1984**, *307*, 465-468

Defarias, F. P.; Stevens, S. P.; Leonard, R. J. Stable expression of human Kv1.3 potassium channels resets the resting membrane potential of cultured mammalian cells. *Receptors Channels*. **1995**, *3*, 273-281

del Camino, D.; Holmgren, M.; Liu, Y.; Yellen, G. Blocker protection in the pore of a voltage-gated K⁺ channel and its structural implications. *Nature*. **2000**, *403*, 321-325

Deutsch, C.; Krause, D.; Lee, S. C. Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester. *J. Physiol.* **1986**, *372*, 405-423

Diserbo, M.; Antonny, B.; Verdeti, J. Biophysical and pharmacological properties of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in N1E-115 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *205*, 596-602

Dittus, G. Methoden zur Herstellung und Umwandlung dreigliedriger cyclischer Äther (1,2-Epoxyde). *Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Sauerstoff-Verbindungen I, Teil 3 (Georg Thieme Verlag, Stuttgart)*. **1965**, 371-487

Doyle, D. A.; Cabral, J. M.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*. **1998**, *280*, 69-77

Duddeck, H.; Kaiser M. ¹³C NMR spectroscopy of coumarin derivatives. *Org. Magn. Reson.* **1982**, *20*, 55-72

Easson, L. H.; Stedman, E. Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action. V. Molecular dissymmetry and physiological activity. *Biochem. J.* **1933**, *27*, 1257-1266

Fanger, C. M.; Ghanshani, S.; Logsdon, N. J.; Rauer, H.; Kalman, K.; Zhou, J.; Beckingham, K.; Chandy, K. G.; Cahalan, M. D.; Aiyar, J. Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, *IKCa1*. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 5746-5754

FDA. FDA's policy statement for the development of new stereoisomeric drugs. *Chirality*. **1992**, 4, 338-40

FDA. Q6A specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances. <http://www.fda.gov/cder/guidance/> **1997**

Fedida, D.; Wible, B.; Wang, Z.; Fermini, B.; Faust, F.; Nattel, S.; Brown, A. M. Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K⁺ channel current. *Circ. Res.* **1993**, 73, 210-216

Felix, J. P.; Bugianesi, R. M.; Schmalhofer, W. A.; Borris, R.; Goetz, M. A.; Hensens, O. D.; Bao, J.-M.; Kayser, F.; Parsons, W. H.; Rupprecht, K.; Garcia, M. L.; Kaczorowski, G. J.; Slaughter, R. S. Identification and biochemical characterization of a novel nortriterpene inhibitor of the human lymphocyte voltage-gated potassium channel, Kv1.3. *Biochemistry*. **1999**, 38, 4922-4930

Feng, J.; Wible, B.; Li, G.-R.; Wang, Z.; Nattel, S. Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ. Res.* **1997**, 80, 572-579

Fomina, A. F.; Fanger, C. M.; Kozak, J. A.; Cahalan, M. D. Single channel properties and regulated expression of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels in human T cells. *J. Cell Biol.* **2000**, 150, 1435-1444

Ghanshani, S.; Wulff, H.; Miller, M. J.; Rohm, H.; Neben, A.; Gutman, G. A.; Cahalan, M. D.; Chandy, K. G. Up-regulation of the *IKCa1* potassium channel during T-cell activation – Molecular mechanism and functional consequences. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 37137-37149

Goldin, A. L. Diversity of mammalian voltage-gated sodium channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, 868, 38-50

Gong, J.; Xu, J.; Bezanilla, M.; van Huizen, R.; Derin, R.; Li, M. Differential stimulation of PKC phosphorylation of potassium channels by ZIP1 and ZIP2. *Science*. **1999**, 285, 1565-1569

González, T.; Longobardo, M.; Caballero, R.; Delpón, E.; Sinisterra, J. V.; Tamargo, J.; Valenzuela, C. Stereoselective effects of the enantiomers of a new

local anaesthetic, IBQ-9302, on a human cardiac potassium channel (Kv1.5). *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *132*, 385-392

Grinstein, S.; Dixon, S. J. Ion transport, membrane potential, and cytoplasmic pH in lymphocytes: changes during activation. *Physiol. Rev.* **1989**, *69*, 417-481

Grissmer, S.; Cahalan, M. D. Divalent ion trapping inside potassium channels of human T lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* **1989**, *93*, 609-630

Grissmer, S.; Dethlefs, B.; Wasmuth, J. J.; Goldin, A. L.; Gutman, G. A.; Cahalan, M. D.; Chandy, K. G. Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K⁺ channel gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 9411-9415

Grissmer, S.; Nguyen, A. N.; Cahalan, M. D. Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. *J. Gen. Physiol.* **1993**, *102*, 601-630

Grissmer, S.; Nguyen, A. N.; Aiyar, J.; Hanson, D. C.; Mather, R. J.; Gutman, G. A.; Karmilowicz, M. J.; Auperin, D. D.; Chandy, K. G. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45*, 1227-1234

Günther, H. *NMR-Spektroskopie – Eine Einführung* (Georg Thieme Verlag, Stuttgart). **1973**, 1. Auflage

Günzler, H.; Böck, H. *IR-Spektroskopie – Eine Einführung* (Verlag Chemie, Weinheim). **1983**, 2 Auflage

Halazy, S.; Perez, M.; Fourrier, C.; Pallard, I.; Pauwels, P. J.; Palmier, C.; John, G. W.; Valentin, J.-P.; Bonnafous, R.; Martinez, J. Serotonin dimers: application of the bivalent ligand approach to the design of new potent and selective 5-HT_{1B/1D} agonists. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4920-4927

Hamill, O. P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F. J. Improved *patch-clamp* techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **1981**, *391*, 85-100

Hanada, T.; Lin, L.; Chandy, K. G.; Oh, S. S.; Chishti, A. H. Human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor binds to p56^{lck} tyrosine kinase and *Shaker* type Kv1.3 potassium channel in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 26899-26904

Hanson, D. C.; Nguyen, A.; Mather, R. J.; Rauer, H.; Koch, K.; Burgess, L. E.; Rizzi, J. P.; Donovan, C. B.; Bruns, M. J.; Canniff, P. C.; Cunningham, A. C.; Verdries, K. A.; Mena, E.; Kath, J. C.; Gutman, G. A.; Cahalan, M. D.; Grissmer, S.; Chandy, K. G. UK-78,282, a novel piperidine compound that potently blocks the Kv1.3 voltage-gated potassium channel and inhibits human T cell activation. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *126*, 1707-1716

Hench, P. S.; Kendall, E. C.; Slocumb, C. H.; Polley, H. F. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.* **1949**, *24*, 181-197

Herzog, T. *Patch-clamp Studien zur Kv-Kanal-blockierenden Wirkung von Cumaringen, Benzofuranen und Psoralenen als potenzielle Immunsuppressiva. Dissertation Universität Kiel.* **2000**

Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie (Georg Thieme Verlag, Stuttgart).* **1991**, 4. Auflage

Hill, R. J.; Grant, A. M.; Volberg, W.; Rapp, L.; Faltynek, C.; Miller, D.; Pagani, K.; Baizman, E.; Wang, S.; Guiles, J. W.; Krafte, D. S. WIN 17317-3: novel non-peptide antagonist of voltage-activated K⁺ channels in human T lymphocytes. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *48*, 98-104

Hille, B. *Ionic Channels of Excitable Membranes (Sinauer Associates Inc., Sunderland)* **1992**, 2. Auflage

Hirsh, J. K.; Quandt, F. N. Down-regulation of Na channel expression by A23187 in N1E-115 neuroblastoma cells. *Brain Res.* **1996**, *706*, 343-346

Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **1952**, *117*, 500-544

Holmgren, M.; Jurman, M. E.; Yellen, G. N-type inactivation and the S4-S5 region of the *Shaker* K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* **1996**, *108*, 195-206

Hoshi, T.; Zagotta, W. N.; Aldrich, R. W. Biophysical and molecular mechanisms of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science.* **1990**, *250*, 533-538

Hoth, M.; Fanger, C. M.; Lewis, R. S. Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J. Cell Biol.* **1997**, *137*, 633-648

Hoth, M.; Button, D. C.; Lewis, R. S. Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2000**, *97*, 10607-10612

Hugues, M.; Romey, G.; Duval, D.; Vincent, J. P.; Lazdunski, M. Apamin as a selective blocker of the calcium-dependent potassium channel in neuroblastoma cells: voltage-clamp and biochemical characterization of the toxin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1982**, *79*, 1308-1312

Ikeda, S. R.; Soler, F.; Zühlke, R. D.; Joho, R. H.; Lewis, D. L. Heterologous expression of the human potassium channel Kv2.1 in clonal mammalian cells by direct cytoplasmic microinjection of cRNA. *Pflügers Arch.* **1992**, *422*, 201-203

Imuta, M.; Kawai, K.; Ziffer, H. Product stereospecificity in the microbial reduction of α -haloaryl ketones. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 3352-3355

Isacoff, E. Y.; Jan, Y. N.; Jan, L. Y. Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the *Shaker* K⁺ channel. *Nature.* **1991**, *353*, 86-90

Kalman, K.; Pennington, M. W.; Lanigan, M. D.; Nguyen, A.; Rauer, H.; Mahnir, V.; Paschetto, K.; Kem, W. R.; Grissmer, S.; Gutman, G. A.; Christian, E. P.; Cahalan, M. D.; Norton, R. S.; Chandy, K. G. ShK-Dap²², a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32697-32707

Kerschbaum, H. H.; Grissmer, S.; Engel, E.; Richter, K.; Lehner, C.; Jäger, H. A. *Shaker* homologue encodes an A-type current in *Xenopus laevis*. *Brain Res.* **2002**, *927*, 55-68

Khanna, R.; Chang, M. C.; Joiner, W. J.; Kaczmarek, L. K.; Schlichter, L. C. hSK4/hIK1, a calmodulin-binding KCa channel in human T lymphocytes – Roles in proliferation and volume regulation. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 14838-14849

Klemic, K. G.; Kirsch, G. E.; Jones, S. W. U-type inactivation of Kv3.1 and *Shaker* potassium channels. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 814-826

Koo, G. C.; Blake, J. T.; Talento, A.; Nguyen, M.; Lin, S.; Sirotna, A., Shah, K.; Mulvany, K.; Hora Jr., D.; Cunningham, P.; Wunderler, D. L.; McManus, O. B.; Slaughter, R.; Bugianesi, R.; Felix, J.; Garcia, M.; Williamson, J.; Kaczorowski, G.; Sigal, N. H.; Springer, M. S.; Feeney, W. Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses *in vivo*. *J. Immunol.* **1997**, *158*, 5120-5128

Koo, G. C.; Blake, J. T.; Shah, K.; Staruch, M. J.; Dumont, F.; Wunderler, D.; Sanchez, M.; McManus, O. B.; Sirotna-Meisher, A.; Fischer, P.; Boltz, R. C.; Goetz, M. A.; Baker, R.; Bao, J.; Kayser, F.; Rupprecht, K. M.; Parsons, W. H.; Tong, X.-C.; Ita, I. E.; Piynichny, J.; Vincent, S.; Cunningham, P.; Hora Jr., D.; Feeney, W.; Kaczorowski, G.; Springer, M. S. Correolide and derivatives are novel immunosuppressants blocking the lymphocyte Kv1.3 potassium channels. *Cell. Immunol.* **1999**, *197*, 99-107

Kuryshv, Y. A.; Gudz, T. I.; Brown, A. M.; Wible, B. A. KChAP as a chaperone for specific K⁺ channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2000**, *278*, C931-C941

Lewis, R. S.; Cahalan, M. D. Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **1995**, *13*, 623-653

Lewis, R. S. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **2001**, *19*, 497-521

Liu, J.; Farmer Jr., J. D.; Lane, W. S.; Friedman, J.; Weissmann, I.; Schreiber, S. L. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell.* **1991**, *66*, 807-815

Longobardo, M.; Delpón, E.; Caballero, R.; Tamargo, J.; Valenzuela, C. Structural determinants of potency and stereoselective block of hKv1.5 channels induced by local anesthetics. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 162-169

López-Barneo, J.; Hoshi, T.; Heinemann, S. H.; Aldrich, R. W. Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of *Shaker* potassium channels. *Receptors Channels.* **1993**, *1*, 61-71

MacKinnon, R.; Cohen, S. L.; Kuo, A.; Lee, A.; Chait, B. T. Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science.* **1998**, *280*, 106-109

Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M. Polyvalente Wechselwirkungen in biologischen Systemen: Auswirkungen auf das Design und die Verwendung multivalenter Liganden und Inhibitoren. *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908-2953

Matsuda, S.; Moriguchi, T.; Koyasu, S.; Nishida, E. T lymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 and MKK7-SAPK/JNK signaling pathways sensitive to cyclosporin A. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 12378-12382

McCloskey, M. A.; Cahalan, M. D. G protein control of potassium channel activity in a mast cell line. *J. Gen. Physiol.* **1990**, *95*, 205-227

McCormack, T.; McCormack, K.; Nadal, M. S.; Vieira, E.; Ozaita, A.; Rudy, B. The effects of *Shaker* β -subunits on the human lymphocyte K⁺ channel Kv1.3. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20123-20126

McKinnon, D. Molecular identity of I_{to} – Kv1.4 redux. *Circ. Res.* **1999**, *84*, 620-622

Mesecar, A. D.; Koshland Jr., D. E. A new model for protein stereospecificity. *Nature.* **2000**, *403*, 614-615

Miller, S. FDA perspectives on manufacture of single enantiomer drugs. <http://www.fda.gov/cder/ondc/Presentations/Presentations.htm> **1999**

Möller, K. Acridone, Furo- und Pyranochinoline als Blocker von Kv-Kanälen – *patch clamp* Untersuchungen und Studien zur Phototoxizität. *Dissertation Universität Kiel.* **2000**

Mujagić, H.; Chabner, B. A.; Mujagić, Z. Mechanisms of action and potential therapeutic uses of thalidomide. *Croat. Med. J.* **2002**, *43*, 274-285

Murray, R. D. H.; Méndez, J.; Brown, S. A. *The Natural Coumarins – Occurrence, Chemistry and Biochemistry* (John Wiley & Sons Ltd., New York). **1982**

Narahashi, T.; Tsunoo, A.; Yoshii, M. Characterization of two types of calcium channels in mouse neuroblastoma cells. *J. Physiol.* **1987**, *383*, 231-249

Negulescu, P. A.; Shastri, N.; Cahalan, M. D.; Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1994**, *91*, 2873-2877

Neher, E.; Sakmann, B. Single-channel currents recorded from membrane of dener-
vated frog muscle fibres. *Nature.* **1976**, *260*, 799-802

Neher, E. Unit conductance studies in biological membranes. *Techniques in Cellular Physiology – Part II.* (Elsevier/North-Holland Scientific Publishers Ltd., County Clare). **1982**

Nguyen, A.; Kath, J. C.; Hanson D. C.; Biggers, M. S.; Canniff, P. C.; Donovan, C. B.; Mather, R. J.; Bruns, M. J.; Rauer, H.; Aiyar, J.; Lepple-Wienhues, A.; Gutman, G. A.; Grissmer, S.; Cahalan, M. D.; Chandy, K. G. Novel nonpeptide agents potently block the C-type inactivated conformation of Kv1.3 and suppress T cell activation. *Mol. Pharmacol.* **1996**, *50*, 1672-1679

Noyori, R.; Tomino, I.; Yamada, M.; Nishizawa, M. Synthetic applications of the enantioselective reduction by binaphthol-modified lithium aluminium hydride reagents. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6717-6725

Numberger, M.; Draguhn, A. *Patch-Clamp-Technik* (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg). **1996**

Olyaei, A. J.; de Mattos, A. M., Bennett, W. M. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies. *Curr. Opin. Crit. Care.* **2001**, *7*, 384-389

Ottschytch, N.; Raes, A.; Van Hoorick, D.; Snyders, D. J. Obligatory heterotetramerization of three previously uncharacterized Kv channel α -subunits identified in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**, *99*, 7986-7991

Ozaita, A.; Martone, M. E.; Ellisman, M. H.; Rudy, B. Differential subcellular localization of the two alternatively spliced isoforms of the Kv3.1 potassium channel subunit in brain. *J. Neurophysiol.* **2002**, *88*, 394-408

Papazian, D. M.; Timpe, L. C.; Jan, Y. N.; Jan, L. Y. Alteration of voltage-dependence of *Shaker* potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature.* **1991**, *349*, 305-310

- Pongs, O.; Leicher, T.; Berger, M.; Roeper, J.; Bähring, R.; Wray, D.; Giese, K. P.; Silva, A. J.; Storm, J. F.;** Functional and molecular aspects of voltage-gated K⁺ channel β subunits. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, 868, 344-355
- Portoghese, P. S.** The role of concepts in structure-activity relationship studies of opioid ligands. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 1927-1937
- Quandt, F. N.** Three kinetically distinct potassium channels in mouse neuroblastoma cells. *J. Physiol.* **1988**, 395, 401-418
- Rasmusson, R. L.; Morales M. J.; Wang, S.; Liu, S.; Campbell, D. L.; Brahmajothi, M. V.; Strauss, H. C.** Inactivation of voltage-gated cardiac K⁺ channels. *Circ. Res.* **1998**, 82, 739-750
- Rauer, H.; Grissmer, S.** Evidence for an internal phenylalkylamine action on the voltage-gated potassium channel Kv1.3. *Mol. Pharmacol.* **1996**, 50, 1625-1634
- Rauer, H. J.** Phenylalkylamine am spannungsabhängigen Kaliumkanal *mKv1.3*: Beweis für eine intrazelluläre Wirkung. *Dissertation Universität Ulm.* **1997**
- Roden, D. M.; Balser, J. R.; George Jr., A. L.; Anderson, M. E.** Cardiac ion channels. *Annu. Rev. Physiol.* **2002**, 64, 431-475
- Ruppersberg, J. P.; Schröter, K. H.; Sakmann, B.; Stocker, M.; Sewing, S.; Pongs, O.** Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature.* **1990**, 345, 535-537
- Ruppersberg, J. P.; Stocker, M.; Pongs, O.; Heinemann, S. H.; Frank, R.; Koenen, M.** Regulation of fast inactivation of cloned mammalian I_{K(A)} channels by cysteine oxidation. *Nature.* **1991**, 352, 711-714
- Sanmann, K.** Strukturabhängigkeit der kaliumkanalblockierenden Wirkung von Cumarinen, Benzofuranen und Furocumarinen. *Dissertation Universität Kiel.* **1995**
- Schmalhofer, W. A.; Bao, J.; McManus, O. B.; Green, B.; Matyskiela, M.; Wunderler, D.; Bugianesi, R. M.; Felix, J. P.; Hanner, M.; Linde-Arias, A.-R.; Ponte, C. G.; Velasco, L.; Koo, G.; Staruch, M. J.; Miao, S.; Parsons, W. H.; Rupprecht, K.; Slaughter, R. S.; Kaczorowski, G. J.; Garcia, M. L.** Identification of a new class

of inhibitors of the voltage-gated potassium channel, Kv1.3, with immunosuppressant properties. *Biochemistry*. **2002**, *41*, 7781-7794

Schönberg, A.; Moubasher, R. (I) The mechanism of the cleavage of ethers of the anisol type by grignard mixtures. (II) The action of grignard solutions on α -bromo-ketones. *J. Chem. Soc.* **1944**, 462-463

Schönberg, A.; Aziz, G. Furochromones and -coumarins VI. Demethylation of xanthotoxin, khellin and khellol with aniline hydrochloride and magnesium iodide. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 3265-3266

Schönberg, A.; Aziz, G. Furochromones and -coumarins X. On the constitution of prangenin. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 2563-2564

Schreiber, S. L.; Crabtree, G. R. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today*. **1992**, *13*, 136-142

Sewing, S.; Roeper, J.; Pongs, O. Kv β 1 subunit binding specific for *Shaker*-related potassium channel α subunits. *Neuron*. **1996**, *16*, 455-463

Shelton, P. A.; Davies, N. W.; Antoniou, M.; Grosveld, F.; Needham, M.; Hollis, M.; Brammar, W. J.; Conley, E. C. Regulated expression of K⁺ channel genes in electrically silent mammalian cells by linkage to β -globin gene-activation elements. *Receptors Channels*. **1993**, *1*, 25-37

Shieh, C.-C.; Coghlan, M.; Sullivan, J. P.; Gopalakrishnan, M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 557-593

Slaughter, R. S.; Garcia, M. L.; Kaczorowski, G. J. Ion channels as drug targets in the immune system. *Curr. Pharm. Des.* **1996**, *2*, 610-623

Spencer, R. H.; Sokolov, Y.; Li, H.; Takenaka, B.; Milici, A. J.; Aiyar, J.; Nguyen, A.; Park, H.; Jap, B. K.; Hall, J. E.; Gutman, G. A.; Chandy, K. G. Purification, visualization, and biophysical characterization of Kv1.3 tetramers. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2389-2395

Steck, W.; Mazurek, M. Identification of natural coumarins by NMR spectroscopy. *Lloydia*. **1972**, *35*, 418-439

Stephens, G. J.; Owen, D. G.; Robertson, B. Cysteine-modifying reagents alter the gating of the rat cloned potassium channel Kv1.4. *Pflügers Arch.* **1996**, *431*, 435-442

Strauss, U.; Wissel, K.; Jung, S.; Wulff, H.; Hänsel, W.; Zhu, J.; Rolfs, A.; Mix, E. K⁺ channel-blocking alkoxy-psoralens inhibit the immune response of encephalitogenic T line cells and lymphocytes from Lewis rats challenged for experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunopharmacology.* **2000**, *48*, 51-63

Szabò, I.; Gulbins, E.; Apfel, H.; Zhang, X.; Barth, P.; Busch, A. E.; Schlottmann, K.; Pongs, O.; Lang, F. Tyrosine phosphorylation-dependent suppression of a voltage-gated K⁺ channel in T lymphocytes upon Fas stimulation. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 20465-20469

Tamiz, A. P.; Bandyopadhyay, B. C.; Zhang, J.; Flippen-Anderson, J. L.; Zhang, M.; Wang, C. Z.; Johnson, K. M.; Tella, S.; Kozikowski, A. P. Pharmacological and behavioral analysis of the effects of some bivalent ligand-based monoamine reuptake inhibitors. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1615-1622

Tomaszewski, J.; Rumore, M. M. Stereoisomeric drugs: FDA's policy statement and the impact on drug development. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1994**, *20*, 119-139

Valenzuela, C.; Delpón, E.; Tamkun, M. M.; Tamargo, J.; Snyders, D. J. Stereoselective block of a human cardiac potassium channel (Kv1.5) by bupivacaine enantiomers. *Biophys. J.* **1995**, *69*, 418-427

Wanner, S. G.; Glossmann, H.; Knaus, H.-G.; Baker, R.; Parsons, W.; Rupprecht, K. M.; Brochu, R.; Cohen, C. J.; Schmalhofer, W.; Smith, M.; Warren, V.; Garcia, M. L.; Kaczorowski, G. J. WIN 17317-3, a new high-affinity probe for voltage-gated sodium channels. *Biochemistry.* **1999**, *38*, 11137-11146

Wei, A.; Covarrubias, M.; Butler, A.; Baker, K.; Pak, M.; Salkoff, L. K⁺ current diversity is produced by an extended gene family conserved in *Drosophila* and mouse. *Science.* **1990**, *248*, 599-603

Werkman, T. R.; Kawamura, T.; Yokoyama, S.; Higashida, H.; Rogawski, M. A. Charybdotoxin, dendrotoxin and mast cell degranulating peptide block the voltage-activated K⁺ current of fibroblast cells stably transfected with NGK1 (Kv1.2) K⁺ channel complementary DNA. *Neuroscience.* **1992**, *50*, 935-946

Wible, B. A.; Yang, Q.; Kuryshev, Y. A.; Accili, E. A.; Brown, A. M. Cloning and expression of a novel K⁺ channel regulatory protein, KChAP. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 11745-11751

Wulff, H. Alkoxyypsoralene - eine neue Klasse nicht-peptidischer Blocker von Kaliumkanälen der *Shaker* Familie - Synthese und *in vitro* Untersuchungen zur Phototoxizität. *Dissertation Universität Kiel.* **1998**

Wulff, H.; Rauer, H.; Düring, T.; Hanselmann, C.; Ruff, K.; Wrisch, A.; Grissmer, S.; Hänsel, W. Alkoxyypsoralens, novel nonpeptide blockers of *Shaker*-type K⁺ channels: synthesis and photoreactivity. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4542-4549

Wulff, H.; Miller, M. J.; Hänsel, W.; Grissmer, S.; Cahalan, M. D.; Chandy, K. G. Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, *IKCa1*: a potential immunosuppressant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2000**, *97*, 8151-8156

Zagotta, W. N.; Hoshi, T.; Aldrich, R. W. Restoration of inactivation in mutants of *Shaker* potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science.* **1990**, *250*, 568-571

Zhou, Y.; Morais-Cabral, J. H.; Kaufmann, A.; MacKinnon, R. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature.* **2001**, *414*, 43-48

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström (10^{-10} m)
AP-1	Transkriptionsfaktor (<i>activator protein 1</i>)
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BKCa	Calcium-aktivierbarer Kaliumkanal großer Leifähigkeit (<i>big conductance</i>)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Ci	Curie
COLOC	<i>correlation via long-range couplings</i>
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CRAC	Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel
CsA	Cyclosporin A
DAG	Diacylglycerol
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagles's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EC ₅₀	halbmaximal wirksame Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	fetales Kälberserum
Fos	Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1
G1-Phase	Phase des Zellwachstums im Zellzyklus (<i>gap</i>)
H404T-Kv1.3	Kv1.3-Mutante, Histidin der Position 404 ersetzt durch Threonin
hDlg	<i>human homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IKCa	Calcium-aktivierbarer Kaliumkanal mittlerer Leifähigkeit (<i>intermediate conductance</i>)
I _{Kur}	kardialer Kaliumionenstrom (<i>ultra-rapid</i>)
IL-2	Interleukin 2
IR	Infrarot
IP ₃	Inositoltriphosphat
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>

Jun	Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1
KCa	Calcium-aktivierbarer Kaliumkanal
Kv	spannungsabhängiger Kaliumkanal (<i>voltage-gated</i>)
λ_{Ex}	Anregungswellenlänge
λ_{Em}	Emissionswellenlänge
Lck	membranständige Kinase (Src-Kinase)
MEL	<i>murine erythroleukaemia</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MS	Multiple Sklerose
	Massenspektrometrie
Nav	spannungsabhängiger Natriumkanal
n. b.	nicht bestimmt
NFATc	Transkriptionsfaktor (<i>nuclear factor of activated T cells</i>)
NF- κ B	Transkriptionsfaktor (<i>nuclear factor κB</i>)
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OKT 3	monoklonaler Antikörper gegen CD3
Ω	Ohm
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositoldiphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase γ
RBL	<i>rat basophilic leukemic</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ShK	Toxin aus der Seeanemone <i>Stichodactyla helianthus</i>
SKCa	Calcium-aktivierbarer Kaliumkanal geringer Leitfähigkeit (<i>small conductance</i>)
S-Phase	Phase der DNA-Synthese im Zellzyklus
Src-Kinasen	Tyrosinkinase-Familie
Syk-Kinasen	Tyrosinkinase-Familie (<i>spleen tyrosine (Y) kinase</i>)
Tac	<i>T cell activation antigen</i>
TZR	T-Zell-Rezeptor
UV	Ultraviolett
Zap-70	zytoplasmatische Kinase (Syk-Kinase) (<i>z-associated protein of 70 kDa</i>)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von Prof. Dr. W. Hänsel.

Herrn Prof. Dr. W. Hänsel möchte ich herzlich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und für die Überlassung des aktuellen und hochinteressanten Themas danken, bei dessen Bearbeitung er mir einen großen wissenschaftlichen Freiraum ließ.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. S. Grissmer, Abteilung Angewandte Physiologie der Universität Ulm, der unserer Arbeitsgruppe den Großteil der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien zur Verfügung stellte und ein unverzichtbarer Ratgeber bei größeren und kleineren elektrophysiologischen Problemen war.

Darüber hinaus ermöglichte er durch großzügige finanzielle Unterstützung einen mehrwöchigen Studienaufenthalt in seinem Labor. Seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Dr. H. Jäger und Herrn T. Dreker, danke ich sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit während dieser Zeit.

Frau Dr. H. Wulff, Department of Physiology and Biophysics, Universität Irvine, USA, möchte ich meinen großen Dank für die Durchführung der Untersuchungen am Lymphozyten und die elektrophysiologische Testung an Kv1.7 aussprechen. Weiterhin danke ich ihr für viele Anregungen, die geduldige Beantwortung jeder der gestellten Fragen und die zur Verfügung gestellten Graphiken, die als Vorlage verschiedener Abbildungen in dieser Arbeit dienten.

Herrn Prof. Dr. D. Kabelitz, Institut für Immunologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel danke für die Möglichkeit, ein mehrwöchiges Praktikum im Institut für Immunologie zu absolvieren. Bei Herrn Privatdozent Dr. O. Janßen und Frau Dr. D. Wesch, ebenfalls Institut für Immunologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, bedanke ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit, diese Zeit war nicht nur fachlich ein großer Gewinn. Auch Frau A. Beyer und Frau G. Podda sei für ihre praktische Unterstützung vor allem während der ersten Tage des Praktikums gedankt.

Herrn Prof. Dr. D. Heber danke ich für seine Hilfe bei der Nomenklatur der synthetisierten Verbindungen.

Bei Herrn Dr. K. Wiethoff, Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr, Kiel, bedanke ich mich für die zur Verfügung gestellten HPLC-Säulen.

Herrn Dr. U. Girreser gilt mein besonderer Dank für seine Hilfe bei synthetischen und spektroskopischen Problemstellungen und als Ansprechpartner für viele Fragen, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit darüber hinaus beschäftigt haben.

Ebenso danke ich Herrn Dr. P. Körner, der mir vor allem zu Beginn meiner Arbeit hilfreich bei der Synthese der Psoralenderivate zur Seite stand.

Bei Frau A. Wernekenschnieder möchte ich mich für die Einarbeitung in die *patch-clamp*-Technik und die nachfolgende gute Zusammenarbeit sowohl in Kiel als auch während unseres gemeinsamen Aufenthaltes in Ulm bedanken.

Frau S. Häuer danke ich für die sorgsam aufgenommenen NMR-Spektren, ihre Unterstützung bei HPL-chromatographischen Untersuchungen und die Betreuung unserer Zellkultur. Herrn B. Henke danke ich für die Aufnahme der IR-Spektren und die Nachsynthese einiger Psoralenderivate.

Bei Herrn Dr. P. Körner, Herrn Dr. U. Girreser, Frau Dr. D. Holzner, Frau K. Lopian, Frau I. Kock, Frau Dr. K. Berger, Frau K. Matschke, Frau M. König und Frau M. Zietz, mit denen ich das Praktikum des achten Semesters zusammen betreut habe, bedanke ich mich für die stets angenehme Zusammenarbeit.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern des Arbeitskreises, mit denen ich eine gemeinsame Zeit am Pharmazeutischen Institut verbracht habe, danke ich herzlich für ihre Kollegialität und viele hilfreiche Diskussionen und Gespräche.

Frau I. Carstens danke ich für die zur Verfügung gestellten Lipophiliedaten. Bei Herrn F. Wildschek möchte ich mich für seine Freundschaft und sein großes Engagement während unseres gemeinsamen immunologischen Praktikums bedanken.

Für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Arbeit und zahlreiche konstruktive Hinweise danke ich Frau Dr. M. Rostaie-Gerylow, Herrn F. Wildschek, Herrn Dr. U. Girreser und besonders Herrn Dr. S. Langhein.

Frau Dr. M. Rostaie-Gerylow gilt mein sehr persönlicher Dank für die enge Freundschaft, die vor allem während der schwierigen Phasen der Dissertation unendlich wertvoll war.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meinen Eltern aussprechen. Sie haben meinen Weg stets unterstützt und mit großem Verständnis begleitet.

Lebenslauf

Name:	Vennekamp
Vorname:	Julia
Geburtsdatum:	4. Juli 1974
Geburtsort:	Herford
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulausbildung

August 1981 – Juni 1985	Grundschule der Stadt Lage
August 1985 – Juni 1993	Gymnasium der Stadt Lage
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium und Pharmaziepraktikum

WS 1993 – SS 1997	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
August 1994	Famulatur in der Apotheke des Klinikums Lippe-Detmold, Detmold
September 1994	Famulatur in der Hirsch-Apotheke, Lage
September 1995	Erster Prüfungsabschnitt
August 1995 – Juli 1996	Wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
November 1997	Zweiter Prüfungsabschnitt
Januar 1998 – Juni 1998	Pharmaziepraktikum in der Klosterstern-Apotheke, Hamburg
Juli 1998 – Dezember 1998	Pharmaziepraktikum bei der Knoll AG, Ludwigshafen
Januar 1999	Dritter Prüfungsabschnitt

Seit dem 15. Januar 1999 bin ich als wissenschaftliche Angestellte am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität tätig. Gleichzeitig begann ich die vorliegende Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. W. Hänsel.