

4-PHENOXYBUTOXY-SUBSTITUIERTE,
ANELLIERTE HETEROZYKLEN
SYNTHESE UND ELEKTROPHYSIOLOGISCHE TESTUNG
AM LYMPHOZYTÄREN KALIUMKANAL KV1.3



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

vorgelegt
von
Silke Bodendiek
Kiel, 2007

Referent: Prof. Dr. W. Hänsel
Korreferent: Prof. Dr. D. Heber
Tag der mündlichen Prüfung: 31.05., 5.06. und 8.06.2007
Zum Druck genehmigt: 13.06.2007

Prof. Dr. J. Grotemeyer
(Dekan)

Meinen Eltern...

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Kaliumkanäle	2
1.1.1. Aufbau, Vorkommen und Funktion	2
1.1.1.1. Spannungsabhängige Kaliumkanäle	4
1.1.1.1.1. Kv1.3-Kanal	8
1.1.1.1.2. Kv1.5-Kanal	9
1.1.1.2. Calciumabhängige Kaliumkanäle	10
1.2. Das Immunsystem	11
1.2.1. Angeborene, unspezifische Abwehr	12
1.2.2. Erworbene, spezifische Abwehr	13
1.2.2.1. B-Lymphozyten	14
1.2.2.2. T-Lymphozyten	14
1.2.2.2.1. T-Effektorzellen	15
1.2.2.3. Aktivierung von T-Lymphozyten	17
1.2.2.4. Kanalexpression auf T-Lymphozyten	20
1.3. Autoimmunerkrankungen	21
1.4. Bekannte Immunsuppressiva	22
1.4.1. Glucocorticoide	23
1.4.2. Hemmstoffe der DNA-Biosynthese	23

Inhaltsverzeichnis

1.4.3. Substanzen mit Wirkung auf Lymphozyten	24
1.5. Kaliumkanalblocker als Immunsuppressiva	25
1.5.1. Bekannte Kv1.3-Blocker	25
2. Stand der Vorarbeiten und Zielsetzung	31
2.1. Stand der Vorarbeiten	31
2.1.1. <i>Ruta graveolens</i> - Vom Kraut zum Kv1.3-Blocker	31
2.1.1.1. Inhaltsstoffe	33
2.1.1.1.1. Multiple Sklerose	36
2.1.1.1.2. Verschiedene Grundkörper als Blocker	36
2.1.1.1.3. FurocumarinGrundgerüst als Blocker	39
2.2. Zielsetzung	41
3. Synthese und Strukturen der untersuchten Verbindungen	42
3.1. Syntheseplanung	42
3.2. Darstellung der einzelnen Verbindungen	42
3.3. Übersicht über die synthetisierten Verbindungen	51
3.3.1. Chinolin-Grundkörper	51
3.3.2. Chinolinon-Grundkörper	51
3.3.3. Chinazolin-Grundkörper	52
3.3.4. Furochinolin-Grundkörper	52
3.3.5. Acridon-Grundkörper	53
3.3.6. Cumarin-Grundkörper	53
3.3.7. Furochromon-Grundkörper	54
3.3.8. Furocumarin-Grundkörper	54
3.3.9. Verschiedene Grundkörper	55
4. Testungen	58
4.1. Elektrophysiologie	58
4.1.1. Die <i>patch-clamp</i> -Technik	58

4.1.1.1.	Allgemeine Einführung	58
4.1.1.2.	Durchführung der <i>patch-clamp</i> -Experimente . . .	63
4.1.1.2.1.	Zellkultur	63
4.1.1.2.2.	<i>patch-clamp</i> -Messungen	66
4.1.1.3.	Ergebnisse der <i>patch-clamp</i> -Experimente	72
4.2.	Lipophilie-Bestimmung	80
4.2.1.	Materialien und Geräte	82
4.2.2.	Durchführung	83
4.2.3.	Ergebnisse	85
5.	Diskussion	87
5.1.	Struktur-Wirkungsbeziehungen	87
5.2.	Struktur-Lipophilie-Beziehungen	92
5.3.	Struktur-Selektivitäts-Beziehungen	93
6.	Zusammenfassung und Ausblick	95
7.	Experimenteller Teil	98
7.1.	Materialien und Geräte	98
7.1.1.	Chemikalien	98
7.1.2.	Geräte	99
7.1.2.1.	Gerät zur Aufreinigung der extrahierten und syn- thetisierten Verbindungen	99
7.1.2.2.	Geräte zur Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen	100
7.2.	Isolierung von Skimmianin und Kokusaginin	102
7.3.	Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen .	104
7.3.1.	Allgemeine Synthesevorschriften	104
7.3.1.1.	Darstellung der Alkohole	104
7.3.1.2.	Veretherung der Alkohole	104

Inhaltsverzeichnis

7.3.2.	Verbindungen mit Chinolin-Grundkörper	106
7.3.2.1.	4-(4-Phenoxybutoxy)chinolin (12)	106
7.3.2.2.	5-(4-Phenoxybutoxy)isochinolin (13)	107
7.3.3.	Verbindung mit Chinolinon-Grundkörper	109
7.3.3.1.	1,2-Dihydro- <i>N</i> -methyl-4-(4- phenoxybutoxy)chinolin-2-on (14)	109
7.3.4.	Verbindung mit Chinazolin-Grundkörper	111
7.3.4.1.	4-(4-Phenoxybutoxy)chinazolin (15)	111
7.3.5.	Verbindungen mit Furochinolin-Grundkörper	112
7.3.5.1.	7,8-Dimethoxy-4-(4-phenoxybut- oxy)furo[2,3- <i>b</i>]chinolin (33)	112
7.3.5.2.	4-Hydroxy-6,7-dimethoxyfuro[2,3- <i>b</i>]chinolin (29) .	114
7.3.5.3.	6,7-Dimethoxy-4-(4-phenoxybut- oxy)furo[2,3- <i>b</i>]chinolin (34)	116
7.3.6.	Verbindung mit Acridon-Grundkörper	118
7.3.6.1.	9,10-Dihydro-4-methoxy- <i>N</i> -(4- phenoxybutyl)acridin-9-on (22)	118
7.3.7.	Verbindungen mit Cumarin-Grundkörper	120
7.3.7.1.	4-(4-Phenoxybutoxy)-2 <i>H</i> -[1]benzopyran-2-on (16)	120
7.3.7.2.	5-(4-Phenoxybutoxy)-2 <i>H</i> -[1]benzopyran-2-on (41)	122
7.3.8.	Verbindungen mit Furochromon-Grundkörper	125
7.3.8.1.	7-Methyl-4-(4-phenoxybutoxy)-5 <i>H</i> -furo- [3,2- <i>g</i>][1]benzopyran-5-on (35)	125
7.3.8.2.	4-(4-Phenoxybutoxy)-5 <i>H</i> - furo[3,2- <i>g</i>][1]benzopyran-5-on (49)	127
7.3.8.3.	9-Methoxy-7-methyl-4-(4-phenoxybutoxy)-5 <i>H</i> - furo[3,2- <i>g</i>][1]benzopyran-5-on (36)	130
7.3.9.	Verbindungen mit Furocumarin-Grundkörper	132

7.3.9.1. 9-(4-Phenoxybutoxy)-7 <i>H</i> - furo[3,2- <i>g</i>][1]benzopyran-7-on (37)	132
7.3.9.2. 4-Methoxy-5-methyl-9-(4-phenoxybutoxy)-7 <i>H</i> - furo[3,2- <i>g</i>][1]benzopyran-7-on (62)	135
7.3.9.3. 4,9-Dimethoxy-5-(4-phenoxybutoxy)-7 <i>H</i> - furo[3,2- <i>g</i>][1]benzopyran-7-on (17)	137
7.3.10. Verbindungen mit verschiedenen Grundkörpern	139
7.3.10.1. 4-(4-Phenoxybutoxy)benzofuran (44)	139
7.3.10.2. 3-(4-Phenoxybutoxy)-2-phenyl-4 <i>H</i> - [1]benzopyran-4-on (18)	141
7.3.10.3. 5-Hydroxy-2-methyl-6,7-methylenedioxy-4 <i>H</i> - [1]benzopyran-4-on (53)	142
7.3.10.4. 2-Methyl-5,6,7-tris-(4-phenoxybutoxy)-4 <i>H</i> - [1]benzopyran-4-on (55)	146
7.3.10.5. 2-Methyl-6,7-methylenedioxy-5-(4- phenoxybutoxy)-4 <i>H</i> -[1]benzopyran-4-on (54) . . .	147
7.3.10.6. 2,6-Dihydro-8-methyl-5-(4- phenoxybutoxy)pyrano[3,2- <i>g</i>][1]benzopyran- 2,6-dion (58)	149
7.3.10.7. 9-(4-Phenoxybutoxy)-9 <i>H</i> -dibenzo[<i>b,e</i>]pyran (19) .	152
7.3.10.8. 1-(4-Phenoxybutoxy)anthrachinon (20)	154
7.3.10.9. 9-(4-Phenoxybutoxy)phenanthren (21)	155
 Literaturverzeichnis	 158
 A. Abkürzungsverzeichnis	 186
 B. Danksagung	 192
 C. Lebenslauf	 194

Inhaltsverzeichnis

D. Erklärung zu § 10 Abs. 2 Nr. 2 der Promotionsordnung	195
E. Kurzfassung	196
F. Abstract	197

1. Einleitung

Es sind heutzutage weit mehr als 60 Autoimmunerkrankungen bekannt. Die Zahl der Betroffenen ist groß und ansteigend. Laut der Deutschen Gesellschaft für Autoimmun-Erkrankungen e. V. ist zum Beispiel jeder sechste von 10.000 Einwohnern in der Bundesrepublik Deutschland an Multipler Sklerose, einer Autoimmunerkrankung des Nervensystems, erkrankt. In den letzten Jahren sind zwar zahlreiche und zum Teil vielversprechende neue Therapieansätze gefunden worden, trotzdem bleibt aber das Bestreben, weitere effektivere und nebenwirkungsärmere Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen zu entwickeln.

Bei Autoimmunerkrankungen richtet sich das Immunsystem, das eigentlich den Körper vor fremden äußeren Einflüssen wie z. B. Viren und Bakterien schützen soll, gegen körpereigene Strukturen. Eine entscheidende Rolle kommt hierbei einer Gruppe der weißen Blutkörperchen, den sogenannten T-Lymphozyten, zu. An der Aktivierung solcher T-Lymphozyten sind verschiedene Ionenkanäle, unter anderem der spannungsabhängige Kaliumkanal Kv1.3, beteiligt. Es hat sich gezeigt, dass eine Blockade dieses Kanals eine Immunsuppression zur Folge hat. Somit steht bei der Entwicklung von Immunsuppressiva eine neue potentielle Zielstruktur zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit werden daher die Wirkungen neu synthetisierter Verbindungen am Kv1.3-Kanal untersucht.

1. Einleitung

1.1. Kaliumkanäle

1.1.1. Aufbau, Vorkommen und Funktion

Ionenkanäle sind in die Zellmembran eingelagerte und diese durchspannende makromolekulare Proteine. Sie gewährleisten, dass geladene Teilchen (Ionen), gemäß ihres elektrochemischen Gradienten, durch die Lipiddoppelschicht hindurchtreten können. In der Regel sind sie sehr selektiv einer Ionenart gegenüber. Die Aktivierung (Öffnung) solcher Kanäle kann durch verschiedene Reize ausgelöst werden, z. B. durch Änderung des Membranpotentials (spannungsgesteuert), durch Neurotransmitter oder andere chemische Substanzen (ligandgesteuert) oder durch Änderung der Temperatur oder des Drucks, sowie durch Dehnung (mechanisch gesteuert). Der Aktivierung der Kanäle folgt eine Inaktivierung, eine Phase, in welcher der Kanal nicht wieder geöffnet werden kann. Aus diesem inaktiven Zustand geht der Kanal in einen desaktivierten oder geschlossenen Zustand über, aus dem dann wieder eine erneute Öffnung erfolgen kann. Diesen Ablauf von der Aktivierung über die Inaktivierung in einen erneut aktivierbaren Zustand eines Kanals nennt man *gating*.

Da der Transport von Ionen für alle Zellen essentiell ist, finden sich Ionenkanäle in den Membranen aller erregbaren (z. B. Muskel- und Nervenzellen) und nicht-erregbaren Zellen (z. B. Gliazellen und T-Lymphozyten). Dort übernehmen sie verschiedenste Aufgaben (HILLE, 1992 und CHANDY, 1995). Sie regulieren sowohl in den erregbaren als auch in den nicht-erregbaren Zellen das Membranpotential. In den erregbaren Zellen sind sie zudem an der Ausbildung, Länge (Repolarisationsphase) und Frequenz von Aktionspotentialen beteiligt. Ferner sorgen Ionenkanäle für den transmembranären Stofftransport, die Volumenregulation (z. B. Steuerung des Salz-/Wasserhaushalts in Erythrozyten) und die Aktivierung von T-Lymphozyten (CHANDY ET AL., 1984). Zudem steuern sie sekretorische Prozesse, wie z. B. die Insulin-Ausschüttung in den Langerhansschen Inselzellen des Pankreas (ASHCROFT ET AL., 1987). Bei diesen zahlreichen Aufgaben der

1.1. Kaliumkanäle

Ionenkanäle kann es bisweilen zu Fehlfunktionen, sogenannten Channelopathien, durch beschädigte bzw. fehlerhafte Gene der Kanalproteine kommen. Diese zum größten Teil erblichen Defekte sind unter anderem für die cystische Fibrose (Chloridkanal-Defekte) (DAVIS ET AL., 1996) und das „lange“ QT-Syndrom (Defekte kaliumkanalcodierender Gene) (RODEN ET AL., 1996) verantwortlich. Das „lange“ QT-Syndrom ist gleichzeitig auch ein Beispiel für durch Arzneimittel induzierte Fehlfunktionen von Ionenkanälen. So kann z. B. die Einnahme des Antihistaminikums Terfenadin dieses hervorrufen (TAGLIALATELA ET AL., 2000). Ausführlichere Informationen über Channelopathien und die dadurch hervorgerufenen Erkrankungen finden sich in zahlreichen Übersichtsartikeln (LEHMANN-HORN UND JURKAT-ROTT, 1999, SHIEH ET AL., 2000, KASS, 2005 und ASHCROFT, 2006).

Kaliumkanäle weisen in Bezug auf ihre Regulation, ihre Funktion als auch ihren strukturellen Aufbau eine sehr große Vielfalt auf. Es wurden alleine beim Menschen über 80 kaliumkanalcodierende Gene identifiziert. Früher wurden die Kaliumkanäle nach ihren *gating*- und pharmakologischen Eigenschaften oder Einzelkanalleitfähigkeiten benannt. Daher ergaben sich Namen wie *delayed rectifier* oder ATP-abhängiger Kaliumkanal. Aufgrund der Kenntnis des Aufbaus ihrer α -Untereinheiten teilt man nun die Kaliumkanäle in vier strukturelle Klassen ein (WEI ET AL., 1996) (erweiterte Einteilung siehe Kapitel 1.1.1.1). Die Untereinheiten unterscheiden sich in der Anzahl ihrer membrandurchspannenden Segmente ihrer Aminosäurekette und der Anzahl der Porenregionen.

So gibt es Kaliumkanaluntereinheiten, die eine Porenregion aufweisen und entweder aus zwei oder sechs transmembranären Segmenten bestehen. Diese werden auch kurz als 2TM1P bzw. 6TM1P bezeichnet. Aus den 2TM1P-Untereinheiten werden sowohl die sogenannten Kir-Kanäle (*inward rectifier*), die einwärts-gleichrichtende Kanäle darstellen (MILLER, 2000), als auch die ATP-abhängigen und die G-Protein-gekoppelten Kanäle gebildet (DOUPNIK ET AL., 1995). Kanäle aus 6TM1P-Untereinheiten stellen die größte Gruppe, zu der

1. Einleitung

auch die spannungsabhängigen und die calciumaktivierbaren Kanäle gehören.

Zur Bildung eines funktionsfähigen Kaliumkanals müssen sich vier α -Untereinheiten derselben Klasse zusammenlagern. Sind vier gleiche Untereinheiten zusammengelagert, ergibt sich ein homotetramerer Kanal. Lagern sich dagegen unterschiedliche Untereinheiten zusammen, so spricht man von einem Heterotetramer.

Des Weiteren existieren Kaliumkanaluntereinheiten, die zwei Porenregionen aufweisen und entweder aus vier oder acht transmembranären Segmenten aufgebaut sind. Diese werden kurz 4TM2P bzw. 8TM2P genannt. Bei den 8TM2P-Untereinheiten liegen die Porenregionen zwischen dem Segment 5 und 6 sowie zwischen 7 und 8. Funktionsfähige Kanäle werden durch das Zusammentreten jeweils zweier α -Untereinheiten gebildet. Sie liegen demnach als Dimere vor.

Alle vier Klassen lassen sich mittels der Übereinstimmung der Aminosäuresequenz weiter in Familien und Subfamilien unterteilen.

Die Klasse der 6TM1P-Kaliumkanäle, von der heutzutage die meisten Vertreter bekannt sind, ist die wichtigste Klasse. Sie wird in sechs Familien eingeteilt, zu denen unter anderem die calciumaktivierbaren Kaliumkanäle sowie die spannungsabhängigen Kaliumkanäle zählen.

1.1.1.1. Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle stellen die größte und bedeutendste Familie der 6TM1P-Kanäle dar. Sie lässt sich weiter in zwölf Subfamilien unterteilen (GUTMAN ET AL., 2003). Die bekanntesten Subfamilien sind *Shaker* (Kv1), *Shab* (Kv2), *Shaw* (Kv3) und *Shal* (Kv4). Diese vier Subfamilien wurden zum ersten Mal in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert und benannt (WEI ET AL., 1990). Neben dieser Kv-Nomenklatur (K: Kaliumkanal; v: *voltage-gated* (spannungsgesteuert)) (CHANDY ET AL., 1991 und GUTMAN UND CHANDY, 1993), bei der eine phylogenetische Übereinstimmung von $\sim 65\%$ vorliegt,

1.1. Kaliumkanäle

existiert gleichzeitig eine vom GNC (*Gene Nomenclature Committee*) der *Human Genome Organisation* (HUGO) entwickelte sogenannte KCN-Nomenklatur (WHITE ET AL., 1997) (phylogenetische Übereinstimmung von $\sim 45\%$). Aufgrund dieser zwei uneinheitlichen, parallel verwendeten Nomenklaturen, der wachsenden Zahl an neu identifizierten Kanälen, der Neucharakterisierung von bereits bekannten Kanälen infolge neuer Erkenntnisse und der Aufklärung des menschlichen Genoms wurde von der IUPHAR (*International Union of Pharmacology*) eine neue Einteilung vorgeschlagen (GUTMAN ET AL., 2003). Hierbei werden die 6TM1P-Kanäle und der bis jetzt einzig bekannte 7TM1P-Kanal zu einer Klasse, die wiederum aufgrund von genetischen Eigenschaften weiter unterteilt werden kann, zusammengefasst. Der 7TM1P-Kanal (Tetramer) ist ein *large conductance*-Kanal, der auch als BK- oder Slo-Kanal bezeichnet wird (siehe Kapitel 1.1.1.2). Die Porenregion liegt zwischen Segment 6 und 7. Im Unterschied zu den anderen Kanälen liegt das N-terminale Ende der Aminosäure-Kette nicht im Intra- sondern im Extrazellarraum (MEERA ET AL., 1997). Zwei weitere Familien bilden die 2TM1P- und die 2P-Kanäle (4TM2P und 8TM2P), ebenfalls mit weiteren Untergruppen. Zusätzliche Aktualisierungen wurden 2005 von der IUPHAR für die spannungsabhängigen Kaliumkanäle (GUTMAN ET AL., 2005) und für die calciumaktivierbaren Kaliumkanäle (WEI ET AL., 2005) durchgeführt.

Wie oben bereits erwähnt, bilden vier α -Untereinheiten einen funktionsfähigen spannungsabhängigen Kaliumkanal. Dabei sind die α -Untereinheiten relativ frei kombinierbar (COVARRUBIAS ET AL., 1991). Es können sich zwar nur Mitglieder einer Subfamilie zusammenlagern, also z. B. Kv1.1 und Kv1.2, nicht aber Kv1.1 und Kv2.1 (Klasse: 6TM1P/7TM1P, Familie: Kv, Subfamilie: 1-12). Trotzdem ergeben sich auch hierdurch eine Reihe von Kombinationsmöglichkeiten, wodurch sich die große Variabilität der Kaliumkanäle erklärt. Die Vielfalt der Natrium- und Calciumkanäle ist dagegen um einiges geringer, da sie aus einer langen Aminosäurekette mit vier aufeinander folgenden identischen 6TM-Domänen, die die Kanal-Funktionseinheit bilden, aufgebaut sind.

1. Einleitung

Die Bildung von Heteromultimeren der spannungsabhängigen Kaliumkanäle über die Grenzen der Subfamilien hinaus wird durch eine sogenannte Tetramerisierungsdomäne 1 (T1-Segment), die intrazellulär über einen Aminosäurespacer mit dem aminoterminalen Ende der α -Untereinheit verbunden ist, verhindert (KOBERTZ ET AL., 2000, GULBIS ET AL., 2000 und SCANNEVIN ET AL., 2004). Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus der Aminosäurekette der α -Untereinheiten befinden sich im Intrazellularraum und können dort mit weiteren Molekülen, sogenannten β -Untereinheiten, assoziiert vorliegen, die Einfluss auf die Kanaleigenschaften, z. B. das *gating*, haben können (PONGS, 1992 und RETTIG ET AL., 1994). Von PONGS ET AL. konnten 1999 drei Familien dieser β -Untereinheiten, die mit verschiedenen Kv-Kanälen assoziiert waren, identifiziert werden (PONGS ET AL., 1999).

In Abbildung 1.1 ist der Aufbau einer α -Untereinheit gezeigt. Eine Untereinheit besteht aus 500-600 Aminosäuren. Die sechs transmembranären Segmente werden beginnend vom N-terminalen Ende mit S1 bis S6 bezeichnet. Zwischen S5 und S6 befindet sich die porenbildende Region (*P-Loop*). Sie stellt zugleich den Selektivitätsfilter dar. Mit Hilfe von verschiedenen Toxinstrukturen konnte man durch die Stärke der Wechselwirkungen zwischen der Porenregion und den unterschiedlichen Aminosäuresequenzen der Toxine auf die Struktur der Porenregion schließen (z. B. AIYAR ET AL., 1995 und 1996). Weitere Hinweise auf die Funktionsweise des Selektivitätsfilters konnten gewonnen werden, als es erstmalig MacKinnon 1998 gelang, einen Kaliumkanal, den KcsA-Kanals aus *Streptomyces lividans*, zu kristallisieren und in einer anschließenden Röntgenstrukturanalyse zu untersuchen (DOYLE ET AL., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass sich in der Pore derartig angeordnete Carbonylsauerstoffe befinden, dass die Hydrathülle, die die Kaliumionen im Cytosol normalerweise umgibt, imitiert wird, so dass die Kaliumionen nahezu ohne Energieverlust ihre Hydrathülle abstreifen und durch die Pore gelangen können. Für andere Ionen, z. B. Natriumionen (geringerer Durchmesser), die vermeintlich auch durch die Pore gelangen könnten, sind die Abstände zwischen

1.1. Kaliumkanäle

den Carbonylsauerstoffen nicht optimal. Somit ist ein Durchtritt dieser Ionen energetisch ungünstig und findet nicht statt. Damit die positiv-geladenen Kaliumionen nicht zu stark mit den partiell negativ-geladenen Carbonylsauerstoffen interagieren und somit in der Pore stecken bleiben, sind die Kaliumbindungsstellen in der Region des Selektivitätsfilters so gruppiert, dass es zur elektrostatischen Abstoßung zwischen den Kaliumionen kommt (DOYLE ET AL., 1998). Das S4-Segment, das in der Abbildung 1.1 rot unterlegt ist, stellt den Spannungssensor dar. Dieses Segment weist ungefähr an jeder dritten Position eine basische Aminosäure (Lysin oder Arginin) auf, die beim physiologischen pH-Wert protoniert vorliegt (PAPAZIAN ET AL., 1991). Durch diese permanente positive Ladung liegt eine große Ladungsdichte und eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Änderungen im Ruhemembranpotential vor. Wird das Ruhemembranpotential verändert, resultieren Konformationsänderung rund um das S4-Segment und die Öffnung der Pore erfolgt. Wie der genaue Bewegungsablauf aussieht, ist noch nicht geklärt. Es wird unter anderem eine Kombination aus dem Modell der *sliding helix* (Translation und Rotation des S4 Segments) und dem Transporter-Modell (Drehbewegung des S1-S3-Segments um das S4-Segment) diskutiert (YAROV-YAROVY, 2006).

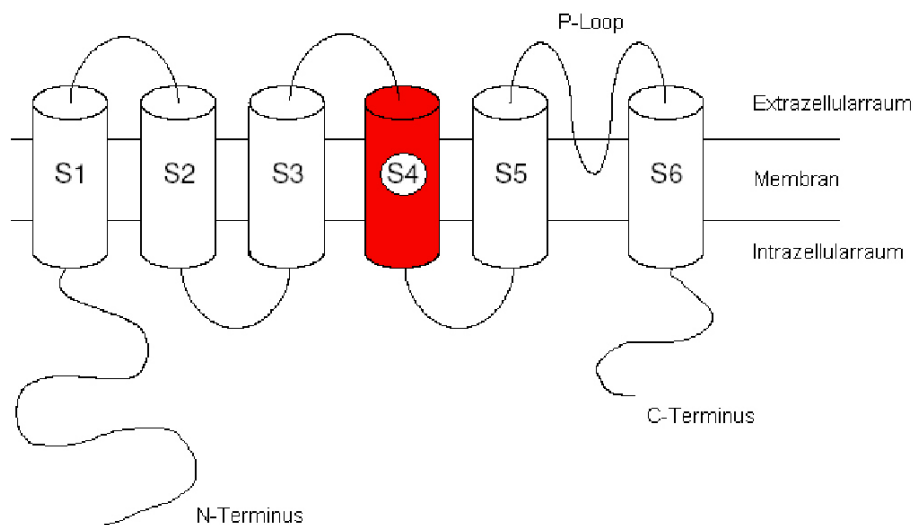


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einer α -Untereinheit eines 6TM1P-Kaliumkanals

1. Einleitung

Wie alle Ionenkanäle können auch die spannungsabhängigen Kaliumkanäle in drei Aktivitätszuständen vorliegen (Kapitel 1.1.1): Geschlossen-aktivierbar, offen und inaktiviert. Bei der Inaktivierung gibt es drei verschiedene Mechanismen. Die langsame oder auch C-Typ-Inaktivierung ist charakteristisch für die *delayed rectifier*-Kanäle. Dieser Form der Inaktivierung liegt eine gleichzeitige und koordinative Konformationsänderung aller vier Untereinheiten zugrunde, die zum Verschluss der Pore führt (RASMUSSEN ET AL., 1998). Ein zweiter Inaktivierungsmechanismus ist die in wenigen Millisekunden ablaufende schnelle bzw. N-Typ-Inaktivierung. Dabei geht ein Teil des N-terminalen Endes der Aminosäurekette, der ungefähr die ersten 20 Aminosäuren umfasst (HOSHI ET AL., 1990), Wechselwirkungen (elektrostatische und sterische Interaktionen) mit der Aminosäurekette zwischen dem S4- und S5-Segment ein und verschließt dabei die Pore wie ein Stopfen (HOLMGREN ET AL., 1996). Dieser Mechanismus wird auch *ball and chain* genannt, da der N-terminale Aminosäurerest zum Verschließen der Pore wie ein Ball an einer Kette zur S4/S5-Region schwingt. Die dritte Form der Inaktivierung ist die sehr langsam ablaufende und spannungsabhängige U-Typ-Inaktivierung. Sie wurde z. B. für die Kv2.1- und Kv3.1-Kanäle beobachtet. Bei dieser Inaktivierung gelangen die Kanäle direkt vom geschlossenen, aktivierbaren in den inaktivierten Zustand, ohne dass es zu einer Öffnung des Kanals kommt (KLEMIC ET AL., 2001).

1.1.1.1.1. Kv1.3-Kanal Der *delayed rectifier* Kv1.3-Kanal wird ebenfalls durch die Zusammenlagerung von vier α -Untereinheiten, die jeweils eine Größe von 64 kDa aufweisen, gebildet (SPENCER ET AL., 1997). Als Inaktivierungsmechanismus wurde die C-Typ-Inaktivierung nachgewiesen, die zudem bei schnell aufeinander folgenden Depolarisationen eine *use-dependence* zeigte, also eine Verminderung der Stromamplitude bei jeder erneuten Depolarisation (GRISSMER ET AL., 1994). Der Kanal wird in nur recht wenigen Geweben exprimiert (GRISSMER ET AL., 1990). So kommt er z. B. in Form von Heterotetrameren in geringem Aus-

maß im Gehirn (z. B. assoziiert mit Kv1.1 und Kv1.2, SLAUGHTER ET AL., 1996 und COLEMAN ET AL., 1999), in der Niere sowie in B-Lymphozyten vor. Bei der Regulation des Membranpotentials in Osteoklasten, Thrombozyten und Makrophagen spielt er zudem nur eine untergeordnete Rolle und stellt einen von vielen an diesem Vorgang beteiligten Kanälen dar. Als Homotetramer liegt der Kanal nur in den T-Lymphozyten vor, wobei ihm dort eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung und damit der Proliferation zukommt (siehe Kapitel 1.2.2.3). Diese Tatsache ermöglicht eine gezielte Beeinflussung der T-Lymphozyten, ohne verstärkt Effekte an anderen Zellen bzw. Geweben hervorzurufen und weist auf eine große Bedeutung dieses Kanals in der Entwicklung von selektiven Immunsuppressiva hin.

1.1.1.1.2. Kv1.5-Kanal Dieser Kanal ist als Homotetramer im Atrium, nicht aber im Ventrikel, exprimiert und ist dort am Beginn der Plateau-Phase der Repolarisation (*ultra-rapid inward rectifier*-Strom) beteiligt (FEDIDA ET AL., 1993, COGHLAN ET AL., 2001, FEDIDA ET AL., 2003 und FORTH ET AL., 2005). Von FENG ET AL. konnte 1997 gezeigt werden, dass eine Blockade dieses Kanals zu einer Verlängerung der atrialen Refraktärphase führt (FENG ET AL., 1997). Zudem ist kürzlich herausgefunden worden, dass das Vorhofflimmern (*atrial fibrillation*, AF) durch eine Kv1.5-Channelopathie verursacht wird (OLSON ET AL., 2006). Aufgrund dieser Tatsachen und der hohen Gewebespezifität wird der Kv1.5-Kanal als ein vielversprechender Angriffspunkt zur Behandlung von atrialen Herzrhythmusstörungen, wie z. B. das Vorhofflimmern, angesehen (BRENDDEL UND PEUKERT, 2003). Infolge der nahen strukturellen Verwandtschaft mit dem Kv1.3-Kanal (gleiche Familie, 80 % Homologie der Aminosäuresequenz (LAWSON UND MCKAY, 2006)) kommt dem Kv1.5-Kanal bei der Entwicklung von Kv1.3-Kanal-Blockern eine besondere Bedeutung zu. Ein proarrhythmogenes Potential von Kv1.3-Kanal-Blockern mit einer geringen Selektivität gegenüber dem Kv1.5-Kanal kann nicht sicher ausgeschlossen werden und daher sollte die Selektivität stets untersucht werden.

1. Einleitung

1.1.1.2. Calciumabhängige Kaliumkanäle

Die Familie der calciumabhängigen Kaliumkanäle gehört ebenfalls zur Klasse der 6TM1P/7TM1P-Kanäle. Die Öffnung der Kanäle ist zum größten Teil spannungsunabhängig und wird, wie ihr Name schon sagt, durch die Konzentration von Calciumionen reguliert. Diese Familie wird nach der IUPHAR in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt (WEI ET AL., 2005). In der einen Gruppe werden der BKCa-Kanal (B: *big* bzw. *large conductance*, große Leitfähigkeit; K: Kaliumkanal; Ca: calciumabhängig) und drei weitere Kanäle, deren Aktivierung allerdings nicht calciumabhängig ist, zusammengefasst. Diese drei Kanäle wurden, bevor etwas über funktionelle Eigenschaften bekannt war, anhand ihrer Genstrukturähnlichkeiten in die KCa-Nomenklatur aufgenommen. Der BKCa-Kanal hingegen ist calciumabhängig, aber zugleich auch spannungsabhängig. Die Öffnung dieses Kanals wird sowohl durch eine Depolarisation der Zellmembran (NELSON ET AL., 1995) als auch durch die Calciumionen-Konzentration moduliert (STEFANI ET AL., 1997). Wie bereits in Kapitel 1.1.1.1 erwähnt, ist dieser Kanal aus sieben transmembranären Segmenten aufgebaut, wodurch sich das N-terminale Ende im Extrazellularraum befindet. Die zweite Gruppe setzt sich aus den SKCa-Kanälen (S: *small conductance*, kleine Leitfähigkeit) und dem IKCa-Kanal (I: *intermediate conductance*, mittlere Leitfähigkeit) zusammen. Die SKCa-Kanäle und der IKCa-Kanal sind komplett spannungsunabhängig und werden nur von der Konzentration der Calciumionen reguliert. Für die Calciumsensitivität ist Calmodulin, ein Protein, das an vier Positionen Calciumionen binden kann, verantwortlich. Es ist relativ fest am C-terminalen Ende jeder α -Untereinheit gebunden (XIA ET AL., 1998 und FANGER ET AL., 1999). Die Bindung von Calciumionen an das Calmodulin bewirkt eine Konformationsänderung und damit die Öffnung der Kanäle (SCHUMACHER ET AL., 2001). Der IKCa-Kanal ist insofern von besonderer Bedeutung, da er neben dem Kv1.3-Kanal auch auf T-Lymphozyten exprimiert wird und bei der Immunsuppression eine wichtige Rolle spielt.

1.2. Das Immunsystem

Das Immunsystem (lat. *immunis* = frei, unberührt) ist ein komplexes System von Molekülen und Zellen, das den Körper vor Angriffen von außen (Bakterien, Viren, Pilze, einzellige und mehrzellige Organismen sowie sonstige körperfremde Proteine), aber auch von innen (entartete körpereigene Zellen) schützen soll. Dabei muss das Immunsystem befähigt sein, zwischen fremd und eigen, sowie zwischen entartet und normal zu unterscheiden. Wenn diese Unterscheidung nicht mehr richtig funktioniert, kann es unter anderem zu Autoimmunerkrankungen (Kapitel 1.3) kommen. Im weitesten Sinne können schon die mechanischen Barrieren des Körpers wie Haut und Schleimhäute zum Immunsystem gezählt werden. Schließlich verhindern sie zum großen Teil, dass Erreger überhaupt in den Körper eindringen können (z. B. auch durch Absonderung von Stoffen und Enzymen, wie z. B. Lysozym und Pepsin) bzw. ermöglichen sie, dass die Erreger schnell wieder hinaus transportiert werden. Das eigentliche Immunsystem lässt sich in zwei Komponenten, die angeborene, unspezifische Abwehr und die erworbene, spezifische Abwehr einteilen. Die angeborene Abwehr wird sofort beim Eindringen von Erregern aktiviert. Dabei reagiert sie immer gleich und geht nicht spezifisch gegen einzelne Erreger vor. Sie kann entweder alleine die Entstehung von Infektionsherden verhindern oder die Ausbreitung solange unterdrücken, bis die erworbene Abwehr eingreifen kann. Die erworbene Abwehr greift erst nach wenigen Tagen ein, da die Abwehrzellen eine gewisse Zeit für die Reifung (Wachstum und Proliferation) brauchen, um z. B. spezifische Antikörper zu produzieren. Beide Komponenten greifen ineinander, verstärken und ergänzen sich in ihrer Wirkung. In Abbildung 1.2 ist eine vereinfachte Übersicht über das Immunsystem dargestellt. Im Folgenden werden die in der Abbildung 1.2 dargestellten Komponenten näher erklärt. Für weiterführende Informationen über das Immunsystem sei auch auf die für diesen Text verwendete Quellenliteratur verwiesen, wie JANEWAY ET AL., 2002, KAEVER UND RESCH, 2005 und VOLLMAR UND DINGERMANN, 2005.

1. Einleitung

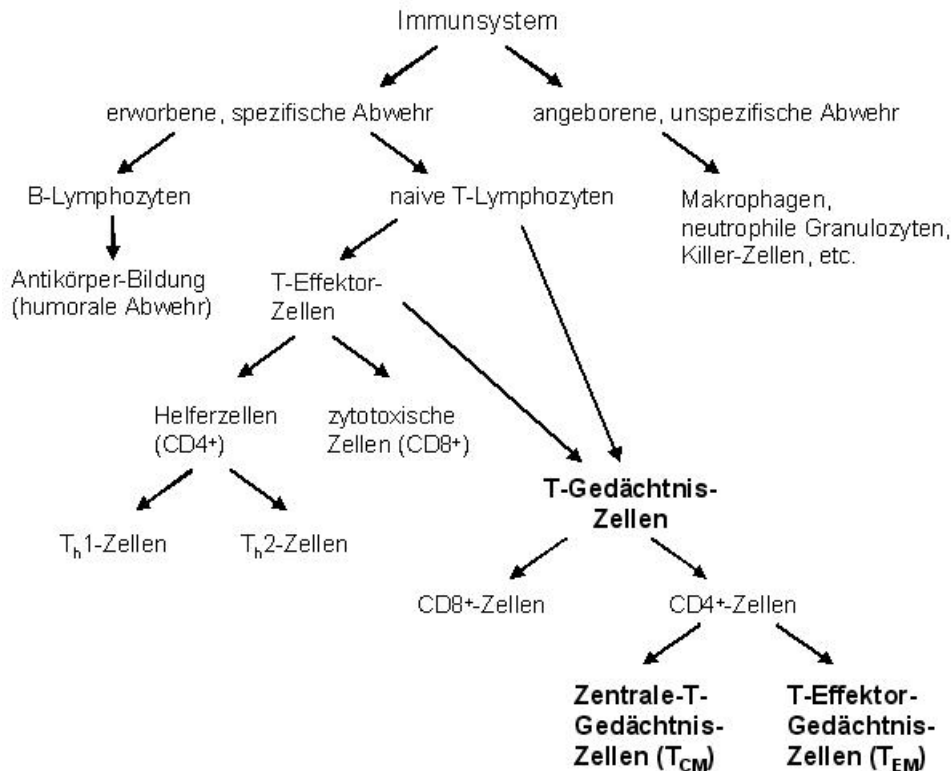


Abbildung 1.2: Vereinfachte Darstellung der Komponenten des Immunsystems

1.2.1. Angeborene, unspezifische Abwehr

Die angeborene, unspezifische Abwehr wird zum einen von dem Komplement und zum anderen von Zellen vermittelt. Das Komplement ist ein komplexes Enzym-system, das aus mindestens 20 Serum-Glykoproteinen besteht. Es kann einerseits selbstständig zur Immunabwehr beitragen und zählt dann zur angeborenen Immunantwort. Andererseits kann es aber auch die erworbene Immunantwort unterstützen und wird dann als ein Teil der erworbenen Abwehr angesehen. Der Aktivierung, die durch Antigen-Antikörper-Komplexe oder durch auf Mikroorganismen befindlichen Polysaccharid-Strukturen ausgelöst wird, folgt eine Kaskade proteolytischer Reaktionen, die verschiedene Wirkungen hervorrufen können. So kommt es durch Bildung transmembranärer Poren zur osmotischen Lyse und somit zum Zelltod. Des Weiteren wird durch Opsonierung, also durch Kenn-

zeichnung der Oberflächen von als fremd erkannten Organismen, der Angriff von Immunzellen erleichtert und unterstützt. Zudem werden die Gefäßpermeabilität z. B. durch sogenannte *Anaphylotoxine* erhöht und weitere Abwehrzellen ange lockt. Durch alle diese Vorgänge kommt es zu lokalen Entzündungsreaktionen. Die an der angeborenen Abwehr beteiligten Zellen besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose, also Fremdstoffe aufzunehmen und durch Lyse unschädlich zu machen. Für die Abwehr von extrazellulären Pathogenen (z. B. Bakterien) sind die Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen verantwortlich. Die Dendritischen Zellen und die Makrophagen, die aus Monozyten entstehen, gehören zu den antigenpräsentierenden Zellen und schütten sogenannte Zytokine (z. B. Interleukine) aus. Zytokine sind Proteine, die die Aktivierung, Teilung, Beweglichkeit und Apoptose von sezernierenden und anderen Zellen regulieren. Die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) spielen bei der Abwehr von intrazellulären Pathogenen, insbesondere von Viren, eine entscheidende Rolle. Sie töten die infizierten Zellen durch zytotoxische Stoffe ab und setzen ebenfalls Zytokine (z. B. Interferon γ) frei, die unter anderem wiederum die Makrophagen aktivieren.

1.2.2. Erworbene, spezifische Abwehr

Die erworbene, spezifische Abwehr wird von zwei Gruppen von Zellen, den B- und den T-Lymphozyten, die nach dem Ort ihrer Reifung benannt werden, vermittelt. Wie die bisher angesprochenen Zellen werden diese beiden Gruppen auch im Knochenmark gebildet. Zur Reifung verbleiben die Zellen der einen Gruppe im Knochenmark (*bone marrow*) und werden daher B-Lymphozyten genannt. Die Zellen der anderen Gruppe wandern zur Reifung in die Thymusdrüse (*thymus*) und heißen folglich T-Lymphozyten. Das Besondere der erworbenen gegenüber der angeborenen Abwehr ist die Tatsache, dass sie ein sogenanntes Gedächtnis nach dem ersten Antigen-Kontakt ausbilden kann. Zur Abwehr werden Effektorzellen gebildet, von denen nach Beseitigung der Pathogene nur einige wenige

1. Einleitung

überleben, die zu Gedächtniszellen werden. So kann bei erneuter Invasion des entsprechenden Antigens schnell und effektiv reagiert werden. Auf der Bildung solcher Gedächtnis-Lymphozyten beruht auch das Prinzip von aktiven Immunisierungen.

1.2.2.1. B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten erkennen spezifisch vollständige Antigene. Der Kontakt mit einem Antigen erfolgt über einen speziellen B-Zell-Rezeptor, der einem membrangebundenen Antikörper entspricht. Durch diesen Kontakt werden die B-Lymphozyten stimuliert, sich zu teilen und zu Plasmazellen zu differenzieren, deren Aufgabe in der Produktion von Antikörpern besteht. Neben dem Antigen-B-Zell-Rezeptor-Kontakt sind häufig auch aktivierte T-Lymphozyten an dieser Aktivierung beteiligt. Die B-Zellen produzieren immer speziell die Antikörper, die in der Lage sind, exakt das von ihnen aufgenommene Antigen zu binden. Es ergeben sich eine Vielzahl von verschiedenen Antikörpern. So besitzt jeder Mensch mehr als 10^8 verschiedene Antikörper (Immunglobuline). Die antikörpervermittelte Abwehr wird auch als humorale adaptive Immunantwort bezeichnet. Die freigesetzten Antikörper können auf verschiedene Weise zur Immunabwehr beitragen. Sie können Erreger und deren toxische Stoffe (Exotoxine) binden und so für die Fresszellen, z. B. die Makrophagen, kenntlich machen. Ein weiterer Effekt der Antikörper ist die Aktivierung des Komplement-Systems, das zu den oben bereits beschriebenen Reaktionen führt.

1.2.2.2. T-Lymphozyten

Für die eigentliche zelluläre adaptive Immunantwort sind die T-Lymphozyten verantwortlich. Da die T-Lymphozyten im Gegensatz zu den B-Lymphozyten keine kompletten Antigenstrukturen, sondern nur Teilstrukturen (Peptide von 8-25 Aminosäuren) erkennen können, werden zur Aktivierung antigenpräsentierende Zellen (*antigen-presenting cell*, APC) wie Dendritische Zellen und Makropha-

gen benötigt. Diese tragen auf ihrer Oberfläche die Antigenteilstrukturen, die an sogenannte HLA-Proteine (humane Leukoyzten-Antigene bzw. MHC, *major histocompatibility complex*) gebunden sind. Von den HLA-Proteinen gibt es zwei Klassen. Die HLA-Proteine der Klasse I befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen und sind maßgeblich an der Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremd beteiligt. Sie spielen daher eine wichtige Rolle bei der Abstoßung von Transplantaten. Die Klasse II der HLA-Proteine befindet sich ausschließlich auf den Phagozyten. In den Lymphknoten treffen die antigenpräsentierenden Zellen auf die T-Lymphozyten. Zur Aktivierung der T-Lymphozyten müssen neben den passenden Antigenstrukturen gleichzeitig auch die entsprechenden HLA-Proteine vorhanden sein. Kommt es zum Kontakt zwischen antigenpräsentierender Zelle und dem T-Lymphozyten, so beginnt dieser zu wachsen und zu proliferieren. Aus den neu entstandenen Zellen bilden sich verschiedene T-Effektorzellen, die entweder im Lymphknoten verbleiben, um B-Lymphozyten zu aktivieren, oder in die betroffenen Gewebe wandern, um die infizierten Zellen zu eliminieren.

1.2.2.2.1. T-Effektorzellen Die sich bildenden T-Effektorzellen lassen sich unterteilen in die zytotoxischen T-Zellen und die T-Helfer-Zellen (Th0). Diese beiden Gruppen exprimieren auf ihren Oberflächen verschiedene Corezeptoren, wodurch sie sich unterscheiden lassen. Die zytotoxischen Zellen besitzen den CD8-Corezeptor ($CD8^+$; CD = cluster of differentiation) und binden an HLA I. Die T-Helfer-Zellen hingegen tragen den CD4-Corezeptor auf ihrer Oberfläche, der an HLA II bindet. Aus den Th0-Zellen bilden sich die Th1- und Th2-Zellen. Die Bildung der Th1-Zellen wird durch die von Makrophagen und Dendritischen Zellen sezernierten Interleukine (IL-12 und IL-18) gefördert. Die Th1-Zellen schütten ihrerseits ebenfalls Stoffe aus, wie IL-2, das die T-Zellproliferation beschleunigt und die zytotoxischen T-Zellen stimuliert, und wie Interferon γ , das wiederum Makrophagen und NK-Zellen aktiviert. Die Th1-Zellen sind somit an der Abwehr von intrazellulären Pathogenen beteiligt und spielen auch bei Autoimmunerkrank-

1. Einleitung

kungen eine entscheidende Rolle. Die Ausbildung der Th2-Zellen wird durch das besonders aus den Granulozyten und den Mastzellen stammende Interleukin-4 (IL-4) reguliert. Die Th2-Zellen unterstützen über die Ausschüttung von Interleukinen (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13) die Aktivierung der B-Lymphozyten und damit die Antikörper-Produktion. Die Th2-Zellen sind unter anderem bei Allergien beteiligt. Aus den zytotoxischen Zellen entwickeln sich ebenfalls zwei Untergruppen, deren genaue Aufgaben aber noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Allgemein sind diese Zellen für das Auslösen der Apoptose (programmierter Zelltod) verantwortlich, z. B. durch Perforation der Zellmembran der Zielzellen. Wie oben bereits angesprochen können sich auch aus den T-Lymphozyten Gedächtniszellen bilden. Diese werden entweder direkt bei der ersten Aktivierung aus den noch undifferenzierten (naiven) T-Zellen oder aus den durch die erfolgreiche Abwehrreaktion entstandenen T-Effektor-Zellen gebildet. In Untersuchungen von WULFF ET AL. konnte gezeigt werden, dass zwei Arten von CD4⁺-Gedächtniszellen (WULFF ET AL., 2003b) existieren. Die eine Gruppe besteht aus den T-Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM} , effector memory T cells), die bei erneutem Kontakt mit dem entsprechenden Antigen schnell zu T-Effektor-Zellen differenzieren und die Proliferation von anderen T-Lymphozyten vorantreiben. Sie wandern direkt in die entzündeten Gewebe, daher spielen sie bei vielen Autoimmunerkrankungen und bei deren Verlauf eine Schlüsselrolle. Sie werden auch als autoreaktive T-Zellen bezeichnet. Die zweite Gruppe stellen die Zentralen-T-Gedächtniszellen (T_{CM} , central memory T cells) dar. Diese kehren bei Antigenkontakt zügig in die lymphatischen Gewebe zurück und sorgen dort für die Differenzierung der T-Zellen und teilweise auch für Aktivierung der B-Lymphozyten. Unterschiede in der Funktion der beiden Zelltypen werden durch den Chemokinrezeptor CCR7, einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor mit sieben transmembranären Segmenten, verursacht. Ist dieser vorhanden, z. B. bei den T_{CM} -Zellen, so werden die Zellen angeregt, in die lymphatischen Gewebe überzutreten und dort zu verweilen. Die T_{EM} -Zellen exprimieren diesen CCR7-Rezeptor nicht und treten somit nicht ins lymphatische Gewebe über, sondern gelangen direkt zu den infizierten Geweben.

1.2.2.3. Aktivierung von T-Lymphozyten

In T-Lymphozyten sind verschiedene Ionenkanäle exprimiert (Übersicht bei LEWIS UND CAHALAN, 1995). Für ihre Aktivierung sind drei Ionenkanäle von Bedeutung. Die beiden Kaliumkanäle Kv1.3 und IKCa1 (Kapitel 1.1.1.1.1 und 1.1.1.2) und der CRAC-Kanal (CRAC = *calcium release-activated calcium*), ein Calciumkanal, der durch intrazellulär freigesetzte Calciumionen aktiviert wird und für einen zusätzlichen Calciumioneneinstrom sorgt.

In der Abbildung 1.3 ist die Aktivierung von T-Lymphozyten am Beispiel einer CD4⁺-Zelle gezeigt. Wird einer T-Zelle durch eine antigenpräsentierende Zelle (APC) ein zu ihr passendes Antigen angeboten und stimmen die anderen Rezeptor-Merkmale überein, also z. B. eine CD4⁺-T-Zelle und eine HLA II tragende antigenpräsentierende Zelle, so kommt es zur Ausbildung einer sogenannten „immunologischen Synapse“. Hierdurch wird eine Signalkaskade ausgelöst, die schließlich zur Aktivierung der membranständigen Phospholipase C (PLC) führt. Durch die PLC wird aus Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP₂) Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) gebildet. Durch diese beiden *second messenger* werden weitere Prozesse vermittelt.

DAG, das an der Membran gebunden bleibt, aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Dadurch wird eine Phosphorylierungskaskade gestartet, die den Transkriptionsfaktor NFκB befähigt, in den Zellkern zu gelangen, wodurch es zur Genexpression kommt. Durch die PKC werden ebenfalls das Protein Ras, ein kleines G-Protein, und die JNK (*c-JUN N-terminal kinase*) stimuliert, was zur Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren führt.

Das IP₃ gelangt zu seinem Rezeptor, der am endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert ist. Es kommt zu einer Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher des ERs, so dass eine freie intrazelluläre Calciumionenkonzentration von ca. 500 nM erreicht wird. Diese relativ hohe Calciumionen-Konzentration (Normalkonzentration < 100 nM) ist für eine effektive Produktion von Transkriptionsfaktoren

1. Einleitung

ren und damit für eine Proliferation von T-Zellen nötig und sollte möglichst über einen Zeitraum von ein bis zwei Stunden anhalten (NEGULESCU ET AL., 1994).

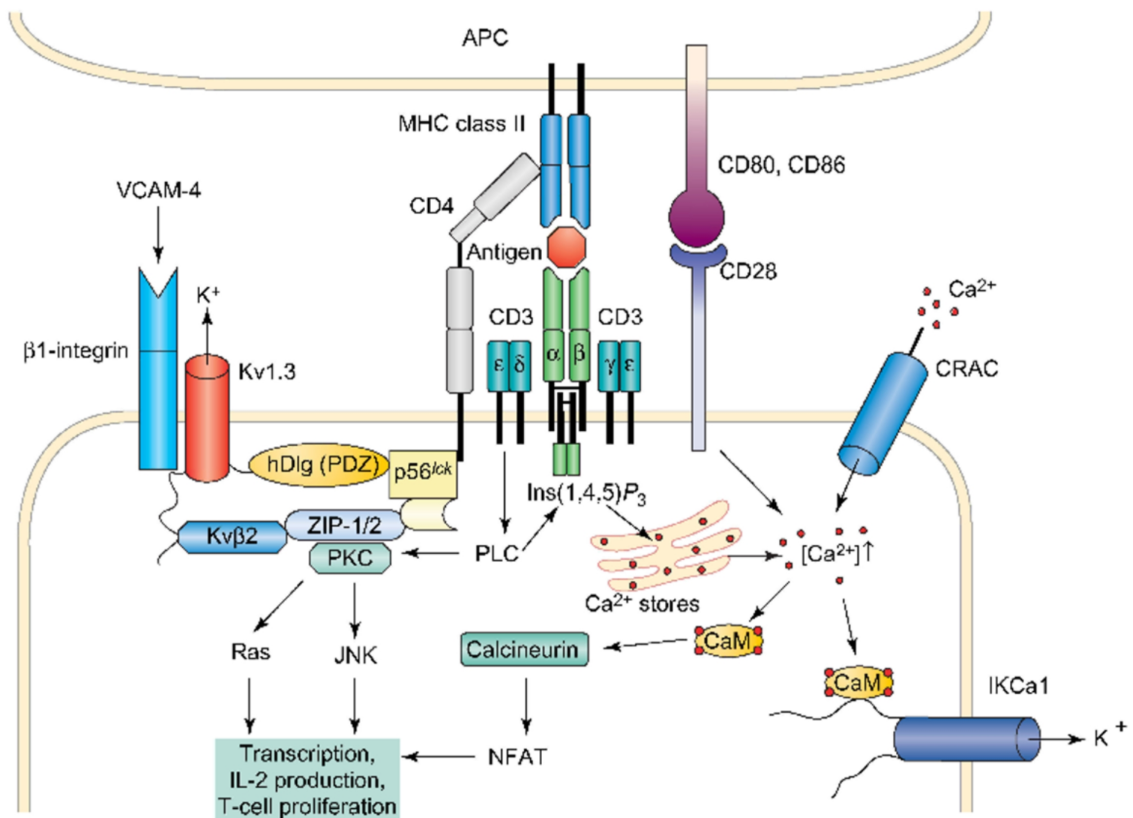


Abbildung 1.3: T-Zellaktivierung unter Beteiligung der Kaliumkanäle Kv1.3 und IKCa1 (CHANDY ET AL., 2004): APC = *antigen-presenting cell* (antigen-präsentierende Zelle), CD = *cluster of differentiation*, CRAC = *calcium release-activated calcium*, CaM = Calmodulin, hDlg = humanes Analogon des Drosophila-Tumor-Suppressor-Proteins, IKCa = Calciumabhängiger Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit, IL = Interleukin, Ins(1,4,5)P₃ = Inositoltriphosphat, JNK = c-Jun N-terminale Kinase, Kv1.3 = Spannungsabhängiger Kaliumkanal 1.3, MHC = *major histocompatibility complex*, NFAT = Nukleärer Faktor der T-Zellaktivierung, p56^{lck} = T-Zell-spezifische Tyrosinkinase der Src-Familie, PLC = Phospholipase C, PKC = Proteinkinase C, VCAM = vaskuläres Zell-Adhäsions-Molekül, ZIP = Zrt/Irt-ähnliches Molekül

Durch den hohen Calciumionenspiegel wird das Calcineurin, eine Phosphatase, aktiviert. Diese Phosphatase sorgt für eine Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), der hierdurch befähigt ist, in den Zellkern zu wandern und dort die Transkription zu regulieren. Damit die Calciumionenkonzentration überhaupt über einen längeren Zeitraum auf diesem Niveau gehalten werden kann, muss stetig Calcium aus dem Extrazellularraum in die Zelle gelangen. Der Calciumeinstrom wird durch die CRAC-Kanäle gewährleistet, die sich aufgrund der hohen intrazellulären Calciumionenkonzentration öffnen und verstärkt exprimiert werden. Die CRAC-Kanäle sind eigentlich spannungsunabhängig, aber dennoch über das Membranpotential modulierbar, d. h., dass aus einer Depolarisation ebenfalls eine Schließung der Kanäle resultiert. Daher ist es nötig, dass der durch den Calciumioneneinstrom verursachten Depolarisation entgegengewirkt wird. Zudem soll ebenfalls die treibende elektrochemische Kraft für den Calciumioneneinstrom nicht versiegen. Die Repolarisation wird von den Zellen durch das Ausschleusen von Kaliumionen erzeugt. Hierzu besitzt die Zelle zwei Kaliumkanäle (CAHALAN UND CHANDY, 1997). Der spannungsabhängige Kv1.3-Kanal wird durch die Depolarisation aktiviert, wohingegen der IKCa1-Kanal durch die hohe Calciumionenkonzentration geöffnet wird. Durch diese beiden Kanäle wird eine für die Proliferation nötige hohe Konzentration an Calciumionen gewährleistet.

Alle durch die Calciumionen getriggerten Kaskaden führen über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und die Produktion von T-Zellwachstumsfaktoren (z. B. IL-2) schließlich zur T-Zellproliferation.

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass aus der Blockade der Kaliumkanäle Kv1.3 und IKCa1, die es durch das Ausschleusen von Kaliumionen möglich machen, die benötigte hohe Calciumionenkonzentration aufrechtzuerhalten, eine Inhibition der T-Zellproliferation resultiert. So bewiesen JENSEN ET AL., dass z. B. durch Clotrimazol der IKCa1-Kanal blockiert und die T-Zellproliferation dadurch unterbunden wird (JENSEN ET AL., 1999). Für den Kv1.3-Kanal wurde gezeigt, dass Blocker dieses Kanals in der La-

1. Einleitung

ge waren, die Symptome der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis), die ein Tiermodell der Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose (MS) darstellt, zu verbessern (BEETON ET AL., 2001a und 2001b). Zudem wurde entdeckt, dass der Kv1.3-Kanal sehr stark in entzündlichen Bereichen des Gehirns von Personen, die an MS erkrankt sind, exprimiert ist (RUS ET AL., 2005). Erst kürzlich berichteten BEETON ET AL., dass bei den Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1 und der rheumatoiden Arthritis, die T-Zell-vermittelt sind, der Kv1.3-Kanal eine therapeutische Zielstruktur darstellt (BEETON ET AL., 2006). Es können also Substanzen, die diese beiden Kanäle blockieren als potentielle Immunsuppressiva angesehen werden.

1.2.2.4. Kanalexpression auf T-Lymphozyten

WULFF ET AL. untersuchten die Kaliumkanalexpression an verschiedenen T-Zell-Typen (WULFF ET AL., 2003a). Dabei stellten sie fest, dass der Kanalbesatz je nach Zelltyp und Aktivierungszustand variierte (Abbildung 1.4). Im ruhenden Zustand wiesen alle drei untersuchten Zelltypen ungefähr den gleichen Kanalbesatz auf, der sich jedoch durch Aktivierung veränderte. Sowohl die naiven T-Zellen als auch die T_{CM} -Zellen erwiesen sich als sogenannte $IKCa1^{high}Kv1.3^{low}$ -Zellen. Das bedeutet, dass diese Zellen durch die Aktivierung die Anzahl der IKCa1-Kanäle deutlich hoch regulierten, während die Zahl der Kv1.3-Kanäle nur verhältnismäßig geringfügig anstieg. Bei den T_{EM} -Zellen ließ sich genau das Gegenteil beobachten. Wobei das Verhältnis hier besonders zugunsten des Kv1.3-Kanals verschoben war. Die T_{EM} -Zellen werden als $Kv1.3^{high}IKCa1^{low}$ -Zellen bezeichnet. Die T_{EM} -Zellen sind an der Pathogenese der Autoimmunerkrankungen beteiligt (Kapitel 1.2.2.2.1). Aufgrund der Unterschiede in der Kanalexpression wird deutlich, dass eine Blockade der Kv1.3-Kanäle besonders in Bezug auf die Behandlung von Autoimmunerkrankungen von großer Bedeutung ist.

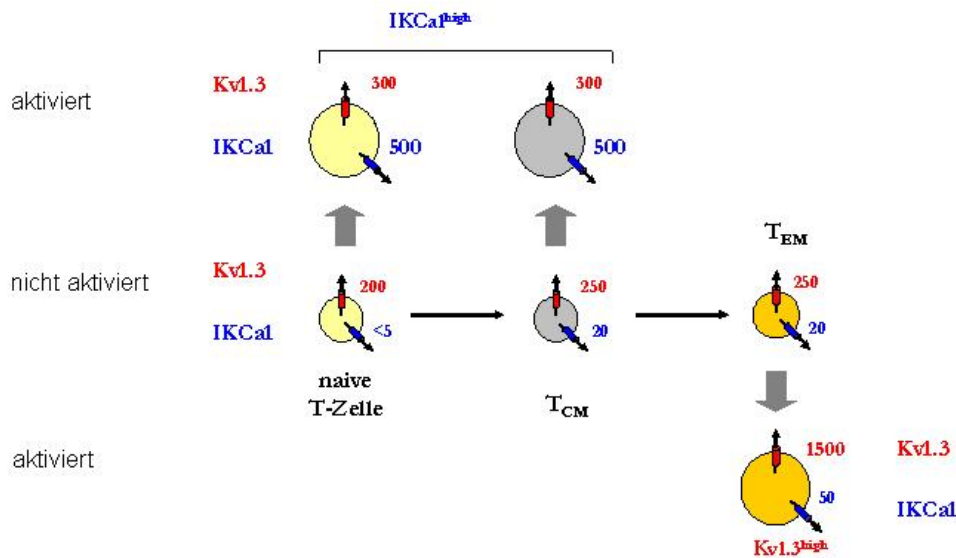


Abbildung 1.4: Kanalexpressionsveränderung verschiedener T-Lymphozyten-Typen durch Aktivierung (nach WULFF ET AL., 2003a): Die Zahlen geben die Anzahl der Kanäle pro Zelle einer repräsentativen Zellpopulation wieder. Waagerechte Pfeile: Differenzierung, senkrechte Pfeile: Aktivierung, IKCa = Calciumabhängiger Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit, Kv1.3 = Spannungsabhängiger Kaliumkanal 1.3, T_{CM} = *central memory T cell* (zentrale T-Gedächtniszelle), T_{EM} = *effector memory T cell* (Effektor-T-Gedächtniszelle)

1.3. Autoimmunerkrankungen

Das Immunsystem (Kapitel 1.2) ist ein sehr komplexes System zum Schutz vor Angriffen von außen (z. B. Bakterien und Viren) oder von innen (z. B. entartete Zellen). Es setzt sich aus humoralen und zellulären Bestandteilen zusammen. Durch das Immunsystem ist es dem Körper möglich, zwischen unterschiedlichen Antigenen zu unterscheiden. Hierzu stellt der Körper eine Vielzahl von Antigen-Rezeptoren her, wobei zum Teil auch solche Antigen-Rezeptoren entstehen, die sich gegen körpereigene Strukturen richten. Bei der Reifung der Lymphozyten werden die Zellen, die diese autoreaktiven Antigen-Rezeptoren tragen, weitest-

1. Einleitung

gehend eliminiert. Ein paar wenigen Zellen gelingt es jedoch, dieser Elimination zu entkommen. Diese „autoreaktiven“ Zellen werden aber bei gesunden Menschen durch bestimmte Mechanismen daran gehindert, an körpereigene Zellen zu binden. Man geht davon aus, dass durch bestimmte genetische Prädispositionen in Kombination mit äußeren Einflüssen, z. B. Viren, diese Kontrollmechanismen gestört werden. Als ein Grund für das Versagen dieser Kontrollmechanismen wird diskutiert, dass durch den Kontakt mit einem Erreger, der zufälligerweise einen körpereigenen Merkmalen sehr ähnliche Antigen-Struktur aufweist, die „autoreaktiven“ Zellen vermehrt aktiviert werden. Sie beginnen zu proliferieren und können in der Folge wieder auf körpereigene Antigene reagieren, wodurch sich eine Autoimmunerkrankung entwickelt. Autoimmunerkrankungen stellen also Krankheiten dar, bei denen das Immunsystem sich gegen körpereigene Strukturen richtet. Dabei kann sich dieser Angriff auf ein Organ bzw. Gewebe beschränken oder große Teile des Organismus betreffen (systemisch). Zu den heute wichtigsten Autoimmunerkrankungen zählen z. B. die rheumatoide Arthritis, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, der Typ-I-Diabetes mellitus, die Multiple Sklerose, die Myasthenia gravis und der systemische Lupus erythematoses.

1.4. Bekannte Immunsuppressiva

Obwohl das Immunsystem für ein Überleben unerlässlich ist, kann es manchmal nötig sein, dass man die Immunabwehr ausschaltet bzw. schwächt. Dieses ist unter anderem bei Autoimmunerkrankungen der Fall. Zudem unterdrückt man die Immunantwort zur Verhinderung einer Abstoßungsreaktion nach Organtransplantationen, bei allergischen Reaktionen sowie bei chronisch entzündlichen Erkrankungen. Diese Unterdrückung der Immunabwehr wird durch immunsuppressive Medikamente, sogenannte Immunsuppressiva, erreicht. Die bisher bekannten eingesetzten Immunsuppressiva lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen, wobei eine Vielzahl die Signaltransduktion in den T-Lymphozyten beeinflusst.

1.4.1. Glucocorticoide

Die Effekte von Glucocorticoiden (z. B. Cortisol) auf die Immunzellen sind sehr komplex. So werden neben der Hemmung des Wachstums und der Proliferation von T-Zellen, beispielsweise auch die Antikörperproduktion supprimiert und die Apoptose von Fresszellen und B-Zellen stimuliert. Durch die Bindung der Glucocorticoide an intrazelluläre Rezeptoren bildet sich ein Glucocorticoid-Rezeptor-Komplex aus, der in den Zellkern wandert und dort die Transkription vieler proinflammatorischer Gene beeinflusst. Die Produktion von Entzündungsmediatoren (z. B. Leukotriene, Prostaglandine), aber auch von Proliferationsmediatoren (z. B. Interleukin-2) werden unterdrückt. Aufgrund dieser komplexen Wirkung werden aber auch viele Nebenwirkungen verursacht (z. B. Gewichtszunahme, diabetische Effekte, Osteoporose).

1.4.2. Hemmstoffe der DNA-Biosynthese

Zu dieser Stoffgruppe gehören unter anderem Stoffe, die ein zytostatisches Potential aufweisen, wie Antimetabolite. Hierzu zählt das Methotrexat, das als Folat-Antagonist kompetitiv die Dihydrofolat-Reduktase hemmt. Es greift somit in den C-1-Stoffwechsel ein und wirkt dadurch antiproliferativ und immunsuppressiv. Ein weiterer Antimetabolit ist das Azathioprin, ein Purin-Analogon, das ebenfalls die DNA-Biosynthese hemmt und dadurch auch antiproliferative und immunsuppressive Wirkungen zeigt. Ferner zählt das Cyclophosphamid zu dieser Gruppe. Es ist allerdings kein Antimetabolit, sondern weist alkylierende Eigenschaften auf und unterbindet somit auch die DNA-Synthese und wirkt letztlich immunsuppressiv. Der Nachteil dieser Stoffgruppe ist, dass sie alle schnell proliferierenden Zellen beeinflusst, also neben den Immunzellen, die für eine gute Immunkompetenz eine hohe Teilungsrate aufweisen müssen, z. B. auch die Schleimhautzellen des Magen-Darm-Traktes sowie die Haarfollikel. Hieraus ergeben sich Nebenwirkungen wie Durchfall und Haarausfall.

1. Einleitung

1.4.3. Substanzen mit Wirkung auf Lymphozyten

Zu dieser Gruppe zählen z. B. Ciclosporin A (CsA), Tacrolimus (FK506) und Rapamycin (RAP, Sirolimus). Die aus Mikroorganismen isolierten Verbindungen greifen in die Signaltransduktion der Lymphozyten ein. Ciclosporin A und Tacrolimus inhibieren dabei die T-Zellaktivierung durch Hemmung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin. Rapamycin bindet an die Proteinkinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) und verhindert dadurch die Aktivierung einer weiteren Kinase (p70-S6), die normalerweise eine Translationskontrolle ausübt. Alle drei Verbindungen unterdrücken letztendlich die Produktion von Interleukin-2 und damit die T-Zellproliferation. Sie weisen ein etwas günstigeres Nebenwirkungsprofil als die beiden ersten Gruppen auf. Allerdings sind Ciclosporin A und Tacrolimus stark nephrotoxisch. Bei Rapamycin kann es zu Blutbildungsstörungen kommen.

Ebenfalls zu dieser Gruppe gehören proteinogene Wirkstoffe. Als ein Beispiel sei hier ein monoklonaler Antikörper, Muromomab-CD3, genannt. Dieser bindet sich gezielt an die CD3-Untereinheit des T-Zell-Rezeptors, wodurch die Antigenerkennung nicht mehr funktioniert und die Signaltransduktionskaskade blockiert wird. Zudem werden die T-Zellen durch Muromomab-CD3 markiert und innerhalb kürzester Zeit abgetötet. Basiliximab ist ein weiterer eingesetzter Antikörper. Er richtet sich gegen CD25 und damit gegen den IL-2-Rezeptor. Natalizumab, das seit August 2006 von der Europäischen Zulassungsbehörde (*European Medicines Agency*, EMA) zur Behandlung der Multiplen Sklerose zugelassen ist, hemmt den Übertritt von Leukozyten ins Gewebe und bremst somit lokale Entzündungsreaktionen (WIENDL, 2006). Es werden viele weitere proteinogene Stoffe eingesetzt, wobei häufig der genaue Wirkmechanismus unbekannt ist (z. B. Glatirameracetat und β -Interferone). Aufgrund von teilweise körperfremden Eiweißen können unter anderem allergische Reaktionen als Nebenwirkungen auftreten.

1.5. Kaliumkanalblocker als Immunsuppressiva

Allen in Kapitel 1.4 genannten Immunsuppressiva ist gemein, dass sie ein sehr breites Wirkungsspektrum haben, das gesamte Immunsystem stark einschränken und viele unerwünschte Nebenwirkungen verursachen. Daher wird ständig nach weiteren selektiveren und damit nebenwirkungsärmeren Therapiemöglichkeiten auf dem Gebiet der Immunsuppression gesucht. Da, wie in Kapitel 1.2.2.3 beschrieben, den Kaliumkanälen bei der Aktivierung der T-Lymphozyten, den Hauptfaktoren der adaptiven zellulären Immunabwehr, eine entscheidende Rolle zukommt und da je nach Aktivitätszustand der T-Lymphozyten die Kaliumkanäle in unterschiedlichem Maße exprimiert sind, lässt sich durch Kaliumkanalblocker eine selektivere Immunsuppression erhoffen. So können z. B. die bei Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose besonders aktiven T_{EM} -Zellen aufgrund ihrer starken Expression der Kv1.3-Kanäle effektiv durch einen Kv1.3-Kanalblocker gehemmt werden (WULFF ET AL., 2003b), ohne die Funktion anderer Immunzellen, deren Kv1.3-Kanalexpression deutlich geringer ist, sonderlich zu beeinträchtigen.

1.5.1. Bekannte Kv1.3-Blocker

Die Kv1.3-Kaliumkanalblocker lassen sich in peptidische und nicht-peptidische Substanzen einteilen. Die peptidischen Substanzen werden auch als Toxine bezeichnet und sind bevorzugt aus kurzen Peptidketten aufgebaut. Diese bestehen aus weniger als 70 Aminosäuren und werden durch viele Disulfidbrücken stabilisiert. Als erste peptidische den Kaliumkanal Kv1.3 blockierende Substanz wurde in den frühen 80iger Jahren das aus dem Skorpiongift von *Leiurus quinquestriatus hebraeus* isolierte Charybdotoxin (ChTX) entdeckt (SANDS ET AL., 1989 und LEONARD ET AL., 1992). Es blockiert den Kv1.3-Kanal in einer EC_{50} -Konzentration von 3 nM (GRISSMER ET AL., 1994). In der Folge wurden weitere Skorpiontoxine isoliert, wie z. B. Margatoxin (MgTX,

1. Einleitung

$EC_{50} = 110 \text{ pM}$,GARCIA-CALVO ET AL., 1993 und GHANSHANI ET AL., 2000), Hongotoxin (HgTX1, $EC_{50} = 86 \text{ pM}$, KOSCHAK ET AL., 1998) und Anuroctoxin ($EC_{50} = 730 \text{ pM}$, BAGDANY ET AL., 2005). Diese Skorpiongifte sind zwar sehr potente, aber dafür recht unselektive Kv1.3-Blocker. Lediglich ein Toxin, das OSK1-K¹⁶D²⁰ ($EC_{50} = 3 \text{ pM}$), weist eine sehr hohe Selektivität (> 300 -fach) gegenüber anderen nahe verwandten Kanälen auf (MOUHAT ET AL., 2005). Neben den Skorpiongiften sind noch Toxine aus Schlangen, Kegelschnecken und Seeanemonen bekannt. So wurde z. B. Mitte der 90iger Jahre aus der Seeanemone *Stichodactyla helianthus* das Toxin ShK isoliert ($EC_{50} = 11 \text{ pM}$, PENNINGTON ET AL., 1996 und KALMAN ET AL., 1998). Auch bei diesem Toxin war die Selektivität gegenüber dem Kv1.3-verwandten Kanälen eher gering, so dass zu einer Selektivitätssteigerung weitere Strukturveränderungen vorgenommen wurden. Daraus ergaben sich Toxine wie das ShK-Dap²², das in Position 22 der Aminosäurekette anstelle von Lysin die Diaminopropionsäure aufweist ($EC_{50} = 23 \text{ pM}$, KALMAN ET AL., 1998). 2005 wurde von BEETON ET AL. zudem mit dem ShK(L5) ein weiteres ShK-Derivat mit mindestens 100-facher Selektivität gegenüber anderen Kaliumkanälen hergestellt (BEETON ET AL., 2005). Die Kanalblockade aller dieser Toxine wird durch einen Verschluss der Pore vom Extrazellularraum ausgehend verursacht, wobei die Toxine die Poren wie ein Flaschenkorken verschließen. Peptidische Wirkstoffe sind als Arzneistoffe nicht ganz unproblematisch, da ihre Isolierung bisweilen sehr aufwendig und kostspielig sein kann. Zudem müssen sie aufgrund ihrer geringen Stabilität und der damit einhergehenden Gefahr der Denaturierung, z. B. durch die Magensäure, parenteral verabreicht werden. Des Weiteren können durch körperfremde Proteinstrukturen allergische Reaktionen verursacht werden. Aus diesen Gründen wurde neben der Entwicklung peptidischer Stoffe gleichzeitig auch die der nicht-peptidischen Substanzen betrieben. Als nicht-peptidische kaliumkanalblockierende Wirkstoffe wurden bereits in den Anfängen der 80iger Jahre das 4-Aminopyridin (4-AP, $EC_{50} = 195 \text{ } \mu\text{M}$) und das Tetraethylammonium (TEA, $EC_{50} = 10 \text{ mM}$, GRISSMER ET AL., 1994)

1.5. Kaliumkanalblocker als Immunsuppressiva

entdeckt. Beide waren aber sehr unselektiv und blockierten eine Reihe anderer Kanäle. Daneben stellte man für einige Calciumkanalblocker ebenfalls eine Kv1.3-kanalblockierende Wirkung fest (z. B. Diltiazem ($EC_{50} = 27 \mu\text{M}$) und Nifedipin ($EC_{50} = 5 \mu\text{M}$), GRISSMER ET AL., 1994). Mithilfe umfangreicher *Screening*-Methoden wurden Mitte der 90iger Jahre relativ einfach aufgebaute, niedermolekulare, stickstoff- und halogenhaltige Verbindungen synthetisiert. Zu dieser Gruppe gehören die Dihydrochinoline WIN-17317-3 (HILL ET AL., 1995) und CP-339818 (NGUYEN ET AL., 1996). Sie weisen beide EC_{50} -Werte im nanomolaren Konzentrationsbereich (335 nM bzw. 230 nM) auf. Allerdings ist ihre Selektivität eher gering. So stellt WIN-17317-3 einen hochpotenten Natriumkanalblocker dar, der zudem den neuronalen und kardialen Kv1.4-Kanal inhibiert ($EC_{50} = 300 \text{ nM}$, WANNER ET AL., 1999). Dieser Kv1.4-Kanal wird auch mit nahezu der gleichen Potenz wie am Kv1.3-Kanal vom CP-339818 gehemmt ($EC_{50} = 300 \text{ nM}$, NGUYEN ET AL., 1996). Das ebenfalls durch ein *high-throughput-Screening* entdeckte Piperidin-Derivat UK-78282 blockiert den Kv1.3-Kanal mit einer EC_{50} von ungefähr 280 nM und hat dabei wie die Dihydrochinoline auch den Nachteil der geringen Selektivität gegenüber dem Kv1.4-Kanal ($EC_{50} = 170 \text{ nM}$, HANSON ET AL., 1999 und CHANDY ET AL., 2006). Eine weitere entwickelte Substanzklasse ist die der cyclohexylsubstituierten Benzamide. Die Grundverbindung, das 4-Phenyl-4-[3-(2-methoxyphenyl)-3-oxo-2-azaprop-1-yl]cyclohexanon (PAC), wirkt in einer EC_{50} -Konzentration von 270 nM am Kv1.3-Kanal (SCHMALHOFER ET AL., 2002). Durch Derivatisierung konnte die Wirksamkeit weiter gesteigert werden (*trans*-*N*-Propyl-carbamoyloxy-PAC, $EC_{50} = 29 \text{ nM}$). Allerdings mangelt es auch dieser Verbindung an der angestrebten Selektivität, z. B. gegenüber anderen *Shaker*-Kanälen wie Kv1.1 und Kv1.2. Die in Patenten beschriebenen Verbindungen Sulfimidbenzamidoindan ($EC_{50} = 100 \text{ nM}$, CASTLE ET AL., 2000 und BAKER ET AL., 2000) und Dichlorophenylpyrazolopyrimidin (ATWAL ET AL., 2001) sind hingegen deutlich selektiver gegenüber den meisten Kaliumkanälen. Einen weiteren Blocker mit Sulfonamidstruktur stellt das H-89 dar, das den Kv1.3 mit einer EC_{50} von $1,7 \mu\text{M}$ blockiert.

1. Einleitung

Die Correolide-, Khellinon- und Furocumarin-Derivate sind aus Naturprodukten isolierte und abgewandelte Substanzen. Sie weisen im Vergleich zu den vorher beschriebenen Blockern in ihrem Grundkörper viele Sauerstoffatome und im Falle der Correolide-Derivate ebenfalls eine komplexe stereochemische Struktur auf. Das pentacyclische Nortriterpen Correloide wurde aus der Rinde und den Wurzeln des Baumes *Spachea correa* gewonnen und blockiert den Kv1.3-Kanal mit einer EC₅₀-Konzentration von 86 nM. Zudem ist es gegenüber anderen Kanälen, z. B. den nahe verwandten Mitgliedern der Kv1-Subfamilien, 4-14-fach selektiv (FELIX ET AL., 1999). Durch Entfernung des E-Rings konnte die Wirksamkeit noch gesteigert werden (C18-Analogon 43, EC₅₀ = 37 nM, BAO ET AL., 2005). Das Correloide bindet in der Pore und blockiert so den Kanal (HANNER ET AL., 2001). In neuesten Untersuchungen konnte nun gezeigt werden, wie diese eher paradoxe Bindung des durch die vielen Sauerstoffe nukleophilen Correloides mit der vorwiegend hydrophoben Porenregion vermutlich zustande kommt. So werden durch die Sauerstoffatome des Correolides die in der Porenregion gebundenen Kaliumionen (siehe Kapitel 1.1.1.1) komplexiert (BRUHOVA UND ZHOROV, 2007). Von BAELL ET AL. wurden zwei weitere Klassen von Kaliumkanalblockern hergestellt, die Khellinonchalcone und die Khellinondimere, die EC₅₀-Werte im Bereich von 300-800 nM aufweisen und mindestens dreifach selektiv gegenüber anderen Kv-Subfamilien sind (BAELL ET AL., 2004). Ausgehend von dem aus *Ruta graveolens* isolierten Furocumarin Bergapten (5-Metoxypsoralen, 5-MOP, EC₅₀ = 101 μM) wurden zahlreiche Derivate hergestellt, so z. B. das 5,8-Diethoxypsoralen, H37, mit einem EC₅₀-Wert von 10 μM (WULFF, 1998). Durch weitere Strukturvariationen konnte das Psora-4 (5-(4-Phenylbutoxy)psoralen), das den bis zu diesem Zeitpunkt potentesten nicht-peptidischen Kv1.3-Kanal-Blocker darstellte, synthetisiert werden (VENNEKAMP, 2002). Die Selektivität gegenüber anderen Kaliumkanälen war ebenfalls deutlich besser. Lediglich der Kv1.5-Kanal wurde mit nahezu gleicher Potenz (EC₅₀ = 8 nM, VENNEKAMP ET AL., 2004) blockiert. Um die „Kv1.5-Selektivität“ zu verbessern, wurden weitere Strukturvariationen vor-

1.5. Kaliumkanalblocker als Immunsuppressiva

genommen, die zum PAP-1 (5-(4-Phenoxybutoxy)psoralen) führten (SCHMITZ, 2004). Das PAP-1 zeigte neben der für die nicht-peptidischen Blocker höchsten Kv1.3-Potenz ($EC_{50} = 2 \text{ nM}$) zudem nun auch die gewünschte Selektivität gegenüber dem Kv1.5-Kanal (23-fach, SCHMITZ ET AL., 2005). In der Abbildung 1.5 sind die Strukturen von einigen der hier angesprochenen nicht-peptidischen Substanzen dargestellt. Übersichten über Kv1.3-Blocker finden sich zudem auch bei COGHLAN ET AL. (2001) und CHANDY ET AL. (2006).

1. Einleitung

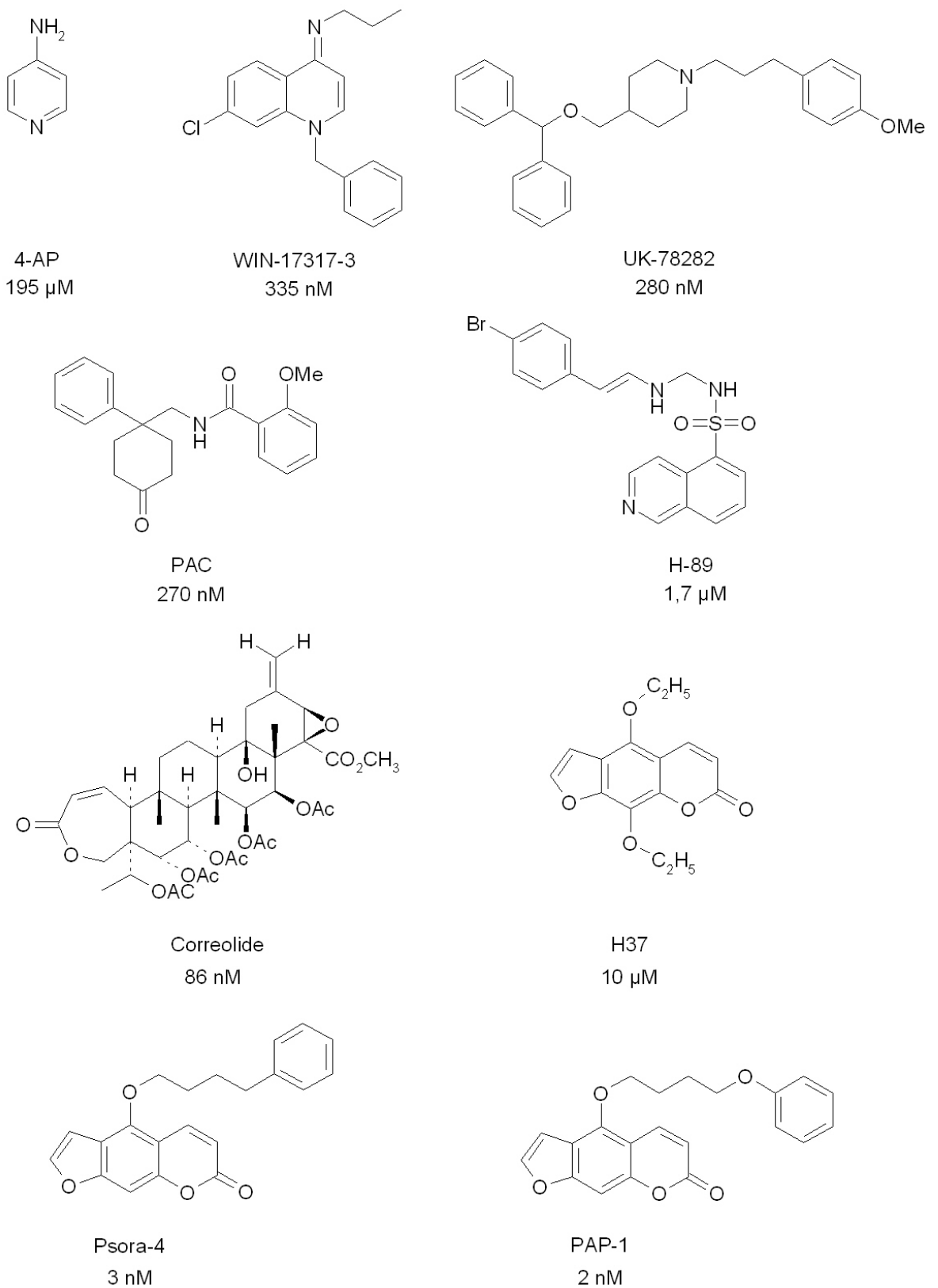


Abbildung 1.5: Strukturen ausgewählter niedermolekularer Kv1.3-Blocker unter Angabe der jeweiligen EC_{50} -Werte

2. Stand der Vorarbeiten und Zielsetzung

2.1. Stand der Vorarbeiten

2.1.1. *Ruta graveolens* - Vom Kraut zum Kv1.3-Blocker

Die Gartenraute, *Ruta graveolens* (Abbildung 2.1), war bereits im Altertum bekannt. Sie findet sich als Heilkraut unter anderem in dem von Karl dem Großen im Jahre 795 erlassenen *Capitulare de villis* und war im 16.-18. Jahrhundert fester Bestandteil von Haus- und Kräutergärten (HILLER UND MELZIG, 2000). Der Gartenraute wurden krampflösende und entzündungshemmende Wirkungen zugesprochen. Sie wurde bei Dyspepsien, Leber- und Gallenleiden, sowie bei Menstruationsbeschwerden eingesetzt. Ferner wurde sie sogar als Mittel gegen die Pest angepriesen. Im heutigen Arzneigebrauch ist die Gartenraute allerdings so gut wie verschwunden. 1989 riet die Kommission E zudem aufgrund der nicht belegten Wirksamkeit von einer Anwendung ab. Dahingegen wurden aber Ende der 80iger Jahre Berichte aus Chile bekannt, dass das regelmäßige Trinken von Gartenrautentee die Symptome der Multiplen Sklerose (MS) zu lindern vermochte. Es wurde berichtet, dass ein Haciendabesitzer, der nachweislich an MS erkrankt war und dem es nicht mehr möglich war, sich aus eigener Kraft zu bewegen, durch Gartenrautentee trinken wieder befähigt wurde, seine Hacienda zu Pferde abreiten zu können. Aufgrund dieser Berichte wurde mit der „Rutaforschung“ be-

2. Stand der Vorarbeiten und Zielsetzung

gonnen und die Gartenraute auf ihre gegen die MS wirksamen Bestandteile hin untersucht.



Abbildung 2.1: Die Gartenraute (*Ruta graveolens*, HAAKE, 2005)

2.1.1.1. Inhaltsstoffe

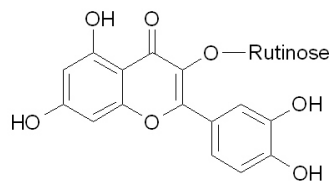
In der Gartenraute sind bisher über 200 Inhaltsstoffe gefunden worden. Zum einen handelt es sich dabei um ubiquitär in Pflanzen vorkommende Stoffe wie Gerbstoffe, Lignanderivate und Bitterstoffe, zum anderen um für die Gartenraute bzw. die Familie der Rutaceen charakteristische Inhaltsstoffe, die sich in vier Klassen einteilen lassen:

- ätherisches Öl

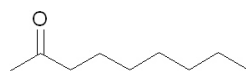
Dieses besteht zu fast 50 % aus 2-Nonanon. Weitere Bestandteile sind das 2-Undecanon sowie 2-Nonyl- und 2-Undecylacetat (CLASSEN UND KNOBLOCH, 1985 und BAUTZ, 1994). Dem intensiven Geruch des Öls verdankt die Pflanze ihren Namen (*graveolens* = schwer- bzw. übelriechend).

- Flavonoide

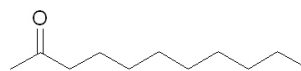
Im Jahre 1842 wurde vom Nürnberger Apotheker August Weiss erstmalig das Rutin als Pflanzeninhaltsstoff isoliert (BURGER UND WACHTER, 1993).



Rutin



2-Nonanon



2-Undecanon

Abbildung 2.2: Ausgewähltes Flavonoid (Rutin) und ausgewählte Bestandteile des ätherischen Öls aus *Ruta graveolens*

2. Stand der Vorarbeiten und Zielsetzung

- Alkaloide

Es sind über 40 verschiedene Alkaloide in der Gartenraute gefunden worden. Diese lassen sich in die zwei Untergruppen Chinoline/Furochinoline und Acridone einteilen. Zu den Chinolinen gehört z. B. das Graveolin. 1999 konnten von KOSTOVA ET AL. vier neue 2-Alkyl-1,4-dihydrochinolin-4-one isoliert werden (KOSTOVA ET AL., 1999). Skimmianin und Kokusaginin sind die Hauptvertreter der Furochinolin-Derivate (PRICE, 1963 und KONG ET AL., 1984). Als Acridon-Derivate sind zum einen die 9,10-Dihydroacridinone (z. B. Arborinin, REISCH ET AL., 1972) und zum anderen die Furanerivate (z. B. Rutacridon) enthalten.

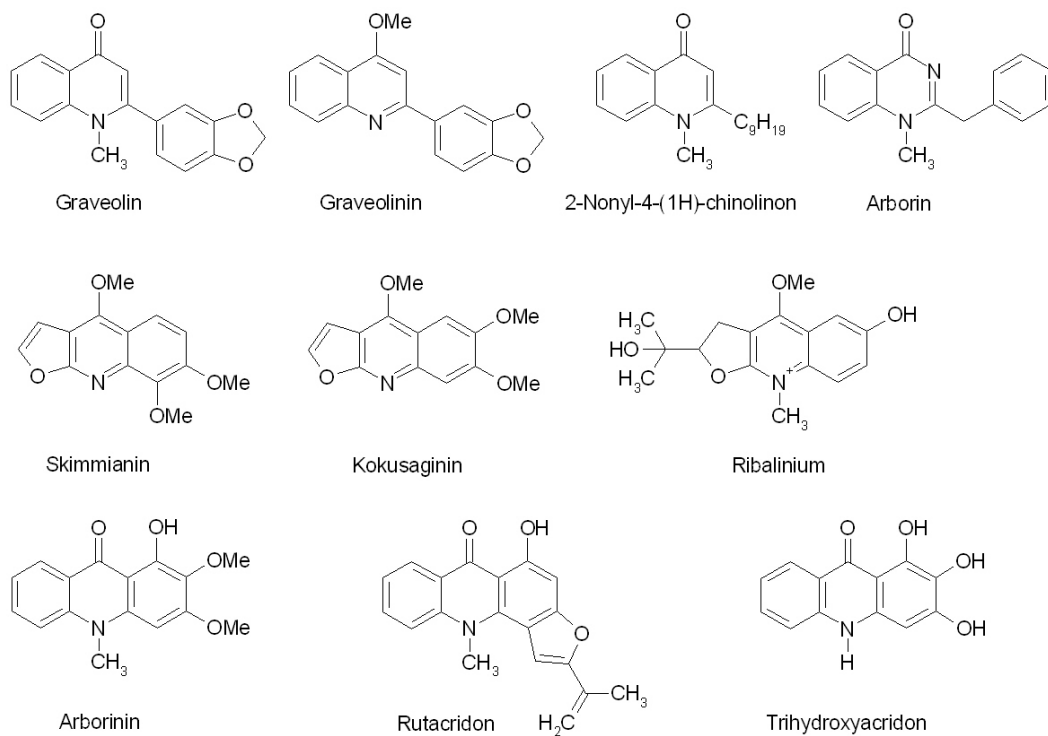


Abbildung 2.3: Ausgewählte Alkaloide aus *Ruta graveolens*

- Cumarine und Furocumarine

Diese Klasse (Übersicht bei GRAY AND WATERMAN, 1978) lässt sich in monomere (z. B. Herniarin) und dimere Cumarine (z. B. Daphnoretin, REISCH ET AL., 1968) sowie Furocumarine, Dihydrofurocumarine (z. B. Rutamarin) und Pyranocumarine (z. B. Xanthyletin, REISCH ET AL., 1969) einteilen. Die hauptsächlich vorkommenden Furocumarine sind das 5-Methoxypsoralen (5-MOP, Bergapten) und das 8-Methoxypsoralen (8-MOP, Xanthotoxin)(BRANDT, 1915).

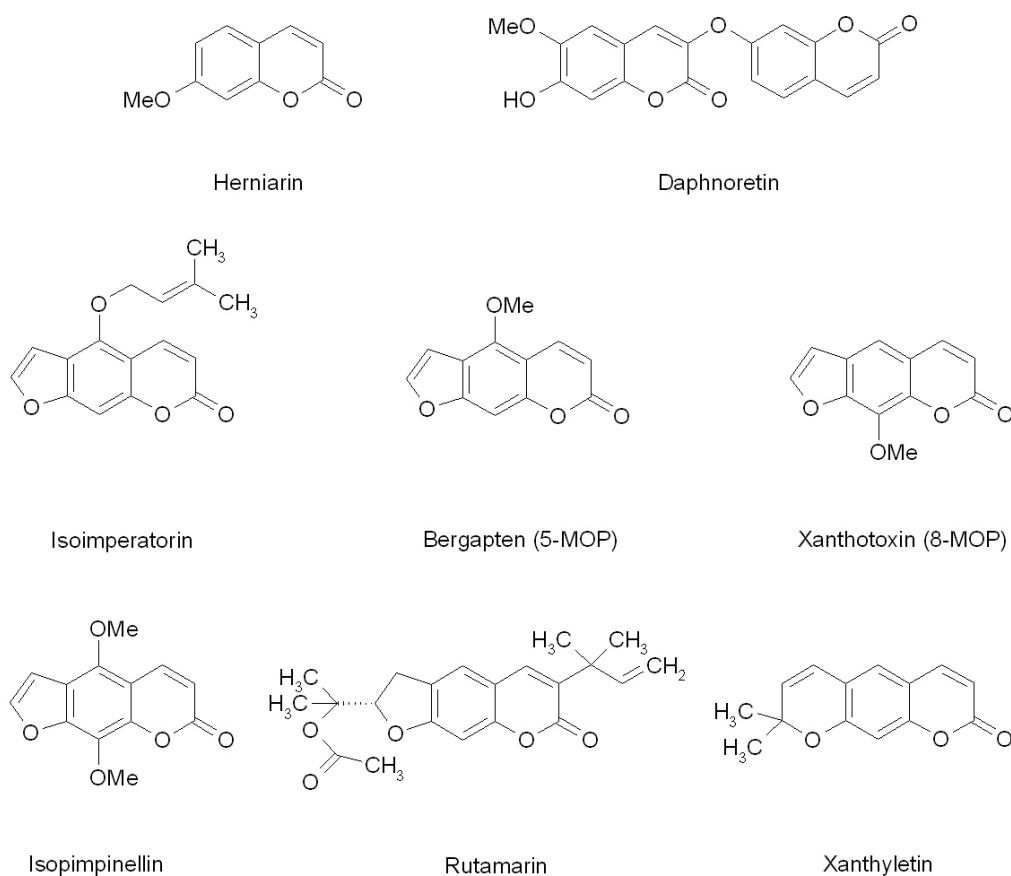


Abbildung 2.4: Ausgewählte Cumarine, Furo- und Pyranocumarine aus *Ruta graveolens*

In den Abbildungen 2.2, 2.3 und 2.4 ist nur eine Auswahl der Inhaltsstoffe der Gartenraute dargestellt. Ausführliche Angaben finden sich in zahlreichen Artikeln und Nachschlagewerken (AMEND, 1998, WATERMAN UND GRUNDON, 1983 sowie EILERT, 1994).

2. Stand der Vorarbeiten und Zielsetzung

2.1.1.1.1. Multiple Sklerose Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische, entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Sie zählt zu den Autoimmunerkrankungen (Kapitel 1.3). Dabei entstehen im zentralen Nervensystem mehrere bis viele (multiple) kleine Entzündungsherde, wodurch die Myelinscheide, die die Nervenfasern umgibt und so eine schnelle Reizleitung ermöglicht, zerstört wird und sich Narbengewebe ausbildet (Sklerose). Das verantwortliche Antigen ist das basische Myelinprotein (MBP, *myelin basic protein*). Die gegen dieses Antigen gerichteten CD4⁺-T-Zellen (Kapitel 1.2) können die Blut-Hirnschranke überwinden, so ins ZNS gelangen und dort durch Zytokin-Ausschüttung eine Reihe von Effekten hervorrufen, die letztendlich zur Schädigung der Myelinschicht führen. Die Krankheit kann schubförmig oder progredient verlaufen. Als Symptome treten unter anderem Missempfindungen, Lähmungen und Haltungstörungen sowie Seh- und Sprachstörungen auf. Die Therapie besteht zur Zeit in der Gabe von immunsuppressiven Substanzen, wie Glatirameracetat, Interferon- β und Glucocorticoiden (bei akuten Schüben)(Kapitel 1.4).

2.1.1.1.2. Verschiedene Grundkörper als Blocker Zur Zeit der Berichte aus Chile war bereits das 4-Aminopyridin als ein Kaliumkanalblocker (siehe Kapitel 1.5.1) mit positiven Wirkungen auf die Symptome der MS bekannt. Daher wurde vermutet, dass in dem Extrakt Substanzen enthalten waren, die, ähnlich dem 4-Aminopyridin, durch ihre kaliumkanalblockierenden Eigenschaften die Symptome der MS verbessern konnten. Infolgedessen sollte zunächst überprüft werden, ob die positiven Wirkungen des Gartenrautentees tatsächlich auf kaliumkanalblockierende und damit auf neurophysiologische Effekte zurückzuführen waren. Hierzu wurden die Wirkungen wässriger Extrakte der Gartenraute am Ranvierschen Schnürring intakter, myelinisierter Axone des afrikanischen Krallenfrosches, *Xenopus laevis*, untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass der Kaliumionenstrom blockiert wurde (BAUTZ ET AL., 1989). Daraufhin begann man mit der Extraktion der Gartenrauteninhaltsstoffe. Als kaliumkanalblockierende Inhaltsstoffe wurden zum einen die Furochinoline Skimmianin und

2.1. Stand der Vorarbeiten

Kokusaginin (Abb. 2.3) und zum anderen die Furocumarine Bergapten und Xanthotoxin (Abb. 2.4) identifiziert (BAUTZ, 1994).

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit dem 4-Aminopyridin synthetisierte man zudem, obwohl sie sich primär nicht als kaliumkanalblockierende Substanzen bei den Voruntersuchungen herausgestellt hatten, Derivate der in der Gartenraute enthaltenen Acridone (Kapitel 2.1.1.1, NIEMÖLLER, 1994). Diese zeigten dann auch in den Untersuchungen am Axon nur eine mäßig ausgeprägte Blockade des Kaliumionenstroms und inhibierten zusätzlich den Natriumionenstrom.

Das den Kaliumionenstrom am wirksamsten blockierende Furocumarin Bergapten, das normalerweise bei der PUVA-Therapie (Psoralen + UVA-Strahlung) der Psoriasis (Schuppenflechte) angewandt wird, wurde im Rahmen der ärztlichen Therapiefreiheit zu Einzelfallbeobachtungen eingesetzt. Es ließen sich durch die Einnahme von 0,3 mg/kg Körpergewicht Spastiken und Paresen lindern und die Gabe von Antispastika teilweise fast völlig reduzieren (BOHUSLAVIZKI ET AL., 1993, KOPPENHÖFER ET AL., 1995 und GERST, 1997). Daher beschäftigte man sich im Folgenden besonders mit den Cumarinen und den Furocumarinen sowie zum Teil auch mit den Benzofuranen. Es wurden zahlreiche Strukturvariationen sowohl des Cumarin- als auch des Furocumarinringgrundgerüsts vorgenommen (SANMANN, 1995 und WULFF, 1998). Da der Kaliumionenstrom am Axon des Krallenfrosches durch mehrere Kaliumkanäle (verschiedene *Shaker*- und *Shaw*-Subfamilien) verursacht wird, sollte durch Untersuchungen an verschiedenen homomeren, rekombinanten Kaliumkanälen untersucht werden, welche Subtypen beeinflusst wurden. Dabei stellte man fest, dass neben der Blockade der Kv1.1- und Kv1.2-Kanäle ebenfalls der Kv1.3-Kanal inhibiert wurde. Von diesem Kanal war bekannt, dass er eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der T-Lymphozyten spielt (Kapitel 1.2.2.3).

Ausgehend von Skimmianin und Kokusaginin wurden auch verschiedene Furochinolin- bzw. Chinolin- und Chinolinon-Derivate hergestellt (WACKERNAGEL, 1998). Sie zeigten teilweise ebenfalls Wirkungen am Kv1.3-Kanal, sowie kaliumionenstromerhöhende Effekte. Neben den Furochinolinen

2. Stand der Vorarbeiten und Zielsetzung

wurden bei den Untersuchungen am Krallenfroschaxon weitere Fraktionen (Dihydrofuro- und Dihydropyranochinolinone) mit kaliumkanalstimulierenden Effekten entdeckt. Um diese weiter zu untersuchen, wurden Derivate der Dihydrofuro- und Dihydropyranochinolinone hergestellt (BUTENSCHÖN, 2000) und an einer Neuroblastom-Zelllinie (N1E-115), die sowohl spannungsabhängige Natrium- als auch Kaliumkanäle aufweist, getestet. Die kaliumionenstromerhöhenden Effekte konnten bei den N1E-115-Experimenten nicht reproduziert werden. Es erwiesen sich hingegen einige Substanzen als kaliumionenstromblockierende Substanzen. Als Ursache hierfür können Unterschiede im Kanalbesatz des Krallenfroschaxons und der N1E-115-Zellen angesehen werden.

Aufgrund der doch beachtlichen Wirksamkeiten am Kv1.3-Kanal und der Tatsache, dass diesem Kanal eine entscheidende Rolle bei der T-Zellaktivierung zukommt, wurde von nun an ein anderer Weg auf der Suche nach Therapeutika für die Behandlung der MS verfolgt. Die Entwicklung der bisherigen Substanzen zielte auf eine symptomatische Behandlung durch Verbesserung der Reizweiterleitung an den demyelinisierten Axonen ab. Da Autoimmunerkrankungen wie die MS durch sogenannte autoreaktive T-Lymphozyten moduliert werden, ermöglicht die Blockade der an der Aktivierung dieser T-Lymphozyten beteiligten Kv1.3-Kanäle eine kausale Behandlung. Die bisher synthetisierten und am Axon getesteten Verbindungen wurden nun nochmals auf ihre Kv1.3-kanalblockierende Wirkung hin untersucht. Dabei ergaben sich folgende Wirksamkeiten:

Acridone	> 10 μ M	MÖLLER (2000)
Furochinolin- bzw. Chinolin- und Chinolinon-Derivate	> 50 μ M	WACKERNAGEL (1998)
Dihydrofuro- und Dihydropyranochinolinone	> 5 μ M	BUTENSCHÖN (2000)
Cumarine	> 5 μ M	HERZOG (2000)
Furocumarine	> 10 μ M	WULFF (1998)

2.1.1.1.3. Furocumarinringgrundgerüst als Blocker Aufgrund der Tatsache, dass sich die Fraktionen des wässrigen *Ruta*-Extraktes, die die Furocumarine (Psoralene) enthielten, in den Testungen am Krallenfroschaxon als besonders wirksam erwiesen, wurden in der Folge verstärkt Furocumarin-Derivate synthetisiert (Grundkörperstruktur siehe Abbildung 2.5). Mit Hilfe dieser großen Vielzahl an Substanzen war es möglich, einige Rückschlüsse auf die zur Blockade des Kv1.3-Kanals benötigte Struktur zu ziehen. So hatte sich herausgestellt, dass eine Substitution mit Alkoxygruppen in Position 5 höhere Blockadepotenzen bewirkte als in Position 8 und lipophilere Substituenten ebenfalls die Wirksamkeit gegenüber hydrophileren steigerten.

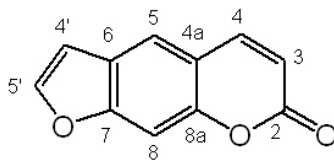


Abbildung 2.5: Struktur des Furocumarin-Grundkörpers mit der üblichen medizinisch-chemischen Nummerierung der Atome

Diese Struktur-Wirkungsbeziehungen dienten als Grundlage für weitere Strukturoptimierungen, um potentere und selektivere Verbindungen herzustellen. So wurde das Psora-4 (5-(4-Phenylbutoxy)psoralen) entwickelt, das als erster niedermolekularer, nicht-peptidischer Blocker einen EC_{50} -Wert im einstellig nanomolaren Bereich (3 nM) aufwies (VENNEKAMP, 2002). Es hatte sich dabei gezeigt, dass die Länge eines Spacers, der aus vier Methylen-Gruppen besteht, einen optimalen Abstand zwischen zwei elektronenreichen Systemen schafft. Die Selektivität der Verbindung war, außer in Bezug auf den Kv1.5-Kanal ($EC_{50} = 7,7$ nM), ebenfalls zufriedenstellend. Allerdings resultierte eine recht hohe Lipophilie ($\log P = 4,33$). Um die Selektivität gegenüber dem Kv1.5-Kanal noch zu steigern und die Lipophilie zu senken, wurde die Struktur des Psora-4 weiter variiert. Es wurden Variationen in der Seitenkette durchgeführt, dabei stellte sich die Einführung eines zusätzlichen Sauerstoffs, ohne weitere Veränderungen an der Struktur vorzunehmen,

2. Stand der Vorarbeiten und Zielsetzung

als optimal heraus. Es wurde ein EC_{50} -Wert von 2 nM ermittelt (SCHMITZ, 2004). Die Selektivität gegenüber dem Kv1.5-Kanal konnte im Vergleich zu dem Psora-4 vom Dreifachen auf das 23-fache erhöht, so wie die Lipophilie ($\log P = 4,06$) gesenkt werden. Durch die vorgenommenen Derivatisierungen konnte also letztendlich eine Wirkungssteigerung um den Faktor 50000 von 101 μ M der Ausgangsverbindung 5-MOP auf 2 nM des PAP-1 erreicht werden.

2.2. Zielsetzung

In vorangegangenen Untersuchungen wurden die Inhaltsstoffe der Gartenraute, wie bereits in Kapitel 2.1 angesprochen, auf ihre Wirksamkeit am spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.3 getestet. Als bestwirksame und selektivste Verbindung entwickelte SCHMITZ das 5-(4-Phenoxybutoxy)psoralen (PAP-1) (SCHMITZ, 2004). Beim Bergapten (5-Methoxypsoralen, 5-MOP), das die Ausgangsverbindung für die Entwicklung des PAP-1 darstellte, wurde ein EC_{50} -Wert von $101 \mu\text{M}$ gemessen. Beim PAP-1 hingegen ergab sich ein Wert von 2 nM . Folglich konnte durch die Einführung der 4-Phenoxybutyl-Seitenkette die Wirksamkeit sehr deutlich, um den Faktor 50000, erhöht werden. Aufgrund dieser Ergebnisse sollte nun im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, inwiefern die Einführung dieser 4-Phenoxybutyl-Seitenkette die Wirksamkeit anderer vielversprechender in der Gartenraute enthaltener Grundkörper zu beeinflussen vermag. Zusätzlich zu den in der Gartenraute vorkommenden Grundkörpern wurden noch einige weitere Grundkörper mit der PAP-1-Seitenkette versehen, um mehr Informationen über die für eine Wirkung am Kv1.3-Kanal benötigte Struktur des Grundkörpers zu erhalten.

Ein weiterer Aspekt, der untersucht werden sollte, war die Selektivität der synthetisierten 4-Phenoxybutoxy-Derivate. Dazu wurden vergleichende Blockadestudien am Kv1.3- und Kv1.5-Kanal durchgeführt.

Neben der Selektivität eines potentiellen Arzneistoffs sind auch seine pharmakokinetischen Eigenschaften von großer Bedeutung. Als ein diese pharmakokinetischen Eigenschaften beeinflussender, wichtiger physikochemischer Parameter wurde die Lipophilie der getesteten Verbindungen bestimmt.

3. Synthese und Strukturen der untersuchten Verbindungen

3.1. Syntheseplanung

Wie bereits in Kapitel 2.2 erwähnt, sollten verschiedene Grundkörper der Inhaltsstoffe von *Ruta graveolens*, der Gartenraute, mit dem Alkylanz 4-Phenoxybutylbromid umgesetzt werden, um festzustellen, ob daraus eine ähnliche Steigerung der Blockadepotenz am Kv1.3-Kanal wie bei dem 5-(4-Phenoxybutoxy)psoralen (PAP-1) resultiert. Zudem wurden einige weitere Grundkörper substituiert, um in Hinblick auf Struktur-Wirkungsbeziehungen möglichst viele Informationen sammeln und so Rückschlüsse auf die für eine Kv1.3-Blockade benötigte Struktur des Grundkörpers ziehen zu können. Damit die Seitenkette wie beim PAP-1 über einen Sauerstoff mit dem Grundkörper verbunden ist, sollte das Phenoxybutylbromid möglichst mit aliphatischen oder phenolischen Alkoholen umgesetzt werden. Zur Vereinfachung wird im Folgenden generell von Alkoholen gesprochen, wobei sowohl aliphatische Alkohole als auch Phenole darunter zu verstehen sind.

3.2. Darstellung der einzelnen Verbindungen

Die hier in der Arbeit dargestellten Substanzen wurden über unterschiedliche Synthesesequenzen gewonnen. Eine Reihe von Alkoholen, die teilweise die Grundkörper der Gartenrauteninhaltsstoffe aufwiesen, konnten direkt käuflich erworben

3.2. Darstellung der einzelnen Verbindungen

und in nur einem Schritt zu den gewünschten Verbindungen umgesetzt werden (Abb. 3.1, Tab. 3.1 und Abb. 3.2). Zum Teil waren nur Methoxyverbindungen erhältlich, die vor der Alkylierung mit dem 4-Phenoxybutylbromid zuerst demethyliert werden mussten, um zu den Zielstrukturen gelangen zu können (Abb. 3.3 und Tab. 3.2).

Für die Verbindungen **33** und **34** wurden als Ausgangssubstanzen die Furochinoline Skimmianin (4,7,8-Trimethoxyfuro[2,3-*b*]chinolin, **23**) und Kokusaginin (4,6,7-Trimethoxyfuro[2,3-*b*]chinolin, **24**) (Methoxyverbindungen) aus *Ruta graveolens*, der Gartenraute, isoliert, da sie nicht kommerziell zu erwerben waren, eine Umsetzung dieser Furochinoline aber von großem Interesse war (siehe Kapitel 2.1). Die Isolierung erfolgte nach MÖLLER in Anlehnung an OHTA ET AL. (MÖLLER, 2000 und OHTA ET AL., 1960). Genaue Angaben zur Durchführung finden sich in Kapitel 7.2.

Bei einigen Verbindungen mussten zudem die Grundkörper erst synthetisch aufgebaut werden (Abb. 3.4-3.6).

In den Abbildungen 3.1 bis 3.6 sind die durchgeführten Synthesesequenzen dargestellt. Wie aus diesen Abbildungen ersichtlich, ist allen Synthesen der mit **a** bezeichnete Schritt, die Alkylierung, gemeinsam. Dabei wurden in einer der Williamson-Ether-Synthese analogen Reaktion die Alkohole mit dem 4-Phenoxybutylbromid entweder unter Zusatz von Kaliumcarbonat/Kaliumiodid in Aceton oder *N,N*-Dimethylformamid (DMF) bzw. unter Zusatz von Cäsiumfluorid-Celit in Acetonitril umgesetzt. Lagen Methoxyverbindungen als Ausgangssubstanzen vor, musste der Alkylierung (**a**) eine Demethylierung (**b**) vorangehen. Dazu wurden die Methoxyverbindungen entweder unter Rückfluss mit konzentrierter Salzsäure erhitzt oder mit Hilfe der Lewisäure Bortribromid desalkyliert. Die mit **c-m** bezeichneten Syntheseschritte beschreiben die Darstellung der Grundkörper. Zum einen wurden Alkohole (Verbindungen **41** und **44**) erhalten, die direkt der Ether-Synthese (**a**) zugänglich waren, zum anderen resultierten Methoxyverbindungen (Verbindungen **49**, **54**, **55**, **58** und **62**), die

3. Synthese und Strukturen der untersuchten Verbindungen

zunächst demethyliert (**b**) werden mussten, um dann abschließend alkyliert (**a**) werden zu können.

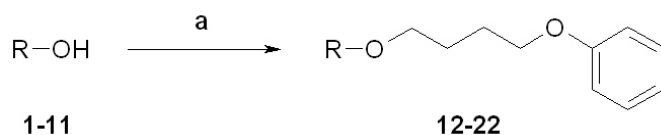
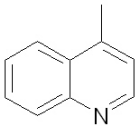
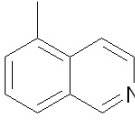
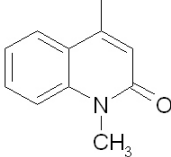
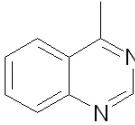
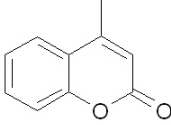
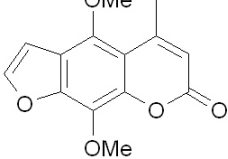
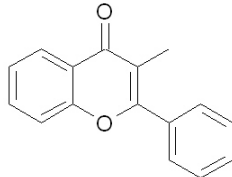
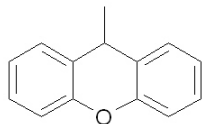
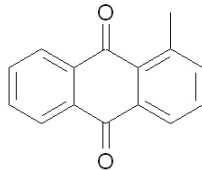
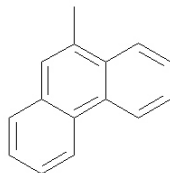


Abbildung 3.1: Alkylierung der Alkohole; a: 4-Phenoxybutylbromid, CsF-Celit, CH₃CN/RF bzw. 4-Phenoxybutylbromid, K₂CO₃/KI, Aceton oder DMF/RF

Tabelle 3.1: Strukturen von R und Nummern der kommerziell erhältlichen Alkohole sowie die daraus resultierenden Endverbindungen

R	Nummer des Alkohols	Nummer der resultierenden Endverbindung
	1	12
	2	13
	3	14
	4	15
	5	16
	6	17

3.2. Darstellung der einzelnen Verbindungen

R	Nummer des Alkohols	Nummer der resultierenden Endverbindung
	7	18
	8	19
	9	20
	10	21

Bei der Synthese der Verbindung **22** war davon auszugehen, dass das Edukt, 9-Hydroxy-4-methoxyacridin, in zwei tautomeren Formen vorlag (Abb. 3.2). Infolgedessen und aufgrund der Tatsache, dass in der Literatur die CsF-Celit-Methode neben der *O*-Alkylierung ebenfalls für *N*-Alkylierungen eingesetzt wird (z. B. HAYAT ET AL., 2001), wurde erwartet, dass sich neben der *O*-alkylierten Verbindung ebenfalls die *N*-alkylierte Verbindung bildet. Beide Verbindungen sind für die Testungen am Kaliumkanal Kv1.3 von Bedeutung (siehe Kapitel 2). In der Literatur ist für die „CsF-Celit-Alkylierung“ des 4-Hydroxychinolins, das ebenfalls in zwei tautomeren Formen vorliegen kann, gezeigt worden, dass die *O*-alkylierte Verbindung als Hauptprodukt (Ausbeute von 81 %) entsteht (SHAH ET AL., 2002). Somit wurde davon ausgegangen, dass die *O*-alkylierte

3. Synthese und Strukturen der untersuchten Verbindungen

Verbindung in ausreichender Menge für die Isolierung anfallen würde. Es konnte jedoch lediglich die *N*-alkylierte Verbindung, das 9,10-Dihydro-4-methoxy-*N*-(4-phenoxybutyl)acridin-9-on, isoliert werden. Dieses lässt sich dadurch erklären, dass bei vinylogen und phenylogenen Amidstrukturen in Lösung überwiegend die Ketoform vorliegt (KATRITZKY UND POZHARSKII, 2000) und so eine *N*-Alkylierung mit dem 4-Phenoxybutylbromid laut des HSAB-Prinzips bevorzugt ablaufen kann.

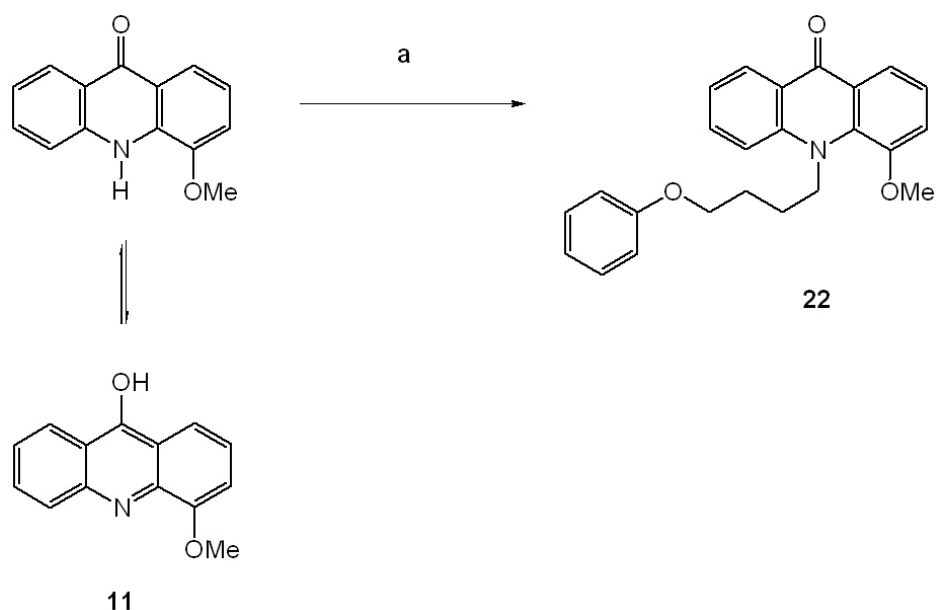


Abbildung 3.2: Synthese der Verbindung 22; a: 4-Phenoxybutylbromid, CsF-Celit, CH₃CN/RF

3.2. Darstellung der einzelnen Verbindungen

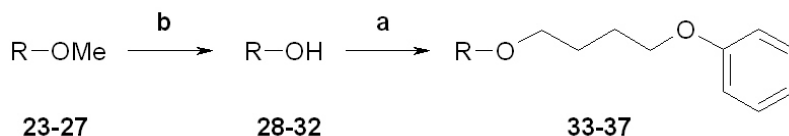


Abbildung 3.3: Umsetzung der kommerziell erhältlichen Methoxyverbindungen; a: 4-Phenoxybutylbromid, CsF-Celit, CH₃CN/RF bzw. 4-Phenoxybutylbromid, K₂CO₃/KI, Aceton oder DMF/RF b: HCl(aq)(konz. oder 20 %)/RF bzw. BBr₃ (5 °C), CH₂Cl₂/RF

Tabelle 3.2: Strukturen von R und Nummern der kommerziell* erhältlichen Methoxyverbindungen, der daraus resultierenden Alkohole und Endverbindungen

R	Nummer der Methoxy- verbindung	Nummer des Alkohols	Nummer der resultierenden Endverbindung
	23	28	33
	24	29	34
	25	30	35
	26	31	36
	27	32	37

*Die Verbindungen **23** und **24** waren nicht käuflich zu erwerben. Die Isolierung aus *Ruta graveolens* (Gartenraute) ist im Kapitel 7.2 beschrieben.

3. Synthese und Strukturen der untersuchten Verbindungen

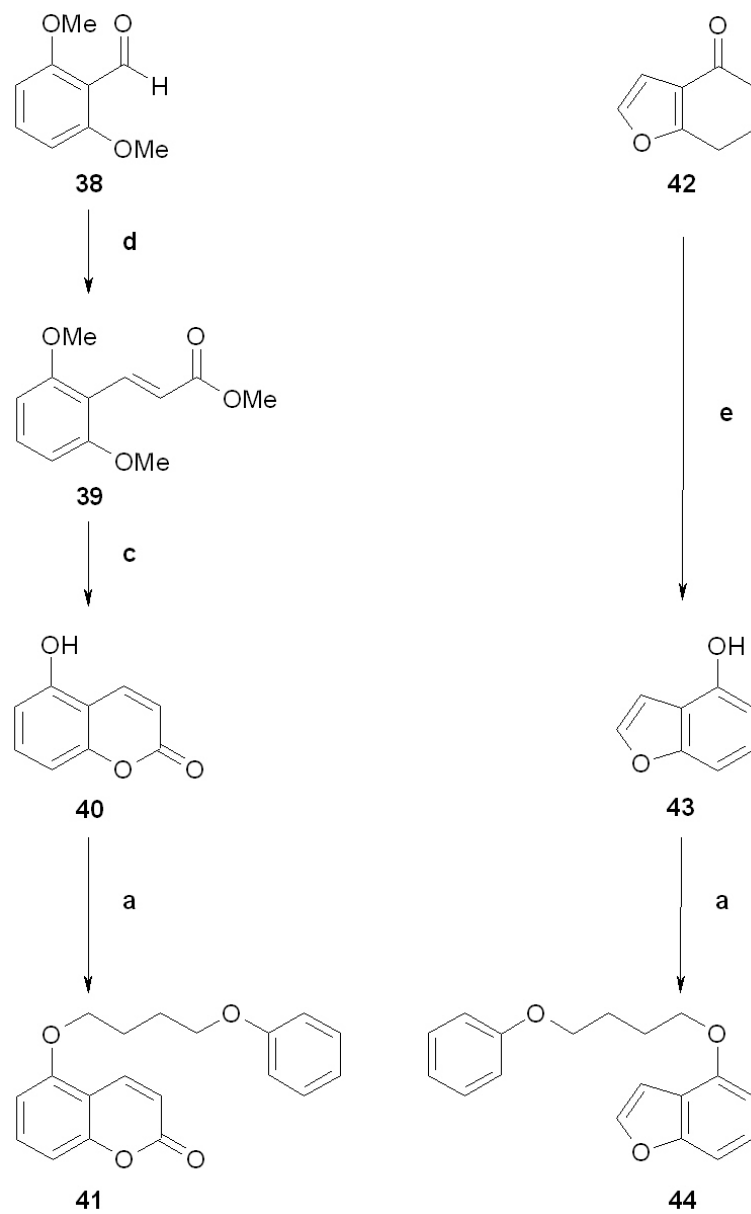


Abbildung 3.4: Synthese der Verbindungen **41** und **44**; a: 4-Phenoxybutylbromid, CsF-Celvit, CH₃CN/RF bzw. 4-Phenoxybutylbromid, K₂CO₃/KI, DMF/RF, c: BBr₃ (5 °C), CH₂Cl₂/RF, d: (C₆H₅)₃PCHCOOCH₃, Toluol/RF (3 h), e: Palladium-Aktivkohle, 1-Dodecen/Dekalin/RF (20 h)

3.2. Darstellung der einzelnen Verbindungen

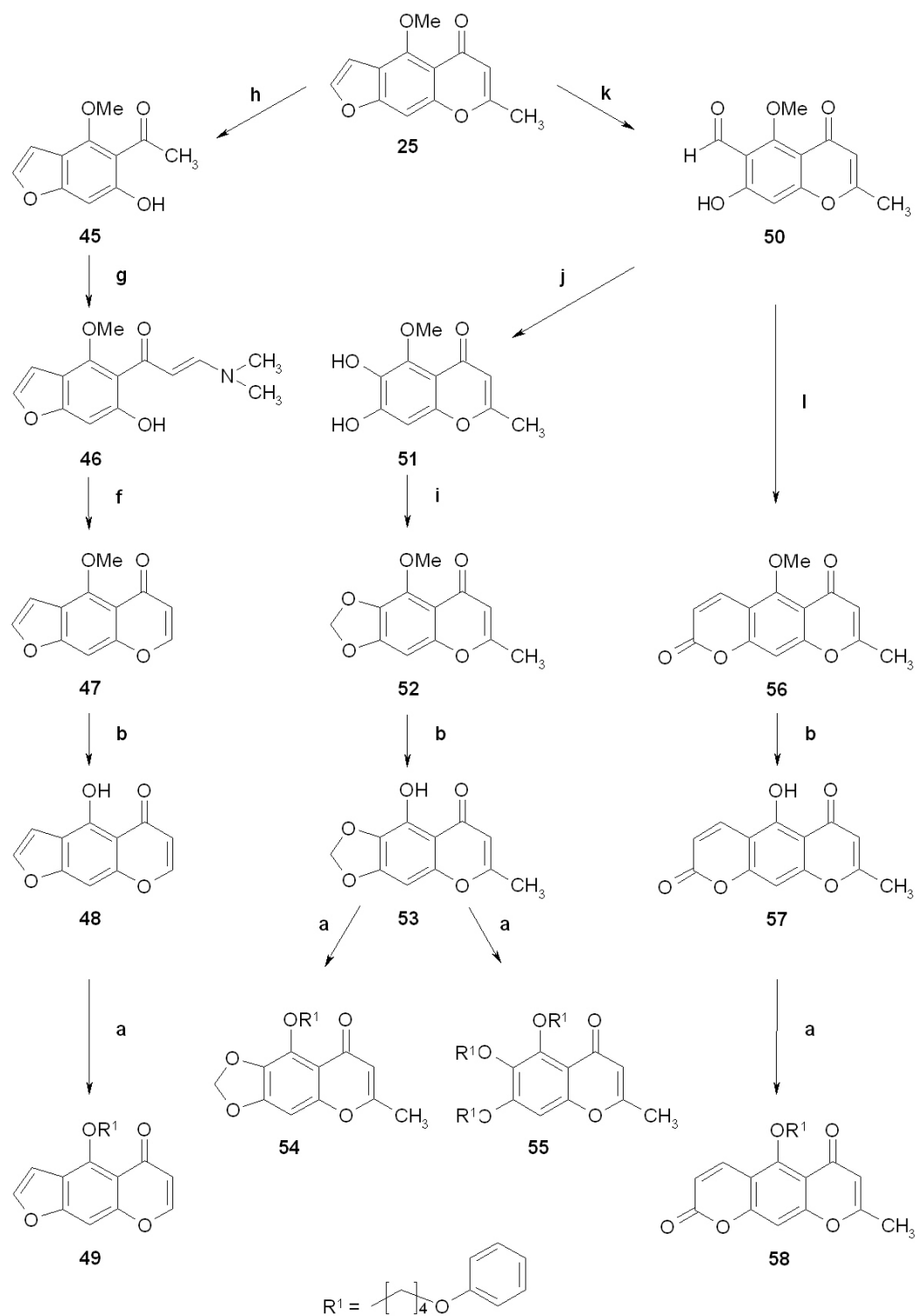


Abbildung 3.5: Synthese der Verbindungen 49, 54, 55 und 58; **a:** s. o., **b:** s. o., **f:** CH₃COOH/RF (5 h), **g:** DMFDMA, Toluol/RF (3 h); **h:** KOH (1 %)/RF (15 min); **i:** K₂CO₃, CH₂Br₂, DMF (4 h, 95 °C); **j:** NaOH (4 %), H₂O₂ (35 %), RT (2-3 h); **k:** H₂SO₄ (10 %), K₂CrO₄ (10 %) (60 °C), RT (2 h), **l:** (C₆H₅)₃PCHCOOCH₃, Toluol/RF (6 h) 49

3. Synthese und Strukturen der untersuchten Verbindungen

Bei dem 1. Syntheseansatz für die Verbindung **54** (siehe Abbildung 3.5) entstand bei der Umsetzung von Substanz **53** mit dem 4-Phenoxybutylbromid als unerwartetes Hauptprodukt Verbindung **55**. Aufgrund dieser Tatsache wurde die Synthese der Substanz **54** unter veränderten Bedingungen erneut durchgeführt und man erhielt das gewünschte Endprodukt **54**. Die genauen Reaktionsbedingungen für die beiden Substanzen (**54** und **55**) sind in Kapitel 7.3.10 beschrieben.

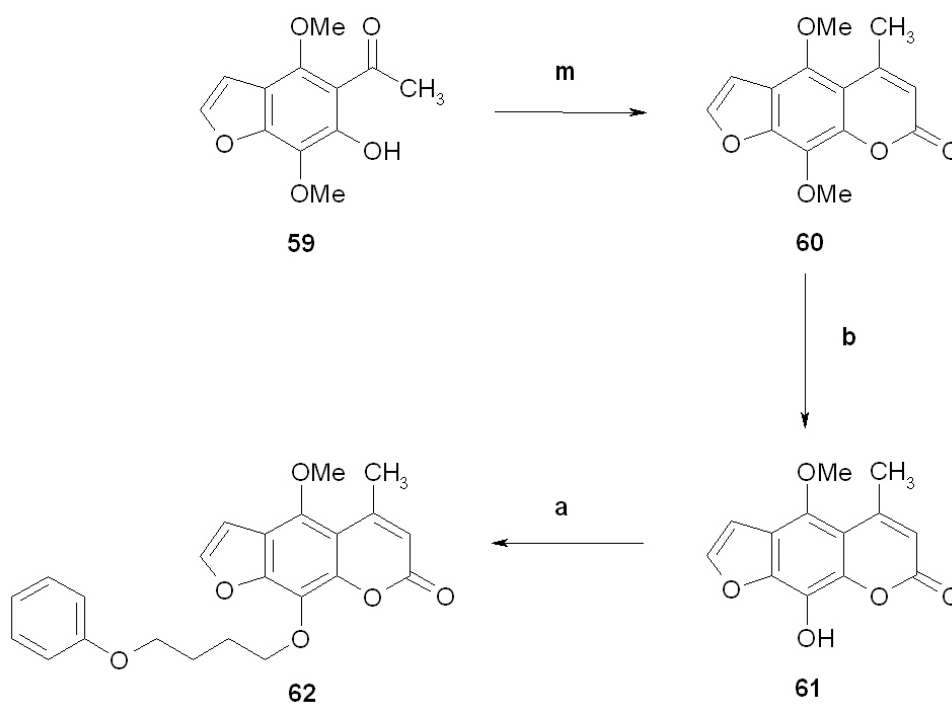
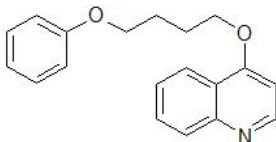
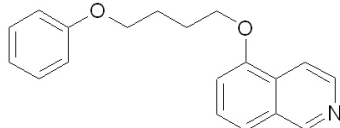


Abbildung 3.6: Synthese der Verbindung **62**; **a**: 4-Phenoxybutylbromid, CsF-Celit, CH₃CN/RF, **b**: BBr₃ (5 °C), CH₂Cl₂/RF, **m**: (C₆H₅)₃PCHCOOCH₃, Toluol/RF (3 h)

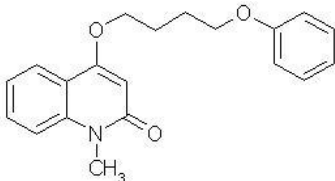
3.3. Übersicht über die synthetisierten Verbindungen

In den folgenden Tabellen sind die Strukturen der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen mit den IUPAC-Bezeichnungen und den in dieser Arbeit verwendeten Nummern aufgelistet.

3.3.1. Chinolin-Grundkörper

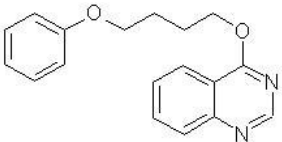
Struktur	Bezeichnung	Verbindung
	4-(4-Phenoxybutoxy)chinolin	12
	5-(4-Phenoxybutoxy)isochinolin	13

3.3.2. Chinolinon-Grundkörper

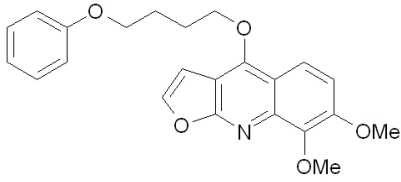
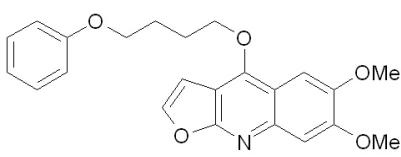
Struktur	Bezeichnung	Verbindung
	1,2-Dihydro- <i>N</i> -methyl-4-(4-phenoxybutoxy)chinolin-2-on	14

3. Synthese und Strukturen der untersuchten Verbindungen

3.3.3. Chinazolin-Grundkörper

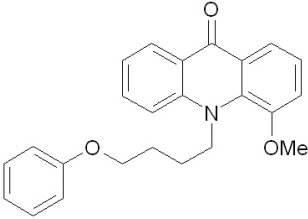
Struktur	Bezeichnung	Verbindung
	4-(4-Phenoxybutoxy)chinazolin	15

3.3.4. Furochinolin-Grundkörper

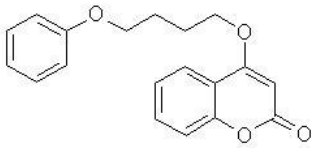
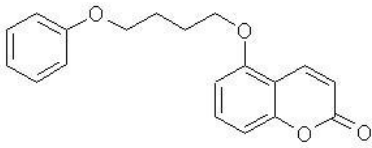
Struktur	Bezeichnung	Verbindung
	7,8-Dimethoxy-4-(4-phenoxybutoxy)furo[2,3- <i>b</i>]chinolin	33
	6,7-Dimethoxy-4-(4-phenoxybutoxy)furo[2,3- <i>b</i>]chinolin	34

3.3. Übersicht über die synthetisierten Verbindungen

3.3.5. Acridon-Grundkörper

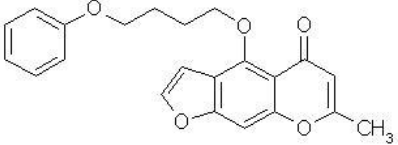
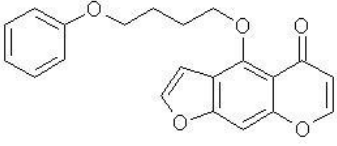
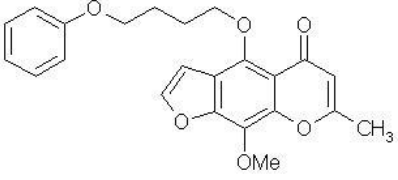
Struktur	Bezeichnung	Verbindung
	9,10-Dihydro-4-methoxy- <i>N</i> -(4-phenoxybutyl)acridin-9-on	22

3.3.6. Cumarin-Grundkörper

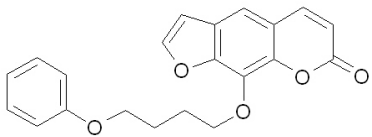
Struktur	Bezeichnung	Verbindung
	4-(4-Phenoxybutoxy)-2 <i>H</i> -[1]benzopyran-2-on	16
	5-(4-Phenoxybutoxy)-2 <i>H</i> -[1]benzopyran-2-on	41

3. Synthese und Strukturen der untersuchten Verbindungen

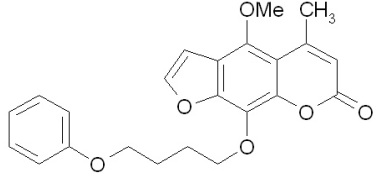
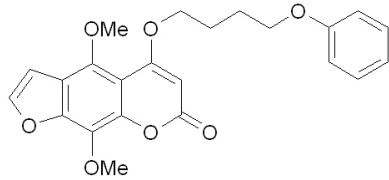
3.3.7. Furochromon-Grundkörper

Struktur	Bezeichnung	Verbindung
	7-Methyl-4-(4-phenoxybutoxy)- 5 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i>][1]benzopyran-5-on	35
	4-(4-Phenoxybutoxy)-5 <i>H</i> - furo[3,2- <i>g</i>][1]benzopyran-5-on	49
	9-Methoxy-7-methyl-4-(4- phenoxybutoxy)-5 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i>][1]benzopyran-5-on	36

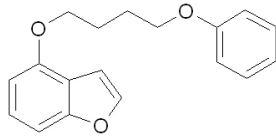
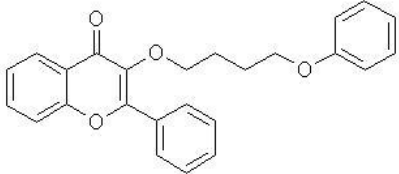
3.3.8. Furocumarin-Grundkörper

Struktur	Bezeichnung	Verbindung
	9-(4-Phenoxybutoxy)-7 <i>H</i> - furo[3,2- <i>g</i>][1]benzopyran-7-on	37

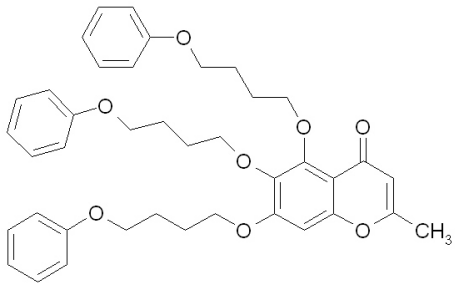
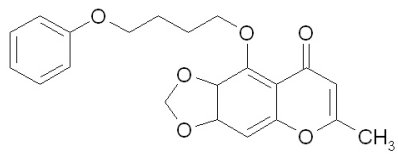
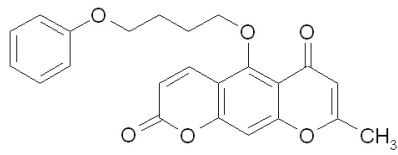
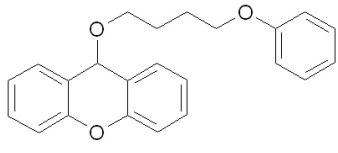
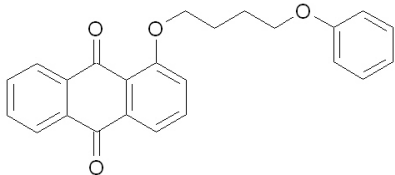
3.3. Übersicht über die synthetisierten Verbindungen

Struktur	Bezeichnung	Verbindung
	4-Methoxy-5-methyl-9-(4-phenoxybutoxy)-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i>][1]benzopyran-7-on	62
	4,9-Dimethoxy-5-(4-phenoxybutoxy)-7 <i>H</i> -furo[3,2- <i>g</i>][1]benzopyran-7-on	17

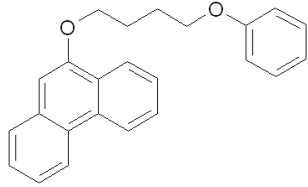
3.3.9. Verschiedene Grundkörper

Struktur	Bezeichnung	Verbindung
	4-(4-Phenoxybutoxy)benzofuran	44
	3-(4-Phenoxybutoxy)-2-phenyl-4 <i>H</i> -[1]benzopyran-4-on	18

3. Synthese und Strukturen der untersuchten Verbindungen

Struktur	Bezeichnung	Verbindung
	2-Methyl-5,6,7-tris-(4-phenoxybutoxy)-4 <i>H</i> -[1]benzopyran-4-on	55
	2-Methyl-6,7-methylenedioxy-5-(4-phenoxybutoxy)-4 <i>H</i> -[1]benzopyran-4-on	54
	2,6-Dihydro-8-methyl-5-(4-phenoxybutoxy)pyrano[3,2- <i>g</i>][1]benzopyran-2,6-dion	58
	9-(4-Phenoxybutoxy)-9 <i>H</i> -dibenzo[<i>b</i> , <i>e</i>]pyran	19
	1-(4-Phenoxybutoxy)anthrachinon	20

3.3. Übersicht über die synthetisierten Verbindungen

Struktur	Bezeichnung	Verbindung
 <p>The image shows the chemical structure of 9-(4-phenoxybutoxy)phenanthrene. It consists of a phenanthrene core (three fused benzene rings) with a butoxy chain (-O-CH2-CH2-CH2-CH2-O-) attached to the 9th position, which is further connected to a phenyl ring at the 4th position.</p>	9-(4-Phenoxybutoxy)phenanthren	21

4. Testungen

4.1. Elektrophysiologie

4.1.1. Die *patch-clamp*-Technik

4.1.1.1. Allgemeine Einführung

Die *patch-clamp*-Technik ist heutzutage als die Standardtechnik in der Elektrophysiologie zur Untersuchung von Ionenkanälen etabliert. In den 20iger Jahren des letzten Jahrhunderts begannen COLE UND CURTIS Experimente, die die elektrischen Vorgänge beim Aktionspotential aufklären sollten. Sie stellten dabei fest, dass die Membranleitfähigkeit bei einem Aktionspotential stark ansteigt und die elektromotorische Kraft (EMK) sinkt (COLE UND CURTIS, 1939). Mittels der von ihnen entwickelten *voltage-clamp*-Methode („Spannungsklemme“) konnten COLE UND CURTIS am Tintenfischriesenaxon zeigen, dass Ionenströme für die elektrischen Signale verantwortlich waren. Mit Hilfe dieser Methode bot sich nun zum ersten Mal die Möglichkeit, eine bestimmte Spannung zu „klemmen“, also das Membranpotential auf einen bestimmten Wert einzustellen. Der durch die Spannungsänderung gesetzte Impuls führte zu messbaren Ionenströmen durch die Membranen. Welche Ionen zu welchem Zeitpunkt des Aktionspotentials für die Ströme verantwortlich sind, konnte allerdings erst durch weitere Experimente von HODGKIN UND HUXLEY aufgeklärt werden (HODGKIN UND HUXLEY, 1952 und HODGKIN, 1976). Sie führten dazu zahlreiche *voltage-clamp*-Versuche durch und stellten daraus eine Reihe von Gleichungen auf, anhand derer sie zeigen

konnten, dass das Aktionspotential sich aus zwei Komponenten, einem Natrium- und einem Kaliumionenstrom, zusammensetzt. Sie konnten damit das Verhalten bzw. die Eigenschaften von Ionenkanälen, die sie als spannungsabhängige, ionenselektive „Tore“ bezeichneten, schon gut beschreiben. Ein indirekter Nachweis von Ionenkanälen selber gelang schließlich 1972 KATZ UND MILEDI mittels der sogenannten Rauschanalyse, als sie bei Untersuchungen an dem Acetylcholinrezeptor feststellten, dass eine so große Zahl an Ionen pro Sekunde bewegt wurde, dass dieses nur durch einen passiven Ionenstrom, nicht aber durch einen aktiven Transport mittels einer Ionenpumpe erklärbar wäre (KATZ UND MILEDI, 1972, NUMBERGER UND DRAGUHN, 1996). Sowohl die *voltage-clamp*-Methode als auch die Rauschanalyse erlaubten allerdings nur die gleichzeitige Messung einer großen Anzahl von Ionenkanälen, da das elektrische Hintergrundrauschen um ein Vielfaches größer war als der Strom durch einen einzigen Kanal. Eine Weiterentwicklung der *voltage-clamp*-Methode stellt die von NEHER UND SAKMANN entwickelte *patch-clamp*-Technik dar. Bei der Vorläufermethode, der *voltage-clamp*-Methode, wurde mit intrazellulären Mikroelektroden an Gewebestücken bzw. sehr großen Zellen (Durchmesser von 100-1000 μm , (HILLE, 1992)) gemessen. Bei der *patch-clamp*-Technik steckte man nun die Messelektrode in eine fein ausgezogene Glaspipette, die mit Elektrolyt gefüllt war. Diese modifizierte Messelektrode wurde nicht mehr in die zu vermessende Zelle eingeführt, sondern lediglich vorsichtig auf die Zelloberfläche aufgesetzt. Durch den kleinen Innendurchmesser der Pipettenspitze (wenige μm) konnte nur ein kleiner Teil der Membran (*patch* = Fleck, Stück) elektrisch isoliert und vermessen werden. Durch diese Anordnung erreichte man hohe Abdichtwiderstände (*Seal*widerstand, *seal* = Dichtung) von 50 $\text{M}\Omega$ zwischen der Pipette und der Zellmembran (Abstände von 20-50 Ångström (2-5 nm) (TEISSEYRE, 2001)), wodurch sich das Hintergrundrauschen so weit verringern ließ, dass Einzelkanalmessungen möglich wurden (NEHER UND SAKMANN, 1976). Es konnten zudem nun auch Messungen an sehr kleinen Zellen, z. B. an chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks von

4. Testungen

Säugetieren mit einem Durchmesser von 12 μm (HILLE, 1992), die sehr kleine Ströme aufweisen und den mechanischen Belastungen der *voltage-clamp*-Methode (intrazelluläre Mikroelektroden) nicht standhalten, durchgeführt werden. Eine weitere Verbesserung des Signal-Rauschverhältnisses wurde in den folgenden Jahren erreicht, als man für jede einzelne Messung „frische“, saubere Pipetten verwendete und einen leichten Unterdruck beim Aufsetzen der Pipette auf die Zelloberfläche anlegte (SIGWORTH UND NEHER, 1980, NEHER, 1981 und HAMILL ET AL., 1981). Es resultierten Abdichtwiderstände im Gigaohm-Bereich (10-100 $\text{G}\Omega$). Daher spricht man auch von der Ausbildung eines „Gigaseals“. Bei diesen „Gigaseals“ beträgt der Abstand zwischen Pipettenspitze und der Zellmembran nur wenige Ångström ($> 1 \text{ nm}$) (COREY UND STEVENS, 1983). Dass eine solch enge Verbindung zwischen Pipette und Glasmembran entsteht, wird der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen, Salzbrücken, Ca^{2+} -Brücken oder Van-der-Waals-Kräften zugeschrieben (COREY UND STEVENS, 1983 und OPSAHL UND WEBB, 1994). Aber welche genauen physikalischen Hintergründe der Ausbildung solcher „Gigaseals“ zu Grunde liegen, ist bis heute noch nicht bis ins letzte Detail aufgeklärt.

Eine ausführliche Übersicht über die Entwicklung und die *patch-clamp*-Technik im Allgemeinen finden sich bei SAKMANN UND NEHER (1995), NUMBERGER UND DRAGUHN (1996) sowie HILLE (2001).

Bei der *patch-clamp*-Technik können verschiedene Mess-Konfigurationen, die dem jeweilig zu lösenden Messproblem (z. B. Einzelkanalmessungen, Messungen des Gesamtstroms von Zellen oder die Untersuchung des Einflusses bestimmter Zytoplasma-Bestandteile auf die Eigenschaften eines Kanals) angepasst sind, durchgeführt werden. Eine Übersicht über diese verschiedenen Konfigurationen finden sich bei HAMILL ET AL. (1981) und in der Abbildung 4.1. Die verschiedenen Konfigurationen sind möglich, da ein „Gigaseal“, wenn er erst einmal etabliert ist, sich als sehr stabil erweist.

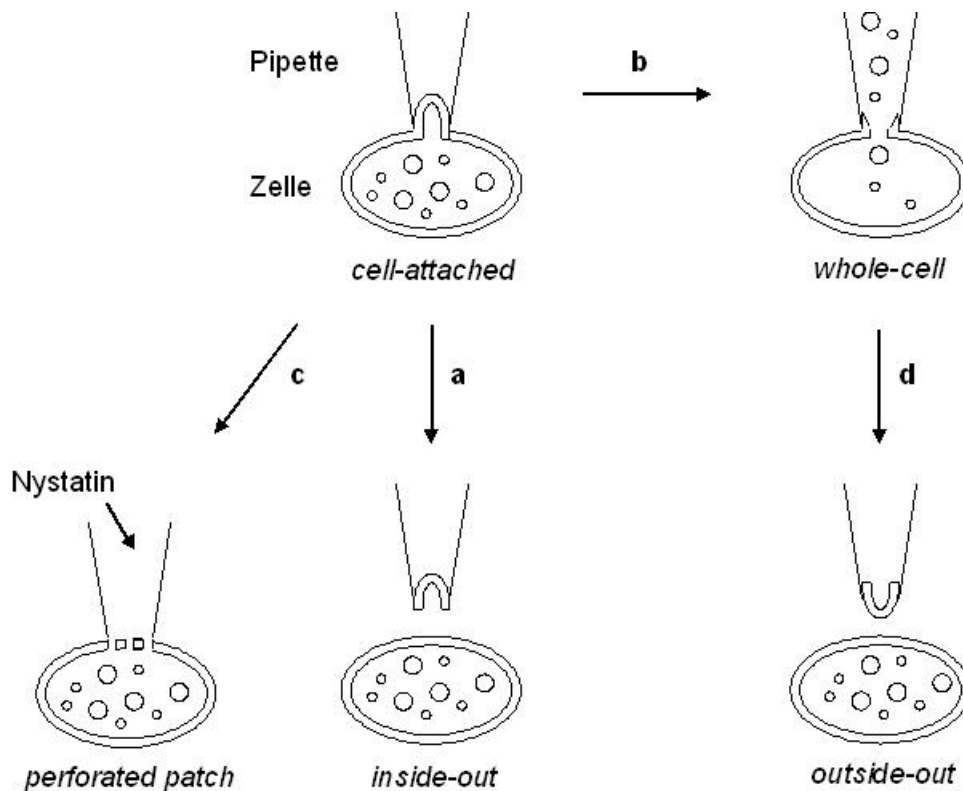


Abbildung 4.1: Verschiedene Mess-Konfigurationen der *patch-clamp*-Technik (Erläuterungen siehe Text)

Ausgehend von der *cell-attached*-Konfiguration, die durch das Heranführen der Pipette an die Zelloberfläche bereits erfolgt ist, können die *inside-out*- und die *whole-cell*-Konfiguration, von der man zudem noch zu der *outside-out*-Konfiguration gelangen kann, erreicht werden. Um von dem *cell-attached*-Zustand zum *inside-out*-Zustand (Abb. 4.1: Pfeil **a**) zu gelangen, wird die Pipette vorsichtig vertikal von der Zelle abgezogen. Dabei löst sich ein kleines Membranstück von der Zelle ab, ohne dass sich der *Seal*widerstand verringert. Den *whole-cell*-Zustand erreicht man, indem im *cell-attached*-Zustand ein plötzlicher, kurzer Unterdruck in der Pipette erzeugt wird oder durch Setzen eines hochfrequenten Wechspannungsimpulses (Abb. 4.1: Pfeil **b**). In beiden Fällen wird die Zellmembran in der Pipettenöffnung durchbrochen und es besteht ein direkter Kontakt zum Zellin-

4. Testungen

neren und somit zu der gesamten Zelle. Mittels dieser Ganzzelleableitung werden folglich die Ströme aller Kanäle einer Zelle erfasst. Die Bedingungen bei diesem Modus ähneln damit denen der *voltage-clamp*-Methode. Durch das Durchbrechen der Zellmembran kommt es allerdings zum Austausch des Zytoplasmas mit der Pipettenlösung, damit ist die natürliche Zusammensetzung des Zytoplasmas nicht mehr gegeben. Stoffe, wie z. B. ATP, IP₃ oder kleinere Proteine, die teilweise auch für die Funktion von bestimmten Kanälen von Bedeutung sind, liegen nicht mehr in den benötigten Konzentrationen vor. Für einige Messungen ist es aber wichtig, dass die Zusammensetzung des Zytoplasmas annähernd erhalten bleibt, da es sonst zum Verlust wichtiger Zellfunktionen kommen kann (MARTY UND NEHER, 1995). Um den Verlust solcher Zellfunktionen zu verhindern bzw. die Kanaleigenschaften nicht zu verändern, kann man zum einen der Pipettenlösung entsprechende Substanzen zufügen oder man bedient sich des *perforated-patch*, einer besonderen Form der Ganzzelleableitung (Abb. 4.1: Pfeil c). Dabei wird der Pipettenlösung ein Porenbildner zugesetzt. Häufig eingesetzt für diesen Zweck werden die Antimykotika Nystatin (HORN UND MARTY, 1988 und KORN ET AL., 1991) und Amphotericin B (RAE ET AL., 1991). Lässt man nun im *cell-attached*-Zustand diese Porenbildner auf die Zellmembran einwirken, bilden sich nach wenigen Minuten Poren in der Zellmembran, die für das Durchtreten vieler Stoffe zu klein sind, aber die gesamte Zelle elektrisch zugänglich machen. Im Falle des Nystatins haben diese Poren z. B. einen Durchmesser von acht Ångström (0,8 nm). Das bedeutet, dass Moleküle mit einem Molekulargewicht von > 300 g/mol die Poren nicht passieren können (MARTY UND NEHER, 1995).

Vom *whole-cell*-Zustand kann man, wie oben bereits angedeutet, zu einer weiteren Konfiguration gelangen, der *outside-out*-Konfiguration (Abb. 4.1: Pfeil d). Hierbei entfernt man die Pipette vorsichtig axial von der Zelle, dabei reißt ein Teil der Membran ab, der sich aber gleich wieder wie ein Vesikel um die Pipetenspitze schließt.

Die Messungen im Rahmen dieser Arbeit zur Ermittlung der Blockadewerte für die synthetisierten Substanzen am Kv1.3- und Kv1.5-Kanal wurden alle mittels

der *whole-cell*-Methode, die für diesen Zweck als Standard-Methode angesehen werden kann, durchgeführt.

4.1.1.2. Durchführung der *patch-clamp*-Experimente

4.1.1.2.1. Zellkultur

Materialien und Geräte

<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM), Nr. D-6046; 1,0 g/l Glucose	Sigma
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (PBS), Nr. D-8537	Sigma
Fetales Kälberserum (FBS), Nr. F-2442	Sigma
Geneticin-Lösung (G-418), 50 mg/ml, Nr. 10131-019	Gibco BRL
Trypsin/EDTA-Lösung (1x), Nr.T-3924	Sigma
Bacillol Plus®	Bode
Sterillium®	Bode
Isopropanol 70 %	Merck
Inverses Mikroskop CK2	Olympus
Neubauer Zählkammer	
Eppendorf Varipette, 100 ml	Eppendorf
Sterile Pipettenspitzen (gelb)	Sarstedt
Pipettiergerät „accu jet“	Brand
Sterile wattierte Einmalpipetten (5 und 10 ml)	Sarstedt
Gewebekulturschälchen 35 x 10 mm	Sarstedt
Gewebekulturflaschen 25 cm ² , belüftet	Sarstedt
Gefrier Röhrchen 2,0 ml, Nr.430 289	Corning, USA
Einfrierbehälter für Zellkulturen, Nr. 5100-0001	Corning, USA
Begasungsbrutschrank, Typ BB16	Heraeus, Hanau
Sterilbank Klasse 2 Herasafe, Typ HS12	Heraeus, Hanau

4. Testungen

Verwendete Zelllinien Die für die *patch-clamp*-Untersuchungen verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Tabelle 4.1: Beschreibung der verwendeten Zelllinien; Kv: Spannungsabhängige Kaliumkanäle; *m*: mice; Kanalprotein aus der Maus; *h*: human; Kanalprotein aus dem Menschen

Zelllinie	Zellart	Kanalbesatz	Literatur
L-929	Bindegewebsfibroblasten der Maus	<i>m</i> Kv1.3	GRISSMER ET AL., 1994
MEL-C88	Leukämiezellen der Maus (MEL: murine erythroleukaemia)	<i>h</i> Kv1.5	SHELTON ET AL., 1993

Die MEL-C88-Zelllinie wurde ausschließlich in Davis/Kalifornien (USA) für die dort von Frau Dr. Heike Wulff am *Department of Medicinal Pharmacology and Toxicology (University of California)* durchgeführten Messungen am Kv1.5-Kanal verwendet (siehe 4.1.1.3).

Die stabil transfizierten L-929-Zellen wurden freundlicher Weise von Herrn Prof. Dr. S. Grissmer, Abteilung Angewandte Physiologie der Universität Ulm zur Verfügung gestellt. Zudem ermöglichte es Herr Prof. Dr. S. Grissmer, dass im Rahmen zweier Forschungsaufenthalte in seinem Labor ein Teil der Messungen durchgeführt werden konnte.

Zellkultivierung Bei den L-929-Zellen handelt es sich um eine Adhäsions-Zelllinie, d. h., die Zellen wachsen am Boden der Kulturflaschen fest. Sie wurden bei 36,5 °C und unter 5 %iger CO₂-Begasung in *Dulbecco's Modified Eagle's*

4.1. Elektrophysiologie

Medium (DMEM) mit einem Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (*fetal bovine serum*, FBS) in einem wasserbefeuchteten Brutschrank kultiviert. Es wurde zudem als Selektionsantibiotikum Geneticin (G-418) (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugesetzt. Zum einen verhindert dieses eine Verkeimung und zum anderen sorgt es dafür, dass nur die Zellen wachsen, die den Kv1.3-Kanal exprimieren, da diese gleichzeitig eine Geneticin-Resistenz aufweisen (SOUTHERN UND BERG, 1982).

Das Passagieren der Zellen erfolgte zweimal wöchentlich je nach Wachstum in einem *Splitting*-Verhältnis 1:5 bis 1:10. Dazu wurde zunächst das alte Medium entfernt und anschließend mit 3-4 ml PBS-Puffer gewaschen. Um die Zellen leicht vom Boden der Kulturflaschen ablösen zu können, setzte man die Zellen für höchstens 2 Minuten ca. 2 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung aus. Danach wurden die Zellen in frischem DMEM, das 10 % FBS und Geneticin (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) enthielt, aufgenommen und in neue Kulturflaschen (Endvolumen 10 ml) bzw. Petrischälchen (einige Tropfen auf ein Endvolumen von 2 ml, für die *patch-clamp*-Messungen) überführt.

Um die Zellen nach dem Passagieren für *patch-clamp*-Messungen verwenden zu können, wurden sie für einige Stunden im Brutschrank gelagert, damit sie wieder am Boden der Petrischälchen anhafteten. Die so präparierten Schälchen konnten maximal zwei Tage nach dem Passagieren noch für Messungen verwendet werden. Eine auf die beschriebene Weise kultivierte Zellkultur konnte maximal sechs Monate für Messungen eingesetzt werden, da sich nach und nach die Eigenschaften bei den *patch-clamp*-Messungen verschlechterten. So nahmen unter anderem die Stromstärken der Zellen mit der Zeit ab. Um jeder Zeit auf frische Zellen zurückgreifen zu können, wurde immer dafür gesorgt, dass eine gewisse Menge an Zellen in flüssigem Stickstoff eingelagert wurde. Auf diese Weise ist es möglich, Zellen für mehrere Jahre ohne Vitalitätsverlust zu lagern. Lagen ein gutes Wachstum und gute „*patch*-Eigenschaften“ (z. B. leichtes Erreichen von „*Gigaseals*“, Ströme im Bereich von 1-5 nA und Stabilität der verschiedenen Parameter bei den Messungen) vor, so wurde ein Teil der Zellen eingefroren. Dazu gab man die Zellen

4. Testungen

in Medium, das mit 10 % DMSO als Gefrierschutzmittel versetzt war. Diese Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen aliquotiert und in einem speziellen Einfrierbehälter, der mit Isopropanol gefüllt war, für mindestens vier Stunden in eine Kühltruhe bei -80 °C gegeben. Somit konnten die Zellen mit einer Einfrierrate von 1 °C/min eingefroren werden. Anschließend wurden die Kryoröhrchen zügig in flüssigen Stickstoff überführt und bei -196 °C gelagert. Wenn frische Zellen benötigt wurden, entnahm man die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff und taute die Zellsuspension zügig in einem auf 37 °C temperierten Wasserbad auf. Dann pipettierte man die Zellsuspension in mit DMEM, 10 % FBS und Geneticin (300 µg/ml) gefüllte Gewebekulturflaschen. Für mindestens 24 Stunden wurden die Zellen im Brutschrank aufbewahrt. Binnen 48 Stunden nach dem Auftauen nahm man einen Mediumwechsel vor, um so die Zellen dem Einfluss des DMSO zu entziehen. Die Zellen wurden des Weiteren, wie oben bereits beschrieben, zweimal pro Woche passagiert. Nach etwa zwei Wochen (4-5 Passagen) konnten die Zellen in der Regel für *patch-clamp*-Messungen verwendet werden. Sowohl das Passagieren der Zellen als auch das Abfüllen von Zellsuspensionen für die Einfrier- und Auftauvorgänge wurden unter möglichst keimfreien Bedingungen unter einer Reinraumwerkbank (*laminar flow box*) durchgeführt.

4.1.1.2.2. *patch-clamp*-Messungen

Materialien und Geräte

Kiel

Agar, Nr. 05040	Fluka
Sterilfilter Filtropur S 0,2 µm, Nr. 831826.001	Sarstedt
pH-Meter 605	Metrohm, Schweiz
Halbautomatisches Mikroosmometer	Knauer, Berlin
Petrischälchen 35 x 10 mm	Sarstedt
Kapillaren aus Borsilikatglas ohne Filament,	Hilgenberg, Malsfeld

4.1. Elektrophysiologie

Meterware, AD = 1,5 mm, ID = 0,15 mm, Nr. 1141150	
Pipettenziehgerät PIP 5	HEKA Elektronik, Lambrecht
Inverses Mikroskop CK-2	Olympus, Hamburg
Poliergerät Microforge CPM-2	ALA Scientific Instruments, USA
Silberdraht, rein, D = 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	Narishinge, Japan
Pipettenhalter	HEKA Elektronik, Lamprecht
Verstärker EPC-9	HEKA Elektronik, Lamprecht
Styropor-Blöcke zur Schwingungsdämpfung	
Passive Schwingungsdämpfer SLM-3A	Newport, USA
Granitplatte, ca. 250 kg	
Faraday-Käfig	Werkstatt des Pharm. Instituts, Kiel
Software Pulse/PulseFit, Version 8.11	HEKA Elektronik, Lamprecht
Software GraphPad Prism, Version 2.00	GraphPad Software, USA

Ulm*

Teflonringe, $\varnothing = 1,4$ cm, Tiefe = 2 mm, Volumen = 500 μ l	THF GmbH Ulm
Borsilikatkapillaren GB150TF-10	Science Products GmbH,

4. Testungen

(mit Filament)	Hofheim
Pipettenziehgerät dmZ-Universal-Puller	Zeitz, Augsburg
Pumpe	Eigenbau, Universität Ulm
Inverses Mikroskop Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen/Jena
Schwingungsgedämpfter Tisch IsoStationTM	Newport, USA
Patchmaster 2.0	HEKA Elektronik, Lamprecht
Fitmaster 2.0	HEKA Elektronik, Lamprecht

*Es sind nur die Materialien und Geräte aufgelistet, die sich von denen in Kiel verwendeten unterscheiden.

Die Chemikalien, die für die Herstellung der für die *patch-clamp*-Messungen benötigten Lösungen verwendet wurden, wurden von den Firmen Merck oder Fluka bezogen. Sie wiesen alle den höchstmöglichen Reinheitsgrad auf.

Aufbau eines Messplatzes Es gibt keine kompletten Aufbauten für die *patch-clamp*-Technik zu kaufen. So muss jeder Anwender sich individuell seinen eigenen Messplatz, den sogenannten *setup*, aus Einzelkomponenten zusammenstellen. Je nach Art der Experimente, die durchgeführt werden, variiert der Aufbau des Messplatzes. Der prinzipielle Aufbau ist aber bei allen *setups* gleich und soll im Folgenden kurz beschrieben werden.

Ein *setup* besteht aus einem schwingungsgedämpften Tisch bzw. einer Konstruktion, die diese Funktion erfüllt (z. B. beim Kieler *setup*: 250 kg schwere Granitplatte, passive Schwingungsdämpfer, Styroporblöcke zur weiteren Schwingungsdämpfung). Dieses ist nötig, da kleinste Bewegungen bzw. Schwingungen den *seal*, also den Kontakt von der Pipette mit der Zelle, zerstören können. Auf dem schwingungsgedämpften Tisch befindet sich ein Mikroskop mit inverser Optik, das genügend Platz für die zu vermessenden Präparate, die Elektroden und den Vorverstärker bietet. Ein Mikroskop wird benötigt, da es sich um sehr kleine Prä-

parate handelt (z. B. Zellen von wenigen μm), an die die Messelektrode mittels eines Mikromanipulators, der sehr feine Bewegungen erlaubt, vorsichtig herangeführt werden muss. Neben der Messelektrode wird noch eine weitere Elektrode, die sogenannte Badelektrode, zur Erdung verwendet, die in die die Zellen umgebende Lösung eintaucht. Da sehr niedrige Ströme mit einem sehr empfindlichen Vorverstärker gemessen werden, muss man störende elektromagnetische Einstrahlungen, die durch das Wechselfeld von z. B. Netzteilen verwendeter Geräte (50 Hz, „Netzbrummen“) verursacht werden, minimieren bzw. verhindern. Dazu erdet man alle leitenden Teile des *setups* und umgibt unter Umständen zur zusätzlichen Abschirmung das Präparat, die Messelektrode und den Vorverstärker mit einem Faraday-Käfig. Der Vorverstärker ist mit einem Verstärker verbunden. Diese beiden Komponenten erlauben es, den Membranen der zu vermessenden Zellen ganz bestimmte Spannungen aufzuzwingen, diese mittels eines Kompensationsstromes konstant zu halten und das ganze mit Hilfe einer Software in Stromkurven umzuwandeln. Um Lösungen auf die zu vermessenden Zellen aufspülen zu können, werden Perfusionssysteme verwendet, die meistens mit elektrischen Pumpen betrieben sind. Umfassende Ausführungen über den prinzipiellen Aufbau eines *setups*, die verwendeten Komponenten und die zu treffenden Vorbereitungen zur Durchführung eines Experiments (z. B. die Präparation der Elektroden) finden sich unter anderem bei NUMBERGER UND DRAGUHN (1996) sowie, speziell auf den Aufbau der Anlage und die Messungen in Kiel bezogen, in den Arbeiten von HERZOG (2000) und MÖLLER (2000).

Lösungen Für die *patch-clamp*-Messungen wurden zwei unterschiedliche Arten von Lösungen verwendet: Zum einen die interne Lösung, die man als Lösung für die Messpipetten benutzte und zum anderen die externe Lösung, die als Badlösung und zur Herstellung der Untersuchungslösung diente. Sowohl für die interne als auch für die externe Lösung wurden zunächst Stammlösungen hergestellt, von denen dann die entsprechenden Mengen mit *Aqua bidestillata* auf 1000 ml verdünnt wurden, um die in den Tabellen 4.2 und 4.3 angegebenen Substrat-Konzentrationen

4. Testungen

der internen und externen Lösung zu erhalten. Die Einstellung der internen Lösung auf einen pH-Wert von 7,2 erfolgte mittels einer 1 M Kalilauge, die Einstellung der externen Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 mittels 1 M Natronlauge. Nach einer abschließenden Sterilfiltration (Filterdurchmesser = 0,2 μm) war es möglich, die externe Lösung im Kühlschrank über mehrere Wochen aufzubewahren. Die interne Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Osmolarität der Lösungen lag zwischen 290-310 mOsm und wurde stichprobenartig kontrolliert.

Tabelle 4.2: Zusammensetzung der internen Lösung pH 7,2

Bestandteile	stabil transfizierte Zellen Kv1.3 bzw. Kv1.5
NaCl	-
KCl	20,0 mM
KF	120,0 mM
MgCl ₂	-
HEPES	10,0 mM
EGTA	10,0 mM

Tabelle 4.3: Zusammensetzung der externen Lösung pH 7,4

Bestandteile	Na ⁺ -Ringerlösung stabil transfizierte Zellen Kv1.3 bzw. Kv1.5
NaCl	160,0 mM
KCl	4,5 mM
CaCl ₂	2,0 mM
MgCl ₂	1,0 mM
HEPES	5,0 mM
Glucose	-

Die zu untersuchenden Substanzen löste man aufgrund ihrer Lipophilie in DMSO. Für die *patch-clamp*-Messungen wurden diese Substanz-DMSO-Lösungen mit externer Lösung auf einen DMSO-Gehalt von 2 % eingestellt. Die zum Spülen des Schlauchsystems und zur Equilibrierung des gesamten Messsystems benötigte Menge an externer Lösung wurde, um gleiche Versuchsbedingungen für den Kontrollwert und die Messwerte zu gewährleisten, ebenfalls mit 2 % DMSO versetzt.

Messprotokolle Je nachdem, an welchen Kanälen Blockaden gemessen werden sollen, verwendet man andere Pulsprotokolle. Für die Messungen am Kv1.3-Kanal wird ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV, das dem Ruhemembranpotential entspricht, alle 30 s auf +40 mV für die Dauer von 200 ms depolarisiert. Die Kv1.3-Kanäle weisen eine *use dependence*-Inaktivierung auf, daher ist eine Pause von 30 s zwischen zwei Pulsen nötig, damit die Kanäle in den geschlossenen Zustand zurückkehren können und so wieder erregbar sind. Sowohl beim Kontrollwert als auch bei den verschiedenen Konzentrationen werden 20 Messpulse gesetzt, da dann davon ausgegangen werden kann, dass sich das Blockadegleichgewicht, der *steady state*, eingestellt hat. Für jede vermessene Substanz wurden je 3-5 verschiedene Konzentrationen hergestellt und in aufsteigender Konzentration auf die Zellen gegeben. Dieses wurde mindestens dreimal pro Substanz durchgeführt.

Bei den Messungen am Kv1.5-Kanal wird ebenfalls ausgehend von -80 mV auf +40 mV depolarisiert, wobei die Pulse alle 10 s gesetzt werden. Dieses ist möglich, da die Kv1.5-Kanäle keine *use dependence*-Inaktivierung aufweisen. Es wird ebenfalls die Einstellung des Blockadegleichgewichts abgewartet.

Die Messungen am Kv1.5-Kanal wurden von Frau Dr. Heike Wulff in Davis/Kalifornien (USA) mit den oben angegebenen Lösungen (intern und extern) und an der MEL-C88-Zelllinie (Kapitel 4.1.1.2.1) durchgeführt und die Ergebnisse freundlicher Weise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

4. Testungen

4.1.1.3. Ergebnisse der *patch-clamp*-Experimente

Die bei den Messungen ermittelten Ströme werden in Strom-Zeit-Kurven graphisch dargestellt. In Abbildung 4.2 sind die Strom-Zeit-Kurven (Kontrollwert bzw. Blindwert und die verschiedenen getesteten Konzentrationen) nach Einstellung des Blockade-Gleichgewichts der Verbindung **41** gezeigt.

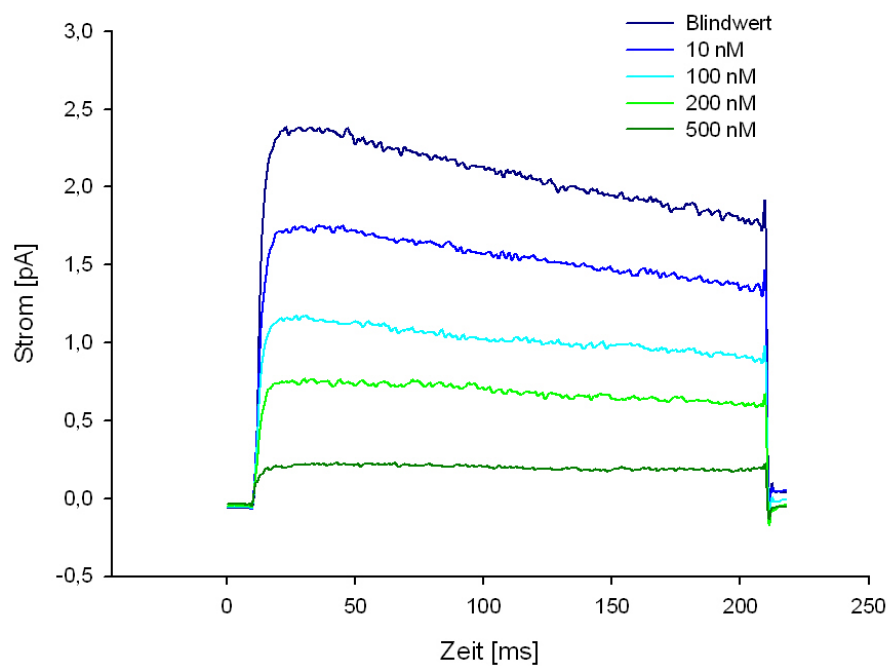


Abbildung 4.2: Strom-Zeit-Kurve am Beispiel der Verbindung **41**

Der Strom zwischen 0,4 ms und 40 ms wird als K_{Peak} -Stromwert bezeichnet und für die Auswertung herangezogen. Dazu betrachtet man jeweils die Mittelwerte der Stromwerte der letzten fünf Pulse des Kontrollwertes ($I_{Kontrolle}$) und der verschiedenen Konzentrationen ($I_{Konzentration}$). Aus diesen Werten wird nach der folgenden Gleichung 4.1 die prozentuale Blockade, also der bewirkte Effekt, errechnet:

$$E = \frac{I_{Kontrolle} - I_{Konzentration}}{I_{Kontrolle}} \cdot 100 \quad (4.1)$$

Diese so ermittelten Werte für die prozentualen Blockaden werden mit dem Programm GraphPad Prism® in Konzentrations-Wirkungs-Kurven (siehe Abb. 4.3) umgewandelt. Das Programm erstellt mittels nichtlinearer Regression sigmoidale Kurven einer variablen Steigung nach folgender mathematischer Beziehung 4.2:

$$E = E_{min} + \frac{E_{max} - E_{min}}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{c}\right)^n} \quad (4.2)$$

E entspricht hierbei dem prozentualen Blockadeeffekt bei der betrachteten Konzentration c , E_{min} dem Minimalwert (0) und E_{max} dem Maximalwert (100) der sigmoidalen Auswertung. Der Hill-Koeffizient n gibt die Steigung der Kurve an und liefert gleichzeitig Hinweise auf die Anzahl der Rezeptorbindungsstellen. Bei einem Hill-Koeffizienten von eins bindet ein Substratmolekül an den Rezeptor und blockiert diesen. Ein Wert von zwei kann zwei unterschiedliche Ursachen haben. Zum einen kann es bedeuten, dass eine Kanalblockade erfolgt, da zwei Substratmoleküle gleichzeitig an den Rezeptor binden und zum anderen, dass ein Substratmolekül an zwei unterschiedliche, räumlich voneinander getrennte Bindungsstellen bindet. Die zweite Variante tritt unter anderem dann auf, wenn ein Molekül zwei reaktive Strukturen aufweist, die über einen Spacer miteinander verbunden sind. Dies ist z. B. bei Psora-4 (VENNEKAMP ET AL., 2004) und PAP-1 (SCHMITZ ET AL., 2005) der Fall.

4. Testungen

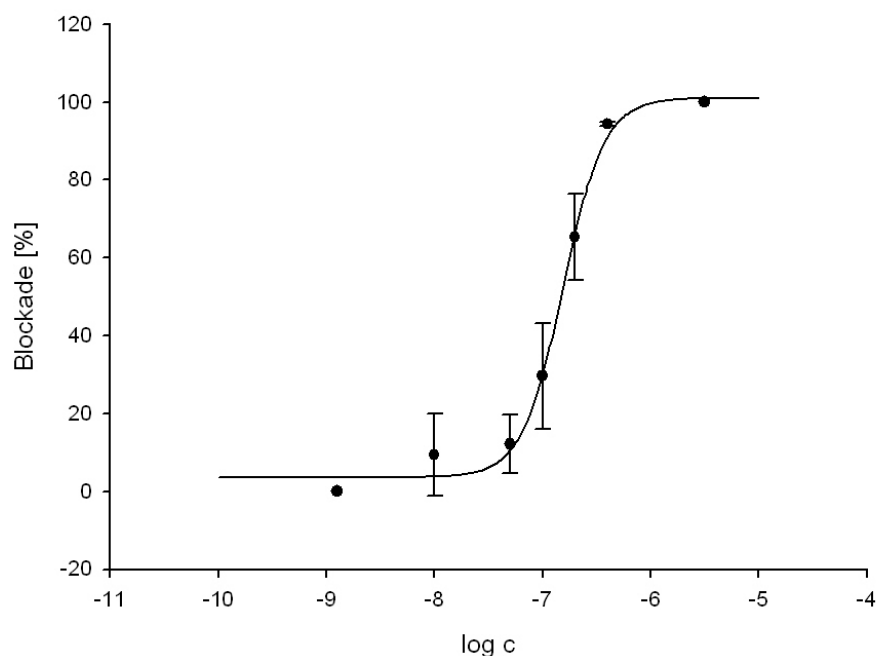


Abbildung 4.3: Konzentrations-Wirkungs-Kurve am Beispiel von Verbindung **41**, erstellt mittels des Programms GraphPad Prism®

Kv1.3-Messungen Wie allgemein bekannt ist, können bei analytischen Messverfahren systematische oder zufällige Fehler, zum einen verursacht durch den Experimentator und zum anderen durch das Messsystem selbst, auftreten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher sowohl Messungen von verschiedenen Experimentatoren als auch an verschiedenen Messaufbauten durchgeführt und miteinander verglichen. So wurden neben den in Kiel und Ulm durchgeführten Messungen, auch Messungen in Davis/Kalifornien (USA) von Frau Dr. H. Wulff angefertigt und die Ergebnisse freundlicher Weise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Im Weiteren werden diese Werte mit der Bezeichnung „Davis“ benannt oder es wird darauf hingewiesen, dass die Werte in Davis gemessen wurden.

In der Tabelle 4.4 sind für sechs Verbindungen die Werte aus den Messungen Kiel/Ulm und Davis gegenübergestellt. Diese sechs Werte wurden beispielhaft ausgesucht, da sie den Bereich der EC_{50} -Werte (ca. 100 nM bis $> 10 \mu\text{M}$) aller

gemessenen Werte gut umfassen. Aufgrund der Tatsache, dass sich z. B. Ungenauigkeit bei der Herstellung von Verdünnungen oder ähnliches bei Werten im nM-Bereich stärker als bei Werten im μ M-Bereich bemerkbar machen, wurden hier mit den Werten der Verbindungen **22** und **41** zwei Werte im unteren nM-Bereich in die Betrachtung miteinbezogen.

Die Messungen in Davis wurden mit den gleichen Lösungen (sowohl interne als externe), der gleichen Zelllinie (L-929) und einem Messprotokoll, das sich lediglich in der Pulslänge unterscheidet (500 ms anstelle von 200 ms), durchgeführt. Der Aufbau des Messplatzes entspricht denen in Kiel/Ulm.

Die Auswertung der in Davis durchgeführten Messungen erfolgte nicht mittels der K_{Peak} -Werte, sondern über die Flächen unterhalb der Kurven (AUC zwischen 1 und 99 %). Die AUC-Werte der unterschiedlichen Konzentrationen wurden ebenfalls auf die AUC-Werte der Kontrolle bezogen und die EC_{50} -Werte in einer sigmoidalen Kurve ermittelt.

Es gibt verschiedene Arten von Blockern, die sich in der Kinetik der Blockade unterscheiden. Zum einen gibt es die sogenannten *open and closed state*-Blocker, die sofort bei Kontakt mit dem Kanal diesen blockieren und keiner Öffnung des Kanals bedürfen. Das bedeutet, dass sie in der Lage sind, den Kanal bereits von außerhalb der Zelle inhibieren zu können. Als ein Beispiel sei hier das ShK genannt (Kapitel 1.5.1).

Als weitere Gruppe existieren die *open channel*-Blocker, die einen phasischen Block verursachen. Wie ihr Name schon sagt, muss der Kanal sich erst öffnen, bevor sie ihre Wirkung entfalten können. Dieses ist z. B. beim Verapamil, einem Calciumkanalblocker, der Fall.

Als dritte Gruppe seien die C-Typ-Blocker genannt. Diese Blocker verstärken bei jedem erneuten Puls die Blockade bis ein *steady state* erreicht ist, wobei sie anders als die *open channel*-Blocker die C-Typ-Inaktivierung nicht beschleunigen. Solche Blocker sind z. B. Psora-4, PAP-1 und die Verbindung **35** (Abb. 4.4).

Als eine vierte Gruppe können die Blocker angesehen werden, die eine Kombina-

4. Testungen

tion aus *open channel*- und C-Typ-Blocker sind. Sie beschleunigen wie die *open channel*-Blocker die C-Typ-Inaktivierung, wobei sie allerdings nicht sofort ihre volle Blockadestärke entfalten, sondern wie die C-Typ-Blocker mit jedem weiteren Puls den Kanal stärker inhibieren, bis auch hier ein *steady state*-Gleichgewicht erreicht ist. Bei Verbindung 14 ist eine derartige Blockadekinetik vorhanden (Abb. 4.5).

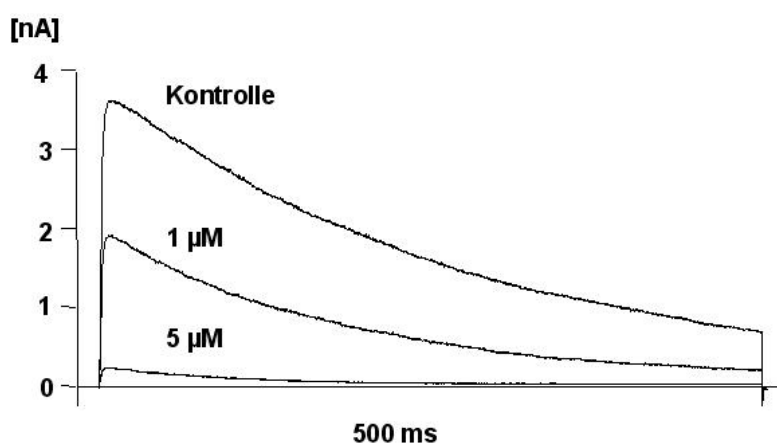


Abbildung 4.4: C-Typ-Blockade am Beispiel der Verbindung 35

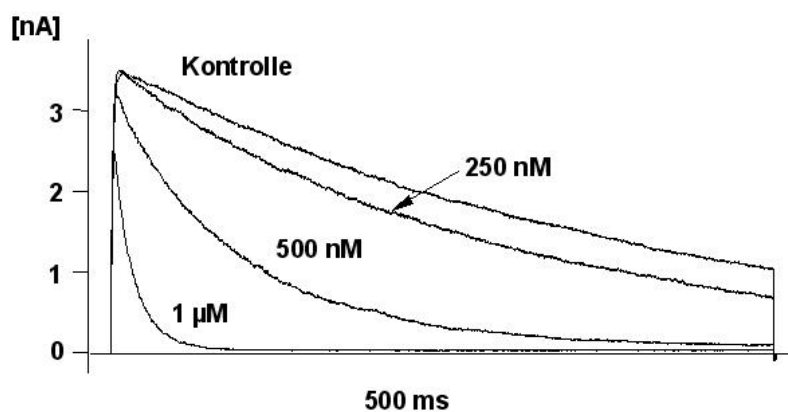


Abbildung 4.5: Kombination aus *open channel*- und C-Typ-Blocker am Beispiel der Verbindung 14

Je nachdem, was für eine Art von Blocker man vorliegen hat und welche Puls-längen und Methoden zur Auswertung verwendet werden, können sich mehr oder

weniger große Unterschiede für die EC_{50} -Werte ergeben. Hat man reine C-Typ-Blocker, wie z. B. das PAP-1, vorliegen, dann sind die nach der K_{Peak} - und der AUC-Methode ermittelten EC_{50} -Werte gleich und die Pulslänge spielt keine entscheidende Rolle. Man erreicht lediglich eher die Gleichgewichtseinstellung. Untersucht man dagegen *open channel*-Blocker bzw. Blocker mit einem starken phasischen Block, so gibt die K_{Peak} -Methode meist nicht die wirkliche Potenz an, sondern solche EC_{50} -Werte, die der Stärke des Blockers nicht ganz gerecht werden. Die Wirkstärke wird folglich als geringer, als sie tatsächlich ist, angenommen. Bei diesen Substanzen hat sich auch eine verlängerte Pulsdauer von Vorteil erwiesen, da so der phasische Block, das sogenannte *speeding up of inactivation*, besser zu erkennen ist.

Tabelle 4.4: EC_{50} -Werte am Kv1.3-Kanal: Kiel/Ulm im Vergleich mit Davis

Verbindung	EC_{50} -Werte (Kv1.3-Kanal)		Abweichung [%]
	Kiel/Ulm	Davis	
12	> 10 μ M	> 10 μ M	/
16	886 nM	890 nM	0,4
22	172 nM	165 nM	4,1
35	238 nM	233 nM	2,1
41	143 nM	150 nM	4,7
54	4,1 μ M	5 μ M	18,0

Die Abweichungen innerhalb einer Messreihe an derselben Anlage können teilweise bis zu 30 % betragen (vgl. Tab. 4.5). Zwischen zwei unterschiedlichen Anlagen variieren die Messergebnisse zum Teil um mehr als 30 %. Da es sich bei den Messsystemen um biologische Systeme handelt, die bekanntermaßen gewissen Schwankungen unterliegen (z. B. verschiedene Stadien des Zellwachstums), werden solche Abweichungen allgemein als akzeptabel angesehen.

Obwohl sich bei den Messungen für einige Substanzen gezeigt hat, dass sie teil-

4. Testungen

weise eine phasische Komponente bei der Blockade aufweisen, konnten keine stark abweichenden Werte beim Vergleich der Messreihen festgestellt werden. So liegt die prozentuale Abweichung der Werte der zwei zu vergleichenden Messreihen im Bereich von 0,5-18 % (Tab. 4.4) und damit im üblichen Abweichungsbereich. Somit können die Werte der zwei Messreihen Kiel/Ulm und Davis mit unterschiedlichem Experimentator und unterschiedlichem *setup* als gleichwertig angesehen werden.

Kv1.5-Messungen Der Kv1.5-Kanal ähnelt strukturell dem Kv1.3-Kanal (gleiche Familie), daher ist es möglich, dass Kv1.3-Kanalblocker auch am Kv1.5-Kanal eine Blockade verursachen. Dieses ist aber unter anderem daher unerwünscht, da Nebenwirkungen am Herz-Kreislauf-System auftreten können (siehe auch Kapitel 1.1.1.1.2). Um die Selektivitäten der einzelnen Substanzen bewerten zu können, wurden in Davis Messungen am Kv1.5-Kanal durchgeführt. Aus den ermittelten EC_{50} -Werten an beiden Kanälen lassen sich nun mittels der folgenden Gleichung 4.3 die Selektivitäten der Kv1.3-Kanalblockade gegenüber der Kv1.5-Kanalblockade bestimmen :

$$\text{Selektivität} = \frac{EC_{50Kv1.5}}{EC_{50Kv1.3}} \quad (4.3)$$

Da die Blockadewerte am Kv1.3-Kanal der Messungen Kiel/Ulm und Davis als gleichwertig angesehen werden können und die Blockaden am Kv1.5-Kanal ausschließlich in Davis gemessen wurden, werden für die Kv1.3-Werte des Weiteren ebenfalls die in Davis ermittelten Blockadewerte angegeben und für die Auswertung herangezogen. Somit entstammen alle im Folgenden angegebenen Blockadewerte den Messungen aus Davis.

In der Tabelle 4.5 sind die Blockadewerte für den Kv1.3-Kanal und den Kv1.5-Kanal sowie die Selektivität angegeben.

Tabelle 4.5: Blockadewerte am *mKv1.3*-Kanal und *hKv1.5*-Kanal

Verbindung	<i>mKv1.3</i> -Kanal	<i>hKv1.5</i> -Kanal	Selektivität
	EC ₅₀ -Wert	EC ₅₀ -Wert	
12	> 10 μ M	3,5 \pm 1 μ M	< 0,35
13	520 \pm 50 nM	520 \pm 30 nM	1
14	670 \pm 20 nM	1,5 \pm 0,5 μ M	2,24
15	10 μ M kein Effekt	~ 25 μ M	/
16	890 \pm 30 nM	1,5 \pm 0,4 μ M	1,69
17	450 \pm 50 nM	850 \pm 50 nM	1,89
18	1,0 \pm 0,2 μ M	10 \pm 1 μ M	10
19	12 \pm 1 μ M	15 \pm 2 μ M	1,25
20	7 \pm 1 μ M	10 \pm 2 μ M	1,43
21	10 μ M kein Effekt	10 μ M kein Effekt	/
22	165 \pm 20 nM	450 \pm 50 nM	2,73
33	200 \pm 20 nM	980 \pm 30 nM	4,9
34	150 \pm 30 nM	480 \pm 30 nM	3,2
35	233 \pm 15 nM	310 \pm 40 nM	1,33
36	1,5 \pm 0,2 μ M	2,5 \pm 0,5 μ M	1,67
37	1,0 \pm 0,1 μ M	1,0 \pm 0,2 μ M	1
41	150 \pm 10 nM	520 \pm 30 nM	3,47
44	650 \pm 50 nM	1,0 \pm 0,1 μ M	1,54
49	170 \pm 20 nM	200 \pm 30 nM	1,18
54	5 \pm 0,5 μ M	1,7 \pm 0,3 μ M	0,34
55	1 μ M kein Effekt	1 μ M kein Effekt	/
	10 μ M nicht löslich	10 μ M nicht löslich	
58	6 \pm 0,5 μ M	6 \pm 1 μ M	1
62	318 \pm 20 nM	280 \pm 30 nM	0,88

4.2. Lipophilie-Bestimmung

Die Lipophilie ist durch den Verteilungskoeffizienten P charakterisiert. Dieser gibt die Verteilungsverhältnisse einer Substanz zwischen zwei Phasen (Okta-nol/Wasser) im Gleichgewichtszustand an. In der Literatur findet man meistens die Angabe des Logarithmus P ($\log P$). Wird anstelle von Wasser ein Puffer mit definiertem pH-Wert verwendet, so spricht man von dem $\log D$ -Wert (z. B. bei pH 7,4: $\log D_{7,4}$) (SANGSTER, 1997). In der Arzneistoffentwicklung kommt es immer wieder zum Abbruch der Weiterentwicklung von Substanzen, da toxische Effekte in Tierversuchen festgestellt werden, unerwünschte Nebenwirkungen auftreten bzw. eine mangelnde Wirksamkeit vorliegt. Einer der häufigsten Gründe für einen Abbruch aber sind pharmakokinetische Probleme (KENNEDY, 1997). Das pharmakokinetische Verhalten von Substanzen wird maßgeblich durch ihre physikochemischen Eigenschaften, zu denen unter anderem auch die Lipophilie zählt, bestimmt. Es gibt verschiedene Modelle mittels derer man versucht, die pharmakokinetischen Vorgänge und die physikochemischen Eigenschaften von Substanzen zu korrelieren. So wurde 1997 von LIPINSKI ET AL. die *rule of five* entwickelt (LIPINSKI ET AL., 1997). Diese Regel besagt, dass eine schlechte Absorption oder Permeation einer Verbindung wahrscheinlich ist, wenn zwei der folgenden vier Parameter nicht erfüllt sind:

- Wasserstoffbrückendonatoren < 5 (Σ OH, NH)
- Wasserstoffbrückenakzeptoren < 10 (Σ O, N)
- Molekulargewicht < 500 g/mol
- $\log P < 5$

Die Lipophilie hat Einfluss auf die Absorption und damit auf die Bioverfügbarkeit, Rezeptorbindung und die Metabolisierung eines Stoffes. Damit ein Stoff gut in der Blutbahn transportiert werden kann, muss er ausreichend hydrophil sein. Im Gegenzug muss aber auch eine gewisse Anzahl an lipophilen Strukturen vorhanden

4.2. Lipophilie-Bestimmung

sein, damit der Stoff Biomembranen (z. B. die Blut-Hirn-Schranke) überwinden kann. Um diese Voraussetzung zu erfüllen, sollte ein potentieller Arzneistoff unter anderem eine mittlere Lipophilie aufweisen. Bei oral verfügbaren Substanzen ist ein log P-Wert im Bereich von 0-3 angezeigt, wohingegen injizierbare Substanzen einen niedrigeren log P-Wert (< 0) besitzen sollten, um gut wasserlöslich zu sein. Die Lipophilie wird nicht nur bei Bioverfügbarkeitsstudien mit einbezogen, sondern auch bei quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen (*quantitative structure-activity relationships*, QSAR) betrachtet (REKKER, 1977). Das Ziel solcher QSAR ist es, eine Vorhersage der biologischen Wirksamkeit aufgrund der chemischen Struktur treffen zu können, um eine rationelle Arzneistoffentwicklung zu ermöglichen (SEYDEL UND SCHAPER, 1979). Bereits Ende des 19. Jahrhunderts konnte ein solcher Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur und der Wirksamkeit gezeigt werden. OVERTON und MEYER postulierten 1899 unabhängig voneinander, dass die Wirksamkeit von Anästhetika mit ihrer Lipophilie korreliert („MEYER-OVERTON-Korrelation“, OVERTON, 1899 und MEYER, 1899). Dieses konnte von BAUM noch im gleichen Jahr bestätigt werden (BAUM, 1899). Für die synthetisierten Verbindungen, deren Wirkung am Kv1.3-Kanal getestet wurde, sollte die Lipophilie bestimmt werden, um zu prüfen, ob eine Korrelation zwischen ihrer Wirkung am Kv1.3-Kanal und ihrer Lipophilie besteht. Ferner sollte untersucht werden, ob die Lipophilie-Werte, wie in der *rule of five* für eine gute Bioverfügbarkeit gefordert, einen Wert < 5 aufweisen.

Die Bestimmung wurde mittels der Gradienten-Methode angelehnt an KRASS ET AL. durchgeführt (KRASS ET AL., 1997). Dieses Verfahren kann als Standardmethode für die Ermittlung der Lipophiliewerte angesehen werden (CARSTENS, 2004). Aufgrund der chemischen Struktur der zu untersuchenden Verbindungen sind höhere log P-Werte zu erwarten. Wie sich bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt hat (CARSTENS, 2004), eignet sich die Gradienten-Methode gerade für höhere Lipophilie-Werte und daher besonders gut zur Ermittlung der log P-Werte der synthetisierten Substanzen.

4. Testungen

4.2.1. Materialien und Geräte

HPLC Pumpe:	Waters Breeze Binary HPLC Pumpe 1525		
Autosampler:	Waters 717 Plus Autosampler		
Detektor:	Waters 486 Tunable Adsorbens Dectector Waters 2475 Fluorescence Detector		
Integrator:	Waters Breeze® Version 3.20 (Software)		
Stationäre Phase:	Kromasil® 100 C18 μm ; 60 x 4.6 mm VDS Optilab Chromatographie Technik GmbH		
Säulenofen:	Peltier Kolonnenthermostat für HPLC und GC jetstream		
Säulentemperatur:	25 °C		
Mobile Phase:	Komponente A : 11 mM Sörensen-Phosphat-Puffer: (9 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und 2 mM KH_2PO_4 in <i>Aqua bidestillata</i> , pH 7,4, eingestellt mit konz. H_3PO_4) Komponente B : Acetonitril		
Injektionsvolumen:	20 μl		
Flussrate:	1 ml/min		
Gradient:	Zeit [min]	Komponente A [%]	Komponente B [%]
	0	30	70
	55	85	15
Detektion:	214 nm (Standardsubstanzen) $\lambda_{Ex} = 246 \text{ nm}$ (zu vermessende Verbindungen) $\lambda_{Em} = 450 \text{ nm}$ (zu vermessende Verbindungen)		

Als Standardsubstanzen wurden *p*-Methylbenzaldehyd und die homologe Reihe der Alkylbenzole (Toluol, Ethyl-, *n*-Propyl-, *n*-Butyl-, *n*-Pentyl-, *n*-Hexyl-, *n*-Heptyl-, *n*-Octylbenzol) verwendet. Uracil (gelöst in Wasser) wurde als Totzeitmarker verwendet.

4.2.2. Durchführung

Die Komponente A wurde nach der Herstellung zunächst membranfiltriert (Porenweite: $0,45\ \mu\text{m}$). Anschließend folgte eine 20-minütige Entgasung beider Komponenten im Ultraschallbad. Es wurden Stammlösungen sowohl von den Standardsubstanzen ($\sim 20\ \mu\text{l}/5\ \text{ml}$ Acetonitril) als auch von den zu vermessenden Verbindungen (Spatelspitze bzw. Tropfen Substanz/ml Acetonitril) angefertigt. Da zur Auswertung nur die Retentionszeiten, nicht aber die Peakflächen herangezogen wurden, brauchten keine genau definierten Konzentrationen der Verbindungen hergestellt werden. Zunächst wurden die Standardsubstanzen einzeln vermessen, um deren Retentionszeiten exakt festlegen zu können. Dann wurde jeweils eine der zu analysierenden Substanzen in einem Gemisch aus Puffer und Acetonitril (30:70) gelöst und unter Zusatz der Standardsubstanzen vermessen. Es erfolgte jeweils eine Dreifachbestimmung.

In Abbildung 4.6 ist ein HPLC-Chromatogramm der oben beschriebenen Methode am Beispiel der Substanz **20** dargestellt.

4. Testungen

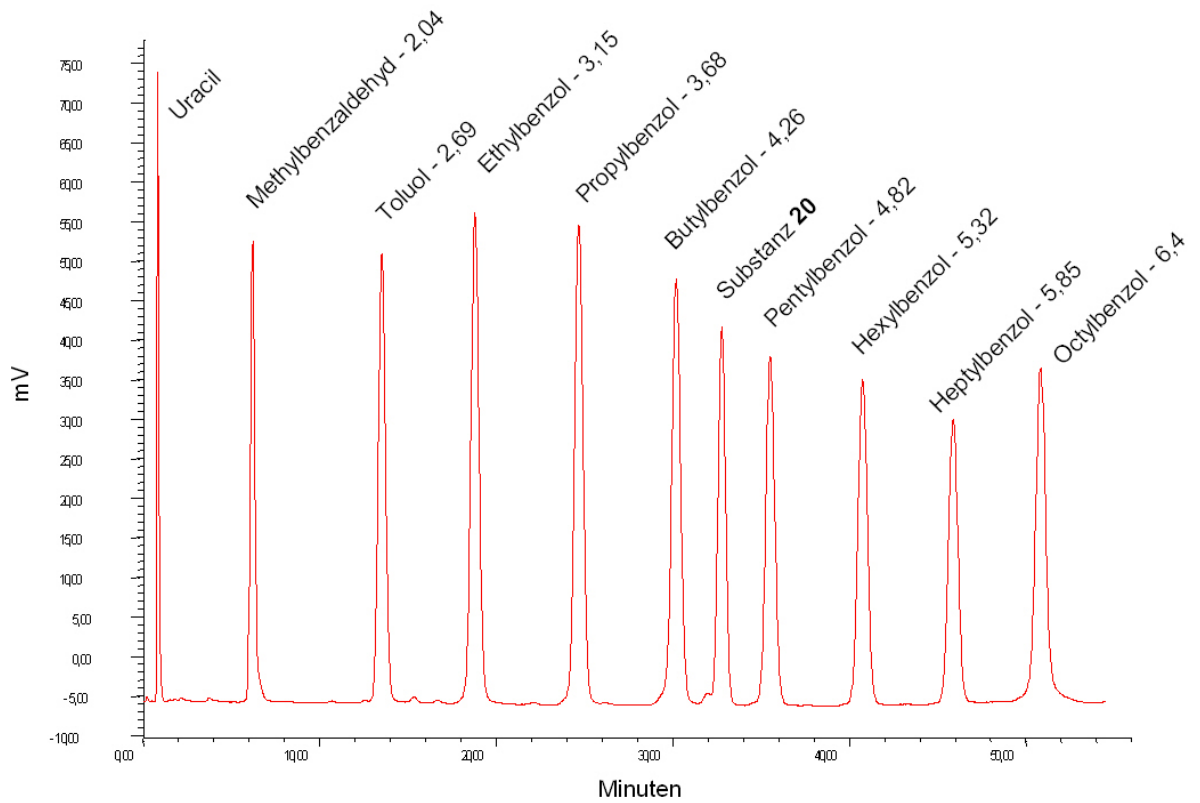


Abbildung 4.6: HPLC-Chromatogramm der log P-Wert-Bestimmung der Substanz 20 ($\log P = 4,55$). Die Peaks sind jeweils mit dem Namen der Substanzen beschriftet. Bei den Standardsubstanzen sind zudem die hier in der Arbeit verwendeten log P-Werte angegeben.

4.2.3. Ergebnisse

Es wird mit einem Puffer bei einem pH-Wert von 7,4 gearbeitet. Somit kann die Lipophilie beim physiologischen pH-Wert 7,4 (z. B. pH-Wert des Blutes) bestimmt werden. Aufgrund der Strukturen der zu vermessenden Verbindungen kann davon ausgegangen werden, dass die Stoffe bei einem pH-Wert von 7,4 nicht ionisiert vorliegen und somit der $\log D_{7,4}$ -Wert dem $\log P$ -Wert entspricht. Im Folgenden wird daher weiter vom $\log P$ -Wert gesprochen.

Mit Hilfe der ermittelten Retentionszeiten der Standardsubstanzen lassen sich die Kapazitätsfaktoren k' nach der Gleichung 4.4 berechnen.

$$k' = \frac{\text{Nettoretentionszeit}}{\text{Totzeit}} \quad (4.4)$$

Es werden die berechneten k' -Werte der Standardsubstanzen gegen die aus der Literatur entnommenen bzw. mittels eines $\log P$ -Wert-Berechnungsprogramms errechneten $\log P$ -Werte der Standardsubstanzen aufgetragen und eine Regressionsgerade erstellt (LEO ET AL., 1971 und INTERACTIVE ANALYSIS, 2007). Für die zu bestimmenden Substanzen werden ebenfalls mittels der Gleichung 4.4 die k' -Werte berechnet. Anhand der Regressionsgerade können die $\log P$ -Werte abgelesen werden.

In der Tabelle 4.6 sind die Lipophilie-Werte (zusammen mit den Kv1.3-EC₅₀-Werten) der getesteten Verbindungen aufgelistet.

4. Testungen

Tabelle 4.6: Ergebnisse der Lipophilie-Bestimmungen

Verbindung	EC ₅₀ -Wert (Kv1.3-Kanal)	log P-Wert
12	> 10 μ M	3,69
13	520 nM	3,85
14	670 nM	3,42
15	> 10 μ M	2,65
16	890 nM	3,75
17	450 nM	3,85
18	1 μ M	4,82
19	12 μ M	5,21
20	7 μ M	4,55
21	> 10 μ M	5,94
22	165 nM	4,13
33	200 nM	3,75
34	150 nM	3,67
35	233 nM	3,71
36	1,5 μ M	3,62
37	1 μ M	3,79
41	150 nM	3,87
44	650 nM	4,67
49	170 nM	3,47
55	> 10 μ M	6,26
54	5 μ M	3,20
58	6 μ M	3,44
62	318 nM	4,16

Bei den Verbindungen **12**, **15**, **21** und **55** sind die Wirksamkeiten am Kv1.3-Kanal zur Vereinfachung alle mit einem EC₅₀-Wert > 10 μ M angegeben. Für genauere Angaben siehe Tabelle 4.5 (Kapitel 4.1.1.3).

5. Diskussion

5.1. Struktur-Wirkungsbeziehungen

In vorangegangenen Arbeiten wurden zunächst die Inhaltsstoffe der Gartenraute isoliert, darauffolgend viele Derivate synthetisiert und zahlreiche Strukturvariationen durchgeführt. Dadurch konnte der potenteste niedermolekulare Blocker des Kaliumkanals Kv1.3 PAP-1 (Kapitel 1.5.1 (Abb. 1.5) und 2.1.1.1.3) entwickelt werden. Dabei wurde durch die Einführung einer 4-Phenoxybutyl-Seitenkette eine enorme Steigerung der Blockadepotenz im Vergleich zur Ausgangsverbindung, dem 5-Methoxypsoralen (Bergapten), erreicht. Wie bereits in Kapitel 2 angesprochen, sollte nun im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, wie von ausgewählten Substanzen durch Einführung der 4-Phenoxybutyl-Seitenkette die Wirkungen am Kaliumkanal Kv1.3 beeinflusst wurden. Von einigen Grundkörpern bzw. von einigen Verbindungen, die den Grundkörpern ähneln, waren bereits aus vorangegangenen Untersuchungen die EC_{50} -Werte bekannt, so konnte in diesen Fällen ein direkter Vergleich der Wirkstärke gezogen werden. In der Tabelle 5.1 sind die ermittelten EC_{50} -Werte der synthetisierten 4-Phenoxybutoxy-Derivate bzw. des einen 4-Phenoxybutyl-Derivates (Verbindung **22**) dargestellt sowie, sofern vorhanden, die EC_{50} -Werte von Verbindungen, die jeweils eine dem Grundkörper ähnliche Struktur aufweisen.

5. Diskussion

Tabelle 5.1: EC₅₀-Werte der synthetisierten Verbindungen und von Vergleichssubstanzen

synthetisierte Verbindung	EC ₅₀ -Wert [μ M bzw. nM]	strukturähnlicher Grundkörper	EC ₅₀ -Wert [μ M bzw. nM]
12	> 10 μ M	/	/
13	520 nM	H-89 (Abb. 1.5)	1,7 μ M
14	670 nM	Furochinolinone*	> 5 μ M
15	> 10 μ M	/	/
16	890 nM	Cumarin-Derivate*	> 5 μ M
17	450 nM	H37 (Abb. 1.5)	10 μ M
18	1 μ M	/	/
19	12 μ M	/	/
20	7 μ M	/	/
21	> 10 μ M	/	/
22	165 nM	N-alkylierte Acridone*	> 10 μ M
33	200 nM	23	/
34	150 nM	24 **	10 μ M
35	233 nM	25	/
36	1,5 μ M	26	/
37	1 μ M	27 ^o	160 μ M
41	150 nM	Cumarin-Derivate*	> 5 μ M
44	650 nM	Benzofuran-Derivat 45 ^o	46 μ M
49	170 nM	25	/
55	> 10 μ M	/	/
54	5 μ M	4-Methyl-6,7-methylenedioxy- cumarin (Strukturisomer) ^{oo}	~ 100 μ M
58	6 μ M	/	/
62	318 nM	H37 (Abb. 1.5)	10 μ M

* siehe Kap. 2.1.1.1.2; ** CHANDY ET AL., 2006; ^o HERZOG, 2000; ^{oo} WULFF, 1998; Für genauere Angaben zu den EC₅₀-Werte der Verb. **12**, **15**, **21** und **55** siehe Tab. 4.5 (Kap. 4.1.1.3).

5.1. Struktur-Wirkungsbeziehungen

Neben dem in erster Linie zu prüfenden Einfluss der Einführung der Seitenkette sollten zudem, sofern möglich, Struktur-Wirkungsbeziehungen diskutiert werden. Um dieses durchführen zu können, braucht man möglichst viele strukturell ähnliche Substanzen, die zudem an der gleichen biologischen Zielstruktur angreifen (BÖHM ET AL., 1996). Als eine Schwierigkeit ergibt sich hierbei, dass es bis heute noch nicht gelungen ist, den Kv1.3-Kanal, der in diesem Fall die Zielstruktur darstellt, zu kristallisieren und seine Struktur mittels der Röntgenstrukturanalyse aufzuklären. Somit ist es auch nicht möglich, Bindungsaffinitäten über eine Kristallisation des „Kanal-Blocker-Komplexes“ zu bestimmen. So kann man lediglich mittels der Blockade-Unterschiede der verschiedenen Blocker auf die für eine Bindung benötigten Strukturen schließen. Die zu untersuchenden Substanzen gleichen sich in ihrer Seitenkette, die Grundkörper sind aber zum Teil sehr verschieden. Es werden daher erst einmal die Verbindungen miteinander verglichen, die den gleichen Grundkörper aufweisen. Infolgedessen sollen dann, soweit möglich, allgemeine Schlussfolgerungen für die gesamte Gruppe der synthetisierten Verbindungen gezogen werden.

Eine Übersicht über die Strukturen der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen befindet sich in Kapitel 3.3.

Als Grundkörper wurden zum einen Verbindungen eingesetzt, die denen der Gartenrauteninhaltsstoffe gleichen bzw. ähneln. Zum anderen wurden Verbindungen eingesetzt, die nicht planar, sondern gewinkelt aufgebaut waren (z. B. Verbindung **19**) bzw. eine andere räumliche Ausdehnung aufwiesen (z. B. Verbindung **21**). Die im Folgenden angegebenen Positionsnummern beziehen sich auf die IUPAC-Nomenklatur. Die in der Tabelle 5.1 aufgeführten EC_{50} -Werte für die Vergleichssubstanzen liegen bei Werten oberhalb von $5 \mu\text{M}$ (außer für H-89, $EC_{50} = 1,7 \mu\text{M}$). Betrachtet man nun im Vergleich die Werte für die jeweils synthetisierten Verbindungen, so ist festzustellen, dass eine zum Teil deutliche Steigerung der Blockadepotenz zu erkennen ist. So weist z. B. die Verbindung **37** gegenüber der Ausgangsverbindung **27** eine deutliche, um das 160-fache bessere Wirksamkeit auf. Bei den Verbindungen **12**, **15**, **18-21**, **33**, **35**, **36**, **49**,

5. Diskussion

55 und **58** sind keine Vergleichswerte angegeben. Die Verbindungen **12**, **15**, **21** und **55** zeigten in den *patch-clamp*-Untersuchungen in Konzentrationen kleiner als $10\ \mu\text{M}$ keine Wirkung. Aufgrund der Tatsache, dass bereits „nanomolare Blocker“ bekannt sind, wurde die genaue Wirkkonzentration nicht näher bestimmt. Die Verbindungen **18-20**, **36** und **58** sind mit EC_{50} -Werten im Bereich von $1\ \mu\text{M}$ bis $12\ \mu\text{M}$ wirksam.

Die EC_{50} -Werte der Verbindungen **33**, **35** und **49** liegen zwischen 170 und $233\ \text{nM}$. Im folgenden werden die Verbindungen näher verglichen, die sich in ihrer Struktur nur geringfügig unterscheiden. Die Verbindungen **12-15** sind stickstoffhaltige Bizeyklen. Die beiden Verbindungen **12** und **15**, bei denen sich die Seitenkette in 4-Position befindet, sind unwirksam (EC_{50} -Wert $> 10\ \mu\text{M}$). Das Chinolin-Derivat **14**, das ebenfalls die Kette in Position 4 trägt, weist einen EC_{50} -Wert im nanomolaren Bereich auf ($670\ \text{nM}$). Beim Isochinolin-Derivat **13** mit der Seitenkette in Position 5 liegt der EC_{50} -Wert bei $520\ \text{nM}$. Somit scheint sich zum einen die Seitenkette am Ring, der kein Stickstoffatom aufweist, positiv auszuwirken und zum anderen die Chinolinon-Teilstruktur günstige Einflüsse auszuüben.

Bei den Cumarinen **16** und **41** sowie dem Flavon-Derivat **18**, das ein Strukturisomer darstellt, zeigt sich ebenfalls, dass die Seitenkette in Position 5, also an dem Carbozyklus, von Vorteil ist. So wird bei der Substanz **41** sogar ein EC_{50} -Wert von $150\ \text{nM}$ erreicht.

Die Verbindungen **35**, **36**, **49**, **54** und **58** sind trizyklische Chromen-4-on-Derivate mit EC_{50} -Werten in einem Bereich von $170\ \text{nM}$ bis $6\ \mu\text{M}$. Die Wirksamkeit nimmt von der Verbindung **49** ($170\ \text{nM}$), die außer der Seitenkette keinen weiteren Substituenten trägt, über das 7-Methylderivat **35** ($233\ \text{nM}$) hin zum 9-Methoxy-7-methyl-Derivat **36** ($1,5\ \mu\text{M}$) ab. Die Verbindungen **54** und **58**, die anstelle des in den anderen Verbindungen enthaltenen Furanringes eine Methylendioxo-Teilstruktur bzw. einen Chromen-2-on-Ring aufweisen, sind mit EC_{50} -Werten von $5\ \mu\text{M}$ bzw. $6\ \mu\text{M}$ die am wenigsten wirksamen Substanzen dieser Gruppe. Es zeigt sich also, dass durch die Einführung von Substituenten sowie den Ersatz des Furanringes die Wirksamkeit der Chromen-4-on-Derivate abgeschwächt wird.

5.1. Struktur-Wirkungsbeziehungen

Für die Furocumarin-Derivate **17**, **37** und **62** ergeben sich EC₅₀-Werte im Bereich von 318 nM bis 1 μ M. Die einfach substituierte (Seitenkette in Position 9) Verbindung **37** weist dabei die geringste Potenz auf. Zusätzliche Substitutionen in den Positionen 4 und 5 wirken sich positiv auf die EC₅₀-Werte aus, wobei eine in Position 9 befindliche Seitenkette günstiger als eine in Position 5 erscheint. Das Benzofuran-Derivat **44** kann als Teilstruktur der Furocumarine aufgefasst werden und entspricht so den in Position 4 mit der Seitenkette substituierten Furocumarinen. Es weist eine Wirksamkeit von 650 nM auf und ist damit potenter als Verbindung **37**.

Die Furochinoline **33** und **34** zählen mit ihren EC₅₀-Werten von 200 nM bzw. 150 nM zu den potentesten Verbindungen. Diese beiden Strukturisomere unterscheiden sich nur in der Stellung ihrer beiden Methoxygruppen.

Das Acridon-Derivat **22** ist anders als die anderen Substanzen nicht am Sauerstoff alkyliert, sondern am Stickstoff, weist aber mit einem EC₅₀-Wert von 165 nM nahezu die beste Wirksamkeit auf.

Sowohl das Phenanthren-Derivat **21**, das frei von Heteroatomen ist und eine andere räumliche Anordnung der Ringe besitzt, als auch die durch die dreifache Substitution mit der Seitenkette sehr voluminöse Verbindung **55** sind beide unwirksam (EC₅₀-Werte > 10 μ M).

Die unplanare Verbindung **19** und das Anthrachinon-Derivat **20** weisen beide geringe Wirksamkeiten auf (12 μ M bzw. 7 μ M).

Aus den oben dargestellten Ergebnissen, lässt sich ableiten, dass durch die Einführung der Seitenkette durchaus eine Steigerung der Blockadepotenz zu erreichen ist. Allerdings kann man nicht generell sagen, dass jegliche bityklischen bzw. trityklischen Systeme durch die Seitenketteneinführung zu potenten Kv1.3-Blockern werden. Es scheinen gewisse nukleophile Teilstrukturen und die Position der Seitenkette eine wichtige Rolle zu spielen (vgl. Verbindungen **12-14**). Zudem zeigte sich, dass die räumliche Ausdehnung ebenfalls von Bedeutung ist, z. B. beim Vergleich der Verbindungen **49** und **58**.

5.2. Struktur-Lipophilie-Beziehungen

Die Lipophilie ist, wie in Kapitel 4.2 bereits beschrieben, ein wichtiger physikochemischer Parameter der unter anderem die Pharmakokinetik von Substanzen beeinflusst. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Beziehung zwischen der Lipophilie und der Wirksamkeit der synthetisierten Verbindungen besteht. Die Lipophiliewerte liegen zwischen 2,65 und 6,26, wobei nur drei Werte oberhalb von 5 liegen (Verbindungen **19**, **21** und **55**). Somit ist laut der *rule of five* (LIPINSKI ET AL., 1997) bei den meisten Verbindungen, außer denen, die einen log P-Wert größer als 5 aufweisen, eine Voraussetzung für eine Resorption gegeben. In der Tabelle 4.6 im Kapitel 4.2 sind die Lipophilie-Werte neben den EC_{50} -Werten der Verbindungen aufgelistet. Diese Daten sind in der Abbildung 5.1 graphisch dargestellt (logarithmische Darstellung).

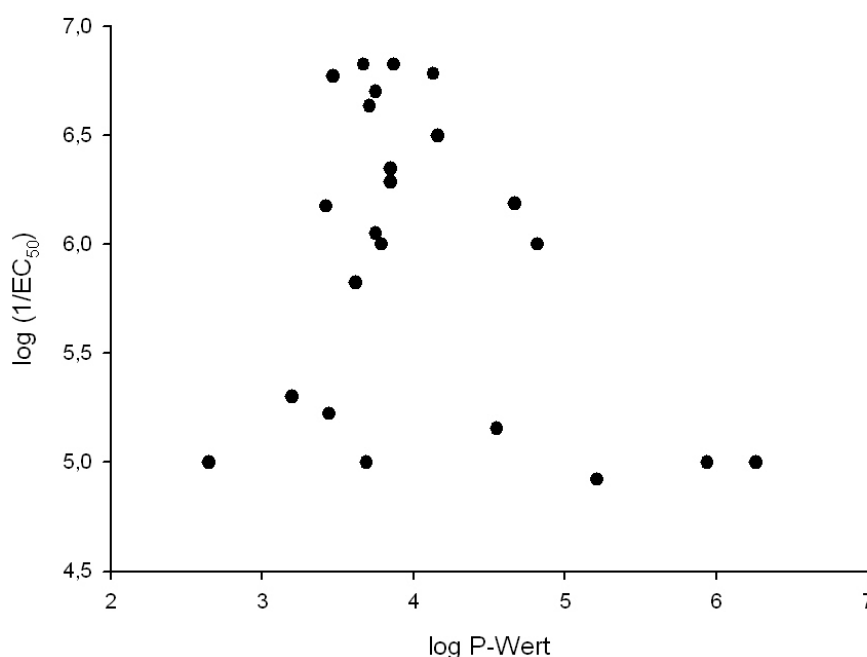


Abbildung 5.1: Lipophilie-Wirkungs-Korrelation: Darstellung der $\log (1/EC_{50})$ - und der dazugehörigen log P-Werte

Es lässt sich keine direkte Beziehung zwischen der Wirkung und der Lipophilie erkennen. Es fällt lediglich auf, dass die potenteren Substanzen eher mittlere

Lipophilie-Werte im Bereich von 3,4-4,3 aufweisen. Es kann aber dennoch nicht von der Lipophilie auf die Wirksamkeit geschlossen werden.

5.3. Struktur-Selektivitäts-Beziehungen

Für potentielle Arzneistoffe spielt die Selektivität eine wichtige Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit sollte besonders die Selektivität gegenüber dem naheverwandten, kardialen Kv1.5-Kanals untersucht werden (Kapitel 1.1.1.1), da ein proarrhythmogenes Potential von Substanzen, die neben der Kv1.3-Kanalblockade auch Effekte am Kv1.5-Kanal hervorrufen, nicht sicher ausgeschlossen werden kann. In der Tabelle 4.5 im Kapitel 4.1 sind die EC₅₀-Werte der Kv1.3- und der Kv1.5-Kanalblockaden aufgeführt. Dabei ergaben sich für die Verbindungen **12**, **54** und **62** Selektivitäten < 1. Diese Verbindungen blockieren also den Kv1.5-Kanal mit höherer Potenz. Bei den anderen Verbindungen resultierten Selektivitäten im Bereich von 1 bis 10. Somit sind sie ähnlich selektiv wie das Psora-4 (2,6-fach), aber deutlich unselektiver als das PAP-1 (23-fach). Aufgrund dieser recht geringen Blockadeunterschiede der synthetisierten Verbindungen lässt sich keine eindeutige Aussage über die für eine Selektivität benötigten Strukturen treffen.

Zusammenfassend lässt sich für die synthetisierten Verbindungen feststellen, dass sich durch die Einführung der 4-Phenoxybutyl-Seitenkette zum Teil eine deutliche Potenzsteigerung erreichen ließ. Als Strukturelemente spielen dabei, neben der Seitenkette, nukleophile Elemente sowie die Position der Seitenkette eine Rolle. Ebenso scheinen sich planare, lineare bi- oder trizyklische, sowie möglichst zusätzlich zur Seitenkette unsubstituierte Grundkörper günstig auf die Blockadepotenz am Kv1.3-Kanal auszuwirken. Die in vorangegangenen Untersuchungen erreichte Potenzsteigerung um den Faktor 50000 vom 5-Methoxypsoralen zum PAP-1 ließ sich allerdings nicht erreichen. Gerade jedoch bei den Furochinolinen, Verbindungen **33** und **34**, wurde eine ähnlich starke Wirksteigerung erhofft, da das Kokusagin (24), das als Ausgangsverbindung für die Verbindung **34**

5. Diskussion

eingesetzt wurde, bereits gegenüber dem 5-Methoxyypsoralen eine um den Faktor 10 bessere Wirksamkeit aufwies. Unter anderem lässt sich aufgrund dieser Tatsache annehmen, dass für die hohe Potenz des PAP-1 ähnliche, wie kürzlich für das Correolide festgestellte Effekte verantwortlich sind (Kapitel 1.5.1). Die nukleophilen Sauerstoffe des PAP-1 scheinen dabei einen optimalen Abstand für die Komplexierung der in der Pore gebundenen Kaliumionen darzubieten, wodurch sich vermutlich ein hochpotenter Kanal-Blocker-Komplex ausbildet. Für das PAP-1 wird zudem eine zusätzliche Bindungsstelle angenommen (SCHMITZ, 2004), was die höhere Potenz im Vergleich zum Correloide (EC_{50} -Wert = 86 nM) erklären könnte. Für die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen kann teilweise ebenfalls der fürs PAP-1 beschriebene Mechanismus (Komplexierung von Kaliumionen in der Pore sowie eine zweite Bindungsstelle) angenommen werden. So zum Beispiel für die Verbindung **41**. Allerdings fehlt durch das Wegfallen des Furanrings ein zusätzlicher nukleophiler Sauerstoff. Dieser scheint aber für eine weitere Wirksteigerung wichtig zu sein.

Die Lipophilie-Werte der Verbindungen liegen, außer bei den Verbindungen **19**, **21** und **55**, unterhalb von 5 und entsprechen somit der *rule of five*, so dass dadurch eine Resorption der Substanzen möglich erscheint. In Untersuchungen an Ratten hatte sich für das Psora-4 gezeigt, dass es trotz eines log P-Wertes von < 5 (4,33) zu Ausfällungen in den Geweben der Ratten gekommen ist (WULFF, 2005, persönliche Mitteilung). Daher sollte die Grenze der log P-Werte für potentielle Arzneistoffe nicht erst bei > 5 gezogen werden. Es sollte vielmehr bereits ab einem log P-Wert von 4 daran gedacht werden, dass es gegebenenfalls zu Ausfällungen kommen kann.

Im Hinblick auf die Selektivität der synthetisierten Verbindungen, lassen sich aufgrund der hier ermittelten Werte keine allgemein gültigen Schlüsse ziehen.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Mit der *Ruta*-Forschung wurde aufgrund von Berichten aus Chile, dass das Trinken von Gartenrautentee positive Effekte auf die Symptome der Multiplen Sklerose habe, Ende der 80iger Jahre begonnen. Es stellten sich nach Extraktion der Gartenraute (*Ruta graveolens*) und Untersuchungen der wässrigen Extrakte an dem Riesenfroschaxon als kaliumkanalblockierende Substanzen sowohl Furochinoline als auch Furocumarine heraus. Das 5-Methoxypsoralen (5-MOP, Abb. 1.5), ein Furocumarin, erwies sich dabei als potenteste Verbindung. Daher wurden in der Folge zahlreiche Derivate des 5-MOP hergestellt. Dabei stellte man fest, dass die Position der Seitenkette und deren Länge eine entscheidende Rolle spielten. Mit dem Psora-4 (Abb. 1.5) gelang es, den bis zu diesem Zeitpunkt potentesten Kv1.3-Kanalblocker herzustellen. Im Zuge der Entwicklung des Psora-4 zeigte sich, dass durch Einführung einer vier Methylen-Gruppen umfassenden Seitenkette, die das Furocumarin-Grundgerüst mit einem Phenylring verband, die Potenz enorm gesteigert werden konnte. Die Verbindung wies einen Hill-Koeffizienten (siehe Kapitel 4.1.1.3) von 2 auf, daher wurde für das Psora-4 eine zweite Bindungsstelle postuliert. Zur Verbesserung der Selektivität und Reduktion der Lipophilie wurden darauffolgend Variationen an der Seitenkette durchgeführt. Hierbei konnte durch die Einführung eines weiteren Sauerstoffs in die Seitenkette eine genauso potente, aber deutlich selektivere Verbindung geringerer Lipophilie, die ebenfalls einen Hill-Koeffizienten von 2 zeigte,

6. Zusammenfassung und Ausblick

erzeugt werden, das PAP-1 (Abb. 1.5). Zur weiteren Abklärung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurde in der Folge der Phenylring der Seitenkette mit verschiedensten Substituenten versehen bzw. wurde der Phenylrest durch andere zyklische Strukturen ersetzt. Dabei stellte sich heraus, dass lediglich das Volumen bzw. sterische Effekte, nicht aber Elektroneneinflüsse der Substituenten eine Rolle zu spielen schienen. Mit der 4-Phenoxybutoxy-Seitenkette war somit die für das Furocumarin-Grundgerüst optimale Seitenkette gefunden. Im Folgenden sollte nun die Seitenkette beibehalten und der Grundkörper variiert werden, um weitere Struktur-Wirkungs-Beziehungen durchführen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte infolgedessen überprüft werden, wie sich die Einführung der 4-Phenoxybutyl-Seitenkette auf die Wirksamkeiten anderer Grundkörper auswirkt. Dazu wurde eine Reihe von Substanzen synthetisiert. Zum einen wurden dabei Grundkörper umgesetzt, die in der Gartenraute enthalten sind und von denen durch vorangegangene Untersuchungen teilweise die Wirksamkeiten am Kv1.3-Kanal bekannt waren. Zum anderen verwendete man weitere Grundkörper anderer Struktur, deren Wirksamkeiten allerdings nicht bekannt waren. Wie aus den Ergebnissen in Kapitel 4.1.1.3 hervorgeht, wurden EC_{50} -Werte von hinunter bis zu 150 nM gemessen. Im Vergleich zu den bekannten Werten für die Wirksamkeit der unsubstituierten Grundkörper (EC_{50} -Werte $> 5 \mu M$), konnte folglich eine deutliche Potenzsteigerung erreicht werden. Zum Teil waren aber auch einige Substanzen hergestellt worden, die sich als unwirksam erwiesen (EC_{50} -Werte $> 10 \mu M$). Somit kann man nicht generell von einer Wirksteigerung ausgehen, wenn bi- oder trizyklische, elektronenreiche Systeme mit der 4-Phenoxybutyl-Seitenkette umgesetzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten des Weiteren die Selektivitäten der hergestellten Verbindungen gegenüber dem kardialen Kv1.5-Kanal ermittelt werden. Dabei zeigte sich, dass einige Substanzen, besonders die wirksameren, eine ausreichende Selektivität (bis zum Vierfachen) aufwiesen, wohingegen andere Substanzen sogar den Kv1.5-Kanal mit einer höheren Präferenz blockierten.

Für die ebenfalls in dieser Arbeit bestimmten Lipophilie-Werte der Substanzen konnte keine Korrelation mit der Wirkung gezeigt werden, wobei sich aber mittlere Lipophilie-Werte im Bereich von 3,4 bis 4,3 als günstig erwiesen.

Betrachtet man diese und alle vorangegangenen Arbeiten zur *Ruta*-Forschung, so kann zusammenfassend vermutet werden, dass mit dem PAP-1 wohl bereits die potenteste Verbindung, die zudem noch ausreichend selektiv und von akzeptabler Lipophilie war, hergestellt wurde. Durch die hier in der Arbeit vorgenommenen Variationen konnte zumindest diese Wirksamkeit nicht erreicht werden.

Um aber zusätzliche Informationen über die Struktur des Grundkörpers zu gewinnen und im Hinblick auf die Steigerung der Selektivität, wäre es für nachfolgende Untersuchungen sehr interessant, weitere Substanzen herzustellen, die zu den in dieser Arbeit synthetisierten, am besten wirksamen Verbindungen nur geringe Strukturvariationen aufweisen. So könnte von der Verbindung **22**, das *O*-alkylierte Derivat hergestellt werden, um *N*- und *O*-alkylierte direkt vergleichen zu können. Des Weiteren wäre die Darstellung des in Position 4 substituierten Derivates der Verbindung **62** von großem Interesse. Zudem bietet sich eine erneute Variation der Seitenkette an, um zu untersuchen, ob sich für die jeweiligen Grundkörper durch andere Seitenkettenstrukturen die Wirksamkeiten noch steigern lassen.

Es hatte sich, wie in Kapitel 4.1.1.3 bereits erwähnt, für einige Substanzen keine reine C-Typ-Blockade, sondern eine Kombination aus einem C-Typ- und einem phasischen Blocker ergeben. Daher stellt die Abklärung der Blockadekinetik ein weiteres Ziel zukünftiger Arbeiten dar.

7. Experimenteller Teil

7.1. Materialien und Geräte

7.1.1. Chemikalien

Sämtliche verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Lancaster (Mühlheim), Acros Organics (Belgien) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen, einschließlich Fluka) bezogen. Die Lösungsmittel, die für die Isolierung von Skimmianin **23** und Kokusaginin **24** sowie für die Synthesen verwendet wurden, stammten aus den allgemeinen Industrielieferungen an das Pharmazeutische Institut der CAU Kiel. Bei einigen Synthesen war der Einsatz von getrockneten Lösungsmitteln erforderlich. Im Folgenden sind diese Lösungsmittel (Trocknungsmittel und Literaturstelle) aufgelistet: Aceton (Molekularsieb 3 Å, BECKER ET AL., 2001), Acetonitril (Molekularsieb 4 Å, BECKER ET AL., 2001) und *N,N*-Dimethylformamid (Destillation über Phosphorpentoxid, Molekularsieb 3 Å, KREITMEIER, 2001), Toluol (Molekularsieb 4 Å, BECKER ET AL., 2001).

7.1.2. Geräte

7.1.2.1. Gerät zur Aufreinigung der extrahierten und synthetisierten Verbindungen

MPLC Die extrahierten Verbindungen (Skimmianin **23** und Kokusagin **24**) sowie nahezu alle synthetisierten Verbindungen (teilweise auch die Zwischenstufen) wurden mittels der Mitteldruckflüssigchromatographie (*medium pressure liquid chromatography*, MPLC) aufgereinigt. Die MPLC ermöglicht präparative Trennungen und weist einige entscheidende Vorteile gegenüber der klassischen offenen Säulenchromatographie („Schwerkraftsäulen“) auf. Es ergeben sich höhere Trennleistungen und deutlich kürzere Trennzeiten, da mit Drücken bis zu 20 bar und Kieselgelen von einer Partikelgröße bis hinunter zu 15 μm gearbeitet werden kann. Im Vergleich hierzu beträgt die Partikelgröße der stationären Phase bei der klassischen offenen Säulenchromatographie durchschnittlich 63-200 μm . Die Trennleistung der MPLC kommt daher der Trennleistung der Hochdruckflüssigchromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) sehr nahe. Gegenüber der HPLC kann bei der MPLC ein Rohpflanzenextrakt ohne besondere Vorreinigung aufgetrennt werden (ZOGG ET AL., 1989c). Nähere Angaben zur Anwendung und Durchführung der MPLC finden sich in den Artikeln von HWU und ZOGG (HWU, 1987 und ZOGG, 1989a und 1989b). Die Präparation der Säulen wurde nach WACKERNAGEL durchgeführt (WACKERNAGEL, 1998). Die verwendeten Fließmittel sind jeweils bei den Verbindungen genauer charakterisiert.

Die folgenden Geräte und Materialien wurden für die Durchführung der MPLC verwendet:

Kieselgel:	LiChroprep® Merck 25-40 μm und 40-63 μm
Verwendete Säulen:	LABOCHROM MPGC-Chromatographiesäulen der Volumina 205 ml und 1025 ml
Pumpe:	Mitteldruckkolbenpumpe LABOMATIC MD 80

7. Experimenteller Teil

Druck-Mess-Begrenzer:	LABOMATIC MB 10
Pulsationsdämpfer:	LABOMATIC MDP-20
Fraktionssammler:	LABOCOL ROTO-10 mit Steuergerät LABOMAT 21-D und Peak-Detektor LABOMATIC LABODIV-10
Detektor:	Präparatives UV-Spektralphotometer LABOCORD-200
Schreiber:	Flachbettschreiber BD 4004 (Kipp & Zonen, Holland)

7.1.2.2. Geräte zur Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen

Für die Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Substanzen wurden die nachfolgend aufgelisteten Geräte und Materialien eingesetzt:

Dünnschichtchromatographie:

DC-Folien POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄, Kieselgel (Macherey-Nagel, Düren)

Als Fließmittel wurden Gemische von Cyclohexan/Ethylacetat in einem Verhältnis von 50:50 bis hin zu 90:10 und Gemische von Cyclohexan/Dichlormethan/Methanol (32:8:1, 30:9:1 bzw. 14:6:1) verwendet.

Elementaranalyse:

Hewlett-Packard CHN-Autoanalyser

Institut für Anorganische Chemie der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

IR-Spektrometrie:

16 PC FTIR (Perkin Elmer)

Die Verbindungen **44** und **55**, die als Öle vorliegen, wurden zwischen zwei Natriumchlorid-Fenstern vermessen, alle weiteren Verbindungen als Kaliumbromid-Presslinge.

Massenspektrometrie:

HP5989A-MS Engine (70 eV) (Hewlett-Packard, Walbronn)

Direkteinlass: Schubstange IGT (Instrumente und Geräte Technik GmbH)

Wolfram-Wendel, Ionenquellentemperatur: 250 °C

Quadrupoltemperatur: 120 °C

Lösungsmittel: Methanol

Hochauflösende Massenspektrometrie:

Finnigan MAT 8230, 70 eV

Institut für Organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

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; m = Multiplett; *J* = Kopplungskonstante in Hz (¹*J* = direkte Kopplung; ²*J* = geminale Kopplung; ³*J* = vicinale Kopplung; ⁴*J* und ⁵*J* = Fernkopplung). Die Auswertung erfolgte nach den Regeln für Spektren 1. Ordnung.

Für die Zuordnung der Wasserstoff-Atome der ¹H-Spektren wurden teilweise zusätzlich ¹H,¹H-COSY- und ¹H,¹H-NOESY-Experimente durchgeführt.

Für die Zuordnung der Kohlenstoff-Atome der ¹³C-Spektren wurden für fast alle Verbindungen DEPT-135-Experimente durchgeführt. Für die Verbindung **22** wurden zudem zusätzlich ¹³C,¹H-COSY- und ¹³C,¹H-COLOC-Experimente zur Auswertung herangezogen. Des Weiteren wurden Inkrementberechnungen (z. B.

7. Experimenteller Teil

mittels ChemDraw Ultra 8.0) sowie Literaturwerte für analoge Verbindungen miteinbezogen.

Die Nummerierung der Kohlenstoff-Atome der Grundkörper erfolgte gemäß der IUPAC-Nomenklatur. Die Kohlenstoff-Atome des Spacers wurden nicht nummeriert, sondern bei der Zuordnung der Signale strukturell dargestellt. In Abbildung 7.1 ist die Nummerierung am Beispiel der Verbindung **35** gezeigt.

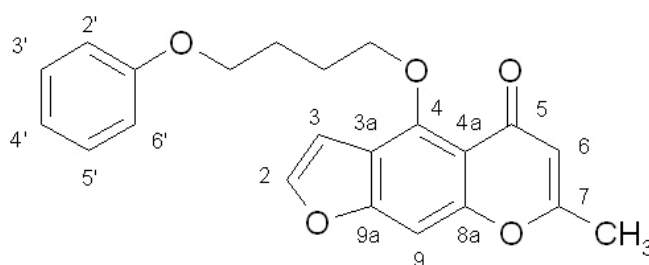


Abbildung 7.1: Nummerierung der Atome gemäß IUPAC am Beispiel der Verbindung **35**

Schmelzpunkte:

Schmelzpunktapparatur Stuart Scientific, SMP03

Die Angabe der Werte erfolgt unkorrigiert.

7.2. Isolierung von Skimmianin und Kokusagin

Für die Synthesen der Verbindungen **33** und **34** wurden die Ausgangssubstanzen Skimmianin **23** und Kokusagin **24** aus *Ruta graveolens*, der Gartenraute, isoliert. Die Isolierung erfolgte nach MÖLLER in Anlehnung an OHTA ET AL., (MÖLLER, 2000 und OHTA ET AL., 1960). Dazu wurden 6 kg des getrockneten, fein geschnittenen Krautes von *Ruta graveolens* (Lieferant Caelo, Hilden) mit 20 l Methanol unter ständigem Schütteln über einen Zeitraum von 48 Stunden kalt extrahiert. Nach Abfiltrieren des Lösungsmittels, führte man mit der Pflanzenmasse eine zweite Extraktion mit weiteren 20 l frischem Methanol durch. Die vereinigt-

7.2. Isolierung von Skimmianin und Kokusaginin

ten Methanol-Extrakte wurden einrotiert, wobei eine schwarze sirupartige Masse zurückblieb. Um die Furochinoline von den ebenfalls enthaltenen Furocumarinen abzutrennen, erhitzte man den Sirup mit 10 l 9 %iger Salzsäure für 3-4 Stunden unter Rückfluss und rührte den Ansatz anschließend für weitere 15 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Filtration schüttelte man jeweils 500 ml der salzsauren Lösung zweimal mit je 500 ml Diethylether aus. Die Diethylether-Phasen wurden verworfen, die salzsauren wässrigen Phasen hingegen anschließend mit konzentriertem Ammoniak alkalisiert ($\text{pH} > 10$) und in Mengen von 500 ml mit jeweils dreimal 500 ml Dichlormethan erneut ausgeschüttelt. Nach Entfernen des Dichlormethans im Vakuum fiel ein gelblich bis bräunlich gefärbtes Öl an. Für die Aufreinigung des Öls wurde die Mitteldruckflüssigchromatographie (*medium pressure liquid chromatography*, MPLC, siehe Kapitel 7.1.2.1) angewandt. Dazu wurde in einem ersten Aufreinigungsschritt als stationäre Phase ein basisches Aluminiumoxid (Al_2O_3 90 aktiv (Stufe I), Korngröße 63-200 μm) und als Fließmittel ein Gemisch aus Toluol/Aceton (7:1) verwendet. Für einen zweiten Aufreinigungsschritt setzte man als stationäre Phase ein Kieselgel (Korngröße 40-63 μm) und als Fließmittel ein Gemisch aus Toluol/Methanol (100:1) ein. Es wurde bei Drücken zwischen 4-12 bar gearbeitet. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 275 nm. Die Identität der Furochinoline konnte mittels Standardsubstanzen, die noch von der Extraktion von MÖLLER vorhanden waren und deren Identität durch spektroskopische Daten als gesichert angesehen werden kann, während und zum Abschluss der Trennschritte mittels Dünnschichtchromatographie (DC) überprüft werden (MÖLLER, 2000). Durch die Kombination der beiden Chromatographie-Trennschritte war es möglich, die beiden Furochinoline rein und getrennt voneinander zu gewinnen. Es ergaben sich dabei bezogen auf die 6 kg des getrockneten Krautes Ausbeuten von 404 mg (0,0067 %) Skimmianin **23** und 1,5 g (0,025 %) Kokusaginin **24**.

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

7.3.1. Allgemeine Synthesevorschriften

7.3.1.1. Darstellung der Alkohole

Wie bereits in Kapitel 3.2 angesprochen, lagen einige umzusetzende Grundkörper schon als Alkohole vor, die direkt der Alkylierung zugänglich waren. War dies nicht der Fall, wurden die Alkohole entweder aus vorliegenden Methylethern durch Desalkylierung gewonnen oder mussten zum Teil über mehrere Syntheseschritte aufgebaut werden. Ausführliche Angaben dazu finden sich bei den jeweiligen Verbindungen.

7.3.1.2. Veretherung der Alkohole

Die Veretherung der Alkohole erfolgte analog der Williamson-Ethersynthese, wobei zwei Varianten durchgeführt wurden. Bei der Variante A erfolgte die Umsetzung nach der „Cäsiumfluorid-Celit-Methode“, einer von LEE UND CHOI beschriebenen Methode (LEE UND CHOI, 1998). Nach der Variante B wurden die Alkohole mit dem Alkylanz, 4-Phenoxybutylbromid, unter Zusatz von Kaliumcarbonat in getrocknetem Aceton bzw. *N,N*-Dimethylformamid (DMF) umgesetzt (siehe dazu auch VENNEKAMP, 2002 und SCHMITZ, 2004). Die Reaktionszeiten lagen zwischen 30 Minuten und zehn Stunden. Der Reaktionsverlauf wurde mittels Dünnschichtchromatographie (DC) verfolgt.

Variante A:

Herstellung von CsF-Celit Die Herstellung des CsF-Celits erfolgte nach LEE UND CHOI (LEE UND CHOI, 1998). Dazu wurden 10 g (0,17 mol) Celit 521 in 300 ml Wasser suspendiert und mit 15,2 g (0,1 mol) CsF versetzt. Nach 20 Minuten entfernte man das Wasser bei 60 °C mittels eines Rotationsverdampfers unter

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

Vakuum. Der Rückstand wurde mit Acetonitril (100 ml) ausgeschüttelt, filtriert und nochmals mit Acetonitril (2 x 50 ml) gewaschen. Anschließend trocknete man den Rückstand bei Raumtemperatur im Exsikkator.

Umsetzung der Alkohole CsF-Celit wurde laut SHAH ET AL. bei dieser Umsetzung als feste Base verwendet (SHAH ET AL. 2002 und 2005). Hierzu gab man das CsF-Celit und den jeweiligen Alkohol zusammen und fügte das Alkylhalogenid, 4-Phenoxybutylbromid, hinzu. Dieses Gemisch wurde unter Rückfluss in getrocknetem Acetonitril erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion (Kontrolle mittels DC) filtrierte man das Gemisch, um das CsF-Celit zu entfernen. Anschließend wurde das Filtrat eingeeengt, um das gewünschte Produkt zu erhalten.

Variante B:

Umsetzung der Alkohole Der jeweilige Alkohol wurde in getrocknetem Aceton bzw. *N,N*-Dimethylformamid (DMF) gelöst. Nach Zusatz von Kaliumcarbonat und einer Spatelspitze Kaliumiodid wurde das Alkylanz, 4-Phenoxybutylbromid, hinzugegeben, bevor man den Ansatz unter Rückfluss und, sofern erforderlich, unter Stickstoffatmosphäre kochte. Die Kontrolle des Reaktionsverlaufs erfolgte mittels DC. Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch filtriert und so das Kaliumcarbonat abgetrennt. Dann folgte eine Entfernung des jeweiligen Lösungsmittels im Vakuum, bevor man den Rückstand in Dichlormethan aufnahm und mit 2 %iger Natronlauge dreimal ausschüttelte, um nicht umgesetzten Alkohol und gegebenenfalls noch vorhandenes Kaliumcarbonat zu beseitigen. Die wässrige Phase wurde verworfen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abfiltrieren des Natriumsulfats entfernte man das Dichlormethan im Vakuum.

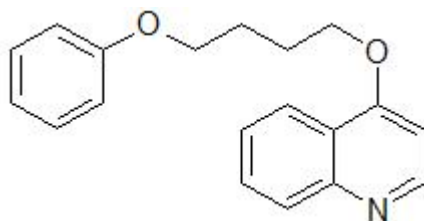
Beiden Synthese-Varianten folgte nahezu immer abschließend die Aufreinigung der erhaltenen Rückstände mittels der MPLC und gegebenenfalls ein zusätzliches Umkristallisieren. Nähere Angaben dazu finden sich jeweils bei den

7. Experimenteller Teil

einzelnen Verbindungen.

7.3.2. Verbindungen mit Chinolin-Grundkörper

7.3.2.1. 4-(4-Phenoxybutoxy)chinolin (12)



Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante A. Dazu wurden 590 mg (4,1 mmol) 4-Hydroxychinolin **1** und 1,3 g (6,1 mmol) CsF-Celit in 20 ml getrocknetem Acetonitril suspendiert und unter Rückfluss erhitzt. Anschließend tropfte man langsam eine Lösung von 1,87 g (8,2 mmol) 4-Phenoxybutylbromid in 5 ml getrocknetem Acetonitril zu dem Reaktionsansatz hinzu.

Ausbeute: 354 mg (1,21 mmol, 30 % der Theorie)

MPLC-Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol (11:9:1)

Schmelzpunkt: 66,5 °C (weißes Pulver)

$C_{19}H_{19}NO_2$ (293,37 g/mol)

ber.: C 77,79 % H 6,53 % N 4,77 %

gef.: C 77,89 % H 6,75 % N 4,78 %

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz):

δ /ppm (TMS) = 1,94-2,08 (m, 4H, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,07 (t, 2H, ³J = 6,1 Hz, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,30 (t, 2H, ³J = 5,9 Hz, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 6,89-6,95 (m, 3H, H-2', H-4' und H-6'), 7,00 (d, 1H, ³J = 5,2 Hz, H-3), 7,25-7,30 (m, 2H, H-3' und H-5'), 7,52 (ddd, 1H, ³J = 8,2 Hz, ³J = 6,9 Hz, ⁴J = 1,2 Hz, H-6), 7,72 (ddd, 1H, ³J = 8,4 Hz,

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

$^3J = 6,9$ Hz, $^4J = 1,5$ Hz, H-7), 7,95 (d, 1H, $^3J = 8,3$ Hz, H-8), 8,13 (dd, 1H, $^3J = 8,3$ Hz, $^4J = 0,9$ Hz, H-5), 8,72 (d, 1H, $^3J = 5,2$ Hz, H-2).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 25,08 und 25,43 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 66,85 und 67,98 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 101,46 (C-3), 114,40 (C-2' und C-6'), 120,38 (C-4'), 120,74 (C-4a), 121,45 (C-5), 125,55 (C-8), 128,59 (C-6), 129,40 (C-3' und C-5'), 129,59 (C-7), 148,68 (C-8a), 151,54 (C-2), 158,53 (C-1'), 160,62 (C-4).

Die Zuordnung der Signale erfolgte analog zu 4-Hydroxychinolin **1** (KATRITZKY ET AL., 1981).

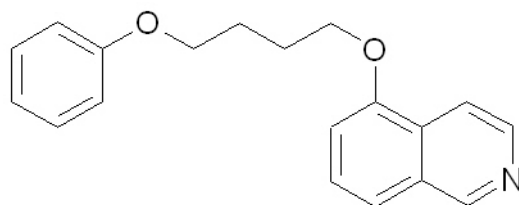
IR (KBr):

$\nu/\text{cm}^{-1} = 2952, 2876, 1592, 1570, 1504, 1476, 1242, 1066.$

MS (EI):

m/z (%) = 293 M⁺ (23), 200 [C₁₃H₁₄NO]⁺ (14), 158 (21), 149 [C₁₀H₁₃O]⁺ (100), 128 [C₉H₆N]⁺ (12), 107 [C₆H₅O-CH₂]⁺ (99), 94 (13), 77 [C₆H₅]⁺ (38), 65 [C₅H₅]⁺ (7), 55 [C₄H₇]⁺ (50).

7.3.2.2. 5-(4-Phenoxybutoxy)isochinolin (13)



Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante B. Dazu wurden 1,0 g (6,89 mmol) 5-Hydroxyisochinolin **2**, 2,37 g (10,35 mmol) 4-Phenoxybutylbromid, 2,75 g (19,93 mmol) Kaliumcarbonat und eine Spatelspitze Kaliumiodid in 35,5 ml

7. Experimenteller Teil

getrocknetes DMF gegeben und auf 100 °C erhitzt.

Ausbeute: 1,89 g (6,44 mmol, 93,5 % der Theorie)

MPLC-Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol (30:9:1)

Schmelzpunkt: 80,5 °C (schwach gelbe Kristalle)

$C_{19}H_{19}NO_2$ (293,37 g/mol)	ber.: C 77,79 %	H 6,53 %	N 4,77 %
	gef.: C 77,28 %	H 6,70 %	N 4,82 %

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz):

δ /ppm (TMS) = 1,92-2,08 (m, 4H, 5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,08 (t, 2H, ³*J* = 6,0 Hz, 5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,25 (t, 2H, ³*J* = 5,8 Hz, 5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 6,89-6,95 (m, 3H, H-2', H-4' und H-6'), 7,21-7,30 (m, 3H, H-7, H-3' und H-5'), 7,58 (t, 1H, ³*J* = 7,9 Hz, H-6 bzw. H-8), 7,63 (t, 1H, ³*J* = 8,5 Hz, H-6 bzw. H-8), 7,92 (d, 1H, ³*J* = 5,8 Hz, H-3), 8,47 (d, 1H, ³*J* = 5,8 Hz, H-4), 9,26 (s, 1H, H-1).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz):

δ /ppm (TMS) = 25,25 und 25,48 (5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 66,90 und 67,72 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 109,08 (C-6), 114,33 (C-3), 114,39 (C-2' und C-6'), 118,91 (C-8), 120,33 (C-4'), 127,44 (C-4a), 127,79 (C-7), 128,91 (C-8a), 129,35 (C-3' und C-5'), 142,46 (C-4), 151,67 (C-2), 152,99 (C-5), 158,51 (C-1').

IR (KBr):

ν /cm⁻¹ = 2948, 2871, 1599, 1583, 1492, 1475, 1250, 1110.

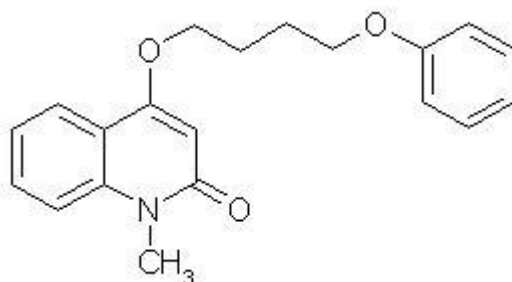
MS (EI):

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

m/z (%) = 293 M^+ (6), 149 $[C_{10}H_{13}O]^+$ (64), 117 (6), 116 (6), 107 $[C_6H_5O-CH_2]^+$ (100), 94 (9), 77 $[C_6H_5]^+$ (41), 65 $[C_5H_5]^+$ (7), 55 $[C_4H_7]^+$ (57), 41 $[C_3H_5]^+$ (9).

7.3.3. Verbindung mit Chinolinon-Grundkörper

7.3.3.1. 1,2-Dihydro-*N*-methyl-4-(4-phenoxybutoxy)chinolin-2-on (14)



Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante A. Dazu wurden 430 mg (2,45 mmol) 1,2-Dihydro-4-hydroxy-*N*-methylchinolin-2-on **3** und 1,89 g (8,92 mmol) CsF-Celit in 20 ml getrocknetem Acetonitril suspendiert und unter Rückfluss erhitzt. Anschließend tropfte man langsam eine Lösung von 1,67 g (7,27 mmol) 4-Phenoxybutylbromid in 5 ml getrocknetem Acetonitril zu dem Reaktionsansatz hinzu.

Ausbeute: 130 mg (0,4 mmol, 16,4 % der Theorie)

MPLC-Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol (32:8:1)

Schmelzpunkt: 80 °C (weißes Pulver)

$C_{20}H_{21}NO_3$ (323,39 g/mol)

ber.: C 74,28 % H 6,55 % N 4,33 %

gef.: C 74,39 % H 6,61 % N 4,31 %

7. Experimenteller Teil

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz):

δ/ppm (TMS) = 1,88-2,04 (m, 4H, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 3,55 (s, 3H, N-CH₃), 4,06 (t, 2H, ³*J* = 6,0 Hz, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,19 (t, 2H, ³*J* = 5,8 Hz, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 6,02 (s, 1H, H-3), 6,89-6,95 (m, 3H, H-2', H-4' und H-6'), 7,19-7,30 (m, 3H, H-7, H-3' und H-5'), 7,47 (d, 1H, ³*J* = 8,5 Hz, H-8), 7,63 (ddd, 1H, ³*J* = 8,6 Hz, ³*J* = 7,2 Hz, ⁴*J* = 1,5 Hz, H-6), 7,87 (dd, 1H, ³*J* = 8,0 Hz, ⁴*J* = 1,3 Hz, H-5).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 24,86 und 25,38 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 28,48 (N-CH₃), 66,78 und 68,04 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 96,64 (C-3), 114,38 (C-2' und C-6'), 114,50 (C-8), 115,55 (C-4a), 120,34 (C-4'), 121,36 (C-6), 122,54 (C-5), 129,35 (C-3' und C-5'), 131,26 (C-7), 139,38 (C-8a), 158,48 (C-1'), 160,91 (C-2), 162,26 (C-4).

Die Zuordnung der Signale erfolgte analog zu 1,2-Dihydro-4-methoxy-*N*-methylchinolin-2-on (REISCH UND MESTER, 1980).

IR (KBr):

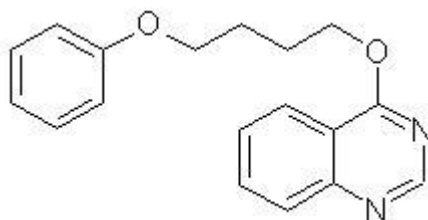
ν/cm^{-1} = 2960, 2940, 1640, 1598, 1586, 1242, 1034.

MS (EI):

m/z (%) = 323 M⁺ (41), 230 [C₁₄H₁₆NO₂]⁺ (26), 176 (40), 175 (29), 149 [C₁₀H₁₃O]⁺ (48), 120 (33), 107 [C₆H₅O-CH₂]⁺ (100), 94 (22), 77 [C₆H₅]⁺ (57), 55 [C₄H₇]⁺ (82).

7.3.4. Verbindung mit Chinazolin-Grundkörper

7.3.4.1. 4-(4-Phenoxybutoxy)chinazolin (15)



Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante A. Dazu wurden 315 mg (2,16 mmol) 4-Hydroxychinazolin **4** und 1,92 g (9,0 mmol) CsF-Celit in 20 ml getrocknetem Acetonitril suspendiert und unter Rückfluss erhitzt. Anschließend tropfte man langsam eine Lösung von 945 mg (4,12 mmol) 4-Phenoxybutylbromid in 5 ml getrocknetem Acetonitril zu dem Reaktionsansatz hinzu.

Ausbeute: 352 mg (1,2 mmol, 55,4 % der Theorie)

MPLC-Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol (32:8:1)

Schmelzpunkt: 130 °C (weiße Kristalle)

$C_{18}H_{18}N_2O_2$ (294,36 g/mol)	ber.: C 73,45 %	H 6,16 %	N 9,52 %
	gef.: C 73,52 %	H 6,24 %	N 9,40 %

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz):

δ/ppm (TMS) = 1,70-1,79 (m, 2H) und 1,82-1,92 (m, 2H) (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 3,99 (t, 2H, $^3J = 6,2$ Hz, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,06 (t, 2H, $^3J = 7,0$ Hz, 4-O-CH₂-CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 6,87-6,92 (m, 3H, H-2', H-4' und H-6'), 7,22-7,28 (m, 2H, H-3' und H-5'), 7,54 (ddd, 1H, $^3J = 8,1$ Hz, $^3J = 7,7$ Hz, $^4J = 1,1$ Hz, H-7), 7,68 (dd, 1H, $^3J = 8,2$ Hz, $^4J = 0,5$ Hz, H-5), 7,82 (ddd, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, $^3J = 7,3$ Hz, $^4J = 1,5$ Hz, H-6), 8,17 (dd, 1H, $^3J = 9,4$ Hz, $^4J = 1,5$ Hz, H-8), 8,42 (s, 1H, H-2).

7. Experimenteller Teil

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 25,46 und 25,80 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 45,59 und 66,80 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 114,37 (C-2' und C-6'), 120,35 (C-4'), 121,50 (C-4a), 125,94 (C-5), 126,88 (C-6), 127,08 (C-8), 129,33 (C-3' und C-5'), 134,10 (C-7), 147,89 (C-8a), 147,92 (C-2), 158,46 (C-1'), 160,12 (C-4).

IR (KBr):

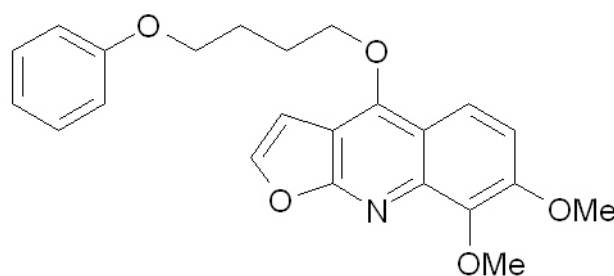
ν/cm^{-1} = 2920, 1667, 1614, 1474, 1250, 1234, 1086.

MS (EI):

m/z (%) = 294 M^+ (5), 201 $[\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}]^+$ (100), 159 (38), 147 (42), 129 $[\text{C}_8\text{H}_5\text{N}_2]^+$ (26), 102 (11), 94 (12), 77 $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$ (29), 55 $[\text{C}_4\text{H}_7]^+$ (82), 41 $[\text{C}_3\text{H}_5]^+$ (17).

7.3.5. Verbindungen mit Furochinolin-Grundkörper

7.3.5.1. 7,8-Dimethoxy-4-(4-phenoxybutoxy)furo[2,3-*b*]chinolin (33)



Darstellung des 4-Hydroxy-7,8-dimethoxyfuro[2,3-*b*]chinolins (28)

Die Synthese erfolgte nach den Vorschriften von LAMBERTON UND PRICE bzw. ISHII (LAMBERTON UND PRICE, 1953 und ISHII, 1961). Dazu wurden 323 mg (1,25 mmol) 4,7,8-Trimethoxyfuro[2,3-*b*]chinolin **23** (Skimmianin) in 13 ml Ethanol mit 2,6 ml 10 N Salzsäure für 10 Stunden unter Rückfluss erhitzt.

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

Der sich beim Abkühlen bildende Niederschlag wurde abfiltriert und mit 25 ml 3 N Natronlauge versetzt. Nach erneuter Filtration säuerte man das Filtrat zur Fällung von **28** mit Eisessig an (Ausbeute: 69,7 %). Dieses Zwischenprodukt wurde nicht näher charakterisiert und ohne weitere Aufarbeitung für die nachfolgende Synthese eingesetzt.

Darstellung des **7,8-Dimethoxy-4-(4-phenoxybutoxy)furo[2,3-*b*]chinolins (33)**

Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante B. Dazu wurden 245 mg (1 mmol) **28**, 599 mg (2,61 mmol) 4-Phenoxybutylbromid, 361 mg (2,61 mmol) Kaliumcarbonat und eine Spatelspitze Kaliumiodid in 35 ml getrocknetes DMF gegeben und auf 120 °C erhitzt. Das Rohprodukt wurde mittels MPLC aufgereinigt und anschließend **33** aus Ethanol umkristallisiert.

Gesamtausbeute: 52,1 mg (0,13 mmol, 10,6 % der Theorie)

MPLC-Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat (60:40)

Schmelzpunkt: 107,5 °C (weiße Kristalle)

$C_{23}H_{23}NO_5$ (393,44 g/mol)	ber.: C 70,21 %	H 5,89 %	N 3,56 %
	gef.: C 69,33 %	H 5,94 %	N 3,45 %

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz):

δ/ppm (TMS) = 1,98-2,09 (m, 4H, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 3,92 (s, 3H, 7-OCH₃ bzw. 8-OCH₃), 3,95 (s, 3H, 7-OCH₃ bzw. 8-OCH₃), 4,09 (t, 2H, $^3J = 5,9$ Hz, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,78 (t, 2H, $^3J = 5,7$ Hz, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 6,90-6,94 (m, 3H, H-2', H-4' und H-6'), 7,24-7,41 (m, 4H, H-3, H-6, H-3' und H-5'), 7,95-7,98 (m, 2H, H-2 und H-5).

7. Experimenteller Teil

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 25,28 und 25,86 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 56,51 (7-OCH₃), 60,67 (8-OCH₃), 66,85 und 71,22 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 101,99 (C-4a), 105,31 (C-3), 112,54 (C-6), 114,30 (C-3a), 114,36 (C-2' und C-6'), 117,73 (C-5), 120,32 (C-4'), 129,33 (C-3' und C-5'), 140,66 (C-8), 141,38 (C-7), 151,79 (C-8a), 155,91 (C-4), 158,45 (C-1'), 163,68 (C-9a).

Die Zuordnung der Signale erfolgte analog zu 4,7,8-Trimethoxyfuro[2,3-*b*]chinolin **23** (Skimmianin) (AHOND ET AL., 1978).

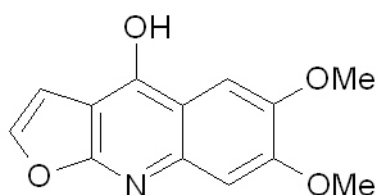
IR (KBr):

ν/cm^{-1} = 2957, 1629, 1583, 1353, 1274, 1244, 1090.

MS (EI):

m/z (%) = 393 M⁺ (12), 244 [C₁₃H₁₀NO₄]⁺ (4), 230 (7), 149 [C₁₀H₁₃O]⁺ (84), 107 [C₆H₅O-CH₂]⁺ (100), 94 (6), 79 (11), 77 [C₆H₅]⁺ (25), 55 [C₄H₇]⁺ (36), 44 (7), 41 [C₃H₅]⁺ (17).

7.3.5.2. 4-Hydroxy-6,7-dimethoxyfuro[2,3-*b*]chinolin (**29**)



Die Synthese wurde analog der Herstellung des 4-Hydroxy-7,8-dimethoxyfuro[2,3-*b*]chinolins **28** (siehe 7.2.5.1., LAMBERTON UND PRICE (1953) bzw. ISHII (1961)) durchgeführt. Dazu wurden 800 mg (3,1 mmol) 4,6,7-Trimethoxyfuro[2,3-*b*]chinolin **24** (Kokusagin) in 70 ml Ethanol mit 14 ml 10 N Salzsäure für 10 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Der sich beim Abkühlen bildende Nie-

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

derschlag wurde abfiltriert und mit 25 ml 3 N Natronlauge versetzt. Nach erneuter Filtration säuerte man das Filtrat zur Fällung des 4-Hydroxy-6,7-dimethoxyfuro[2,3-*b*]chinolins **29** mit Eisessig an. Dieses Produkt wurde ohne weitere Aufarbeitung für die nachfolgende Synthese eingesetzt.

Ausbeute: 214 mg (0,87 mmol, 28,3 % der Theorie)

MPLC-Fließmittel: /

Schmelzpunkt: 235 °C (unter Zersetzung) (schwach gräuliches Pulver)

$C_{13}H_{11}NO_4$ (245,24 g/mol)

1H -NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz):

δ /ppm (TMS) = 3,89 (s, 3H, 6-OCH₃ bzw. 7-OCH₃), 3,91 (s, 3H, 6-OCH₃ bzw. 7-OCH₃), 5,97 (s, 1H, 4-OH), 7,42 (s, 2H, H-3 und H-6), 7,56 (s, 1H, H-5), 7,78 (s, 1H, H-2).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz):

δ /ppm (TMS) = 55,26 und 55,25 (6-OCH₃ und 7-OCH₃), 102,80 (C-5), 103,23 (C-4a), 105,25 (C-3), 105,61 (C-8), 115,16 (C-3a), 138,88 (C-7), 141,61 (C-2), 145,35 (C-6), 151,51 (C-8a), 162,48 (C-9a), 162,48 und 162,72 (C-6 und C-7), 172,23 (C-4).

IR (KBr):

ν /cm⁻¹ = 3153, 2829, 1641, 1597, 1506, 1287.

MS (EI):

m/z (%) = 245 M⁺ (100), 230 [C₁₂H₈NO₄]⁺ (26), 202 (23), 187 (8), 174 (8), 159 (10), 122 (5), 50 (5).

7. Experimenteller Teil

HRMS:

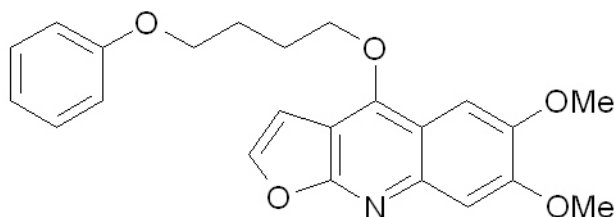
ber.: $C_{13}H_{11}NO_4$ 245,06880 g/mol

gef.: $C_{13}H_{11}NO_4$ 245,06798 g/mol

ber.: $C_{12}^{13}CH_{11}NO_4$ 246,07216 g/mol

gef.: $C_{12}^{13}CH_{11}NO_4$ 246,07248 g/mol

7.3.5.3. 6,7-Dimethoxy-4-(4-phenoxybutoxy)furo[2,3-*b*]chinolin (34)



Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante B. Dazu wurden 178 mg (0,73 mmol) 4-Hydroxy-6,7-dimethoxyfuro[2,3-*b*]chinolin **29**, 371 mg (1,62 mmol) 4-Phenoxybutylbromid, 477 mg (3,45 mmol) Kaliumcarbonat und eine Spatelspitze Kaliumiodid in 20 ml getrocknetes DMF gegeben und auf 120 °C erhitzt. Das Produkt wurde erst mittels MPLC aufgereinigt und anschließend aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 108 mg (0,27 mmol, 37,6 % der Theorie)

MPLC-Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat (60:40)

Schmelzpunkt: 130,0 °C (schwach gelbliche, watteartige Kristalle)

$C_{23}H_{23}NO_5$ (393,44 g/mol)

ber.: C 70,21 % H 5,89 % N 3,56 %

gef.: C 69,60 % H 5,90 % N 3,83 %

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz):

δ/ppm (TMS) = 1,97-2,10 (m, 4H, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 3,84 (s, 3H, 6-OCH₃ bzw. 7-OCH₃), 3,92 (s, 3H, 6-OCH₃ bzw. 7-OCH₃), 4,10 (t, 2H, ³*J* = 6,0 Hz, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,76 (t, 2H, ³*J* = 5,9 Hz, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 6,88-6,93 (m, 3H, H-2', H-4' und H-6'), 7,19-7,29 (m, 3H, H-8, H-3' und H-5'), 7,32 (d, 1H, ³*J* = 2,8 Hz, H-3), 7,44 (s, 1H, H-5), 7,92 (d, 1H, ³*J* = 2,7 Hz, H-2).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 25,30 und 25,95 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 55,30 und 55,54 (6-OCH₃ und 7-OCH₃), 66,91 und 71,09 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 100,00 (C-5), 102,33 (C-4a), 105,14 (C-3), 106,58 (C-8), 112,44 (C-3a), 114,35 (C-2' und C-6'), 120,34 (C-4'), 129,33 (C-3' und C-5'), 141,90 (C-7), 143,08 (C-2), 147,49 (C-6), 152,32 (C-8a), 154,22 (C-4), 158,45 (C-1'), 162,46 (C-9a).

Die Zuordnung der Signale erfolgte analog zu 4,6,7-Trimethoxyfuro[2,3-*b*]chinolin (Kokusaginin) **24** (KONG ET AL., 1984).

IR (KBr):

ν/cm^{-1} = 2980, 2965, 1596, 1316, 1093.

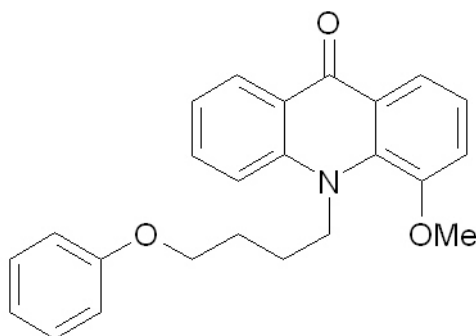
MS (EI):

m/z (%) = 393 M⁺ (18), 258 [C₁₄H₁₂NO₄]⁺ (3), 245 (9), 230 (6), 149 [C₁₀H₁₃O]⁺ (100), 107 [C₆H₅O-CH₂]⁺ (98), 95 (5), 79 (10), 77 [C₆H₅]⁺ (23), 55 [C₄H₇]⁺ (31).

7. Experimenteller Teil

7.3.6. Verbindung mit Acridon-Grundkörper

7.3.6.1. 9,10-Dihydro-4-methoxy-*N*-(4-phenoxybutyl)acridin-9-on (22)



Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante A. Dazu wurden 450 mg (2 mmol) 9-Hydroxy-4-methoxyacridin **11** und 1,91 g (9 mmol) CsF-Celit in 20 ml getrocknetem Acetonitril suspendiert und unter Rückfluss erhitzt. Anschließend tropfte man langsam eine Lösung von 1,15 g (5,1 mmol) 4-Phenoxybutylbromid in 5 ml getrocknetem Acetonitril zu dem Reaktionsansatz hinzu.

Ausbeute: 180 mg (0,48 mmol, 24,1 % der Theorie)

MPLC-Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol (30:9:1)

Schmelzpunkt: 128,5 °C (gelbe Kristalle)

$C_{24}H_{23}NO_3$ (373,45 g/mol)

ber.: C 77,19 % H 6,21 % N 3,75 %

gef.: C 77,09 % H 6,38 % N 3,72 %

$^1\text{H-NMR}$ (C_6D_6 , 300 MHz):

δ/ppm (TMS) = 1,42-1,49 (m, 2H, $N\text{-(CH}_2)_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-C}_6\text{H}_5$) und 1,83-1,90 (m, 2H, $N\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_2\text{-O-C}_6\text{H}_5$), 3,33 (s, 3H, 4-OCH₃), 3,58 (t, 2H, $^3J = 6,1$ Hz, $N\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_2\text{-CH}_2\text{-O-C}_6\text{H}_5$), 4,22 (t, 2H, $^3J = 7,7$ Hz, $N\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_2\text{-CH}_2\text{-O-C}_6\text{H}_5$), 6,74 (dd, 1H, $^3J = 7,8$ Hz, $^4J = 1,5$ Hz, H-3), 6,91 (dd, 2H,

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

$^3J = 8,7$ Hz, $^4J = 1,0$ Hz, H-2' und H-6'), 6,97 (t, 1H, $^3J = 7,4$ Hz, H-4'), 7,05 (t, 1H, $^3J = 7,9$ Hz, H-2), 7,09 (ddd, 1H, $^3J = 7,9$ Hz, $^3J = 6,2$ Hz, $^4J = 1,6$ Hz, H-7), 7,23-7,30 (m, 2H, H-3' und H-5'), 7,34 (dd, 1H, $^3J = 9,6$ Hz, $^4J = 2,1$ Hz, H-5), 7,39 (ddd, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, $^3J = 6,3$ Hz, $^4J = 1,7$ Hz, H-6), 8,75 (dd, 1H, $^3J = 8,0$ Hz, $^4J = 1,5$ Hz, H-1), 8,99 (dd, 1H, $^3J = 7,9$ Hz, $^4J = 1,2$ Hz, H-8).

$^1\text{H}, ^1\text{H-COSY}$ (C_6D_6 , 300 MHz):

Kreuzsignale: 1,42-1,49/3,58, 1,83-1,90/4,22, 6,74/7,05, 6,74/8,75, 6,91/7,23-7,30, 6,97/7,23-7,30, 7,05/8,75, 7,09/7,39, 7,09/8,99, 7,34/7,39.

$^1\text{H}, ^1\text{H-NOESY}$ (C_6D_6 , 300 MHz):

Kreuzsignale: 1,42-1,49/3,58, 1,83-1,90/7,34, 3,33/6,74, 3,58/6,91, 4,22/7,34, 6,74/7,05, 6,91/7,23-7,30, 6,97/7,25-7,30, 7,05/8,75, 7,09/7,39, 7,09/8,99, 7,34/7,39.

$^{13}\text{C-NMR}$ (C_6D_6 , 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 27,37 ($N\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-C}_6\text{H}_5$), 27,49 ($N\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-C}_6\text{H}_5$), 52,61 ($N\text{-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-O-C}_6\text{H}_5$), 56,59 (4-OCH₃), 67,71 ($N\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH}_2\text{-O-C}_6\text{H}_5$), 115,51 (C-2' und C-6'), 116,34 (C-3), 117,11 (C-5), 121,00 (C-1), 121,70 (C-4'), 122,21 (C-7), 122,70 (C-2), 124,71 (C-8a), 127,37 (C-9a), 128,67 (C-8), 130,44 (C-3' und C-5'), 133,98 (C-6), 135,88 (C-4a), 145,98 (C-4b), 150,67 (C-4), 160,15 (C-1'), 178,47 (C-9).

$^{13}\text{C}, ^1\text{H-COSY}$ (C_6D_6):

Kreuzsignale: 27,37/1,83-1,90, 27,49/1,42-1,49, 52,61/4,22, 56,59/3,33, 67,71/3,58, 115,51/6,91, 116,34/6,74, 117,11/7,34, 121,00/8,75, 121,70/6,97, 122,21/7,09, 122,70/7,05, 128,67/8,99, 130,44/7,23-7,30, 133,98/7,39.

7. Experimenteller Teil

$^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -COLOC (C_6D_6):

Kreuzsignale: 52,61/4,22 (1J), 56,59/3,33 (1J), 67,71/3,58 (1J), 115,51/6,97 (3J), 116,34/8,75 (3J), 117,11/7,09 (3J), 121,70/6,91 (3J), 122,21/7,34 (3J), 122,70/6,74 (2J), 124,71/7,09 (3J), 124,71/7,34 (3J), 127,37/7,05 (3J), 130,44/7,23-7,30 (1J), 133,98/7,09 (2J), 133,98/7,39 (1J), 133,98/8,99 (3J), 135,88/6,74 (3J), 135,88/8,75 (3J), 145,98/7,39 (3J), 145,98/8,99 (3J), 150,67/3,33 (3J), 150,67/7,05 (3J), 160,15/7,23-7,30 (3J), 178,47/8,75 (3J), 178,47/8,99 (3J).

IR (KBr):

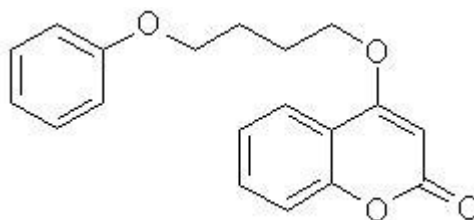
$\nu/\text{cm}^{-1} = 2966, 1632, 1596, 1496, 1254, 1080.$

MS (EI):

m/z (%) = 373 M^+ (69), 280 $[\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{NO}_2]^+$ (3), 238 $[\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{NO}_2]^+$ (100), 223 (59), 210 $[\text{C}_{13}\text{H}_8\text{NO}_2]^+$ (7), 166 (6), 149 $[\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}]^+$ (54), 107 $[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-\text{CH}_2]^+$ (46), 77 $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$ (23), 65 $[\text{C}_5\text{H}_5]^+$ (7), 55 $[\text{C}_4\text{H}_7]^+$ (14).

7.3.7. Verbindungen mit Cumarin-Grundkörper

7.3.7.1. 4-(4-Phenoxybutoxy)-2H-[1]benzopyran-2-on (16)



Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante A. Dazu wurden 330 mg (2 mmol) 4-Hydroxy-2H-[1]benzopyran-2-on **5** und 1,91 g (9 mmol) CsF-Celit in 20 ml getrocknetem Acetonitril suspendiert und unter Rückfluss erhitzt. Anschließend

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

tropfte man langsam eine Lösung von 916 mg (4 mmol) 4-Phenoxybutylbromid in 5 ml getrocknetem Acetonitril zu dem Reaktionsansatz hinzu.

Ausbeute: 375 mg (1,2 mmol, 60 % der Theorie)

MPLC-Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat (75:25)

Schmelzpunkt: 79 °C (weißes Pulver)

$C_{19}H_{18}O_4$ (310,35 g/mol)	ber.: C 73,53 %	H 5,85 %
	gef.: C 73,60 %	H 5,98 %

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz):

δ/ppm (TMS) = 1,89-2,05 (m, 4H, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,07 (t, 2H, $^3J = 6,0$ Hz, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,29 (t, 2H, $^3J = 6,0$ Hz, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 5,90 (s, 1H, H-3), 6,90-6,96 (m, 3H, H-2', H-4' und H-6'), 7,25-7,41 (m, 4H, H-7, H-8, H-3' und H-5'), 7,65 (ddd, 1H, $^3J = 8,6$ Hz, $^3J = 7,3$ Hz, $^4J = 1,6$ Hz, H-6), 7,78 (dd, 1H, $^3J = 7,9$ Hz, $^4J = 1,5$ Hz, H-5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 24,67 und 25,21 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 66,67 und 69,12 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 90,45 (C-3), 114,36 (C-2' und C-6'), 115,18 (C-4a), 116,35 (C-8), 120,36 (C-4'), 122,73 (C-5), 124,05 (C-6), 129,37 (C-3' und C-5'), 132,61 (C-7), 152,69 (C-8a), 158,45 (C-1'), 161,57 (C-2), 164,85 (C-4).

Die Zuordnung der Signale erfolgte analog zu 4-Methoxy-2*H*-[1]benzopyran-2-on (4-Methoxycumarin) (CUSSANS UND HUCKERBY, 1975).

IR (KBr):

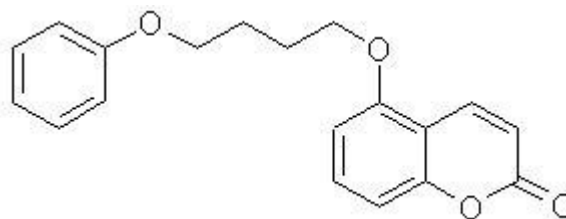
$\nu/\text{cm}^{-1} = 3074, 2940, 1728, 1622, 1382, 1242.$

7. Experimenteller Teil

MS (EI):

m/z (%) = 310 M^+ (14), 217 $[C_{13}H_{13}O^3]^+$ (29), 175 $[C_{10}H_7O^3]^+$ (24), 163 (30), 149 $[C_{10}H_{13}O]^+$ (29), 120 (41), 107 $[C_6H_5O-CH_2]^+$ (100), 94 (31), 77 $[C_6H_5]^+$ (63), 55 $[C_4H_7]^+$ (100).

7.3.7.2. 5-(4-Phenoxybutoxy)-2H-[1]benzopyran-2-on (41)



Darstellung des 5-Hydroxy-2H-[1]benzopyran-2-ons (40)

Die Synthese des 5-Hydroxycumarins **40** erfolgte nach DUBUFFET ET AL. (DUBUFFET ET AL., 1999). Dazu wurden 5,0 g (30,09 mmol) 2,6-Dimethoxybenzaldehyd **38** in einer Wittig-Reaktion mit 12,1 g (36,1 mmol) Methoxycarbonylmethyltriphenylphosphoran in getrocknetem Toluol (90 ml) unter Rückfluss umgesetzt. Nach einem Lösungsmittelwechsel zu trockenem Diethylether wurde das Triphenylphosphinoxid abfiltriert und das Lösungsmittel abrotiert. Die anschließende Reinigung mittels MPLC (Cyclohexan/Ethylacetat (80:20)) führte zu dem Zwischenprodukt 3-(2,6-Dimethoxyphenyl)acrylsäuremethylester **39** in einer Ausbeute von 71,8 %. Zur Identifizierung dieses Zwischenprodukts wurde ein 1H -NMR-Spektrum aufgenommen und die chemischen Verschiebungen mit Literaturdaten abgeglichen (ARAD-YELLIN ET AL., 1980).

1H -NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz):

δ /ppm (TMS) = 3,71 (s, 3H, -COO-CH₃), 3,87 (s, 6H, 2'-OCH₃ und 6'-OCH₃), 6,73 (d, 2H, $^3J = 8,5$ Hz, H-3' und H-5'), 6,78 (d, H, $^3J = 16,3$ Hz, H- α), 7,37 (t, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, H-4'), 7,99 (d, 1H, $^3J = 16,3$ Hz, H- β).

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

In einem zweiten Schritt wurden 4,8 g (21,6 mmol) **39** in Dichlormethan (300 ml) gelöst und tropfenweise unter Eiskühlung mit 4,18 ml (43,4 mmol) Bortribromid versetzt. Anschließend erhitze man den Ansatz für 3 Stunden unter Rückfluss, bevor man Wasser hinzufügte und die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan ausschüttelte. Die Dichlormethan-Phasen wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und bis zur Trockene eingeengt. Die Aufreinigung des entstandenen Rückstands mittels MPLC (Cyclohexan/Ethylacetat (80:20)) führte zu **40** in einer Ausbeute von 65 %. Die spektroskopischen Daten stimmten mit den Literaturdaten überein (CERQUEIRA ET AL., 2002).

Darstellung des **5-(4-Phenoxybutoxy)-2H-[1]benzopyran-2-ons (41)**

Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante A. Dazu wurden 520 mg (3,2 mmol) **40** und 2,97 g (14 mmol) CsF-Celit in 25 ml getrocknetem Acetonitril suspendiert und unter Rückfluss erhitzt. Anschließend tropfte man langsam eine Lösung von 1,47 g (6,4 mmol) 4-Phenoxybutylbromid in 5 ml getrocknetem Acetonitril zu dem Reaktionsansatz hinzu. Nach Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/Ethylacetat (75:25)) und Umkristallisieren aus Methanol ergab sich eine Ausbeute von 55 %.

Gesamtausbeute: 25,7 % der Theorie

Schmelzpunkt: 82 °C (weiße Kristalle)

C₁₉H₁₈O₄ (310,35 g/mol)

ber.: C 73,53 % H 5,85 %

gef.: C 73,58 % H 6,00 %

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz):

δ /ppm (TMS) = 1,87-1,98 (m, 4H, 5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,05 (t, 2H, ³J = 5,9 Hz, 5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,19 (t, 2H, ³J = 5,8 Hz, 5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 6,35 (d, 1H, ³J = 9,7 Hz, H-3), 6,89-6,95 (m,

7. Experimenteller Teil

5H, H-6, H-8, H-2', H-4' und H-6'), 7,24-7,30 (m, 2H, H-3' und H-5'), 7,53 (t, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, H-7), 8,08 (d, 1H, $^3J = 9,7$ Hz, H-4).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 25,20 und 25,64 (5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 51,42 und 66,71 (5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 108,68 (C-6), 114,35 (C-2' und C-6'), 116,50 (C-8), 120,39 (C-4'), 123,09 (C-3), 125,77 (C-7), 126,73 (C-4a), 129,36 (C-3' und C-5'), 131,90 (C-4), 139,52 (C-8a), 144,38 (C-5), 158,42 (C-1'), 176,18 (C-2).

IR (KBr):

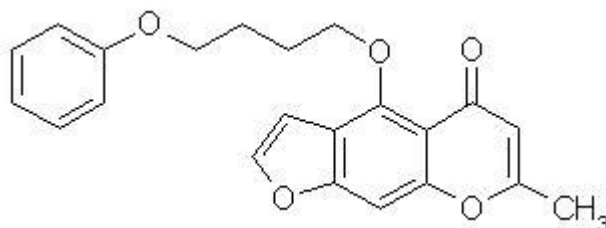
$\nu/\text{cm}^{-1} = 2954, 1744, 1606, 1246, 1082.$

MS (EI):

m/z (%) = 310 M⁺ (8), 217 [C₁₃H₁₃O³]⁺ (7), 175 [C₁₀H₇O³]⁺ (8), 163 (6), 149 [C₁₀H₁₃O]⁺ (73), 107 [C₆H₅O-CH₂]⁺ (100), 94 (10), 79 (17), 77 [C₆H₅]⁺ (40), 55 [C₄H₇]⁺ (52).

7.3.8. Verbindungen mit Furochromon-Grundkörper

7.3.8.1. 7-Methyl-4-(4-phenoxybutoxy)-5H-furo[3,2-g][1]benzopyran-5-on (35)



Darstellung des 4-Hydroxy-7-methyl-5H-furo[3,2-g][1]benzopyran-5-ons (30)

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von SCHÖNBERG UND BADRAN (SCHÖNBERG UND BADRAN, 1951). Dazu wurden 2,5 g (10,9 mmol) 4-Methoxy-7-methyl-5H-furo[3,2-g][1]benzopyran-5-on **25** (Visnagin) in 75 ml 20 %iger Salzsäure gelöst und eine Stunde lang unter Rückfluss gekocht. Der sich bereits während des Kochens bildende Niederschlag wurde nach vollständigem Erkalten abfiltriert und aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Dabei ergab sich das Produkt **30** in einer Ausbeute von 72 %. Die spektroskopischen Daten stimmten mit den Literaturdaten überein (AHLUWALIA ET AL., 1981).

Darstellung des 7-Methyl-4-(4-phenoxybutoxy)-5H-furo[3,2-g][1]benzopyran-5-ons (35)

Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante A. Dazu wurden 432 mg (2 mmol) **30** und 1,9 g (9 mmol) CsF-Celit in 25 ml getrocknetem Acetonitril suspendiert und unter Rückfluss erhitzt. Anschließend tropfte man langsam eine Lösung von 1,39 g (6,1 mmol) 4-Phenoxybutylbromid in 5 ml getrocknetem Acetonitril zu dem Reaktionsansatz hinzu. Nach Aufreinigung mittels MPLC und Umkristallisierens aus Methanol/Wasser ergab sich **35** in einer Ausbeute von 79 %.

7. Experimenteller Teil

Gesamtausbeute: 56,9 % der Theorie

MPLC-Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat (75:25)

Schmelzpunkt: 90,0 °C (weiße watteartige Kristalle)

$C_{22}H_{20}O_5$ (364,40 g/mol)	ber.: C 72,51 %	H 5,53 %
	gef.: C 72,61 %	H 5,71 %

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz):

δ/ppm (TMS) = 1,91-1,95 (m, 4H, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 2,31 (s, 3H, 7-CH₃), 4,04 (t, 2H, $^3J = 5,8$ Hz, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,29 (t, 2H, $^3J = 5,6$ Hz, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 6,02 (s, 1H, H-6), 6,88-6,93 (m, 3H, H-2', H-4' und H-6'), 7,17 (d, 1H, $^3J = 2,2$ Hz, H-3), 7,23-7,29 (m, 2H, H-3' und H-5'), 7,49 (s, 1H, H-9), 8,03 (d, 1H, $^3J = 2,3$ Hz, H-2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 19,30 (7-CH₃), 25,31 und 26,35 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 67,09 und 73,86 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 95,11 (C-9), 105,29 (C-3), 110,15 (C-6), 112,12 (C-4a), 114,35 (C-2' und C-6'), 117,26 (C-3a), 120,28 (C-4'), 129,37 (C-3' und C-5'), 146,46 (C-2), 151,92 (C-9a), 155,29 (C-8a), 156,90 (C-4), 158,58 (C-1'), 164,01 (C-7), 176,47 (C-5).

Die Zuordnung der Signale erfolgte analog zu 4-Methoxy-7-methyl-5*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-5-on **25** (Visnagin) (ELGAMAL, 1979).

IR (KBr):

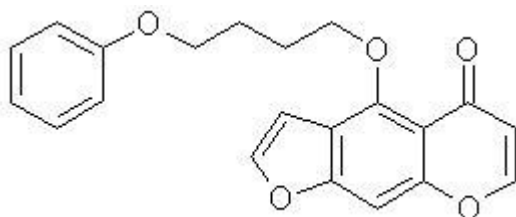
$\nu/\text{cm}^{-1} = 3104, 1658, 1614, 1454, 1342, 1110.$

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

MS (EI):

m/z (%) = 364 M^+ (69), 271 $[C_{16}H_{15}O_4]^+$ (57), 229 $[C_{13}H_9O_4]^+$ (78), 216 (87), 201 (33), 149 $[C_{10}H_{13}O]^+$ (62), 107 $[C_6H_5O-CH_2]^+$ (100), 77 $[C_6H_5]^+$ (64), 55 $[C_4H_7]^+$ (70), 43 (39).

7.3.8.2. 4-(4-Phenoxybutoxy)-5*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-5-on (49)



Darstellung des 5-Acetyl-4-methoxy-benzofuran-6-ols (45)

Die Darstellung fand in Anlehnung an SPÄTH UND GRUBER bzw. SANMANN statt (SPÄTH UND GRUBER, 1941 und SANMANN, 1995). Dazu wurden 5 g (21,7 mmol) 4-Methoxy-7-methyl-5*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-5-on **25** (Visnagin) mit 500 ml 1 %iger Kalilauge versetzt und 15 Minuten unter Rückfluss erhitzt. Nach Erkalten wurden 75 ml Schwefelsäure hinzugegeben. Der sich dabei bildende Niederschlag wurde abfiltriert und aus Methanol/Wasser (60:40) umkristallisiert. Dabei konnte das 5-Acetyl-4-methoxy-benzofuran-6-ol **45** (Visnaginon) in 83,4 %iger Ausbeute gewonnen werden. Die spektroskopischen Daten stimmten mit den Literaturdaten überein (SANMANN, 1995).

Darstellung des 4-Methoxy-5*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-5-ons (47)

Die Synthese wurde nach ABDEL-RAHMAN ET AL. durchgeführt (ABDEL-RAHMAN ET AL., 2002). Dazu wurden in einem ersten Schritt 4,12 g (20 mmol) **45** mit 4,48 ml (33,6 mmol) *N,N*-Dimethylformamid-dimethylacetal (DMFDMA) in 50 ml Toluol für 3 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Der sich nach Einengen des Lösungsmittels im Vakuum bildende Niederschlag wurde abfiltriert, mit

7. Experimenteller Teil

Petrolether gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert. Das 1-(4-Methoxy-6-hydroxy-benzofuran-5-yl)-3-dimethylamino-2-propen-1-on **46** fiel in einer Ausbeute von 64,8 % an. Ohne nähere Charakterisierung wurden in einem zweiten Schritt 3,38 g dieses Enaminons **46** in Eisessig 5 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Gabe auf Eis erfolgte eine Alkalisierung des Reaktionsgemisch mit Ammoniumhydroxidlösung. Der entstehende Niederschlag wurde abfiltriert und aus Ethanol umkristallisiert. Die Ausbeute an **47** betrug 80 %. Die spektroskopischen Daten stimmten mit den Literaturdaten überein.

Darstellung des **4-Hydroxy-5H-furo[3,2-g][1]benzopyran-5-ons (48)**

865 mg (4 mmol) **47** wurden in 20 ml Dichlormethan gelöst. Unter Eiskühlung wurden 4 ml einer Bortribromid-Lösung (1 M, CH₂Cl₂) zugetropft. Dann erhitze man das Gemisch für 2 Stunden unter Rückfluss. Nach Zugabe von Wasser und zweimaligem Ausschütteln der wässrigen Phase mittels Dichlormethan wurden die Dichlormethan-Phasen vereinigt, einrotiert und der Rückstand aus Methanol/Wasser (5:1) umkristallisiert. Das Produkt **48** wurde in einer Ausbeute von 98,7 % erhalten. Zur Identifizierung wurden ein ¹H-NMR- und ein ¹³C-NMR-Spektrum aufgenommen.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz):

$\delta/\text{ppm (TMS)} = 6,38$ (d, 1H, ³*J* = 5,9 Hz, H-7), $7,09$ (dd, 1H, ³*J* = 2,3 Hz, ⁵*J* = 0,9 Hz, H-3), $7,37$ (d, 1H, ⁵*J* = 0,9 Hz, H-9), $8,03$ (d, 1H, ³*J* = 2,3 Hz, H-2), $8,34$ (d, 1H, ³*J* = 5,9 Hz, H-6), $13,56$ (s, 1H, 4-OH).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz):

$\delta/\text{ppm (TMS)} = 91,08$ (C-9), $103,86$ (C-3), $106,24$ (C-4a), $109,60$ (C-6), $112,39$ (C-3a), $146,39$ (C-2), $153,73$ (C-4), $154,25$ (C-8a), $158,19$ (C-9a), $158,49$ (C-7), $183,28$ (C-5).

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

Darstellung des **4-(4-Phenoxybutoxy)-5H-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-5-ons (49)**

Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante A. Dazu wurden 800 mg (3,96 mmol) **48** und 5,72 g (27 mmol) CsF-Celit in 60 ml getrocknetem Acetonitril suspendiert und unter Rückfluss erhitzt. Anschließend tropfte man langsam eine Lösung von 1,83 g (8 mmol) 4-Phenoxybutylbromid in 5 ml getrocknetem Acetonitril zu dem Reaktionsansatz hinzu. Nach Aufreinigung mittels MPLC erhielt man **49** in einer Ausbeute von 39,7 %.

Gesamtausbeute: 17 % der Theorie

MPLC-Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat (70:30)

Schmelzpunkt: 70,0 °C (schwach gelbe Kristalle)

$C_{21}H_{18}O_5$ (350,37 g/mol)	ber.: C 71,99 %	H 5,18 %
	gef.: C 72,18 %	H 5,34 %

1H -NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz):

δ /ppm (TMS) = 1,93-1,99 (m, 4H, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,05 (t, 2H, 3J = 5,8 Hz, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,31 (t, 2H, 3J = 5,7 Hz, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 6,13 (d, 1H, 3J = 5,9 Hz, H-7), 6,88-6,93 (m, 3H, H-2', H-4' und H-6'), 7,19 (d, 1H, 3J = 1,5 Hz, H-3), 7,23-7,29 (m, 2H, H-3' und H-5'), 7,54 (s, 1H, H-9), 8,04 (d, 1H, 3J = 2,2 Hz, H-2), 8,10 (d, 1H, 3J = 5,9 Hz, H-6).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ /ppm (TMS) = 25,26 und 26,32 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 67,08 und 73,85 (4-O-CH₂-CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 95,29 (C-9), 105,27 (C-3), 112,48 (C-6), 113,38 (C-4a), 114,34 (C-2' und C-6'), 117,30 (C-3a), 120,24 (C-4'), 129,31 (C-3' und C-5'), 146,53 (C-2), 152,04 (C-4), 154,40 (C-7), 155,18 (C-8a), 156,98 (C-9a), 158,56 (C-1'), 175,94 (C-5).

7. Experimenteller Teil

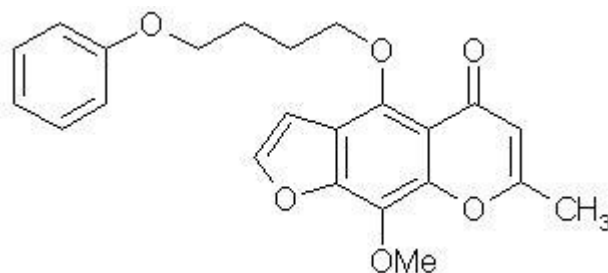
IR (KBr):

$\nu/\text{cm}^{-1} = 1646, 1450, 1338, 1248, 1094.$

MS (EI):

m/z (%) = 350 M^+ (5), 257 $[\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_4]^+$ (79), 215 $[\text{C}_{12}\text{H}_7\text{O}_4]^+$ (54), 202 $[\text{C}_{11}\text{H}_6\text{O}_4]^+$ (100), 149 $[\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}]^+$ (83), 107 $[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-\text{CH}_2]^+$ (99), 79 (24), 77 $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$ (68), 55 $[\text{C}_4\text{H}_7]^+$ (65), 51 (24).

7.3.8.3. 9-Methoxy-7-methyl-4-(4-phenoxybutoxy)-5H-furo[3,2-g][1]benzopyran-5-on (36)



Darstellung des 4-Hydroxy-9-Methoxy-7-methyl-5H-furo[3,2-g][1]benzopyran-5-ons (31)

Die Synthese wurde variiert nach HARVEY ET AL. durchgeführt (HARVEY ET AL., 2006). Dazu wurden 1,35 g (5,19 mmol) 4,9-Dimethoxy-7-methyl-5H-furo[3,2-g][1]benzopyran-5-on **26** (Khellin) mit 10 ml Dichlormethan versetzt. Unter Eiskühlung tropfte man 5 ml einer Bortribromid-Lösung (1 M, CH_2Cl_2) zu. Anschließend wurde das Gemisch für einige Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Zugabe von Wasser und zweimaligem Ausschütteln der wässrigen Phase mittels Dichlormethan wurden die Dichlormethan-Phasen vereinigt und im Vakuum einrotiert. Nach Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/Dichlormethan/Methanol (5:5:1)) erhielt man **31** in einer Ausbeute von 60 %. Die spektroskopischen Daten stimmten mit den Literaturangaben überein.

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

Zudem zeigte das Produkt **31** aufgrund der Hydroxylgruppe in 4-Position eine positive (grün) Eisen(III)-chlorid-Reaktion (BENCZE ET AL., 1956).

Darstellung des **9-Methoxy-7-methyl-4-(4-phenoxybutoxy)-5H-furo[3,2-g][1]benzopyran-5-ons (36)**

Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante A. Dazu wurden 456 mg (1,85 mmol) **31** und 1,81 g (8,5 mmol) CsF-Celit in 25 ml getrocknetem Acetonitril suspendiert und unter Rückfluss erhitzt. Anschließend tropfte man langsam eine Lösung von 895 g (3,9 mmol) 4-Phenoxybutylbromid in 5 ml getrocknetem Acetonitril zu dem Reaktionsansatz hinzu. Das Produkt **36** wurde nach Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/Ethylacetat (75:25)) in 26,3 %iger Ausbeute erhalten.

Gesamtausbeute: 15,8 % der Theorie

Schmelzpunkt: 105 °C (weißes Pulver)

$C_{23}H_{22}O_6$ (394,43 g/mol)

ber.: C 70,04 % H 5,62 %

gef.: C 70,20 % H 5,80 %

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz):

δ/ppm (TMS) = 2,05-2,09 (m, 4H, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 2,39 (s, 3H, 7-CH₃), 4,08 (t, 2H, $^3J = 5,9$ Hz, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,20 (s, 3H, 9-OCH₃), 4,23 (t, 2H, $^3J = 6,0$ Hz, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 6,03 (s, 1H, H-6), 6,89-6,94 (m, 3H, H-2', H-4' und H-6'), 6,97 (d, 1H, $^3J = 2,3$ Hz, H-3), 7,24-7,29 (m, 2H, H-3' und H-5'), 7,60 (d, 1H, $^3J = 2,2$ Hz, H-2).

$^1\text{H}, ^1\text{H-NOESY}$ (CDCl_3 , 300 MHz):

Kreuzsignale: 2,05-2,09/6,97, 2,29/6,03, 4,23/6,97, 6,97/7,60.

7. Experimenteller Teil

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 19,43 (7-CH₃), 25,34 und 26,34 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 61,13 (9-OCH₃), 67,08 und 74,31 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 105,15 (C-3), 109,93 (C-6), 113,33 (C-4a), 114,33 (C-2' und C-6'), 119,36 (C-3a), 120,27 (C-4'), 129,35 (C-9, C-3' und C-5'), 145,67 (C-8a), 146,50 (C-4), 146,93 (C-2), 148,08 (C-9a), 158,57 (C-1'), 164,11 (C-7), 176,57 (C-5).

Die Zuordnung der Signale erfolgte analog zu 4,9-Dimethoxy-7-methyl-5*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-5-on **26** (Khellin) (ELGAMAL, 1979).

IR (KBr):

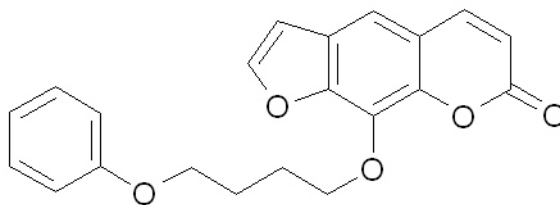
ν/cm^{-1} = 3104, 2948, 1658, 1616, 1358, 1250, 1072.

MS (EI):

m/z (%) = 394 M⁺ (12), 259 [C₁₄H₁₁O₅]⁺ (37), 246 (13), 231 (100), 149 [C₁₀H₁₃O]⁺ (83), 107 [C₆H₅O-CH₂]⁺ (85), 94 (13), 79 (14), 77 [C₆H₅]⁺ (39), 55 [C₄H₇]⁺ (29).

7.3.9. Verbindungen mit Furocumarin-Grundkörper

7.3.9.1. 9-(4-Phenoxybutoxy)-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-on (37)



Darstellung des **9-Hydroxy-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-on (Xanthoxol) (32)**

720 mg (3,33 mmol) 9-Methoxy-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-on **27** (Xantho-

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

toxin) wurden mit 10 ml Dichlormethan versetzt. Unter Eiskühlung tropfte man 3,5 ml einer Bortribromid-Lösung (1 M, CH₂Cl₂) zu. Dann erhitze man das Gemisch für einige Stunden unter Rückfluss. Nach Zugabe von Wasser und zweimaligem Ausschütteln der wässrigen Phase mittels Dichlormethan wurden die Dichlormethan-Phasen vereinigt und im Vakuum einrotiert. Den Rückstand kristallisierte man aus Methanol/Wasser um und erhielt **32** in einer Ausbeute von 89,9 %. Die Verbindung wurde ohne nähere Charakterisierung für die nachfolgende Synthese eingesetzt.

Darstellung des **9-(4-Phenoxybutoxy)-7H-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-on (37)**

Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante B. Dazu wurden 520 mg (2,57 mmol) **32**, 2,36 g (10,3 mmol) 4-Phenoxybutylbromid, 1,03 g (7,46 mmol) Kaliumcarbonat und eine Spatelspitze Kaliumiodid in 25 ml getrocknetes Aceton gegeben und unter Rückfluss erhitzt.

Gesamtausbeute: 35,9 % der Theorie

MPLC-Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat (80:20)

Schmelzpunkt: 53 °C (schwach gelbes Pulver)

C₂₁H₁₈O₅ (350,37 g/mol)

ber.: C 71,99 % H 5,18 %

gef.: C 71,65 % H 5,30 %

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz):

δ/ppm (TMS) = 1,92-2,08 (m, 4H, 9-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,05 (t, 2H, ³J = 6,1 Hz, 9-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,46 (t, 2H, ³J = 6,1 Hz, 9-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 6,42 (d, 1H, ³J = 9,5 Hz, H-6), 6,87-6,93 (m, 3H, H-2', H-4' und H-6'), 7,08 (d, 1H, ³J = 2,2 Hz, H-3), 7,22-7,29 (m, 2H, H-3' und H-5'), 7,66 (s, 1H, H-4), 8,09 (d, 1H, ³J = 2,2 Hz, H-2), 8,12 (d, 1H,

7. Experimenteller Teil

$^3J = 9,7$ Hz, H-5).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 25,19 und 26,26 (9-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 66,91 und 73,09 (9-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 106,97 (C-3), 113,95 (C-4), 114,08 (C-6), 114,34 (C-2' und C-6'), 116,36 (C-4a), 120,28 (C-4'), 125,68 (C-3a), 129,32 (C-3' und C-5'), 130,84 (C-9), 142,81 (C-8a), 145,13 (C-5), 147,32 (C-9a), 147,67 (C-2), 158,52 (C-1'), 159,65 (C-7).

Die Zuordnung der Signale erfolgte analog zu 9-Methoxy-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-on **27** (Xanthotoxin) (DUDDECK UND KAISER, 1982).

IR (KBr):

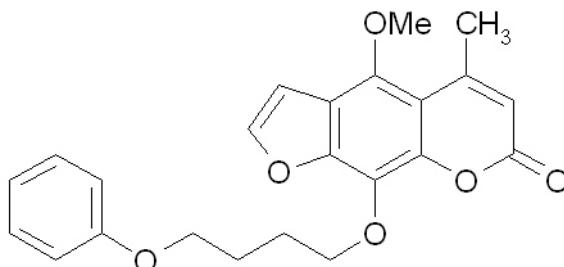
$\nu/\text{cm}^{-1} = 2920, 1740, 1720, 1602, 1548, 1142, 1026.$

MS (EI):

m/z (%) = 350 M⁺ (2), 202 [C₁₁H₆O₄]⁺ (16), 174 [202-CO]⁺ (10), 149 [C₁₀H₁₃O]⁺ (100), 107 [C₆H₅O-CH₂]⁺ (87), 94 (8), 89 (13), 77 [C₆H₅]⁺ (34), 63 (9), 55 [C₄H₇]⁺ (39), 51 (8).

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

7.3.9.2. 4-Methoxy-5-methyl-9-(4-phenoxybutoxy)-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on (62)



Darstellung des 4,9-Dimethoxy-5-methyl-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-ons (60)

5-Acetyl-4,7-dimethoxybenzofuran-6-ol **59** (Khellinon) wurde nach ATTA ET AL. zum 4,9-Dimethoxy-5-methyl-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on **60** umgesetzt (ATTA ET AL., 1993). Dazu erhitzte man 1,36 g (5,76 mmol) **59** mit 1,93 g (5,76 mmol) Methoxycarbonylmethylentriphenylphosphoran 3 Stunden in 96 ml getrocknetem Toluol unter Rückfluss. Der sich beim Abkühlen bildende Niederschlag wurde abfiltriert und aus Toluol umkristallisiert. Das Produkt **60** wurde in 85,2 %iger Ausbeute gewonnen. Die spektroskopischen Daten stimmten mit den Literaturdaten überein.

Darstellung des 9-Hydroxy-4-methoxy-5-methyl-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-ons (61)

520 mg (2 mmol) **60** wurden mit 10 ml Dichlormethan versetzt. Unter Eiskühlung tropfte man 1 ml einer Bortribromid-Lösung (1 M, CH₂Cl₂) zu und erhitzte anschließend das Gemisch für einige Stunden unter Rückfluss. Nach Zugabe von Wasser und zweimaligem Ausschütteln der wässrigen Phase mit Dichlormethan wurden die Dichlormethan-Phasen vereinigt und im Vakuum einrotiert. Nach Aufreinigung mittels MPLC (Toluol/Methanol (100:2)) erhielt man 9-Hydroxy-4-methoxy-5-methyl-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-on **61** in einer Ausbeute von

7. Experimenteller Teil

43,2 %. Die Verbindung wurde ohne weitere Charakterisierung für die folgende Synthese eingesetzt.

Darstellung des **4-Methoxy-5-methyl-9-(4-phenoxybutoxy)-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-ons (62)**

Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante A. Dazu suspendierte man 370 mg (1,5 mmol) **61** und 1,39 g (6,75 mmol) CsF-Celit in 20 ml getrocknetem Acetonitril und erhitze unter Rückfluss. 688 mg (3 mmol) 4-Phenoxybutylbromid wurden portionsweise zu dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Das gewünschte Produkt **62** wurde in einer Ausbeute von 25,1 % erhalten.

Gesamtausbeute: 9,2 % der Theorie

Schmelzpunkt: 76,0 °C (weißes Pulver)

C₂₃H₂₂O₆ (394,43 g/mol)

ber.: C 70,04 % H 5,62 %

gef.: C 70,25 % H 5,80 %

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz):

δ/ppm (TMS) = 2,03-2,11 (m, 4H, 9-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 2,63 (s, 3H, 5-CH₃), 4,06 (s, 3H, 4-OCH₃), 4,09 (t, 2H, ³J = 6,0 Hz, 9-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,40 (t, 2H, ³J = 6,1 Hz, 9-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 6,11 (s, 1H, H-6), 6,89-6,92 (m, 3H, H-2', H-4' und H-6'), 6,94 (d, 1H, ³J = 2,3 Hz, H-3), 7,23-7,29 (m, 2H, H-3' und H-5'), 7,59 (d, 1H, ³J = 2,3 Hz, H-2).

¹H,¹H-NOESY (CDCl₃, 300 MHz):

Kreuzsignale: 2,63/4,06, 2,63/6,11, 4,06/6,94, 6,94/7,59.

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 23,26 (5-CH₃), 25,22 und 26,20 (9-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 61,27 (4-OCH₃), 66,91 und 73,09 (9-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 105,47 (C-3), 108,72 (C-4a), 112,97 (C-6), 114,34 (C-2' und C-6'), 116,59 (C-3a), 120,28 (C-4'), 127,02 (C-9), 129,34 (C-3' und C-5'), 143,58 (C-5), 146,19 (C-2 und C-8a), 148,67 (C-4), 154,09 (C-9a), 158,53 (C-1'), 158,95 (C-7).

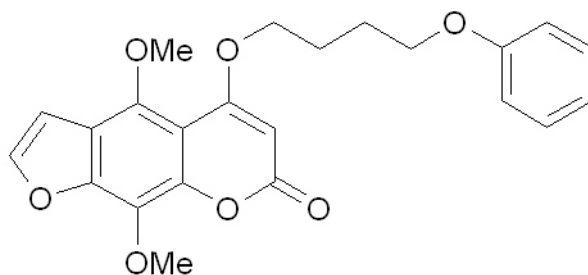
IR (KBr):

ν/cm^{-1} = 2958, 2946, 1722, 1592, 1470, 1344, 1248, 1058.

MS (EI):

m/z (%) = 394 M⁺ (5), 246 (9), 231 (21), 203 (7), 149 [C₁₀H₁₃O]⁺ (100), 107 [C₆H₅O-CH₂]⁺ (69), 79 (10), 77 [C₆H₅]⁺ (23), 65 [C₅H₅]⁺ (6), 55 [C₄H₇]⁺ (23).

7.3.9.3. 4,9-Dimethoxy-5-(4-phenoxybutoxy)-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-on (17)



Das Ausgangsprodukt stammte aus der Chemikaliensammlung des Pharmazeutischen Instituts. Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante B. Dazu wurden 793 mg (3,02 mmol) 5-Hydroxy-4,9-dimethoxy-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-7-on **6** mit 1,21 g (8,77 mmol) Kaliumcarbonat und einer Spatelspitze Kaliumiodid in 15 ml getrocknetem DMF bei 120 °C gerührt. Eine Lösung von 1,04 g (4,5 mmol) 4-Phenoxybutylbromid in 10 ml getrocknetem DMF wurde langsam hinzugegossen.

7. Experimenteller Teil

Ausbeute: 260 mg (0,63 mmol, 21 % der Theorie)

MPLC-Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat (70:30)

Schmelzpunkt: 94,5 °C (weißes Pulver)

$C_{23}H_{22}O_7$ (410,43 g/mol)	ber.: C 67,31 %	H 5,40 %
	gef.: C 67,02 %	H 5,52 %

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz):

δ/ppm (TMS) = 1,88-1,99 (m, 4H, 5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 3,92 (s, 3H, 4-OCH₃ bzw. 9-OCH₃), 4,02-4,16 (m, 5H, 4-OCH₃ bzw. 9-OCH₃ und 5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,23-4,30 (m, 2H, 5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 5,76 (s, 1H, H-6), 6,89-6,96 (m, 3H, H-2', H-4' und H-6'), 7,19 (d, 1H, $^3J = 2,3$ Hz, H-3), 7,25-7,30 (m, 2H, H-3' und H-5'), 8,07 (d, 1H, $^3J = 2,2$ Hz, H-2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 24,93 und 25,29 (5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 61,01 und 62,10 (4-OCH₃ und 9-OCH₃), 66,76 und 69,19 (5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 88,55 (C-6), 104,90 (C-3), 105,33 (C-4a), 114,35 (C-2' und C-6'), 118,78 (C-3a), 120,32 (C-4'), 128,59 (C-9), 129,33 (C-3' und C-5'), 143,05 (C-4), 145,10 (C-8a), 146,55 (C-2), 147,95 (C-9a), 158,51 (C-1'), 160,92 (C-7), 167,17 (C-5).

IR (KBr):

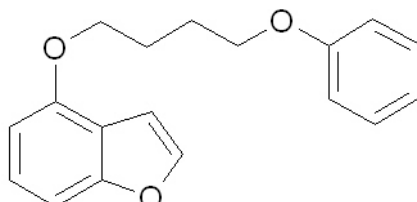
$\nu/\text{cm}^{-1} = 2954, 1718, 1587, 1376, 1250, 1128, 1064.$

MS (EI):

m/z (%) = 410 M⁺ (34), 220 (17), 205 (16), 177 (9), 149 [C₁₀H₁₃O]⁺ (82), 107 [C₆H₅O-CH₂]⁺ (100), 79 (12), 77 [C₆H₅]⁺ (30), 65 [C₅H₅]⁺ (6), 55 [C₄H₇]⁺ (34).

7.3.10. Verbindungen mit verschiedenen Grundkörpern

7.3.10.1. 4-(4-Phenoxybutoxy)benzofuran (44)



Darstellung von 4-Hydroxybenzofuran (Karanjol) (43)

Die Synthese wurde nach KNEEN UND MADDOCKS durchgeführt (KNEEN UND MADDOCKS, 1986). Hierzu kochte man für 20 Stunden 5 g (36,7 mmol) 6,7-Dihydro-5*H*-benzofuran-4-on **42**, 10 ml 1-Dodecen und 3,3 g Palladium-Aktivkohle (10 % Pd) in 60 ml Dekalin am Rückfluss unter Stickstoffatmosphäre. Nachdem der Ansatz auf ca. 80 °C abgekühlt war, fügte man Ethanol hinzu. Nach vollständigem Abkühlen wurde dann der gebildete Niederschlag abfiltriert und das Rohprodukt mittels MPLC (Cyclohexan/Ethylacetat (80:20)) aufgereinigt. **43** fiel in einer Ausbeute von 45 % an und wurde ohne weitere Charakterisierung für die nächste Synthese verwendet.

Darstellung des 4-(4-Phenoxybutoxy)benzofuran (44)

Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante B. Dazu wurden 2,1 g (15,7 mmol) **43**, 7,21 g (31,5 mmol) 4-Phenoxybutylbromid, 6,48 g (47 mmol) Kaliumcarbonat und eine Spatelspitze Kaliumiodid in 25 ml getrocknetes DMF gegeben und unter Rückfluss erhitzt. Nach Aufarbeitung (MPLC, Fließmittel: Cyclohexan) erhielt man 300 mg eines gelblichen Öls.

Gesamtausbeute: 6,8 % der Theorie

C₁₈H₁₈O₃ (282,34 g/mol)

ber.: C 76,57 % H 6,43 %

gef.: C 76,42 % H 6,73 %

7. Experimenteller Teil

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz):

δ/ppm (TMS) = 2,02-2,15 (m, 4H, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,12 (t, 2H, ³*J* = 6,4 Hz, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,20 (t, 2H, ³*J* = 6,1 Hz, 4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 6,70 (dd, 1H, ³*J* = 7,7 Hz, ⁵*J* = 0,5 Hz, H-5 bzw. H-7), 6,89 (dd, 1H, ³*J* = 2,2 Hz, ⁵*J* = 0,7 Hz, H-3), 6,92-7,00 (m, 3H, H-2', H-4' und H-6'), 7,15-7,35 (m, 4H, H-5 bzw. H-7, H-6, H-3' und H-5'), 7,56 (d, 1H, ³*J* = 2,2 Hz, H-2).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 25,39 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 66,93 und 67,59 (4-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 103,80 (C-7), 104,16 (C-3), 104,57 (C-5), 114,37 (C-2' und C-6'), 117,16 (C-3a), 120,33 (C-4'), 125,11 (C-6), 129,36 (C-3' und C-5'), 144,36 (C-2), 152,46 (C-4), 155,55 (C-7a), 158,53 (C-1').

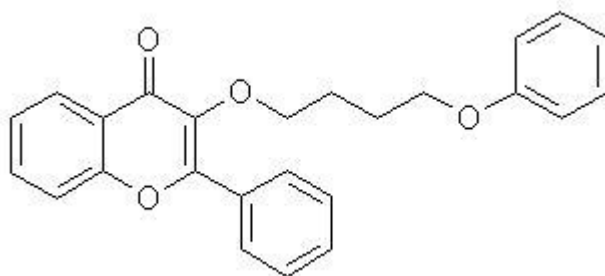
IR (KBr):

ν/cm^{-1} = 2947, 1601, 1470, 1433, 1278, 1246, 1138, 1077.

MS (EI):

m/z (%) = 282 M⁺ (12), 149 [C₁₀H₁₃O]⁺ (88), 134 [C₈H₅O₂]⁺ (23), 107 [C₆H₅O-CH₂]⁺ (100), 94 (9), 77 [C₆H₅]⁺ (46), 65 [C₅H₅]⁺ (8), 55 [C₄H₇]⁺ (54), 51 (17), 41 [C₃H₅]⁺ (7).

7.3.10.2. 3-(4-Phenoxybutoxy)-2-phenyl-4H-[1]benzopyran-4-on (18)



Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante A. Dazu suspendierte man 550 mg (2,3 mmol) 3-Hydroxy-2-phenyl-4H-[1]benzopyran-4-on **7** und 1,89 g (8,9 mmol) CsF-Celit in 20 ml getrocknetem Acetonitril und erhitze unter Rückfluss. 1,42 g (6,2 mmol) 4-Phenoxybutylbromid wurden portionsweise zu dem Reaktionsansatz hinzugefügt.

Ausbeute: 850 mg (2,2 mmol, 95,6 % der Theorie)

MPLC-Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat (90:10)

Schmelzpunkt: 66 °C (weißes Pulver)

C₂₅H₂₂O₄ (386,45 g/mol)

ber.: C 77,70 % H 5,74 %

gef.: C 77,93 % H 5,86 %

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz):

δ /ppm (TMS) = 1,74-1,78 (m, 4H, 3-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 3,93 (t, 2H, ³J = 5,8 Hz, 3-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,06 (t, 2H, ³J = 5,8 Hz, 3-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 6,86-6,92 (m, 3H, H-2'', H-4'' und H-6''), 7,23-7,28 (m, 2H, H-3'' und H-5''), 7,47-7,52 (m, 1H, H-6), 7,56-7,58 (m, 3H, H-2', H-4', H-6'), 7,73 (dd, 1H, ³J = 8,3 Hz, ⁴J = 0,8 Hz, H-8), 7,82 (ddd, 1H, ³J = 8,5 Hz, ³J = 7,0 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H-7), 8,04-8,07 (m, 2H, H-3', H-5'), 8,11 (dd, 1H, ³J = 7,9 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, H-5).

7. Experimenteller Teil

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 25,18 und 26,00 (3-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 66,77 und 71,50 (3-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 114,33 (C-2'' und C-6''), 118,31 (C-8), 120,26 (C-4''), 123,47 (C-4a), 124,88 (C-6), 124,91 (C-4'), 128,32 (C-2' und C-6'), 128,42 (C-3' und C-5'), 129,30 (C-3'' und 5''), 130,47 (C-1'), 130,70 (C-5), 133,90 (C-7), 139,74 (C-3), 154,68 (C-2), 155,27 (C-8a), 158,49 (C-1''), 173,88 (C-4).

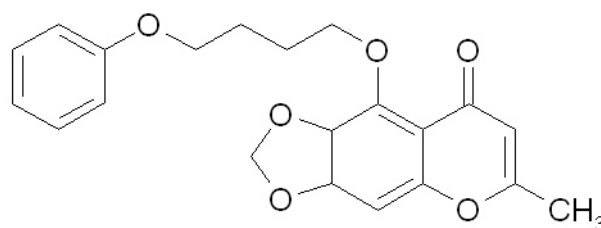
IR (KBr):

ν/cm^{-1} = 2924, 1636, 1468, 1206.

MS (EI):

m/z (%) = 386 M⁺ (4), 237 [C₁₅H₉O₃]⁺ (21), 149 [C₁₀H₁₃O]⁺ (100), 121 [C₈H₉O]⁺ (9), 107 [C₆H₅O-CH₂]⁺ (75), 94 (8), 77 [C₆H₅]⁺ (47), 65 [C₅H₅]⁺ (10), 55 [C₄H₇]⁺ (43), 51 (9).

7.3.10.3. 5-Hydroxy-2-methyl-6,7-methylenedioxy-4*H*-[1]benzopyran-4-on (53)



Darstellung des **6-Formyl-7-hydroxy-5-methoxy-2-methyl-4-*H*-[1]benzopyran-4-on (50)**

Die Oxidation des 4-Methoxy-7-methyl-5*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopyran-5-on **25** (Visnagin) erfolgte analog der Vorschrift von SCHÖNBERG ET AL. (SCHÖNBERG ET AL., 1953). Dazu löste man 10 g (43,5 mmol) **25** in 300 ml 10 %iger

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

Schwefelsäure (ca. 60 °C). 20 ml 10 %ige Kaliumdichromatlösung wurden langsam zugetropft, so dass die Temperatur in dem Bereich von 60-70 °C gehalten wurde. Es bildete sich beinahe sofort ein weißer Niederschlag. Nachdem der Ansatz für 2 Stunden bei Raumtemperatur weiter gerührt wurde, filtrierte man den Niederschlag ab, wusch diesen mit Wasser und kristallisierte aus Methanol/Wasser um. **50** ergab sich in einer Ausbeute von 70,8 % und wurde ohne weitere Charakterisierung für die nächste Synthese eingesetzt.

Darstellung des **6,7-Dihydroxy-5-methoxy-2-methyl-4-*H*-[1]benzopyran-4-on (51)**

Die Synthese wurde analog der Vorschrift von GAMMILL UND NASH durchgeführt (GAMMILL UND NASH, 1986). Dazu wurden 4,7 g (20,1 mmol) **50** in 34 ml einer 4 %igen Natriumhydroxidlösung gegeben. Dann tropfte man 12 ml einer 35 %igen Wasserstoffperoxidlösung unter Eiskühlung hinzu. Der Reaktionsansatz wurde für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, dann mit Salzsäure angesäuert und mit Ethylacetat verdünnt. Des Weiteren schüttelte man mehrmals mit Ethylacetat aus. Die Ethylacetat-Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. **51** resultierte in einer Ausbeute von 86 %. Zur Identifizierung wurde ein ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz):

$\delta/\text{ppm (TMS)} = 2,24$ (s, 3H, 2-CH₃), $3,71$ (s, 3H, 5-OCH₃), $5,90$ (s, 1H, H-8), $6,62$ (s, 1H, H-3), $9,47$ (s, 2H, 6-OH und 7-OH).

Darstellung des **2-Methyl-6,7-methylenedioxy-5-methoxy-4*H*-[1]benzopyran-4-on (52)**

Dieser Syntheseschritt wurde ebenfalls analog der Vorschrift von GAMMILL UND NASH durchgeführt (GAMMILL UND NASH, 1986). Dazu wurden 3,84 g (17,3 mmol) **51** und 5,19 g (34,6 mmol) Kaliumcarbonat in 86,5 ml DMF gelöst.

7. Experimenteller Teil

Zu dieser Lösung wurde innerhalb von 15 Minuten unter Stickstoffatmosphäre eine Lösung aus 3,31 g (19,03 mmol) Dibrommethan in 63 ml DMF getropft. Dieses Reaktionsgemisch ließ man für ca. 4 Stunden bei 95 °C rühren. Anschließend filtrierte man das Kaliumcarbonat ab und entfernte das DMF unter Vakuum. Der Rückstand wurde mit Ether versetzt und mit 1 %iger Natronlauge dreimal ausgeschüttelt. Anschließend rotierte man den Ether unter Vakuum ab und reinigte den Rückstand mittels MPLC (Cyclohexan/Ethylacetat (60:40)) auf. Es ergab sich eine Ausbeute an **52** von 35,4 %. Zur Identifizierung wurde ein ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz):

δ /ppm (TMS) = 2,26 (s, 3H, 2-CH₃), 3,87 (s, 3H, 5-OCH₃), 5,98 (s, 1H, H-8), 6,16 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 6,90 (s, 1H, H-3).

Darstellung des **5-Hydroxy-2-methyl-6,7-methylenedioxy-4H-[1]benzopyran-4-on (53)**

850 mg (3,63 mmol) **52** wurden in 20 ml Dichlormethan gelöst. Unter Eiskühlung tropfte man langsam 347 μ l (3,6 mmol) Bortribromid zu und ließ anschließend das Gemisch für einige Stunden am Rückfluss kochen. Nach Zugabe von Wasser und zweimaligem Ausschütteln der wässrigen Phase mittels Dichlormethan wurden die Dichlormethan-Phasen vereinigt und einrotiert. Nach Aufreinigung mittels MPLC (Cyclohexan/Ethylacetat (50:50)) erhielt man **53** in einer Ausbeute von 85 %.

Gesamtausbeute: 18,3 % der Theorie

Schmelzpunkt: 174 °C (gelbliches Pulver)

C₁₁H₈O₅ (220,18 g/mol)

ber.: C 60,01 % H 3,66 %

gef.: C 59,14 % H 3,83 %

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz):

δ/ppm (TMS) = 2,37 (s, 3H, 2-CH₃), 6,15 (s, 2H, H-2'), 6,23 (s, 1H, H-8), 6,78 (s, 1H, H-3), 12,84 (s, 1H, 5-OH).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 19,75 (2-CH₃), 89,41 (C-8), 102,64 (C-2'), 106,27 (C-4a), 107,86 (C-3), 129,29 (C-6), 141,02 (C-5), 152,99 (C-8a), 153,65 (C-7), 167,99 (C-2), 182,39 (C-4).

IR (KBr):

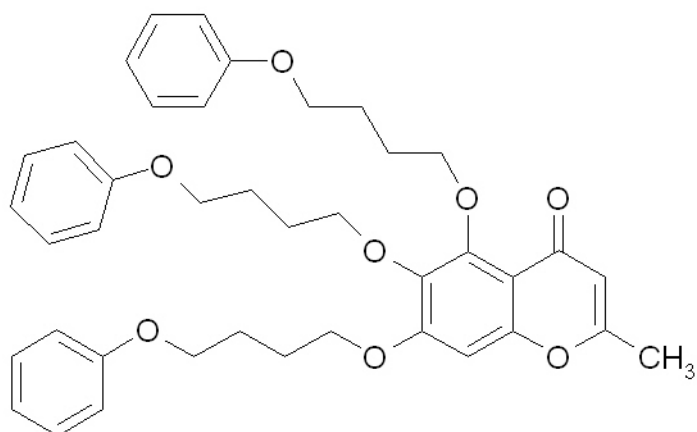
ν/cm^{-1} = 2917, 1683, 1637, 1472, 1394, 1348, 1278, 1104.

MS (EI):

m/z (%) = 220 M⁺ (100), 191 (10), 162 (54), 134 (29), 122 (8), 119 (8), 78 (28), 69 (22), 66 (22), 53 (29), 43 (23).

7. Experimenteller Teil

7.3.10.4. 2-Methyl-5,6,7-tris-(4-phenoxybutoxy)-4H-[1]benzopyran-4-on (55)



Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante B. Dazu wurden 355 mg (1,61 mmol) 5-Hydroxy-2-methyl-6,7-methylenedioxy-4H-[1]benzopyran-4-on **53**, 1,47 g (6,44 mmol) 4-Phenoxybutylbromid, 644 mg (4,67 mmol) Kaliumcarbonat und eine Spatelspitze Kaliumiodid in 25 ml getrocknetes DMF gegeben und unter Rückfluss erhitzt. Es ergab sich ein gelbliches Öl.

Ausbeute: 150 mg (0,23 mmol, 14,3 % der Theorie)

MPLC-Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat (80:20)

$C_{40}H_{44}O_8$ (652,79 g/mol)	ber.: C 73,60 %	H 6,79 %
	gef.: C 73,88 %	H 6,84 %

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz):

δ/ppm (TMS) = 1,76-1,94 (m, 12H, $3 \times -\text{O}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_5$), 2,28 (s, 3H, 2- CH_3), 3,93-4,04 (m, 10H) und 4,15 (t, 2H, $^3J = 5,6$ Hz) ($3 \times -\text{O}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-\text{O}-$), 5,98 (s, 1H, H-8), 6,86-6,92 (m, 9H, $3 \times \text{H}-2'$, $3 \times \text{H}-4'$, $3 \times \text{H}-6'$), 6,94 (s, 1H, H-3), 7,19-7,27 (m, 6H, $3 \times \text{H}-3'$ und $3 \times \text{H}-5'$).

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 19,15 (2- CH_3), 25,10, 25,31, 25,37, 25,41, 26,19 und 26,27 ($3 \times -\text{O}-\text{CH}_2-(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_2-\text{CH}_2-\text{O}-$), 66,76, 66,94, 67,06, 68,35, 72,91 und 73,88 ($3 \times -\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2)_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}-$), 97,17 (C-8), 110,46 (C-4a), 111,79 (C-3), 114,27 und 114,32 ($3 \times \text{C}-2'$ und $3 \times \text{C}-6'$), 120,23 und 120,29 ($3 \times \text{C}-4'$), 129,28 ($3 \times \text{C}-3'$ und $3 \times \text{C}-5'$), 138,82 (C-6), 150,77 (C-5), 154,12 (C-8a), 156,59 (C-7), 158,46, 158,52 und 158,58 ($3 \times \text{C}-1'$), 163,52 (C-2), 175,37 (C-4).

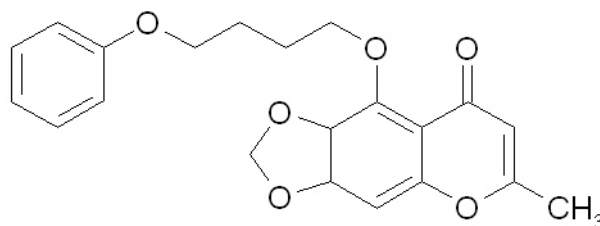
IR (KBr):

ν/cm^{-1} = 3061, 2946, 2874, 1386, 1240, 1171, 1118, 1042.

MS (EI):

m/z (%) = 559 [$\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{O}_7$] $^+$ (3), 517 (5), 503 [$\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{O}_7$] $^+$ (3), 149 [$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}$] $^+$ (100), 107 [$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-\text{CH}_2$] $^+$ (72), 94 (14), 79 (11), 77 [C_6H_5] $^+$ (18), 65 [C_5H_5] $^+$ (5), 55 [C_4H_7] $^+$ (26).

7.3.10.5. 2-Methyl-6,7-methylenedioxy-5-(4-phenoxybutoxy)-4H-[1]benzopyran-4-on (54)



Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante B. Dazu wurden 238 mg (1,08 mmol) 5-Hydroxy-2-methyl-6,7-methylenedioxy-4H-[1]benzopyran-4-on **53**, 495 mg (2,16 mmol) 4-Phenoxybutylbromid, 430 mg (3,12 mmol) Kaliumcarbonat und eine Spatelspitze Kaliumiodid in 15 ml getrocknetes Aceton gegeben und unter Rückfluss erhitzt.

7. Experimenteller Teil

Ausbeute: 80 mg (0,22 mmol, 20,4 % der Theorie)

MPLC-Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat (80:20)

Schmelzpunkt: 83,5 °C (gelbes Pulver)

$C_{21}H_{20}O_6$ (368,39 g/mol)	ber.: C 68,47 %	H 5,47 %
	gef.: C 68,73 %	H 5,69 %

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz):

δ/ppm (TMS) = 1,82-2,00 (m, 4H, 5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 2,31 (s, 3H, 2-CH₃), 4,07 (t, 2H, $^3J = 6,2$ Hz, 5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,20 (t, 2H, $^3J = 6,0$ Hz, 5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 6,01 (s, 1H, H-8), 6,17 (s, 2H, H-2'), 6,92-6,98 (m, 4H, H-3, H-2'', H-4'' und H-6''), 7,27-7,35 (m, 2H, H-3'' und H-5'').

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 19,05 (2-CH₃), 25,17 und 26,03 (5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 66,98 und 72,95 (5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 93,48 (C-8), 102,33 (C-2'), 110,55 (C-3), 112,42 (C-4a), 114,34 (C-2'' und C-6''), 120,23 (C-4''), 129,31 (C-3'' und C-5''), 135,77 (C-6), 139,08 (C-5), 152,16 (C-8a), 154,16 (C-7), 158,55 (C-1''), 163,37 (C-2), 175,53 (C-4).

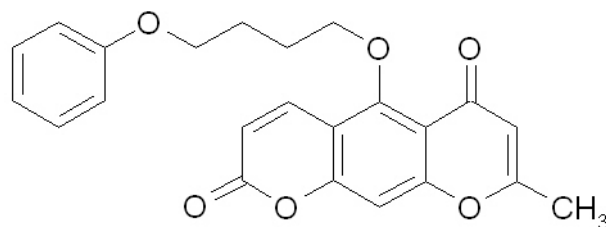
IR (KBr):

$\nu/\text{cm}^{-1} = 2960, 1667, 1622, 1475, 1248, 1079.$

MS (EI):

m/z (%) = 368 M⁺ (3), 275 [C₁₅H₁₅O₅]⁺ (100), 233 [C₁₂H₉O₅]⁺ (80), 220 (71), 162 (22), 149 [C₁₀H₁₃O]⁺ (24), 107 [C₆H₅O-CH₂]⁺ (52), 77 [C₆H₅]⁺ (61), 65 [C₅H₅]⁺ (20), 55 [C₄H₇]⁺ (35).

7.3.10.6. 2,6-Dihydro-8-methyl-5-(4-phenoxybutoxy)pyrano[3,2-*g*][1]benzopyran-2,6-dion (58)



Darstellung des **6-Formyl-7-hydroxy-5-methoxy-2-methyl-4-*H*-[1]benzopyran-4-on (50)**

Die Herstellung der Substanz erfolgte wie bei der Synthese der Verbindung **53** (Kapitel 7.2.10.3) bereits beschrieben.

Darstellung des **2,6-Dihydro-5-methoxy-8-methylpyrano[3,2-*g*][1]benzopyran-2,6-dion (56)**

Die Synthese wurde angelehnt an die Vorschrift von ATTA ET AL. durchgeführt (ATTA ET AL., 1993). Ein Gemisch von 7,2 g (30,8 mmol) **50** und 10,3 g (30,8 mmol) Methoxycarbonylmethyltriphenylphosphoran wurde in 500 ml trockenem Toluol 6 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum reinigte man den Rückstand mittels MPLC (Dichlormethan/Ethylacetat (10:1)) auf. Dabei ergab sich eine Ausbeute an **56** von 25,2 %. Zur Identifizierung wurde ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz):

δ/ppm (TMS) = 2,34 (s, 3H, 8-CH₃), 3,90 (s, 3H, 5-OCH₃), 6,15 (d, 1H, $^4J = 0,8$ Hz, H-7), 6,49 (d, 1H, $^3J = 9,8$ Hz, H-3), 7,35 (d, 1H, $^5J = 0,5$ Hz, H-10), 8,15 (dd, 1H, $^3J = 9,8$ Hz, $^5J = 0,5$ Hz, H-4).

7. Experimenteller Teil

Darstellung des **2,6-Dihydro-5-hydroxy-8-methylpyrano[3,2-*g*][1]benzopyran-2,6-dion (57)**

290 mg (1,12 mmol) **56** wurden in 15 ml Dichlormethan gelöst. Unter Eiskühlung tropfte man langsam 139 μl (1,44 mmol) Bortribromid zu und erhitzte dann das Gemisch für 30 Minuten unter Rückfluss. Nach Zugabe von Wasser und zweimaligem Ausschütteln der wässrigen Phase mittels Dichlormethan wurden die Dichlormethan-Phasen vereinigt und einrotiert. **57** ergab sich in einer Ausbeute von 90,7 %. Zur Identifizierung wurde ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz):

δ/ppm (TMS) = 2,44 (s, 3H, 8-CH₃), 6,38-6,41 (m, 2H, H-3 und H-7), 7,04 (s, 1H, H-10), 8,09 (d, 1H, $^3J = 9,6$ Hz, H-4).

Darstellung des **2,6-Dihydro-8-methyl-5-(4-phenoxybutoxy)pyrano[3,2-*g*][1]benzopyran-2,6-dion (58)**

Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante B. Dazu wurden 180 mg (0,74 mmol) **57**, 336,8 mg (1,47 mmol) 4-Phenoxybutylbromid, 306,4 mg (2,22 mmol) Kaliumcarbonat und eine Spatelspitze Kaliumiodid in 30 ml getrocknetes DMF gegeben und auf 120 °C erhitzt. Das Produkt **58** fiel nach Aufreinigung mittels MPLC (Dichlormethan/Methanol (200:1)) in einer Ausbeute von 9,3 % an.

Gesamtausbeute: 2,4 % der Theorie

Schmelzpunkt: 120,0-124,0 °C (weiße Kristalle)

C₂₃H₂₀O₆ (392,41 g/mol)

ber.: C 70,40 % H 5,14 %

gef.: C 70,75 % H 5,56 %

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz):

δ/ppm (TMS) = 1,90-2,01 (m, 4H, 5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 2,35 (s, 3H, 8-CH₃), 4,06 (t, 2H, ³*J* = 6,1 Hz, 5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,10 (t, 2H, ³*J* = 6,3 Hz, 5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 6,15 (s, 1H, H-7), 6,48 (d, 1H, ³*J* = 9,8 Hz, H-3), 6,89-6,94 (m, 3H, H-2', H-4' und H-6'), 7,24-7,30 (m, 2H, H-3' und H-5'), 7,36 (s, 1H, H-10), 8,14 (d, 1H, ³*J* = 9,8 Hz, H-4).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 19,27 (8-CH₃), 25,23 und 26,16 (5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 67,07 und 76,29 (5-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 100,81 (C-10), 110,94 (C-7), 111,24 (C-5a), 113,95 (C-4a), 114,37 (C-2' und C-6'), 115,31 (C-3), 120,31 (C-4'), 129,35 (C-3' und C-5'), 138,67 (C-4), 156,09, 158,53, 158,86 und 158,94 (C-5, C-9a, C-10a und C-1'), 164,91 (C-8 und C-2), 175,19 (C-6).

IR (KBr):

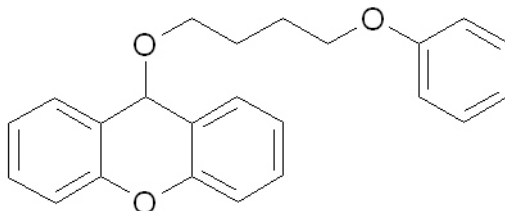
ν/cm^{-1} = 2924, 1739, 1669, 1616, 1593, 1351, 1121, 1078.

MS (EI):

m/z (%) = 392 M⁺ (15), 299 [C₁₇H₁₅O₅]⁺ (42), 257 [C₁₄H₉O₅]⁺ (85), 244 (43), 229 [C₁₂H₅O₅]⁺ (34), 149 [C₁₀H₁₃O]⁺ (53), 107 [C₆H₅O-CH₂]⁺ (95), 79 (33), 77 [C₆H₅]⁺ (83), 55 [C₄H₇]⁺ (100).

7. Experimenteller Teil

7.3.10.7. 9-(4-Phenoxybutoxy)-9*H*-dibenzo[*b,e*]pyran (19)



Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante B. Dazu wurden 3,5 g (20 mmol) 9-Hydroxy-9*H*-dibenzo[*b,e*]pyran **8**, 8 g (58 mmol) Kaliumcarbonat und eine Spatelspitze Kaliumiodid in 100 ml getrocknetem DMF bei 120 °C unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Man tropfte langsam eine Lösung von 5,73 g (25 mmol) 4-Phenoxybutylbromid in 35 ml getrocknetem DMF zum Ansatz hinzu. Anschließend wurde noch für 2 Stunden am Rückfluss unter Stickstoffatmosphäre gekocht.

Ausbeute: 150 mg (0,43 mmol, 2,2 % der Theorie)

MPLC-Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat (95:5)

Schmelzpunkt: 96,5 °C (weiße Kristalle)

C₂₃H₂₂O₃ (346,43 g/mol)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz):

δ /ppm (TMS) = 1,46-1,66 (m, 4H, 10-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 3,25 (t, 2H, ³*J* = 6,1 Hz, 10-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 3,82 (t, 2H, ³*J* = 6,3 Hz, 10-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 5,70 (s, 1H, H-9), 6,83 (d, 2H, ³*J* = 7,9 Hz, H-1 und H-8), 6,89 (t, 1H, ³*J* = 7,3 Hz) und 7,19-7,27 (m, 6H) (H-3, H-6, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 7,40-7,45 (m, 2H, H-2 und H-7), 7,56 (dd, 2H, ³*J* = 7,5 Hz, ³*J* = 1,3 Hz, H-4 und H-5).

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 25,44 und 25,78 (10-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 64,44 und 66,82 (10-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 69,28 (C-9), 114,29 (C-2' und C-6'), 116,19 (C-4 und C-5), 120,24 (C-4'), 120,55 (C-8a und C-9a), 123,25 (C-2 und C-7), 129,30 (C-3' und C-5'), 129,60 (C-3 und C-6), 130,08 (C-1 und C-8), 151,63 (C-4a und C-10a), 158,47 (C-1').

IR (KBr):

ν/cm^{-1} = 2948, 2854, 1602, 1480, 1458, 1258.

MS (EI):

m/z (%) = 346 M⁺ (1), 197 [C₁₃H₉O₂]⁺ (29), 181 [C₁₃H₉O]⁺ (100), 152 (8), 149 [C₁₀H₁₃O]⁺ (8), 94 (16), 77 [C₆H₅]⁺ (7), 71 (7), 55 [C₄H₇]⁺ (5), 41 [C₃H₅]⁺ (5).

HRMS:

ber.: C₂₂H₂₃O₃ 346,15689 g/mol

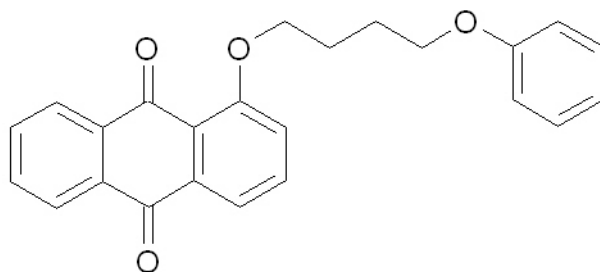
gef.: C₂₂H₂₃O₃ 346,15518 g/mol

ber.: C₂₂¹³CH₂₃O₃ 347,16025 g/mol

gef.: C₂₂¹³CH₂₃O₃ 347,16011 g/mol

7. Experimenteller Teil

7.3.10.8. 1-(4-Phenoxybutoxy)anthrachinon (20)



Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante B. Dazu wurden 897 mg (4 mmol) 1-Hydroxyanthrachinon **9**, 1,37 g (6 mmol) 4-Phenoxybutylbromid, 1,6 g (11,6 mmol) Kaliumcarbonat und eine Spatelspitze Kaliumiodid in 40 ml getrocknetem DMF bei 120 °C gerührt.

Ausbeute: 600 mg (1,61 mmol, 40 % der Theorie)

MPLC-Fließmittel: Cyclohexan/Ethylacetat (95:5)

Schmelzpunkt: 151,5 °C (gelbe, watteartige Kristalle)

$C_{24}H_{20}O_4$ (372,42 g/mol)

ber.: C 77,40 % H 5,41 %

gef.: C 77,60 % H 5,46 %

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz):

δ /ppm (TMS) = 1,94-2,13 (m, 4H, 1-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,15 (t, 2H, ³*J* = 6,2 Hz, 1-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,29 (t, 2H, ³*J* = 5,7 Hz, 1-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 6,90-7,00 (m, 3H, H-2', H-4' und H-6'), 7,27-7,32 (m, 2H, H-3' und H-5'), 7,61-7,64 (m, 1H, H-2), 7,83-7,97 (m, 4H, H-3, H-4, H-7 und H-8), 8,15-8,19 (m, 2H, H-6 und H-9).

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 25,29 und 25,48 (1-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 67,01 und 68,68 (1-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 114,35 (C-2' und C-6'), 118,80 (C-2), 119,89 (C-4), 120,23 (C-4'), 120,67 (C-10a), 125,99 (C-6), 126,53 (C-9), 129,29 (C-3' und C-5'), 131,89 (C-5a), 133,39 (C-7), 134,47 (C-8), 134,92 (C-9a und C-4a), 135,29 (C-3), 158,56 (C-1'), 159,33 (C-1), 181,01 (C-10), 182,75 (C-5).

Die Zuordnung der Signale erfolgte analog zu 1-Methoxyanthrachinon (BERGER ET AL., 1980).

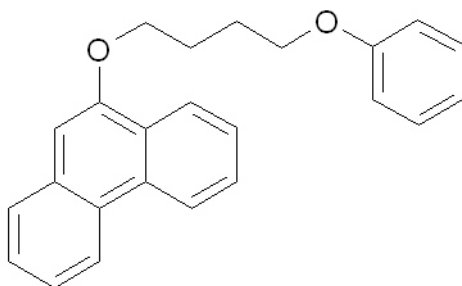
IR (KBr):

ν/cm^{-1} = 2915, 1668, 1594, 1260, 1244.

MS (EI):

m/z (%) = 372 M⁺ (1), 279 [C₁₈H₁₅O₃]⁺ (26), 237 [C₁₅H₉O₃]⁺ (9), 225 (17), 147 (8), 120 (7), 107 [C₆H₅O-CH₂]⁺ (14), 94 (9), 77 [C₆H₅]⁺ (19), 55 [C₄H₇]⁺ (100).

7.3.10.9. 9-(4-Phenoxybutoxy)phenanthren (21)



Die Umsetzung erfolgte mittels der Variante B. Dazu wurden 700 mg (3,6 mmol) 9-Hydroxyphenanthren **10**, 2,67 g (11,6 mmol) 4-Phenoxybutylbromid, 1,49 g (10,8 mmol) Kaliumcarbonat und eine Spatelspitze Kaliumiodid in 25 ml getrocknetem DMF bei 120 °C gerührt. 9-(4-Phenoxybutoxy)phenanthren **21** konnte durch Ausfällen aus Dichlormethan mittels Zugabe von Cyclohexan/Ethylacetat

7. Experimenteller Teil

(60:40) in reiner Form gewonnen werden. Daher wurde auf eine Reinigung mittels MPLC verzichtet und lediglich aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 700 mg (2,04 mmol, 56,8 % der Theorie)

Schmelzpunkt: 105,5 °C (schwach hellgelbe, watteartige Kristalle)

$C_{24}H_{22}O_2$ (342,44 g/mol)	ber.: C 84,18 %	H 6,48 %
	gef.: C 83,38 %	H 6,70 %

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz):

δ/ppm (TMS) = 1,99-2,09 (m, 4H, 9-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,09 (t, 2H, $^3J = 6,0$ Hz, 9-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 4,31 (t, 2H, $^3J = 5,8$ Hz, 9-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 6,90-6,96 (m, 3H, H-2', H-4' und H-6'), 7,16-7,31 (m, 3H, H-10, H-3' und H-5'), 7,47-7,74 (m, 4H, H-2, H-3, H-6 und H-7), 7,85 (dd, 1H, $^3J = 7,8$ Hz, $^4J = 1,1$ Hz, H-1 bzw. H-8), 8,29 (dd, 1H, $^3J = 8,0$ Hz, $^4J = 1,1$ Hz, H-1 bzw. H-8), 8,69 (d, 1H, $^3J = 7,9$ Hz, H-4 bzw. H-5), 8,78 (d, 1H, $^3J = 8,0$ Hz, H-4 bzw. H-5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz):

δ/ppm (TMS) = 25,32 und 25,63 (9-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 66,93 und 67,37 (9-O-CH₂-(CH₂)₂-CH₂-O-C₆H₅), 102,80 (C-10), 114,39 (C-2' und C-6'), 120,32 (C-4'), 121,96, 122,56, 122,80, 124,24, 126,49, 126,94, 127,19, 127,24 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7 und C-8), 125,67 und 125,86 (C-4a und C-8a), 129,35 (C-3' und C-5'), 130,64 (C-4b), 132,54 (C-10a), 134,47 (C-8), 134,92 (C-9a und C-4a), 151,92 (C-9), 158,53 (C-1').

IR (KBr):

$\nu/\text{cm}^{-1} = 2952, 1624, 1600, 1582, 1496, 1314, 1248, 1120.$

7.3. Synthesen und physikalische Daten der einzelnen Verbindungen

MS (EI):

m/z (%) = 342 M^+ (17), 194 (20), 165 $[C_{10}H_{13}O_2]^+$ (30), 149 $[C_{10}H_{13}O]^+$ (100), 107 $[C_6H_5O-CH_2]^+$ (92), 95 (5), 94 (5), 79 (13), 77 $[C_6H_5]^+$ (29), 65 $[C_5H_5]^+$ (6), 55 $[C_4H_7]^+$ (35).

Literaturverzeichnis

ABDEL-RAHMAN, A.-R.H., KESHK, E.M. und EL-TELBANI, E.M., „Linearly fused furochromones by intramolecular enaminone reactions“, *Zeitschrift fuer Naturforschung, B: Chemical Sciences*, 57, 5, 557–562 (2002).

AHLUWALIA, V.K., ARORA, K.K. und PRAKASH, C., „Selective Claisen migration in chromones. A convenient synthesis of the linear furanochromones desmethoxyvisnagin, norvisnagin, and visnagin“, *Gazzetta Chimica Italiana*, 111, 3-4, 103–107 (1981).

AHOND, A., PICOT, F., POTIER, P., POUPAT, C. und SEVENET, T., „Plants of New Caledonia. Part 48. Alkaloids of *Melicope leratii*“, *Phytochemistry*, 17, 1, 166–167 (1978).

AIYAR, J., RIZZI, J.P., GUTMAN, G.A. und CHANDY, K.G., „The signature sequence of voltage-gated potassium channels projects into the external vestibule“, *Journal of Biological Chemistry*, 271, 49, 31013–31016 (1996).

AIYAR, J., WITHKA, J.M., RIZZI, J.P., SINGLETON, D.H., ANDREWS, G.C., LIN, W., BOYD, J., HANSON, D.C., SIMON, M. und AL., ET., „Topology of the pore-region of a K⁺ channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins“, *Neuron*, 15, 5, 1169–1181 (1995).

- AMEND, S.A., „Inhaltsstoffe der Gartenraute (*Rutae herba*) - Grundlagen für eine klinische Studie zu MS“, *Edition Forschung, Karl und Veronica Carstens-Stiftung, KVC Verlag, Essen* (1998).
- ARAD-YELLIN, R., GREEN, B.S. und MUSZKAT, K.A., „Photocyclization of 2,6-dichlorocinnamic acid derivatives to 5-chlorocoumarin“, *Journal of Organic Chemistry*, 48, 15, 2578–2583 (1983).
- ASHCROFT, F.M., „From molecule to malady“, *Nature*, 440, 7083, 440–447 (2006).
- ASHCROFT, F.M., KAKEI, M., KELLY, R.P. und SUTTON, R., „ATP-sensitive potassium channels in human isolated pancreatic B-cells“, *FEBS Letters*, 215, 1, 9–12 (1987).
- ATTA, S.M.S., HAFEZ, T.S. und MAHRAN, M.R., „Organophosphorus chemistry. 25. The utilization of Wittig reagents in lactone ring formation. Application to the synthesis of linear furocoumarins and pyranocoumarins“, *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*, 80, 1-4, 109–116 (1993).
- ATWAL, K.S., VACCARO, W., LLOYD, J., FINLAY, H., LIN, Y. und BHANDARU, R.S., *Patent*, WO 01/40231 A1 (2001).
- BAELL, J.B., GABLE, R.W., HARVEY, A.J., TOOVEY, N., HERZOG, T., HÄNSEL, W. und WULFF, H., „Khellinone Derivatives as Blockers of the Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.3: Synthesis and Immunosuppressive Activity“, *Journal of Medicinal Chemistry*, 47, 9, 2326–2336 (2004).
- BAGDANY, M., BATISTA, C.V.F., VALDEZ-CRUZ, N.A., SOMODI, S., VEGA, R.C.R. DE LA, LICEA, A.F., VARGA, Z., GASPAR, R., POSSANI, L.D. und PANYI, G., „Anuroctoxin, a new scorpion toxin of the α -KTx 6

Literaturverzeichnis

- subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCa1 Ion channels of human T lymphocytes“, *Molecular Pharmacology*, 67, 4, 1034–1044 (2005).
- 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., LIVERTON, N., CLAIRBONE, C.F., CLAREMON, D.A., J., T. W. und WAYNE, J., „Carbocyclic potassium channel inhibitors“, *PCT Int. Appl. WO 0025770* (2000).
- BAO, J., MIAO, S., KAYSER, F., KOTLIAR, A.J., BAKER, R.K., DOSS, G.A., FELIX, J.P., BUGIANESI, R.M., SLAUGHTER, R.S., KACZOROWSKI, G.J., GARCIA, M.L., HA, S.N., CASTONGUAY, L., KOO, G.C., SHAH, K., SPRINGER, M.S., STARUCH, M.J., PARSONS, W.H. und RUPPRECHT, K.M., „Potent Kv1.3 inhibitors from correolide-modification of the C18 position“, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15, 2, 447–451 (2005).
- BAUM, F., „Zur Theorie der Alkoholnarkose. Zweite Mittheilung. Ein physikalisch-chemischer Beitrag zur Theorie der Narcotica“, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 119-137 (1899).
- BAUTZ, C., „Kaliumkanalblockierende Substanzen in *Ruta Graveolens* L. und *Ruta Chalepensis* L.“ *Dissertation Kiel* (1994).
- BAUTZ, C., BOHUSLAVIZKI, K.H. und KOPPENHÖFER, E., „Über die Wirkung wässriger Auszüge von *Ruta graveolens* auf die Ionenströme der Nervenmembran“, *Therapeutikon*, 3, 571–575 (1989).
- BECKER, H.G.O., BECKERT, R., DOMSCHKE, G., FANGHÄNEL, E., HABICHER, W.D., METZ, P., PAVEL, D. und K. SCHWETLICK, „Organikum - Organisch-chemisches Grundpraktikum“, *Wiley-VCH Verlag, Weinheim*, 22. Auflage (2001).

- BEETON, C., BARBARIA, J., GIRAUD, P., DEVAUX, J., BENOLIEL, A.-M., GOLA, M., SABATIER, J.M., BERNARD, D., CREST, M. und BERAUD, E., „Selective blocking of voltage-gated K⁺ channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation“, *Journal of Immunology*, 166, 2, 936–944 (2001a).
- BEETON, C., PENNINGTON, M.W., WULFF, H., SINGH, S., NUGENT, D., CROSSLEY, G., KHAYTIN, I., CALABRESI, P.A., CHEN, C.-Y., GUTMAN, G.A. und CHANDY, K.G., „Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases“, *Molecular Pharmacology*, 67, 4, 1369–1381 (2005).
- BEETON, C., WULFF, H., BARBARIA, J., CLOT-FAYBESSE, O., PENNINGTON, M., BERNARD, D., CAHALAN, M.D., CHANDY, K.G. und BERAUD, E., „Selective blockade of T lymphocyte K⁺ channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 24, 13942–13947 (2001b).
- BEETON, C., WULFF, H., STANDIFER, N.E., AZAM, P., MULLEN, K.M., PENNINGTON, M.W., KOLSKI-ANDREACO, A., WEI, E., GRINO, A., COUNTS, D.R., WANG, P.H., LEEHEALEY, C.J., ANDREWS, B.S., SANKARANARAYANAN, A., HOMERICK, D., ROECK, W.W., TEHRANZADEH, J., STANHOPE, K.L., ZIMIN, P., HAVEL, P.J., GRIFFEY, S., KNAUS, H.-G., NEPOM, G.T., GUTMAN, G.A., CALABRESI, P.A. und CHANDY, K.G., „Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 46, 17414–17419 (2006).
- BENCZE, W., EISENBEISS, J. und SCHMID, H., „Die Konstitution des Visaminols“, *Helvetica Chimica Acta*, 39, 923–944 (1956).

Literaturverzeichnis

- BERGER, Y., CASTONGUAY, A. und BRASSARD, P., „Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of anthraquinones. Part II. Hydroxymethoxyanthraquinones, acetoxymethoxyanthraquinones and naturally occurring anthraquinone analogs“, *Organic Magnetic Resonance*, 14, 2, 103–108 (1980).
- BÖHM, H.J., KLEBE, G. und KUBINYI, H., „Wirkstoffdesign“, *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg* (1996).
- BOHUSLAVIZKI, K.H., HINCK-KNEIP, C., KOPPENHÖFER, E. und REIMERS, A., „Reduction of MS-related scotoma by a new class of potassium channel blockers from *Ruta graveolens*“, *Neuroophthalmology*, 13, 191–198 (1993).
- BRANDT, W., „Anatomie und Chemie der *Ruta graveolens* L.“ *Dissertation Berlin* (1915).
- BRENDEL, J. und PEUKERT, S., „Blockers of the Kv1.5 channel for the treatment of atrial arrhythmias“, *Current Medicinal Chemistry: Cardiovascular and Hematological Agents*, 1, 3, 273–287 (2003).
- BRUHOVA, I. und ZHOROV, B. S., „Monte Carlo-energy minimization of correolide in the Kv1.3 channel: possible role of potassium ion in ligand-receptor interactions“, *BMC structural biology*, 7, 5 (2007).
- BURGER, A. und WACHTER, H., „Hunnius - Pharmazeutisches Wörterbuch“, *Walter de Gruyter, Berlin*, 7. Auflage (1993).
- BUTENSCHÖN, I., „Furo- und Pyrano-anellierte Chinolinone sowie Pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazin-1,1-dioxide: Synthese, spektroskopische Analyse sowie pharmakologische Testung an Kv- und K_{ATP} -Kanälen“, *Dissertation Kiel* (2000).

- CAHALAN, M.D. und CHANDY, K.G., „Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression“, *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 6, 749–756 (1997).
- CARSTENS, I., „Lipophiliebestimmungen Kaliumkanal-blockierender Psoralenderivate mittels Flüssigchromatographie und Kapillarelektrophorese“, *Dissertation Kiel* (2004).
- CASTLE, N.A., HOLLINSHEAD, S.P., HUGHES, P.F., MENDOZA, G.S., WILSON, J.W., AMATO, G.S., BEAUDOIN, S., GROSS, M. und MCNAUGHTON-SMITH, G., „Potassium channel inhibitors“, *U.S. Patent 6083986* (2000).
- CERQUEIRA, N.M.F.S.A., OLIVEIRA-CAMPOS, A.M.F., COELHO, P.J., CARVALHO, L.H. MELO DE, SAMAT, A. und GUGLIELMETTI, R., „Synthesis of photochromic dyes based on annulated coumarin systems“, *Helvetica Chimica Acta*, 85, 2, 442–450 (2002).
- CHANDY, K.G., „Simplified gene nomenclature“, *Nature*, 352, 6330, 26 (1991).
- CHANDY, K.G., DECOURSEY, T.E., CAHALAN, M.D., MCLAUGHLIN, C. und GUPTA, S., „Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation“, *Journal of Experimental Medicine*, 160, 2, 369–385 (1984).
- CHANDY, K.G. und GUTMAN, G.A., „Voltage-gated potassium channel genes“, *In: Handbook of Receptors and Channels: Ligand- and Voltage-gated Ion Channels, North, R. A. (Hrsg.) CRC Press*, S. 1–71 (1995).
- CHANDY, K.G., WULFF, H., BEETON, C., CALABRESI, P.A., GUTMAN, G.A. und PENNINGTON, M., „Kv1.3 Potassium Channel: Physiology, Pharmacology and Therapeutic Indications“, *In: D. Triggle (Hrsg.) Voltage-*

Literaturverzeichnis

Gated Ion Channels as Drug Targets, WILEY-VCH Verlag GmbH und Co. KGaA, Weinheim (2006).

CHANDY, K.G., WULFF, H., BEETON, C., PENNINGTON, M., GUTMAN, G.A. und CAHALAN, M.D., „K⁺ channels as targets for specific immunomodulation“, *Trends in Pharmacological Sciences*, 25, 5, 280–289 (2004).

CLASSEN, B. und KNOBLOCH, K., „Essential oils from common rue (*Ruta graveolens* L.)“, *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 181, 1, 28–31 (1985).

COGHLAN, M.J., CARROLL, W.A. und GOPALAKRISHNAN, M., „Recent developments in the biology and medicinal chemistry of potassium channel modulators: update from a decade of progress“, *Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 11, 1627–1653 (2001).

COLE, K.S. und CURTIS, H.J., „Electric impedance of the squid giant axon during activity“, *Journal of General Physiology*, 22, 649–670 (1939).

COLEMAN, S.K., NEWCOMBE, J., PRYKE, J. und DOLLY, J.O., „Subunit composition of Kv1 channels in human CNS“, *Journal of Neurochemistry*, 73, 2, 849–858 (1999).

COREY, D. und STEVENS, C.F., „Science and technology of patch-recording electrodes.“ *In: Single-Channel Recording, 1st Edition, Sakmann, B. and Neher, E., Plenum Press, New York*, 53-68 (1983).

COVARRUBIAS, M., WEI, A. und SALKOFF, L., „Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent potassium current systems“, *Neuron*, 7, 5, 763–773 (1991).

CUSSANS, N.J. und HUCKERBY, T.N., „Carbon-13 NMR spectroscopy of heterocyclic compounds. IV. 20 MHz study of chemical shifts and carbon-

- proton coupling constants in a series of hydroxy, methoxy, and glucosyl coumarins“, *Tetrahedron*, 31, 21, 2719–2726 (1975).
- DAVIS, P.B., DRUMM, M. und KONSTAN, M.W., „Cystic fibrosis“, *American journal of respiratory and critical care medicine*, 154, 1229–1256 (1996).
- DOUPNIK, C.A., DAVIDSON, N. und LESTER, H.A., „The inward rectifier potassium channel family“, *Current Opinion in Neurobiology*, 5, 3, 268–277 (1995).
- DOYLE, D.A., CABRAL, J.M., PFUETZNER, R.A., KUO, A., GULBIS, J.M., COHEN, S.L., CHAIT, B.T. und MACKINNON, R., „The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity“, *Science*, 280, 5360, 69–77 (1998).
- DUBUFFET, T., LOUTZ, A. und LAVIELLE, G., „An efficient large scale synthesis of coumarins by a dealkylative boron-mediated ring closure of 3-(ortho-methoxyaryl)propenoic esters“, *Synthetic Communications*, 29, 6, 929–936 (1999).
- DUDDECK, H. und KAISER, M., „Carbon-13 NMR spectroscopy of coumarin derivatives“, *Organic Magnetic Resonance*, 20, 2, 55–72 (1982).
- EILERT, U., „Ruta“, In: Hänsel, R., Keller, K., Rimpler, H., Schneider, G. (Hrsg.) , *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Band 6: Drogen P-Z*, 5. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, 506-521 (1994).
- ELGAMAL, M.H.A., ELEWA, N.H., ELKHRISY, E.A.M. und DUDDECK, H., „Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra. Part XI. Carbon-13 NMR chemical shifts and carbon-proton coupling constants of some furocoumarins and furochromones“, *Phytochemistry*, 18, 1, 139–43 (1979).
- FANGER, C.M., GHANSHANI, S., LOGSDON, N.J., RAUER, H., KALMAN, K., ZHOU, J., BECKINGHAM, K., CHANDY, K.G., CAHALAN, M.D.

Literaturverzeichnis

- und AIYAR, J., „Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1“, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 9, 5746–5754 (1999).
- FEDIDA, D., ELDESTROM, J., HESKETH, J.C., LAMORGESE, M., CASTEL, L., STEELE, D.F. und WAGONER, D.R. VAN, „Kv1.5 is an important component of repolarizing K⁺ current in canine atrial myocytes“, *Circulation research*, 93, 744–751 (2003).
- FEDIDA, D., WIBLE, B., WANG, Z., FERMINI, B., FAUST, F., NATTEL, S. und BROWN, A.M., „Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned potassium channel current“, *Circulation Research*, 73, 1, 210–216 (1993).
- 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. und SLAUGHTER, R.S., „Identification and Biochemical Characterization of a Novel Nortriterpene Inhibitor of the Human Lymphocyte Voltage-Gated Potassium Channel, Kv1.3“, *Biochemistry*, 38, 16, 4922–4930 (1999).
- FENG, J., WIBLE, B., LI, G.R., WANG, Z. und NATTEL, S., „Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in cultured adult human atrial myocytes“, *Circulation Research*, 80, 4, 572–579 (1997).
- FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W., FÖRSTERMANN, U. und STARKE, K., „Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie“, *Urban und Fischer, München*, 8. Auflage (2001).
- GAMMILL, R.B. und NASH, S.A., „Oxymetallation of khellin. Solvomercuration, osmylation, and palladium-catalyzed oxidation of the furan ring in khellin.

- The synthesis of highly oxygenated chromones and 2-substituted furochromones“, *Journal of Organic Chemistry*, 51, 16, 3116–3123 (1986).
- GARCIA-CALVO, M., LEONARD, R.J., NOVICK, J., STEVENS, S.P., SCHMALHOFER, W., KACZOROWSKI, G.J. und GARCIA, M.L., „Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels“, *Journal of Biological Chemistry*, 268, 25, 18866–18874 (1993).
- GERST, F., „Psoralene zur Therapie MS-bedingter Funktionsausfälle - Vorarbeiten für künftige klinische Studien“, *Dissertation Kiel* (1997).
- GHANSHANI, S., WULFF, H., MILLER, M.J., ROHM, H., NEBEN, A., GUTMAN, G.A., CAHALAN, M.D. und CHANDY, K.G., „Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences“, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 47, 37137–37149 (2000).
- GRAY, A.I. und WATERMAN, P.G., „Chemosystematics in the Rutaceae. Part IX. Coumarins in the Rutaceae“, *Phytochemistry*, 17, 5, 845–864 (1978).
- GRISSMER, S., DETHLEFS, B., WASMUTH, J.J., GOLDIN, A.L., GUTMAN, G.A., CAHALAN, M.D. und CHANDY, K.G., „Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K⁺ channel gene“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 23, 9411–9415 (1990).
- GRISSMER, S., NGUYEN, A.N., AIYAR, J., HANSON, D.C., MATHER, R.J., GUTMAN, G.A., KARMILOWICZ, M.J., AUPERIN, D.D. und 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“, *Molecular pharmacology*, 45, 6, 1227–1234 (1994).

Literaturverzeichnis

- GULBIS, J.M., ZHOU, M., MANN, S. und MACKINNON, R., „Structure of the cytoplasmic β subunit-T assembly of voltage-dependent K^+ channels“, *Science*, 289, 5476, 123–127 (2000).
- GUTMAN, G.A. und CHANDY, K.G., „Nomenclature of mammalian voltage-dependent potassium channel genes“, *Seminars in Neuroscience*, 5, 2, 101–106 (1993).
- GUTMAN, G.A., CHANDY, K.G., ADELMAN, J.P., AIYAR, J., BAYLISS, D.A., CLAPHAM, D.E., COVARRIUBIAS, M., DESIR, G.V., FURUICHI, K., GANETZKY, B., GARCIA, M.L., GRISSMER, S., JAN, L.Y., KARSCHIN, A., KIM, D., KUPERSCHMIDT, S., KURACHI, Y., LAZDUNSKI, M., LESAGE, F., LESTER, H.A., MCKINNON, D., NICHOLS, C.G., O'KELLY, I., ROBBINS, J., ROBERTSON, G.A., RUDY, B., SANGUINETTI, M., SEINO, S., STUEHMER, W., TAMKUN, M.M., VANDENBERG, C.A., WEI, A., WULFF, H. und WYMORE, R.S., „International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: potassium channels“, *Pharmacological Reviews*, 55, 4, 583–586 (2003).
- GUTMAN, G.A., CHANDY, K.G., GRISSMER, S., LAZDUNSKI, M., MCKINNON, D., PARDO, L.A., ROBERTSON, G.A., RUDY, B., SANGUINETTI, M.C., STUEHMER, W. und WANG, X., „International union of pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels“, *Pharmacological Reviews*, 57, 4, 473–508 (2005).
- HAAKE, D., „Atlas of medicinal plants“, *Geneva Foundation for Medicinal Education and Research* (2001).
http://www.gfmer.ch/TMCAM/Atlas_medicinal_plants/Images/mp0095.jpg, visited: April/2007
- HAMILL, O.P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. und SIGWORTH, F.J., „Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recor-

- ding from cells and cell-free membrane patches“, *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 391, 2, 85–100 (1981).
- HANNER, M., GREEN, B., GAO, Y.-D., SCHMALHOFER, W.A., MATYSKIELA, M., DURAND, D.J., FELIX, J.P., LINDE, A.-R., BORDALLO, C., KACZOROWSKI, G.J., KOHLER, M. und GARCIA, M.L., „Binding of correolide to the Kv1.3 potassium channel: Characterization of the binding domain by site-directed mutagenesis“, *Biochemistry*, 40, 39, 11687–11697 (2001).
- 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. und 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“, *British Journal of Pharmacology*, 126, 8, 1707–1716 (1999).
- HARVEY, A.J., BAELL, J.B., TOOVEY, N., HOMERICK, D. und WULFF, H., „A New Class of Blockers of the Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.3 via Modification of the 4- or 7-Position of Khellinone“, *Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 4, 1433–1441 (2006).
- HAYAT, S., ATTA-UR-RAHMAN, A., CHOUDHARY, M.I., KHAN, K.M., SCHUMANN, W. und BAYER, E., „N-Alkylation of anilines, carboxamides and several nitrogen heterocycles using CsF-Celite/alkyl halides/CH₃CN combination“, *Tetrahedron*, 57, 50, 9951–9957 (2001).
- HERZOG, T., „Patch-clamp Studien zur Kv-Kanal-blockierenden Wirkung von Cumarinen, Benzofuranen und Psoralenen als potenzielle Immunsuppressiva“, *Dissertation Kiel* (2000).

Literaturverzeichnis

- HILL, R.J., GRANT, A.M., VOLBERG, W., RAPP, L., FALTYNEK, C., MILLER, D., PAGANI, K., BAIZMAN, E., WANG, S. und AL., ET, „WIN 17317-3: novel nonpeptide antagonist of voltage-activated K⁺ channels in human T lymphocytes“, *Molecular Pharmacology*, 48, 1, 98–104 (1995).
- HILLE, B., „Ion Channels of Excitable Membranes, 2nd Edition“, *Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts* (1992).
- HILLE, B., „Ion Channels of Excitable Membranes, 3rd Edition“, *Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts* (2001).
- HILLER, K. und MELZIG, M.F., „Lexikon der Arzneipflanzen und Drogen“, *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg* (2000).
- HODGKIN, A.L., „Chance and design in electrophysiology: an informal account of certain experiments on nerve carried out between 1934 and 1952“, *The Journal of physiology*, 263, 1, 1–21 (1976).
- HODGKIN, A.L. und HUXLEY, A.F., „A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve“, *The Journal of physiology*, 117, 4, 500–544 (1952).
- HOLMGREN, M., JURMAN, M.E. und YELLEN, G., „N-type inactivation and the S4-S5 region of the shaker K⁺ channel“, *Journal of General Physiology*, 108, 3, 195–206 (1996).
- HORN, R. und MARTY, A., „Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method“, *The Journal of General Physiology*, 92, 2, 145–159 (1988).
- HOSHI, T., ZAGOTTA, W.N. und ALDRICH, R.W., „Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation“, *Science*, 250, 4980, 533–538 (1990).

- HWU, J.R., ROBL, J.A. und KHOUDARY, K.P., „Instrumentation and separation results of medium-pressure liquid chromatography“, *Journal of Chromatographic Science*, 25, 11, 501–505 (1987).
- INTERACTIVE ANALYSIS, BEDFORD, „log P-Wertbestimmungsprogramm“, (2007).
<http://www.logp.com>, visited: April/2007
- ISHII, H., „Alkaloids of Rutaceous plants. XIV. Syntheses of some hydrogenated derivatives of skimmianine“, *Yakugaku Zasshi*, 81, 248–253 (1961).
- JANEWAY, C.A., TRAVERS, P., WALPORT, M. und SCHLOMCHIK, „Immunologie“, *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*, 5. Auflage (2002).
- JENSEN, B.S., ODUM, N., JORGENSEN, N.K., CHRISTOPHERSEN, P. und OLESEN, S.-P., „Inhibition of T cell proliferation by selective block of Ca²⁺-activated K⁺ channels“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 19, 10917–10921 (1999).
- KAEVER, V. und RESCH, K., „Prinzipien der Immunsuppression“, *Pharmazie in unserer Zeit*, 34, 4, 268–275 (2005).
- 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. und CHANDY, K.G., „ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide“, *Journal of Biological Chemistry*, 273, 49, 32697–32707 (1998).
- KASS, R.S., „The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease“, *The Journal of clinical investigation*, 115, 8, 1986–1989 (2005).

Literaturverzeichnis

- KATRITZKY, A.R., ELLISON, J., FRANK, J., RAKOCZY, P., RADICS, L. und GACS-BAITZ, E., „Carbon-13 NMR spectra of 4-quinolones and related compounds“, *Organic Magnetic Resonance*, 16, 4, 280–284 (1981).
- KATRITZKY, A.R. und POZHARSKII, A.F., „Handbook of Heterocyclic Chemistry“, *Pergamon*, 2. Auflage, 47-53 (2000).
- KATZ, B. und MILEDI, R., „Statistical nature of the acetylcholine potential and its molecular components“, *Journal of Physiology*, 224, 3, 665–699 (1972).
- KENNEDY, T., „Managing the drug discovery/development interface“, *Drug Discovery Today*, 2, 10, 436–444 (1997).
- KLEMIC, K.G., KIRSCH, G.E. und JONES, S.W., „U-type inactivation of Kv3.1 and Shaker potassium channels“, *Biophysical Journal*, 81, 2, 814–826 (2001).
- KNEEN, G. und MADDOCKS, P.J., „A convenient synthesis of 4-hydroxybenzo(b)furan, (karanjol)“, *Synthetic Communications*, 16, 13, 1635–1640 (1986).
- KOBERTZ, W.R., WILLIAMS, C. und MILLER, C., „Hanging Gondola Structure of the T1 Domain in a Voltage-Gated K⁺ Channel“, *Biochemistry*, 39, 34, 10347–10352 (2000).
- KONG, Y.C., LAU, C., BUT, P.P.H., CHENG, K.F. und CAMBIE, R.C., „Quinoline alkaloids from *Ruta graveolens*“, *Fitoterapia*, 55, 2, 67–71 (1984).
- KOPPENHÖFER, E., DITZEN, G., GERST, F. und REIMERS, A., „Kaliumkanalblocker in der Neurologie; 5-MOP zur Behandlung MS-bedingter Funktionsdefizite“, *TW Neurol Psychatrie*, 9, 585–591 (1995).
- KORN, S.J., MARTY, A., CONNOR, J.A. und HORN, R., „Perforated patch

- recording“, In : Conn, P.M. (Hrsg.) *Methods in Neuroscience, Vol. 4, Academic Press, San Diego*, 364-373 (1991).
- KOSCHAK, A., BUGIANESI, R.M., MITTERDORFER, J., KACZOROWSKI, G.J., GARCIA, M.L. und KNAUS, H.-G., „Subunit composition of brain voltage-gated potassium channels determined by hongotoxin-1, a novel peptide derived from *Centruroides limbatus* venom“, *Journal of Biological Chemistry*, 273, 5, 2639–2644 (1998).
- KOSTOVA, I., IVANOVA, A., MIKHOVA, B. und KLAIBER, I., „Alkaloids and coumarins from *Ruta graveolens*“, *Monatshefte für Chemie*, 130, 5, 703–707 (1999).
- KRASS, J.D., JASTORFF, B. und GENIESER, H.-G., „Determination of Lipophilicity by Gradient Elution High-Performance Liquid Chromatography“, *Analytical Chemistry*, 69, 13, 2575–2581 (1997).
- KREITMEIER, P., „Einführung in die apparativen Methoden in der Organischen Chemie - Ein Tutorial zum Organischen Praktikum als Hypertextsystem, Universität Regensburg“, basierend auf einem Skript von Hünig, S., Märkl, G., Sauer, J., *Universitäten Regensburg, Würzburg* (2001).
http://www.fh-nuernberg.de/fileadmin/Fachbereiche/ac/organische_chemie/Lehre/Praktikum/OC_I_Sem_3/versuche/apparative_methoden/MethodenFH.pdf, visited: April/2007
- LAMBERTON, J.A. und PRICE, J.R., „Alkaloids of the Australian Rutaceae: *Acronychia baueri*. IV. Alkaloids present in the leaves“, *Australian Journal of Chemistry*, 6, 66–77 (1953).
- LAWSON, K. und MCKAY, N.G., „Modulation of potassium channels as a therapeutic approach“, *Current Pharmaceutical Design*, 12, 4, 459–470 (2006).

Literaturverzeichnis

- LEE, J.C. und CHOI, Y., „An improved method for preparation of carboxylic esters using CsF-celite/alkyl halide/CH₃CN combination“, *Synthetic Communications*, 28, 11, 2021–2026 (1998).
- LEHMANN-HORN, F. und JURKAT-ROTT, K., „Voltage-gated ion channels and hereditary disease“, *Physiological Reviews*, 79, 4, 1317–1372 (1999).
- LEO, A., HANSCH, C. und ELKINS, D., „Partition coefficients and their uses“, *Chemical Reviews (Washington, DC, United States)*, 71, 6, 525–616 (1971).
- LEONARD, R.J., GARCIA, M.L., SLAUGHTER, R.S. und REUBEN, J.P., „Selective blockers of voltage-gated potassium channels depolarize human T lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 21, 10094–10098 (1992).
- LEWIS, R.S. und CAHALAN, M.D., „Potassium and calcium channels in lymphocytes“, *Annual Review of Immunology*, 13, 623–653 (1995).
- LIPINSKI, C.A., LOMBARDO, F., DOMINY, B.W. und FEENEY, P.J., „Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings“, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 1-3, 3–25 (1997).
- MARTY, A. und NEHER, E., „Tight-Seal Whole-Cell Recording“, *In: Sakmann, B. and Neher, E., (Hrsg.), Single-Channel Recording, 2nd Edition, Plenum Press, New York*, 31-52 (1995).
- MEERA, P., WALLNER, M., SONG, M. und TORO, L., „Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments

- (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) terminus“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 25, 14066–14071 (1997).
- MEYER, H., „Zur Theorie der Alkoholnarkose. Erste Mittheilung. Welche Eigenschaft der Anästhetica bedingt ihre narkotische Wirkung?“ *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 42, 109–118 (1899).
- MILLER, C., „An overview of the potassium channel family“, *Genome Biology*, 1, 4 (2000).
- MÖLLER, K., „Acridone, Furo- und Pyranochinoline als Blocker von Kv-Kanälen - patch-clamp Untersuchungen und Studien zur Phototoxizität“, *Dissertation Kiel* (2000).
- MOUHAT, S., VISAN, V., ANANTHAKRISHNAN, S., WULFF, H., ANDREOTTI, N., GRISSMER, S., DARBON, H., WAARD, M. DE und SABATIER, J.-M., „K⁺ channel types targeted by synthetic OSK1, a toxin from *Orthochirus scrobiculosus* scorpion venom“, *Biochemical Journal*, 385, 1, 95–104 (2005).
- NEGULESCU, P.A., SHASTRI, N. und CAHALAN, M.D., „Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 7, 2873–2877 (1994).
- NEHER, E., „Unit conductance studies in biological membranes“, *In: Baker, P. F. (Hrsg.), Techniques in cellular physiology, Elsevier, North-Holland, Amsterdam* (1981).
- NEHER, E. und SAKMANN, B., „Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres“, *Nature*, 260, 5554, 799–802 (1976).

Literaturverzeichnis

- NELSON, M.T., CHENG, H., RUBART, M., SANTANA, L.F., BONEV, A.D., KNOT, H.J. und LEDERER, W.J., „Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks“, *Science*, 270, 5236, 633–637 (1995).
- 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., LEPPEL-WIENHUES, A., GUTMAN, G.A., GRISSMER, S., CAHALAN, M.D. und CHANGY, K.G., „Novel nonpeptide agents potently block the C-type inactivated conformation of Kv1.3 and suppress T cell activation“, *Molecular Pharmacology*, 50, 6, 1672–1679 (1996).
- NIEMÖLLER, E., „Untersuchungen zur Synthese und zur Wirkung von Acridinonen, Xanthenonen, quartären Ammoniumsalzen und Pyridinen auf die Membranströme myelinisierter Nervenfasern“, *Dissertation Kiel* (1994).
- NUMBERGER, M. und DRAGUHN, A., „Patch-Clamp-Technik“, *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg* (1996).
- OHTA, T., MORI, Y., NODA, C. und AOKI, T., „Furoquinolines. XX. Alkaloids of the leaves of *Ruta graveolens* and synthesis of dihydrokokusaginine“, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 8, 377–379 (1960).
- OLSON, T.M., ALEKSEEV, A.E., LIU, X.K., PARK, S., ZINGMAN, L.V., BIENENGRÄBER, M., SATTIRAJU, S., BALLEW, J.D., JAHANGIR, A. und TERZIC, A., „Kv1.5 channelopathy due to KCNA5 loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation“, *Human Molecular Genetics*, 15, 14, 2185–2191 (2006).
- OPSAHL, L.R. und WEBB, W.W., „Lipid-glass adhesion in giga-sealed patch-clamped membranes“, *Biophysical Journal*, 66, 1, 75–79 (1994).
- OVERTON, E., „Studien über die Narkose“, *Gustav Fischer Verlag, Jena, Deutschland* (1901).

- PAPAZIAN, D.M., TIMPE, L.C., JAN, Y.N. und JAN, L.Y., „Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence“, *Nature*, 349, 6307, 305–310 (1991).
- PENNINGTON, M.W., MAHNIR, V.M., KRAFTE, D.S., ZAYDENBERG, I., BYRNES, M.E., KHAYTIN, I., CROWLEY, K. und KEM, W.R., „Identification of three separate binding sites on SHK toxin, a potent inhibitor of voltage-dependent potassium channels in human“, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 219, 3, 696–701 (1996).
- PONGS, O., „Molecular biology of voltage-dependent potassium channels“, *Physiological Reviews*, 72, 4, Suppl., 69–88 (1992).
- PONGS, O., LEICHER, T., BERGER, M., ROEPER, J., BAHRING, R., WRAY, D., GIESE, K.P., SILVA, A.J. und STORM, J.F., „Functional and molecular aspects of voltage-gated K⁺ channel β subunits“, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 868 (Molecular and Functional Diversity of Ion Channels and Receptors), 344–355 (1999).
- PRICE, J.R., „The distribution of alkaloids in the Rutaceae“, *In: Chemical Plant Taxonomy (Hrsg.) T. Swain, Academic Press, London, New York*, 429–452 (1963).
- RAE, J., COOPER, K., GATES, P. und WATSKY, M., „Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B.“ *Journal of Neuroscience Methods*, 37, 1, 15–26 (1991).
- RASMUSSEN, R.L., MORALES, M.J., WANG, S., LIU, S., CAMPBELL, D.L., BRAHMAJOTHI, M.V. und STRAUSS, H.C., „Inactivation of voltage-gated cardiac K⁺ channels“, *Circulation research*, 82, 739–750 (1998).
- REISCH, J. und MESTER, I., „Synthesis and effect of potential drugs. Part 17.

Literaturverzeichnis

- Methylation of 4-hydroxy-2-quinolone“, *Archiv der Pharmazie (Weinheim, Germany)*, 313, 9, 751–755 (1980).
- REISCH, J., NOVAK, I., SZENDREI, K. und MINKER, E., „Chemistry of natural substances. XIX. Additional C3-substituted coumarin derivatives from *Ruta graveolens*: daphnoretin and its methyl ether“, *Planta Medica*, 16, 4, 372–376 (1968).
- REISCH, J., SZENDREI, K., MINKER, E. und NOVAK, I., „Natural substances. XXI. Coumarins from *Ruta graveolens* roots. Xanthyletin and byakangelicin“, *Planta Medica*, 17, 2, 116–119 (1969).
- REISCH, J., SZENDREI, K., NOVAK, I. und MINKER, E., „Natural substance chemistry. 38. Occurrence and biological effect of acridone derivatives“, *Scientia Pharmaceutica*, 40, 3, 161–178 (1972).
- REKKER, R.F., „The Hydrophobic Fragmental Constant“, *Elsevier Science Publishers: Amsterdam* (1977).
- RETTIG, J., HEINEMANN, S.H., WUNDER, F., LORRA, C., PARCEJ, D.N., DOLLY, J.O. und PONGS, O., „Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of beta-subunit“, *Nature*, 369, 6478, 289–294 (1994).
- RODEN, D.M., LAZZARA, R., ROSEN, M., SCHWARTZ, P.J., TOWBIN, J. und VINCENT, G.M., „Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions“, *Circulation*, 94, 8, 1996–2012 (1996).
- RUS, H., PARDO, C.A., HU, L., DARRAH, E., CUDRICI, C., NICULESCU, T., NICULESCU, F., MULLEN, K.M., ALLIE, R., GUO, L., WULFF, H., BEETON, C., JUDGE, S.I.V., KERR, D.A., KNAUS, H.-G., CHANDY, K.G. und CALABRESI, P.A., „The voltage-gated potassium channel Kv1.3

- is highly expressed on inflammatory infiltrates in multiple sclerosis brain“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 31, 11094–11099 (2005).
- SAKMANN, B. und NEHER, E., „Single-Channel Recording, Second Edition“, *Plenum Press, New York and London* (1995).
- SANDS, S.B., LEWIS, R.S. und CAHALAN, M.D., „Charybdotoxin blocks voltage-gated potassium channels in human and murine T lymphocytes“, *Journal of General Physiology*, 93, 6, 1061–1074 (1989).
- SANGSTER, J., „Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry“, *John Wiley and Sons, Chichester* (1997).
- SANMANN, K., „Strukturabhängigkeit der kaliumkanalblockierenden Wirkung von Cumarinen, Benzofuranen und Furocumarinen“, *Dissertation Kiel* (1995).
- SCANNEVIN, R.H., WANG, K., JOW, F., MEGULES, J., KOPSCO, D.C., EDRIS, W., CARROLL, K.C., LUE, Q., XU, W., XU, Z., KATZ, A.H., OLLAND, S., LIN, L., TAYLOR, M., STAHL, M., MALAKIAN, K., SOMERS, W., MOSYAK, L., BOWLBY, M.R., CHANDA, P. und RHODES, K.J., „Two N-terminal domains of Kv4 K⁺ channels regulate binding to and modulation by KChIP1“, *Neuron*, 41, 4, 587–598 (2004).
- SCHMALHOFER, W.A., BAO, J., MCMANUS, O.B., GREEN, B., MATYSKIELLA, 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. und GARCIA, M.L., „Identification of a new class of inhibitors of the voltage-gated potassium channel, Kv1.3, with immunosuppressant properties“, *Biochemistry*, 41, 24, 7781–7794 (2002).

Literaturverzeichnis

- SCHMITZ, A., „Phenoxyalkoxy-psoralene - Eine neue Klasse hochpotenter Blocker des lymphozytären Kaliumkanals Kv1.3“, *Dissertation Kiel* (2004).
- SCHMITZ, A., SANKARANARAYANAN, A., AZAM, P., SCHMIDT-LASSEN, K., HOMERICK, D., HÄNSEL, W. und WULFF, H., „Design of PAP-1, a selective small molecule Kv1.3 blocker, for the suppression of effector memory T cells in autoimmune diseases“, *Molecular Pharmacology*, 68, 5, 1254–1270 (2005).
- SCHÖNBERG, A. und BADRAN, N., „Khellin from visnagin“, *Journal of the American Chemical Society*, 73, 2960–2961 (1951).
- SCHÖNBERG, A., BADRAN, N. und STARKOWSKY, N.A., „Furochromones and -coumarins. VII. Degradation of Visnagin, Khellin and Related Substances; Experiments with Chromic Acid and Hydrogen Peroxide; and a Synthesis of Eugenitin“, *Journal of the American Chemical Society*, 75, 4992–4995 (1953).
- SCHUMACHER, M.A., RIVARD, A.F., BICHINGER, H.P. und ADELMAN, J.P., „Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complexed with Ca²⁺/calmodulin“, *Nature*, 410, 6832, 1120–1124 (2001).
- SEYDEL, J.K. und SCHAPER, K.-J., „Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen“, *Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland*, 73-82 (1979).
- SHAH, S.T.A., KHAN, K.M., HEINRICH, A.M., CHOUDHARY, M.I. und VOELTER, W., „An efficient approach towards syntheses of ethers and esters using CsF-Celite as a solid base“, *Tetrahedron Letters*, 43, 47, 8603–8606 (2002).
- SHAH, S.T.A., KHAN, K.M., HUSSAIN, H., ANWAR, M.U., FECKER, M. und

- VOELTER, W., „Cesium fluoride-Celite: a solid base for efficient syntheses of aromatic esters and ethers“, *Tetrahedron*, 61, 27, 6652–6656 (2005).
- SHELTON, P.A., DAVIES, N.W., ANTONIOU, M., GROSVELD, F., NEEDHAM, M., HOLLIS, M., BRAMMAR, W.J. und CONLEY, E.C., „Regulated expression of potassium channel genes in electrically silent mammalian cells by linkage to b-globin gene-activation elements“, *Receptors and Channels*, 1, 1, 25–37 (1993).
- SHIEH, C.-C., COGHLAN, M., SULLIVAN, J.P. und GOPALAKRISHNAN, M., „Potassium channels: Molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities“, *Pharmacological Reviews*, 52, 4, 557–593 (2000).
- SIGWORTH, F.J. und NEHER, E., „Single sodium channel currents observed in cultured rat muscle cells“, *Nature*, 287, 5781, 447–449 (1980).
- SLAUGHTER, R.S., GARCIA, M.L. und KACZOROWSKI, G.J., „Ion channels as drug targets in the immune system“, *Current Pharmaceutical Design*, 2, 6, 610–623 (1996).
- SOUTHERN, P.J. und BERG, P., „Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter“, *Journal of Molecular and Applied Genetics*, 1, 4, 327–341 (1982).
- 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. und CHANDY, K.G., „Purification, visualization, and biophysical characterization of Kv1.3 tetramers“, *Journal of Biological Chemistry*, 272, 4, 2389–2395 (1997).
- SPÄTH, E. und GRUBER, W., „II. Mitteilung über natürliche Chromone. Die Konstitution des Visnagins (aus *Ammi visnaga*).“ *Berichte der Deutschen*

Literaturverzeichnis

- Chemischen Gesellschaft, Abteilung B: Abhandlungen*, 74B, 1492–1500 (1941).
- STEFANI, E., OTTOLIA, M., NOCETI, F., OLCESE, R., WALLNER, M., LATORRE, R. und TORO, L., „Voltage-controlled gating in a large conductance Ca^{2+} -sensitive K^+ channel (hslo)“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 10, 5427–5431 (1997).
- TAGLIALATELA, M.M., TIMMERMAN, H.H. und ANNUNZIATO, L.L., „Cardiotoxic potential and CNS effects of first-generation antihistamines“, *Trends in Pharmacological Sciences*, 21, 2, 52–56 (2000).
- TEISSEYRE, A., „The "patch-clamp" technique and its application in investigations of the properties of human T lymphocyte potassium channels“, *Cellular and Molecular Biology Letters*, 6, 1, 93–105 (2001).
- VENNEKAMP, J., „Synthese und elektrophysiologische Testung hochwirksamer Psoralenderivate als nicht-peptidische Blocker des lymphozytären Kaliumkanals Kv1.3“, *Dissertation Kiel* (2002).
- VENNEKAMP, J., WULFF, H., BEETON, C., CALABRESI, P.A., GRISSMER, S., HÄNSEL, W. und CHANDY, K.G., „Kv1.3-blocking 5-phenylalkoxy-psoralens: A new class of immunomodulators“, *Molecular Pharmacology*, 65, 6, 1364–1374 (2004).
- VOLLMAR, A. und DINGERMANN, T., „Immunologie - Grundlagen und Wirkstoffe“, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart* (2005).
- WACKERNAGEL, M., „Strukturabhängigkeit der kaliumkanalblockierenden Wirkung von Chinolinen und Furochinolinen - Synthese und Untersuchung des Einflusses auf die Membranströme myelinisierter Nervenfasern“, *Dissertation Kiel* (1998).

- 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. und KACZOROWSKI, G.J., „WIN 17317-3, a New High-Affinity Probe for Voltage-Gated Sodium Channels“, *Biochemistry*, 38, 34, 11137–11146 (1999).
- WATERMAN, P.G. und GRUNDON, M.R.E., „Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales“, *Academic Press, London, England* (1983).
- WEI, A., COVARRUBIAS, M., BUTLER, A., BAKER, K., PAK, M. und SALKOFF, L., „Potassium current diversity is produced by an extended gene family conserved in *Drosophila* and mouse“, *Science*, 248, 4955, 599–603 (1990).
- WEI, A., JEGLA, T. und SALKOFF, L., „Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* Genome Project“, *Neuropharmacology*, 35, 7, 805–829 (1996).
- WEI, A.D., GUTMAN, G.A., ALDRICH, R., CHANDY, K.G., GRISSMER, S. und WULFF, H., „International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels“, *Pharmacological Reviews*, 57, 4, 463–472 (2005).
- WHITE, J.A., MCALPINE, P.J., ANTONARAKIS, S., CANN, H., EPPIG, J.T., FRAZER, K., FREZAL, J., LANCET, D., NAHMIAS, J., PEARSON, P., PETERS, J., SCOTT, A., SCOTT, H., SPURR, N., C. TALBORT, JR. und POVEY, S., „Guidelines for human gene nomenclature (1997)“, *Genomics*, 45, 2, 468–471 (1997).
- WIENDL, H., „Natalizumab - Anwendung sollte sorgsam überwacht werden“, *Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft Bundesverband e. V.* (2006).
www.dmsg.de/mutiple-sklerose-news, visited: April/2007

Literaturverzeichnis

- WULFF, H., „Alkoxyypsoralene - eine neue Klasse nicht-peptidischer Blocker von Kaliumkanälen der Shaker Familie - Synthese und in vitro Untersuchungen zur Phototoxizität“, *Dissertation Kiel* (**1998**).
- WULFF, H., BEETON, C. und CHANDY, K.G., „Potassium channels as therapeutic targets for autoimmune disorders“, *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 6, 5, 640–647 (**2003a**).
- WULFF, H., CALABRESI, P.A., ALLIE, R., YUN, S., PENNINGTON, M., BEETON, C. und CHANDY, K.G., „The voltage-gated Kv1.3 K⁺ channel in effector memory T cells as new target for MS“, *Journal of Clinical Investigation*, 111, 11, 1703–1713 (**2003b**).
- XIA, X.M., FAKLER, B., RIVARD, A., WAYMAN, G., JOHNSON-PAIS, T., KEEN, J.E., ISHII, T., HIRSCHBERG, B., BOND, C.T., LUTSENKO, S., MAYLIE, J. und ADELMAN, J.P., „Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels“, *Nature*, 395, 6701, 503–507 (**1998**).
- YAROV-YAROVOY, V., BAKER, D. und CATTERALL, W.A., „Voltage sensor conformations in the open and closed states in ROSETTA structural models of K⁺ channels“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 19, 7292–7297 (**2006**).
- ZOGG, G.C., NYIREDY, S. und STICHER, O., „Operating conditions in preparative medium pressure liquid chromatography (MPLC). I. Influence of column preparation and particle size of silica“, *Journal of Liquid Chromatography*, 12, 11, 2031–2048 (**1989a**).
- ZOGG, G.C., NYIREDY, S. und STICHER, O., „Operating conditions in preparative medium pressure liquid chromatography (MPLC). II. Influence of solvent strength and flow rate of the mobile phase, capacity and dimensi-

ons of the column“, *Journal of Liquid Chromatography*, 12, 11, 2049–2065
(1989b).

ZOGG, G.C., NYIREDY, S. und STICHER, O., „Preparative medium pressure
liquid chromatographic (MPLC) and semipreparative HPLC separation of
furocoumarin isomers“, *Chromatographia*, 27, 11-12, 591–595 (1989c).

A. Abkürzungsverzeichnis

4-AP	4-Aminopyridin
5-MOP	5-Methoxypsoralen (Bergapten)
8-MOP	8-Methoxypsoralen (Xanthotoxin)
Å	Ångström (10^{-10} m)
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AD	Außendurchmesser
AF	<i>atrial fibrillation</i>
APC	<i>antigen-presenting cell</i> (antigenpräsentierende Zelle)
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>
aq	wässrige Lösung
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under the curve</i> (Fläche unterhalb der Kurve)
ber.	berechnet
BKCa	calciumabhängiger Kaliumkanal hoher Leitfähigkeit
bzw.	beziehungsweise
C ₆ D ₆	vollständig deuteriertes Benzol
Ca ⁺	Calciumion
CAU	Christian-Albrechts-Universität
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
COLOC	<i>correlation via long range couplings</i>

COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CH ₃ CN	Acetonitril
ChTX	Charybdotoxin
CRAC	<i>calcium release-activated calcium</i>
CsA	Ciclosporin A
d	Dublett
DAG	Diacylglycerol
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Dublett eines Dubletts
ddd	Dublett eines Dubletts eines Dubletts
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
d. h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMFDAM	<i>N,N</i> -Dimethylformamiddimethylacetal
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	vollständig deuteriertes Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
EAE	<i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
EC ₅₀	Konzentration, bei der eine halbmaximale Blockade erzielt wird
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisation
EMEA	<i>European Medicines Agency</i> (Europäische Arzneimittelagentur (Zulassungsbehörde))
EMK	elektromotorische Kraft
ER	Endoplasmatisches Reticulum
eV	Elektronenvolt

A. Abkürzungsverzeichnis

e. V.	eingetragener Verein
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fetales Kälberserum)
FK506	Tacrolimus
FTIR	<i>Fourier Transform Infra Red</i>
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
gef.	gefunden
GNC	<i>Gene Nomenclature Committee</i>
h	<i>hour</i> (Stunde)
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
HgTX1	Hongotoxin
HLA	humane Leukozyten-Antigene
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> (hochauflösende Massenspektrometrie)
Hrsg.	Herausgeber
HSAB	<i>hard and soft acids and bases</i>
HUGO	<i>Human Gene Organisation</i>
Hz	Hertz
ID	Innendurchmesser
IL	Interleukin
IKCa	calciumabhängiger Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit
IP ₃	Inositoltriphosphat
IR	Infrarot
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IUPHAR	<i>International Union of Pharmacology</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante
JNK	<i>c-Jun N-terminale Kinase</i>
K ⁺	Kaliumion

Kap.	Kapitel
KCN	K ⁺ (<i>potassium</i>) <i>channel</i> (Kaliumkanal)
konz.	konzentriert
Kv	spannungsgesteuerter Kaliumkanal
log P	Logarithmus des Verteilungskoeffizienten P (Maß für die Lipophilie)
m	Multipllett
M	molar (mol/l, m = milli-, μ = micro-, n = nano-)
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MEL	<i>murine erythroleukaemia</i>
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MgTX	Margatoxin
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MHz	Megahertz
min	Minuten
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MPLC	Mitteldruckflüssigchromatographie
MS	Multiple Sklerose bzw. Massenspektrometrie
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NFAT	Nukleärer Faktor der T-Zellaktivierung
NF κ B	Nukleärer Faktor κ B
NK	<i>natural killer cells</i> (Natürliche Killerzellen)
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
PAP	Phenoxyalkoxy psoralen

A. Abkürzungsverzeichnis

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pH-Wert	<i>pondus Hydrogenii</i> (dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Ionen-Konzentration mit -1 multipliziert)
PIP ₂	Phosphatidylinositoldiphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
ppm	<i>parts per million</i>
Psora-4	5-(4-Phenylbutoxy)psoralen
PUVA	Psoralen + UVA-Strahlung
QSAR	<i>quantitative structure-activity relationships</i> (quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen)
RAP	Rapamycin
Ras	<i>rat sarcoma</i> (kleines G-Protein)
RF	Rückfluss
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde bzw. Singulett
SKCa	calciumabhängiger Kaliumkanal mittlerer Leitfähigkeit
t	Triplett
Tab.	Tabelle
T _{CM}	<i>central memory T cell</i> (zentrale T-Gedächtniszelle)
TEA	Tetraethylammonium
T _{EM}	<i>effector memory T cell</i> (T-Effektor-Gedächtniszelle)
Th	T-Helfer-Zellen
TMS	Tetramethylsilan
UV	Ultraviolett
V	Volt
Verb.	Verbindung
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

ZNS

Zentralnervensystem

δ

chemische Verschiebung

B. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Leitung von Prof. Dr. W. Hänsel.

Herrn Prof. Dr. W. Hänsel danke ich sehr herzlich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des höchstinteressanten Themas sowie die stete Diskussionsbereitschaft und die vielen interessanten wissenschaftlichen aber auch nicht wissenschaftlichen Gespräche.

Herrn Prof. Dr. S. Grissmer, Abteilung Angewandte Physiologie der Universität Ulm, möchte ich sehr danken für die Ermöglichung zweier Forschungsaufenthalte in seinem Labor und die stete Bereitschaft, Fragen zu elektrophysiologischen Problemen zu beantworten.

Herrn Prof. Dr. D. Heber danke ich sehr für die Hilfe bei Nomenklaturfragen und für die interessanten, wissenschaftlichen Diskussionsrunden.

Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Dr. Heike Wulff, *Department of Medicinal Pharmacology and Toxicology, University of California, Davis*, für die Durchführung von *patch-clamp*-Messungen, die große Hilfe bei plötzlich auftretenden Problemen und Fragen sowie die ständige Erreichbarkeit.

Herrn Dr. U. Girreser sei sehr gedankt, für die Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren, besonders der zweidimensionalen, und seine unentbehrliche Hilfe bei der Auswertung dieser spektroskopischen Daten.

Aufgrund der stets äußerst engagierten Mitarbeit von Herrn B. Henke und seiner unermüdlichen Bemühungen bei der Synthese und Aufreinigung zahlreicher Substanzen gilt ihm mein ganz besonderer Dank. Ebenso möchte ich mich bei Frau S. Häuer für die Bestimmung der Lipophilie-Werte, die Unterstützung

B. Danksagung

bei der Zellkultur und die Aufnahme von NMR-Spektren bedanken. Für die Aufnahme von NMR-Spektren sei auch Frau M. Zietz gedankt. Herrn S. Wichmann danke ich für die Durchführung der Massenspektrometrie.

Bei den wissenschaftlichen Hilfskräften Frau A. Beinlich und Herrn B. Cohrs bedanke ich mich unter anderem für die Aufnahme von IR-Spektren und die Bestimmung von Schmelzpunkten.

Ein großer Dank geht an meine Korrekturleser Frau B. Gerig, Herrn D. Schade, Frau M. Lückert für das zügige Lesen und die konstruktive Kritik. Ein ganz besonderer Dank kommt hierbei Frau B. Gerig zu.

Für die Unterstützung bei computertechnischen Fragen sei Herrn Dr. J. I. Flege von Herzen gedankt.

Für die stets unkomplizierte und erfreuliche Zusammenarbeit bei der 3. Semesterbetreuung möchte ich mich bei Herrn Dr. A. Schmitz, Frau U. Schwering und Herrn J. Kotthaus bedanken.

Zuletzt möchte ich meiner Familie von ganzem Herzen danken. Das in mich gesetzte Vertrauen sowie die außerordentliche Unterstützung hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

C. Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Familienname	Silke Bodendiek
Geburtsdatum	02. März 1979
Geburtsort	Kiel
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1985 - 1989	Grundschule am Heidenberger Teich, Kiel
1989 - 1998	Gymnasium im Bildungszentrum Mettenhof, Kiel
Mai 1998	Allgemeine Hochschulreife

Studium und Ausbildung

1998 - 2002	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
August 2000	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 2002	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Januar - Juni 2003	1. Hälfte des Pharmaziepraktikums, Ferring GmbH, Kiel
Juli - Dezember 2003	2. Hälfte des Pharmaziepraktikums, Belvedere-Apotheke, Kiel
Januar 2004	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Approbation als Apothekerin

Berufliche Tätigkeit und Weiterbildung

seit Januar 2004	Wissenschaftliche Angestellte am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. W. Hänsel
------------------	--

D. Erklärung zu § 10 Abs. 2 Nr. 2 der Promotionsordnung

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde - abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer - selbständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Kiel, im April 2007

Silke Bodendiek

E. Kurzfassung

Ende der 80iger Jahre wurden Berichte bekannt, dass das Trinken von Gartenrautentee positive Effekte auf die Symptome der Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose (MS) habe. Diese weckten das Interesse von Forschern in der ganzen Welt, und so konnten bald darauf die Furocumarine als die wirksame Komponente identifiziert werden. In der zweiten Hälfte der 90iger Jahre wurde als Wirkprinzip die Blockade des Kaliumkanals Kv1.3, der bei der Aktivierung von T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle spielt, entdeckt. Eine Blockade dieses Kaliumkanals hat eine Immunsuppression zur Folge. Somit können Blocker des Kv1.3-Kanals als potentielle Immunsuppressiva angesehen werden. Obwohl die natürlich vorkommenden Furocumarine bereits recht gut den Kaliumionenstrom blockierten, war eine weitere Potenzsteigerung erstrebenswert. Auch im Hinblick auf eine Steigerung der Selektivität, die neben der Potenz für die Entwicklung von potentiellen Arzneistoffen ein wichtiger Parameter ist, wurde eine Vielzahl von Derivaten synthetisiert. Hierbei stellte sich heraus, dass eine enorme Potenzsteigerung um das 50000-fache gegenüber dem am besten wirksamen natürlich vorkommenden Furocumarin-Derivat, dem 5-Methoxypsoralen (5-MOP), durch die Einführung einer 4-Phenoxybutyl-Seitenkette erreicht werden konnte. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere ausgewählte Grundkörper mit der 4-Phenoxybutyl-Seitenkette substituiert, um mittels *patch-clamp*-Messungen zu testen, ob sich ebenfalls potente Blocker ergeben. So konnten tatsächlich für die meisten Verbindungen gute Wirksamkeiten bzw. deutliche Wirksamkeitssteigerungen sowie adäquate Selektivitäten nachgewiesen werden. Neben einer hohen Potenz und einer ausreichenden Selektivität ist für potentielle Arzneistoffe eine gute Bioverfügbarkeit wünschenswert. Als ein ausgewählter physikochemischer Parameter wurde die Lipophilie herangezogen. Es ergaben sich mittlere Lipophilie-Werte, die für eine ausreichende Resorption sprechen. Zudem konnte gezeigt werden, dass keine direkte Lipophilie-Wirkungsbeziehung besteht.

In the second half of the 1980ies it was reported that drinking tea prepared from the leaves of *Ruta graveolens* improved the symptoms of the autoimmune disease multiple sclerosis (MS). This finding aroused the interest of researchers all over the world, and soon the furocoumarins were identified as the active component. In the second half of the 1990ies the blockade of the potassium channel Kv1.3, which plays an important role in activation of T-lymphocytes, was determined as underlying mechanism. Blocking this potassium channel results in immunosuppression. Therefore Kv1.3 channel blockers are potential immunosuppressive drugs. Though the native furocoumarins from *Ruta graveolens* showed great promise for being effective potassium channel blockers an improved selectivity towards Kv1.3 was still highly desirable. To increase the potency and to minimize the risk of harmful side effects of a potential drug, research focused on synthesizing new substances that fulfill these requirements. Extensive efforts lead to the discovery that an enormous increase in potency up to 50000-fold in comparison to the most potent native furocoumarin, 5-methoxypsoralen, was achieved by attaching a 4-phenoxybutyl side chain. Because of these results the goal of this thesis was to investigate by the means of patch-clamp experiments whether attaching this 4-phenoxybutyl side chain to other scaffolds also results in increased potency. In fact, a high percentage of the synthesized substances showed clear increase in potency and adequate selectivity towards the Kv1.3-channels. Besides a high potency and selectivity, a pharmaceutical drug needs sufficient bioavailability. In this work the lipophilicity was taken as an indicator for the absorption characteristics and satisfactory values were determined. However, it could be shown that there is no direct correlation between the potency and the lipophilicity.