

β -Carboline
als potentielle Arzneistoffe oder endogene
Neurotoxine bei neurodegenerativen Erkrankungen:
Analytik, Synthese, Pharmakologie

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Dipl. pharm. Yvonne Rook

geboren am 13. März 1981
in Sonneberg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Jochen Lehmann, Jena
2. Prof. Dr. Gerhard Scriba, Jena
3. Prof. Dr. Michael Gütschow, Bonn

Tag der öffentlichen Verteidigung: 25.06.2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2005 bis Mai 2009 am Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Jochen Lehmann angefertigt.

Bei Herrn Prof. Dr. Jochen Lehmann bedanke ich mich herzlich für die Ermöglichung der Promotion auf diesem interessanten Themengebiet. Auch seine vielen nützlichen Hinweise und Diskussionsbereitschaft sowie seine freundliche und humorvolle Art haben mir sehr geholfen.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Scriba und Herrn Prof. Dr. Michael Gütschow danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Ebenfalls danken möchte ich allen Kollegen am pharmazeutischen Institut in Jena für die angenehme Zeit in einer freundschaftlichen, entspannten Atmosphäre. Insbesondere sei hier Dr. Christoph Enzensperger erwähnt wegen seiner wertvollen Anregungen, seines nie enden wollenden Ideenreichtums und seiner Geduld in vielen langen Gesprächen. Weiterhin möchte ich Kathrin Lange, Patrick Mohr, Franziska Müller und Robert Otto danken, mit denen ich ein Büro mit viel Freude teilen durfte, ebenso Carolin Roegler und PD Andreas Seeling für ihre fachlichen Hinweise und Kirsten Dahse für ihre stetige Diskussionsbereitschaft.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch den Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. Hans Rommelspacher und Frau Dr. Catrin Wernicke von der Charité Berlin, sowie Herrn Kai-Uwe Schmidtke, Frau Heidemarie Graf und Herrn Dr. Friedemann Gaube des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena für die Durchführung des Exzitotoxizitätsassays und ihre wertvollen Tips. Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. habil. Marcus Fändrich für die Bereitstellung des A β 40 und seine Diskussionsbereitschaft.

Petra Wiecha danke ich für die Durchführung des Ellman-Tests und Heidi Traber für ihre Hilfsbereitschaft bei der praktischen Durchführung des THT-Assays. Weiterhin bedanke ich mich bei Katrin Fischer für die angenehme Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Unterstützung

Meiner lieben Familie gilt jedoch mein größter Dank für ihre moralische, liebevolle Unterstützung. Ganz besonders möchte ich meinem Mann Holger für seine unendliche Geduld und Ruhe danken, als ich diese am meisten brauchte.

A	EINLEITUNG	1
A.1	Neurodegenerative Erkrankungen	1
A.1.1	Alzheimer'sche Erkrankung.....	2
A.1.2	Parkinson'sche Erkrankung.....	5
A.1.3	Cholinesteraseinhibitoren.....	8
A.1.3.1	Allgemeines zu Cholinesterasen.....	8
A.1.3.2	Inhibitoren der Cholinesterase und deren Einsatz in der Pharmakotherapie.....	13
A.2	β-Carboline	19
A.3	Zielstellung der Arbeit	22
B	SYNTHETISCHER TEIL	27
B.1	Synthese von 1S- und 1R-1,2,2-Trimethyl-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolin-2-ium	28
B.1.1	Literaturbekanntes.....	28
B.1.2	Synthese von <i>rac</i> -1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (<i>rac</i> 1)	29
B.1.3	Racemattrennung von <i>rac</i> -1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (<i>rac</i> 1).....	31
B.1.4	Synthese der <i>rac</i> - und 1R-1,2,2-Trimethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-2-ium-Salze (<i>rac</i> 2, <i>R</i> 2)	36
B.2	Synthese von β-Carbolin	39
B.3	Synthese von N2-bivalenten β-Carbolinen	42
B.4	Synthese weiterer bivalenter Verbindungen	45
B.5	Synthese von partiell reduzierten N2-homobivalenten β-Carbolinen	46
B.6	Synthese von N2-monovalenten β-Carbolinen	48
B.7	Synthese von N9-bivalenten β-Carbolinen	49
B.8	Synthese von quartären N9-bivalenten β-Carbolinen	51
B.9	Synthese des partiell reduzierten N9-bivalenten β-Carbolins	53
B.10	Synthese von N9-monovalenten β-Carbolinen	54
C	PHARMAKOLOGISCHER TEIL	56
C.1	Untersuchung auf Neurotoxizität, MTS-Assay, β-Carbolin-Uptake-Assay	56

Inhaltsverzeichnis

C.1.1	Methodenbeschreibung	58
C.1.2	Ergebnisse und Diskussion	59
C.2	Untersuchung auf neuroprotektive Eigenschaften.....	65
C.2.1	Methodenbeschreibung	66
C.2.2	Ergebnisse und Diskussion	66
C.3	Bestimmung der inhibitorischen Aktivität an der AChE und BChE, Ellman Test	69
C.3.1	Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität	69
C.3.2	Methodenbeschreibung	69
C.3.3	Ergebnisse.....	73
C.3.4	Diskussion	76
C.3.4.1	N2-bivalente β -Carboline.....	76
C.3.4.2	Partiell reduzierte N2-homobivalente β -Carboline	80
C.3.4.3	N2-monovalente β -Carboline	81
C.3.4.4	N9-homobivalente β -Carboline.....	82
C.3.4.5	N9-monovalente und N2,N9-disubstituierte, monovalente β -Carboline.....	84
C.4	β-Amyloid Aggregation und deren Beeinflussung durch verschiedene Faktoren.....	86
C.4.1	Methodenbeschreibung	88
C.4.2	Ergebnisse und Diskussion	89
C.5	Bestimmung der inhibitorischen Aktivität am NMDA-Rezeptor	95
C.5.1	Methodenbeschreibung	96
C.5.2	Ergebnisse.....	99
C.5.3	Diskussion	101
D	GESAMTDISKUSSION.....	105
E	ZUSAMMENFASSUNG	109
F	ABSTRACT.....	115
G	EXPERIMENTELLER TEIL.....	116
G.1	Experimenteller Teil, Synthesen	116
G.1.1	Allgemeine Angaben zu Materialien und Geräten.....	116
G.1.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	117
G.1.3	Monographien.....	119
G.2	Untersuchung auf Neurotoxizität, MTS-Assay, β-Carbolin-Uptake-Assay	165

G.3	Untersuchung auf neuroprotektive Eigenschaften.....	165
G.4	Bestimmung der inhibitorischen Aktivität an der AChE und BChE, Ellman-Test	165
G.4.1	Allgemeine Angaben zu Materialien und Geräten.....	165
G.4.2	Versuchsdurchführung	166
G.5	Aβ-Aggregation und deren Beeinflussung durch verschiedene Faktoren.....	167
G.5.1	Allgemeine Angaben zu Materialien und Methoden.....	167
G.5.2	Versuchsdurchführung	168
G.6	Bestimmung der inhibitorischen Aktivität am NMDA-Rezeptor	169
H	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	170
I	LITERATURVERZEICHNIS	172

Lebenslauf

Publikationsverzeichnis

Selbständigkeitserklärung

A Einleitung

Nach wie vor sind die Ursachen vieler neurodegenerativer Erkrankungen nicht geklärt. Die Alzheimer'sche und die Parkinson'sche Erkrankung gehen mit einem massiven Neuronensterben einher. So umfangreich mögliche Entstehungsfaktoren diskutiert werden, so vielfältig sind auch die Therapieansätze, die zur Behandlung entwickelt wurden.

In der vorliegenden Arbeit werden β -Carboline diskutiert; zum Einen in ihrer Funktion als Neurotoxine, die zur Pathogenese speziell der Parkinson'schen Erkrankung beitragen, zum Anderen wird ihr Potential in Hinblick auf die praxisbewährten Therapieansätze, Cholinesterasehemmung und NMDA-Rezeptor-Antagonismus bei der Alzheimer'schen Erkrankung untersucht.

A.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen sind langsame, unaufhaltsam fortschreitende Prozesse, bei denen das Nervengewebe einer Degeneration unterliegt, die über Nekrobiose zum Untergang nervöser Strukturen führt. Die Häufigkeit der Erkrankungen nimmt mit dem Alter zu, insbesondere nach dem 65. Lebensjahr. Durch erhöhte Lebenserwartung und einen zunehmenden Anteil älterer Menschen in der Bevölkerung wächst auch die Bedeutung dieser Erkrankungen [Skovronsky et al., 2006].

Die klinischen Hauptsymptome neurodegenerativer Erkrankungen sind die Abnahme kognitiver Fähigkeiten, Gangstörungen, motorische Schwäche und vegetative Ausfälle [Stevens et al., 1997]. Die Symptome sind abhängig von der betroffenen Gehirnregion, und so lassen sich die Erkrankungen auch nach dieser einteilen, wie in Tabelle A-1 dargestellt.

Viele neurodegenerative Erkrankungen haben ein und denselben pathologischen Mechanismus gemeinsam, die Aggregation und Ablagerung von fehlerhaft gefalteten Proteinen. Unterscheiden kann man die Krankheiten ebenso nach diesen. Vor allem die Proteine beta-Amyloid, Tau und α -Synuclein stehen hier im Fokus [Skovronsky et al., 2006].

Hauptlokalisation	Erkrankung
Großhirnrinde	senile Demenz vom Alzheimer Typ Alzheimer'sche Erkrankung Morbus Pick
Stammganglien	Chorea Huntington Parkinson'sche Erkrankung progressive Pallidumatrophy Torsionsdystonie
Kleinhirn	diffuse und lokalisierte Kleinhirnatrophie Zahnkern-Bindegewebe-Atrophie
Spino-zerebellare Systeme	verschiedene Atrophien
Motorische Systeme	spastische Spinalparalyse spinale Muskelatrophie progressive Bulbärparalyse myatrophische Lateralsklerose
Periphere Nerven und spinale Strangsysteme	neurale Muskelatrophien Neuropathie
Multisystematrophien	Striato-nigrale Degeneration Zahnkern-Ruber-Degeneration Shy-Drager-Syndrom

Tabelle A-1 Gliederung wichtiger Degenerativprozesse nach betroffenen neuronalen Regionen (nach [Holzner, 1989])

Im Folgenden werden die häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen, die Alzheimer'sche und die Parkinson'sche Erkrankung, näher betrachtet.

A.1.1 Alzheimer'sche Erkrankung

Die Alzheimer'sche Erkrankung ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung und die häufigste Ursache einer Demenz. In Deutschland geht man zur Zeit von 1,2 Millionen Erkrankten aus sowie von einer Verdopplung dieser Zahl in den nächsten 20 Jahren. Die Kosten für die Behandlung und Pflege der Patienten sind besonders durch die hohe Pflegebedürftigkeit im fortgeschrittenen Krankheitsstadium enorm: sie betragen jährlich pro Patient ca. 45000 Euro [Alzheimer Forschungsinitiative e.V., 2009].

Klinisch entwickeln die Patienten eine progrediente Störung der Merkfähigkeit, eine Beeinträchtigung des abstrakten Denkens, zeigen Persönlichkeitsveränderungen, gestörtes Urteilsvermögen und häufig emotionale Störungen. Mit Fortschreiten der Erkrankung werden die Patienten immobil und ausgezehrt, der Tod ist gewöhnlich die Folge einer sich entwickelnden Pneumonie oder eines Herzinfarktes [Werning et al., 1997].

Eine sichere Diagnose ist durch das Fehlen eindeutiger krankheitsspezifischer Marker bis heute erst nach dem Tod möglich. So muß die Diagnose zu Lebzeiten durch eine Kombination verschiedener Methoden erfolgen, die neuropsychologische und

neurophysiologische Untersuchungen, das klinische Krankheitsbild, bildgebende Diagnose-Verfahren und Laboruntersuchungen beinhalten.

Bei der Alzheimer'schen Erkrankung handelt es sich um eine Erkrankung multifaktorieller Genese, wobei das Alter den größten Risikofaktor darstellt.

Bereits viele Jahre bevor erste klinische Symptome bei den Betroffenen sichtbar werden, bilden sich in Bereichen des Gehirns, die mit Lernen, Gedächtnis und emotionalem Verhalten assoziiert sind, extrazelluläre Plaques und intrazelluläre Neurofibrillen. Die Plaques bestehen aus aggregiertem und abgelagertem beta-Amyloid (A β) – Peptiden mit 40 bis 42 Aminosäuren, welche aus dem membranständigen Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) durch β - und γ -Sekretase freigesetzt werden (siehe Abschnitt C.4, S.86). Gebildete A β -Aggregate induzieren oxidativen Streß verbunden u.a. mit einer Beeinträchtigung von ATPasen, Membrantransportern (z.B. für Glucose und Glutamat) und Ionenkanälen, um nur einen kleinen Teil zu nennen. Intrazelluläre Neurofibrillen bestehen hauptsächlich aus aggregiertem, hyperphosphoryliertem und dadurch bedingt dysfunktionalem Tau-Protein. Die physiologische Funktion des Proteins, die Bindung und Stabilisierung von Mikrotubuli, ist dadurch nicht mehr möglich. Dies führt u.a. zu einem gestörten axonalen Transport und oxidativen Veränderungen in der Zelle [Mattson, 2004].

Die betroffenen Hirnregionen, wie der entorhinale Kortex, der Hippocampus und das basale Vorderhirn weisen unter Einfluß von Plaques eine reduzierte Zahl an Synapsen sowie geschädigte Neuriten auf. Dabei scheinen cholinerge und glutamaterge Neuronen besonders betroffen zu sein. Die verminderte cholinerge Signaltransduktion, verursacht durch einen erniedrigten Acetylcholin-Spiegel, wird direkt mit den bei Alzheimer-Patienten beobachteten Symptomen in Verbindung gebracht [Ballard, 2002]. Glutamaterge Neuronen reagieren bei Schädigung mit einer erhöhten Glutamat-Freisetzung, die u.a. zu einer Überaktivierung von *N*-Methyl-*D*-aspartat (NMDA)-Rezeptoren führt, wodurch ein erhöhter Calcium-Einstrom initiiert wird. Die Störung der Calciumhomöostase und letzten Endes der Zelltod sind die Folgen (siehe Abschnitt C.5, S.95). Die Calciumhomöostase scheint auch mit neurodegenerativen Vorgängen assoziiert zu sein [Mattson et al., 2003].

Da der eigentliche Ausgangspunkt der Krankheit noch nicht gefunden ist, kann eine Therapie zur Zeit nur symptomatisch erfolgen, mit dem Ziel, die Lebensqualität der Betroffenen und ihrer Betreuer zumindest für einen begrenzten Zeitraum zu verbessern. Neben psychosozialen Maßnahmen umfaßt die Therapie einen kognitiven (antidementiven) und einen nicht-kognitiven (antidepressiven, neuroleptischen) Bereich.

Zur Zeit sind für die Therapie kognitiver Einschränkungen leichter bis mittelschwerer Formen der Alzheimer'schen Erkrankung vier Medikamente in Deutschland zugelassen (siehe Abb. A-1) [BPI Rote Liste, 2009]. Rivastigmin, Galantamin und Donepezil sind Cholinesteraseinhibitoren. Sie verlangsamen den Abbau des vermindert vorkommenden

A.1.2 Parkinson'sche Erkrankung

Die Parkinson'sche Erkrankung ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. Hauptsächlich betroffen sind Menschen über 55 Jahre, aber auch jüngere Erwachsene und Kinder. Etwa 150000 Menschen leiden in Deutschland unter dieser Krankheit. Man unterscheidet zwei Arten der Erkrankung, das weitaus häufigere primäre (idiopathische) Syndrom mit unbekannter Herkunft und das sekundäre (symptomatische) Syndrom, das als Folge von z.B. Atherosklerose, Enzephalitiden, Traumen und Tumoren auftreten kann. Eine, im Gegensatz zu o.g. Syndromen, reversible Erkrankung mit parkinsonoiden Symptomen wird z.B. durch Neuroleptika hervorgerufen [Forth et al., 2005].

Klinisch ist die Krankheit gekennzeichnet durch drei Kardinalsymptome: Ruhetremor, Rigor und Brady-, Hypo- oder Akinese. Meist beginnt der Tremor einseitig, gefolgt von einer generellen Verlangsamung der Bewegung und Steifigkeit der Muskulatur [Forth et al., 2005]. Für die Diagnose läßt sich die Tatsache nutzen, daß die Symptomatik der Parkinson'schen Erkrankung durch L-Dopa positiv beeinflussbar ist (siehe nachfolgenden Abschnitt „Therapie“) [Diener et al., 2008].

Wie bei der Alzheimer'schen Erkrankung, so spricht man auch bei Morbus Parkinson von einer multifaktoriellen Genese, bei der Umweltfaktoren in Zusammenspiel mit genetischen Faktoren und dem Alter die Erkrankung zum Ausbruch bringen [von Bohlen und Halbach, 2005].

Weitgehend akzeptiert ist, daß die Symptome eine Konsequenz des Verlustes dopaminergener Neuronen und der Dopaminverarmung der Substantia nigra des Corpus striatum ist. Die Symptome treten nicht gleich zu Beginn der Erkrankung auf. Sie sind erst vollständig ausgeprägt, wenn mindestens 50-60% der dopaminergen Neuronen untergegangen sind und nur noch 30% des striatalen Dopamins vorhanden sind. Durch den selektiven Verlust der dopaminergen Neuronen und den damit verbundenen Dopaminmangel werden bewegungsregulierende Signale nicht genügend weitergeleitet, und Bewegungen können von motorischen Hirnregionen nicht mehr ausreichend koordiniert werden [Forth et al., 2005; von Bohlen und Halbach, 2005].

In den noch verbliebenen dopaminergen Neuronen sind Lewy-Körperchen (intrazytoplasmatische Inklusionen) zu erkennen. Diese bestehen aus Aggregaten des Proteins α -Synuclein [Skovronsky et al., 2006; von Bohlen und Halbach, 2005]. Vorstufen der Aggregate bewirken eine Schädigung der Mitochondrienmembran, und Aggregate selbst wirken zelltoxisch [Irvine et al., 2008]. Als Ursache des massiven Neuronensterbens werden seit langem auch physiologische Neurotoxine, wie z.B. quartäre β -Carbolinium-Derivate diskutiert (siehe Abschnitt C.1, S.56).

Durch den geringeren Dopamingehalt kommt es zu einem Ungleichgewicht u.a. zwischen den Neurotransmittern Dopamin, Glutamat und Acetylcholin. Der verminderte

Dopaminspiegel führt zu einer erhöhten Glutamat- und Acetylcholinfreisetzung [Forth et al., 2005].

Auch die Parkinson'sche Erkrankung kann angesichts der noch unbekanntem Auslöser der Krankheit nur symptomatisch behandelt werden.

Das erste eingesetzte Medikament war *L*-Dopa, das bis heute zur Standardtherapie gehört. *L*-Dopa, die biosynthetische Vorstufe des Dopamins, kann durch seine Aminosäurestruktur die Blut-Hirn-Schranke überwinden und wird dort durch enzymatische Decarboxylierung zu Dopamin umgesetzt. So vermag es den Dopaminmangel im Gehirn vorübergehend auszugleichen. *L*-Dopa wird zur Zeit nur in Kombination mit peripher wirksamen Decarboxylasehemmern wie Carbidopa eingesetzt, um die periphere, unerwünschte Umwandlung zu Dopamin zu verhindern. Ein weiterer Ansatzpunkt um die Dopaminkonzentration zu erhöhen, ist die Hemmung der Dopamin-abbauenden Enzyme Monoaminoxidase B (MAO B) durch z.B. Selegilin und Catechol-O-methyltransferase (COMT) durch z.B. Entacapon.

Dopaminrezeptor-Agonisten werden ebenfalls zur Therapie eingesetzt. Neben den klassischen Mutterkornalkaloiden, wie z.B. Bromocriptin und Cabergolin werden die neueren selektiven und deshalb besser verträglichen Dopamin-Rezeptor D₂ - Agonisten, wie z.B. Pramipexol und Ropinirol, gegeben.

Das Ungleichgewicht der Neurotransmitter bietet noch weitere Therapieansätze. Die erhöhte Acetylcholin-Konzentration kann durch Antagonisten an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren wie Benztropin gesenkt werden, und die verstärkte Ausschüttung von Glutamat kann durch NMDA-Rezeptor-Antagonisten wie z.B. Amantadin ausgeglichen werden.

Einige Pharmakotherapeutika sind in Abb. A-2 beispielhaft dargestellt.

Auch bei der Parkinson'schen Erkrankung zielen Forschungsansätze neuer Therapien auf die Verhinderung und Auflösung von α -Synuclein-Ablagerungen [Skovronsky et al., 2006].

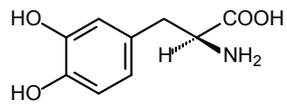
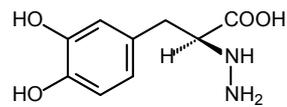
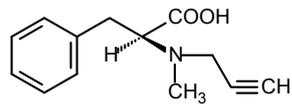
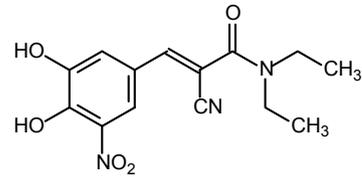
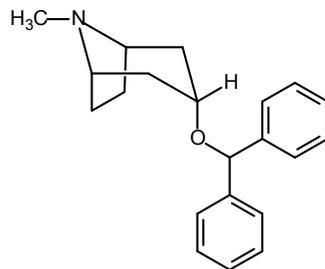
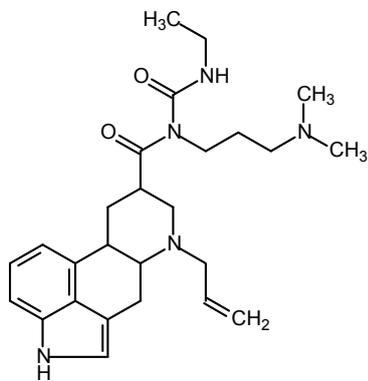
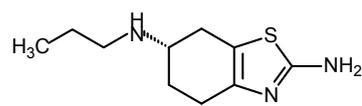
**L-Dopa****Carbidopa****Selegilin****Entacapon****Benztropin****Amantadin****Cabergolin****Pramipexol**

Abb. A-2 Pharmakotherapeutika zur Behandlung der Parkinson'schen Erkrankung

A.1.3 Cholinesteraseinhibitoren

A.1.3.1 Allgemeines zu Cholinesterasen

Die Wirkung des esteratischen Enzyms Acetylcholinesterase (AChE) wurde von Dale erstmals beschrieben [Dale, 1914]. Jahre später wurde von Nachmansohn et al. die Spezifität für das Substrat Acetylcholin (ACh) nachgewiesen [Nachmansohn et al., 1945].

Der Neurotransmitter ACh wird nach der Erregung cholinergischer Synapsen aus Vesikeln der Synapse ausgeschüttet und bindet dann an postsynaptische Rezeptoren. Die Erregungsübertragung wird beendet, indem AChE den Ester ACh in Essigsäure und Cholin spaltet. Dazu bindet ACh mit dem Acetyl-Rest an die Aminosäure Serin des Enzyms (siehe Abb. A-3). Durch eine Transacetylierung wandert der Acetylrest vom Acetylcholin zum Serin, wo er zunächst gebunden wird. Nachfolgend wird der Serinester gespalten und AChE wieder in seine Ausgangsform überführt [Soreq et al., 2001]. Dieser Prozeß verläuft so schnell, daß er nur durch die Diffusion des Substrates an das Enzym limitiert wird. Man spricht hier von einer diffusionskontrollierten Enzymreaktion.

Wirbeltiere verfügen über zwei Cholinesterasen: AChE und Butyrylcholinesterase (BChE). Die katalytische Reaktion von BChE verläuft analog zur AChE. Die Enzyme unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität. BChE hydrolysiert ACh, aber schneller noch das größere Butyrylcholin (BCh), während AChE selektiv ACh spaltet und inaktiv gegenüber größeren Estern ist. Die Erklärung liegt in der im Vergleich zu AChE größeren Bindungstasche von BChE [Massoulie et al., 1998].

Ein weiterer Unterschied liegt im Verhalten der Enzyme gegenüber hohen Substratkonzentrationen. AChE ist bei niedrigen Substratkonzentrationen hoch effizient und wird durch hohe gehemmt, während BChE bei niedrigen Konzentrationen wenig und bei hohen hoch effizient ist [Greig et al., 2005].

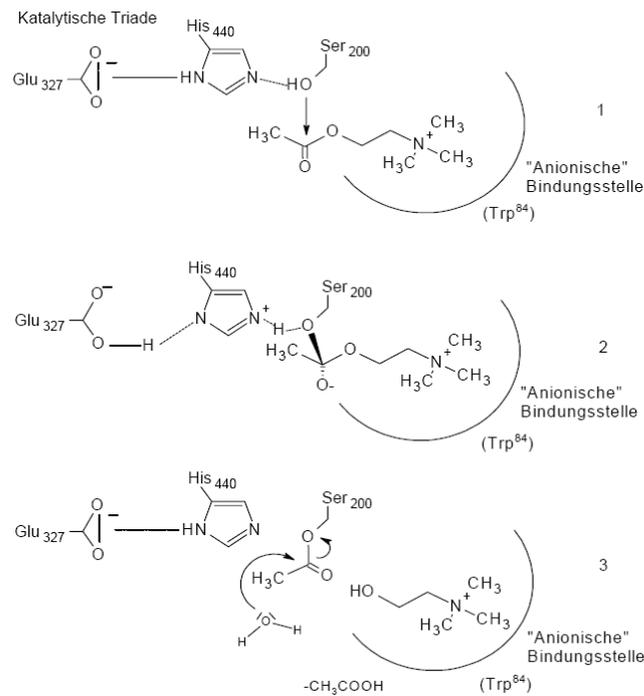


Abb. A-3 Katalytische Triade; Spaltung des Acetylcholins in Essigsäure und Cholin durch AChE [Kapkova, 2004]

AChE und BChE besitzen neben der klassischen Esterasefunktion, Aryl-Acyl-Amidase-(AAA) und Peptidase-Aktivität. Die physiologische Funktion der AAA-Aktivität ist bislang unbekannt, stellt aber vermutlich eine Verbindung von serotonergem und cholinergem System dar, wobei der Mechanismus zur Zeit noch nicht bekannt ist. Das synthetische Substrat *o*-Nitroacetanilid wird durch AAA in *o*-Nitroacetanilin und Acetat gespalten. Für einige Cholinesteraseinhibitoren, wie Tacrin und Physostigmin, wurde eine höhere AAA- als Esterase-Inhibition festgestellt. Die Peptidase-Aktivität hat eine große Bedeutung in der Pathogenese der Alzheimer'schen Erkrankung. Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) ist ein Substrat der Cholinesterasen und durch seine Spaltung kann niedermolekulares β -Amyloid freigesetzt werden, was schließlich die β -Amyloid-Plaques-Bildung begünstigen kann. Beide Cholinesterasen spalten APP, AChE aber auf einem nicht-amyloidogenen Weg, während BChE β -Amyloid freisetzt und dadurch die β -Amyloid-Plaques-Bildung fördert [Cokugras, 2003] (siehe Abschnitt C.4).

Die Cholinesterasen können nach ihren verschiedenen Untereinheiten des C-terminalen Endes unterschieden werden. Dabei steht „H“ für hydrophob, „T“ für „tail“ (Schwanz oder Rest) und „S“ für „soluble“ (löslich) bzw. „snake“ (Schlange) [Massoulié et al., 1998].

Zusätzlich unterscheidet man zwei molekulare Spezies der Cholinesterasen: A- und G-Form. Die globulären (G-) Formen der Cholinesterasen bestehen aus ein, zwei oder vier Monomeren und werden demnach als G₁, G₂, oder G₄ bezeichnet. Dimere entstehen meist durch Disulfidbrücken-Bildung am Cystein 571 und können H- oder T-Untereinheiten

aufweisen. Tetramere können sich aus monomeren und dimeren Formen über hydrophobe Wechselwirkungen der aromatischen Aminosäuren am C-terminalen Ende bilden und besitzen immer T-Untereinheiten [Cokugras, 2003; Massoulie et al., 1998; Massoulie et al., 1999].

Die asymmetrische (A-) Form kann aus ein, zwei oder drei Tetrameren bestehen (A_4 , A_8 , A_{12}) und besitzt immer die T-Form des C-terminalen Endes [Montenegro et al., 2008]. Zusammengefaßt ist dies in Tabelle A-2 dargestellt.

Die katalytische Aktivität der Enzyme ist für alle Formen gleich. Grund dafür ist die Lokalisation der katalytischen Triade am unveränderten N-Terminus. Die Unterschiede der Aminosäuresequenz liegen bei den verschiedenen Formen lediglich im C-Terminus [Massoulie et al., 1998].

AChE und BChE sind Glykoproteine, unterscheiden sich aber im Grad der Glykosylierung, die sich zusätzlich noch von Gewebe zu Gewebe unterscheidet. Während die humane AChE drei Glykosylierungsstellen aufweist [Velan et al., 1993], finden sich bei der BChE neun [Millard et al., 1992].

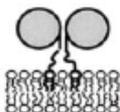
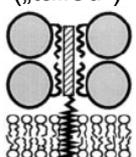
Untereinheit	Molekulare Formen	Vorkommen
<p>H („hydrophobic“)</p> 	G_2	<ul style="list-style-type: none"> wird nur von AChE gebildet Nervengewebe von Insekten Muskel- und Nervengewebe und Zitterorgan von Torpedo-Arten humane Erythrozyten und blutbildende Zellen [Di Francesco et al., 1981]
<p>T („tailed“)</p> 	G_1, G_2, G_4 A_4, A_8, A_{12}	<ul style="list-style-type: none"> wird von AChE und BChE gebildet G_4-BChE macht 95% der Plasmaaktivität aus Plasma-AChE zu 54% G_4, 44% sind $G_1 + G_2$ Muskel- und Nervengewebe von Wirbeltieren; G_4 am häufigsten im Nervengewebe vertreten [Atack et al., 1986]
<p>S („soluble“ oder „snake“)</p> 	G_1	<ul style="list-style-type: none"> wird nur von AChE gebildet Giftdrüsen und andere Gewebe von Giftschlangen

Tabelle A-2 Übersicht über die verschiedenen Untereinheiten des C-terminalen Peptides mit graphischer Darstellung einiger Formen, deren molekulare Formen und Vorkommen [Massoulie et al., 1998; Massoulie et al., 1999]

Acetylcholinesterase

Die erste Isolierung der AChE gelang aus dem elektrischen Organ des Zitteraals (*Electrophorus electricus*) [Rothenberg et al., 1947]. Eine weitere Quelle wurde im elektrischen Organ des Zitterrochen (*Torpedo californica* und *marmorata*) gefunden. Nach der Isolierung gelang hier auch die erste Kristallisation des Enzyms [Nachmansohn et al., 1939; Sussman et al., 1991].

Neben den bereits erwähnten Funktionen spielt die AChE auch für die Stimulation der Differenzierung und der zellulären Adhäsion während der Neurogenese eine Rolle [Cokugras, 2003].

AChE hat eine 20 Å tiefe Bindungstasche, die in Abb. A-4 dargestellt ist. An deren Boden befindet sich das aktive Zentrum mit zwei Bindungsstellen: Einerseits die katalytische Bindungsstelle, bestehend aus Serin, Histidin und Glutaminsäure (S200, H440, E327), in der Bindungstasche linkerhand gelegen, und andererseits eine rechterhand liegende anionische Bindungsstelle, bestehend aus Tryptophan, die zur Stabilisierung des Cholins während der Hydrolyse beiträgt. Das elektronenreiche Tryptophan (W84) bildet Kation- π -Wechselwirkungen mit dem quartären Stickstoff des Cholins aus. W84 kann auch π - π -Wechselwirkungen ausbilden und ist deshalb oft an Inhibitor-Bindungen beteiligt. Vermutlich sind die in der Mitte der Bindungstasche gelegenen Aminosäuren Glycin, Serin und Phenylalanin (teilweise abgebildet; G328, S329, F330, F331) auch an der Stabilisation des Inhibitors oder Substrates beteiligt [Holzgrabe et al., 2007]. Die Stabilisierung des Acylrestes während der Hydrolyse wird durch zwei Phenylalanine (F288, F290) bewirkt (nicht dargestellt) [Silman et al., 2000].

Am Rand der Bindungstasche befinden sich die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und die sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure (D72, Y334, W279, Y70, Y121, E278), die die sogenannte „peripheric anionic site“ (PAS), bilden [Masson et al., 1999]. Über diese Bindungsstelle soll eine verstärkte Bildung der bei der Alzheimer'schen Erkrankung vorkommenden A β -Plaques vermittelt werden. PAS wird somit als pharmakotherapeutischer Ansatzpunkt untersucht und diskutiert [Giacobini, 2004].

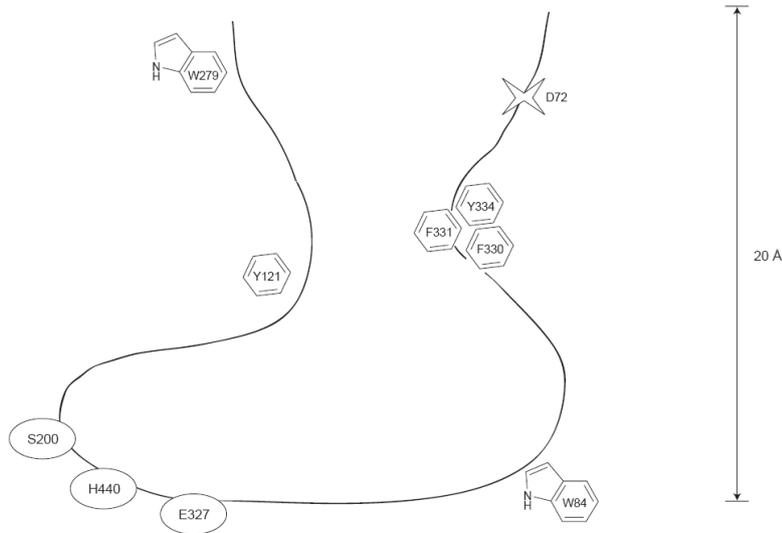


Abb. A-4 Schematische Darstellung der AChE-Bindungstasche (bezogen auf AChE isoliert aus *Torpedo californica*) [Holzgrabe et al., 2007]

Butyrylcholinesterase

BChE, auch bekannt als Pseudo- oder Serumcholinesterase, gehört wie AChE zur Familie der α/β -gefalteten Hydrolasen.

Die BChE ist weit weniger untersucht als die AChE, geriet aber in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus u.a. von Untersuchungen zur Pathogenese der Alzheimer'schen Erkrankung.

Involviert in die embryonale Entwicklung des Nervensystems beeinflusst die BChE zudem die zelluläre Proliferation sowie morphogenetische Veränderungen [Cokugras, 2003]. Die Konzentration von BChE ist bei der Alzheimer'schen Erkrankung nicht vermindert, sondern unverändert bis leicht erhöht. Ein Einfluß auf die Bildung von A β -Plaques, A β -Oligomeren und neurofibrillären Tangles wird diskutiert [Guillozet et al., 1997].

Die Aminosäuresequenz der BChE zeigt 65% Übereinstimmung mit der AChE [Cokugras, 2003]. Die Bindungstasche ist ebenfalls 20 Å tief, allerdings sind 6 von 14 aromatischen Aminosäuren der AChE durch aliphatische Aminosäuren ersetzt, wodurch die Bindungstasche ein viel größeres Volumen aufweist [Cokugras, 2003]. Daher können auch, wie bereits erwähnt, größere Substrate wie z.B. Butyrylcholin und Benzoylcholin hydrolysiert werden. Die Bindungstasche der BChE ist in Abb. A-5 schematisch dargestellt. Die anionische Bindungsstelle des aktiven Zentrums wird, wie auch bei der AChE, von Tryptophan (W82, als „W“ in Abb. A-5) gebildet und die katalytische Triade durch Serin (S226, „S“), Histidin (H466, „H“) und Glutaminsäure (E353, „E“) gestaltet [Darvesh et al., 2003]. Der Acylrest des Substrates kann mit den aliphatischen Aminosäuren Leucin (L286) und Valin (V288), die die Acyl-Bindungsstelle („A“) bilden eine Wechselwirkung eingehen [Cokugras, 2003]. Am Eingang der Bindungstasche befindet sich wie bei der AChE die periphere Bindungsstelle, deren Funktion und zugehörige Aminosäuren im Falle der BChE

aber noch nicht genau geklärt sind. Tyrosin (Y332, „Y“) und Asparaginsäure (D70, „D“) werden aber als zugehörig betrachtet. Positiv geladene Substrate werden durch Wechselwirkung mit Tyrosin und Asparaginsäure in die Bindungstasche gezogen [Darvesh et al., 2003].

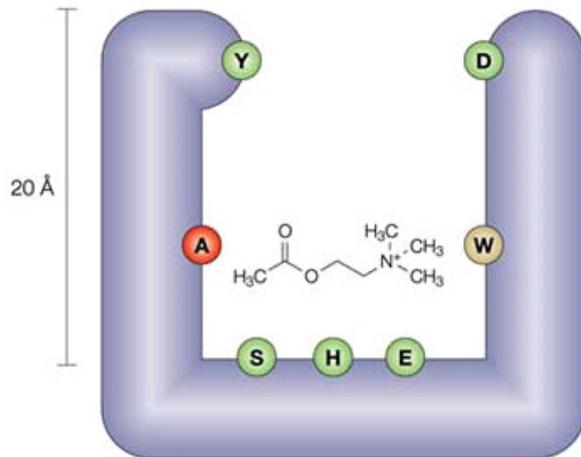


Abb. A-5 Schematische Darstellung der BChE-Bindungstasche mit Acetylcholin als Substrat (bezogen auf humane BChE) [Darvesh et al., 2003]

A.1.3.2 Inhibitoren der Cholinesterase und deren Einsatz in der Pharmakotherapie

Cholinesteraseinhibitoren vermindern die Abbaugeschwindigkeit von ACh und anderen Substraten. Als Folge der erhöhten Substratkonzentration nimmt der Parasympathikotonus und der Tonus der quergestreiften Muskulatur zu. Cholinesteraseinhibitoren werden auch als indirekt wirkende Parasympathomimetika bezeichnet und vielfältig therapeutisch eingesetzt [Forth et al., 2005].

Peripher wirksame Inhibitoren werden u.a. zur Therapie von Myasthenia gravis, zentral wirksame Hemmer bei beginnender und fortgeschrittener Demenz genutzt. In Tabelle A-3 sind therapeutisch genutzte Cholinesteraseinhibitoren mit ihren Handelsnamen zusammengefaßt.

Substanz (Handelsname)	in Deutschland zugelassene Anwendung
Galantamin (Reminyl®)	symptomatische Behandlung von leichter bis mittelschwerer Demenz vom Alzheimer-Typ
Physostigmin (Anticholium®)	Antidot u.a. bei Atropin- und Amphetamin-Vergiftungen
Pyridostigmin (Kalymin®, Mestinon®)	Myasthenia gravis
Distigmin (Ubretid®)	Myasthenia gravis, neurogene Blasenstörungen, postoperative Darmatonie
Neostigmin (Neostig®)	Myasthenia gravis
Rivastigmin (Exelon®)	symptomatische Behandlung von leichter bis mittelschwerer Demenz vom Alzheimer-Typ und beim idiopathischen Parkinsonsyndrom
Donepezil (Aricept®)	symptomatische Behandlung von leichter bis mittelschwerer Demenz vom Alzheimer-Typ

Tabelle A-3 In Deutschland zugelassene Cholinesteraseinhibitoren und deren Anwendungsgebiete [BPI Rote Liste, 2009]

Physostigmin, auch Eserin genannt, wurde als erster Cholinesterasehemmer bereits 1863 von Fraser aus der Kalabarbohne isoliert [Holmstedt, 2000]. Tacrin und Physostigmin waren die ersten therapeutisch eingesetzten Inhibitoren. Sie werden aber heute nur noch als Modellsubstanz bzw. als Antidot angewandt und sind durch besser verträgliche Inhibitoren verdrängt worden.

Für Behandlungen, die zentrale Wirksamkeit erfordern, wie die Demenz-Therapie, haben sich Galantamin, Rivastigmin und Donepezil etabliert. Durch diese Stoffe wird zumindest zeitweilig eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten und Verhaltenssymptome wie Apathie und Halluzinationen erzielt. Quartäre Inhibitoren, wie Pyridostigmin und Neostigmin mit selektiv peripherer Wirkung, werden zur Therapie u.a. bei Myasthenia gravis angewandt.

Die Inhibitoren können nach ihrer Angriffsstelle und Art der Blockade am Enzym eingeteilt werden (siehe Tabelle A-4).

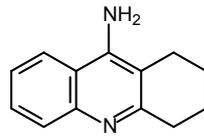
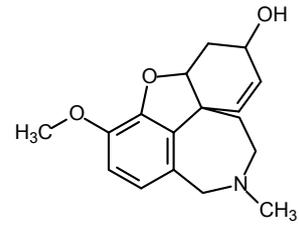
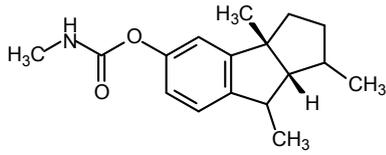
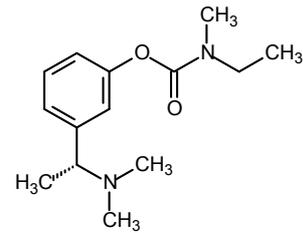
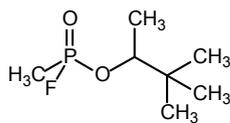
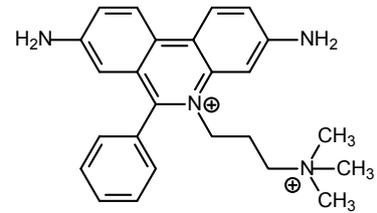
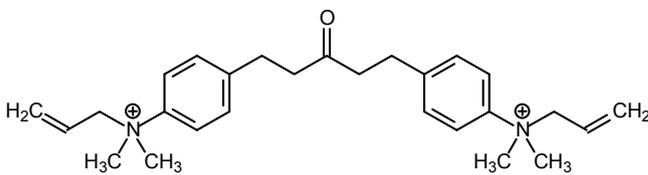
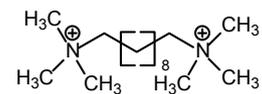
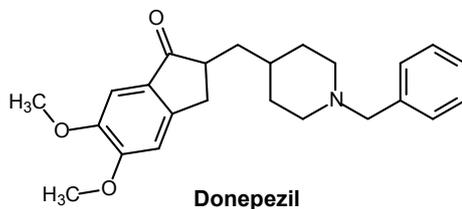
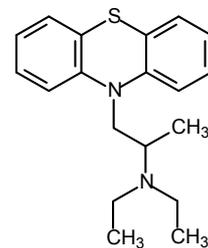
Angriffsstelle	Bindungsart Art der Inhibition	Substanzen
aktives Zentrum	nicht kovalent bindende Inhibitoren reversible Inhibitoren	Tacrin
		Galantamin
		Hyperzin A
	carbamylierende Inhibitoren pseudo-irreversible Inhibitoren	Physostigmin
		Neostigmin
		Pyridostigmin
		Distigmin
		Rivastigmin
	kovalent-bindende Inhibitoren irreversible Inhibitoren	Paraoxon
		Soman
Sarin		
periphere Bindungsstelle der AChE (PAS)	nicht kovalent bindende Inhibitoren reversible Inhibitoren	Propidium
		Gallamin
		Fasciculin
„duale“ Inhibitoren (aktives Zentrum und PAS)	nicht kovalent bindende Inhibitoren reversible Inhibitoren	Decamethonium
		BW284C51
		Donepezil

Tabelle A-4 Einteilung der Inhibitoren [Brufani et al., 2000; Forth et al., 2005]

Einige der genannten Inhibitoren sind in Abb. A-6 dargestellt, und beispielhaft sind in Tabelle A-5 die inhibitorischen Aktivitäten ausgewählter Substanzen aufgeführt.

Tacrin, Galantamin und Hyperzin A sind chemisch nicht verwandte, reversible Cholinesteraseinhibitoren. Sie verändern also nicht das Enzym oder werden hydrolysiert, sondern blockieren nur die Bindungstasche. ACh kann nicht an das Enzym binden und gespalten werden. Sie können kompetitiv von ACh oder anderen Substanzen verdrängt werden. Tacrin ist bereits nanomolar, Galantamin dagegen erst mikromolar wirksam.

Carbamate, wie Pyridostigmin und Rivastigmin, sind sog. pseudo-irreversible Inhibitoren. Sie übertragen ihren Carbaminsäurerest auf das Serin im katalytischen Zentrum. Dieser Ester wird durch Wasser jedoch viel langsamer als der Acylrest des AChs abgespalten. Die langanhaltende Blockade und damit auch Wirkung macht selbst relativ schwach inhibitorisch wirksame Substanzen wie Rivastigmin für die Therapie bedeutsam [Brufani et al., 2000].

**Tacrin****Galantamin****Physostigmin****Rivastigmin****Soman****Propidium****BW284C51****Decamethonium****Donepezil****Ethopropazin***Abb. A-6 Cholinesteraseinhibitoren*

Substanz	AChE IC ₅₀ [nM]	BChE IC ₅₀ [nM]	AChE Selektivität
Tacrin	45 ^a	5 ^a	0,1
Galantamin	600 ^b	8400 ^b	14
Physostigmin	28 ^c	16 ^c	0,6
Rivastigmin	48000 ^c	54000 ^c	1,1
Soman	3 ^d	-	-
Propidium	32300 ^e	13200 ^e	0,4
BW284C51	19 ^c	48000 ^c	2553
Decamthonium	12000 ^f	31000 ^f	2,6
Donepezil	22 ^c	4150 ^c	189
Ethopropazin	260000 ^c	300 ^c	0,001

*Tabelle A-5 Cholinesterase-Inhibitoren und ihre inhibitorische Aktivität an der AChE und BChE; AChE Selektivität [IC₅₀ (BChE) / IC₅₀ (AChE)]^a) gemessen an eeAChE (isoliert aus *Electrophorus electricus*) und equBChE (isoliert aus Pferdeserum), Daten aus [Fang et al., 2008]; ^b) gemessen an eeAChE und equBChE, Daten aus [Schott et al., 2006]; ^c) gemessen an huAChE (human rekombinant gewonnen oder aus humanen Erythrozyten isoliert) und huBChE (human rekombinant gewonnen oder aus humanem Serum isoliert), Daten aus [Giacobini, 2004]; ^d) gemessen an huAChE, Daten aus [Erhard et al., 1993]; ^e) gemessen an huAChE und huBChE, Daten aus [Bolognesi et al., 2005]; ^f) gemessen an FBS-AChE (isoliert aus Rinderserum) und huBChE, Daten aus [Payne et al., 1989]*

Irreversible Inhibitoren wie Paraoxon werden als Insektizide eingesetzt. Beim Menschen eingesetzte irreversible Inhibitoren führen zu einer „endogenen Acetylcholinvergiftung“, die letzten Endes zum Tode führt. Soman und Sarin gehören auch zu dieser Klasse und wurden bereits mißbräuchlich als Nervengift verwendet.

Die PAS-Inhibitoren werden in Abschnitt C.4 (S. 86) besprochen.

Von den „dualen“ Inhibitoren, also denen, die am aktiven Zentrum und der PAS der AChE angreifen, ist insbesondere Donepezil zu nennen. Es gehört zur Klasse der *N*-Benzylpiperidine und zeigt, wie in Tabelle A-5 aufgeführt, eine hohe AChE-Selektivität. Dies könnte in der „dualen“ Bindung der Substanz begründet sein, da der peripheren BChE-Bindungsstelle viele der mit ihr in Wechselwirkung stehenden Aminosäuren der AChE-PAS fehlen.

Ethopropazin (siehe Abb. A-6) gehört zu den BChE-selektiven Verbindungen. Diese werden nicht in der Therapie, sondern zu Forschungszwecken eingesetzt, da mögliche Nebenwirkungen durch die Inhibition auch der peripheren BChE noch nicht ausreichend untersucht sind.

Weitere Forschungsansätze sind seit einigen Jahren die Synthesen bivalenter Verbindungen, um Substanzen in noch potentere Verbindungen zu überführen. Die Überlegung, bivalente Strukturen aus aktiven monovalenten Ausgangssubstanzen wie z.B. Tacrin zu synthetisieren, hatte verschiedene Hintergründe. Bivalente Strukturen können zwei räumlich benachbarte Targets gleichzeitig angreifen, und man erreicht durch große Strukturen weitere Bindungsstellen am Target. Beispielsweise können bivalente Inhibitoren der Acetylcholinesterase ab einer bestimmten Kettenlänge sowohl am esteratischen Zentrum als auch gleichzeitig an der PAS angreifen. Im Falle der Cholinesterasen kann diese Bindung an mehrere Bereiche des Enzyms zu Selektivität bei verwandten Targets führen. Dies hängt mit dem Fehlen einiger für Wechselwirkungen wichtiger Aminosäuren der peripheren BChE-Bindungsstelle im Vergleich zur AChE-PAS zusammen.

Bisher wurden u.a. homobivalente und heterobivalente Verbindungen des Tacrins und homobivalente Verbindungen der Inhibitoren Galantamin und Hyperzin A an den Cholinesterasen untersucht (Zusammenfassung siehe [Holzgrabe et al., 2007]) [Pang et al., 1996]. Alle bivalenten Substanzen zeigten im Vergleich zu den monovalenten Derivaten eine höhere inhibitorische Aktivität gegenüber AChE und z.T. auch gegenüber BChE. Für die Tacrin-Homobivalenten stellte sich die Heptylenkette als idealer Spacer in Bezug auf Aktivität und AChE-Selektivität heraus. Spacer kürzer als fünf Methylengruppen erlauben keine Bindung an PAS und das aktive Zentrum zur gleichen Zeit [Carlier et al., 1999]. Bis-Galantamine, die im Gegensatz zu Tacrin keine sekundären Amine als Spacerverlängerung besitzen, zeigten bei Spacern mit 8 und 10 Methylengruppen bestmögliche Ergebnisse [Holzgrabe et al., 2007]. Im Allgemeinen kann man sagen, daß der optimale Abstand zweier aromatischer Zentren bei 7 oder 8 Atomen liegt.

Welche Eigenschaften sollte ein idealer Cholinesteraseinhibitor zur Therapie dementer Erkrankungen besitzen?

Ein Cholinesteraseinhibitor sollte reversibel sein, eine lange Wirkdauer besitzen und die Blut-Hirn-Schranke leicht überwinden können [Brufani et al., 2000; Giacobini, 2004]. Bei der Frage der Enzymselektivität eines idealen Cholinesterasehemmers findet man in der Literatur widersprüchliche Standpunkte. BChE-Inhibitoren erlangen immer mehr an Bedeutung. Eine Hemmung nicht nur des Esterasezentrums, sondern auch der Proteaseaktivität könnte große Therapievorteile bringen, welche indirekt eine geringere A β -Plaquetbildung zur Folge hätten. Zusätzlich verringert sich, im Gegensatz zu AChE, die Konzentration der BChE im Laufe der Alzheimer'schen Erkrankung nicht. Auf der anderen Seite weiß man jedoch nicht, welche möglichen peripheren und zentralen Nebenwirkungen BChE-selektive Verbindungen zeigen könnten. AChE-Inhibitoren sind dagegen besser untersucht, und die Reduktion der A β -Aggregation durch die PAS-Inhibition ist erwiesen. Aus

diesen Gründen erscheint zur Zeit noch eine Fokussierung auf unselektive Inhibitoren sinnvoll.

A.2 β -Carboline

Carboline, sind Pyridoindole, die je nach der Position des Stickstoffs im Pyridinring in α -, β -, γ - oder δ -Carboline unterteilt werden (siehe Abb. A-7).

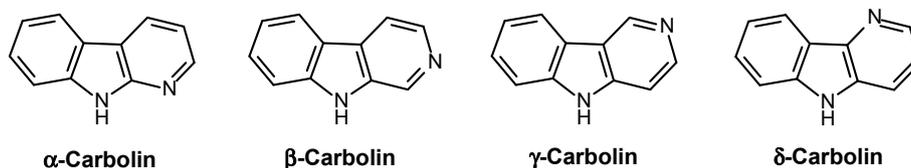


Abb. A-7 Carbolin-Isomere

α -, γ - und δ -Carboline sind weit weniger untersucht als β -Carboline, was in ihrem geringeren Vorkommen in der Natur begründet sein dürfte. Bekannt ist, daß einige α -Carbolin-Derivate eine Antitumorwirkung gezeigt haben [Sennhenn et al., 2006], wohingegen dem γ -Carbolin Dimebon antihistaminerge und nootropische Eigenschaften zugeschrieben werden [Matveeva, 1983; Shevtsova et al., 2005]. Für δ -Carboline sind zur Zeit noch keine pharmakologischen Daten bekannt.

β -Carboline bilden sich endogen aus biogenen Aminen, wie Tryptophan oder Serotonin durch Kondensation mit Aldehyden oder α -Ketosäuren. Diese Reaktion findet in humanen Geweben, hier vorwiegend im Zentralnervensystem, in pflanzlichen und mykotischen Geweben und bei der Nahrungsmittelverarbeitung durch Erhitzen oder Fermentationsprozesse statt. Zudem sind β -Carboline im Tabakrauch zu finden [Drucker et al., 1990; Matsubara et al., 1998; Rommelspacher et al., 2002].

Die vielfältigen Wirkungen der β -Carboline werden schon seit langer Zeit genutzt. So wird beispielsweise die 1-Methyl- β -carbolin-haltige Maracuja in Brasilien als Medikament gegen Spasmen und als Sedativum eingesetzt [Boeira et al., 2001] und verschiedene β -Carbolin-haltige Pflanzen, wie die Liane (*Banisteria caapi*), werden von südamerikanischen Indianerstämmen als Halluzinogen verwendet [Freedland et al., 1999].

In den letzten Jahren konnte besonders im Zentralnervensystem eine Vielzahl von Targets der β -Carboline identifiziert werden. Beispielhaft sind einige in Tabelle A-6 dargestellt.

Die aufgeführten Derivate mit Tetrahydro- β -carbolin-Grundgerüst zeigen meist einen inhibierenden Einfluß auf die Serotonin-, z.T. auch die Noradrenalin- und vereinzelt auf die Dopaminwiederaufnahme, was einen antidepressiven Effekt zur Folge hat.

Dihydro- β -carboline wirken antioxidativ und damit schützend gegenüber oxidativem Streß in der Zelle. Andererseits wurde für diese Verbindungen auch eine Veränderung der Membran-

permeabilität an Mitochondrien gemessen, was sich wiederum negativ auf die Zellüberlebensfähigkeit auswirkt.

Tetrahydro- und Dihydro-Derivate können durch enzymatische Oxidation in vollständig aromatisierte β -Carboline umgewandelt werden und durch *N*-Methyltransferasen in Position 2 und/oder 9 methyliert werden [Drucker et al., 1990; Gearhart et al., 2002]. Nicht-*N*-methylierte β -Carboline, wie Harman und Norharman zeigen einerseits starke inhibitorische Aktivität an der Monoaminoxidase, was einen günstigen Effekt auf die Überlebensfähigkeit von Zellen hat, andererseits fördert im besonderen Norharman apoptotische Vorgänge in der Zelle durch die Stimulation bzw. Inhibition verschiedener Enzyme und Proteine (Phosphoinositol-Phospholipase C, Glucose-regulierendes Protein 78, Triosephosphat-isomerase). In Position 2 methylierte Verbindungen, also quartäre Salze, inhibieren die mitochondriale Atmungskette, führen zu verminderter ATP-Synthese und damit letztendlich zum Zelltod (siehe Abschnitt C.1, S.56). Die permanente Ladung scheint dafür ausschlaggebend zu sein, da das 9-Methyl-Derivat nur geringe zytotoxische Effekte zeigt [Cao et al., 2004]. Die in Position 3 carboxylierten Derivate, wie z.B. β CCM, sind inverse Agonisten am Benzodiazepinrezeptor und zeigen aufgrund dessen Benzodiazepin-antagonistische Effekte.

Die vielfältigen, z.T. gegensätzlichen, Effekte der Verbindungen und deren Auswirkungen auf den Menschen hängen von der Konzentration und dem Vorkommen der Substanzen ab.

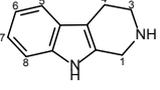
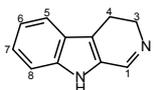
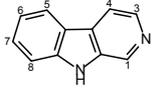
	Substitution (Trivialname)	Eigenschaften
1,2,3,4-Tetrahydro- β -carboline 	(Tryptolin)	inhibiert Noradrenalin- und Serotoninwiederaufnahme [Rommelspacher et al., 1978]
	6-Methoxy (Pinolin)	inhibiert Serotoninwiederaufnahme [Ho et al., 1973; Komulainen et al., 1980] Antioxidanz [Pahkla et al., 1998] stimuliert Insulinsekretion durch Bindung am Imidazolin I ₃ - und Ryanodin-Rezeptor [Squires et al., 2004]
	6-Hydroxy (Plectomin)	inhibiert stark und reversibel die Dopamin-, Noradrenalin- und Serotoninwiederaufnahme [Rommelspacher et al., 1978]
	6-Hydroxy, 1-Methyl (Tetrahydroisoharmol)	hohe Affinität zu Opiatrezeptoren; möglicherweise mit Abhängigkeit und Neuronensterben bei Alkoholmißbrauch verbunden [Wrona et al., 1997]
	6-Methoxy, 1-Methyl (Adrenoglomerulotropin)	starke tranquillisierende Effekte [Zhukov et al., 1983]
3,4-Dihydro- β -carboline 	7-Hydroxy (Harmol) oder 7-Methoxy, 1-Methyl, (Harmalin)	Antioxidanzien verändern die mitochondriale Membranpermeabilität [Park et al., 2003] inhibieren Dopamin-uptake [Drucker et al., 1990]
β -Carboline 	(Norharman)	inhibiert die Monoaminoxidase B [Herraiz et al., 2005; Rommelspacher et al., 2002] stimuliert Phosphoinositol-Phospholipase C; inhibiert Glucose-regulierendes Protein 78 inhibiert Triosephosphatisomerase
	1-Methyl (Harman)	inhibiert die Monoaminoxidase A [Herraiz et al., 2005; Rommelspacher et al., 2002] stimuliert Insulinsekretion durch Bindung am Imidazolin I ₃ - und Ryanodin-Rezeptor [Squires et al., 2004]
	2-Methyl	inhibiert Komplex I der Atmungskette [Sayre et al., 1991] Substrat von N2-Methyltransferasen [Gearhart et al., 2000] inhibiert Acetylcholinesterase [Dekhane et al., 1993]
	9-Methyl	inhibiert stark die Monoaminoxidase [Ho et al., 1970]
	2,9-Dimethyl	inhibiert Komplex I der Atmungskette [Collins et al., 1992]
	3-Carboxymethylester (β CCM)	inverser Agonist am Benzodiazepin-Rezeptor [Glennon et al., 2000] Verbesserung von Gedächtnisleistung [Dekhane et al., 1993]

Tabelle A-6 Eigenschaften der β -Carboline

A.3 Zielstellung der Arbeit

β -Carboline sind im Zusammenhang mit der Alzheimer'schen und der Parkinson'schen Erkrankung eine interessante Naturstoffklasse. Einige von ihnen werden als potentielle Neurotoxine in der Ursachenforschung diskutiert, andere wiederum als potentielle Arzneistoffe betrachtet.

Ziel dieser Arbeit war es, neuartige Derivate dieser Substanzklasse zu synthetisieren und auf ihre neurotoxischen, neuroprotektiven und möglicherweise kognitionsfördernden Eigenschaften hin zu untersuchen, um zu erkennen, welche Moleküleigenschaften für die positiven bzw. negativen Effekte verantwortlich sein könnten. Dadurch soll es in Zukunft leichter möglich sein, Derivate mit überwiegend positiven, neuroprotektiven oder kognitionsfördernden Effekten zu entwickeln.

In dieser Arbeit sollte speziell der Einfluß der Syntheseprodukte auf die Cholinesterasen und den NMDA-Rezeptor untersucht werden. Ebenso sollten eine Dopamintransporter (DAT)-abhängige und DAT-unabhängige Neurotoxizität aber auch mögliche neuroprotektive Effekte bestimmt werden.

Nachfolgend seien die Ziele der Arbeit detailliert aufgeführt.

Ziele zum Thema Neurotoxizität und Neuroprotektion

1) *Synthese eines enantiomerenreinen 1,2,2-Trimethyltetrahydro- β -carbolinium-Salzes (**R2** oder **S2**)*

Bereits in früheren Arbeiten unseres Arbeitskreises wurden β -Carboline synthetisiert und aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu dem neurotoxischen MPP⁺ (siehe Abb. A-8) auf Toxizität an dopaminergen Neuronen untersucht.

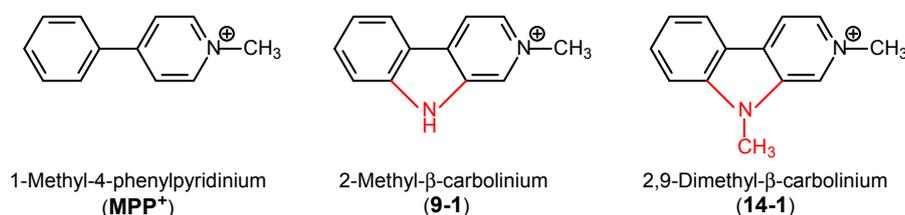


Abb. A-8 MPP⁺ und strukturverwandte β -Carboline

Auffällig bei diesen Untersuchungen war die chirale Verbindung 1,2,2-Trimethyltetrahydro- β -carbolin (**rac2**) (siehe Abb. A-9). Für weitere Tests sollte ein enantiomerenreines Derivat **R2** oder **S2** synthetisiert werden.

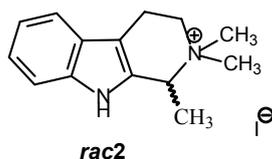


Abb. A-9 *rac*-1,2,2-Trimethyltetrahydro- β -carbolinium (**rac2**)

2) Synthese von *N*9-monovalenten β -Carbolinen (**13**)

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ergab sich ebenfalls aus den früheren Neurotoxizitätsuntersuchungen. Es hatte sich gezeigt, daß 9-Methyl- β -carbolin (**13-1**) (siehe Abb. A-10) nicht nur geringe neurotoxische Eigenschaften besitzt, sondern sogar überraschenderweise neuroprotektiv wirkt [Hamann et al., 2008].

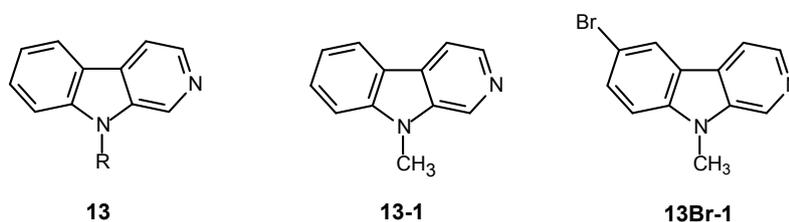


Abb. A-10 *N*9-monovalente β -Carboline **13** ($R = C_2H_5, C_3H_7, C_2H_4F$), 9-Methyl- β -carbolin (**13-1**), 6-Bromo-9-methyl- β -carbolin (**13Br-1**)

Um diese Neuroprotektion eingehender zu untersuchen, sollte **13-1** nicht nur resynthetisiert werden, sondern auch weitere 9-substituierte β -Carboline des Typs **13** dargestellt und auf neurotoxische und neuroprotektive Eigenschaften hin untersucht werden (siehe Abb. A-10). Für eine spätere radioaktive Markierung durch Halogen-Tritium-Austausch sollte schließlich **13-1** in Position 6 bromiert werden (siehe Abb. A-10).

3) Synthese von potentiell neurotoxischen, *N*2,*N*9-disubstituierten, monovalenten β -Carbolinen (**14**)

β -Carboline können im Zentralnervensystem durch *N*-Methyltransferasen an *N*2 methyliert und dadurch in neurotoxische, quartäre Verbindungen überführt werden [Gearhart et al., 2002]. Daraus ergab sich als weiteres Ziel die Quartärnisierung der Vorstufen **13** zu **14** (siehe Abb. A-11).

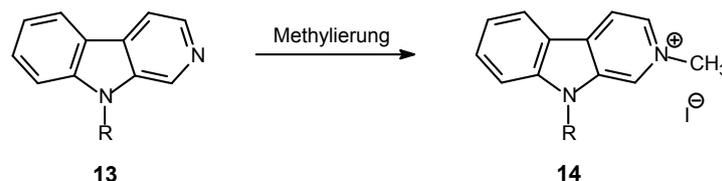


Abb. A-11 N2,N9-disubstituierte monovalente β -Carboline (**14**) ($R=C_2H_5, C_3H_7$)

4) Untersuchungen auf Neurotoxizität und Neuroprotektion

Die neurotoxischen und neuroprotektiven Effekte der Testsubstanzen, sollten durch unsere Kooperationspartner Frau Dr. Catrin Wernicke und Herrn Prof. Hans Rommelspacher an der Charité Berlin untersucht werden.

Ziele zum Thema inhibitorische Aktivität an der AChE und BChE

5) Synthese von N2- und N9-bivalenten β -Carbolinen (**5, 10**)

Bereits früher wurden β -Carboline im Ellman-Test auf ihre Cholinesteraseinhibition untersucht. Dabei waren einige Substanzen im Vergleich zu Galantamin äquipotent, im Vergleich zum Tacrin zeigten sie eine schwächere inhibitorische Aktivität (siehe Tabelle A-7) [Schott et al., 2006].

Name	Strukturformel	AChE IC ₅₀	BChE IC ₅₀	AChE Selektivität
Galantamin		600 nM ^a	8400 nM ^a	14
9MMeO-1		800 nM ^a	1200 nM ^a	1,5
Tacrin		45 nM ^b	5 nM ^b	0,1

Tabelle A-7 Cholinesteraseinhibitoren deren IC₅₀-Werte und AChE Selektivität ($[IC_{50} (BChE) / IC_{50} (AChE)]$ ^a)
 Daten aus [Schott et al., 2006]; ^b) Daten aus [Fang et al., 2008]

Da sich β -Carboline als potente Cholinesterasehemmer erwiesen haben, sollte nun die Strategie des „bivalent ligand approach“, die Verknüpfung von zwei Pharmakophoren, auf sie angewendet werden. Bereits früher wurde diese Strategie erfolgreich auf die Cholinesterasehemmer übertragen. Von Pang et al. wurde die Synthese von homobivalenten Tacrin-Derivaten (siehe Abb. A-12) beschrieben, deren inhibitorische Aktivität die des Tacrins an der AChE um den Faktor 1000 übersteigt [Pang et al., 1996].

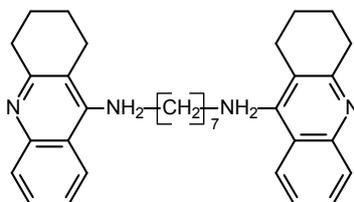


Abb. A-12 homobivalentes Tacrin

Folglich ergab sich ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Darstellung neuer homobivalenter β -Carboline. Es ergaben sich die beiden in Abb. A-13 dargestellten Grundstrukturen **5** und **10**. Weiterhin sollte **10** durch Quartärnisierung zu **11** umgesetzt werden.

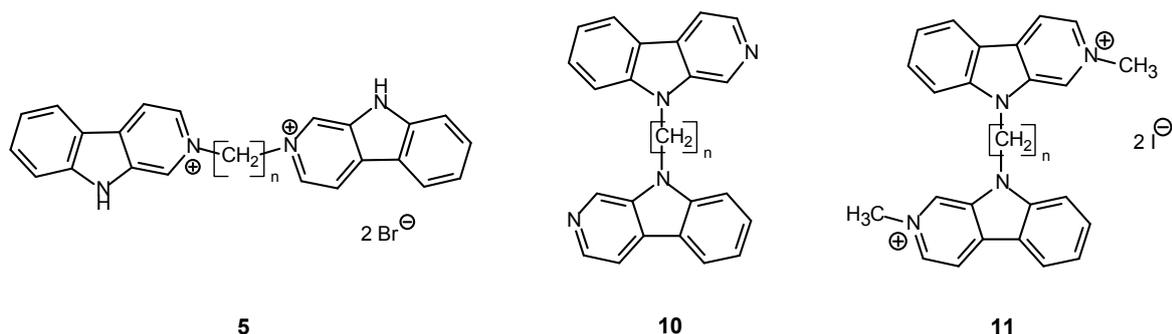


Abb. A-13 Grundstrukturen der homobivalenten β -Carboline (**5**, **10**, **11**)

6) Synthese von N2-monovalenten β -Carbolenen (**9**)

Um die pharmakologischen Ergebnisse der bivalenten Verbindungen bestmöglich mit den Eigenschaften der entsprechenden monovalenten Grundstrukturen **9** und **13** (siehe Abb. A-14) vergleichen zu können, sollten beispielhaft einige dieser monovalenten Derivate synthetisiert werden. Die Derivate **13** sind bereits unter Punkt 2 (siehe S. 23) aufgeführt.

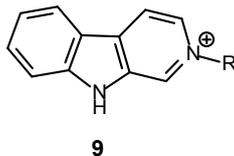


Abb. A-14 Grundstrukturen der monovalenten β -Carboline **9** ($R=CH_3, C_2H_5, C_3H_7, C_8H_{17}, C_2H_4OH$)

7) *Synthese von partiell reduzierten homobivalenten β -Carbolinen (8, 12)*

Die quartären Strukturen **5** und **11** sollten zu den jeweiligen Tetrahydro-Derivaten **8** und **12** reduziert werden (siehe Abb. A-15), zum Einen, um dem Tacrin ähnliche Strukturen zu synthetisieren (siehe Tabelle A-7) und zum Anderen, um die Membrangängigkeit der Verbindungen zu erhöhen.

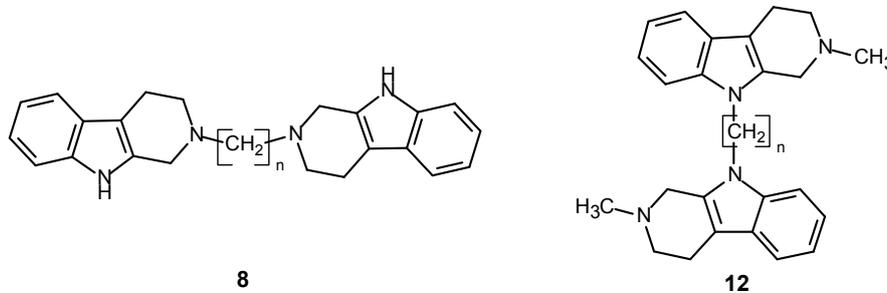


Abb. A-15 Grundstruktur der reduzierten homobivalenten β -Carboline (**8,12**)

8) *Untersuchung der inhibitorischen Aktivität an der AChE und BChE*

Alle Derivate sollten auf ihre inhibitorische Aktivität an der AChE und BChE in einem in vitro Enzymassay (Ellman-Test) untersucht werden, um Änderungen der Aktivität und Selektivität mit strukturellen Merkmalen zu vergleichen.

Ziele weiterer pharmakologischer Charakterisierungen

9) *Bestimmung der antagonistischen Wirkung am NMDA-Rezeptor*

NMDA-Rezeptoren sind Bestandteil des glutamatergen Systems. Störungen in diesem System spielen eine Rolle bei der Alzheimer'schen Erkrankung und können zu Funktionseinschränkungen bis hin zur Exzitotoxizität führen. NMDA-Rezeptor-Antagonisten, wie z.B. Memantin, gleichen diese Störungen aus, und physiologische Signale, z.B. von kognitiven Prozessen, können wieder weitergeleitet werden.

Die eventuelle inhibitorische Aktivität der Zielverbindungen am NMDA-Rezeptor sollte am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der FSU Jena von Kai-Uwe Schmidtke und Heidemarie Graf aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Thomas Winckler bestimmt werden.

10) *Etablierung eines Assays zur Untersuchung der AChE induzierten β -Aggregation*

Ein weiteres Ziel war die Etablierung eines Assay, in dem die zweite nicht-esteratische Bindungsstelle der Acetylcholinesterase, die sog. „peripheric anionic site“ (PAS), und deren induzierender Einfluß auf die β -Amyloid-Aggregation untersucht werden sollte. Die synthetisierten β -Carboline sollten auch hier auf die AChE-inhibitorische Aktivität und die damit verbundene reduzierte β -Amyloid-Aggregation untersucht werden.

B Synthetischer Teil

Es wurden 40 Zielverbindungen synthetisiert, deren Struktur und Reinheit durch NMR- und IR-Spektroskopie, Schmelzpunkt und Elementaranalyse oder hochauflösende Massenspektroskopie abgesichert wurden.

Die Zielverbindungen werden nach folgendem Schema numeriert:

Die erste Zahl beschreibt das Grundgerüst und Zusätze, dazu eventuelle Substituenten am Grundgerüst (in Abb. B-1 beschreibt „5“ das Grundgerüst und „OH“ die Substitution). Die zweite Zahl beschreibt die Anzahl der Kohlenstoffatome in der Alkylkette am β -Carbolin bzw. die Anzahl der Methylengruppen des Spacers bei bivalenten Verbindungen. Im gewählten Beispiel besitzt der Spacer fünf Methylengruppen und dementsprechend eine „5“ hinter dem Bindestrich. Ein Zusatz beschreibt auch hier eventuelle Substitutionen, wie z.B. eine Hydroxygruppe am Kettenende, die mit „OH“ hinter der Kettenlänge angegeben wird.

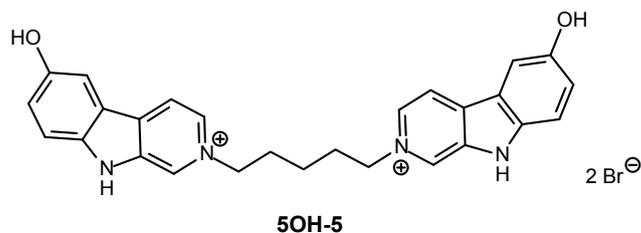


Abb. B-1 Nummerierung der Zielverbindungen am Beispiel von **5OH-5**

Das trizyklische Ringsystem der β -Carboline wird auch als 9H-Pyrido[3,4-b]indol bezeichnet. Da es sich immer um dasselbe Grundgerüst handelt, wird im Folgenden zur Vereinfachung nur der Trivialname β -Carboline genutzt. Die verschiedenen Grundstrukturen werden nach der Position ihrer Substitution/Verknüpfung benannt (siehe Abb. B-2):

- monovalente oder bivalente Verbindungen mit Substitution/Verknüpfung an/über N2 als N2-monovalente oder – bivalente β -Carboline
- monovalente oder bivalente Verbindungen mit Substitution/Verknüpfung an/über N9 als N9-monovalente oder – bivalente β -Carboline

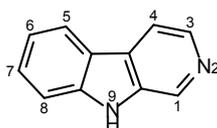


Abb. B-2 Bezifferung des β -Carbolin-Grundgerüstes

Die Gegenionen von quartären Verbindungen werden zur besseren Übersicht im Kapitel B nicht aufgeführt.

B.1 Synthese von 1S- und 1R-1,2,2-Trimethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-2-ium

Wie in A.3 dargestellt, war das erste Ziel dieser Arbeit die Darstellung von 1S- und 1R-1,2,2-Trimethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-2-ium (**2**). Dazu sollte zuerst die Vorstufe *rac*-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (**rac1**) synthetisiert, in ihre Enantiomere getrennt und anschließend zu 1,2,2-Trimethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-2-ium (**2**) dimethyliert werden.

B.1.1 Literaturbekanntes

1S- und 1R-1,2,2-Trimethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-2-ium (**2**)

Die Darstellung beider Enantiomere wurde von Milen et al. beschrieben. Dabei wurde 1-Methyl-3,4-dihydro- β -carbolin mit chiralen Sulfinyl-Derivaten an der Methylgruppe in Position 1 acyliert und anschließend zu dem 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin-Derivat reduziert. Die Trennung der entstandenen Diastereomere erfolgte über Normalphasen-Chromatographie. Abschließend wurde der Sulfinyl-Rest abgespalten und 1S- und 1R-1,2,2-Trimethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (**S2** und **R2**) erhalten [Milen et al., 2004].

S- und R-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-2-ium (**S1**, **R1**)

In der Literatur werden für die Darstellung von enantiomerenreinem 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (**S1**, **R1**) stereoselektive Synthesen beschrieben.

Akimoto et al. setzten *L*-Tryptophan als Ausgangsmaterial ein, welches beim Ringschluß mit Acetaldehyd enantiomerenreines S-(-)-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (**S1**) ergab [Akimoto et al., 1974].

Die Synthese von **S1** wurde auch durch asymmetrische Reduktion von 1-Methyl-3,4-dihydro- β -carbolin mit chiralem Natriumacyloxoborhydriden erreicht [Yamada et al., 1983].

Lee et al. beschrieben die Synthese von **R1** durch *Michael-Addition* von Tryptamin mit chiralem Acetylsulfoxid und anschließender saurer Cyclisierung und Reduktion mit Raney-Nickel [Lee et al., 1994].

Alle genannten Synthesen erfordern die aufwendige Darstellung chiraler Vorstufen und deren analytische Struktursicherung. Deshalb wurde zunächst die Trennung über die Bildung diastereomerer Salze versucht. Dazu wurde zuerst die Vorstufe *rac*-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (**rac1**) synthetisiert (siehe Abb. B-5).

rac-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (**rac1**)

Die Synthese des teilhydrierten β -Carbolin-Grundgerüsts kann über eine *Bischler-Napieralski-Reaktion* oder eine *Pictet-Spengler-Kondensation* erfolgen.

Die *Bischler-Napieralski-Reaktion* beschreibt ursprünglich die Synthese von 3,4-Dihydroisochinolin (**17**) aus Phenylethylamiden (**15**). Diese werden bei hohen

Temperaturen mit geeigneten Kondensationsmitteln wie Phosphorylchlorid zu 3,4-Dihydroisochinolin (17) umgesetzt (siehe Abb. B-3) [Bischler et al., 1893].

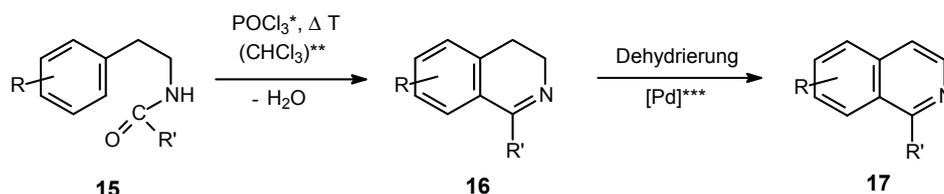


Abb. B-3 Bischler-Napieralski-Synthese von Isochinolinen [Bischler et al., 1893]

$R = \text{H}, \text{OAlk}, \text{Alk}$; $R^* = \text{Alk}, \text{Ar}$ * $\text{P}_2\text{O}_5, \text{PCl}_5, \text{ZnCl}_2, \text{Polyphosphorsäure}$; ** $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$, inerte Lösungsmittel; *** $\text{PdCl}_2, (\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}, [\text{Pt}], \text{KMnO}_4$

Durch Verwendung von Tryptamiden anstelle von Phenylethylaminen entstehen unter gleichen Bedingungen 3,4-Dihydro- β -carboline [Mahboobi et al., 1995]. Die Literaturausbeuten betragen dabei maximal 60%.

Von Pictet und Spengler wurde die Synthese von Tetrahydroisochinolin (20) aus Phenylethylaminen (18) und Aldehyden im stark sauren Milieu über Schiff'sche Basen als Zwischenstufen (19) beschrieben [Pictet et al., 1911].

Auch diese Synthese wurde durch zahlreiche Variationen der Reaktionsbedingungen optimiert und weiter entwickelt (siehe Abb. B-4) [Whaley et al., 1951].

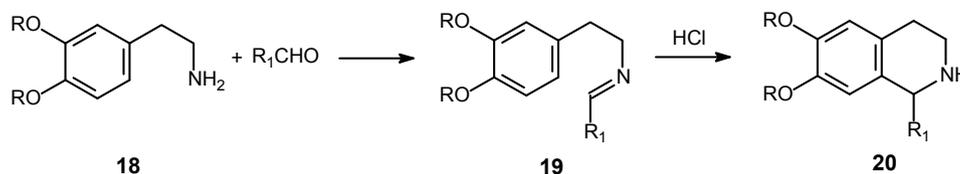


Abb. B-4 Pictet-Spengler-Synthese von Isochinolinen [Whaley et al., 1951]

B.1.2 Synthese von *rac*-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (*rac*1)

Nach Bobbitt und Willis wurde Tryptamin (21) mit Brenztraubensäure in einer *Pictet-Spengler-Kondensation* umgesetzt (siehe Abb. B-5) [Bobbitt et al., 1980].

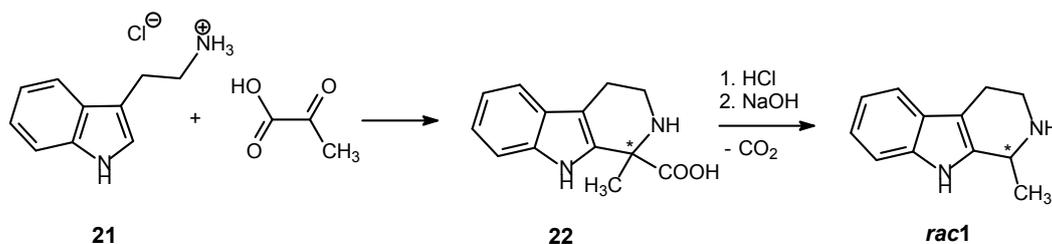


Abb. B-5 Darstellung von *rac*-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (*rac*1)

Die Brenztraubensäure wurde zusammen mit Tryptamin (**21**) in einer Wasser-Methanol-Mischung gerührt, wobei 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-1-carbonsäure (**22**) ausfiel. Das abfiltrierte Zwischenprodukt **22** wurde in heißem Wasser gelöst, durch Zugabe von Salzsäure decarboxyliert und dann die racemische Base **rac1** mit Natriumhydroxid ausgefällt [Bobbitt et al., 1980]. Diese Reaktion lieferte bei milden Bedingungen Ausbeuten von 80%. Das $^1\text{H-NMR}$ von **rac1** zeigte bei 1,3 ppm das Signal der Methylprotonen mit der Integration von 3H. Durch die Kopplung zum Proton in Position 1 erschienen sie als Dublett mit einer vizinalen Kopplungskonstante von 6,7 Hz, welche auch im Quartett des H1-Signals bei 4,0 ppm gefunden wurde. Durch den Einfluß des chiralen Zentrums in Position 1 erschienen die zwei dazu meta-ständigen Protonen in Position 3 als Multipletts. $^{13}\text{C-NMR}$ sind neben den 8 Signalen der aromatischen Kohlenstoffatome 3 aliphatische Ring-Kohlenstoffe und das Signal der Methylgruppe zu sehen (siehe Abb. B-6 a und b).

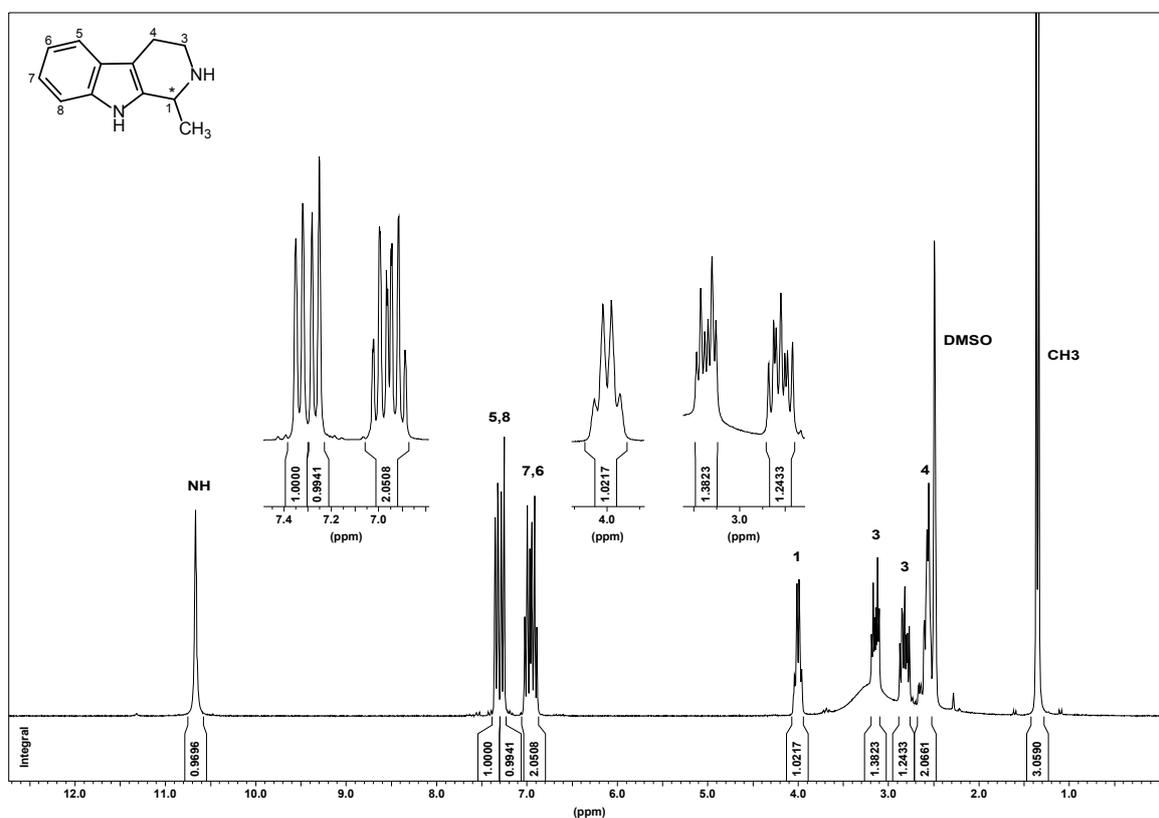
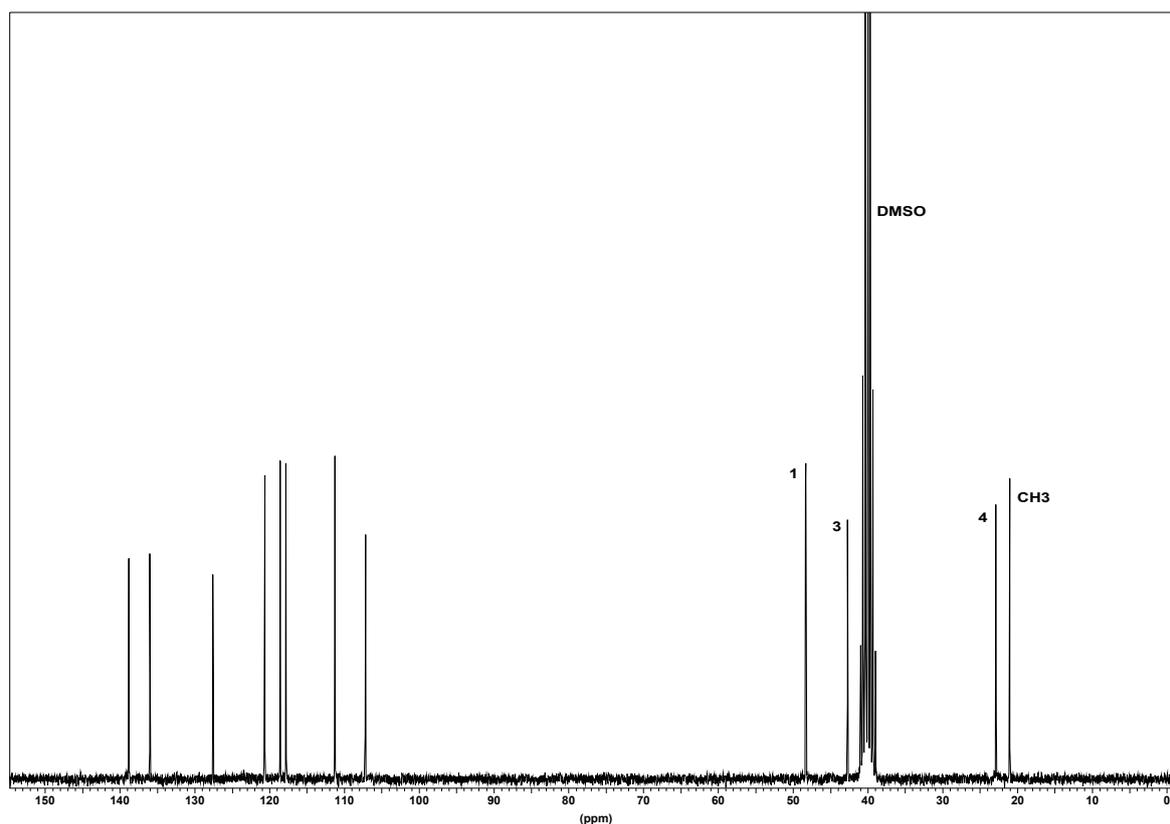


Abb. B-6 a) $^1\text{H-NMR}$ von *rac*-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (**rac1**) ($[\text{D}_6]\text{-DMSO}$)(oben) und b) $^{13}\text{C-NMR}$ **rac1** ($[\text{D}_6]\text{-DMSO}$)(unten)



B.1.3 Racemattrennung von *rac*-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (*rac*1)

Das synthetisierte Racemat (*rac*1) sollte nun in die Enantiomere (*R*1 und *S*1) aufgetrennt werden. Zunächst mußte eine analytische HPLC-Methode entwickelt werden, bei der die Enantiomere getrennt identifiziert und das Verhältnis von beiden quantifiziert werden konnte. Dazu wurden an einer chiralen HPLC-Säule (Chiracel[®] OD) verschiedene Hexan-Alkohol-Mischungen und Mischungsverhältnisse untersucht und dabei jeweils die Flußrate und die Temperatur variiert. n-Hexan mit 10% 2-Propanol stellte sich als beste Mischung für die Auftrennung heraus, allerdings zeigte sich keine Basislinientrennung (siehe Abb. B-7 oben). Diese wurde durch Zusatz von 0,1% Diethylamin erreicht (siehe Abb. B-7 unten).

Methode:

Mobile Phase: n-Hexan /2-Propanol (90/10) mit 0,1% Diethylamin
Stationäre Phase: Chiracel[®] OD Cellulose-(tris-(3,5-dimethylphenylcarbammat))
Flußrate: 1,0 ml/min
Säulentemperatur: 25°C
Detektor: UV-Vis-Detektor, Meßwellenlänge 230 nm

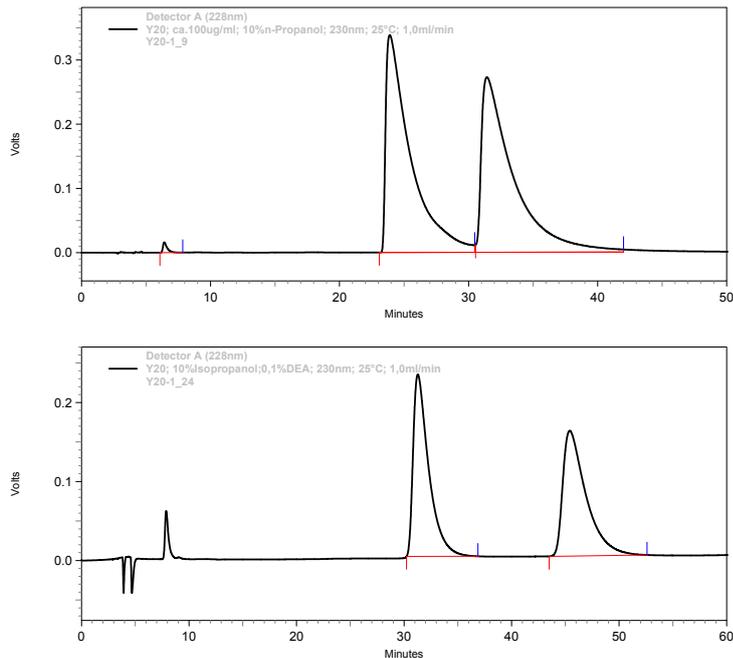


Abb. B-7 Chromatogramme von *rac*-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (**rac1**) mit *n*-Hexan/2-Propanol (90/10) (oben) und *n*-Hexan/2-Propanol (90/10) mit 0,1% Diethylamin (unten)

Die präparative Trennung des basischen Racemats (**rac1**) wurde über die Bildung diastereomerer Salze mit folgenden chiralen Säuren und deren Kombination versucht (siehe Tabelle B-1):

- I (2*R*,3*R*)-(-)-Di-O-benzoylweinsäure-Monohydrat
- II *R,R*-(-)-O,O-Dianisoylweinsäure und *S,S*-(+)-O,O-Dianisoylweinsäure
- III (2*R*,3*R*)-(-)-Di-O-4-toluyl-*L*-weinsäure
- IV *L*-(+)-Weinsäure
- V (-)-Campher-10-sulfonsäure
- T_a III und II (2:1)
- T_b I, II, III (1:1:1)
- T_c II und III (2:1)

R,R-(-)-O,O-Dianisoylweinsäure und *S,S*-(+)-O,O-Dianisoylweinsäure wurden von Dr. Johannes Wange synthetisiert. [Wange, 2005]

Das basische Racemat und die jeweilige chirale Säure wurden zusammen in dem jeweils angegebenen Lösungsmittel in der Hitze gelöst und filtriert. Die Lösung wurde stehengelassen, eventuell gekühlt, bis Kristallbildung einsetzte. Die Kristalle wurden abfiltriert, gewaschen und mit verdünnter Natriumhydroxid-Lösung versetzt. Die erhaltene Base wurde mit organischen Lösungsmitteln extrahiert. Anschließend wurde die Probe HPLC-analytisch nach oben beschriebener Methode untersucht.

Versuch	Racemat [mmol]	chirale Säure/n [mmol]		Lösungsmittel [ml]	erhaltenes Enantiomerenverhältnis
1	1,00	IV	1,00	Methanol 40	50:50
2	2,68	I	1,47	Ethanol 20	50:50
3	1,00	I	0,50	Ethanol 60	keine Kristallbildung
4	1,00	T _b	1,00	Ethanol 75	60:40
5	0,50	I	0,50	2-Propanol 50	keine Kristallbildung
6	0,50	R-II	0,50	Ethanol 25	70:30
7	0,50	III	0,50	Ethanol 20	65:35
8	0,50	III	0,25	Ethanol 25	60:40
9	0,50	III	0,25	2-Propanol 35	55:45
10	0,25	T _a	0,25	Ethanol 15	67:33
11	0,25	T _c	0,25	Ethanol 10	64:36
12	0,25	R-II	0,12	Ethanol 25	36:64
13	0,25	R-II	0,25	Ethanol 25	35:65
14	0,25	R-II	0,50	Ethanol 30	keine Kristallbildung
15	0,25	V	0,13	Ethanol 12	52:48
16	0,25	V	0,25	Ethanol 12	52:48
17	0,25	V	0,25	Methanol 10	51:49
18	0,54	I	0,28	Ethanol 3	45:55

Tabelle B-1 Diastereomerenbildung unter verschiedenen Bedingungen

Versuch 6 und 10 schienen am erfolversprechendsten und wurden deshalb im größeren Maßstab wiederholt. Dabei wurde die Lösungsmittelmenge verringert, um eine größere Ausbeute zu erhalten. In Versuch 19 hatte dies auch einen positiven Effekt auf das auskristallisierte Diastereomeren- und damit Enantiomerenverhältnis, jedoch nicht auf die Ausbeute. Bei Versuch 20 war zwar die Ausbeute gut, allerdings zu ungunsten des Enantiomerenverhältnisses (siehe Tabelle B-2).

Versuch	Racemat [mmol]	chirale Säure/n [mmol]		Lösungsmittel [ml]	Enantiomerenverhältnis / Ausbeute
19	5,00	S-II	5,00	Ethanol 50	20:80 / 5 mg
20	5,00	T _a	5,00	Ethanol 50	58:42 / 580 mg

Tabelle B-2 Diastereomerenbildung unter verschiedenen Bedingungen

Da die Versuche zeigten, daß eine Racemattrennung auf diesem Weg viel Aufwand mit nur geringen Ausbeuten bedeuten, wurde nach Alternativen gesucht. Es bot sich die im Haus befindliche präparative Chiracel® OD-Säule an.

Die bereits ermittelte Methode der analytischen Untersuchungen mußte nun anhand der Erkenntnisse früherer Arbeiten [Wange, 2005] für den präparativen Ansatz in Hinblick auf maximale Selektivität und Säulenbeladung sowie minimale Laufzeit optimiert werden. Die Säulentemperatur wurde auf 30°C gesteigert und die Flußrate wurde auf 1,3 ml/min erhöht, was jeweils zu schmaleren, früher eluierten Peaks führte. Für die Übertragung der Flußrate auf den präparativen Maßstab wurde der empirisch gefundene Faktor 150 eingesetzt, der in der präparativen Trennung zu vergleichbaren Retentionszeiten führen sollte. Zur Ermittlung der maximalen Säulenbeladung wurde der Substanzauftrag auf die analytische Säule schrittweise so weit erhöht, bis im Chromatogramm eine Basislinientrennung gerade noch zu verzeichnen war. Diese Substanzmenge ergab mit dem säulenspezifischen Faktor 250 multipliziert die Säulenbeladung für eine erste sichere präparative Trennung. Die endgültige Optimierung der Trennbedingungen konnte aber erfahrungsgemäß erst im präparativen Maßstab erfolgen, da es durch die stark vergrößerten Säulendimensionen zu Verschiebungen der Retentionszeiten und durch die verdoppelte mittlere Partikelgröße der stationären Phase immer zu einer Verschlechterung der Trennleistung durch Peakverbreiterung kam.

Eine Probetrennung wurde bei einer Säulentemperatur von 30°C mit 75 mg Substanz bei einer Flußrate von 220 ml/min durchgeführt. Da die Peaks im Chromatogramm basisliniengetrennt waren, wurde der Substanzauftrag auf 100 mg erhöht. Die oben angesprochene Peakverbreiterung machte sich hier durch große Übergangsfractionen bereits bemerkbar. Deshalb wurde, um dem entgegen zu wirken, die Temperatur auf 37°C erhöht und die Flußrate auf 260 ml/min eingestellt. Hieraus resultierten nun auch schärfere Peaks bei verkürzter Laufzeit (siehe Abb. B-8 oben). Unter diesen Bedingungen folgten zwei weitere Läufe, wobei die gesammelten Mischfraktionen im letzten Lauf aufgetragen wurden. Die Gesamtlaufzeit eines Laufes betrug 30 min. Die gesammelten Fraktionen wurden auf Enantiomerenreinheit geprüft, Fraktionen gleicher Reinheit vereinigt und unter vollständiger Rückgewinnung der mobilen Phase eingeeengt. Es wurde aber nicht wie erwartet ein Feststoff, sondern ein Öl erhalten. Das ¹H-NMR wies eine Anreicherung von Diethylamin

aus, das auch nach verschiedenen Umkristallisationsversuchen und Trocknung unter verschiedenen Bedingungen (Diethylamin besitzt einen Siedepunkt von 55°C) nicht vollständig zu entfernen war. Daraufhin wurde die präparative Trennung ohne Diethylamin-Zusatz wiederholt, woraus eine schlechtere Auflösung (siehe Abb. B-8 (unten)) und größere Übergangsfractionen resultierten. Eine Trennung war dennoch möglich. Die Übergangsfractionen wurden ein weiteres Mal präparativ getrennt und so wurden letztendlich Fractionen gesammelt und wie oben beschrieben aufgearbeitet.

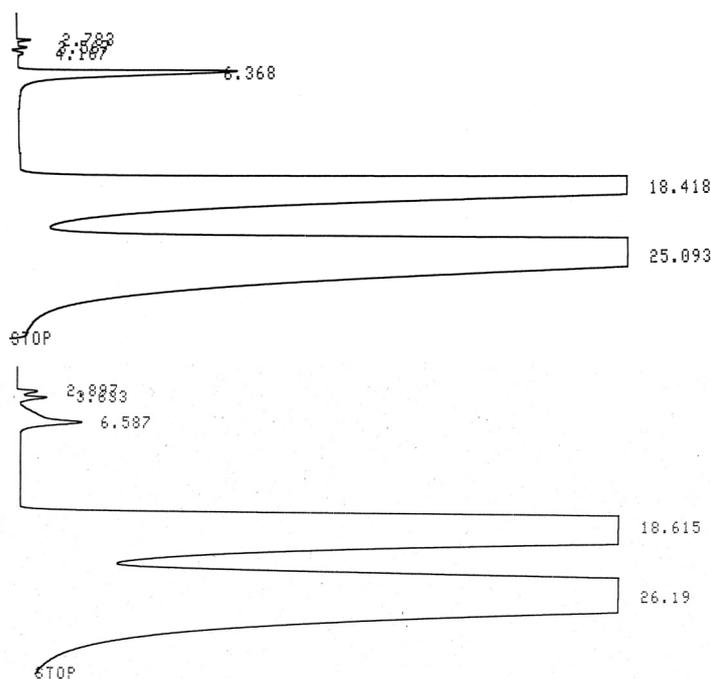


Abb. B-8 Chromatogramme der präparativen Trennung von *rac*-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline (*rac*1) mit *n*-Hexan /2-Propanol (90/10) mit 0,1% Diethylamin (oben) und *n*-Hexan /2-Propanol (90/10) (unten)

Die HPLC-analytischen Untersuchungen ergaben, daß die gesammelten Fractionen der Enantiomere 96 bis 100% Enantiomerenreinheit (ee) besaßen (siehe Abb. B-9). Anschließend wurden deren Drehwerte bestimmt und konnten nach Literaturdaten den Enantiomeren „R“ und „S“ zugeordnet werden.

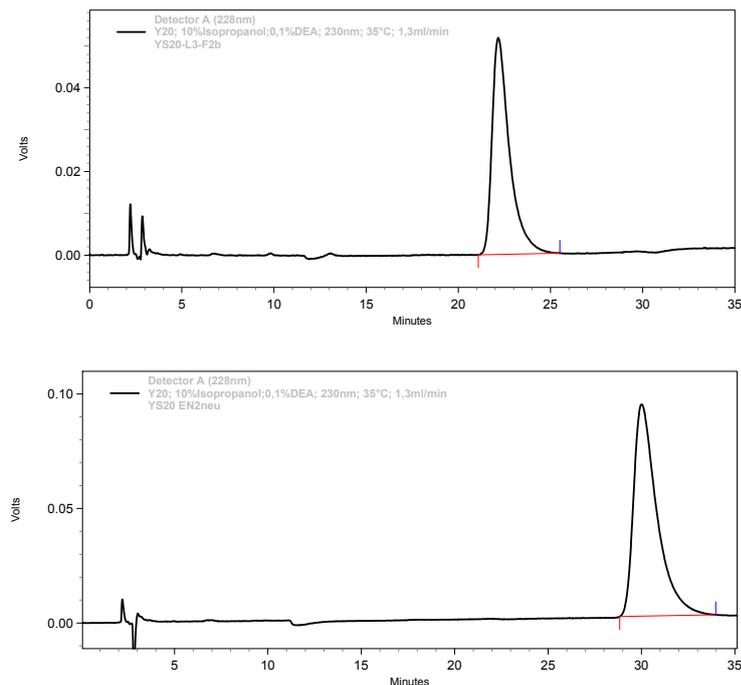


Abb. B-9 Chromatogramme der vereinigten enantiomerenreinen Fraktionen der präparativen Trennung von *rac*-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (*rac*1) mit *n*-Hexan /2-Propanol (90/10) mit 0,1% Diethylamin

B.1.4 Synthese der *rac*- und 1*R*-1,2,2-Trimethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-2-ium-Salze (*rac*2, *R*2)

Die Enantiomere sollten nun, nach erfolgreichen Vorversuchen mit dem Racemat, dimethyliert werden. Die Dimethylierung von 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin gelang bereits früher im Arbeitskreis durch Zugabe von Diisopropylethylamin (Hünig-Base) im Überschuß zum eingesetzten Edukt und Methyljodid in Acetonitril.

Nun wurde *rac*1 mit Hünig-Base im Verhältnis 2:1 vorgelegt und mit Methyljodid im Überschuß in Acetonitril umgesetzt. Mit 10%iger Ausbeute wurde das gewünscht Produkt erhalten.

Da die Hünig-Base als „nicht methylierbar“ galt, wurde der Ansatz wiederholt, dazu aber die doppelte Menge an Hünig-Base zugegeben, um die Ausbeute zu erhöhen. Das $^1\text{H-NMR}$ zeigte daraufhin methylierte Hünig-Base (Diisopropylethylmethylammoniumjodid) und das gewünschte Produkt im Verhältnis von ca. 60:1. Methylierte Hünig-Base war durch Umkristallisation nicht vom Produkt zu trennen.

Deshalb wurde die Reaktion nun ohne Hilfsbase versucht, wobei in Acetonitril kein quartäres Produkt ausfiel und auch laut DC kein Umsatz stattgefunden hatte. Anschließend wurde, wie von Barger et al. beschrieben, Kaliumcarbonat als Base zugesetzt, aber auch hier war keine Umsetzung zu erkennen [Barger et al., 1938].

Die Methylierung von 0,02 mmol 1*R*-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (**R1**) mit 0,02 mmol Hünig-Basis und 0,04 mmol Methyljodid führte mit einer 40%igen Ausbeute zum gewünschten reinen Produkt (siehe Abb. B-10). Diese Reaktion konnte nicht auf das *S*-Enantiomer (**S1**) übertragen werden.

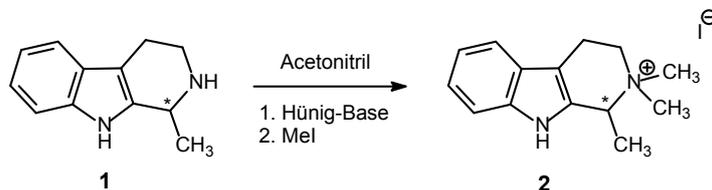


Abb. B-10 Synthese von 1,2,2-Trimethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboliniumiodid (**2**)

Im $^1\text{H-NMR}$ sind die beiden Methylgruppen am Stickstoff als Singulets bei 3,1 und 3,3 ppm zu erkennen. Weiterhin sind durch den quartärnierten Stickstoff in Position 2 die vizinalen Protonen H1 und H3 um ca. 1 ppm ins Tieffeld verschoben (siehe Abb. B-11).

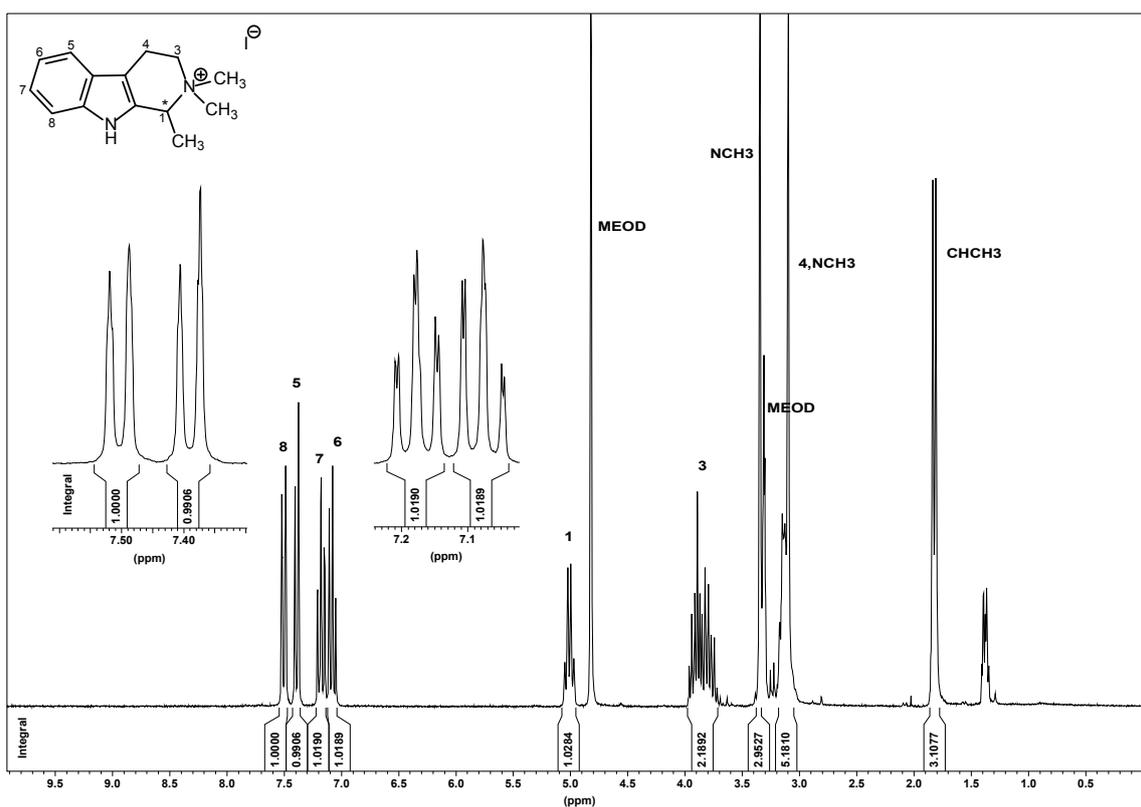


Abb. B-11 $^1\text{H-NMR}$ von 1*R*-1,2,2-Trimethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-2-iumiodid (**R2**) (MeOD)

Zusätzlich zu den Signalen des 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolins (*rac1*) erscheinen im ^{13}C -NMR 2 Signale bei 44 und 50 ppm, die durch das DEPT-Spektrum eindeutig den zwei eingeführten Methylgruppen zugeordnet werden konnten (siehe Abb. B-12 a und b).

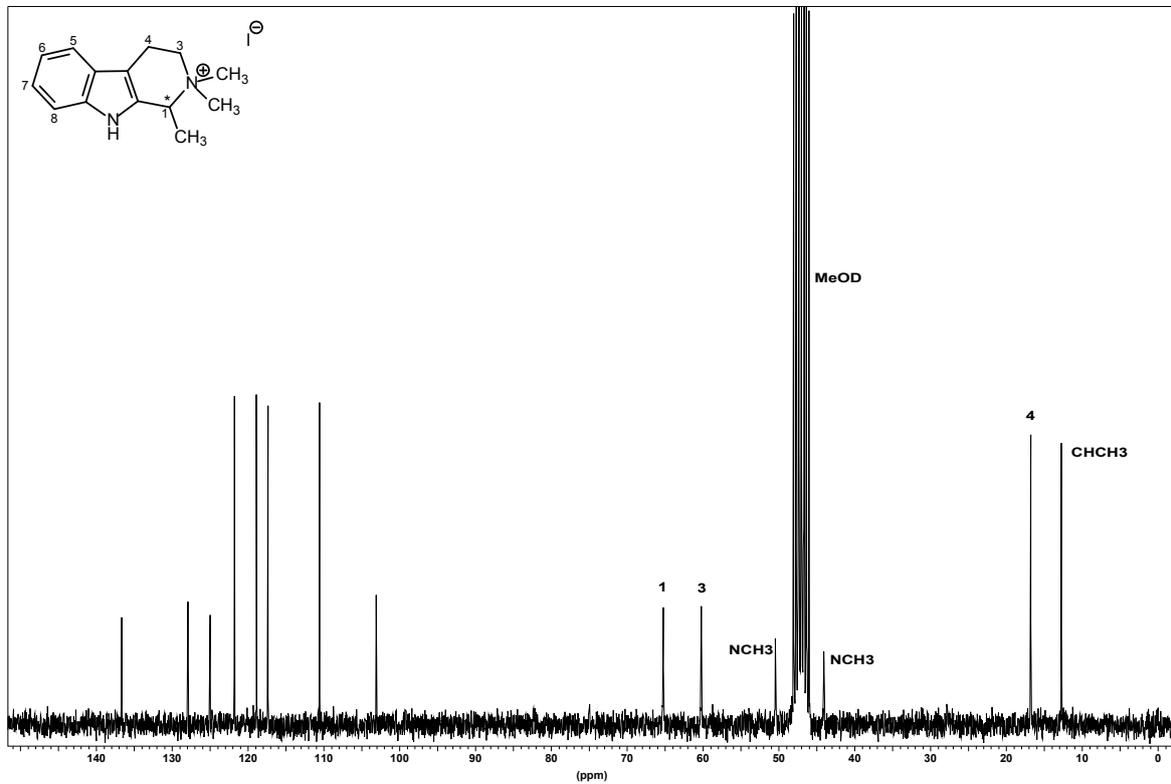
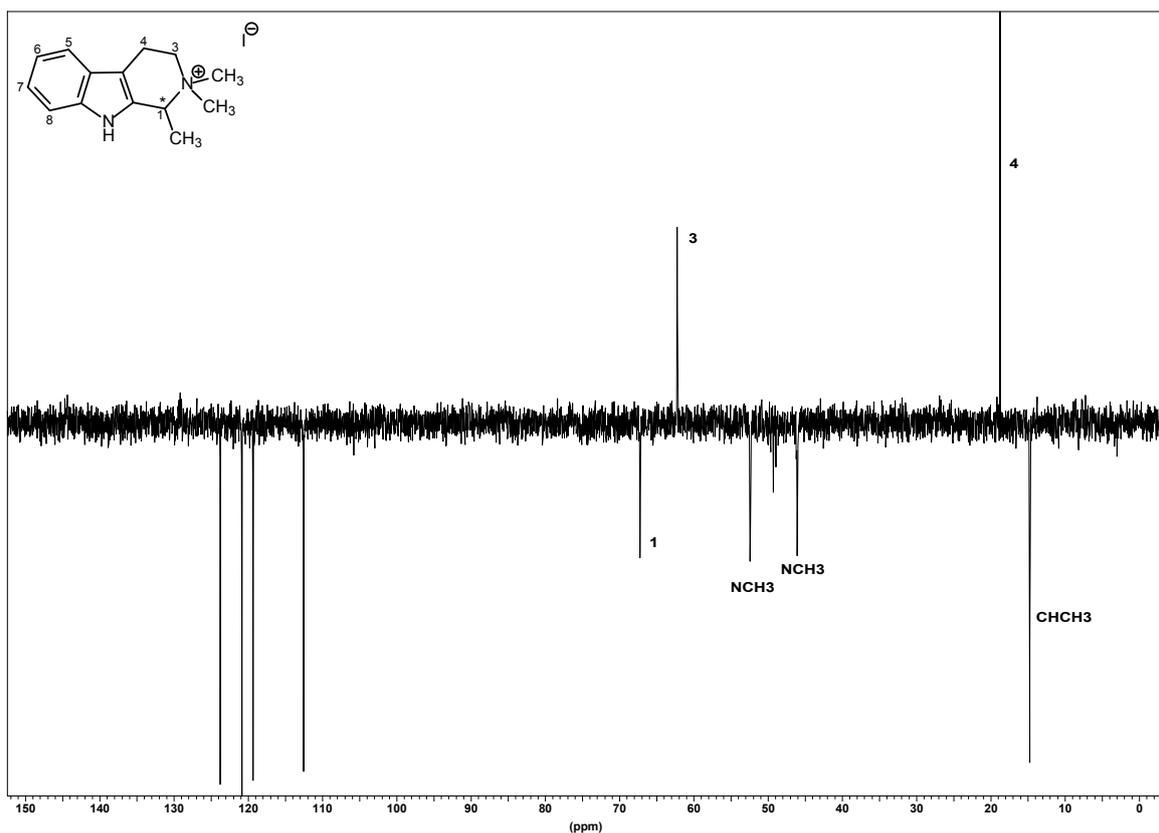


Abb. B-12 a) ^{13}C -NMR von 1R-1,2,2-Trimethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-2-iumiodid (*R2*) (MeOD)(oben) und b) DEPT-Spektrum von (*R2*) (MeOD)(unten)



B.2 Synthese von β -Carbolin

Die Darstellung von β -Carbolin verlief in zwei Stufen. In der ersten Stufe wurde 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin (**3**) analog zum 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (**1**) über eine *Pictet-Spengler-Kondensation* synthetisiert (siehe Abschnitt B.1.2).

Nach Ho et al. wurde, wie in Abb. B-13 dargestellt, Tryptamin-Hydrochlorid (**21**) in Wasser gelöst und mit Glyoxalsäure umgesetzt. Es entstand die Carbonsäure **23**, die in einem weiteren Schritt durch Zugabe konzentrierter Salzsäure decarboxyliert und mit Kaliumhydroxid in die Base **3** überführt wurde. Diese Reaktion lieferte Ausbeuten von 80% [Ho et al., 1988].

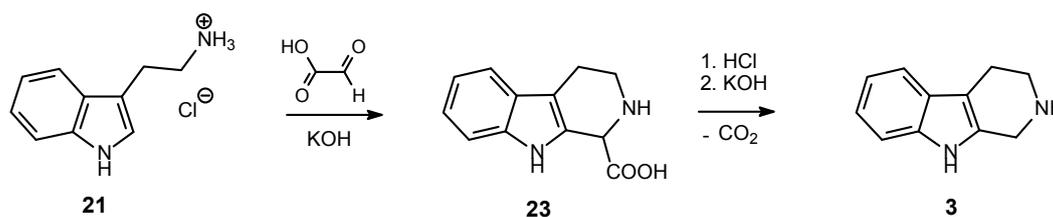


Abb. B-13 *Pictet-Spengler-Kondensation* zu 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin (**3**) [Ho et al., 1988]

Im ¹H-NMR von **3** erkennt man die 3 aliphatischen Protonensignale des Tetrahydro-Pyridin-Ringes (H1,H3,H4) zwischen 2,5 und 4 ppm mit der Integration von jeweils 2H. Die 4 aromatischen Protonen und das NH-Signal sind dann im Tieffeld zu finden. Die Struktur lässt sich analog auch im ¹³C-NMR sichern (siehe Abb. B-14 a und b).

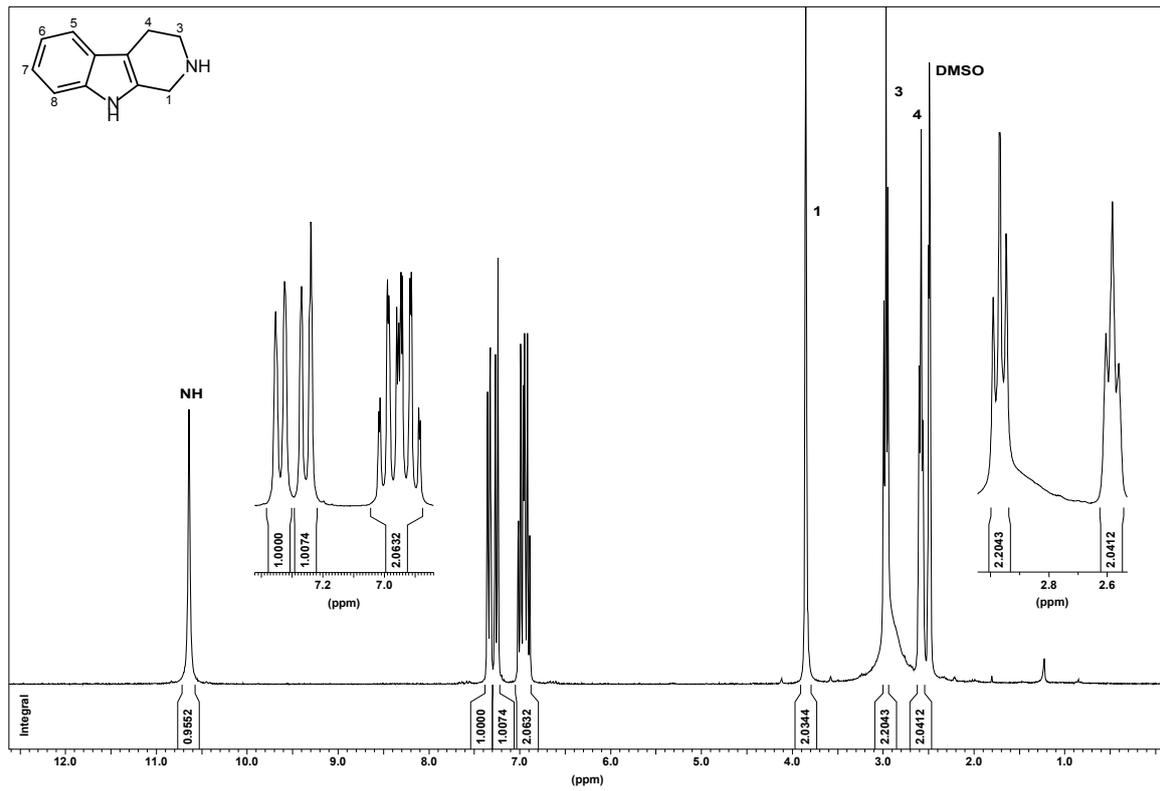
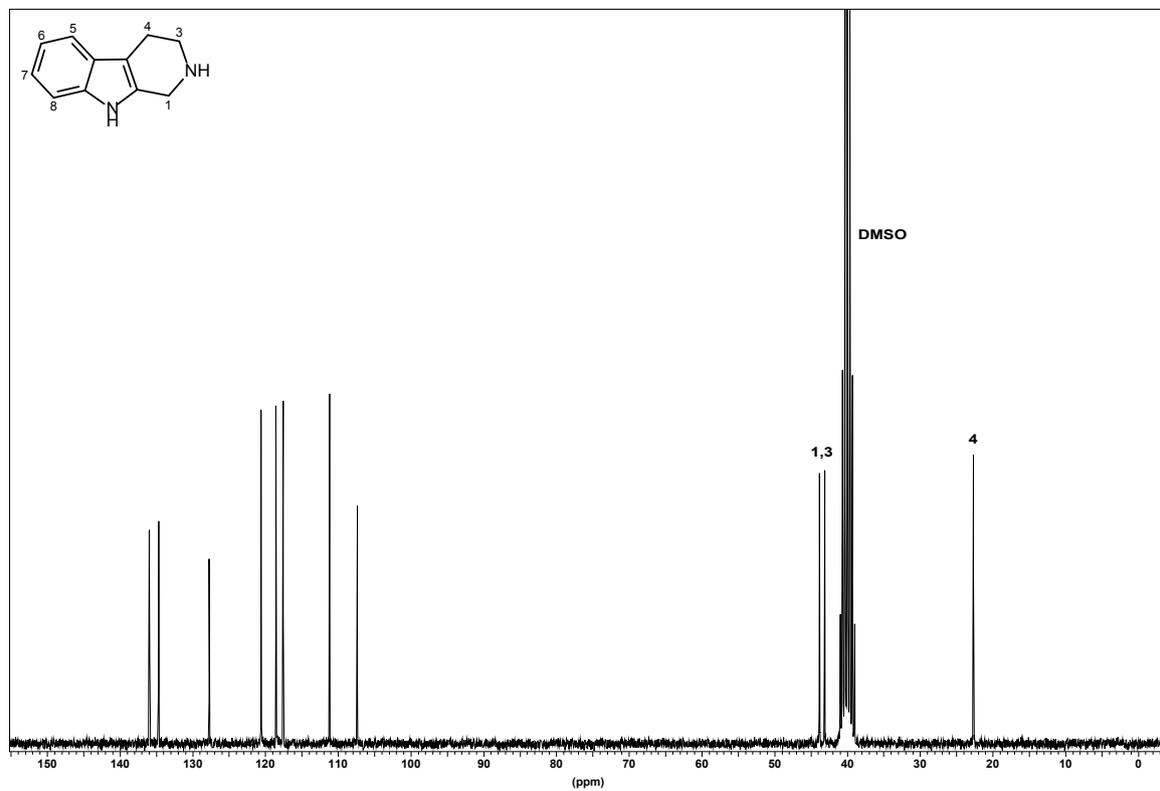


Abb. B-14 a) $^1\text{H-NMR}$ von 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin (3) ($[\text{D}_6]\text{-DMSO}$)(oben) und b) $^{13}\text{C-NMR}$ von 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin (3) ($[\text{D}_6]\text{-DMSO}$)(unten)



Anschließend wurde die Aromatisierung von **3** zu **4** mit Palladium/Kohle in Cumol durchgeführt (siehe Abb. B-15), was im $^1\text{H-NMR}$ sowie im $^{13}\text{C-NMR}$ (siehe Abb. B-16 a und b) durch die Abwesenheit von Signalen im Aliphatenbereich und 3 weiteren aromatischen Signalen gesichert werden konnte.

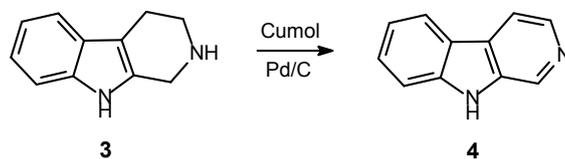


Abb. B-15 Aromatisierung von 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin (**3**) zu β -Carbolin (**4**)

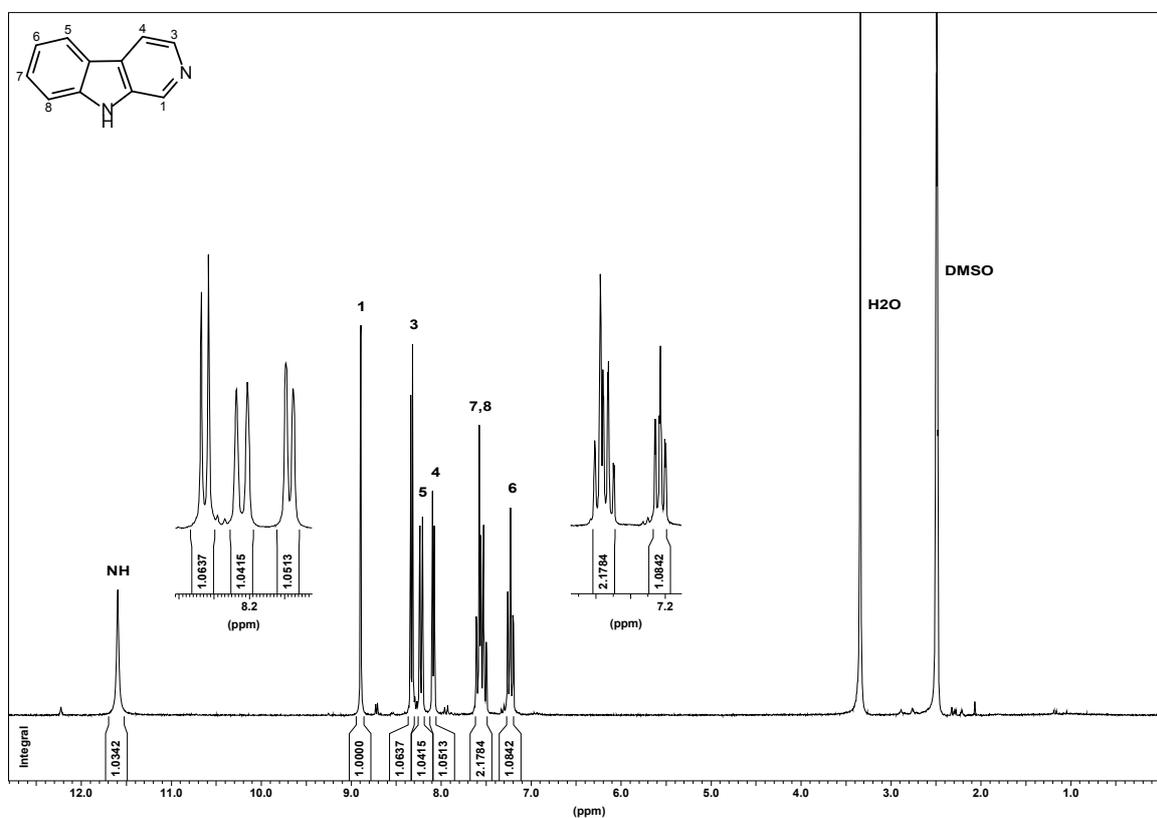
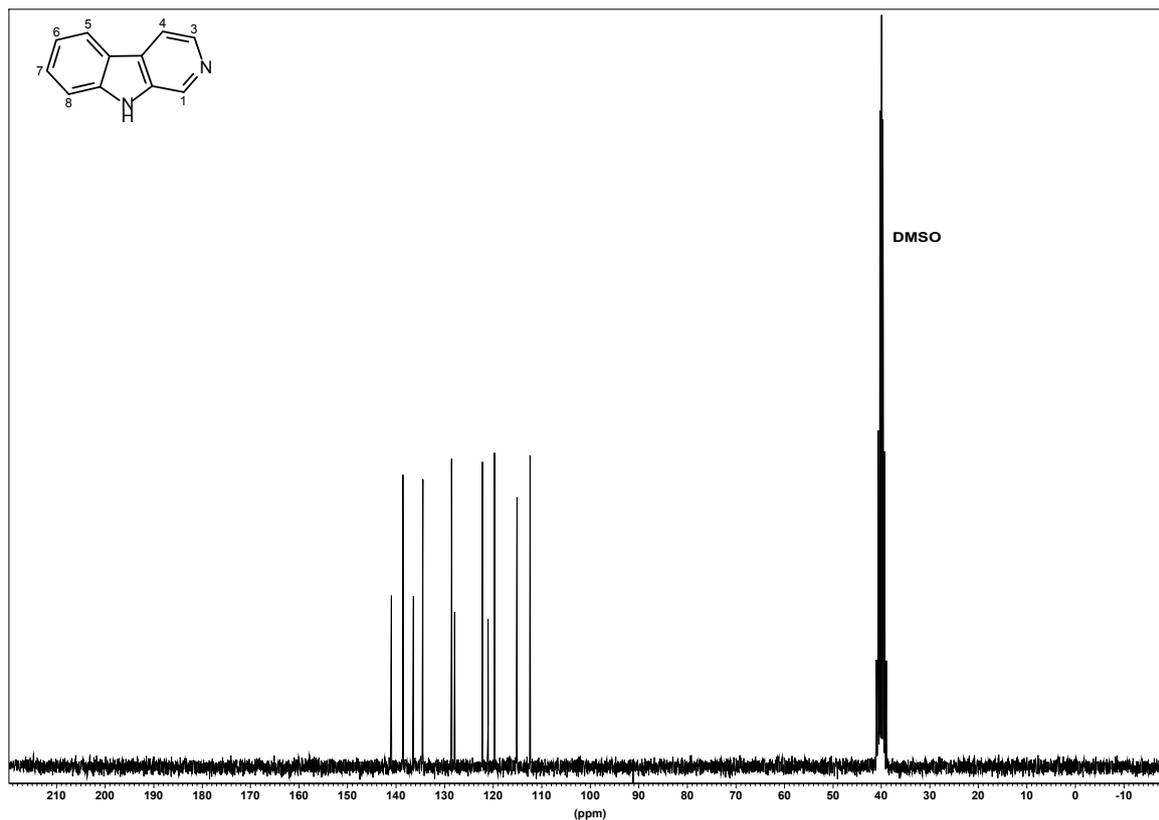


Abb. B-16 a) $^1\text{H-NMR}$ von β -Carbolin (**4**) ($[\text{D}_6]\text{-DMSO}$) (oben) und b) $^{13}\text{C-NMR}$ von **4** ($[\text{D}_6]\text{-DMSO}$) (unten)



B.3 Synthese von *N*2-bivalenten β-Carbolinen

Bereits früher haben Pang et al. die Synthese eines bivalenten AChE-Inhibitors beschrieben, indem zwei Pharmakophor-Einheiten zusammengefügt wurden. Dabei diente Tacrin als Ausgangssubstanz [Pang et al., 1996]. Dies erwies sich als erfolgreiche Strategie und sollte auf das β-Carbolin-Grundgerüst auf zwei unterschiedlichen Wegen angewandt werden: Die Bildung von bivalenten Verbindungen über den Stickstoff in Position 2 (als *N*2-bivalente β-Carboline bezeichnet) und in Position 9 (als *N*9-bivalente β-Carboline bezeichnet).

Die Synthese der *N*2-homobivalenten β-Carboline (**5**) wurde zuerst unter den bei Gray et al. beschriebenen Bedingungen versucht. Hier wurde 1-Methyl-β-carbolin mit 1,5-Dibrompentan im Molverhältnis 3:1 in Acetonitril umgesetzt [Gray et al., 1954]. Im ¹H-NMR konnte aber kein Umsatz festgestellt werden, es waren nur die Signale der Edukte zu erkennen.

Die Literatursuche nach Bispyridinium-Derivaten war erfolgreicher und führte zu mehreren Artikeln von K. Musilek. Übertragen auf die β-Carboline wurde **4** mit α,ω-Dibromalkan im Überschuß in DMF umgesetzt (siehe Abb. B-17). Das Produkt **5** wurde anschließend mit Aceton ausgefällt und abfiltriert [Musilek et al., 2006]. Diese Darstellung war erfolgreich, und die Ausbeuten lagen zwischen 80 und 100%.

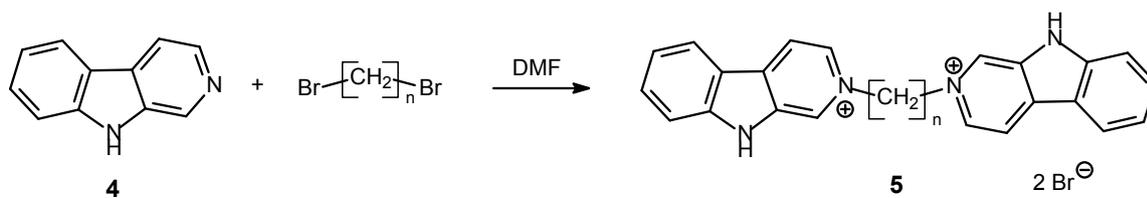


Abb. B-17 Synthese der N₂-homobivalenten β -Carboline (**5**) [Musilek et al., 2006]

Abweichend davon beschrieben Agarwal et al. die Umsetzung von 1-Brom-3-chloropropan mit β -Carbolin (**4**) in 2-Propanol zu **5-3** [Agarwal et al., 1987].

Im ¹H-NMR des beispielhaft dargestellten **5-6** (siehe Abb. B-18 a) sind die Signale der Spacer-Methylengruppen bei 1,4, 2,0 und 4,8 ppm mit der Integration von jeweils 4H zu sehen. Die aromatischen Protonensignale unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Aufspaltung nicht wesentlich vom β -Carbolin (**4**), lediglich H1 und H3 sind durch die Quartärnisierung tieffeldverschoben. Das in Abb. B-18 b dargestellte ¹³C-NMR bestätigt ebenfalls diese Struktur aufgrund der Signale der Spacer-Methylengruppen bei 25-60 ppm.

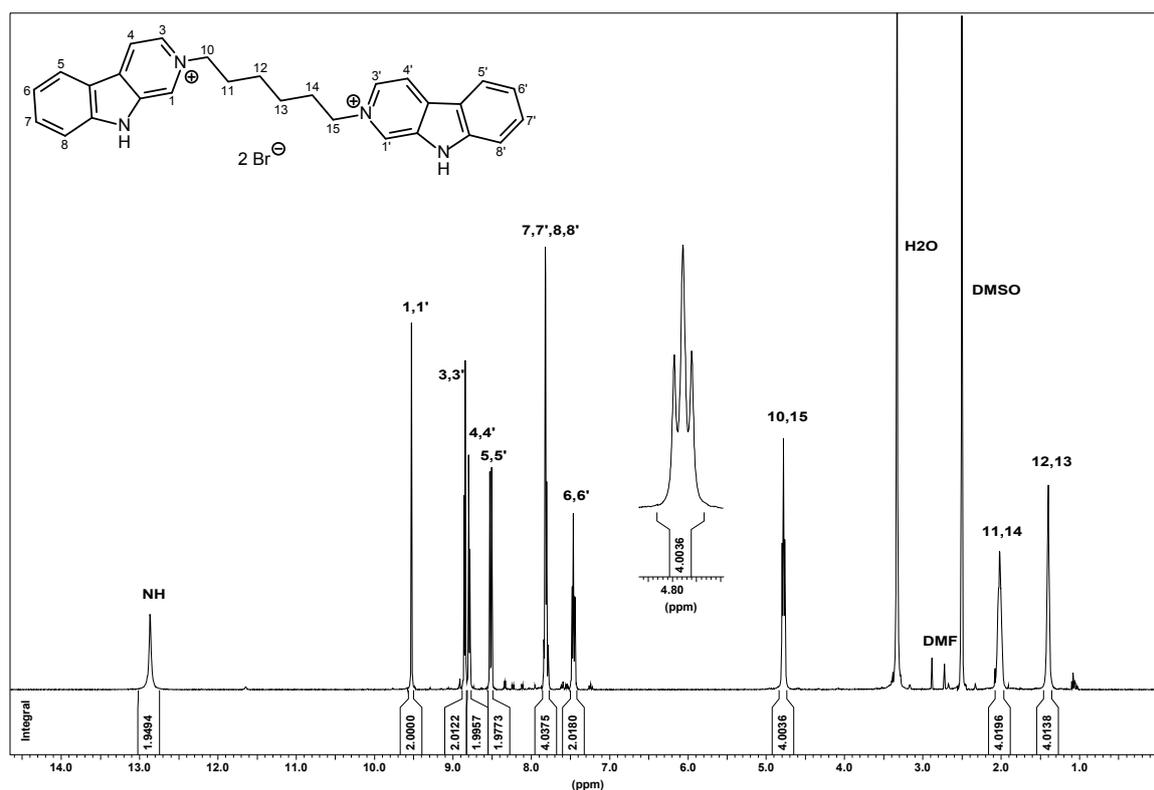
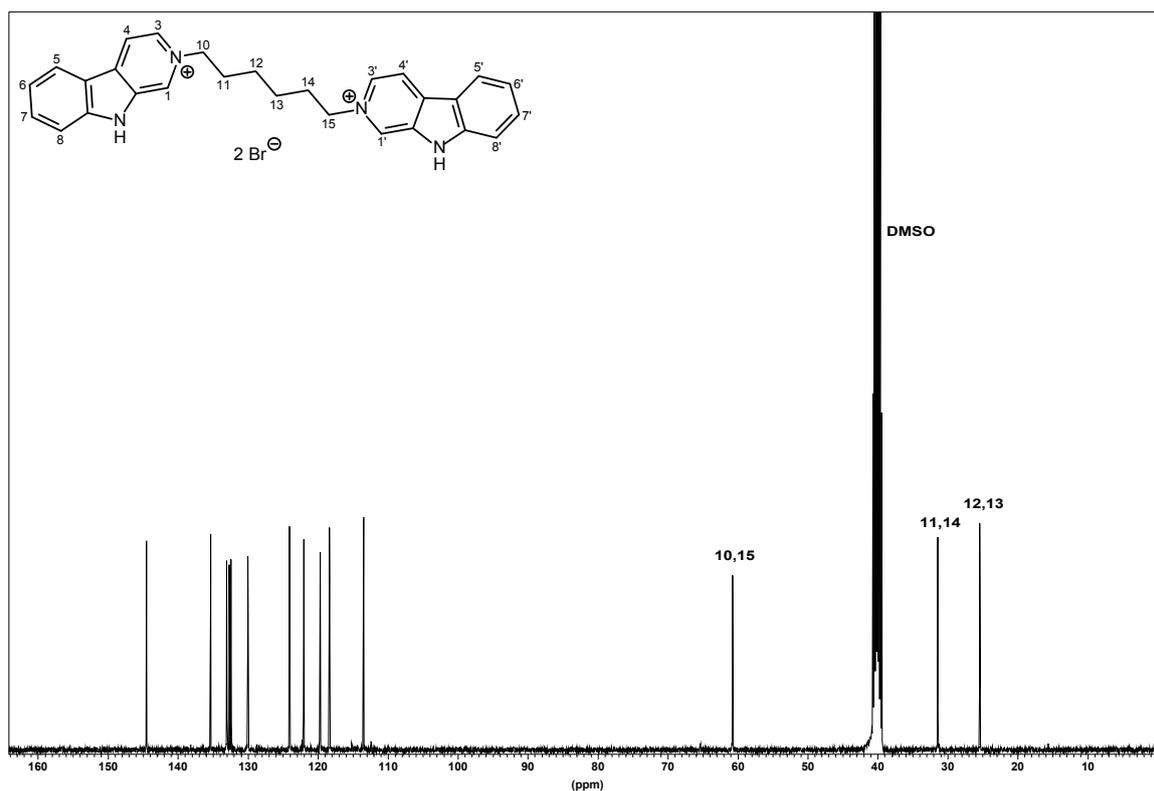


Abb. B-18 a) ¹H-NMR von 2-[6-(β -Carbolin-2-ium-2-yl)hexyl]- β -carbolin-2-iumdibromid (**5-6**) ($[D_6]$ -DMSO) (oben) und b) ¹³C-NMR von **5-6** ($[D_6]$ -DMSO) (unten)



Diese Reaktion wurde für die Spacerlängen 2 bis 12 durchgeführt. Bei den Spacerlängen größer 9 war die Wasserlöslichkeit für die biologischen Tests meist zu gering und die Durchführung zum Teil nicht möglich. Deshalb wurde versucht die Wasserlöslichkeit der langkettigen *N*2-homobivalenten Derivate (**5**) zu erhöhen, in dem die Lipophilie des Spacers durch die Einführung von Sauerstoffen reduziert wurde. Dazu wurden zuerst die endständigen Hydroxylgruppen des Tetraethylglykols durch Bromid substituiert (**24**) [Biron et al., 2004], um anschließend, wie oben beschrieben, das Homobivalente (**5-110**) (siehe Abb. B-19) darzustellen.

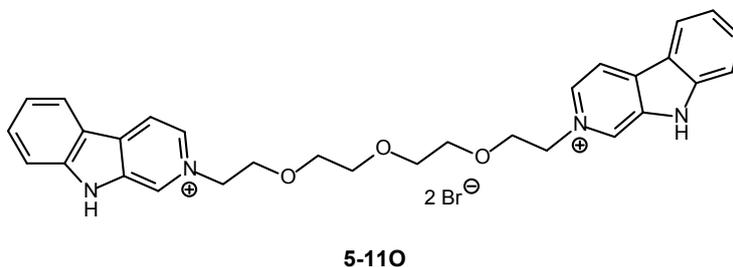


Abb. B-19 2-[2-(2-[2-(2-(β -Carbolin-2-ium-2-yl)ethoxy]ethoxy)ethoxy)ethyl]- β -carbolin-2-iumdibromid (**5-110**)

Weiterhin sollte ein homobivalentes β -Carbolin mit einem starren Spacer synthetisiert werden. Dies wurde durch die Einführung von *p*-Xylyl erreicht. Dazu wurde analog zu den linearen Spacern ein 1,4-Bis-(bromomethyl)benzen eingesetzt und nach oben beschriebener Vorschrift zu **5-Xy** umgesetzt (siehe Abb. B-20).

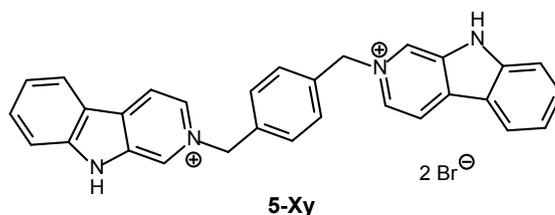


Abb. B-20 2-[4-(β-Carbolin-2-ium-2-ylmethyl)benzyl]-β-carbolin-2-iumdibromid (**5-Xy**)

B.4 Synthese weiterer bivalenter Verbindungen

Die *N*2-homobivalenten β-Carboline besaßen im Vergleich zu den monovalenten Strukturen höhere inhibitorische Aktivität an den Cholinesterasen. Um eine Aussage über die Relevanz eines zweiten eingeführten β-Carbolins bzw. eines zweiten eingeführten aromatischen Systems hinsichtlich der inhibitorischen Aktivität treffen zu können, wurde die heterobivalente Verbindung **6** synthetisiert (siehe Abb. B-21). Der Spacer wurde an einer Seite von β-Carbolinium, an der anderen Seite von Pyridinium begrenzt. Dazu wurde zuerst eine Addition von 1,6-Dibromhexan an Pyridin vorgenommen, wobei das 1,6-Dibromhexan im dreifachen Überschuß verwendet wurde. Das Bromohexylpyridinium (**25**) wurde dann in Acetonitril mit β-Carbolin umgesetzt.

Um auch den Vergleich zum Pyridinium-Homobivalenten (**7**) (siehe Abb. B-21) zu haben, wurde diese Verbindung ebenfalls, wie unter B.3 beschrieben, synthetisiert.

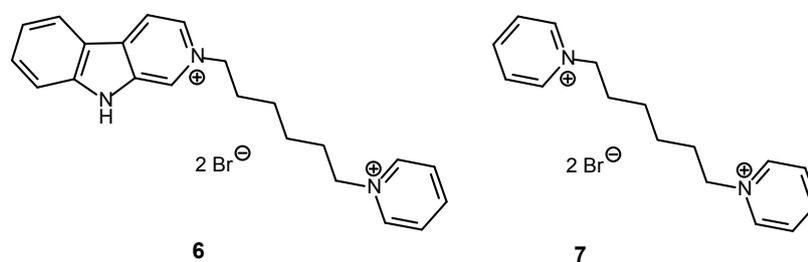


Abb. B-21 2-(6-Pyridinium-1-yl-hexyl)-β-carbolin-2-iumdibromid (**6**) und 1-(6-Pyridinium-1-yl-hexyl)-pyridinium-dibromid (**7**)

Weiterhin sollte der Einfluß einer Methoxy- und einer Hydroxygruppe in Position 6 untersucht werden (siehe Abb. B-22). Dazu wurde die Spacerlänge 5 ausgewählt, da diese zu dem Zeitpunkt in pharmakologischen Tests vielversprechend erschien. In einem ersten Schritt wurde 6-Methoxy-β-carbolin (**4MeO**) analog zu dem bereits in Abschnitt B.2 beschriebenen β-Carbolin synthetisiert. **4MeO** wiederum wurde, wie in Abschnitt B.3 beschrieben, zur homobivalenten Verbindung (**5MeO-5**) umgesetzt. Um eine Hydroxygruppe in Position 6 zu erhalten, wurde eine Etherspaltung der Methoxygruppe von **4MeO** mit Bortribromid durchgeführt [Schott et al., 2006; Tanaka et al., 1978]. Das entstandene 6-Hydroxy-β-carbolin (**4OH**) wurde, wie in Abschnitt B.3 beschrieben, anschließend zu **5OH-5** umgesetzt.

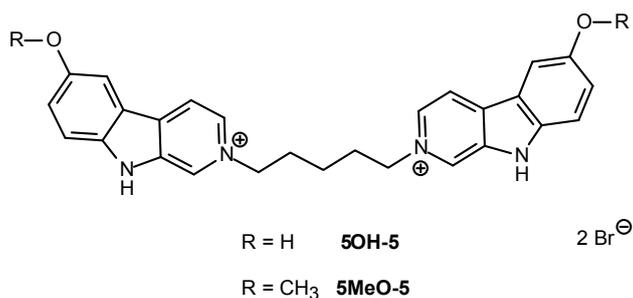


Abb. B-22 6-Methoxy-2-[5-(6-methoxy- β -carbolin-2-ium-2-yl)pentyl]- β -carbolin-2-iumdibromid (**5MeO-5**) und 6-Hydroxy-2-[5-(6-hydroxy- β -carbolin-2-ium-2-yl)pentyl]- β -carbolin-2-iumdibromid (**5OH-5**)

B.5 Synthese von partiell reduzierten N2-homobivalenten β -Carbolinen

Gray et al. und Booth et al. beschrieben die Synthese von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin durch partielle Reduktion des quartären 2-Methyl- β -carboliniumiodids (**9-1**) mit Hilfe von Natriumborhydrid in Methanol [Booth et al., 1989; Gray et al., 1954]. Die beschriebenen Bedingungen konnten erfolgreich auf die Reduktion der N2-Homobivalente (**5**) zu Tetrahydro-N2-Homobivalente (**8**) übertragen werden (siehe Abb. B-23).

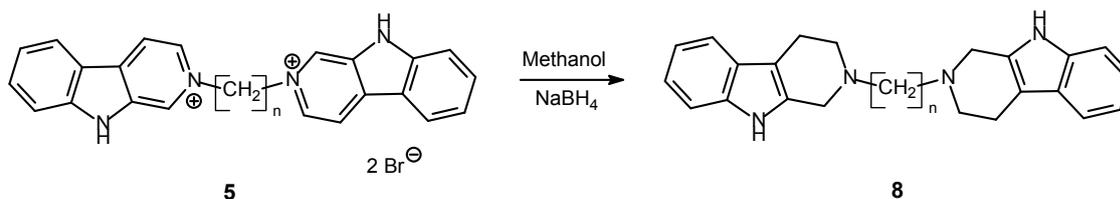


Abb. B-23 Synthese der Tetrahydro-N2-homobivalenten β -Carbolinen (**8**)($n=5,10$)

Zur besseren Übersicht wurden aus den folgenden NMR-Spektren Abb. B-24 a und b für **8-5** Lösungsmittelpeaks nachträglich entfernt. Diese Lösungsmittel konnten durch Trocknen der Substanz im Vakuum nicht beseitigt werden. Im $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ erscheinen zu den Signalen der Methylengruppen des Spacers die Signale des aliphatischen Rings.

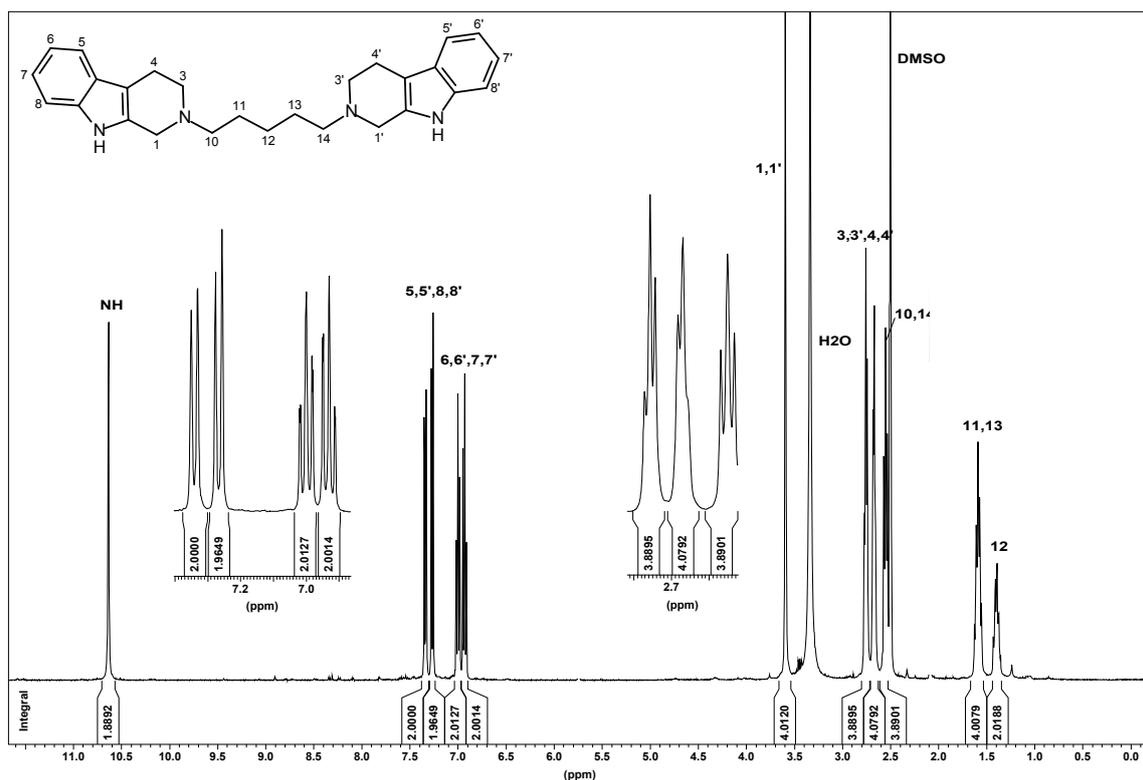
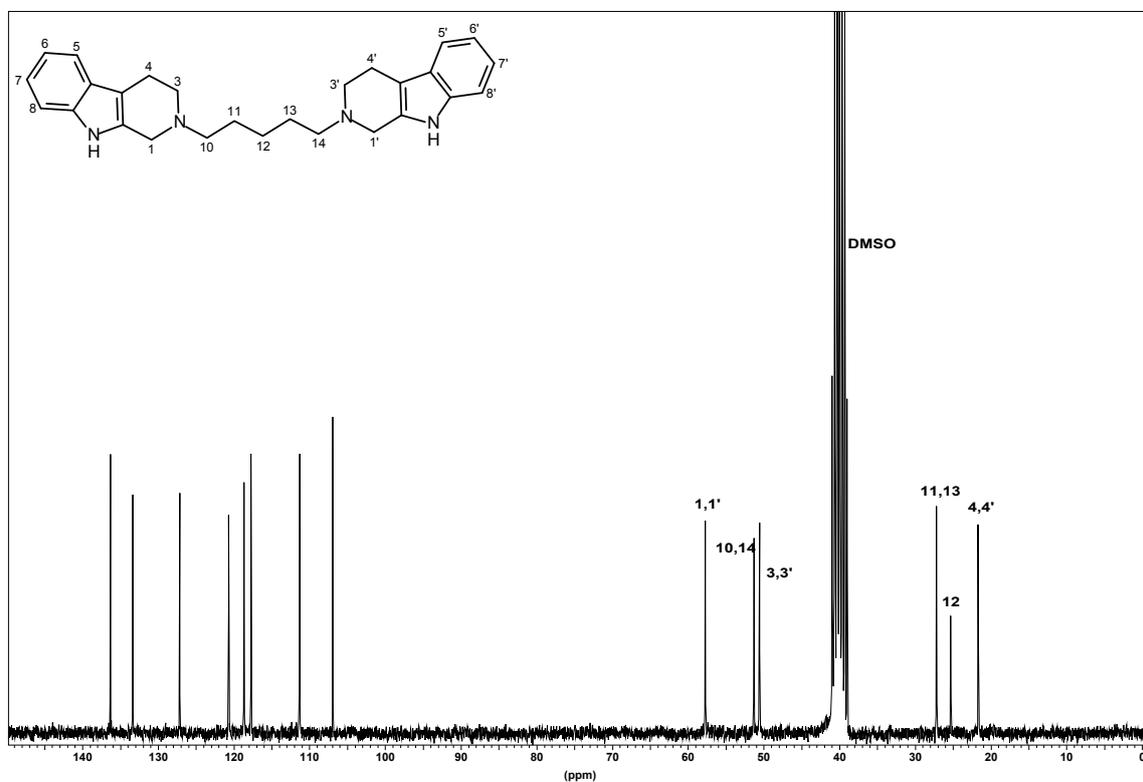


Abb. B-24 a) ¹H-NMR von 2-[5-(1,2,3,4-Tetrahydro-β-carbolin-2-yl)pentyl]-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolin (8-5) ([D₆]-DMSO)(oben) und b) ¹³C-NMR von 8-5 ([D₆]-DMSO)(unten)



B.6 Synthese von N2-monovalenten β -Carbolinen

Die Quartärnisierung gelang unter Standardbedingungen in Aceton oder Acetonitril mit Alkyliodiden (siehe Abb. B-25).

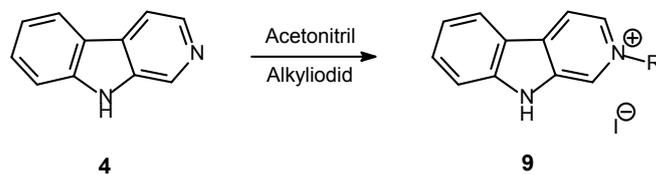


Abb. B-25 Synthese von N2-monovalenten β -Carbolinen (**9**)

Die Struktursicherung der Verbindungen gelang durch $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie. Beispielhaft für die Verbindungen **9** ist das Derivat **9-1** dargestellt. Das $^1\text{H-NMR}$ zeigt die Methylgruppe mit der Integration von 3H bei 5,5 ppm (siehe Abb. B-26). Durch die Quartärnisierung sind die Signale von H1 und H3 leicht tieffeldverschoben. Im $^{13}\text{C-NMR}$ (nicht dargestellt) erscheint das Signal der Methylgruppe bei 48 ppm.

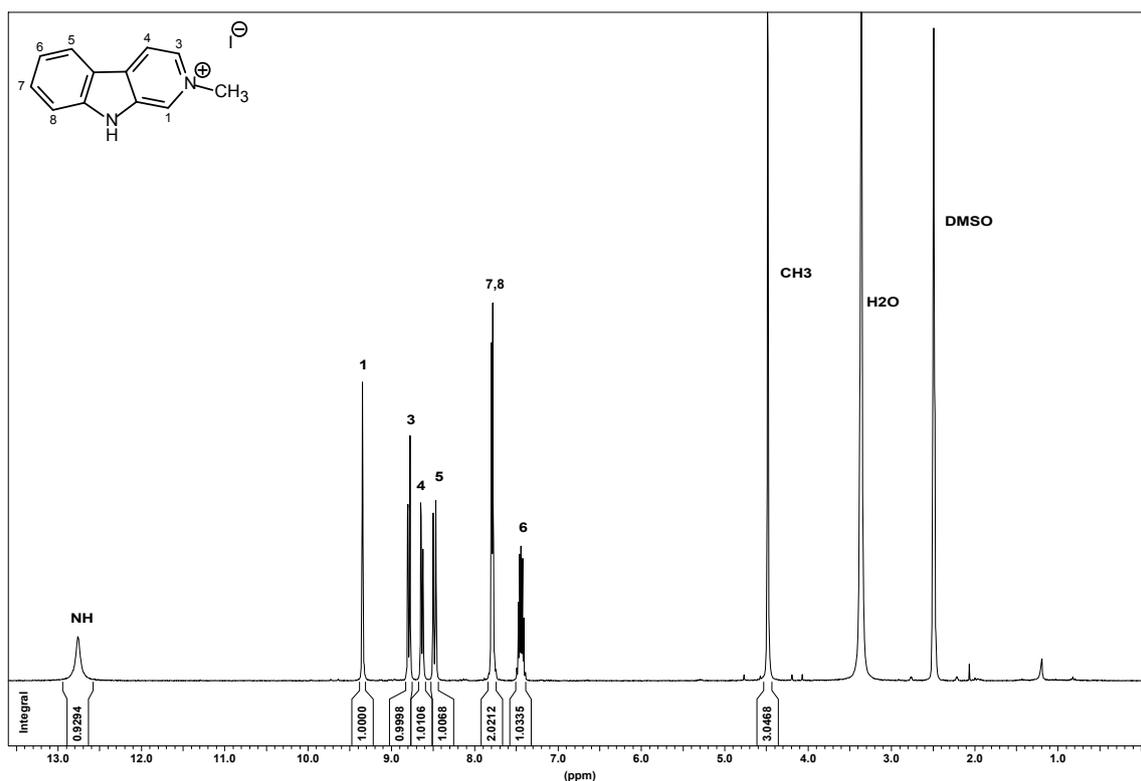


Abb. B-26 $^1\text{H-NMR}$ von 2-Methyl- β -carbolin-2-iumiodid (**9-1**) ($[\text{D}_6]$ -DMSO)

B.7 Synthese von *N*9-bivalenten β -Carbolinen

Wie bereits in Kapitel B.3 beschrieben, sollten auch *N*9-verknüpfte bivalente Verbindungen synthetisiert werden.

Der erste Darstellungsversuch wurde analog der *N*2-homobivalenten Derivate nach Musilek et al. unternommen [Musilek et al., 2006]. Zusätzlich mußte hier im ersten Schritt zu dem in DMF gelösten β -Carbolin (**4**) Natriumhydrid zugegeben werden. Diese Hilfsbase wurde bereits früher erfolgreich bei der Darstellung der *N*9-Monovalente eingesetzt [Schott et al., 2006]. Anschließend wurde ein α,ω -Dibromalkan zugegeben. Allerdings war nach 4 Tagen kein Umsatz von **4** zu sehen. Somit wurde der Ansatz verworfen. Diese Methode wurde leicht verändert auch bei Neumeyer et al. für Cyclorphan-Bivalente mit Erfolg durchgeführt. Hier wurden die Pharmakophore über eine Hydroxy-Gruppe verknüpft und dazu in DMF gelöstes α,ω -Dibromalkan tropfenweise zur deprotonierten Zwischenstufe gegeben. Auch diese Bedingungen führten für die β -Carboline nicht zum Erfolg [Neumeyer et al., 2003].

Nach Hannig et al. wurde **4** mit einem Überschuß an Kaliumhydroxid vermischt und verschmolzen. Der Schmelzkuchen wurde zerrieben, das so erhaltene Kaliumsalz in Xylol suspendiert und mit α,ω -Dibromalkan umgesetzt. Die Mischung wurde für 12 h erhitzt und heiß filtriert. Laut Literatur sollten beim Abkühlen des Filtrats Kristalle des jeweiligen Bivalenten entstehen [Hannig et al., 1963]. Es fanden sich aber nur sehr wenige Kristalle, die bei der DC-Untersuchung nur das Edukt **4** zeigten. Der Ansatz wurde somit verworfen.

Braun et al. beschrieben die Synthese von 3,6-Dibromocarbazol. Danach wurde Carbazol in 1-Methyl-2-pyrrolidinon mit Kaliumhydroxid erhitzt und α,ω -Dibromalkan langsam zugetropft. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde in Toluol oder Toluol/Methanol umkristallisiert [Braun et al., 1999]. Auch diese Synthesemethode konnte nicht auf die β -Carboline übertragen werden. Nach der Umkristallisation in Toluol war kein aromatisches Protonensignal im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zu finden. Das Rohprodukt zeigte bei der DC-Untersuchung eine Umsetzung von **4**, allerdings war die Aufreinigung durch Säulenchromatographie und Umkristallisation nicht erfolgreich.

Die Synthesevorschrift von Yakuphanoglu et al. für *N,N*-Biscarbazole führte letztendlich zum Erfolg. Unter den beschriebenen Bedingungen wurde **4** in DMSO gelöst, mit einem Überschuß an Natriumhydroxid umgesetzt und anschließend α,ω -Dibromalkan zugegeben (siehe Abb. B-27). Die Mischung wurde in Wasser aufgenommen und mit Chloroform extrahiert [Yakuphanoglu et al., 2007]. Das so erhaltene Rohprodukt konnte säulenchromatographisch gereinigt werden.

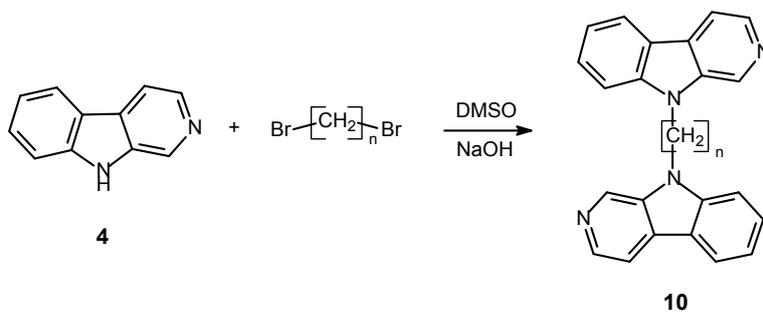


Abb. B-27 Synthese der N9-bivalenten β -Carboline (**10**)

Die Reaktion wurde für $n = 5, 9$ und 12 durchgeführt. Im $^1\text{H-NMR}$, beispielhaft dargestellt für **10-5**, sieht man an der Abwesenheit des NH-Signals die gewünschte Position des Spacers (siehe Abb. B-28 a). Die Signale der Spacer-Methylengruppen sind im Aliphatenbereich von $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ (siehe Abb. B-28 b) zu erkennen.

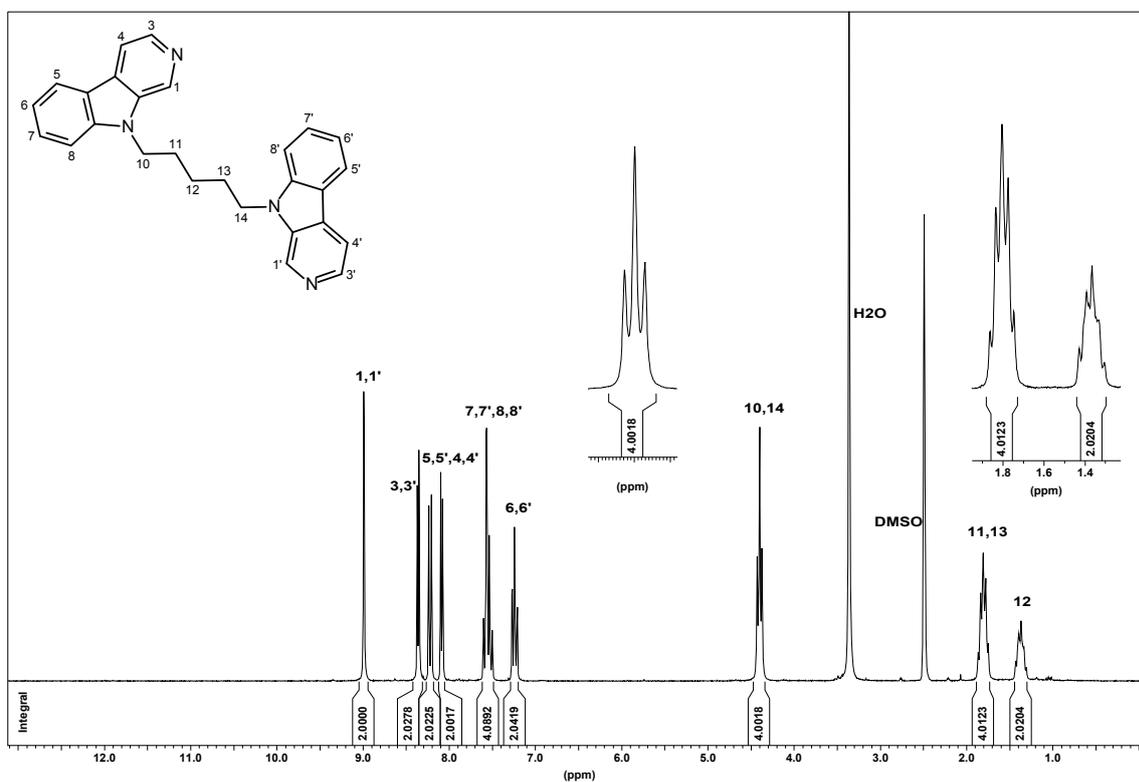
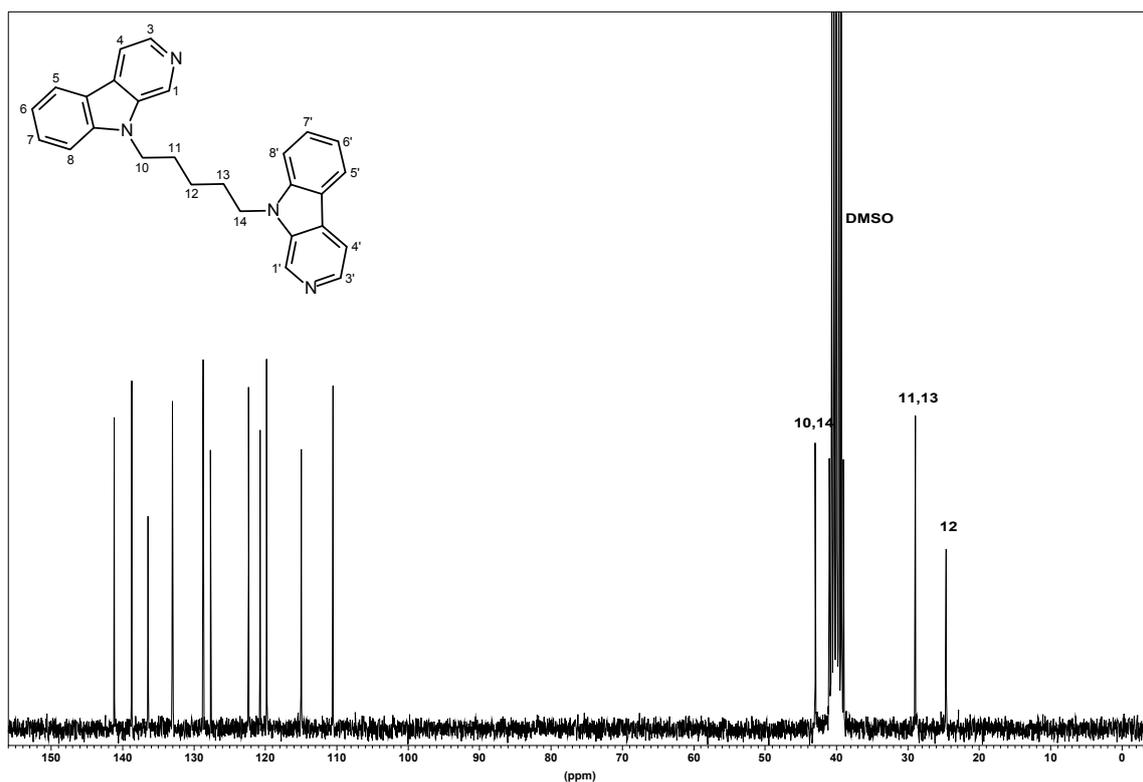


Abb. B-28 a) $^1\text{H-NMR}$ von 9-[5-(β -Carbolin-9-yl)pentyl]- β -carboline (**10-5**) ($[\text{D}_6]$ -DMSO) (oben) und b) $^{13}\text{C-NMR}$ von **10-5**) ($[\text{D}_6]$ -DMSO)



B.8 Synthese von quartären N9-bivalenten β -Carbolinen

Die Synthese erfolgte unter den in Kapitel B.6 beschriebenen Bedingungen in Aceton mit Methyljodid (siehe Abb. B-29).

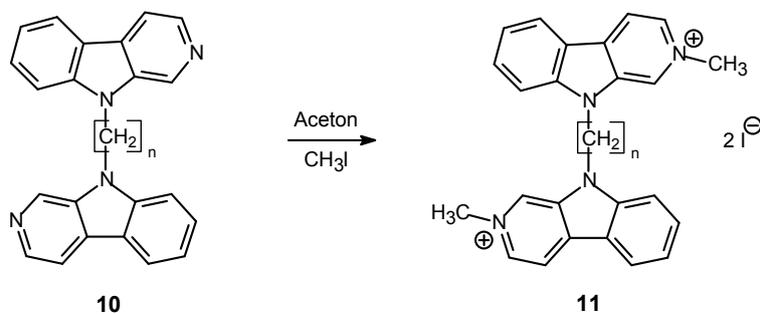


Abb. B-29 Synthese der quartären N9-bivalenten β -Carboline (11)

Im $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ (siehe Abb. B-30 a und b) erscheint das Signal der Methylgruppen im Aliphatenbereich und konnte durch die Integration von 6H im $^1\text{H-NMR}$ eindeutig zugeordnet werden.

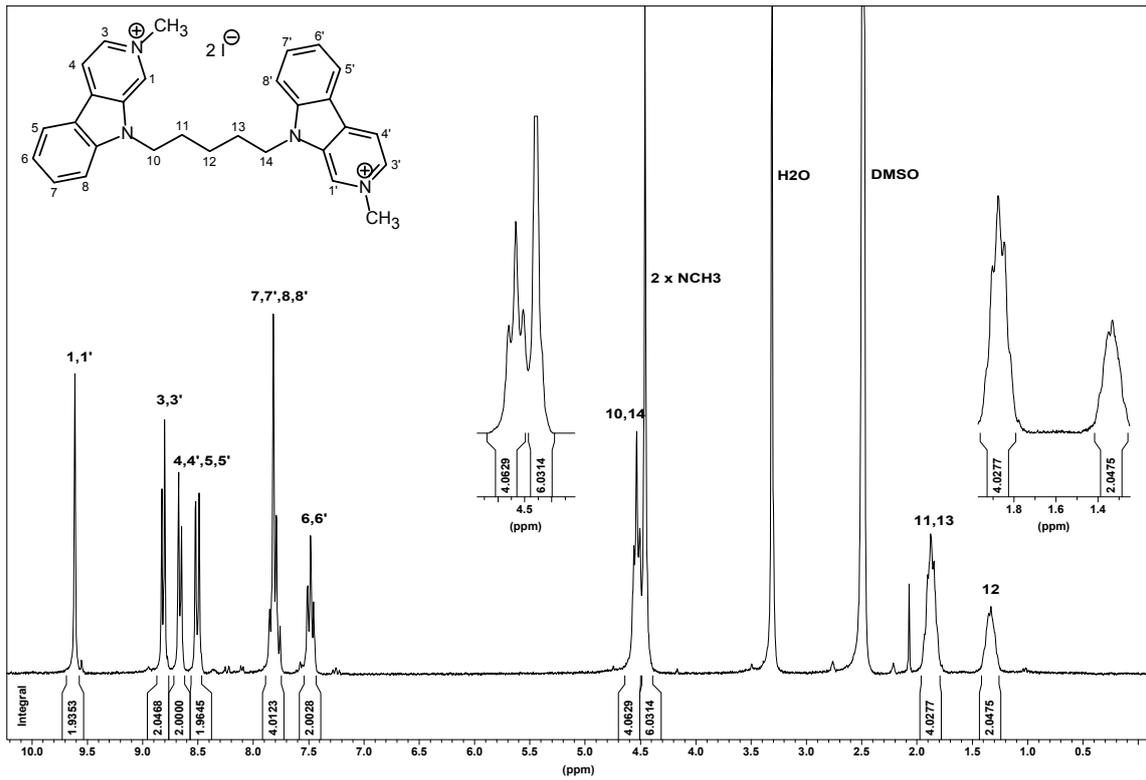
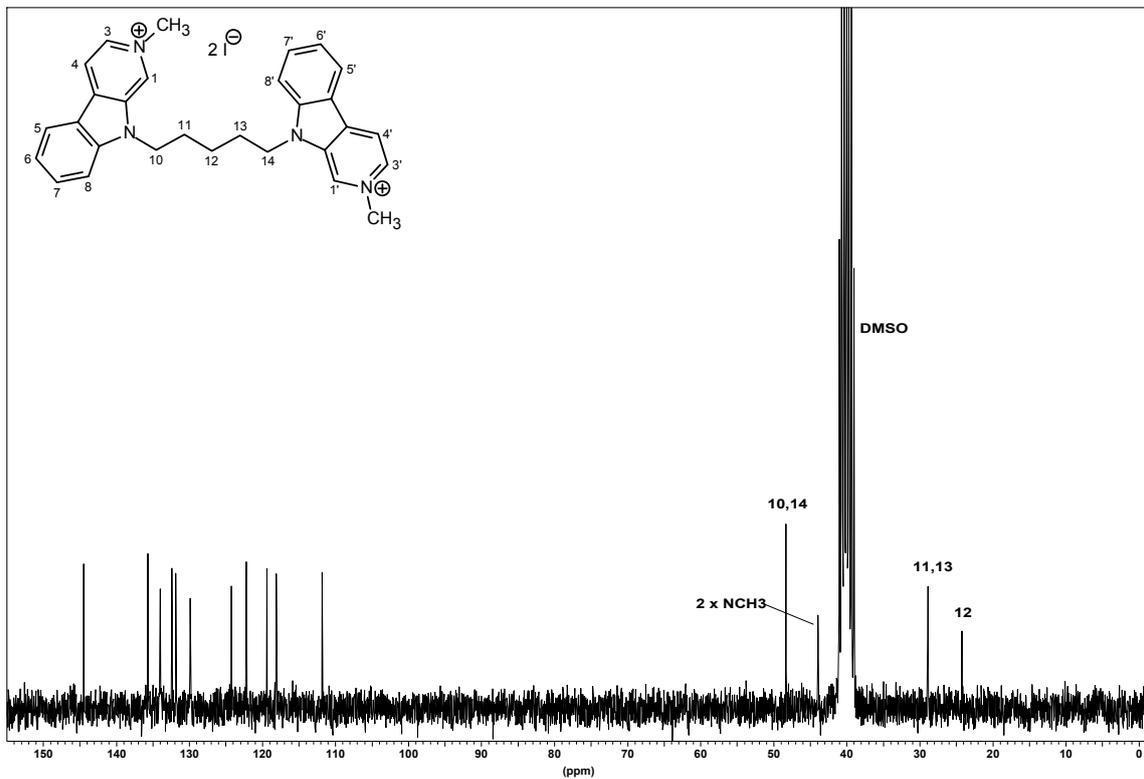


Abb. B-30 a) $^1\text{H-NMR}$ von 2-Methyl-9-[5-(2-Methyl-β-carbolin-9-yl)pentyl]-β-carbolin-2-iumdiodid (**11-5**) ($[\text{D}_6]\text{-DMSO}$) (oben) und b) $^{13}\text{C-NMR}$ von **11-5** ($[\text{D}_6]\text{-DMSO}$) (unten)



B.9 Synthese des partiell reduzierten N9-bivalenten β -Carbolins

Die Reduktion gelang, wie bereits in B.5 für die N2-homobivalente Derivate (**5**) beschrieben, mit Natriumborhydrid in Methanol (siehe Abb. B-31).

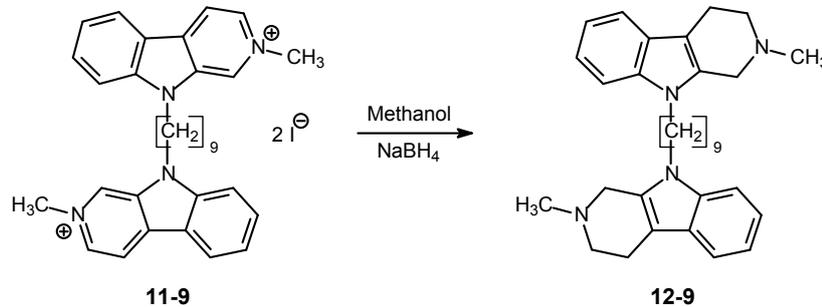


Abb. B-31 Synthese des reduzierten N9-bivalenten β -Carbolins (**12-9**)

Im $^1\text{H-NMR}$ von **12-9** sind die Signale von H1, H3, und H4 im Aliphatenbereich zu sehen. Das Signal der Methylgruppen lässt sich bei 2,4 ppm durch die Integration von 6H eindeutig zuordnen und ist im Vergleich zu dem quartären Vorstufe **11-9** (nicht dargestellt) stark hochfeldverschoben (siehe Abb. B-32).

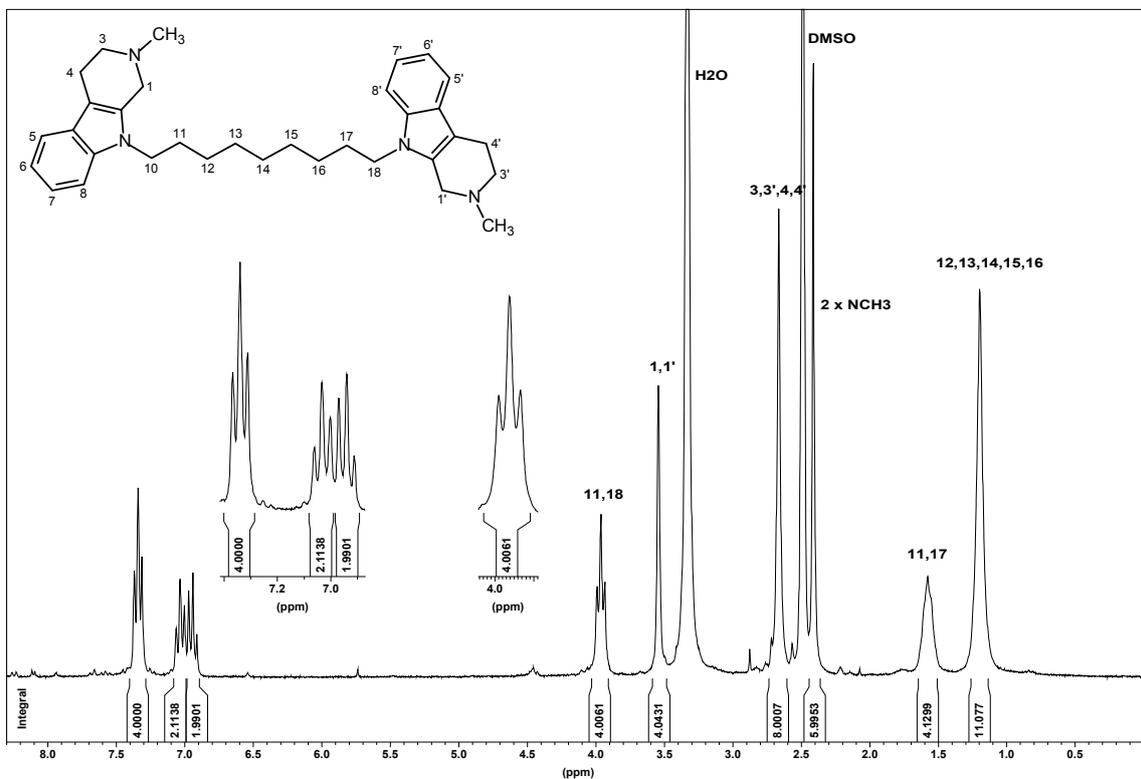


Abb. B-32 $^1\text{H-NMR}$ von 2-Methyl-9-[9-(2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-9-yl)nonyl]-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (**12-9**) ($[\text{D}_6]$ -DMSO)

B.10 Synthese von N9-monovalenten β -Carbolinen

Bereits früher wurde in unserem Arbeitskreis von Dr. Christoph Enzensperger eine Synthesevorschrift entwickelt, die es ermöglichte, N9-monovalente β -Carboline (**13**) rein darzustellen [Hamann et al., 2008].

Dazu wurde β -Carbolin (**4**) in DMF gelöst, durch Natriumhydrid deprotoniert und mit Methyljodid (äquimolar) umgesetzt. Zur Aufreinigung wurde mit Chloroform extrahiert und die Chloroformphase wiederum salzsauer extrahiert. In der sauren Phase lagen Edukt und Produkt nebeneinander als Ionenpaar vor. Durch eine abschließende Schwerphasenextraktion mit Chloroform gelang es, das Produkt **13** selektiv zu isolieren (siehe Abb. B-33).

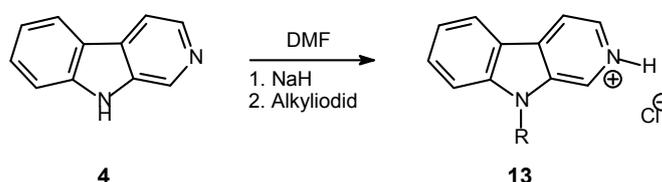


Abb. B-33 Synthese der N9-monovalenten β -Carboline (**13**)

Die Struktur von **13-1** konnte im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum durch das Signal der Methylgruppe bei 4,1 ppm und die Abwesenheit des NH-Signals gesichert werden (siehe Abb. B-34). Im $^{13}\text{C-NMR}$ erscheint die Methylgruppe bei 29 ppm (nicht dargestellt).

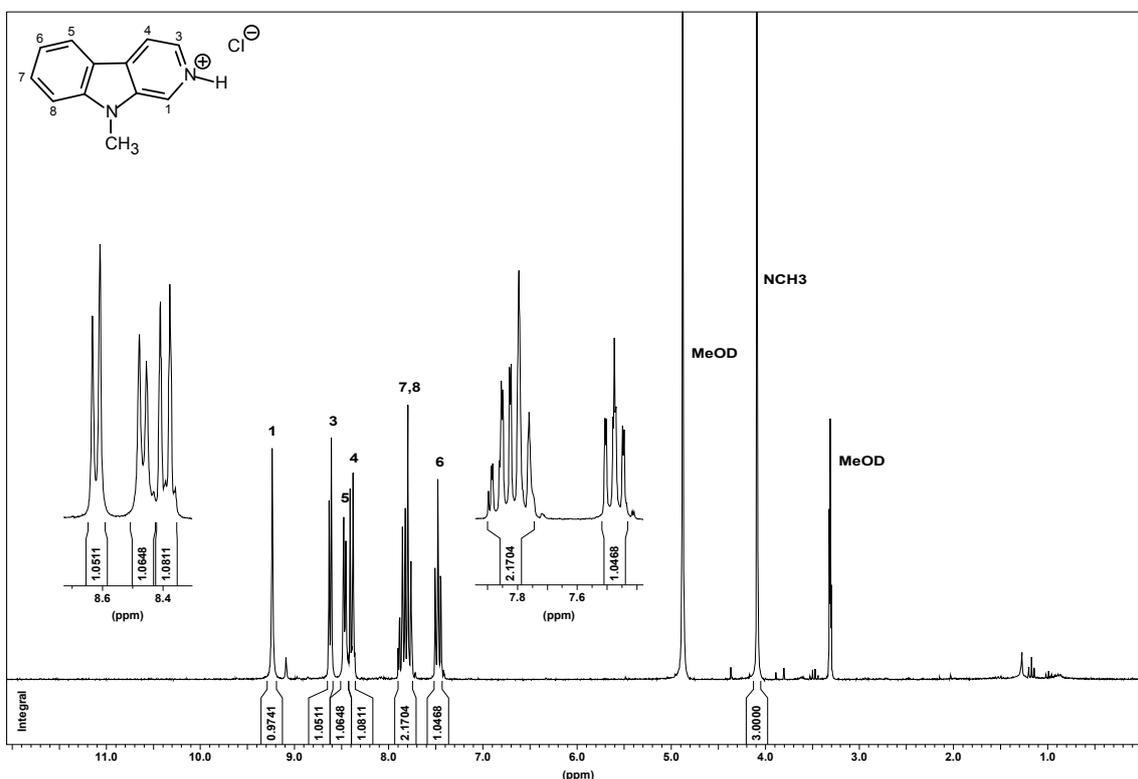


Abb. B-34 $^1\text{H-NMR}$ von 9-Methyl- β -carboliniumchlorid (**13-1**)(MeOD)

Weiterhin sollte für eine spätere radioaktive Tritiummarkierung von **13-1** ein Brom in Position 6 eingeführt werden (siehe Abb. B-35). Hierzu wurde β -Carbolin (**4**) mit Brom nach Heineke umgesetzt [Heineke, 1992] und das entstandene 6-Bromo- β -carbolin (**28**) nach oben beschriebener Methode zu **13Br-1** alkyliert.

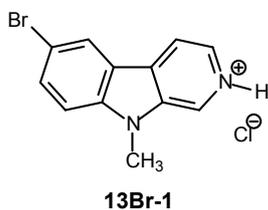


Abb. B-35 6-Bromo-9-methyl- β -carbolin (**13Br-1**)

C Pharmakologischer Teil

C.1 Untersuchung auf Neurotoxizität, MTS-Assay, β -Carbolin-Uptake-Assay

1979 traten in Kalifornien plötzlich parkinsonoide Symptome bei Drogenabhängigen auf, die synthetisch hergestelltes „Straßen-Heroin“, ein Prodinanalogon mit dem Namen MPPP, eingenommen hatten [Davis et al., 1979]. Diese zufällige Vergiftung wurde durch 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) ausgelöst, welches unter Einfluß des Enzyms Monoaminoxidase B (MAO B) in den Astrozyten zu hochgiftigem 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP^+) umgewandelt wird (siehe Abb. C-1) [von Bohlen und Halbach, 2005].

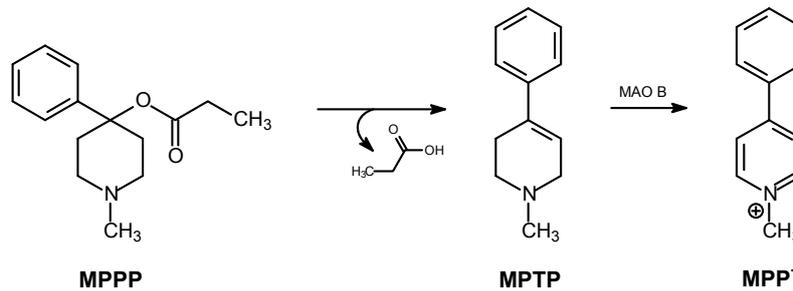


Abb. C-1 Bildung von MPP^+ : 1-Methyl-4-phenyl-4-propionoxypiperidin (MPPP) eliminiert Propionsäure und wird zu 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP), welches durch MAO B zu 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP^+) oxidiert wird.

MPP^+ ist selektiv am Untergang der dopaminergen Neuronen beteiligt, da es als selektives Substrat des Dopamintransporters (DAT) in den Neuronen angereichert [von Bohlen und Halbach, 2005] und durch den transmembranären elektrochemischen Gradienten in den Mitochondrien konzentriert wird [Ramsay et al., 1986]. In den Mitochondrien inhibiert MPP^+ u.a. die NADH-Dehydrogenase des Komplexes I der Atmungskette, was letztendlich zum Zelltod führt [von Bohlen und Halbach, 2005]. Nach diesen Erkenntnissen begann die Suche nach MPP^+ -strukturverwandten Verbindungen aus der Umwelt oder im humanen Organismus selbst, die eventuell als Schlüssel für die Entstehung des Parkinsonsyndroms gelten könnten. Ins Auge fiel eine Substanzklasse, die sich von MPTP bzw. MPP^+ nur durch eine Stickstoffbrücke unterschied, die β -Carboline (siehe Abb. C-2).

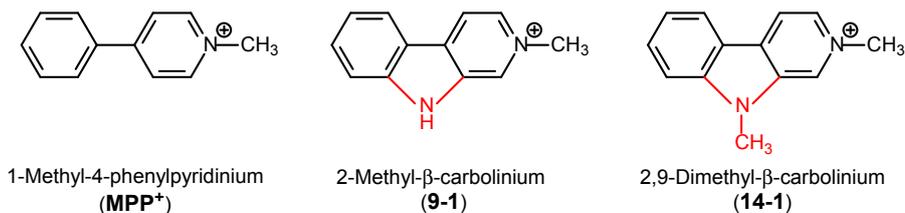


Abb. C-2 MPP^+ und strukturverwandte β -Carboline

β -Carboline sind ubiquitär in der Natur und auch im menschlichen Körper anzutreffen, deshalb lag die Vermutung einer möglichen Beteiligung in der parkinsonschen Pathogenese nahe. Bereits wenige Jahre nach den Zwischenfällen mit MPP⁺ bestätigten Collins und Neafsey diese Vermutung und fanden, daß 2-Methyl-tetrahydro- β -carbolin (**26**) parkinsonähnliche Symptome bei Affen auslösen kann [Collins et al., 1985].

Einige β -Carboline wurden, ähnlich wie das neurotoxische MPP⁺, als Inhibitoren der Dopaminaufnahme in striatalen Synaptosomen identifiziert [Drucker et al., 1990]. Matsubara et al. entdeckten wenige Jahre später, daß 2,9-Dimethyl- β -carbolin (**14-1**) nicht bei Kontrollen-Patienten, sondern nur in lumbaler Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) von Parkinson-Patienten nachgewiesen werden konnte, wohingegen 2-Methyl- β -carbolin (**9-1**) in beiden Proben auftauchte. Zusammen betrachtet ist die Gesamtmenge an methylierten und dimethylierten β -Carbolenen in Parkinson-Patienten signifikant höher als in der Kontrollgruppe [Matsubara et al., 1995]. Weiterhin wurde ein höherer Gehalt an **9-1** und **14-1** in der Substantia nigra als im Cortex gefunden, was auf eine Bevorzugung des erst genannten Gewebes schließen läßt [Matsubara et al., 1993].

Die Umwandlung von harmlosen, physiologisch vorkommenden, kaum neurotoxischen β -Carbolin-Derivaten (wie z.B. **3**, **4** oder **26**) in toxische β -Carbolinium-Verbindungen (wie z.B. **9-1** und **14-1**) geschieht durch enzymatische Oxidation der Tetrahydro- oder Dihydro- β -carboline zu aromatischen β -Carbolenen und durch Reaktion der partiell aromatischen und aromatischen β -Carboline mit verschiedenen S-Adenosyl-L-Methionin (SAM)-abhängigen N-Methyltransferasen [Drucker et al., 1990; Gearhart et al., 2002]. Die Reihenfolge dieser in vivo-Reaktionen ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

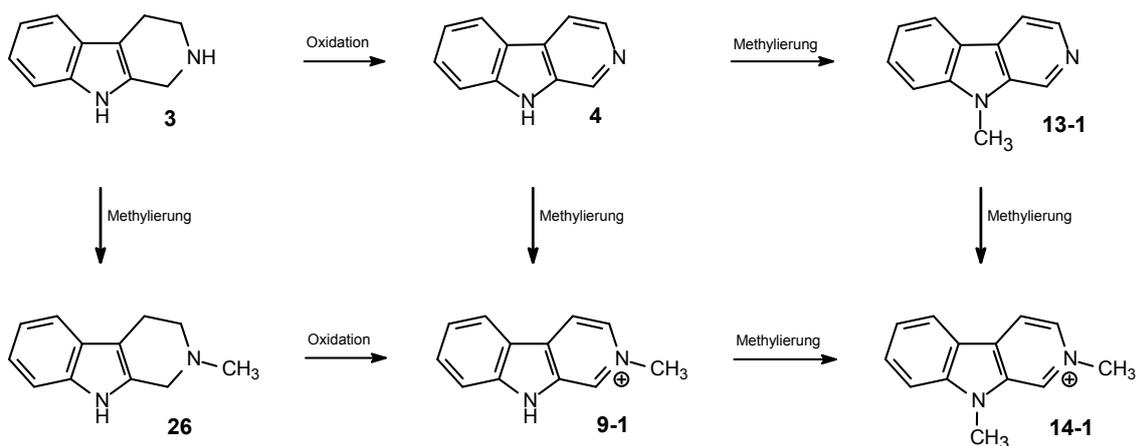


Abb. C-3 Umwandlung kaum neurotoxischer β -Carbolin-Derivate (wie z.B. **4** oder **26**) in toxische β -Carbolinium-Verbindungen (wie z.B. **9-1** und **14-1**); Zur Vereinfachung wurde die Graphik nur auf die Tetrahydro- β -carboline bezogen, läuft aber auch analog mit Dihydro- β -carbolenen ab.

Die *N*-Methyltransferasen lassen sich in 2*N*- (Methylierung des Pyridin-*N* in Position 2) und 9*N*-Methyltransferasen (Methylierung des Indol-*N* in Position 9) unterteilen. Eine Erhöhung der 9*N*-Methyltransferase-Konzentration um 450% im Frontalhirn von Parkinson-Patienten konnte post mortem gezeigt werden [Gearhart et al., 2000]. Da in nigralem Gewebe *N*-Methyltransferasen bei der Parkinson'schen Erkrankung erhöht exprimiert werden, werden auch β -Carbolinium-Derivate in diesem Areal bevorzugt gebildet. Seit einigen Jahren wird besonders die Phenylethanolamin-*N*-methyltransferase (PNMT) im Zusammenhang mit der in vivo-Methylierung der β -Carboline diskutiert. Diese kann verschiedene Derivate der Klasse sowohl in Position 2 als auch Position 9 methylieren [Gearhart et al., 2002], wobei letzteres der limitierende Schritt zu sein scheint [Collins et al., 1992]. Nagatsu et al. konnten PNMT in der Substantia nigra nachweisen [Nagatsu et al., 1998]. Gearhart et al. stellten bei der Parkinson'schen Erkrankung den spezifischen Zelltod von PNMT-exprimierenden Zellen fest, was möglicherweise mit der Bildung von β -Carbolinium-Derivaten in Zusammenhang steht [Gearhart et al., 2002].

Die Selektivität der neurotoxischen β -Carbolinium-Verbindungen auf dopaminerge Neuronen wird neben der vermuteten räumlichen Nähe von Bildungs- und Wirkort [Gearhart et al., 2002], ebenso die Aufnahme der Substanzen über den Dopamintransporter (DAT) und demzufolge die Kumulation in diesen Neuronen diskutiert.

Der Dopamintransporter ist an der präsynaptischen Seite hauptsächlich dopaminerger Neuronen lokalisiert. Er nimmt Dopamin aus dem synaptischen Spalt auf und beendet somit die Signalübertragung [Torres et al., 2003].

Während MPP⁺ ein DAT-abhängiges selektives Neurotoxin ist [Wernicke et al., 2007], konnte dies trotz selektiver Neuronenschädigung von **14-1** nicht nachgewiesen werden [Hamann et al., 2008].

C.1.1 Methodenbeschreibung

Die Untersuchungen wurden im Arbeitskreis unserer Kooperationspartner Frau Dr. Catrin Wernicke und Herrn Prof. Dr. Hans Rommelspacher an der Klinik und Hochschulambulanz für Psychiatrie und Psychotherapie der Charité Berlin durchgeführt.

Für diesen Test wurde eine Zelllinie von humanen embryonalen Nierenzellen HEK-239, als Wildtyp (HEK_{wt}) und als humaner Dopamintransporter exprimierende Zellen (HEK_{hDAT}), verwendet [Wernicke et al., 2007].

Die kultivierten Zellen wurden auf eine 96well-Platte gebracht und mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz inkubiert. Anschließend wurde in einem kolorimetrischen Assay, auch MTS-Assay genannt, die Zellvitalität getestet. Der Tetrazolium-Farbstoff MTS, dargestellt in Abb. C-4, wurde bei Anwesenheit von Phenazinmethosulfat durch Enzyme zu

einem wasserlöslichen Formazan reduziert, welches spektrometrisch bei 490-500 nm quantifiziert worden ist [Cory et al., 1991].

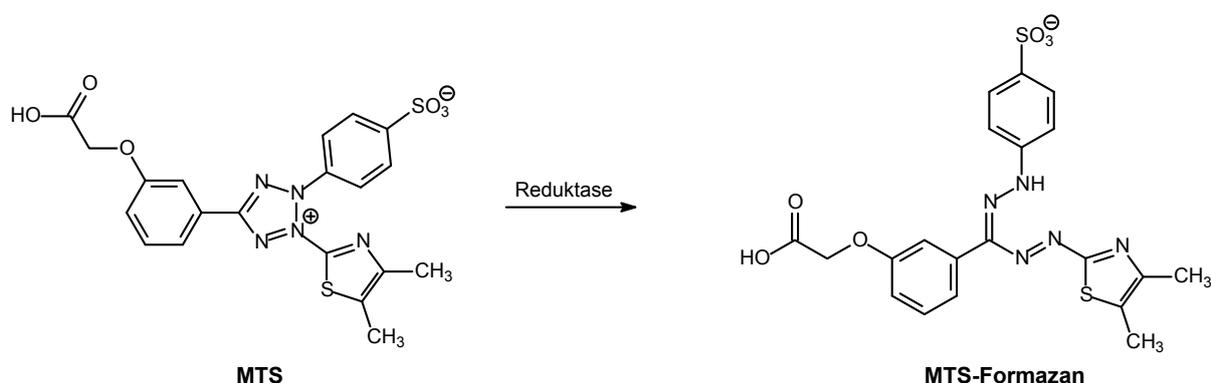


Abb. C-4 MTS-Assay (Das Tetrazolium-Derivat MTS (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4 sulfophenyl)-2H-tetrazolium) wird durch Reduktasen zu einem Formazan-Derivat umgesetzt.)

Substanzen, die Zelltoxizität und damit eine Abnahme der Enzymaktivität hervorrufen, führen zu einer verminderten Formazanbildung.

Die Ergebnisse wurden in EC_{50} -Werten (Mittelwert mit Standardabweichung) dargestellt.

Weiterhin wurde für ausgewählte Testsubstanzen ein β -Carbolin-Uptake-Assay durchgeführt.

Die Testsubstanzen wurden entsprechend ihrem, im MTS-Assay ermittelten EC_{50} -Wert, auf eine HEK_{wt} - und HEK_{hDAT} -Zellsuspension gegeben und für 60 min inkubiert. Anschließend wurde die Testsubstanz ausgewaschen und die Zellen lysiert. Die interzelluläre β -Carbolin-Konzentration konnte anschließend fluorimetrisch durch die spezifische Eigenfluoreszenz der Testsubstanzen bestimmt werden. Die Ergebnisse wurden in mol pro μ g Protein angegeben.

C.1.2 Ergebnisse und Diskussion

Zuerst wurden die chiralen Verbindungen **rac2** und **R2** auf Neurotoxizität untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle C-1 dargestellt.

Chiffre	Strukturformel	HEK_{wt} $EC_{50}[\mu M] \pm S.D.$	HEK_{hDAT} $EC_{50}[\mu M] \pm S.D.$
rac2		894 ± 152	118 ± 63
R2		499 ± 142	52 ± 29

Tabelle C-1 EC_{50} -Werte von **rac2** und **R2** gemessen im MTS-Assay

Die Toxizität, gemessen an den DAT-exprimierenden Zellen, war für das *R*-Enantiomer **R2** doppelt so hoch wie für das Racemat **rac2**. Gleichzeitig war auch die DAT-unabhängige Toxizität größer. Dies deutet darauf hin, daß **R2** auf einem DAT-unabhängigen Weg ins Zellinnere gelangen kann, wo es seine Toxizität entfaltet. Obwohl stereoisomere Eigenschaften des DAT früher bereits beschrieben wurden [Buck et al., 1994; Giros et al., 1994], konnte dies hier nicht bestätigt werden. Da Racemat und Enantiomer bezüglich der Lipophilie identische Eigenschaften aufweisen, ist nicht von einer vermehrten passiven Aufnahme auszugehen. Daher liegt entweder eine erhöhte mitochondriale Toxizität vor oder das Enantiomer gelangt durch andere aktive Transportsysteme in die Zelle.

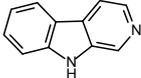
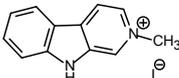
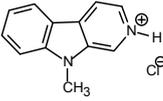
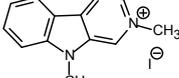
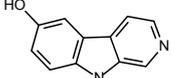
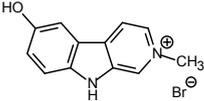
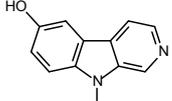
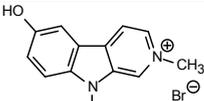
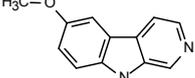
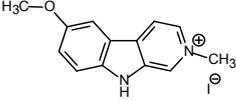
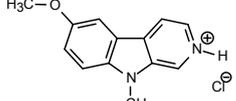
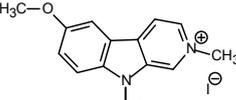
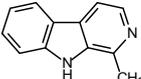
Die Durchführung des Uptake-Assays könnte klären, wieviel Testsubstanz wirklich in die Zellen aufgenommen worden ist, und ob dies mit der Toxizität korreliert. Bisher wurden solche Untersuchungen für diese Verbindungen noch nicht durchgeführt.

⇒ *Das R-Enantiomer von 1,2,2-Trimethyltetrahydro-β-carbolinium R2 besaß DAT-unabhängige, neurotoxischere Eigenschaften als das Racemat rac2.*

In Tabelle C-2 sind zwei Verbindungssätze von β-Carbolin-Derivaten dargestellt. Sie unterscheiden sich in der Methylgruppe in Position 1 (in der Verbindungsbezeichnung als „M“ für Methyl dargestellt). In den jeweiligen Verbindungssätzen sind Substitutionen in Position 2, 6 und 9 und verschiedene Kombinationen derer vorgenommen worden. Diese sind größtenteils bereits in einer vorangegangenen Diplomarbeit synthetisiert worden [Schott, 2005] und für eine Gesamtdiskussion in Tabelle C-2 mit aufgenommen worden.

Vergleicht man physiologisch vorkommende Konzentrationen von β-Carbolinen mit den im MTS-Assay ermittelten EC₅₀-Werten, so zeigt sich eine große Differenz. Dabei ist die physiologische Konzentration in pg/g Protein bestimmt worden [Matsubara et al., 1993], während die EC₅₀-Werte im µM-Bereich anzusiedeln sind. Auch wenn man die ermittelten Konzentrationen durch die verschiedenen Einheiten nicht direkt vergleichen kann, zeigt sich die angesprochene große Differenz, wodurch die pathologische Relevanz der β-Carboline bei der Parkinson'schen Erkrankung fraglich erscheint.

Weiterhin stellte sich das Zellmodell als spezifisch, aber nicht so sensitiv wie der physiologisch exprimierte DAT heraus. In der Literatur ist man sich dennoch einig, daß der Untergang dopaminerger Neuronen bei der Parkinson'schen Erkrankung durch eine Kombination von exogenen und endogenen Stressoren und dem Einfluß genetischen Erbanlagen geschieht. Dies macht die Zellen anfälliger, und Streß kann schlechter abgewehrt werden [Abou-Sleiman et al., 2006]. In Hinblick darauf sind die ermittelten toxischen Konzentrationen der β-Carboline, auch durch ihre chronische Einwirkung, pathologisch relevant.

Chiffre	Strukturformel	HEK _{wt} EC ₅₀ [$\mu\text{M} \pm \text{S.D.}$]	HEK _{hDAT} EC ₅₀ [$\mu\text{M} \pm \text{S.D.}$]
4		717 \pm 103	578 \pm 171
9-1		710 \pm 78	78 \pm 26
13-1		396 \pm 8	764 \pm 73
14-1**		116 \pm 32	43 \pm 11
4OH*		168 \pm 65	81 \pm 54
9OH-1*		1315 \pm 262	186 \pm 90
13OH-1*		1460 \pm 105	215 \pm 81
14OH-1*		>1000	>1000
4MeO*		215 \pm 50	213 \pm 10
9MeO-1*		380 \pm 25	283 \pm 41
13MeO-1*		292 \pm 23	247 \pm 18
14MeO-1*		53 \pm 16	32 \pm 3
4M**		169 \pm 78	215 \pm 90

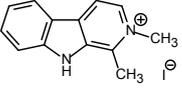
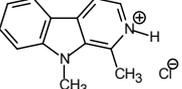
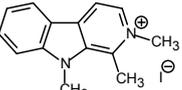
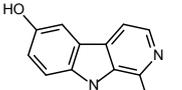
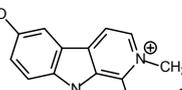
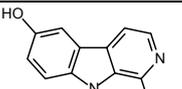
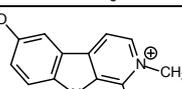
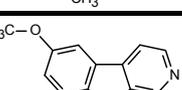
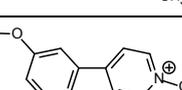
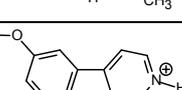
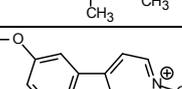
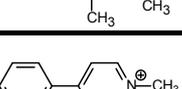
Chiffre	Strukturformel	HEK _{wt} EC ₅₀ [$\mu\text{M} \pm \text{S.D.}$]	HEK _{hDAT} EC ₅₀ [$\mu\text{M} \pm \text{S.D.}$]
9M-1**		445 \pm 98	85 \pm 50
13M-1**		147 \pm 46	227 \pm 80
14M-1**		168 \pm 24	48 \pm 17
4MOH*		53 \pm 20	139 \pm 45
9MOH-1*		535 \pm 125	73 \pm 57
13MOH-1*		130 \pm 47	97 \pm 27
14MOH-1*		1222 \pm 105	105 \pm 47
4MMeO*		93 \pm 20	118 \pm 56
9MMeO-1*		n.b.	n.b.
13MMeO-1*		88 \pm 50	110 \pm 10
14MMeO-1*		n.b.	n.b.
MPP*		113 \pm 10	0,4 \pm 0,1

Tabelle C-2 EC₅₀-Werte bestimmt im MTS-Assay; n.b. = nicht bestimmt; * Verbindungen bereits in einer vorangegangenen Diplomarbeit synthetisiert [Schott, 2005]; ** Verbindung bereits früher im Arbeitskreis synthetisiert

Die Struktur-Toxizitäts-Beziehungen lassen sich wie folgt beschreiben:

Bei den in Position 6 unsubstituierten Derivaten **4**, **9-1**, **13-1** und **14-1** war letztgenannte Verbindung die am stärksten neurotoxische. **9-1** und **14-1** zeigten beide eine stärkere DAT-abhängige als -unabhängige Toxizität.

Die Einführung einer Hydroxylgruppe in Position 6 führte bei den methylierten Derivaten **9OH-1**, **13OH-1** und **14OH-1** zu einer verminderten Toxizität im Vergleich zu den unsubstituierten Analoga, während die Methoxy-substituierten Derivate **4MeO**, **9MeO-1**, **13MeO-1** und **14MeO-1** stärkere neurotoxische Eigenschaften zeigten.

Die Derivate mit einer Methylgruppe in Position 1 (siehe 2. Tabellenhälfte) besaßen meist neurotoxischere z.T. auch unveränderte Effekte, als in dieser Position unsubstituierte Derivate.

Bis auf wenige Ausnahmen zeigten die mit einer Hydroxygruppe substituierten β -Carboline eine hohe DAT-abhängige Toxizität. Der Effekt war bei den Derivaten **4OH**, **9OH-1**, **13OH-1**, **9MOH-1** und **14MOH-1** besonders auffallend. In der strukturellen Ähnlichkeit dieser Verbindungen zu Dopamin, durch die Einführung einer Hydroxygruppe in Position 6 ist eine mögliche Erklärung hierfür zu finden. Weitere allgemeine Regeln der strukturellen Beeinflussung der DAT-abhängigen Toxizität durch andere Substituenten ließen sich aus diesen Daten nicht ermitteln.

14MeO-1 zeigte von allen untersuchten β -Carbolinen die stärksten neurotoxischen Eigenschaften mit EC_{50} -Werten von 53 μ M an den HEK_{wt}-Zellen und 32 μ M an den HEK_{hDAT}-Zellen. Die Verbindung scheint die Membran leicht überwinden zu können, denn die Effekte waren dabei unabhängig vom DAT. Im Vergleich zu MPP⁺, ist **14MeO-1** an den DAT-exprimierenden Zellen aber nur 1/100 mal so toxisch.

Für einige ausgewählte Verbindungen wurde der unter C.1.1 beschriebene Uptake-Assay durchgeführt und die Ergebnisse zusammen mit den EC_{50} -Werten des MTS-Assays in Tabelle C-3 dargestellt.

Dabei korreliert eine Konzentrationszunahme in den HEK_{hDAT} im Vergleich zu den HEK_{wt}, wie bei **13-1** zu sehen, nicht wie angenommen mit einer Zunahme der Toxizität, sondern mit einer Abnahme dieser. Ein Grund dafür könnte die Beeinträchtigung der Zellfunktionen inklusive der Transportfunktionen durch die Testsubstanzen sein. Die anderen Verbindungen zeigen keine DAT-abhängige intrazelluläre Konzentrationszunahme.

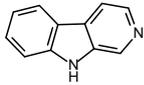
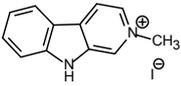
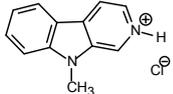
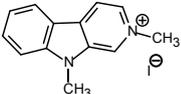
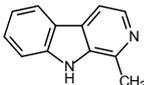
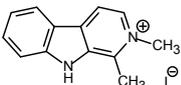
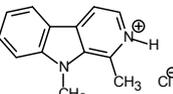
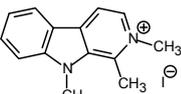
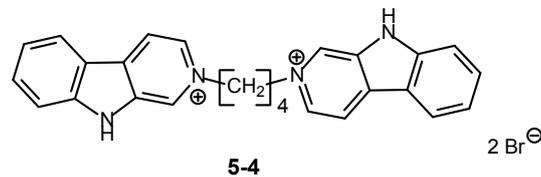
Chiffre	Strukturformel	HEK _{wt}		HEK _{hDAT}	
		EC ₅₀ [$\mu\text{M} \pm \text{S.D.}$]	Uptake-Assay Konz. [mol/ μg Protein]	EC ₅₀ [$\mu\text{M} \pm \text{S.D.}$]	Uptake-Assay Konz. [mol/ μg Protein]
4		717 \pm 103	2,4x10 ⁻⁶	578 \pm 171	1,9x10 ⁻⁶
9-1		710 \pm 78	4,4x10 ⁻⁷	78 \pm 26	2,4x10 ⁻⁷
13-1		396 \pm 8	9,6x10 ⁻⁷	764 \pm 73	1,6x10 ⁻⁶
14-1		116 \pm 32	9,0x10 ⁻⁸	43 \pm 11	8,0x10 ⁻⁸
4M**		169 \pm 78	2,4x10 ⁻⁶	215 \pm 90	1,8x10 ⁻⁶
9M-1**		445 \pm 98	1,4x10 ⁻⁷	85 \pm 50	8,4x10 ⁻⁸
13M-1**		147 \pm 46	2,7x10 ⁻⁶	227 \pm 80	2,7x10 ⁻⁶
14M-1**		168 \pm 24	1,0x10 ⁻⁷	48 \pm 17	7,9x10 ⁻⁸

Tabelle C-3 EC₅₀-Werte gemessen im MTS-Assay und Ergebnisse des Uptake-Assays (Konzentration der Testsubstanzen in den Zellen, gemessen beim jeweiligen EC₅₀-Wert); ** Verbindung bereits früher im Arbeitskreis synthetisiert

⇒ 6-Methoxy- und 1-Methyl-Derivate zeigten meist stärkere neurotoxische Eigenschaften, wohingegen die 6-Hydroxylierung im Allgemeinen zu einer gesteigerten DAT-abhängigen Toxizität führte. **14MeO-1** zeigte von allen untersuchten β -Carbolinen die stärksten neurotoxischen Eigenschaften. Korrelationen zwischen den im MTS-Assay ermittelten EC₅₀-Werten und den intrazellulären Konzentrationen der Testsubstanzen, gemessen im Uptake-Assay, sind nicht zu erkennen.

Das N2-bivalente Derivat **5-4** zeigte, trotz seiner im Vergleich zu Dopamin und anderen β -Carbolinen ausgeprägten Molekülgröße, eine hohe DAT-abhängige Toxizität und stellt demnach ein selektives Substrat des DAT dar.



Chiffre	HEK _{wt} EC ₅₀ [μ M] \pm S.D.	HEK _{hDAT} EC ₅₀ [μ M] \pm S.D.
5-4	1380 \pm 150	15 \pm 3

Tabelle C-4 EC₅₀-Werte von **5-4**, bestimmt im MTS-Assay

⇒ Trotz der Molekülgröße zeigte das untersuchte N2-homobivalente β -Carbolin **5-4** eine hohe DAT-abhängige und eine nur geringe DAT-unabhängige Neurotoxizität

Von den restlichen Zielverbindungen liegen zur Zeit noch keine Ergebnisse zu Neurotoxizitätsuntersuchungen vor.

C.2 Untersuchung auf neuroprotektive Eigenschaften

Bei den Untersuchungen auf Neurotoxizität ist eine Substanz auffällig geworden. Obwohl 9-Methyl- β -carbolin (**13-1**) je nach Zelltyp eine mittlere Toxizität mit einem EC₅₀ von 400 bis 800 μ M zeigte, hat die Substanz bei geringeren Konzentrationen ausgeprägte neuroprotektive Effekte auf dopaminerge Zellen. So fanden Hamann et al. heraus, daß **13-1** in der Lage ist, die Zahl der dopaminergen Neuronen konzentrationsabhängig um bis zu 20% zu erhöhen. Da dieser Effekt durch einen Inhibitor des Dopamintransporters aufgehoben werden konnte, läßt sich eine DAT-abhängige Aufnahme von **13-1** vermuten. Die signifikante Erhöhung der Zellzahl beschränkte sich nur auf dopaminerge Neuronen, während sich der Gesamtteil der Neuronen nur geringfügig änderte. Sie fanden weiterhin heraus, daß sich bei den Zellen durch die Behandlung mit **13-1** die LDH-Freisetzung verringerte, der intrazelluläre ATP-Gehalt stieg und die Anzahl der nekrotischen Zellen um 50% sank. Diese Effekte begünstigen die Überlebensfähigkeit der Zellen. Genexpressionsanalysen zeigten zudem, daß verschiedene Gene von inflammatorischen und apoptotischen Signaltransduktionswegen herunter reguliert wurden [Hamann et al., 2008]. Die aufgeführten Effekte von **13-1** zeigen, daß die Verbindung neuroprotektive Eigenschaften besitzt. Allgemein läßt sich sagen, daß Verbindungen mit neuroprotektiven Eigenschaften den Absterbeprozess verlangsamen bzw. die Neuronen vor dem Zelltod schützen. Sie können dabei selbst direkt

protektiv auf die Physiologie der Zelle wirken, protektive Faktoren in der Zelle stimulieren und/oder Faktoren, die zum Zelltod beitragen, inhibieren.

C.2.1 Methodenbeschreibung

Die folgenden Untersuchungen wurden in den Arbeitsgruppen unserer Kooperationspartner Frau Dr. Catrin Wernicke und Herrn Prof. Dr. Hans Rommelspacher an der Klinik und Hochschulambulanz für Psychiatrie und Psychotherapie der Charité Berlin durchgeführt.

Für diesen Test wurde die Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y verwendet. Die Länge der Neuriten wurde mit einer speziellen Software nach 14 Tagen Inkubation mit der Testsubstanz erfasst. Die Ergebnisse sind jedoch noch nicht publizierbar und werden zur Zeit noch weiter vervollständigt. Ein erster Trend ist aber anhand von Photographien der mit Testsubstanzen inkubierten Zellen bei unterschiedlichen Substanzkonzentrationen zu erkennen.

C.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Untersucht wurden bisher die 9-methylierten Derivate **13-1** und **13MeO-1** und das 9-Fluoroethyl-Derivat **13-2F** (siehe Abb. C-5) auf ihre neuroprotektive Wirkung. Dazu wurden sie für 14 Tage mit Neuroblastomzellen inkubiert (siehe Abb. C-6).

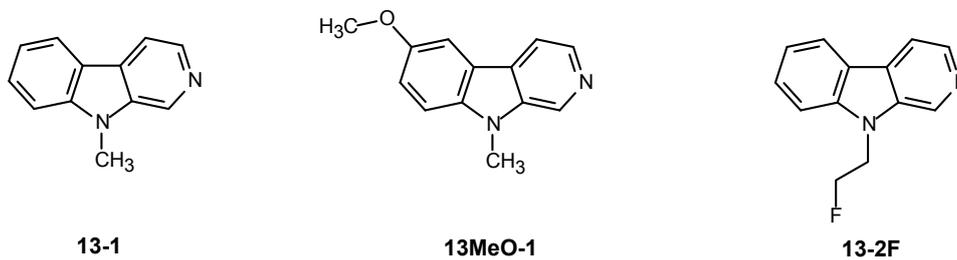
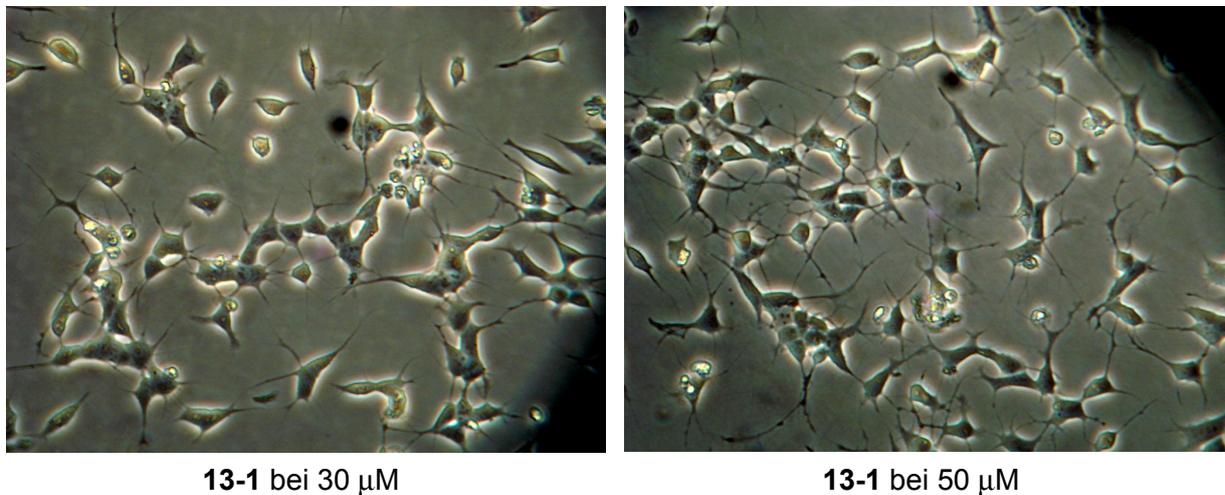
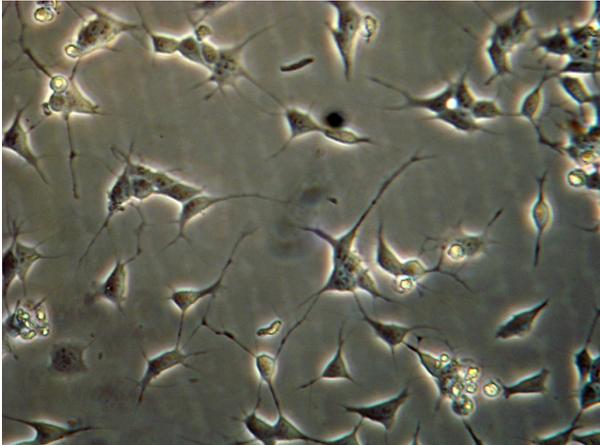


Abb. C-5 Auf neuroprotektive Wirkung untersuchte Substanzen

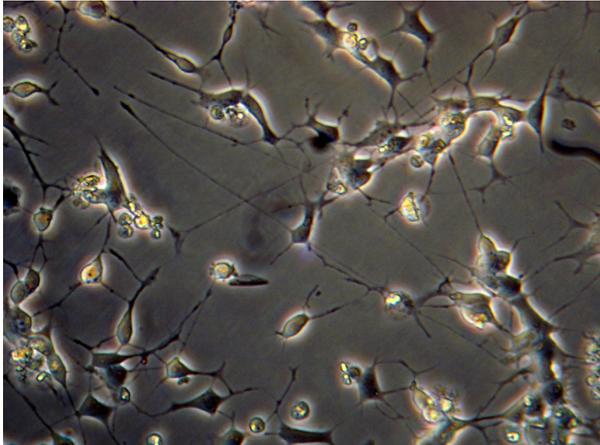


13-1 bei 30 µM

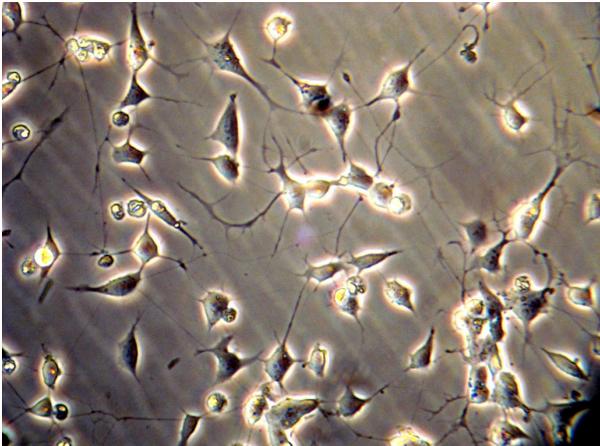
13-1 bei 50 µM



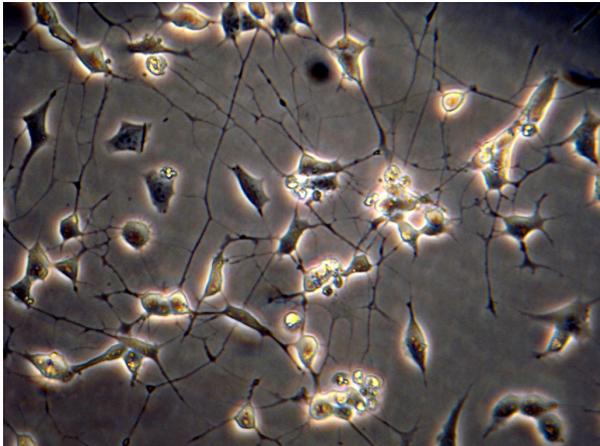
13MeO-1 bei 30 μM



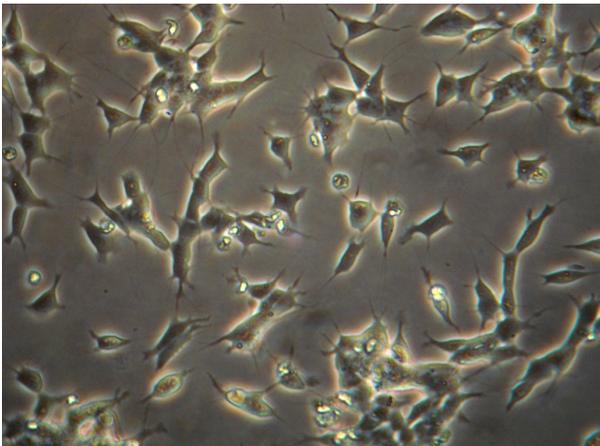
13MeO-1 bei 50 μM



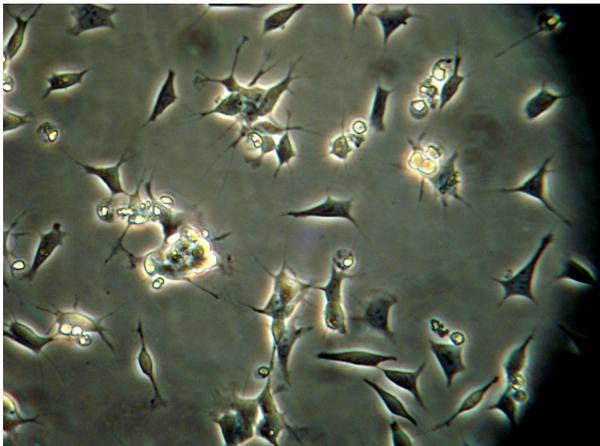
13-2F bei 30 μM



13-2F bei 50 μM



Kontrolle



Kontrolle

Abb. C-6 Inkubation von SH-SY5Y - Zellen für 14 Tage mit 13-1, 13MeO-1 und 13-2F (Testkonzentrationen 30 und 50 μM) und einer Kontrolle (ohne Testsubstanz)

Im Vergleich zur Kontrolle schienen die getesteten Substanzen das Neuritenwachstum (Anzahl und Länge) zu fördern. Die Substanz **13-2F** zeigte hierbei die beeindruckendsten Ergebnisse. Für **13-1** konnte bereits ebenfalls eine Zunahme der Neuronenanzahl nachgewiesen werden [Hamann et al., 2008], was für die anderen Substanzen noch nicht gelang, aber vermutet werden kann.

Die Verbindungen **13-2** und **13-3** zeigten in ersten Versuchen, im Vergleich zu den hier dargestellten Verbindungen **13-1**, **13-2F** und **13MeO-1**, schwächere neuroprotektive Effekte und wurden aus diesem Grunde nicht weiter untersucht. Daraus läßt sich schließen, daß Verbindungen mit größeren Alkyl-Substituenten in Position 9 die neuroprotektiven Eigenschaften vermindern. **13-2F** stellte hier eine Ausnahme dar. Die Fluoroethyl-Gruppe des Moleküls ist zwar isoster zur Ethylgruppe, allerdings ist ein Wasserstoffatom durch ein stark elektronegatives Fluoratom ersetzt, was einen positiven Einfluß auf die Neuroprotektivität zu haben scheint.

- ⇒ *Die Substanzen **13-1**, **13MeO-1** und **13-2F** scheinen einen günstigen Effekt auf das Wachstum der Zellen und somit einen neuroprotektiven Effekt zu haben. Ein größerer Alkyl-Substituent in Position 9 führt zu einer Verschlechterung der neuroprotektiven Eigenschaften.*

C.3 Bestimmung der inhibitorischen Aktivität an der AChE und BChE, Ellman Test

Die inhibitorische Aktivität der Testsubstanzen an der AChE und BChE kann in vitro im Ellman Test gut gemessen werden.

C.3.1 Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität

Zur Bestimmung der Cholinesterase-Aktivität wird das Ausmaß der enzymatischen Hydrolyse von ACh oder eines Analogons unter Freisetzung von Acetat gemessen. Zur Vereinfachung wird im nachfolgenden Abschnitt nur von der AChE und deren Substrat ACh gesprochen, gleiches gilt analog für die BChE mit Butyrylcholin (BCh) als Substrat.

Auf einige der verschiedenen in vitro-Methoden werde ich im nachfolgenden Abschnitt eingehen.

Hestrins Methode beruht z.B. darauf, das nicht umgesetzte Acetylcholin mit Hydroxylamid, Salzsäure und Eisen(III)-chlorid in einen roten ACh-Acethydroxamsäure-Komplex zu überführen, der anschließend spektrophotometrisch quantifiziert werden kann [Hestrin, 1949].

Ein gänzlich anderes Prinzip verfolgt die Methode von *Michel*. Hier wird die Änderung des pH-Werts durch die freigesetzte Essigsäure gemessen [Michel, 1949].

Wesentlich besser zu handhaben und viel genauer ist die neuere radiometrische Methode. Hier wird der Acetatrest des ACh radioaktiv markiert. Das durch die AChE abgespaltene ¹⁴C-Acetat wird dann mittels Szintillationsspektrometrie bestimmt [Potter, 1967; Reed et al., 1966].

Die Erkenntnis, daß der Thioester des Cholins analog dem Cholin ein Substrat der AChE ist, brachte neue methodische Ansätze. Dabei wird das Acetylthiocholin (ATC) als Substrat für die AChE eingesetzt und das Spaltprodukt Thiocholin mit Reagenzien zu einem spektrophotometrisch oder fluorimetrisch vermeßbaren Komplex umgesetzt. Der am häufigsten angewandte Test ist der von *Ellman* beschriebene [Ellman et al., 1961]. Die zugrunde liegende Reaktion ist in Abschnitt C.3.2 näher beschrieben.

C.3.2 Methodenbeschreibung

Die Messung der AChE- und BChE-Inhibition erfolgte mit Hilfe eines am Lehrstuhl etablierten Assays, der von Ellman et al. ursprünglich beschrieben [Ellman et al., 1961] und durch Kapková et al. modifiziert worden ist [Kapkova et al., 2003].

Das Meßprinzip beruht auf der Bildung eines chromophoren Systems, welches spektrophotometrisch bei 412 nm quantifiziert werden kann. Die Testsubstanzen wurden mit dem Enzym in Phosphatpuffer (pH 8) inkubiert und anschließend mit den Reagenzien 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB, Ellmans Reagenz) und ATC versetzt. ATC wurde durch

AChE enzymatisch in Thiocholin und Acetat gespalten. In einer zweiten Reaktion reagierte das freigesetzte Thiocholin im Verhältnis 1:1 mit dem zugesetzten DTNB zum Anion der 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB) (siehe Abb. C-7). Die TNB-Bildung konnte bereits mit bloßem Auge verfolgt werden. Eine schwache Gelbfärbung deutete auf eine starke Inhibition hin, wohingegen eine starke Färbung auf eine geringe Enzyminhibition schließen ließ. Die katalytische Reaktion verlief in gleicher Weise bei der Bestimmung der BChE-Aktivität mit Butyrylthiocholin (BTC) als Substrat ab [Gergel et al., 1997].

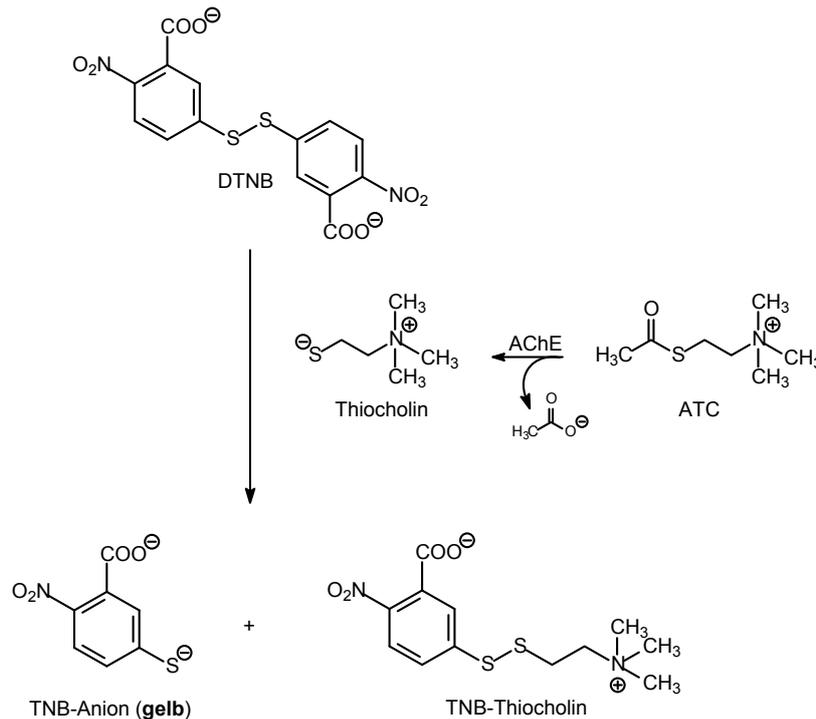


Abb. C-7 Farbreaktion des Ellman-Test

Von der jeweiligen Testsubstanz wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, wobei die Verdünnungsstufen von der Löslichkeit und der Aktivität bestimmt wurden. Idealerweise wurden fünf Verdünnungsstufen hergestellt, deren ermittelte Aktivität den Kurvenbereich von 0% bis 100% klar definierten. Jede Verdünnungsstufe wurde dreifach vermessen. Die erhaltenen prozentualen Aktivitätswerte wurden gegen die logarithmierte Konzentration der Testsubstanz aufgetragen. Daraus wurden anschließend mit Hilfe des Programms GraphPad PrismTM die Inhibitionskurve und der IC₅₀-Wert ermittelt (siehe Abb. C-8).

Die zugrunde liegende Gleichung des Fittings ist die unten dargestellte, die sog. „vier Parameter-Gleichung“.

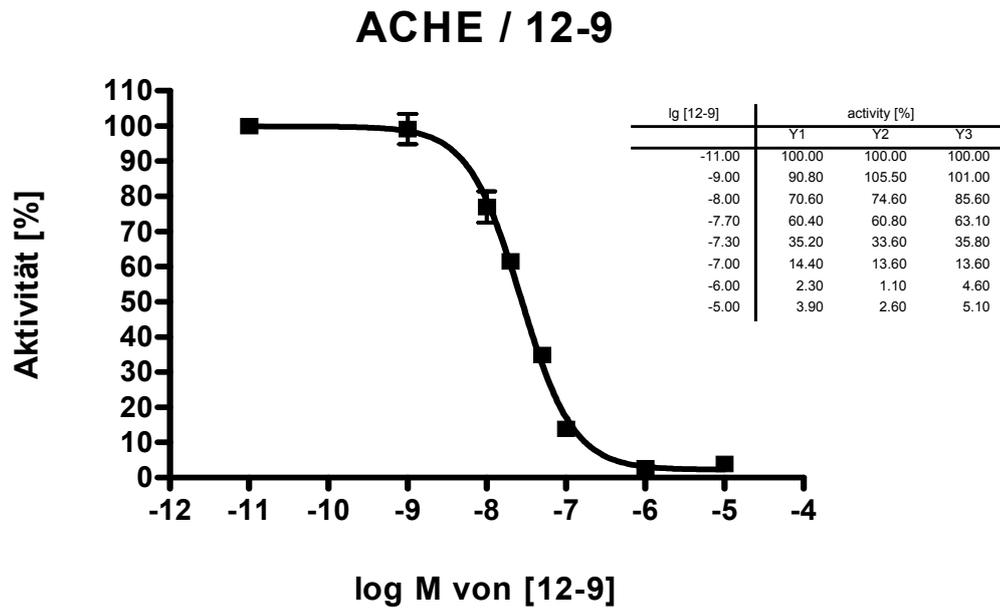
$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{(LogEC_{50} - X) \times Hillslope}}$$

X	Konzentration des Inhibitors
Y	Aktivität
Bottom	erreichtes unteres Plateau (Y nahe Null)
Top	erreichtes oberes Plateau (Y nahe 100)
Hillslope	Hill-Koeffizient oder Steigungsfaktor

IC₅₀ ist diejenige Inhibitorkonzentration, die zu einer halbmaximalen Hemmung des Enzyms führt. Ein anderer Begriff hierfür ist EC₅₀, die effektive Konzentration bei 50% Inhibition. Der Hillslope beschreibt die Steilheit der Kurve. Eine ideale Standard-Dosis-Wirkungskurve hat einen Hillslope von 1.

Die Ergebnisse werden nachfolgend mit IC₅₀-Werten angegeben und zur Fehlerabschätzung der zugehörige lgIC₅₀ mit seinem Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

Aus den erhaltenen IC₅₀-Werten wurde die Enzymselektivität der Testsubstanzen berechnet. Dazu wurde der Quotient aus IC₅₀(BChE) und IC₅₀(AChE) gebildet. Eine hohe Zahl zeigte AChE-Selektivität und eine niedrige Zahl BChE-Selektivität an.



	activity [%]
Sigmoidal dose-response (variable slope)	
Best-fit values	
BOTTOM	2.263
TOP	99.83
LOGEC50	-7.569
HILLSLOPE	-1.307
EC50	2.698e-008
Std. Error	
BOTTOM	1.713
TOP	1.740
LOGEC50	0.02923
HILLSLOPE	0.1003
95% Confidence Intervals	
BOTTOM	-1.310 to 5.836
TOP	96.20 to 103.5
LOGEC50	-7.630 to -7.508
HILLSLOPE	-1.516 to -1.097
EC50	2.345e-008 to 3.105e-008
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	20
R ²	0.9907
Absolute Sum of Squares	326.1
Sy.x	4.038
Data	
Number of X values	8
Number of Y replicates	3
Total number of values	24

Abb. C-8 Ergebnisse des Ellman-Tests am Beispiel der Verbindung 12-9. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad PrismTM; Standardabweichungen z.T. innerhalb der Punktbreite.

C.3.3 Ergebnisse

In Tabelle C-5 sind die Ergebnisse aller Zielverbindungen aufgeführt. Für gering aktive bzw. wenig lösliche Substanzen, bei denen keine IC_{50} -Bestimmung möglich war, wurde eine 3-fach Bestimmung der 10^{-5} M Verdünnung durchgeführt. Näherungen von >1000 oder >10000 wurden für eine Enzyminhibition bei 10^{-5} M von $<50\%$ und $>50\%$ bestimmt.

Die Verbindungen **1** und **2** und die Vorstufen **3**, **4**, **4Br**, **4OH**, **4MeO** wurden auf inhibitorische Aktivität an der AChE und BChE untersucht. Sie zeigten weniger als 50% Enzyminhibition bei einer Konzentration von 10^{-5} M und sind damit gering aktiv.

Der Ellman-Test ist ein in der Literatur anerkannter Test zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der Cholinesterasen. Die Ergebnisse können aber durch Verwendung eines abgewandelten Protokolls oder durch Verwendung von Enzymen unterschiedlicher Herkunft oft nicht direkt verglichen werden. Deshalb wurden Standardsubstanzen wie Tacrin und Galantamin in unserem Arbeitskreis erneut vermessen. Die Daten hierzu sind in Tabelle A-5 (siehe S.17) dargestellt.

Chiffre	AChE IC ₅₀ [nM] (-lgIC ₅₀ ± SEM)	BChE IC ₅₀ [nM] (-lgIC ₅₀ ± SEM)	AChE Selektivität
5-2	430 (6,367 ± 0,077)	319 (6,496 ± 0,063)	0,7
5-3	7661 (5,116 ± 0,139)	652 (6,186 ± 0,029)	0,1
5-4	278 (6,556 ± 0,158)	78 (7,109 ± 0,199)	0,3
5-5	595 (6,225 ± 0,063)	48 (7,311 ± 0,088)	0,1
5-6	248 (6,605 ± 0,070)	186 (6,730 ± 0,081)	0,8
5-7	81 (7,091 ± 0,068)	65 (7,188 ± 0,026)	0,8
5-8	113 (6,947 ± 0,076)	75 (7,120 ± 0,170)	0,7
5-9	125 (6,903 ± 0,074)	40 (7,392 ± 0,052)	0,3
5-10	63 (6,947 ± 0,076)	49 (7,309 ± 0,055)	0,8
5-11	92 (7,035 ± 0,053)	18 (7,741 ± 0,041)	0,3
5-12	86 (7,064 ± 0,024)	22 (7,665 ± 0,042)	0,3
5OH-5	4261 (5,371 ± 0,371)	1629 (5,788 ± 0,1317)	0,4
5MeO-5	>1000**	319 (6,496 ± 0,063)	< 0,3
5-11O	3141 (5,503 ± 0,042)	195 (6,709 ± 0,023)	0,1
5-Xy	147 (6,834 ± 0,110)	473 (6,358 ± 0,223)	3,2
6	564 (6,249 ± 0,034)	6331 (5,199 ± 0,040)	11,2
7	> 10000*	> 10000*	n.b.
8-5	> 1000**	> 1000**	n.b.
8-10	> 1000**	2895 (5,538 ± 0,073)	< 2,9
9-1	> 10000*	540 (6,267 ± 0,068)	< 0,1
9-2	2642 (5,578 ± 0,112)	760 (6,119 ± 0,057)	0,3

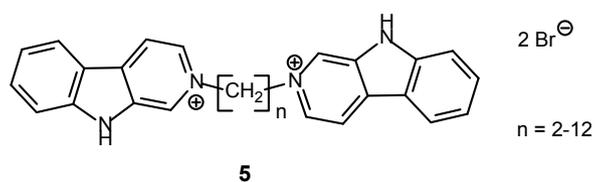
Chiffre	AChE IC ₅₀ [nM] (-lgIC ₅₀ ± SEM)	BChE IC ₅₀ [nM] (-lgIC ₅₀ ± SEM)	AChE Selektivität
9-3	3034 (5,518 ± 0,100)	816 (6,088 ± 0,0435)	0,3
9-8	845 (6,073 ± 0,030)	2305 (5,637 ± 0,099)	2,7
9-2OH	> 10000*	2243 (5,649 ± 0,058)	< 0,2
10-5	> 10000*	> 1000***	n.b.
10-9	> 10000*	> 10000*	n.b.
10-12	> 10000*	> 1000***	n.b.
11-5	280 (6,553 ± 0,055)	18,7 (7,728 ± 0,043)	0,1
11-9	0,5 (9,295 ± 0,074)	5,7 (8,246 ± 0,051)	11,4
11-12	1,2 (8,910 ± 0,047)	4,0 (8,402 ± 0,045)	3,3
12-9	27 (7,569 ± 0,029)	38 (7,424 ± 0,029)	1,4
13-1	> 10000*	> 10000*	n.b.
13-2	> 1000**	> 1000**	n.b.
13-3	> 10000*	> 1000**	n.b.
13-2F	> 10000*	8439 (5,074 ± 0,202)	< 0,8
13Br-1	> 10000*	> 10000*	n.b.
14-2	2567 (5,591 ± 0,103)	2019 (5,695 ± 0,029)	0,8
14-3	7958 (5,099 ± 0,060)	2723 (5,565 ± 0,066)	0,3

Tabelle C-5 IC₅₀-Werte, ermittelt im Ellman-Test; AChE Selektivität berechnet nach $[IC_{50} (BChE) / IC_{50} (AChE)]$;
 * < 50% Enzyminhibition bei 10⁻⁵ M; ** 50%-60% Enzyminhibition bei 10⁻⁵ M; *** 65% Enzyminhibition bei 10⁻⁵ M;
 n.b. = nicht bestimmbar

C.3.4 Diskussion

C.3.4.1 N2-bivalente β -Carboline

Es wurden 11 N2-homobivalente β -Carboline (**5**) auf inhibitorische Aktivität an der AChE und BChE untersucht und die Ergebnisse in Tabelle C-6 dargestellt.



Chiffre	AChE IC ₅₀ [nM] (-lgIC ₅₀ ± SEM)	BChE IC ₅₀ [nM] (-lgIC ₅₀ ± SEM)	AChE Selektivität
5-2	430 (6,367 ± 0,077)	319 (6,496 ± 0,063)	0,7
5-3	7661 (5,116 ± 0,139)	652 (6,186 ± 0,029)	0,1
5-4	278 (6,556 ± 0,158)	78 (7,109 ± 0,199)	0,3
5-5	595 (6,225 ± 0,063)	48 (7,311 ± 0,088)	0,1
5-6	248 (6,605 ± 0,070)	186 (6,730 ± 0,081)	0,8
5-7	81 (7,091 ± 0,068)	65 (7,188 ± 0,026)	0,8
5-8	113 (6,947 ± 0,076)	75 (7,120 ± 0,170)	0,7
5-9	125 (6,903 ± 0,074)	40 (7,392 ± 0,052)	0,3
5-10	63 (6,947 ± 0,076)	49 (7,309 ± 0,055)	0,8
5-11	92 (7,035 ± 0,053)	18 (7,741 ± 0,041)	0,3
5-12	86 (7,064 ± 0,024)	22 (7,665 ± 0,042)	0,3

Tabelle C-6 IC₅₀-Werte, ermittelt im Ellman-Test für die N2-Homobivalenten (**5**); AChE Selektivität berechnet nach [IC₅₀ (BChE) / IC₅₀ (AChE)]

Die Verbindungen **5** zeigten, abhängig von ihrer Kettenlänge, eine hohe Cholinesteraseinhibition im zwei- bis dreistelligen nanomolarem Bereich. Dabei ließ sich eine geringe Bevorzugung der BChE, besonders für die Spacerlängen 3 und 5, erkennen. Ab einer Spacerlänge von 7 Methylengruppen hemmten die Substanzen beide Enzyme in größerem Maße, was in Abb. C-9 gut erkennbar ist. Ein Grund für die Spacer-abhängige hohe Aktivität könnte die Wechselwirkung der Verbindung mit beiden Bindungsstellen, dem aktiven Zentrum und der PAS sein.

Holzgrabe et al. berichten, daß eine bivalente Substanz mindestens einen Spacer mit 7 Atomen (im Artikel auf Tacrin bezogen, wobei 5 Methylengruppen und 2 sekundäre Stickstoffe, also 7 Atome den Spacer bilden) benötigt, um an beiden Bindungsstellen der AChE anzugreifen [Holzgrabe et al., 2007], was auch für die *N2*-Homobivalenten (**5**) bestätigt werden konnte.

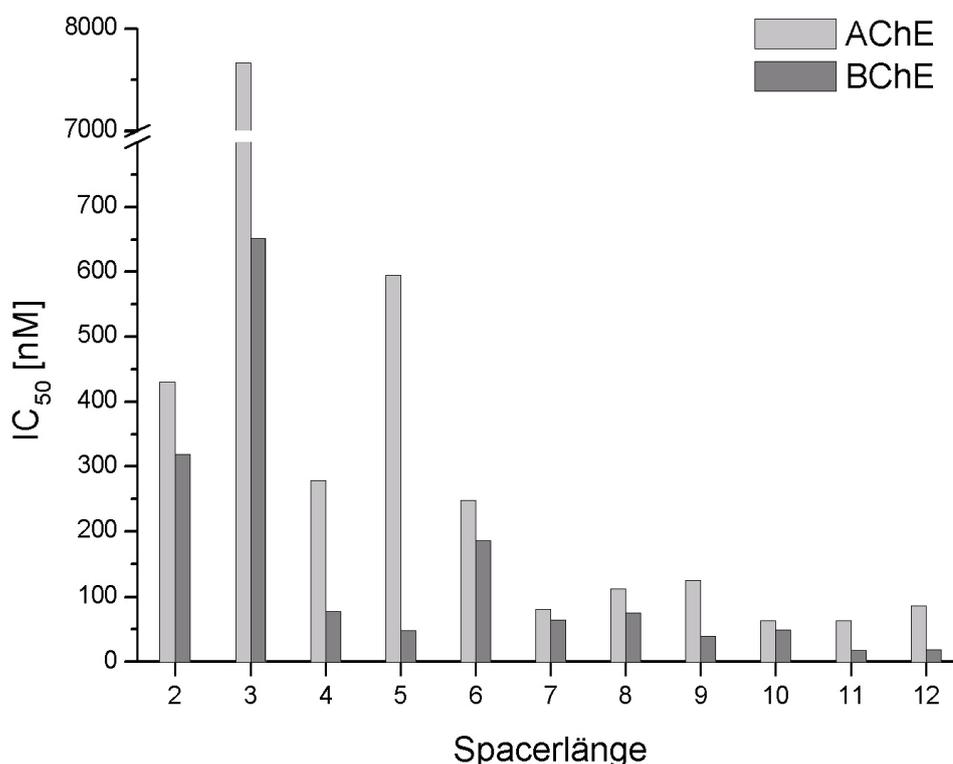
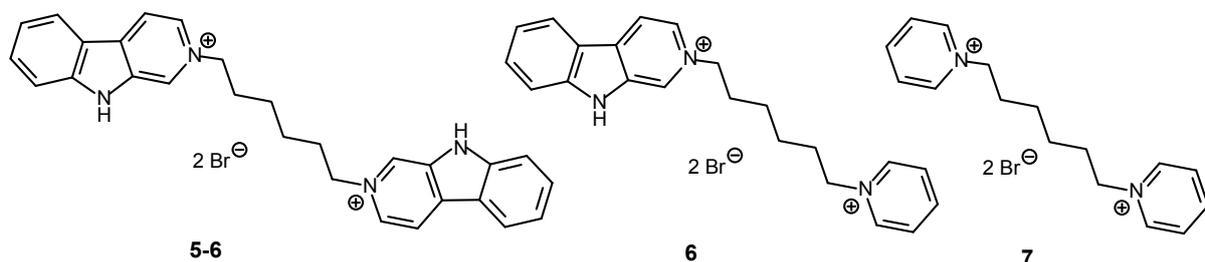


Abb. C-9 Korrelation der IC₅₀-Werte von **5-2** bis **5-12** mit der jeweiligen Spacerlänge

Weiterhin wurde der Einfluß einer Hydroxy- und einer Methoxygruppe in Position 6 auf die inhibitorische Aktivität untersucht. Die Ergebnisse und die Grundstruktur sind in Tabelle C-7 aufgeführt. Beide Substitutionen führten zu einer Aktivitätsabnahme, an der AChE um den Faktor 10, an der BChE um den Faktor 10-30.

Weiterhin wurde eine Verbindung mit einem starren Spacer *p*-Xylyl synthetisiert (**5-Xy**) und im Ellman-Test untersucht. Der Abstand der zwei aromatischen Zentren entsprach in etwa dem von **5-6**. Vergleicht man nun **5-6** mit **5-Xy** so erkennt man eine Verschiebung der Selektivität zugunsten der AChE-Inhibition bei etwa gleich bleibenden Aktivitäten. Daraus läßt sich vermuten, daß die Homobivalenten nicht zusammengefaltet, sondern langgestreckt in der Bindungstasche vorliegen.

Um auch den Einfluß des aromatischen Trizykus der *N*2-Homobivalenten zu ermitteln, wurden die Verbindungen **6** und **7** untersucht (siehe Tabelle C-9).



Chiffre	AChE IC ₅₀ [nM] (-lgIC ₅₀ ± SEM)	BChE IC ₅₀ [nM] (-lgIC ₅₀ ± SEM)	AChE Selektivität
5-6	248 (6,605 ± 0,070)	186 (6,730 ± 0,081)	0,8
6	564 (6,249 ± 0,034)	6331 (5,199 ± 0,040)	11,2
7	> 10000*	> 10000*	n.b.

Tabelle C-9 IC₅₀-Werte, ermittelt im Ellman-Test für **6** und **7**; AChE Selektivität berechnet nach [IC₅₀ (BChE) / IC₅₀ (AChE)]; * < 50% Enzyminhibition bei 10⁻⁵ M; n.b. = nicht bestimmbar

Verbindung **6** zeigte im Vergleich zu **5-6** mit dem Wert 11,2 eine gesteigerte AChE-Selektivität, bei einem Aktivitätsverlust an der AChE um den Faktor 2 und an der BChE um den Faktor 30. Ein Austausch des zweiten β -Carboline-Trizykus gegen einen Pyridin-Ring (**7**) führte zu einem vollständigen Verlust der inhibitorischen Aktivität. Für die Wechselwirkung der Derivate **5** mit den Bindungsstellen der Cholinesterasen ist ein großes aromatisches Gerüst, wie das β -Carboline, essentiell, wobei dies im Fall von **6** besonders für die BChE gilt.

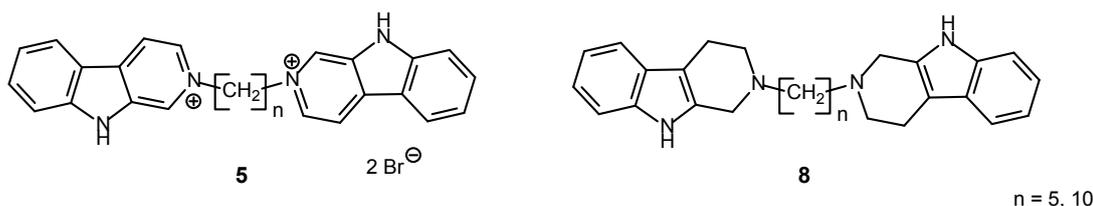
⇒ Die *N*2-homobivalente β -Carboline (**5**) zeigten bei einer Spacerlänge von 2-6 einen IC₅₀-Wert im drei- bis vierstelligen nanomolaren Bereich, während die Derivate mit einer Spacerlänge von 7-12 IC₅₀-Werte nur im zwei oder niedrig dreistelligen nano-

molaren Bereich besaßen. Für alle Derivate **5** ergab sich eine minimal höhere Aktivität an der BChE.

- ⇒ Hydroxylierung und Methoxylierung in Position 6 führten zu einer Aktivitätsverringerng, was sich auch für den oxygenierten und starren Spacer gezeigt hat.
- ⇒ Der Austausch eines oder beider aromatischer Trizyklen der homobivalenten β -Carboline durch Pyridin führte zu einer Aktivitätsabnahme.

C.3.4.2 Partiiell reduzierte N2-homobivalente β -Carboline

Quartäre Verbindungen, wie die in der Arbeit beschriebenen N2-homobivalente β -Carboline (**5**), sind wegen ihrer permanenten Ladung im Allgemeinen schlecht membrangängig. Um analoge, nicht quartäre Derivate zu erhalten, wurden zwei Derivate **5** partiell reduziert. Die dadurch erhaltenen Tetrahydro-Derivate **8** besitzen keine permanente Ladung mehr und könnten somit besser membrangängig sein.



Chiffre	AChE IC ₅₀ [nM] (-lgIC ₅₀ ± SEM)	BChE IC ₅₀ [nM] (-lgIC ₅₀ ± SEM)	AChE Selektivität
5-5	595 (6,225 ± 0,063)	48 (7,311 ± 0,088)	0,1
8-5	> 1000*	> 1000*	n.b.
5-10	63 (6,947 ± 0,076)	49 (7,309 ± 0,055)	0,8
8-10	> 1000**	2895 (5,538 ± 0,073)	< 2,9

Tabelle C-10 IC₅₀-Werte, ermittelt im Ellman-Test für reduzierte N2-Homobivalente (**8**); AChE Selektivität berechnet nach [IC₅₀ (BChE) / IC₅₀ (AChE)]; * 50% Enzyminhibition bei 10⁻⁵ M; ** 52% Enzyminhibition bei 10⁻⁵ M; n.b. = nicht bestimmbar

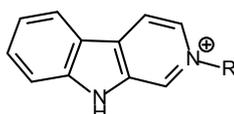
Dies führte allerdings, wie in Tabelle C-10 dargestellt, zu nur noch gering aktiven Substanzen. Der quartäre Stickstoff bzw. eine positive Ladung in Position 2 scheinen also für diese Substanzklasse essentiell zu sein.

⇒ Die Reduktion der N2-homobivalenten β -Carboline (**5**) zu Tetrahydro-Derivaten (**8**) führte zu einem starken Aktivitätsverlust.

C.3.4.3 N2-monovalente β -Carboline

Durch die Darstellung monovalenter Substanzen sollte geklärt werden, ob das zweite aromatische System der bivalenten Verbindungen für die Bindung zum Enzym notwendig ist oder ob ein β -Carbolinium mit einer Methylenkette für die Bindung zum Enzym ausreicht. In Tabelle C-11 wurden die Ergebnisse der Derivate **9** mit den Bivalenten **5** gleicher Spacerlänge verglichen.

9-2 und **9-8** zeigten im Vergleich zu ihren bivalenten Analoga **5-2** und **5-8** einen Aktivitätsverlust an der AChE und an der BChE. **9-3** stellte hier eine Ausnahme dar. Zwar war die BChE-Aktivität leicht vermindert, die AChE-Aktivität war dagegen um den Faktor 2 gestiegen. **9-1** und **9-2OH** zeigten sehr geringe Aktivität an der AChE und an der BChE jedoch moderate Aktivitäten im drei- bis vierstellig nanomolaren Bereich.



R = CH₃, C₂H₅, C₃H₇, C₈H₁₇, C₂H₄OH

9

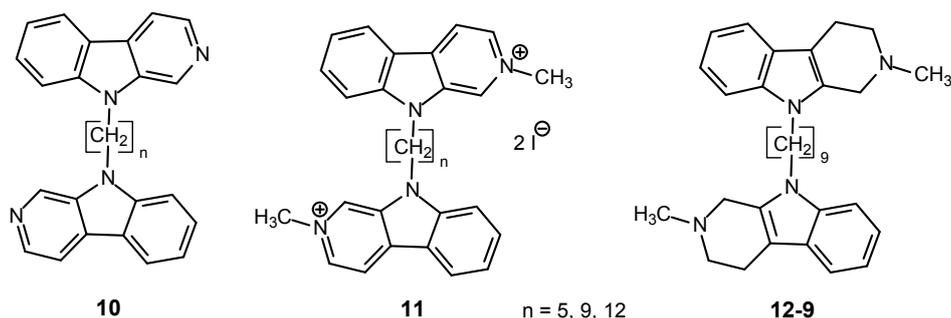
Chiffre	AChE IC ₅₀ [nM] (-lgIC ₅₀ ± SEM)	BChE IC ₅₀ [nM] (-lgIC ₅₀ ± SEM)	AChE Selektivität
9-1	> 10000*	540 (6,267 ± 0,068)	< 0,1
9-2	2642 (5,578 ± 0,112)	760 (6,119 ± 0,057)	0,3
9-3	3034 (5,518 ± 0,100)	816 (6,088 ± 0,0435)	0,3
9-8	845 (6,073 ± 0,030)	2305 (5,637 ± 0,099)	2,7
9-2OH	> 10000*	2243 (5,649 ± 0,058)	< 0,2
5-2	430 (6,367 ± 0,077)	319 (6,496 ± 0,063)	0,7
5-3	7661 (5,116 ± 0,139)	652 (6,186 ± 0,029)	0,1
5-8	113 (6,947 ± 0,076)	75 (7,120 ± 0,170)	0,7

Tabelle C-11 IC₅₀-Werte, ermittelt im Ellman-Test für reduzierte N2-monovalente (**9**) und zum Vergleich ausgewählte N2-homobivalente β -Carboline (**5**); AChE Selektivität [IC₅₀ (BChE) / IC₅₀ (AChE)]; * < 50% Enzyminhibition bei 10⁻⁵ M

⇒ Die N2-monovalenten β -Carboline zeigten geringe Aktivitäten im drei- bis vierstelligen nanomolaren Bereich. Die Entfernung des zweiten aromatischen Systems führte also bei allen, bis auf **9-3**, generell zu einer Aktivitätsabnahme.

C.3.4.4 N9-homobivalente β -Carboline

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Untersuchung der N9-Bivalente im Ellman-Test. Es wurden die Verbindungen **10**, deren methylierte Derivate **11** und das partiell reduzierte Analogon **12-9** untersucht und die Ergebnisse in Tabelle C-12 dargestellt.



Chiffre	AChE IC ₅₀ [nM] (-lgIC ₅₀ ± SEM)	BChE IC ₅₀ [nM] (-lgIC ₅₀ ± SEM)	AChE Selektivität
10-5	> 10000*	> 1000**	n.b.
10-9	> 10000*	> 10000*	n.b.
10-12	> 10000*	> 1000**	n.b.
11-5	280 (6,553 ± 0,055)	18,7 (7,728 ± 0,043)	0,1
11-9	0,5 (9,295 ± 0,074)	5,7 (8,246 ± 0,051)	11,4
11-12	1,2 (8,910 ± 0,047)	4,0 (8,402 ± 0,045)	3,3
12-9	27 (7,569 ± 0,029)	38 (7,424 ± 0,029)	1,4

Tabelle C-12 IC₅₀-Werte ermittelt im Ellman-Test für aromatische, quartäre und reduzierte N9-homobivalente β -Carboline (**10,11,12-9**); AChE Selektivität [IC₅₀ (BChE) / IC₅₀ (AChE)]; * < 40% Enzyminhibition bei 10⁻⁵ M; ** 65% Enzyminhibition bei 10⁻⁵ M; n.b. = nicht bestimmbar

Die Verbindungen **10** zeigten unabhängig von der Anzahl der Atome des Spacers eine sehr geringe Enzym-inhibitorische Aktivität. Durch die Methylierung in Position 2, also die Einführung einer permanenten positiven Ladung an dieser Stelle, sanken die IC₅₀-Werte an

beiden Cholinesterasen in den einstelligen nanomolaren Bereich. Besonders die Verbindungen **11-9** und **11-12** scheinen optimale Kettenlängen zu besitzen, um möglichst starke oder zahlreiche Wechselwirkungen mit AChE und BChE einzugehen. Vermutlich können beide β -Carbolinium-Einheiten π -Kation- bzw. π - π -Wechselwirkungen zu aromatischen Aminosäuren der Cholinesterasen ausbilden; eine Einheit hat vermutlich Wechselwirkungen mit dem Tryptophan (W84 (AChE) und W82 (BChE)) im aktiven Zentrum und die zweite Einheit mit verschiedenen Aminosäuren der PAS (möglich wären hier D72, Y334, W279, Y70, Y121 oder E278).

Die Länge des Spacers von 5 Atomen der Verbindung **11-5** scheint nicht ausreichend zu sein, um Wechselwirkungen an beiden Bindungsstellen (aktives Zentrum und PAS) einzugehen. Dies wurde vorangehend auch für die *N*2-bivalenten β -Carboline (**5**) gezeigt (siehe Abschnitt A.1.3.2). Die partielle Reduktion des aktivsten Derivates **11-9** zu einem nicht quartären und damit, aufgrund der gesteigerten Lipophilie, vermutlich besser membrangängigen Derivat **12-9**, zeigte eine generell leicht verminderte Aktivität. Dennoch besaß die Verbindung IC_{50} -Werte im niedrigen zweistelligen nanomolaren Bereich und ist damit im Aktivitätsbereich von Donepezil und Tacrin (siehe Abschnitt A.1.3.2, S. 13).

Die pK_a -Kalkulation (Software ACD Version 5.11, Advanced Chemistry Development Inc. (ACD/Labs)) für den protonierten Stickstoff in Position 2 von **12-9** und **10-9** ergab Werte von 9,6 und 7,1. Dies bedeutet, daß bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 die Verbindung **12-9** fast vollständig protoniert und **10-9** zu ca. 50% protoniert vorliegt. Die hohe Protonierungsrate von **12-9** und die damit verbundenen positiven Ladungen im Molekül **12-9** könnten die hohe Aktivität erklären. Trotz der kalkulierten Protonierung in vivo ist die Verbindung nicht permanent geladen, wie die Verbindungen **11**, und hat dadurch möglicherweise Vorteile bei der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke. Eine Bestimmung des Verteilungskoeffizienten, um eine genauere Aussage über die Lipophilie von **12-9** treffen zu können, oder die Untersuchung der Membrangängigkeit selbst könnten darüber letztendlich Aufschluß geben.

Auch hier zeigten die getesteten Substanzen keine Enzymselektivität.

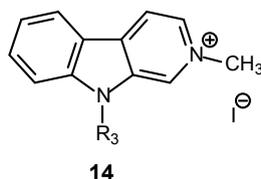
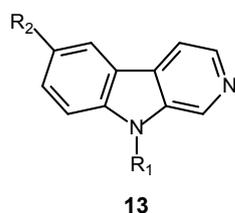
Wie bereits in Abschnitt C.1 beschrieben, können β -Carboline nachweislich durch *N*-Methyltransferasen im Zentralnervensystem in Position 2 methyliert werden. So könnten die Derivate **10** auch als Prodrugs für die Derivate **11** angesehen werden.

⇒ *Die *N*9-homobivalenten β -Carboline **10** zeigten sehr schwache Aktivitäten. Die Methylierung und damit Quartärnisierung in Position 2 führte zu gesteigerten Aktivitäten an AChE und BChE. **11-9** zeigte die stärkste inhibitorische Aktivität aller Zielsubstanzen mit einem IC_{50} (AChE) von 0,5 nM und einer IC_{50} (BChE) von 5,7 nM.*

Die partielle Reduktion zu **12-9** führte zu einem geringfügig schwächer aktiven, aber nicht quartären und somit besser membrangängigen Derivat.

C.3.4.5 N9-monovalente und N2,N9-disubstituierte, monovalente β -Carboline

Die Derivate **13** und **14**, die als monovalente Analoga von **10** und **11** angesehen werden können, wurden ebenfalls im Ellman-Test untersucht (siehe Tabelle C-13). Die Verbindungen **13** zeigten, analog den bivalenten Verbindungen **10**, sehr geringe Aktivitäten, wohingegen die quartären Derivate **14** höhere Aktivitäten aufwiesen. Dies läßt wieder π -Kation-Wechselwirkungen mit der anionischen Bindungsstelle des aktiven Zentrums vermuten. Insgesamt zeigten die N9- und die N2,N9-disubstituierten monovalente β -Carboline sehr geringe Aktivitäten im mikromolarem Bereich.



R₁ = CH₃, C₂H₅, C₃H₇, C₂H₄F

R₂ = H, Br

R₃ = C₂H₅, C₃H₇

Chiffre	AChE IC ₅₀ [nM] (-lgIC ₅₀ ± SEM)	BChE IC ₅₀ [nM] (-lgIC ₅₀ ± SEM)	AChE Selektivität
13-1	> 10000*	> 10000*	n.b.
13-2	> 1000**	> 1000**	n.b.
13-3	> 10000*	> 1000**	n.b.
13-2F	> 10000*	8439 (5,074 ± 0,202)	< 0,8
13Br-1	> 10000*	> 10000*	n.b.
14-2	2567 (5,591 ± 0,103)	2019 (5,695 ± 0,029)	0,8
14-3	7958 (5,099 ± 0,060)	2723 (5,565 ± 0,066)	0,3

Tabelle C-13 IC₅₀-Werte, ermittelt im Ellman-Test für N9-monovalente (**13**) und N2,N9-substituierte monovalente β -Carboline (**14**); AChE Selektivität [IC₅₀ (BChE) / IC₅₀ (AChE)]; * < 50% Enzyminhibition bei 10⁻⁵ M; ** < 60% Enzyminhibition bei 10⁻⁵ M; n.b. = nicht bestimmbar

-
- ⇒ *Die N9- und N2,N9-disubstituierten monovalenten β -Carboline zeigten sehr geringe Aktivitäten im mikromolaren Bereich.*
- ⇒ *Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Verknüpfung der β -Carboline über N2 und N9 sinnvoll war, da sich gesteigerte inhibitorische Aktivitäten verglichen mit den N2- und N9-substituierten monovalenten Analoga ergaben. Die Verknüpfung der bivalenten β -Carboline über N9 scheint durch die hohen Aktivitäten und möglicherweise bessere Membrangängigkeit des nicht permanent geladenen Derivates **12-9** am erfolgversprechendsten im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung zu sein.*

C.4 β -Amyloid Aggregation und deren Beeinflussung durch verschiedene Faktoren

Die Alzheimer'sche Erkrankung zeigt zwei pathologische Auffälligkeiten im Gehirn: Das Vorkommen von intrazellulären Neurofibrillen (näher besprochen in Abschnitt A.1.1) und extrazellulären β -Amyloid-Plaques. Der Hauptbestandteil der Plaques sind β -Amyloid-Peptide ($A\beta$) mit 40 bzw. 42 Aminosäuren. Alle $A\beta$ -Formen werden aus einem Membranprotein, dem „amyloid precursor protein“, kurz APP, durch Reaktion mit verschiedenen Sekretasen freigesetzt (siehe Abb. C-10).



Abb. C-10 Schematische Darstellung von APP und den Schnittstellen der Sekretasen α , β und γ (nach [Sisodia et al., 2002])

APP besteht aus 770 Aminosäuren und kann auf zwei Wegen gespalten werden [Sisodia et al., 2002]:

- dem nicht-amyloidogenen Weg: α -Sekretasen spalten in einem ersten Schritt APP in der $A\beta$ -Sequenz, so daß kein $A\beta$ entstehen kann
- dem amyloidogenen Weg: β -Sekretasen spalten $A\beta$ -Sequenz am N-Terminus von APP ab und γ -Sekretasen spalten $A\beta$ am C-Terminus ab, so daß ein Protein mit 38-43 Aminosäuren, je nach Schnittstelle der Sekretase, freigesetzt wird

$A\beta$ 42 unterscheidet sich von $A\beta$ 40 lediglich im C-Terminus, der bei $A\beta$ 42 zusätzlich die Aminosäuren Isoleucin und Alanin enthält. Dieser Unterschied bewirkt eine enorme Verschlechterung der Löslichkeit und schnellere Fibrillen-Bildung des Peptides [Harper et al., 1997].

Die Aggregation verläuft stets in 2 Phasen [Fändrich, 2007; Hortschansky et al., 2005]:

- In der lag-Phase oder Verzögerungsphase werden Aggregationskerne gebildet, bis eine kritische Anzahl erreicht ist und es zur spontanen Aggregation kommen kann. Die Dauer dieser Phase wird auch als lagtime bezeichnet.
- In der Wachstumsphase wachsen die in der die gebildeten Aggregationskerne.

Die Aggregate bestehen hauptsächlich aus Fibrillen, die eine β -Faltblatt-Struktur aufweisen, wobei die Wechselwirkungen zwischen den Fibrillen senkrecht zur Fibrillen-Achse sind. Diese Sekundärstruktur des Peptides wird deshalb „cross- β -Konformation“ genannt.

β -Amyloid-Plaques wurden auch in post mortem gewonnen Hirngewebe von Patienten gefunden, die vor ihrem Tod keinerlei kognitive Einschränkungen zeigten [Guillozet et al., 1997]. Daraus ergibt sich folgende Frage:

Was macht β -Amyloid-Plaques zu pathogenen Plaques mit Auswirkungen auf die Kognition?

Die Cholinesterasen, AChE und BChE, werden in diesem Zusammenhang als bedeutend diskutiert. Es wurden beide Esterasen in Plaques und Neurofibrillen nachgewiesen, wobei nur für die AChE eine gesteigerte Aggregation des A β in vitro nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. C-11 a). Mit steigender AChE-Konzentration nimmt die Bildung von A β -Aggregaten (siehe Abb. C-11 b) [Bartolini et al., 2003], sowie die Zytotoxizität der β -Amyloid-Plaques zu [Munoz et al., 1999]. Weiterhin wird durch die AChE die A β -Aggregation beschleunigt und die lag-Phase verkürzt [Inestrosa et al., 2005b]. BChE zeigt dagegen z.T. eher eine Reduktion der A β -Aggregation und damit eine Verschiebung zu kleineren Fibrillen und amorphen Aggregaten, die sich in vitro als stärker zytotoxisch als ausgereifte Fibrillen erwiesen haben [Guillozet et al., 1997; Klein, 2002]. Zusätzlich wird eine Funktion von BChE bei der Plaque-Reifung vermutet, da diese eher mit gereiften Plaques als mit diffusen, jungen Plaques assoziiert ist [Ballard, 2002].

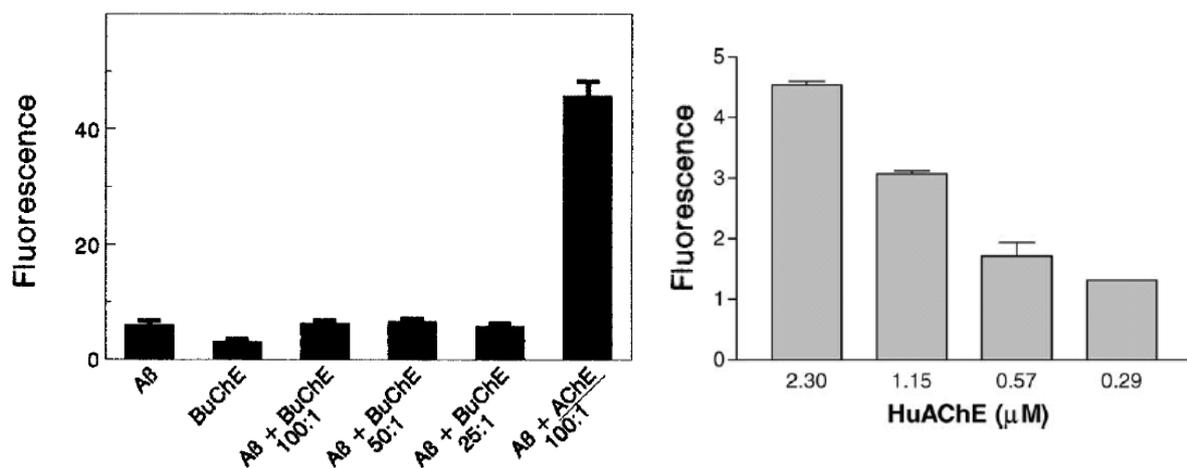
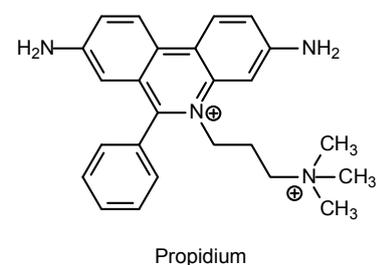


Abb. C-11 a) Einfluß der BChE und der AChE auf die A β -Aggregation [Inestrosa et al., 1996] (links) und b) Einfluß der huAChE-Konzentration auf die A β -Aggregation [Bartolini et al., 2003] (rechts) jeweils aufgetragen gegen willkürlich festgelegte Fluoreszenzeinheiten

Die AChE induzierte A β -Aggregation soll über die Wechselwirkung von A β mit der peripheren, hydrophoben Bindungsstelle der AChE (PAS) (siehe Abschnitt A.1.3) vermittelt sein. Dies wird durch den Aggregations-reduzierenden Effekt der PAS-Inhibitoren wie Propidium (Aggregation-reduktion um 82% [Bartolini et al., 2003])



gestützt. Zusätzlich untermauert wird diese Theorie durch den ausbleibenden induktiven Effekt der BChE auf die Aggregation, was vermutlich im Fehlen mehrerer hydrophober Aminosäuren der peripheren Bindungsstelle begründet liegt [Inestrosa et al., 1996]. Eine Vorstellung, wie ein möglicher AChE-A β -Komplex aussieht, haben Inestrosa et al. entwickelt.

Sie vergleichen diese Aggregation mit der für DNA-Histon-Komplexe beschriebenen, so daß sich A β um die AChE herumlegt, wodurch größere Aggregate gebildet werden können [Inestrosa et al., 2005a].

Inhibiert man also die PAS, so inhibiert man auch die AChE induzierte A β -Aggregation [Bartolini et al., 2003].

Da sich die Zielverbindungen als gute AChE-Inhibitoren herausstellten, sollten sie nun auch auf ihre Inhibition an der peripheren Bindungsstelle der AChE untersucht werden.

C.4.1 Methodenbeschreibung

Der Assay wurde mit einigen Modifikationen nach der von Bartolini et al. beschriebenen Methode mit den Peptiden A β 42 und A β 40 durchgeführt [Bartolini et al., 2003].

Im ersten Schritt wurde, dem Desaggregationsprotokoll von Klein folgend [Klein, 2002], das jeweilige Peptid in eine einheitliche, nicht fibrilläre Konformation überführt. Dies wurde durch Inkubation des Peptides mit HFIP (Hexafluoroisopropanol) erreicht, da dieser Alkohol hydrophobe Wechselwirkungen unterbinden kann [Stine, Jr. et al., 2003].

Als A β -Fibrillen-Marker für den Assay wurde Thioflavin T verwendet (THT-Assay). Dieser lagert sich, wie in Abb. C-12 dargestellt, spezifisch an Amyloid-Fibrillen an, wodurch das Fluoreszenzspektrum des Farbstoffs verschoben wird und bei 490 nm vermessen werden kann.

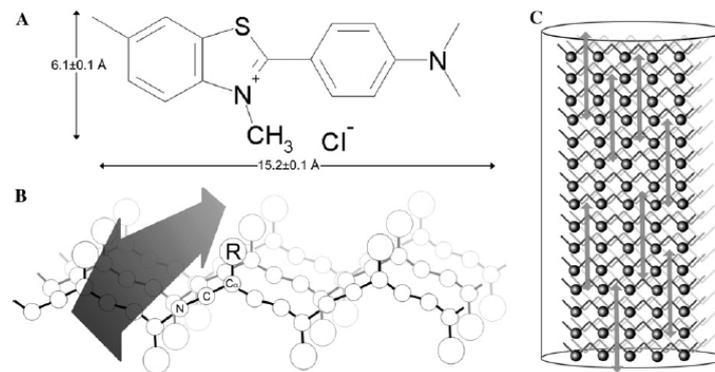


Abb. C-12 a) Struktur von Thioflavin T; b) Schematische Darstellung der A β -Faltblattstruktur (β -sheets); die Anlagerung von THT zur Faltblattstruktur ist mit einem Pfeil dargestellt; c) Schematische Darstellung einer Fibrille mit eingelagertem THT [Krebs et al., 2005]

Die Auswertung des Assays erfolgte durch die Darstellung der Fluoreszenzintensitäten gegen die Zeit, wobei Proben gleicher Zusammensetzung gemittelt wurden. Dabei steht eine hohe Fluoreszenzintensität für eine hohe Anzahl von Fibrillen (Aggregationsrate). Weiterhin wurde die Kurve jeder einzelnen Probe mit der Einstellung „Fit sigmoide“ anhand der untenstehenden *Boltzmann-Gleichung* ausgewertet.

$$y = \frac{Bottom - Top}{1 - e^{-\frac{(x-x_0)}{dx}}} + Top$$

x	Zeit in [min]
x ₀	Wendepunkt des Graphen in [min]; entspricht der halbmaximalen Aggregation
Bottom	erreichtes unteres Plateau
Top	erreichtes oberes Plateau
dx	Umkehrparameter zum Anstieg

Die Parameter x₀ und 1/dx wurden ermittelt, dabei entspricht ein großer Wert für 1/dx einem steilen Anstieg der Aggregationskurve und ein großer x₀-Wert einer langsamen Aggregation. Eine Aussage in Hinblick auf die Aggregation beruht darauf, daß eine langsame Aggregation immer zu großen x₀-Werten, einem kleinen Anstieg und einer geringen Aggregationsrate führt [Fändrich, 2007]. x₀ korreliert mit der lagtime, da diese aus der Differenz von x₀ und 2/dx berechnet wird und analog verwendet werden kann.

C.4.2 Ergebnisse und Diskussion

Zu Beginn der Arbeiten wurde versucht, den Assay mit dem Peptid Aβ 42 zu etablieren. Zuerst wurde, wie unter C.4.1 beschrieben, das Desaggregationsprotokoll durchgeführt. Dabei zeigte Aβ 42 eine schlechte Löslichkeit in HFIP, so daß dieses Protokoll z.T. wiederholt werden mußte. Bei der Herstellung der Aβ-Stammlösung in DMSO löste sich das Peptid schlecht in DMSO. Zeitgleich konnte eine zunehmende Trübung beobachtet werden. Selbst bei minimiertem Zeitplan war es nicht möglich unter diesen Bedingungen einen Nullpunkt, also eine geringe Fluoreszenz nahe dem Blankwert zu vermessen. So wurden zum Meßzeitpunkt Null bereits Fluoreszenzintensitäten im vierstelligen Bereich beobachtet. Es konnten keine Unterschiede zwischen der Inkubation von Aβ und Aβ mit AChE festgestellt werden. Der Einfluß der AChE auf die Aβ-Aggregation ist jedoch fraglich, da Aβ vermutlich bereits Aggregate in der DMSO-Stammlösung gebildet hatte (Trübung in der Lösung), bevor es mit AChE in Kontakt kam. Da mit diesem Protokoll die Aggregation des Peptids nicht kontrolliert werden konnte, wurden die Untersuchungen mit dem kürzeren Aβ 40 wiederholt, welches von der Arbeitsgruppe von PD Dr. habil. Marcus Fändrich (Max-Planck-Institut, Halle/Saale) bereitgestellt wurde. Aβ 40 aggregiert langsamer und war deshalb besser zu handhaben (siehe Abschnitt C.4).

In Abb. C-13 sind die Ergebnisse des THT-Assays von verschiedenen Aβ 40-Konzentrationen aufgetragen. Erwartungsgemäß war hier eine konzentrationsabhängige Fibrillen-Bildung von Aβ zu erkennen, wobei eine geringere Aβ-Konzentration eine längere lag-Phase und eine kleinere Anzahl an THT-angefärbten Fibrillen zeigte.

Die Inkubation der verschiedenen A β -Konzentrationen mit AChE im Molverhältnis 100:1 zeigte nicht die erwarteten Ergebnisse. In der Literatur ist, wie in Abschnitt C.4 erwähnt, eine vermehrte Fibrillen-Bildung beschrieben worden. Hier führte die Zugabe von eeAChE (AChE isoliert aus *Electrophorus electricus*) zu A β zu einer gleichbleibenden oder sogar geringeren Fluoreszenzintensität im Vergleich zu A β ohne AChE-Zusatz.

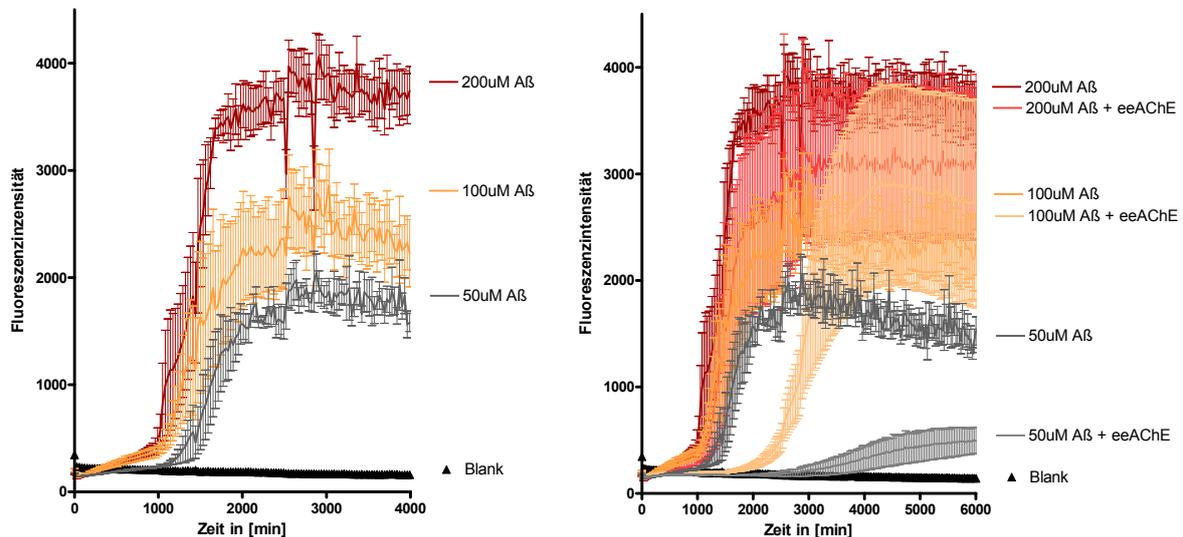


Abb. C-13 Zeitabhängige A β -Aggregation mit A β -Konzentrationen von 50 μ M, 100 μ M und 200 μ M inkubiert mit/ohne eeAChE im Molverhältnis 100:1; aufgetragen sind die Mittelwerte aus 6 Messungen mit deren Standardabweichungen

Anschließend wurden die Bedingungen des Experiments verändert, um eine mögliche Ursache für den nicht erwartungsgemäßen Verlauf zu erhalten:

- Der Einfluß des zu Beginn der Testreihe zugegebenen Natriumazids (NaN₃), welches zur Verminderung der Keimbildung im Puffer dienen sollte, wurde untersucht. Dazu wurden Experimente mit und ohne Natriumazid im Puffer durchgeführt.
- Der Einfluß von DMSO in der A β -Stammlösung wurde untersucht, da selbst geringe Mengen DMSO Funktionseinschränkungen der AChE bewirken können. Dazu wurden Experimente mit und ohne DMSO durchgeführt.
- Der Einfluß der verschiedenen AChE-Spezies wurde untersucht. Bisher verwendete eeAChE (isoliert aus *Electrophorus electricus*) zeigt im Allgemeinen neben Esterase- auch vermehrte AAA- und Peptidase-Aktivität (siehe Abschnitt A.1.3.1, S.8), wobei deren Einfluß auf die A β -Aggregation weitestgehend ungeklärt ist. Aus diesem Grund wurde zusätzlich die huAChE (human rekombinant gewonnene AChE) untersucht, die diese nicht-esteratischen Aktivitäten nicht oder nur gering aufweisen soll.
- Die Inkubation des A β mit/ohne AChE wurde, wie u.a. bei Bartolini et al. beschrieben, ohne THT durchgeführt und anschließend die A β -Aggregation in einer

Endpunktbestimmung durch Zugabe von THT ermittelt. Da auch der Kurvenverlauf, also der Verlauf der Aggregation sehr interessant ist, wurde bei den ersten Experimenten THT gleich zu Beginn zugegeben und halbstündlich vermessen. Um mögliche Wechselwirkungen des THT mit der AChE auszuschließen, wurde zuerst ohne THT inkubiert, dann nach verschiedenen Zeitpunkten THT zugegeben und vermessen.

Die Ergebnisse sind in Abb. C-14 zusammengefaßt. Aufgetragen sind die steigenden A β -Konzentrationen gegen x_0 . Auf die Darstellung des Anstieges $1/dx$ wurde im Folgenden verzichtet, da bei den Ergebnissen ein ähnliches Bild erhalten wurde. Die Ergebnisse der nachträglichen THT-Zugabe wurden hier nicht dargestellt und zeigten keine Unterschiede zu den Proben mit anfänglicher THT-Zugabe.

Die Testreihe ohne DMSO in der A β -Stammlösung konnte aufgrund der wenigen Substanzressourcen nur in einem Assay ($n = 8$) untersucht werden. Alle weiteren Testreihen wurden in zwei bis drei unabhängigen Experimenten vermessen.

Allgemein läßt sich sagen, daß die Resultate keine klaren Tendenzen zeigten. Selbst die Inkubation von A β ohne AChE-Zusatz ergab für die verschiedenen Konzentrationen nicht das erwartete Bild; mit steigender Konzentration sollte x_0 kleinere Werte annehmen, dies war jedoch nicht der Fall.

Zur besseren Übersicht wurden in Abb. C-15 die Ergebnisse für die am meisten untersuchte A β -Konzentration (50 μ M) herausgegriffen. Die Inkubationen von A β mit den bzw. ohne die verschiedenen AChE-Formen wie auch die weiteren Untersuchungen des NaN $_3$ und DMSO-Einflusses ergaben keine signifikanten Unterschiede für x_0 . Keine der Testreihen gab also Aufschluß über die Gründe der unerwarteten ersten Ergebnisse mit A β 40, sondern bestätigten diese.

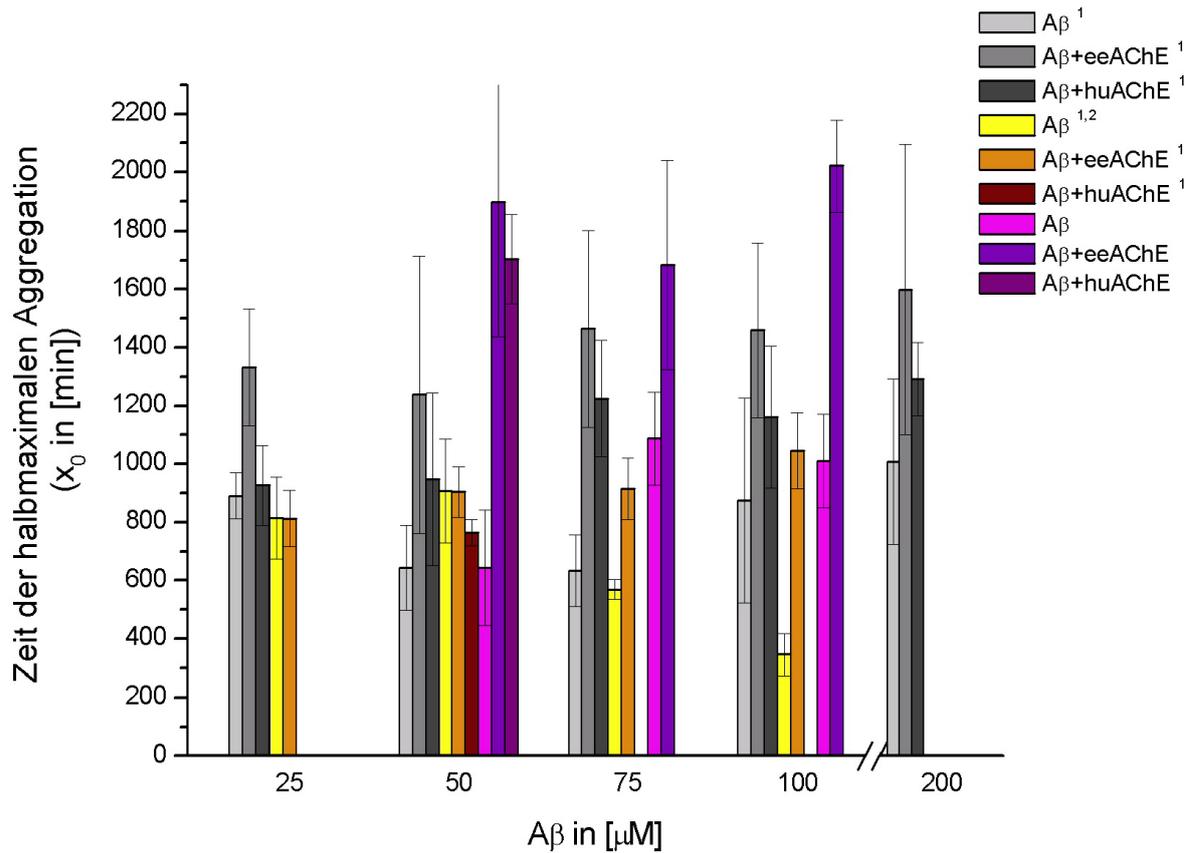


Abb. C-14 Gesamtübersicht der verschiedenen Aβ 40 Testreihen; angegeben ist die halbmaximale Aggregationszeit (x_0), bestimmt in [min], gegen die Aβ Konzentration; ¹Aβ in DMSO gelöst; ²NaN₃-Zusatz im Phosphatpuffer

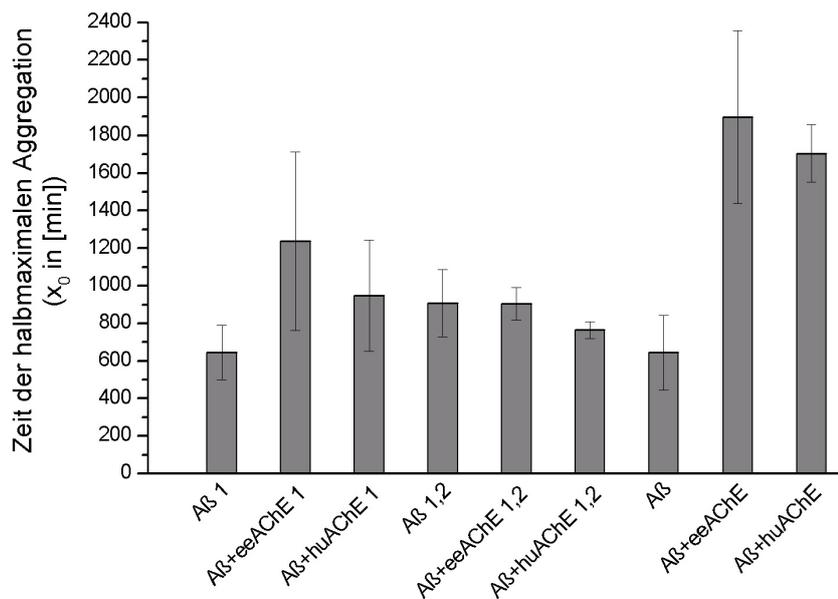


Abb. C-15 Gesamtübersicht der verschiedenen Testreihen bei einer Aβ-Konzentration von 50 μ M; angegeben ist die halbmaximale Aggregationszeit (x_0), bestimmt in [min]; ¹Aβ in DMSO gelöst; ² NaN₃-Zusatz im Phosphatpuffer

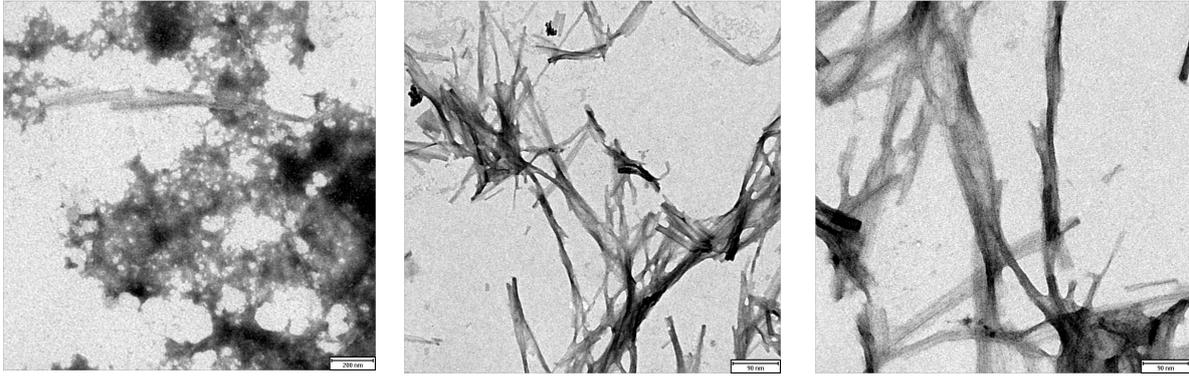
Um diese unerwarteten Ergebnisse näher zu untersuchen, sollten neben der Anfärbung der Fibrillen mit THT weitere Methoden angewandt werden. Da der durchgeführte THT-Assay zwar ein praktikabler Test mit hoher Sensitivität ist, aber die Wechselwirkung des Farbstoffs mit den Fibrillen stark von der Fibrillen-Morphologie abhängt [Harper et al., 1997], wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen zu deren Klärung gemacht. Die Proben wurden hierfür, wie bereits geschrieben, vorbereitet, inkubiert und typisch verlaufende Proben für die Aufnahmen ausgewählt.

Dabei zeigten sich bei der Inkubation von A β 40 (50 μ M) nach 3 Tagen relativ hoch geordnete, kurze und lange, umfangreiche Fibrillen mit einer klaren Morphologie, neben feinen, sog. fibrillären Aggregaten (siehe Abb. C-16 oben).

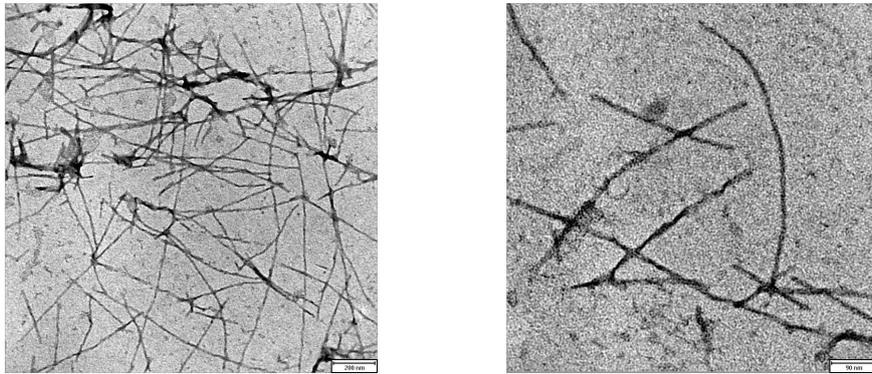
Die Zugabe von eeAChE (Molverhältnis 100:1) führte dagegen zu einem gänzlich anderen Bild. Die Probe war von einem Netzwerk feiner, klar definierter, hauptsächlich langer Fibrillen überzogen und nur wenige Anteile fibrillärer Aggregate waren zu erkennen (siehe Abb. C-16 Mitte). Die Inkubation von huAChE und A β 40 zeigte viele kurze, wenig definierte Fibrillen und fibrilläre Aggregate (siehe Abb. C-16 unten). Möglicherweise vermag THT eher an umfangreiche Fibrillen zu binden, die bei der Inkubation von A β 40 entstanden, als an dünne Fibrillen, die durch die Zugabe von AChE entstanden sind. Dies würde die überraschenden Ergebnisse erklären.

Die Elektronenmikroskopie wurde allerdings nur einmalig durchgeführt. Für fundierte Aussagen müßte dies mehrmals unter gleichen Bedingungen wiederholt werden, was aufgrund von geringen Ressourcen und Zeitknappheit im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war.

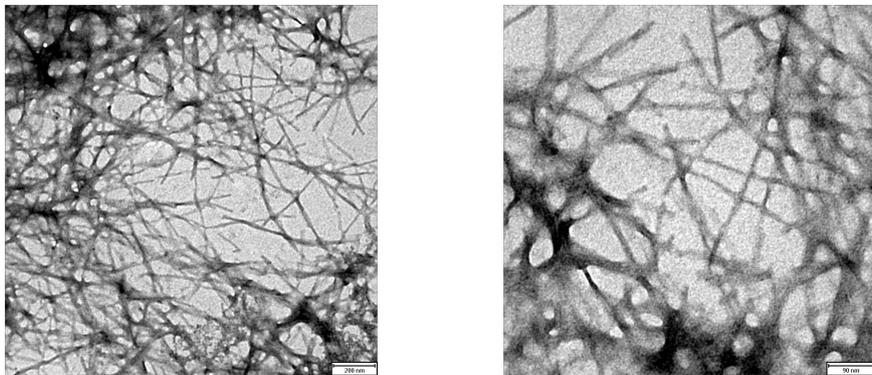
Zukünftig müßten weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen, eventuell in Kombination mit CD-Spektroskopie durchgeführt werden, um diese ersten Ergebnisse zu sichern. Weiterhin müßten die Bedingungen des Desaggregationsprotokolls und des Assays so verändert werden, daß mit dem THT-Assay eine reale Aussage über die Anzahl der gebildeten Fibrillen gemacht werden kann.



50 μ M A β (mit DMSO)



50 μ M A β + eeAChE (Verhältnis 100:1) (mit DMSO)



50 μ M A β + huAChE (Verhältnis 100:1) (mit DMSO)

Abb. C-16 Elektronenmikroskopische Aufnahmen ausgewählter Proben

⇒ *Es ist im Rahmen der zur Verfügung stehenden Zeit nicht gelungen, den Assay zur Bestimmung der AChE-induzierten A β -Aggregation zu etablieren. Dementsprechend konnten auch keine Zielverbindungen auf ihre PAS-Inhibition hin untersucht werden.*

C.5 Bestimmung der inhibitorischen Aktivität am NMDA-Rezeptor

Der NMDA-Rezeptor (NMDAR), nach seinem Liganden *N*-Methyl-*D*-aspartat (NMDA) benannt, gehört zur Familie der Glutamaterezeptoren, speziell zu den ionotropen Rezeptoren. AMPA- (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure) und Kainat-Rezeptoren sind ebenfalls ionotrope Glutamaterezeptoren, neben den metabotropen G-Protein gekoppelten Rezeptoren mGluR 1-8.

Die Struktur des Rezeptors ist noch nicht vollständig aufgeklärt, man geht aber von einem Tetramer aus. Die monomeren Einheiten werden als NR1, NR2 und NR3 bezeichnet und existieren jeweils mit verschiedenen Untereinheiten. Die Kombinationsmöglichkeiten der verschiedenen Einheiten ergeben eine Vielzahl von Rezeptorsubtypen. Das Tetramer wird aus einem dimeren NR1 und einem dimeren NR2 gebildet oder in NR3-exprimierenden Zellen aus NR1, NR2 und NR3. In Abb. C-17 ist der Rezeptor schematisch dargestellt. Neben einem großen extrazellulären *N*-Terminus (als „*N*-terminal domains“ und „Agonist binding domains“ in der Abbildung bezeichnet) und dem intrazellulär gelegenen *C*-Terminus (als „*C*-terminal domains“ bezeichnet), weist der Rezeptor eine Membranregion (als „Pore domains“ bezeichnet) auf, die aus 3 transmembranären (TM1, TM3, TM4) und dem Porenspalt bildenden Segment TM2 besteht. Zur Aktivierung des NMDARs müssen Glutamat und Glycin (oder *D*-Serin) binden. Die gebildete Pore ist besonders gut permeabel für Calcium-Ionen. Dem Rezeptor wird unter physiologischen Verhältnissen eine Funktion in der synaptischen Plastizität und damit verbunden in Lern- und Gedächtnisvorgängen zugeschrieben [Paoletti et al., 2007].

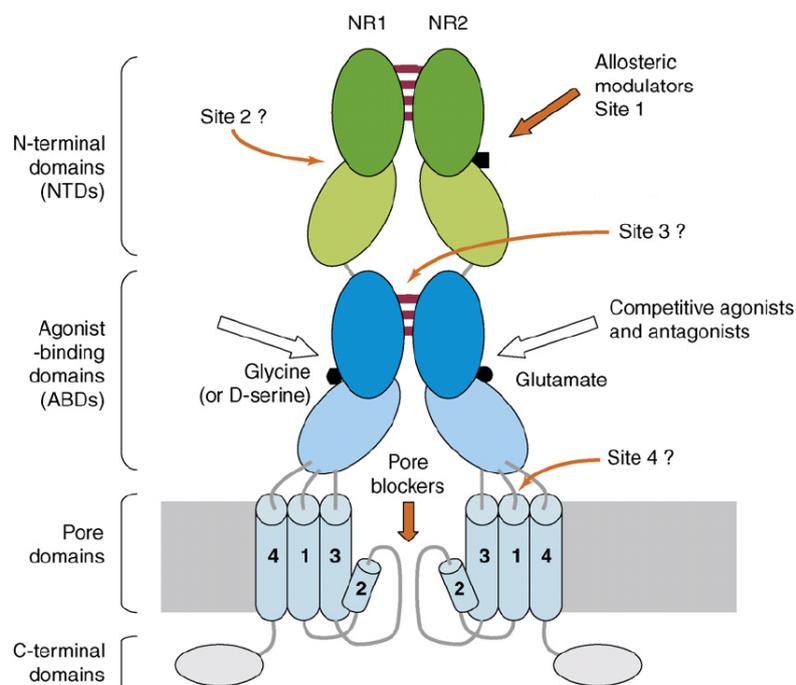


Abb. C-17 Schematische 2D-Darstellung des NMDA-Rezeptors [Paoletti et al., 2007]

Glutamat ist ein exzitatorischer Neurotransmitter im Zentralnervensystem. Kommt es zu einer energetischen Unterversorgung von Neuronen durch erniedrigte Nährstoff- oder Sauerstoffversorgung und Hemmung der Atmungskette in den Mitochondrien, so führt dies zu unphysiologisch hohen Konzentrationen des Transmitters und dieser wandelt sich zum Neurotoxin. Die Zellschädigung wird durch die Überaktivierung von NMDARs initiiert, was einen vermehrten Calciumeinstrom auslöst, der zu einer gestörten Calciumhomöostase führt. Hierdurch bedingt werden schließlich u.a. calciumabhängige Nukleasen, Lipasen und Proteasen aktiviert, was letztendlich zum Zelltod führt. Des Weiteren aktiviert eine exzessive Stimulation mit Glutamat ebenfalls calciumabhängige NO-Synthasen und führt zur Produktion von NO-Radikalen [Dawson et al., 1993]. Diese Überaktivierung der NMDARs ist pathologischer Bestandteil vieler Gehirnerkrankungen, darunter viele neurodegenerative Erkrankungen, wie z.B. die Alzheimer'sche und die Parkinson'sche Erkrankung. Dem entsprechend wird pharmakotherapeutisch versucht, durch Gabe von NMDAR-Inhibitoren den physiologischen Zustand wieder herzustellen [Paoletti et al., 2007].

Es gibt verschiedene Angriffspunkte für Inhibitoren am NMDAR, die in Abb. C-17 eingezeichnet sind. Zum Einen gibt es eine Bindungsstelle für allosterische Inhibitoren an der extrazellulären Domäne (in der Abbildung als „allosteric modulators site“ bezeichnet), wo Zink-Ionen und Ifenprodil (siehe Abb. C-18) angreifen können. Kompetitive Antagonisten können an der extrazellulären, in der Abbildung als „Agonist-binding domains“ bezeichnet Bindungsstelle angreifen. An der Pore gibt es weitere Bindungsstellen. Magnesium-Ionen, MK801, Memantin und Ketamin (siehe Abb. C-18) binden hier nicht-kompetitiv.

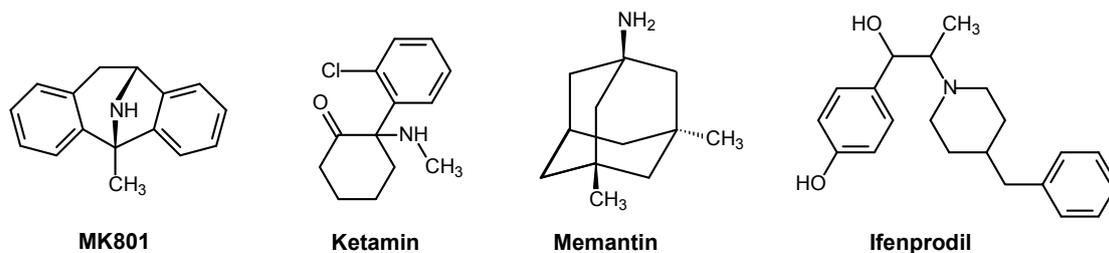


Abb. C-18 NMDAR-Antagonisten

C.5.1 Methodenbeschreibung

Der NMDA-Exzitotoxizitätsassay wurde mit wenigen Modifikationen nach der von Steinmetz et al. beschriebenen Methode [Steinmetz et al., 2002] am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der FSU Jena von Kai-Uwe Schmidtke und Heidemarie Graf aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Thomas Winckler durchgeführt.

Für diesen Test wurden die murinen, mit den jeweiligen NMDAR-Untereinheiten kodierten Plasmiden stabil transfizierten Fibroblasten-Zelllinien L12-G10 (exprimieren die Untereinheiten NR1-1a und NR2a) und L13-E6 (exprimieren die Untereinheiten NR1-1a und

NR3a) verwendet. Da in der Promotorregion ein *glucocorticoid responsive element* zu finden ist, kann mit Dexamethason die Rezeptorexpression initiiert werden. Durch Zugabe von Glutamat und des Co-Aktivators Glycin wird der pathologische Zustand in Neuronen bei der Alzheimer'schen Erkrankung simuliert. Da der in der Folge stattfindende Zelluntergang auf die Wirkung der beiden Neurotransmitter via NMDAR zurückzuführen ist, spricht man von Exzitotoxizität.

Zu deren Bestimmung wurde ein gebräuchlicher Zytotoxizitätsassay unter Verwendung des *Cytotoxicity Detection Kit* (Roche, Mannheim) durchgeführt. Die Integrität der Zellmembran fungiert dabei als korrelierender Parameter. Durch eine Schädigung der Zellmembran können sonst nur intrazellulär vorkommende Enzyme aus der Zelle ins Kulturmedium übergehen. Eines dieser Enzyme ist die Lactatdehydrogenase (LDH), welches durch eine kolorimetrische Bestimmung nachgewiesen werden kann (LDH-Assay). Das Testprinzip ist in Abb. C-19 dargestellt. LDH oxidiert im Medium enthaltenes Lactat zu Pyruvat unter Bildung von $\text{NADH} + \text{H}^+$. In einer nachfolgenden Reaktion wird durch eine im Testreagenz vorhandene Reduktase der Wasserstoff von $\text{NADH} + \text{H}^+$ auf das zugesetzte Tetrazoliumsalz Iodonitrotetrazolium (INT) übertragen. Dadurch erfolgt eine reduktive Spaltung zum entsprechenden Formazan-Derivat, das aufgrund seiner roten Färbung bei 492 nm spektrophotometrisch vermessen werden kann.

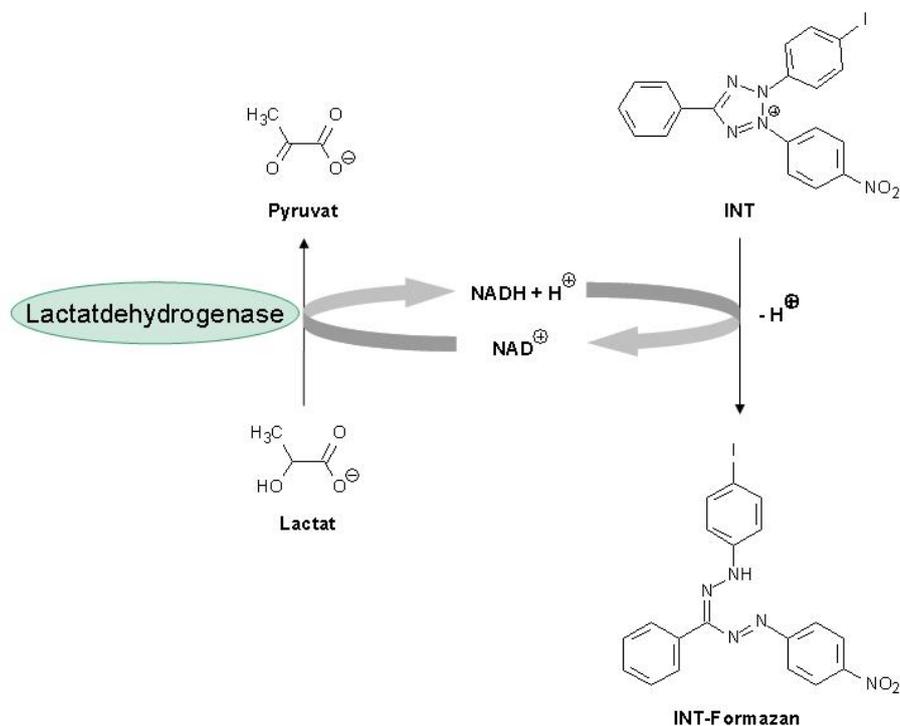


Abb. C-19 LDH-Assay

Die gebildete Menge Formazan korreliert direkt mit der LDH-Aktivität, d.h. der Anzahl lysierter Zellen und ist somit ein Maß für die Exzitotoxizität.

Ziel war es nun, Substanzen auf ihre Fähigkeit zur Senkung der Glutamat/Glycin-vermittelten Exzitotoxizität aufgrund inhibitorischer Wirkungen am NMDAR zu untersuchen.

Zu Beginn wurden in einem Grobscreening die β -Carboline in einer Konzentration von 25 μ M auf ihre Inhibition am NMDAR getestet. Dabei wurden alle Substanzen an der Zelllinie L12-G10 und in der Folge einige ausgewählte, repräsentative Derivate an L13-E6-Zellen getestet. Jeder Wert wurde dreifach bestimmt. Für interessante Verbindungen erfolgte die Bestimmung des IC_{50} -Wertes in mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Die aufgeführte Exzitotoxizität (in Prozent) wurde folgendermaßen errechnet:

$$\text{Exzitotoxizität} = \frac{\text{Absorption}_{\text{Probe}} - \text{Absorption}_{\text{min}}}{\text{Absorption}_{\text{max}} - \text{Absorption}_{\text{min}}} \times 100\%$$

Die minimale Absorption (entspricht 0% Exzitotoxizität) ergibt sich hierbei für Zellen, die zusätzlich zur Glutamat/Glycin-Behandlung mit dem NMDAR-Antagonisten Ketamin (100 μ M) inkubiert wurden. Die maximale Absorption (entspricht 100% Exzitotoxizität) ermittelt man nach einer alleinigen Inkubation mit Glutamat und Glycin. Exzitotoxizitätswerte kleiner 100 sind somit gleichbedeutend mit einer Inhibition des NMDAR. Die Differenz 100 minus Exzitotoxizität entspricht dann der prozentualen Inhibition des NMDARs. Für Substanzen, die potenter wirken als die Vergleichssubstanz Ketamin, ergeben sich somit Exzitotoxizitätswerte kleiner Null bzw. Werte für die prozentuale Inhibition größer 100.

C.5.2 Ergebnisse

Chiffre	Exzitotoxizität bei 25 μ M [% \pm SD]		NMDAR-Inhibition IC ₅₀ \pm SD [μ M]	
	L12G10-Zellen	L13E6-Zellen	L12G10-Zellen	L13E6-Zellen
1	102 \pm 14	n.v.	n.v.	n.v.
3	103 \pm 8	n.v.	n.v.	n.v.
4	108 \pm 4	n.v.	n.v.	n.v.
4Br	70 \pm 2	n.v.	n.v.	n.v.
4MeO	100 \pm 1	n.v.	n.v.	n.v.
5-2	82 \pm 9	85 \pm 2	n.v.	n.v.
5-3	74 \pm 7	n.v.	17,6*	n.v.
5-4	70 \pm 3	88 \pm 0	n.v.	n.v.
5-5	50 \pm 2	46 \pm 9	20,5 \pm 7,1	16,3 \pm 1,8
5-6	3 \pm 2	17 \pm 6	2,2 \pm 0,7	7,2*
5-7	11 \pm 3	31 \pm 7	6,1 \pm 1,9	17,8 \pm 6,0
5-8	4 \pm 4	8 \pm 2	n.v.	6,0 \pm 0,7
5-9	21 \pm 4	31 \pm 2	17,2 \pm 3,3	n.v.
5-10	10 \pm 3	7 \pm 4	9,1 \pm 2,0	n.v.
5-11	16 \pm 3	33 \pm 3	n.v.	n.v.
5-12	3 \pm 1	6 \pm 2	3,2*	n.v.
5OH-5	67 \pm 9	77 \pm 3	n.v.	n.v.
5MeO-5	65 \pm 0,4	66 \pm 7	n.v.	n.v.
5-11O	80 \pm 6	92 \pm 1	n.v.	n.v.
5-Xy	58 \pm 8	78 \pm 12	n.v.	n.v.
6	87 \pm 5	92 \pm 8	n.v.	n.v.
7	97 \pm 9	n.v.	n.v.	n.v.
8-5	99 \pm 3	n.v.	n.v.	n.v.
8-10	104 \pm 11	n.v.	n.v.	n.v.

Chiffre	Exzitotoxizität bei 25 μ M [% \pm SD]		NMDAR-Inhibition IC ₅₀ \pm SD [μ M]	
	L12G10-Zellen	L13E6-Zellen	L12G10-Zellen	L13E6-Zellen
9-1	96 \pm 3	94 \pm 2	n.v.	n.v.
9-2	103 \pm 10	n.v.	n.v.	n.v.
9-3	100 \pm 5	n.v.	n.v.	n.v.
9-8	139 \pm 9	n.v.	n.v.	n.v.
9-2OH	94 \pm 8	n.v.	n.v.	n.v.
10-5	75 \pm 7	n.v.	n.v.	n.v.
10-9	93 \pm 8	n.v.	n.v.	n.v.
10-12	93 \pm 16	n.v.	n.v.	n.v.
11-5	76 \pm 5	n.v.	n.v.	n.v.
11-9	- 2 \pm 2	4 \pm 3	1,4 \pm 0,2	2,9 \pm 1,4
11-12	12 \pm 4	25 \pm 9	4,3 \pm 0,6	5,7*
12-9	93 \pm 8	n.v.	n.v.	n.v.
13-1	91*	n.v.	n.v.	n.v.
13-2	96 \pm 10	n.v.	n.v.	n.v.
13-3	85 \pm 12	n.v.	n.v.	n.v.
13-2F	88 \pm 10	n.v.	n.v.	n.v.
13Br-1	80 \pm 8	n.v.	n.v.	n.v.
14-2	96 \pm 0,1	n.v.	n.v.	n.v.
14-3	100 \pm 2	96 \pm 12	n.v.	n.v.
Memantin	11 \pm 0,4	11 \pm 3	5,6 \pm 1,6	11,3 \pm 2,5
MK801	1 \pm 3	3 \pm 3	6,4 \pm 2,6 (nM)	11,9 \pm 3,2 (nM)

Tabelle C-14 Ergebnisse des NMDAR-Grobscreenings (dargestellt als prozentuale Exzitotoxizität) und IC₅₀-Werte potenter Zielverbindungen. Die Substanzen (inkl. des bekannten NMDAR-Inhibitors Memantin) wurden im Grobscreening bei einer Konzentration von 25 μ M (MK801 bei 300 nM) an der Zelllinie L12-G10 und einige ausgewählte, repräsentative Substanzen an der Zelllinie L13-E6 getestet; n.v. = nicht vermessen; * aus Zeitgründen erst einmal gemessen

C.5.3 Diskussion

Die prozentuale Veränderung der Exzitotoxizität an der Zelllinie L12-G10 durch die Zielverbindungen bei einer Konzentration von 25 μM (siehe Tabelle C-14) wurde in Abb. C-20 dargestellt. Hier kann man klar zwischen wenig und hoch aktiven Substanzen unterscheiden. Die Ergebnisse werden nachfolgend einzeln diskutiert. Exzitotoxizitäts-Werte über 100% sprechen für mögliche zusätzliche zytotoxische Effekte der Substanzen. Ebenso ist eine Überlagerung der inhibitorischen Aktivität anderer Substanzen mit zytotoxischen Effekten denkbar, weswegen zukünftig die vielversprechendsten Verbindungen auf Zytotoxizität getestet werden sollen.

Soweit bereits vermessen, war die Vielzahl der Derivate an beiden Zelllinien gleich potent. Als Ausnahme zeigte **5-7** eine um 20% niedrigere Exzitotoxizität an L12-G10-Zellen im Vergleich zu L13-E6-Zellen.

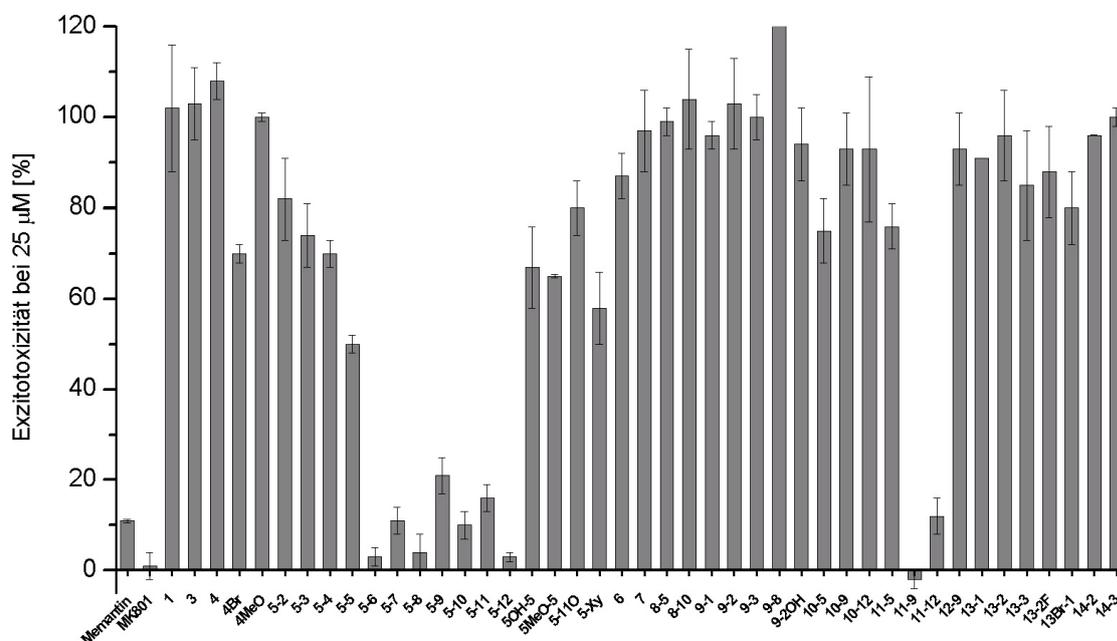


Abb. C-20 Ergebnisse des NMDAR Grobscreenings an der Zelllinie L12-G10. Die Substanzen wurden bei einer Konzentration von 25 μM getestet (Ausnahme: MK801 – 300nM).

Alle untersuchten monovalenten β -Carboline (**1**, **3**, **4**, **9**, **13**, **14**; siehe Abb. C-21) zeigten im Grobscreening an beiden Zelllinien Exzitotoxizitäten zwischen 80 und 100% (entspricht einer inhibitorischen Aktivität am NMDAR im Bereich von 0-20%). Die Verbindung **4Br** ergab eine Exzitotoxizität von 70% an den L12-G10-Zellen. Eine Bromierung in Position 6 scheint also gegenüber keiner Substitution oder einer Methoxylierung (**4MeO**) günstiger zu sein. Auch **13Br-1** zeigte von den Derivaten **13** die geringste Exzitotoxizität.

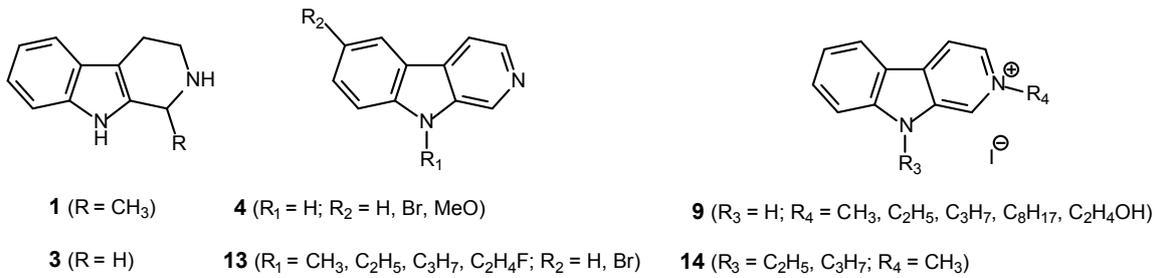


Abb. C-21 Monovalente β -Carboline (**1**, **3**, **4**, **9**, **13**, **14**)

Die N2-homobivalenten β -Carboline **5**, dargestellt in Abb. C-22, erwiesen sich ab einer Spacerlänge von 6 Methylengruppen als hoch potente NMDAR-Inhibitoren. Längere Spacer (untersucht bis 12 Methylengruppen) wurden ebenfalls toleriert. Im Grobscreening, wurden sehr niedrige Exzitotoxizitätswerte (z.T. < 10%) ermittelt. Die für **5-6** ermittelten IC₅₀-Werte (2,2 μ M an L12G10 und 7,2 μ M an L13E6) befindet sich im Bereich von denen von Memantin (5,6 μ M an L12G10 und 11,3 μ M an L13E6).

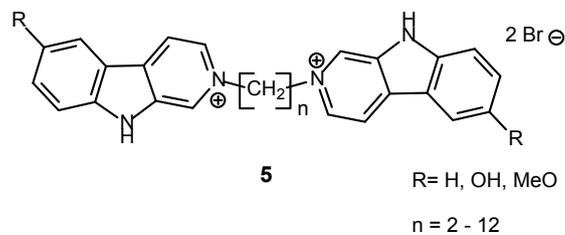


Abb. C-22 N2-homobivalente β -Carboline (**5**)

Die Einführung einer Methoxy- (**5MeO-5**) oder einer Hydroxygruppe (**5OH-5**) in Position 6 führte zu einer um ca. 15% erhöhten Exzitotoxizität, im Vergleich zu dem in Position 6 unsubstituierten **5-5**.

Die Verbindung **5-110** (siehe Abb. C-23) zeigte eine auffallend geringere Wirkung auf den NMDAR, im Vergleich zum Sauerstoff-freien Analogon **5-11** (Exzitotoxizität betrug 85% für **5-110** und 14% für **5-11**). Der starre *p*-Xylyl-Spacer von **5-Xy** (siehe Abb. C-23) erwies sich mit 58% Exzitotoxizität als weniger aktiv, im Vergleich zu **5-6** mit 4% Exzitotoxizität, dessen Abstand der aromatischen Zentren in etwa dem von **5-Xy** entsprach,.

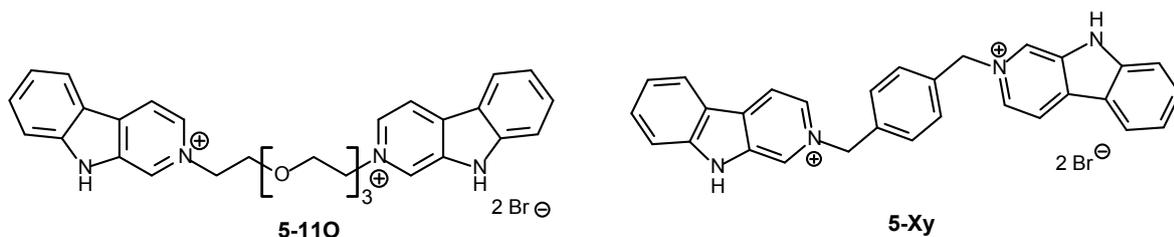


Abb. C-23 N2-homobivalente β -Carboline (**5-110** und **5-Xy**)

Das heterobivalente β -Carbolin **6** und das homobivalente Pyridinium **7** (siehe Abb. C-24) zeigten Exzitotoxizitäten von 87% und 97%. Im Vergleich zum homobivalenten β -Carbolin gleicher Kettenlänge (**5-6**) mit 4% Exzitotoxizität, führte der Austausch des größeren aromatischen Trizyklus β -Carbolin gegen einen bzw. zwei Pyridin-Ringe zu einem drastischen Verlust der Aktivität.

Für die Wechselwirkung der Derivate **5** mit dem NMDAR ist offensichtlich ein großes aromatisches Gerüst, wie das β -Carbolin, essentiell.

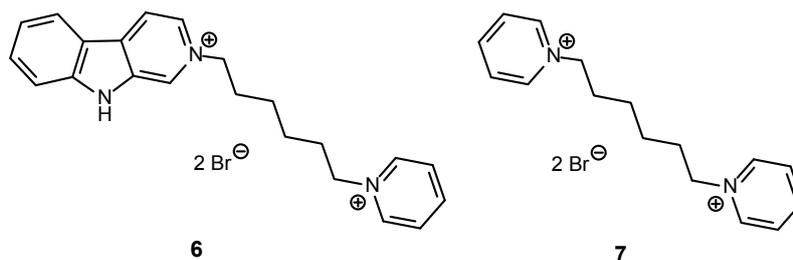


Abb. C-24 heterobivalentes β -Carbolin (**6**) und homobivalentes Pyridinium (**7**)

Die Untersuchung der *N*9-bivalenten β -Carboline (siehe Abb. C-25) ergab für die Derivate **10** sehr geringe inhibitorische Aktivitäten (> 75% Exzitotoxizität). Die Quartärnisierung von **10** zu **11** führte für die Spacerlängen 9 (**11-9**) und 12 (**11-12**) zu einer enormen Verringerung der Exzitotoxizität von ca. 80%, für **11-5** jedoch zu keinerlei Aktivitätsänderung. Dies bestätigte die für die Verbindungen **5** erhaltenen Ergebnisse. Auch hier war der 5er-Spacer im Vergleich zu längeren Spacern nur gering aktiv. Es ist daher eine Bindung der beiden verknüpften aromatischen Zentren der bivalenten β -Carboline an je eine Bindungsstelle denkbar, deren Abstand etwa 6 Atome beträgt. **11-9** zeigte die höchste inhibitorische Aktivität aller Testsubstanzen mit einem IC_{50} -Wert von 1,4 (an L12G10-Zellen) bzw. 2,9 μ M (an L13E6-Zellen).

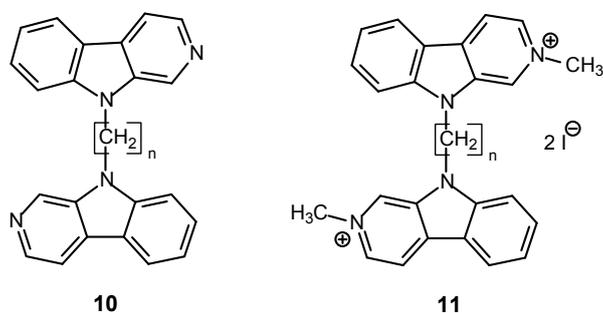


Abb. C-25 *N*9-homobivalente β -Carboline **10**, **11** ($n = 5, 9, 12$)

Die partiell reduzierten, nicht quartären Verbindungen **8-5**, **8-10** und **12-9** (siehe Abb. C-26) zeigten im Grobscreening nur sehr geringe Aktivitäten (> 90% Exzitotoxizität). Dies war überraschend, da die strukturellen Merkmale der meisten bekannten NMDAR-Inhibitoren

neben mindestens einem basischen Stickstoff einen aliphatischen Bereich aufweisen. Dieser liegt entweder in Form einer Methylenkette, wie beispielsweise bei den Polyaminen, oder eines Cyclohexan-Ringes, wie beim Ketamin, vor. Dies scheint sich auf die β -Carboline nicht übertragen zu lassen.

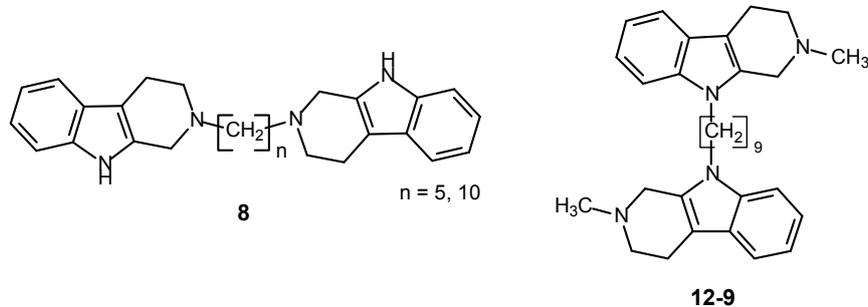


Abb. C-26 Partiiell reduzierte, nicht quartäre β -Carboline **8-5**, **8-10** und **12-9**

- ⇒ Monovalente β -Carboline zeigten im Grobscreening sehr schwache Aktivitäten (> 90% Exzitotoxizität). Dabei unterschieden sich Tetrahydro-Derivate (**1**, **2**), vollständig aromatisierte (**4**) und in Position 2,6 und 9 substituierte β -Carboline (**9**, **13**, **14**) nur in geringem Maße.
- ⇒ Bivalente, quartäre β -Carboline (**5**, **11**) zeigten abhängig von der Kettenlänge im Grobscreening hohe Aktivitäten (Exzitotoxizität z.T. < 10%). **11-9** zeigte die höchste inhibitorische Aktivität mit IC_{50} -Werten von 1,4 μ M an L12G10-Zellen bzw. 2,9 μ M an L13E6-Zellen. Da die Derivate **5** und **11** ab einem 6er Spacer hohe inhibitorische Aktivitäten zeigten, scheint eine Bindung jeweils eines aromatischen Zentrums der bivalenten Strukturen an je eine Bindungsstelle am NMDAR denkbar, deren Abstand etwa 6 Atome beträgt.
- ⇒ Die partielle Reduktion der quartären, bivalenten Derivate (**5**, **11**) zu Tetrahydro- β -Carbolenen (**8**, **12**) führte zu einem nahezu vollständigem Aktivitätsverlust. Die aromatischen, nicht quartären Verbindungen **10** waren ebenfalls nur gering aktiv. Ebenso führte der Austausch eines oder beider aromatischer Trizyklen der homobivalenten β -Carbolen gegen Pyridin-Ringe (**6**, **7**) zu einer Aktivitätsabnahme. Für die Wechselwirkung der Derivate mit dem NMDAR ist offensichtlich ein großes aromatisches Gerüst, wie das β -Carbolen, essentiell.
- ⇒ Nahezu alle getesteten β -Carbolen zeigten ähnliche inhibitorische Aktivitäten an beiden Zelllinien (L12G10 und L13E6). Es konnte somit keine signifikante Selektivität der Verbindungen für die verschiedenen Untereinheiten (NR1/NR2; NR1/NR3) gefunden werden.

D Gesamtdiskussion

In diesem Abschnitt sollen die verschiedenen pharmakologischen Charakterisierungen, besonders die Ergebnisse der Studien auf inhibitorische Aktivität der Zielsubstanzen an der AChE, BChE und am NMDAR, zusammen betrachtet werden.

In den Abbildungen D-2, D-4 und D-6 ist für jede Substanz sowohl deren Hemmwirkung auf die AChE und die BChE (auf der linken Achse (IC_{50} -Wert in [nM])), als auch auf den NMDAR (auf der rechten Achse als erniedrigte Exzitotoxizität in [%]) dargestellt. Dabei stehen jeweils niedrige Balken für eine hohe pharmakologische Aktivität.

Für die Darstellung der NMDAR-Daten wurden die Ergebnisse der L12G10-Zelllinie ausgewählt (siehe C.5.1, S.96).

Obwohl die Enzyme AChE und BChE strukturell keinerlei Ähnlichkeit mit dem NMDAR besitzen, haben die synthetisierten Testsubstanzen mit hoher inhibitorischer Aktivität an den Cholinesterasen gleichzeitig eine starke NMDAR-antagonistische Wirkung.

In Abb. D-2 sind die Daten aller *N2*-bivalenten β -Carboline dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß die homobivalenten Derivate **5-7** bis **5-12** (siehe Abb. D-1) an den drei Targets hoch potente Inhibitoren darstellen.

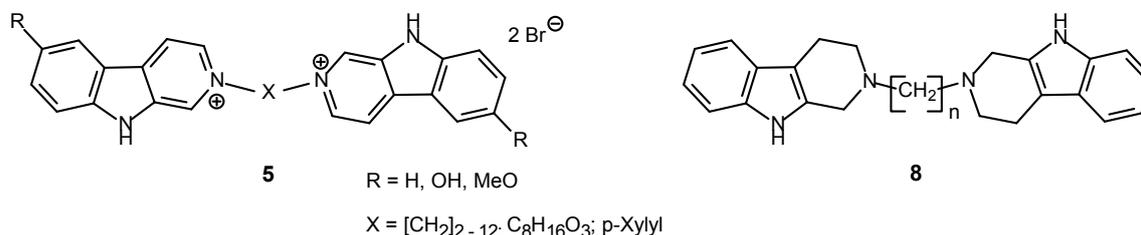


Abb. D-1 *N2*-bivalente β -Carboline **5** und **8** ($n = 5, 10$)

Im Unterschied zu den Ergebnissen gemessen an der AChE und BChE, die erst ab einer Spacerlänge von 7 gleichbleibend hohe Aktivität zeigten, ist am NMDAR dies bereits ab Spacern >6 zu beobachten. Es wurden Spacer bis 12 Methylengruppen untersucht. Verbindungen mit Spacern ab 9 Methylengruppen zeigten schlechte Löslichkeiten, was die pharmakologischen Untersuchungen einschränkte. Aus diesem Grunde wurden auch keine Derivate mit Spacern >12 synthetisiert.

Die Substitutionen am Spacer (**5-Xy**, **5-110**), des β -Carboline-Grundgerüst (**5MeO-5**, **5OH-5**), sowie die Verkleinerung des aromatischen Grundkörpers (**6**, **7**) und die partielle Reduktion (**8-5**, **8-10**) führten zu Aktivitätsverlusten an allen drei Targets.

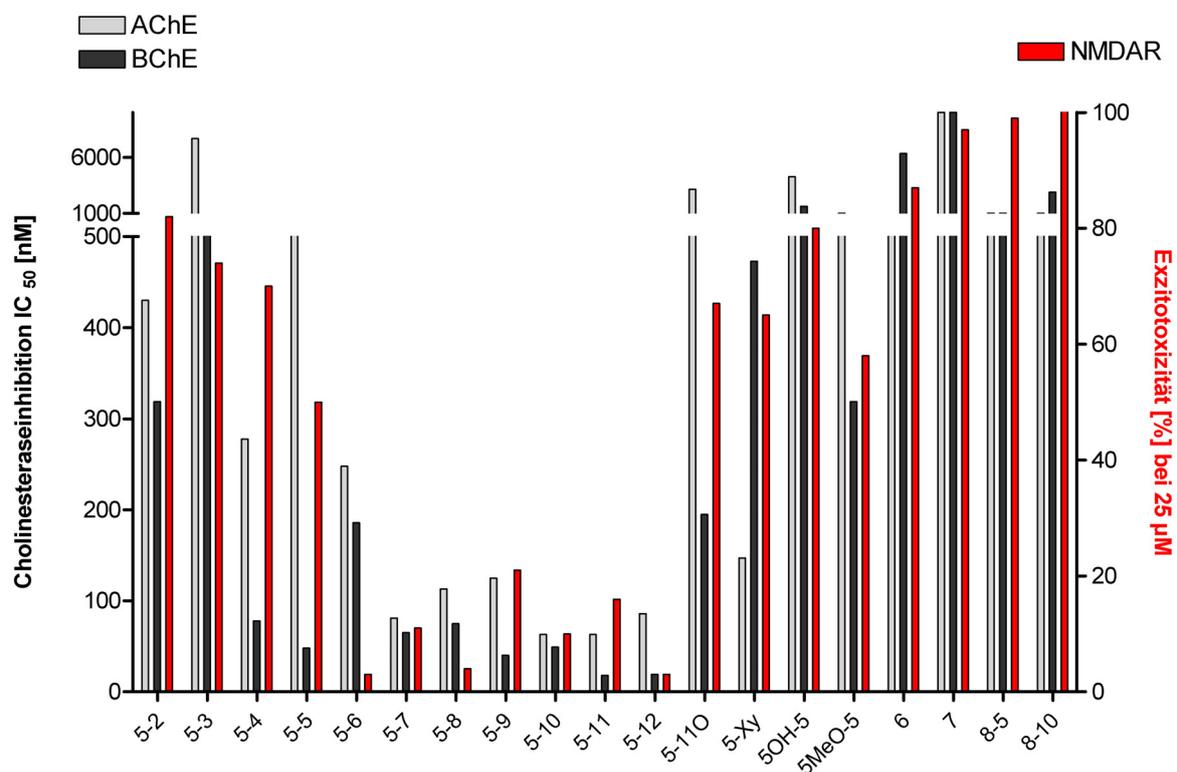


Abb. D-2 Pharmakologische Daten (AChE, BChE und NMDAR) der *N2*-bivalenten β -Carboline

Die nicht quartärnisierten *N*9-bivalenten β -Carboline (**10**) (siehe Abb. D-3) zeigten an allen drei Targets nur sehr geringe Aktivität, die sich durch die Quartärnisierung zu den Derivaten **11** ab einer Spacerlänge >5 enorm steigern ließ (Abb. D-4). Vermutlich können die nicht permanent geladenen, lipophileren Derivate **10** in vivo durch *N*-Methyltransferasen (siehe Abschnitt C.1, siehe S. 56) zu den aktiven Verbindungen **11** quartärnisiert werden und somit als Prodrugs für diese angesehen werden.

Die partielle Reduktion von **11-9** zu **12-9** führte an den Cholinesterasen nur zu einem schwachen Aktivitätsverlust, wohingegen die Aktivität am NMDAR nahezu vollständig verloren ging.

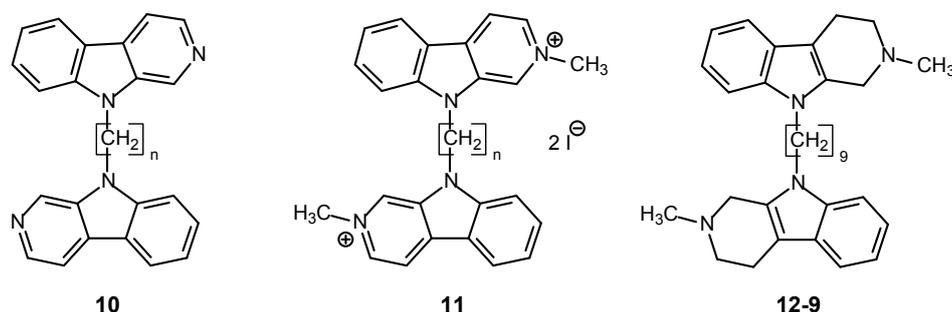


Abb. D-3 *N*9-bivalente β -Carboline **10**, **11** ($n = 5, 9, 12$) und **12-9**

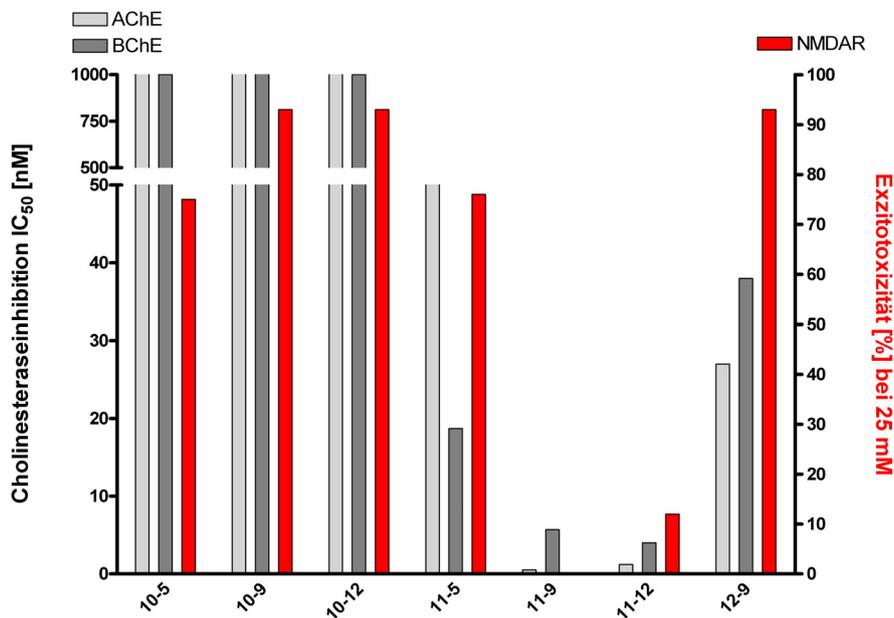


Abb. D-4 Pharmakologische Daten (AChE, BChE und NMDAR) der *N*9-bivalenten β -Carboline

Die untersuchten monovalenten β -Carboline **1**, **3**, **4**, **9**, **13** und **14** (siehe Abb. D-5) zeigten an der AChE und BChE moderate bis schwache inhibitorische Aktivitäten im mikromolaren Bereich. Am NMDAR hingegen sind sie sehr schwach wirksam und konnten bei einer Konzentration von 25 μ M die Exzitotoxizität um maximal 20% senken (siehe Abb. D-6).

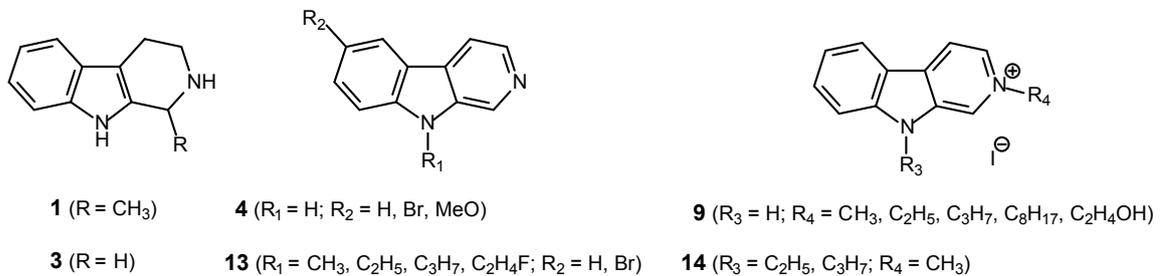


Abb. D-5 Monovalente β -Carboline **1**, **3**, **4**, **9**, **13**, **14**

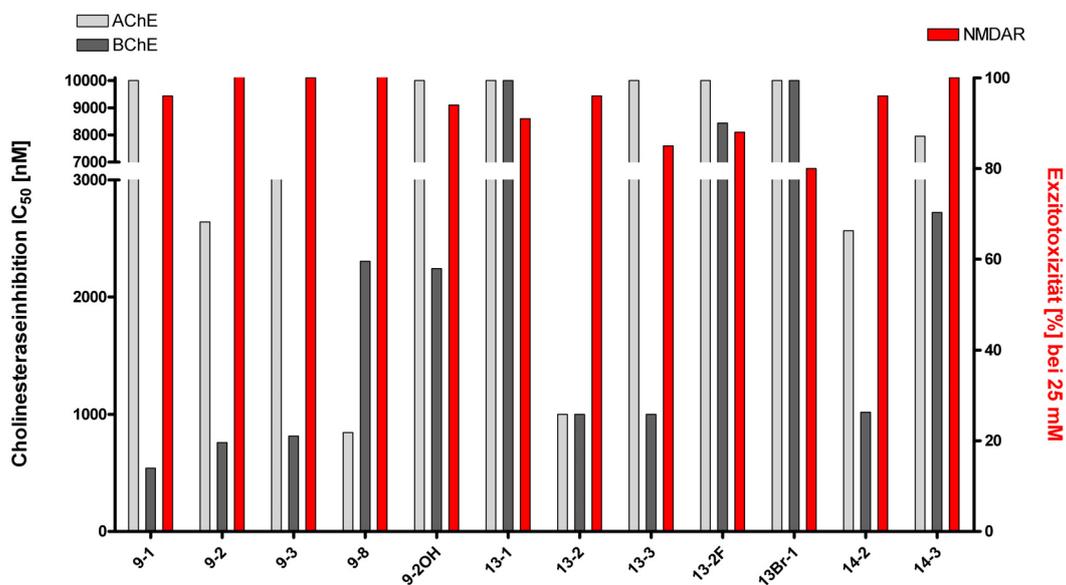


Abb. D-6 Pharmakologische Daten (AChE, BChE und NMDAR) der monovalenten β -Carboline

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß alle quartären N2- und N9-bivalenten β -Carboline ab einer Kettenlänge >5 eine signifikante Steigerung der inhibitorischen Aktivität an den drei Targets im Vergleich zu kürzeren Kettenlängen zeigten. Die hohe Aktivität blieb bis zu einer Spacerlänge von 12 Atomen erhalten. Allerdings konnte auch gezeigt werden, daß der quartäre Stickstoff (z.B. **14-2**, **5OH-5**, **11-5**) bzw. die Bivalenz (z.B. **5-11O**, **5OH-5**, **10-9**) allein keine ausreichenden Voraussetzungen für hohe Aktivitäten an den getesteten Targets sind.

E Zusammenfassung

Der Zielstellung (siehe A.3, S.22) folgend, sollen die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammengefaßt werden.

Ergebnisse zum Thema Neurotoxizität und Neuroprotektion

1) Synthese eines enantiomerenreinen 1,2,2-Trimethyltetrahydro- β -carbolinium-Salzes (**R2** oder **S2**)

Für die Darstellung eines enantiomerenreinen 1,2,2-Trimethyltetrahydro- β -carbolinium-Salzes (**R2** oder **S2**) wurde in einem ersten Schritt die Racemattrennung der Synthesevorstufe 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (**rac1**) mittels präparativer chiraler HPLC erreicht. Anschließend gelang die Umsetzung von **R1** zu **R2** mit Methyljodid unter Zusatz einer Hilfsbase (siehe Abb. E-1).

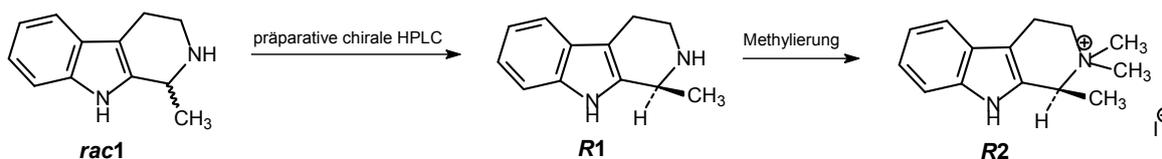


Abb. E-1 Darstellung des R-1,2,2-Trimethyltetrahydro- β -carbolinium-Salzes (**R2**)

2) Synthese von N9-monovalenten β -Carbolinen (**13**)

Es gelang alle in Abb. E-2 dargestellten monovalenten β -Carboline-Derivate zu synthetisieren. Die Substituenten in Position 9 wurden durch Umsetzung mit Natriumhydrid und Alkyljodid in DMF eingeführt. Die Bromierung in Position 6, für eine spätere radioaktive Markierung durch Halogen-Tritium-Austausch, gelang durch Reaktion des völlig unsubstituierten β -Carbolins (**4**) mit Brom.

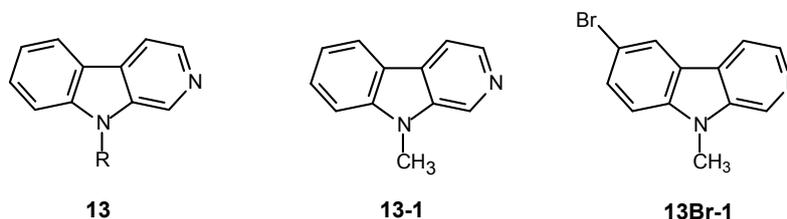


Abb. E-2 N9-monovalente β -Carboline **13** ($R = C_2H_5, C_3H_7, C_2H_4F$), 9-Methyl- β -carbolin (**13-1**), 6-Bromo-9-methyl- β -carbolin (**13Br-1**)

3) *Synthese von potentiell neurotoxischen N2,N9-disubstituierten, monovalenten β -Carbolinen (14)*

Die Quartärnisierung einiger Derivate **13** zu den quartären Analoga **14** gelang durch die Umsetzung mit Methyljodid in Aceton (siehe Abb. E-3).

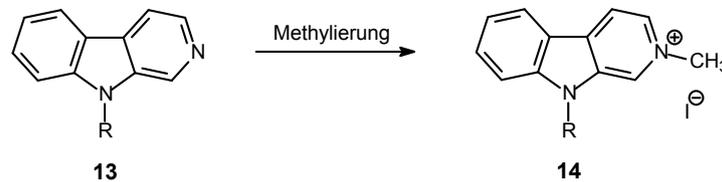


Abb. E-3 N2,N9-disubstituierte monovalente β -Carboline (**14**) (R=C₂H₅, C₃H₇)

4) *Untersuchung auf Neurotoxizität und Neuroprotektion*

Einige der unter Punkt 1, 2, 3 und 6 aufgeführten Derivate (**R2**, **9**, **13**, **14**) und β -Carboline aus früheren Arbeiten des Arbeitskreises wurden auf neurotoxische Effekte und einige Derivate **13** auf neuroprotektive Eigenschaften an dopaminergen Neuronen an der Charité Berlin durch Frau Dr. Catrin Wernicke und Herrn Prof. Hans Rommelspacher untersucht. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- ⇒ *Das R-Enantiomer des 1,2,2-Trimethyltetrahydro- β -carbolinium-Salzes (**R2**) besaß DAT-unabhängige, neurotoxischere Eigenschaften als das Racemat **rac2**.*
- ⇒ *6-Methoxy- und 1-Methyl-Derivate zeigten meist stärker neurotoxische Eigenschaften, wohingegen die 6-Hydroxylierung im Allgemeinen zu einer gesteigerten DAT-abhängigen Toxizität führte. **14MeO-1** zeigte von allen untersuchten β -Carbolinen die stärksten neurotoxischen Eigenschaften. Korrelationen zwischen den im MTS-Assay (Neurotoxizitätsuntersuchung) ermittelten EC₅₀-Werten und den intrazellulären Konzentrationen der Testsubstanzen, gemessen im Uptake-Assay, sind nicht zu erkennen.*
- ⇒ *Trotz der Molekülgröße zeigte das untersuchte N2-homobivalente β -Carbolin **5-4** eine hohe DAT-abhängige und eine nur geringe DAT-unabhängige Neurotoxizität.*
- ⇒ *Die Substanzen **13-1**, **13MeO-1** und **13-2F** scheinen einen günstigen Effekt auf das Wachstum der Zellen und somit einen neuroprotektiven Effekt zu haben. Ein größerer Alkyl-Substituent in Position 9 führt zu einer Verschlechterung der neuroprotektiven Eigenschaften.*

Ergebnisse zum Thema inhibitorische Aktivität an der AChE und BChE

5) Synthese von N2- und N9-bivalenten β -Carbolinen (**5**, **10**)

Zur Darstellung der N2-homobivalenten β -Carboline (**5**) (siehe Abb. E-4) wurde β -Carboline (**4**) mit α,ω -Dibromalkan in DMF umgesetzt. Die Synthese der N9-homobivalenten β -Carboline (**10**) (siehe Abb. E-4) gelang durch die Reaktion von β -Carboline (**4**) mit α,ω -Dibromalkan in DMSO unter Zusatz von Natriumhydroxid. Die Quartärnisierung der Derivate **10** zu **11** wurde mit Methyljodid in Aceton erreicht (siehe Abb. E-4)

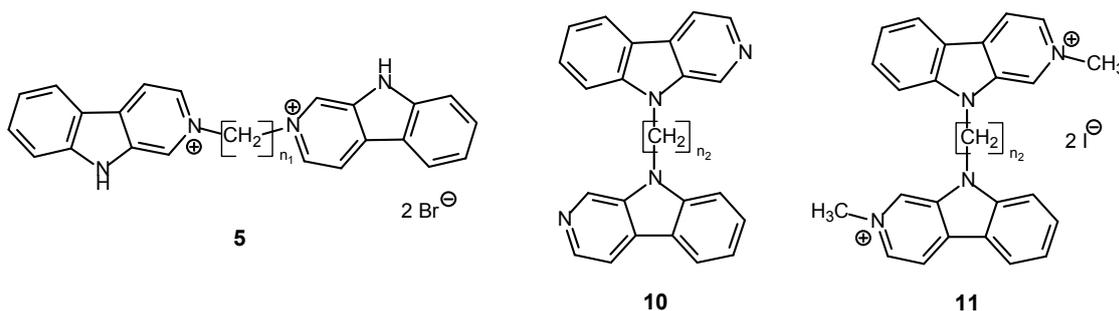


Abb. E-4 Grundstrukturen der homobivalenten β -Carboline (**5**, **10**, **11**); $n_1 = 2-12$; $n_2 = 5, 9, 12$

Zusätzlich sollte eine Verbindung mit hydrophilerem Spacer synthetisiert werden, da die Löslichkeit der Verbindungen mit längerem Spacer (>9 Methylengruppen) sehr schlecht war. Durch die Einführung von drei Sauerstoffatomen in den 11er Spacer (**5-11O**) sollte der erhoffte Effekt erhalten werden. Weiterhin wurde eine Verbindung mit dem starren Spacer *p*-Xylyl synthetisiert (**5-Xy**). Die Synthesen erfolgten mit den jeweiligen Dibrom-Derivat der Spacer analog den oben für **5** beschriebenen Bedingungen.

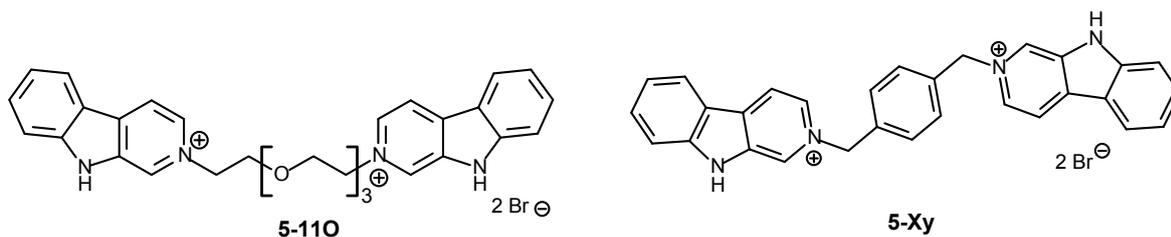


Abb. E-5 N2-homobivalente β -Carboline **5-11O** und **5-Xy**

Um auch den Einfluß des aromatischen Trizykclus der N2-homobivalenten β -Carboline zu ermitteln, wurden ein (**6**) bzw. zwei (**7**) β -Carboline gegen Pyridin-Ringe ersetzt und analog zu den Verbindungen **5** synthetisiert (siehe Abb. E-6).

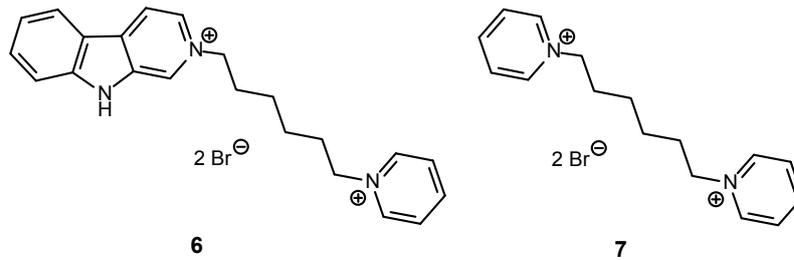


Abb. E-6 heterobivalentes β -Carboline **6** und Bis-Pyridinium-Derivat **7**

6) Synthese von N2-monovalenten β -Carbolinen (**9**)

Die Darstellung der N2-monovalenten β -Carboline (**9**) gelang durch die Umsetzung mit Alkyljodid in Aceton (siehe Abb. E-7).

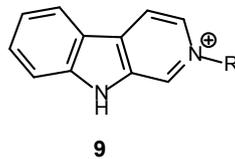


Abb. E-7 Grundstrukturen der N2-monovalenten β -Carboline **9** ($R=CH_3, C_2H_5, C_3H_7, C_8H_{17}, C_2H_4OH$)

7) Synthese von partiell reduzierten homobivalenten β -Carbolinen (**8, 12**)

Die Synthese der partiell reduzierten homobivalenten β -Carboline (**8, 12**) gelang durch die Umsetzung der quartären Verbindungen **5** bzw. **11** mit Natriumborhydrid in Methanol.

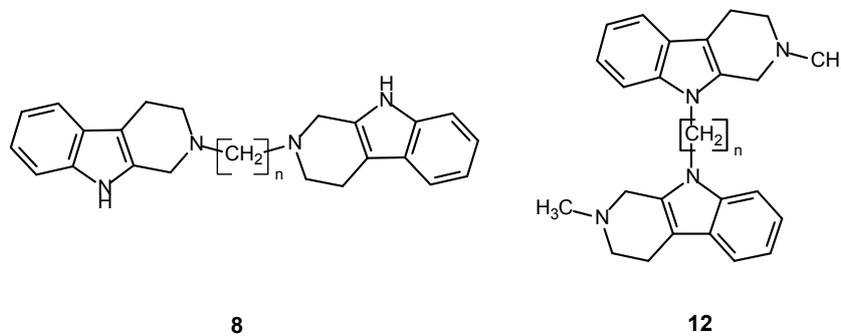


Abb. E-8 Grundstrukturen der partiell reduzierten homobivalenten β -Carboline (**8,12**)

8) Untersuchung der inhibitorischen Aktivität an der AChE und BChE

Alle Zielverbindungen und Synthesestufen wurden auf ihre inhibitorische Aktivität an der AChE und BChE in einem *in vitro* Enzymassay (Ellman-Test) untersucht. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- ⇒ Die N2-homobivalenten β -Carboline (**5**) zeigten bei einer Spacerlänge von 2-6 einen IC_{50} -Wert im drei- bis vierstelligen nanomolaren Bereich, währenddessen die Derivate mit einer Spacerlänge von 7-12 IC_{50} -Werte nur im zwei oder niedrig

dreistelligen nanomolaren Bereich besaßen. Für alle Derivate 5 ergab sich eine minimal höhere Aktivität an der BChE.

- ⇒ *Hydroxylierung und Methoxylierung in Position 6 führten zu einer Aktivitätsverringering an beiden Cholinesterasen, was sich auch für den oxygenierten und starren Spacer gezeigt hat.*
- ⇒ *Der Austausch eines oder beider aromatischen Trizyklen der homobivalenten β -Carboline durch Pyridin führte zu einer Aktivitätsabnahme.*
- ⇒ *Die Reduktion der N2-homobivalenten β -Carboline (5) zu Tetrahydro-Derivaten (8) führte zu einem starken Aktivitätsverlust.*
- ⇒ *Die N2-monovalenten β -Carboline zeigten geringe Aktivitäten im drei- bis vierstelligen nanomolaren Bereich. Die Entfernung des zweiten aromatischen Systems führte also bei allen, bis auf 9-3, generell zu einer Aktivitätsabnahme.*
- ⇒ *Die N9-homobivalenten β -Carboline 10 zeigten sehr schwache Aktivitäten. Die Methylierung und damit Quartärnisierung in Position 2 führte zu gesteigerten Aktivitäten an AChE und BChE. 11-9 zeigte die stärkste inhibitorische Aktivität aller Zielsubstanzen mit einem $IC_{50}(AChE)$ von 0,5 nM und einem $IC_{50}(BChE)$ von 5,7 nM. Die partielle Reduktion zu 12-9 führte zu einem geringfügig schwächer aktiven, aber nicht quartären und somit besser membrangängigem Derivat.*
- ⇒ *Die N9- und N2,N9-substituierten monovalenten β -Carboline zeigten sehr geringe Aktivitäten im mikromolaren Bereich.*
- ⇒ *Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Verknüpfung der β -Carboline über N2 und N9 sinnvoll war, da sich gesteigerte inhibitorische Aktivitäten verglichen mit den N2- und N9-substituierten monovalenten Analoga ergaben. Die Verknüpfung der bivalenten β -Carboline über N9 scheint durch die hohen Aktivitäten und möglicherweise bessere Membrangängigkeit des nicht permanent geladenen Derivates 12-9 am erfolversprechendsten in Hinblick auf eine therapeutische Anwendung zu sein.*

Ergebnisse weiterer pharmakologischer Charakterisierungen

9) Bestimmung der antagonistischen Wirkung am NMDA-Rezeptor

Alle Zielverbindungen und Synthesestufen wurden auf ihre inhibitorische Aktivität am NMDA-Rezeptor in einem in vitro Assay (Exzitotoxizitätsassay) am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der FSU Jena von Kai-Uwe Schmidtke und Heidemarie Graf aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Thomas Winckler durchgeführt.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- ⇒ Monovalente β -Carboline zeigten im Grobscreening sehr schwache Aktivitäten (> 90% Exzitotoxizität). Dabei unterschieden sich Tetrahydro-Derivate (**1, 2**), vollständig aromatisierte (**4**) und in Position 2,6 und 9 substituierte β -Carboline (**9, 13, 14**) nur in geringem Maße.
 - ⇒ Bivalente, quartäre β -Carboline (**5, 11**) zeigten abhängig von der Kettenlänge im Grobscreening hohe Aktivitäten (Exzitotoxizität z.T. < 10%). **11-9** zeigte die höchste inhibitorische Aktivität mit IC_{50} -Werten von 1,4 μ M an L12G10-Zellen bzw. 2,9 μ M an L13E6-Zellen. Da die Derivate **5** und **11** ab einem 6er Spacer hohe inhibitorische Aktivitäten zeigten, scheint eine Bindung jeweils eines aromatischen Zentrums der bivalenten Strukturen an je eine Bindungsstelle am NMDAR denkbar, deren Abstand etwa 6 Atome beträgt.
 - ⇒ Die partielle Reduktion der quartären, bivalenten Derivate (**5, 11**) zu Tetrahydro- β -Carbolinen (**8, 12**) führte zu einem nahezu vollständigem Aktivitätsverlust. Die aromatischen, nicht quartären Verbindungen **10** waren ebenfalls nur gering aktiv. Ebenso führte der Austausch eines oder beider aromatischer Trizyklen der homobivalenten β -Carboline gegen Pyridin-Ringe (**6, 7**) zu einer Aktivitätsabnahme. Für die Wechselwirkung der Derivate mit dem NMDAR ist offensichtlich ein großes aromatisches Gerüst, wie das β -Carbolin, essentiell.
 - ⇒ Nahezu alle getesteten β -Carboline zeigten ähnliche inhibitorische Aktivitäten an beiden Zelllinien (L12G10 und L13E6). Es konnte somit keine signifikante Selektivität der Verbindungen für die verschiedenen Untereinheiten (NR1/NR2; NR1/NR3) gefunden werden.
- 10) *Etablierung eines Assays zur Untersuchung der AChE induzierten A β -Aggregation*
- ⇒ *Es ist im Rahmen der zur Verfügung stehenden Zeit nicht gelungen, den Assay zur Bestimmung der AChE-induzierten A β -Aggregation zu etablieren. Dementsprechend konnten auch keine Zielverbindungen auf ihre PAS-Inhibition hin untersucht werden.*

F Abstract

β -Carbolines are an interesting class of natural products, especially with respect to Alzheimer's and Parkinson's diseases. It is postulated that some β -carbolines are potential neurotoxins, playing a role in the pathogenesis of Parkinson's disease, whereas others are considered as potential agents for the treatment of Alzheimer's disease.

In this work, 40 β -carboline derivatives were synthesized and pharmacologically tested, in order to assess their neurotoxic / neuroprotective effects. Moreover, their activities towards cholinesterases and NMDA-receptor were examined.

The pathogenesis of Parkinson's disease is characterized by a massive loss of dopaminergic cells. Therefore some β -carboline derivatives presumably physiologically occurring were tested for their toxicity. The toxicity tests were carried out in a DAT (dopamine transporter) dependent as well as an independent protocol, in an attempt to determine the specific toxicity towards dopaminergic cells. The results showed no clear image. Since some 9-methylated β -carbolines showed neuroprotective effects, structurally similar target compounds were also examined for their neuroprotective properties and the 9-fluoro- β -carboline (**13-2F**) was found to possess the strongest ones.

Cholinesterases and NMDA-receptor are important therapeutic targets, as they enhance cognitive skills. Cholinesterase and NMDA-receptor inhibitors are used in the treatment of Alzheimer's disease; NMDA-receptor inhibitors are additionally applied in the treatment of Parkinson's disease. Therefore, the inhibitory effect of all target compounds on cholinesterases (AChE and BChE) was tested. Some derivatives showed higher activities than the therapeutically used donepezil (IC_{50} (AChE) 22 nM; IC_{50} (BChE) 4150 nM) and galantamine (IC_{50} (AChE) 600 nM; IC_{50} (BChE) 8400nM). Most of the compounds possessing strong cholinesterase inhibitory properties also proved to be potent NMDA-receptor inhibitors, showing an activity similar to memantine (IC_{50} (NMDAR) 6 μ M). The most promising compound with respect to the three targets, was the *N*9-homobivalent β -carboline **11-9**; displaying an IC_{50} of 1 nM for AChE, an IC_{50} of 6 nM for BChE and an IC_{50} of 1 μ M for the NMDA receptor.

Before considering the therapeutic application of these potent β -carboline derivatives, their ability to cross the blood brain barrier, and thus to reach their therapeutic targets, should first be examined.

G Experimenteller Teil

G.1 Experimenteller Teil, Synthesen

G.1.1 Allgemeine Angaben zu Materialien und Geräten

Dünnschichtchromatographie

DC-Alufolien, Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck (Darmstadt, Deutschland))

Elementaranalyse

Vario EL III (CHNOS Elementaranalysator) (Elementar Analysensysteme GmbH (Hanau, Deutschland))

Die Messungen wurden am Institut für Organische Chemie an der FSU Jena durchgeführt.

Säulenchromatographie

Kieselgel 60 (Merck (Darmstadt, Deutschland))

Schmelzpunktbestimmung

Melting Point Apparatus (Gallenkamp (Loughborough, United Kingdom))

nicht korrigiert

Infrarotspektren

Thermo Nicolet Avatar 370 DTGS FTIR-Spektrometer (Therma Electron Corporation (USA))

Kernresonanzspektroskopie (¹H- und ¹³C-NMR-Spektren)

Avance 200, Avance 250, Avance 400 (Bruker Biopsin (Karlsruhe, Deutschland))

Die Messungen wurden am Institut für Organische Chemie an der FSU Jena durchgeführt.

Massenspektren (hochauflösende Masse)

TSQ Quantum AM Spectrometer (Therma Electron Corporation (Waltham, USA))

Die Messungen wurden am Hans-Knöll-Institut in Jena durchgeführt.

Molekularmassenbestimmung

Atomgewichtstabelle von 1962, bezogen auf ¹²C

Polarimeter

Polartronic E, 4-Filter (Firma Schmidt und Haensch (Berlin Deutschland))

G.1.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

Synthese von *N*2-homobivalenten β -Carbolinen

Nach Musilek et al. werden 8,2 mmol β -Carbolin (**4**) zusammen mit 3,7 mmol α,ω -Dibromalkan in einem 100 ml Rundkolben mit 10 ml DMF bei 100°C unter Rückfluß für 4-6 h erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur (RT) werden 40 ml Aceton zugegeben, wobei das entstandene Produkt ausgefällt wird. Die Suspension wird abfiltriert, mit 100 ml Aceton gewaschen und der Rückstand im Vakuum getrocknet [Musilek et al., 2006].

Synthese von *N*2-monovalenten β -Carbolinen

Die Synthesen erfolgen nach der Standardvorschrift für Quartärnisierungen von tertiären Aminen.

3,0 mmol tertiäres β -Carbolin-Derivat werden in 100 ml Aceton gelöst und mit drei- bis fünffachem molarem Überschuß an Methyljodid 24 h bei RT gerührt. Anschließend wird das Methyljodid bei 50°C verdampft, der Niederschlag abfiltriert, mit Aceton gewaschen und der Rückstand im Vakuum getrocknet.

Synthese von *N*9-bivalenten β -Carbolinen

Nach Yakuphanoglu et al. werden 3,0 mmol β -Carbolin (**4**) in 7,5 ml DMSO gelöst. Zu der Lösung werden 85 mmol verriebenes Natriumhydroxid und 1,5 mmol α,ω -Dibromalkan gegeben und für 4 h bei RT gerührt. Anschließend werden 10 ml Wasser zugegeben und die Reaktionsmischung mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 10%iger Natriumhydroxid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft [Yakuphanoglu et al., 2007]. Der verbleibende Rückstand wird über Kieselgel 60 mit einer Mischung aus Chloroform und Methanol (12:1) säulenchromatographisch gereinigt. Die organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, eingedampft und der Rückstand im Vakuum getrocknet.

Synthese von *N*9-monovalenten β -Carbolinen

6,0 mmol β -Carbolin (**4**) werden in 10 ml getrocknetem DMF unter N_2 -Atmosphäre bei RT gelöst und anschließend auf 0°C gebracht. 14,86 mmol Natriumhydrid (60%ige Petroleum-Suspension) werden zugegeben und bei RT für 1 h gerührt bis sich der entstandene Niederschlag aufgelöst hat. Die Lösung wird auf -10°C abgekühlt und 6,0 mmol Methyljodid zugegeben, 15 min lang unter den Bedingungen gerührt und anschließend bei RT über Nacht weiter gerührt. Das Methyljodid wird im Vakuum entfernt, 100 ml Wasser zur Reaktionslösung zugegeben und mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen

Phasen werden mehrmals mit Wasser gewaschen und mit 2N Salzsäure extrahiert. Die Salzsäure-Phasen werden vereinigt und im Schwerphasenextraktor mit Chloroform zwei Tage lang extrahiert. Die Chloroformphase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, eingedampft und der Rückstand im Vakuum getrocknet [Hamann et al., 2008].

Partielle Reduktion von quartären homobivalenten β -Carbolinen

0,35 mmol β -Carbolin-2-ium-Derivate werden in 50 ml Methanol unter N_2 -Atmosphäre bei RT gelöst. Die Lösung wird langsam mit 0,50 g Natriumborhydrid versetzt und für 2-4 Stunden gerührt. Das organische Lösungsmittel wird vorsichtig verdampft, 10 ml Wasser zum Rückstand gegeben und die wäßrige Phase mit Dichlormethan extrahiert. Anschließend werden die organischen Phasen vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingedampft und der Rückstand im Vakuum getrocknet.

G.1.3 Monographien

rac-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (1)

1,00 g (5,08 mmol) Tryptamin werden in 50 ml Dichlormethan gelöst und tropfenweise mit etherischer Salzsäure versetzt. Das entstandene Tryptamin-Hydrochlorid wird abfiltriert, mit Dichlormethan gewaschen und im Vakuum getrocknet.

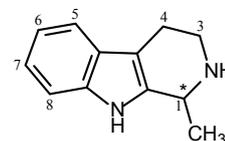
Nach Bobbitt und Willis [Bobbitt et al., 1980] werden 1,00 g (5,08 mmol) Tryptamin-Hydrochlorid in 15 ml einer 1:1 Mischung aus Wasser und Methanol gelöst und mit 0,57 g Brenztraubensäure versetzt. Die Lösung wird für 12 h bei RT unter N₂-Atmosphäre gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und in 17 ml siedendem Wasser suspendiert. Anschließend wird tropfenweise konz. Salzsäure zugegeben bis alles gelöst ist und für 15 bis 30 min zum Sieden erhitzt. Die erkaltete Lösung wird mit Natriumhydroxid auf pH 12 eingestellt und mit Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, eingedampft und der Rückstand im Vakuum getrocknet.

MG: C₁₂H₁₄N₂ (186,25g/mol)

Ausbeute: 1,5 g (74%), beiges Pulver

Rf: 0,06 (FM Chloroform/Methanol (9:1) + 1 Tr. NH₃)

Smp.: 136-138°C, Lit.: 179-180°C [Menshikov et al., 1950]



¹H-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.34-1.37	d ($J = 6.7$ Hz)	3	CH ₃
2.55-2.67	m	2	aliph., H4
2.77-2.87	m	1	aliph., H3
3.10-3.19	m	1	aliph., H3
3.96-4.04	q ($J = 6.5$ Hz)	1	aliph., H1
6.89-6.95	t ($J = 6.3$ Hz)	1	arom., H6
6.96-7.02	dt ($J = 1.0, 7.1$ Hz)	1	arom., H7
7.25-7.28	d ($J = 7.7$ Hz)	1	arom., H8
7.32-7.35	d ($J = 7.5$ Hz)	1	arom., H5
10.66	s	1	NH

¹³C-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
21.01	CH ₃
22.87	aliph., C4
42.69	aliph., C3
48.31	aliph., C1
107.17	arom.
111.24	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
117.80	arom.
118.56	arom.
120.64	arom.
127.55	arom.
135.99	arom.
138.82	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3284, 3139, 3047, 2936, 1454, 1157, 1119, 742

Racemattrennung von 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (*rac1*)

Die Trennung der Enantiomere erfolgt über eine präparative HPLC an der Chiralcel[®] OD-Säule.

HPLC-System: HPLC-Pumpe Labomatic-HD-200 (Labomatic, Alschwil, CH), UV/VIS-Filterphotometer (Knauer, Berlin) mit 220 nm Filter, Thermostat Julabo F12 (Julabo), Schreiber Chromatopac C-6A (Shimadzu, Duisburg), 10 ml Probenaufgabenschleife, 6-Kanalschaltventil (manuell) zur Fraktionssammlung

Stationäre Phase: Chiralcel[®] OD-Säule (50 x 5 cm) mit Kühlmantel (Daicel Chemical Industries, Tokio)

Trennbedingungen: Mobile Phase n-Hexan/Isopropanol 90/10, 35°C, Flußrate: variabel von 260 ml/min

Pro Lauf werden 50-100 mg in 10 ml Isopropanol gelöst. Nach 3 Läufen mit 50 mg, 61 mg und 50 mg Racemat werden 68 mg des *R*-Enantiomers und 140 mg des *S*-Enantiomers erhalten.

Die Racemattrennung wird mittels analytischer HPLC unter den folgenden Bedingungen erreicht:

HPLC-System: Systemcontroller SCL10-Avp, Autoinjektor SIL-10A, UV-Detektor SPD-10A, 2 Pumpen LC-10A, PC-gestützte Steuerung und Auswertung mit der Software CLASS-VP 5.03 (Shimadzu, Duisburg), Säulenofen Jetstream plus (Jasco, Groß-Umstadt)

Stationäre Phase: Chiralcel[®] OD-Säule [Cellulose-tris-(3,5-dimethylphenylcarbamat)] auf Kieselgel (10 μ m), 250 x 4,6 mm (Daicel Chemical Industries, Tokio und von Prof. Chankvetadze, Münster, zu Testzwecken überlassen)

Trennbedingungen: Mobile Phase n-Hexan/Isopropanol 90/10 mit 0,1% Diethylamin, 35°C, Flußrate: 1,4 ml/min, Injektion 20 μ l der Prüflösung

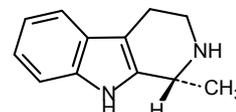
R-(+)-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (**R1**)

$[\alpha]_D^{20} + 61$ (5 mg/ml, Ethanol), e.e. 100%

Lit.: $[\alpha]_D^{20} + 53$ (2 g/ml, Ethanol) [Lee et al., 1994]

Retentionszeit 19 min

Smp.: 136°C, Lit.: 70-75°C [Lee et al., 1994]



S-(-)-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (**S1**)

$[\alpha]_D^{20} - 52$ (5 mg/ml, Ethanol), e.e. 96%

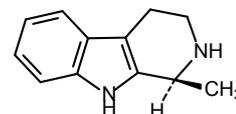
Lit.: $[\alpha]_D^{20} - 41$ (2 g/ml, Ethanol), e.e. 79%

[Yamada et al., 1983]

Lit.: $[\alpha]_D^{20} - 52$ (2 g/ml, Ethanol), e.e. 79% [Akimoto et al., 1974]

Retentionszeit 26 min

Smp.: 138°C, Lit.: 149-168°C [Yamada et al., 1983]; Lit.: 177°C [Akimoto et al., 1974]



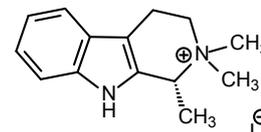
R-(+)-1,2,2-Trimethyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (R2)

0,40 mg (0,20 mmol) *R*-(+)-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro-9*H*- β -carbolin (**R1**) werden in 10 ml Acetonitril gelöst. 0,03 ml (0,20 mmol) Diisopropylethylamin (Hünig-Base) und 0,03 ml (0,40 mmol) Methyljodid werden zugesetzt und die Mischung für 3 Tage bei RT unter N₂-Atmosphäre gerührt. Die Lösungsmittel werden vollständig verdampft, der Rückstand in 0,5 ml Acetonitril gelöst und tropfenweise Ether zugegeben, bis ein Niederschlag entsteht. Dieser wird abfiltriert, mit Ether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

MG: C₁₄H₁₉N₂ (342,22 g/mol)

Ausbeute: 0,03 g (43%), ockerfarbene Kristalle

Smp.: 220-223°C, Lit.: 228°C [Barger et al., 1938]



¹H-NMR: 250 MHz in MeOD

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.81-1.84	d ($J = 6.7$ Hz)	3	CHCH ₃
3.10	m	5	N ⁺ CH ₃ ; aliph., H4
3.34	s	3	N ⁺ CH ₃
3.74-3.96	m	2	aliph., H3
4.97-5.05	q ($J = 6.7$ Hz)	1	aliph., H1
7.05-7.11	dt ($J = 1.1, 8.0$ Hz)	1	arom., H6
7.14-7.21	dt ($J = 1.2, 8.2$ Hz)	1	arom., H7
7.37-7.41	d ($J = 8.2$ Hz)	1	arom., H5
7.49-7.52	d ($J = 7.9$ Hz)	1	arom., H8

¹³C-NMR: 250 MHz in MeOD

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
12.73	CHCH ₃	110.55	arom.
16.77	aliph., C4	117.35	arom.
44.05	N ⁺ CH ₃	118.86	arom.
50.41	N ⁺ CH ₃	121.78	arom.
60.23	aliph., C3	125.01	arom.
65.23	aliph., C1	127.92	arom.
103.06	arom.	136.65	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3199, 3006, 2971, 2857, 1619, 1568, 1461, 1315, 1242, 916, 758

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	48,66	5,50	7,71
berechnet für C ₁₄ H ₁₉ N ₂ x 1/6 H ₂ O	48,71	5,64	8,11

1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin (3)

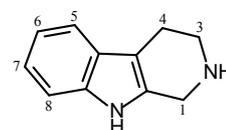
Nach Ho und Walker [Ho et al., 1988] werden 5,90 g (30,0 mmol) Tryptamin-Hydrochlorid in 95 ml Wasser unter leichtem Erwärmen gelöst und nach dem Abkühlen der Lösung mit einer Glyoxalsäure-Lösung (3,49 g (38,0 mmol) Glyoxalsäure in 8,0 ml Wasser) versetzt. Anschließend wird eine eisgekühlte Kaliumhydroxid-Lösung (1,65 g (29,4 mmol) KOH in 8,0 ml Wasser) zugegeben und eine Stunde bei RT gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit 20 ml Wasser gewaschen. Der Filterkuchen wird nun in 56 ml Wasser aufgenommen, 8 ml konz. Salzsäure zugegeben und für 30 min zum Sieden erhitzt. Anschließend werden weitere 8 ml konz. Salzsäure zugegeben und 15 min zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wird der entstandene Niederschlag abfiltriert und mit 8 ml Wasser gewaschen. Dieser wird in 95 ml Wasser gelöst, auf 55°C erhitzt und der pH-Wert mit 20%iger Kaliumhydroxid-Lösung auf 12 eingestellt. Nach Abkühlen der Lösung auf RT wird der entstandene Niederschlag abfiltriert, mit 80 ml Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.

MG: $C_{11}H_{12}N_2$ (172,23g/mol)

Ausbeute: 1,8 g (35%), beiges Pulver

Rf: 0,30 (FM Chloroform/Methanol (9:1) + 1 Tr. NH_3)

Smp.: 207°C, Lit.: 204-205°C [Ho et al., 1988]



1H -NMR: 250 MHz in $[D_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.56-2.60	t ($J = 5.6$ Hz)	2	aliph., H4
2.95-2.99	t ($J = 5.7$ Hz)	2	aliph., H3
3.88	s	2	aliph., H1
6.88-7.02	m	2	arom.
7.24-7.27	d ($J = 7.5$ Hz)	1	arom.
7.32-7.35	d ($J = 7.5$ Hz)	1	arom.
10.64	s	1	NH

^{13}C -NMR: 250 MHz in $[D_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
22.65	aliph., C4	118.53	arom.
43.11	aliph., C3	120.58	arom.
43.84	aliph., C1	127.72	arom.
107.37	arom.	134.67	arom.
111.19	arom.	135.94	arom.
117.56	arom.		

IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 3288, 3063, 2939, 2876, 2822, 2743, 1591, 1477-1432, 1214, 793

β -Carbolin (4)

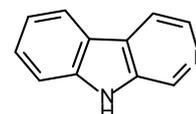
1,3 g (10,4 mmol) **3** werden in 65 ml Cumol gelöst und mit 0,52 g Palladium/Kohle (10% Palladium) versetzt. Die Mischung wird unter N₂-Atmosphäre unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Mittels DC wird der Verlauf der Reaktion kontrolliert. Bei vollständiger Umsetzung von **3** wird zu dem Ansatz 30 ml Ethanol gegeben, nochmals unter Rückfluß zum Sieden erhitzt und heiß filtriert. Es wird mit 100 ml heißem Ethanol nachgewaschen. Anschließend werden die organischen Phasen vereinigt, eingedampft und der Rückstand in Toluol umkristallisiert.

MG: C₁₁H₁₂N₂ (168,20 g/mol)

Ausbeute: 1,8 g (35%), weiße Kristalle

Rf: 0,29 (FM Chloroform/Methanol (9:1) + 1 Tr. NH₃)

Smp.: 198-200°C, Lit.: 198-200 °C [Speitel et al., 1949]



¹H-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
7.20-7.26	dt ($J = 1.3, 8.0$ Hz)	1	arom., H6
7.49-7.57	m	2	arom., H7, H8
8.07-8.10	d ($J = 5.2$ Hz)	1	arom., H4
8.20-8.24	d ($J = 7.8$ Hz)	1	arom., H5
8.32-8.34	d ($J = 5.2$ Hz)	1	arom., H3
9.25	s	1	arom., H1
11.59	s	1	NH

¹³C-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
112.39	arom.
115.08	arom.
119.69	arom.
121.05	arom.
122.21	arom.
127.90	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
128.55	arom.
134.47	arom.
136.44	arom.
138.55	arom.
140.99	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3128, 3044, 2938, 2856, 2739, 2658, 1627, 1503, 1449, 1244, 733,

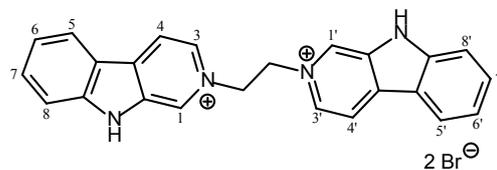
2-[2-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)ethyl]-β-carbolin-2-iumdibromid (5-2)

1,38 g (8,2 mmol) β-Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, mit 0,70 g (3,7 mmol) 1,2-Dibromethan in 10 ml DMF umgesetzt.

MG: C₂₄H₂₀Br₂N₄ (524,26g/mol)

Ausbeute: 0,81 g (42%), gelbes Pulver

Smp.: 326°C



¹H-NMR: 400 MHz in [D₆]-DMSO + Trifluoressigsäure

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
5.50	s	4	2xN ⁺ CH ₂
7.44-7.48	mc	2	arom., H6,H6'
7.82-7.83	m (<i>J</i> = 3.7 Hz)	4	arom., H7,H7',H8,H8'
8.48-8.49	d (<i>J</i> = 8.1 Hz)	2	arom., H5,H5'
8.53-8.54	d (<i>J</i> = 6.3 Hz)	2	arom., H4,H4'
8.75-8.77	d (<i>J</i> = 6.4 Hz)	2	arom., H3,H3'
9.46	s	2	arom., H1,H1'
12.94	s	2	2xNH

¹³C-NMR: 400 MHz in [D₆]-DMSO + Trifluoressigsäure

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
60.50	2xN ⁺ CH ₂	124.09	arom.
113.48	arom.	130.53	arom.
114.03	arom.	132.78	arom.
118.34	arom.	133.17	arom.
119.62	arom.	135.34	arom.
122.20	arom.	144.72	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3411, 3038-2971, 2914, 1648, 1520, 1340, 1261, 729, 609

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	54,80	4,07	10,45
berechnet für C ₂₄ H ₂₀ Br ₂ N ₄	54,99	3,85	10,69

2-[3-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)propyl]-β-carbolin-2-iumdibromid (5-3)

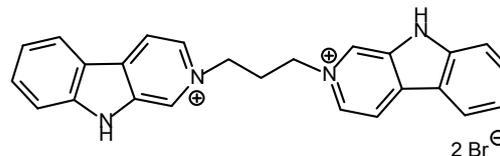
1,38 g (8,2 mmol) β-Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, mit 0,75 g (3,7 mmol) 1,3-Dibrompropan in 10 ml DMF umgesetzt.

MG: C₂₅H₂₂Br₂N₄ (538,28 g/mol)

Ausbeute: 1,73 g (87%), gelbes Pulver

Smp.: 265-267°C,

Lit.: (C₂₅H₂₂Br₂N₄) 265-270°C [Agarwal et al., 1987]



¹H-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.81-2.87	t (J = 6.9 Hz)	2	N ⁺ CH ₂ CH ₂
4.93-4.98	t (J = 6.9 Hz)	4	2xN ⁺ CH ₂
7.38-7.49	mc	2	arom., H6,H6'
7.78-7.80	d (J = 3.5 Hz)	4	arom., H7,H7',H8,H8'
8.47-8.50	d (J = 8.2 Hz)	2	arom., H5,H5'
8.79-8.81	d (J = 6.5 Hz)	2	arom., H4,H4'
8.85-8.87	d (J = 6.5 Hz)	2	arom., H3,H3'
9.53	s	2	arom., H1,H1'
12.91	s	2	2xNH

¹³C-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
33.31	N ⁺ CH ₂ CH ₂	130.19	arom.
57.84	2xN ⁺ CH ₂	132.47	arom.
113.44	arom.	132.81	arom.
118.42	arom.	133.05	arom.
120.44	arom.	135.32	arom.
122.05	arom.	144.51	arom.
124.02	arom.		

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3056, 1644, 1494, 1337, 1254, 1140, 757, 728, 596, 418

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	53,63	4,64	10,07
berechnet für C ₂₅ H ₂₂ Br ₂ N ₄ x 1H ₂ O	53,98	4,35	10,07

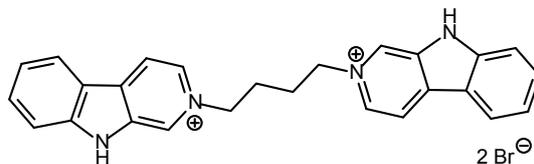
2-[4-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)butyl]-β-carbolin-2-iumdibromid (5-4)

1,38 g (8,2 mmol) β-Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, mit 0,78 g (3,7 mmol) 1,4-Dibrombutan in 10 ml DMF umgesetzt.

MG: C₂₆H₂₄Br₂N₄ (552,31 g/mol)

Ausbeute: 1,82 g (89%), gelbes Pulver

Smp.: 320-322°C



¹H-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.07	s	4	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂
4.84	s	4	2xN ⁺ CH ₂
7.39-7.50	mc	2	arom., H6,H6'
7.75-7.81	m	4	arom., H7,H7',H8,H8'
8.48-8.51	d (J = 8.0 Hz)	2	arom., H5,H5'
8.74-8.77	dd (J = 0.6, 6.3 Hz)	2	arom., H4,H4'
8.82-8.85	d (J = 6.5 Hz)	2	arom., H3,H3'
9.50	s	2	arom., H1,H1'
12.86	s	2	2xNH

¹³C-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
33.31	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂
57.84	2xN ⁺ CH ₂
113.44	arom.
118.42	arom.
120.44	arom.
122.05	arom.
124.02	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
130.19	arom.
132.47	arom.
132.81	arom.
133.05	arom.
135.32	arom.
144.51	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3031, 2911, 1644, 1473, 1340, 1258, 770, 729

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	55,63	4,49	9,98
berechnet für C ₂₆ H ₂₄ Br ₂ N ₄ x 1/2H ₂ O	55,82	4,29	10,03

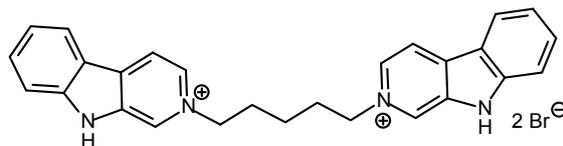
2-[5-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)pentyl]-β-carbolin-2-iumdibromid (5-5)

1,38 g (8,2 mmol) β-Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, mit 0,85 g (3,7 mmol) 1,5-Dibrompentan umgesetzt.

MG: $C_{27}H_{26}Br_2N_4$ (566,34 g/mol)

Ausbeute: 1,61 g (77%), gelbes Pulver

Smp.: 236-240°C, Lit.: 241-242°C [Gray et al., 1954]



1H -NMR: 250 MHz in $[D_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.32-1.38	mc	2	$N^+CH_2CH_2CH_2$
2.06	s	4	$2xN^+CH_2CH_2$
4.76-4.82	t ($J = 7.1$ Hz)	4	$2xN^+CH_2$
7.38-7.49	mc	2	arom., H6, H6'
7.75-7.83	m	4	arom., H7, H7', H8, H8'
8.47-8.50	d ($J = 8.0$ Hz)	2	arom., H5, H5'
8.78-8.81	dd ($J = 6.5, 1.0$ Hz)	2	arom., H4, H4'
8.84-8.86	d ($J = 6.5$ Hz)	2	arom., H3, H3'
9.54	s	2	arom., H1, H1'
12.89	s	2	$2xNH$

^{13}C -NMR: 250 MHz in $[D_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
22.45	$N^+CH_2CH_2CH_2$
36.24	$2xN^+CH_2CH_2$
60.37	$2xN^+CH_2$
113.46	arom.
118.33	arom.
119.58	arom.
122.02	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
124.04	arom.
130.00	arom.
132.40	arom.
132.64	arom.
133.04	arom.
135.28	arom.
144.47	arom.

IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 3386, 3009, 1644, 1502, 1331, 1255, 733

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	55,10	5,10	9,82
berechnet für $C_{27}H_{26}Br_2N_4 \times 1H_2O$	55,50	4,83	9,59

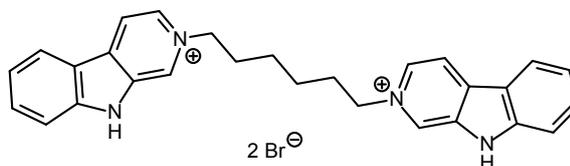
2-[6-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)hexyl]-β-carbolin-2-iumdibromid (5-6)

0,69 g (4,1 mmol) β-Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, mit 0,45 g (1,9 mmol) 1,6-Dibromhexan in 5 ml DMF umgesetzt.

MG: C₂₈H₂₈Br₂N₄ (580,37 g/mol)

Ausbeute: 0,77 g (71%), gelbes Pulver

Smp.: 272-274°C



¹H-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.40	s	4	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂ CH ₂
2.02	s	4	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂
4.75-4.80	t (J = 7.3 Hz)	4	2xN ⁺ CH ₂
7.43-7.48	mc	2	arom., H6, H6'
7.80-7.82	d (J = 5.3 Hz)	4	arom., H7, H7', H8, H8'
8.50-8.52	d (J = 8.1 Hz)	2	arom., H5, H5'
8.78-8.80	dd (J = 1.0, 4.0 Hz)	2	arom., H4, H4'
8.85-8.84	d (J = 4.0 Hz)	2	arom., H3, H3'
9.53	s	2	arom., H1, H1'
12.86	s	2	2xNH

¹³C-NMR: 400 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
22.42	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂ CH ₂
31.42	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂
60.72	2xN ⁺ CH ₂
112.44	arom.
118.33	arom.
119.65	arom.
122.05	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
124.06	arom.
130.02	arom.
132.42	arom.
132.69	arom.
133.04	arom.
135.36	arom.
144.52	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 2930, 2854, 2767, 2749, 1635, 1515, 1334, 1261, 729

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	56,74	4,92	9,52
berechnet für C ₂₈ H ₂₈ Br ₂ N ₄ x 2/3 H ₂ O	56,77	4,99	9,46

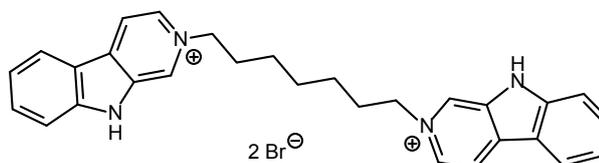
2-[7-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)heptyl]-β-carbolin-2-iumdibromid (5-7)

0,50 g (3,0 mmol) β-Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, mit 0,35 g (1,4 mmol) 1,7-Dibromheptan in 7,5 ml DMF umgesetzt.

MG: C₂₉H₃₀Br₂N₄ (594,38 g/mol)

Ausbeute: 0,75 g (93%), gelbes Pulver

Smp.: 294-296°C



¹H-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.34	m	6	N ⁺ (CH ₂) ₂ (CH ₂) ₃ (CH ₂) ₂ N ⁺
1.98	s	4	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂
4.73-4.78	t (J = 7.08 Hz)	4	2xN ⁺ CH ₂
7.40-7.47	mc	2	arom., H6,H6'
7.80	s	4	arom., H7,H7',H8,H8'
8.48-8.51	d (J = 8.0 Hz)	2	arom., H5,H5'
8.76-8.79	d (J = 6.5 Hz)	2	arom., H4,H4'
8.83 – 8.85	d (J = 6.5 Hz)	2	arom., H3,H3'
9.52	s	2	arom., H1,H1'
12.87	s	2	2xNH

¹³C-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
25.68	N ⁺ (CH ₂) ₂ (CH ₂) ₃ (CH ₂) ₂ N ⁺
31.54	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂
60.77	2xN ⁺ CH ₂
113.46	arom.
118.33	arom.
119.61	arom.
122.00	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
124.04	arom.
129.96	arom.
132.37	arom.
132.64	arom.
133.00	arom.
135.33	arom.
144.47	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3395, 3050, 2933, 2854, 1648, 1518-1448, 1337, 1255, 1141, 729

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	57.02	5.58	9.47
berechnet für C ₂₉ H ₃₀ Br ₂ N ₄ x 1 H ₂ O	56.88	5.27	9.15

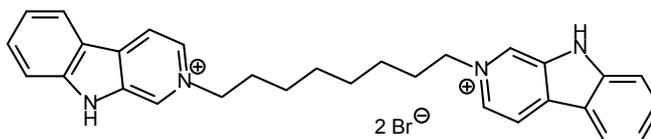
2-[8-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)octyl]-β-carbolin-2-iumdibromid (5-8)

1,38 g (8,2 mmol) β-Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, mit 1,01 g (3,7 mmol) 1,8-Dibromoctan in 10 ml DMF umgesetzt.

MG: C₃₀H₃₂Br₂N₄ (608,41g/mol)

Ausbeute: 2,2 g (98%), gelbes Pulver

Smp.: 294-296°C



¹H-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.30	s	8	N ⁺ (CH ₂) ₂ (CH ₂) ₄ (CH ₂) ₂ N ⁺
1.97	s	4	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂
4.69-4.75	t (J = 7.3 Hz)	4	2xN ⁺ CH ₂
7.39-7.50	mc	2	arom., H6,H6'
7.75-7.83	m	4	arom., H7,H7',H8,H8'
8.48-8.51	d (J = 8,0 Hz)	2	arom., H5,H5'
8.72-8.75	dd (J = 1.0, 6.5 Hz)	2	arom., H4,H4'
8.81-8.84	d (J = 6.3 Hz)	2	arom., H3,H3'
9.47	s	2	arom., H1,H1'
12.83	s	2	2xNH

¹³C-NMR: 200 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
25.91	N ⁺ (CH ₂) ₃ (CH ₂) ₂ (CH ₂) ₃ N ⁺	124.03	arom.
28.75	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂ CH ₂	129.94	arom.
31.65	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂	132.42	arom.
60.86	2xN ⁺ CH ₂	132.65	arom.
113.47	arom.	132.97	arom.
118.31	arom.	135.35	arom.
119.61	arom.	144.47	arom.
122.05	arom.		

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 2920, 2851, 1641, 1499, 1337, 1255, 1144, 758-729, 631, 422

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	57,56	5,61	8,70
berechnet für C ₃₀ H ₃₂ Br ₂ N ₄ x 1 H ₂ O	57,52	5,47	8,94

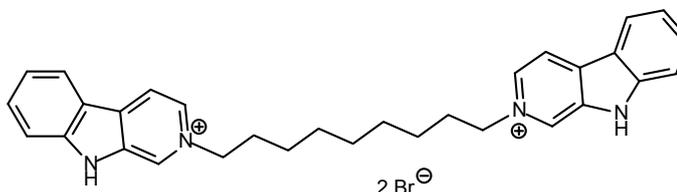
2-[9-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)nonyl]-β-carbolin-2-iumdibromid (5-9)

0,50 g (3,0 mmol) β-Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, mit 0,39 g (1,35 mmol) 1,9-Dibromnonan in 7,5 ml DMF umgesetzt.

MG: C₃₁H₃₄Br₂N₄ (622,44 g/mol)

Ausbeute: 0,74 g (98%),
gelbes Pulver

Smp.: 304°C



¹H-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.27	s	10	N ⁺ (CH ₂) ₂ (CH ₂) ₅ (CH ₂) ₂ N ⁺
1.96	s	4	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂
4.71-4.77	t (J = 7.1 Hz)	4	2xN ⁺ CH ₂
7.40-7.46	mc	2	arom., H6,H6'
7.78-7.80	m	4	arom., H7,H7',H8,H8'
8.48-8.51	d (J = 8,0 Hz)	2	arom., H5,H5'
8.75-8.77	d (J = 6.5 Hz)	2	arom., H4,H4'
8.83-8.85	d (J = 6.3 Hz)	2	arom., H3,H3'
9.51	s	2	arom., H1,H1'
12.86	s	2	2xNH

¹³C-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
25.91	N ⁺ (CH ₂) ₄ CH ₂ (CH ₂) ₄ N ⁺
28.79	2xN ⁺ (CH ₂) ₃ CH ₂
29.05	2xN ⁺ (CH ₂) ₂ CH ₂
31.68	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂
60.83	2xN ⁺ CH ₂
113.45	arom.
118.34	arom.
119.61	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
122.00	arom.
124.04	arom.
129.95	arom.
132.36	arom.
132.62	arom.
132.99	arom.
135.32	arom.
144.46	arom.

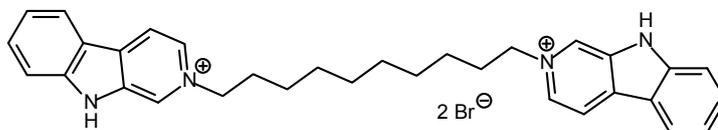
IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3053, 2917, 2848, 1641, 1499, 1337, 1258, 1138, 1258, 1138, 865, 783-764, 729,631, 590

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	59,04	5,52	9,01
berechnet für C ₃₁ H ₃₄ Br ₂ N ₄ x 1/2 H ₂ O	58,97	5,59	8,87

2-[10-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)decyl]-β-carbolin-2-iumdibromid (5-10)

1,38 g (8,2 mmol) β-Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, mit 1,11 g (3,7 mmol) 1,10-Dibromdecan in 10 ml DMF umgesetzt.



MG: $C_{32}H_{36}Br_2N_4$ (636,46 g/mol)

Ausbeute: 2,18 g (93%), gelbes Pulver

Smp.: 285-287°C

1H -NMR: 250 MHz in $[D_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.26	s	12	$N^+(CH_2)_2(CH_2)_6(CH_2)_2N^+$
1.95	s	4	$2xN^+CH_2CH_2$
4.70-4.75	t ($J = 14.5$ Hz)	4	$2xN^+CH_2$
7.41-7.47	mc	2	arom., H6, H6'
7.75-7.82	m	4	arom., H7, H7', H8, H8'
8.48-8.52	d ($J = 8.2$ Hz)	2	arom., H5, H5'
8.73-8.76	d ($J = 1.0, 6.5$ Hz)	2	arom., H4, H4'
8.82-8.85	d ($J = 6.5$ Hz)	2	arom., H3, H3'
9.49	s	2	arom., H1, H1'
12.85	s	2	$2xNH$

^{13}C -NMR: 250 MHz in $[D_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
25.96	$N^+(CH_2)_4(CH_2)_2(CH_2)_4N^+$
28.87	$2xN^+(CH_2)_3CH_2$
29.17	$2xN^+(CH_2)_2CH_2$
31.69	$2xN^+CH_2CH_2$
60.87	$2xN^+CH_2$
113.46	arom.
118.33	arom.
119.61	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
122.02	arom.
124.04	arom.
129.95	arom.
132.39	arom.
132.63	arom.
132.99	arom.
135.34	arom.
144.46	arom.

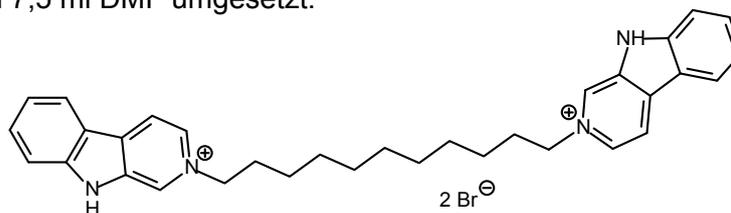
IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 3424, 3063-2857, 1641, 1518, 1499, 1337, 1258, 1140, 739, 631

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	58,39	5,98	8,57
berechnet für $C_{32}H_{36}Br_2N_4 \times 1 H_2O$	58,73	5,85	8,56

2-[11-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)undecyl]-β-carbolin-2-iumdibromid (5-11)

0,50 g (3,0 mmol) β-Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, mit 0,42 g (1,4 mmol) 1,11-Dibromundecan in 7,5 ml DMF umgesetzt.



MG: $C_{33}H_{38}Br_2N_4$ (650,49 g/mol)

Ausbeute: 0,77 g (87%), gelbes Pulver

Smp.: 284-286°C

1H -NMR: 250 MHz in $[D_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.19-1.25	d ($J = 15.1$ Hz)	14	$N^+(CH_2)_2(CH_2)_7(CH_2)_2N^+$
1.95	s	4	$2xN^+CH_2CH_2$
4.71-4.77	t ($J = 7.1$ Hz)	4	$2xN^+CH_2$
7.41-7.47	mc	2	arom., H6,H6'
7.75-7.80	m	4	arom., H7,H7',H8,H8'
8.49-8.52	d ($J = 7.8$ Hz)	2	arom., H5,H5'
8.75-8.78	d ($J = 6.5$ Hz)	2	arom., H4,H4'
8.83-8.86	d ($J = 6.3$ Hz)	2	arom., H3,H3'
9.51	s	2	arom., H1,H1'
12.87	s	2	$2xNH$

^{13}C -NMR: 250 MHz in $[D_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
25.95	$N^+(CH_2)_4(CH_2)_3(CH_2)_4N^+$
28.88	$2xN^+(CH_2)_3CH_2$
29.21	$2xN^+(CH_2)_2CH_2$
31.70	$2xN^+CH_2CH_2$
60.85	$2xN^+CH_2$
113.46	arom.
118.34	arom.
119.62	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
122.00	arom.
124.05	arom.
129.96	arom.
132.36	arom.
132.64	arom.
133.00	arom.
135.33	arom.
144.48	arom.

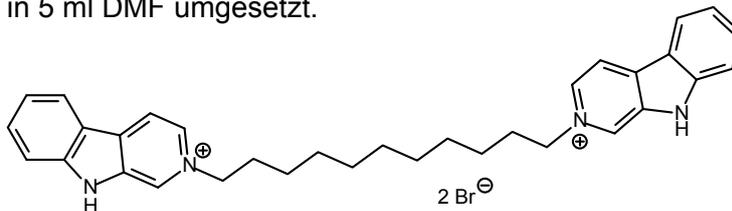
IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 2917, 2848, 2756, 2654, 1638, 1613-1451, 1337, 1255, 1144, 865, 777-732, 625, 590

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	59,98	6,09	8,47
berechnet für $C_{33}H_{38}Br_2N_4 \times 1/2 H_2O$	60,10	5,96	8,50

2-[12-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)dodecyl]-β-carbolin-2-iumdibromid (5-12)

0,40 g (2,4 mmol) β-Carbolin (4) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, mit 0,35 g (1,1 mmol) 1,12-Dibromdodecan in 5 ml DMF umgesetzt.



MG: C₃₄H₄₀Br₂N₄ (664,52 g/mol)

Ausbeute: 0,62 g (86%), gelbes Pulver

Smp.: 295°C

¹H-NMR: 400 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.20-1.27	d (J = 30.2 Hz)	16	N ⁺ (CH ₂) ₂ (CH ₂) ₈ (CH ₂) ₂ N ⁺
1.97	s	4	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂
4.72-4.76	t (J = 7.2 Hz)	4	2xN ⁺ CH ₂
7.44-7.47	m	2	arom., H6, H6'
7.78-7.83	m	4	arom., H7, H7', H8, H8'
8.50-8.52	d (J = 8.1 Hz)	2	arom., H5, H5'
8.75-8.77	d (J = 6.4 Hz)	2	arom., H4, H4'
8.84-8.85	d (J = 6.4 Hz)	2	arom., H3, H3'
9.49	s	2	arom., H1, H1'
12.84	s	2	2xNH

¹³C-NMR: 400 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
25.97	N ⁺ (CH ₂) ₄ (CH ₂) ₂ (CH ₂) ₄ N ⁺
28.91	2xN ⁺ (CH ₂) ₃ CH ₂
29.29	2xN ⁺ (CH ₂) ₂ CH ₂
31.69	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂
60.91	2xN ⁺ CH ₂
113.49	arom.
118.34	arom.
119.65	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
122.04	arom.
124.05	arom.
129.98	arom.
132.40	arom.
132.68	arom.
133.02	arom.
135.38	arom.
144.51	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 2920, 2848, 2759, 2654, 1638, 1496, 1331, 1258, 1141, 867, 777-745, 631

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	61,23	6,10	8,25
berechnet für C ₃₄ H ₄₀ Br ₂ N ₄	61,45	6,07	8,43

6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (27)

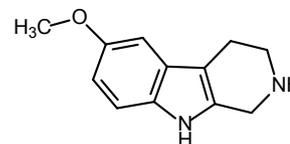
Die Synthese erfolgt unter den gleichen Bedingungen wie bei 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin (**3**) (siehe S. 122) beschrieben. 5,0 g (22 mmol) 5-Methoxytryptamin-Hydrochlorid werden als Edukt eingesetzt.

MG: $C_{12}H_{14}N_2O$ (202,25 g/mol)

Ausbeute: 3,0 g (66%), grün-graues Pulver

Rf: 0,05 (FM Chloroform/Methanol (9:1) + 1 Tr. NH_3)

Smp.: 217°C, Lit.: 220-223 °C [Pachter et al., 1961]



1H -NMR: 250 MHz in MeOD

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
3.05-3.10	t ($J = 6.1$ Hz)	2	aliph., H4
3.58-3.62	t ($J = 6.2$ Hz)	2	aliph., H3
3.84	s	3	OCH_3
4.44	s	2	aliph., H1
6.80-6.84	dd ($J = 2.5, 8.8$ Hz)	1	arom., H7
6.99-7.00	d ($J = 2.3$ Hz)	1	arom., H5
7.24-7.28	d ($J = 8.8$ Hz)	1	arom., H8

^{13}C -NMR: 250 MHz in MeOD

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
19.53	aliph., C4	112.97	arom.
42.35	aliph., C3	113.32	arom.
43.81	aliph., C1	126.97	arom.
56.23	OCH_3	127.90	arom.
101.06	arom.	133.29	arom.
106.78	arom.	155.55	arom.

IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 3291, 3148, 3053, 2936, 2825, 2743, 1591, 1480-1429, 1214, 793

6-Methoxy- β -carbolin (4MeO)

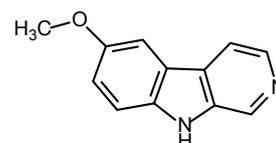
Die Synthese erfolgt unter den gleichen Bedingungen wie für β -Carbolin (**4**) beschrieben. Dabei werden 1,0 g (5,0 mmol) 6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (**27**) als Ausgangsmaterial eingesetzt.

MG: $C_{12}H_{10}N_2O$ (198,22 g/mol)

Ausbeute: 0,5 g (50%), hellbraune Nadeln

Rf: 0,64 (FM Methanol + 1 Tr. NH_3)

Smp.: 200°C, Lit.: 206-207°C [Ho et al., 1970]



¹H-NMR: 200 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
3.85	s	3	OCH ₃
7.15-7.21	dd (<i>J</i> = 2.5, 8.9 Hz)	1	arom., H7
7.48-7.53	d (<i>J</i> = 8.8 Hz)	1	arom., H8
7.77-7.78	d (<i>J</i> = 2.6 Hz)	1	arom., H5
8.05-8.08	d (<i>J</i> = 5.4 Hz)	1	arom., H4
8.27-8.30	d (<i>J</i> = 5.2 Hz)	1	arom., H3
8.87	d (<i>J</i> = 0.8 Hz)	1	arom., H1
11.40	s	1	NH

¹³C-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
55.54	OCH ₃	127.28	arom.
103.51	arom.	134.14	arom.
112.77	arom.	135.41	arom.
114.61	arom.	136.56	arom.
118.06	arom.	137.41	arom.
120.87	arom.	153.26	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3064, 2728, 2644, 1512, 1464, 1289, 1217, 1162, 1036, 807, 614

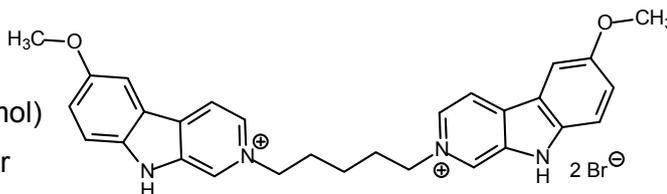
6-Methoxy-2-[5-(6-methoxy-β-carbolin-2-ium-2-yl)pentyl]-β-carbolin-2-iumdibromid (5MeO-5)

0,81 g (4,1 mmol) 6-Methoxy-β-carbolin (**4MeO**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, mit 0,43 g (3,7 mmol) 1,5-Dibrompentan in 5 ml DMF umgesetzt.

MG: C₂₉H₃₀Br₂N₄O₂ (626,38 g/mol)

Ausbeute: 0,98 g (40%), gelbes Pulver

Smp.: 291-294°C

¹H-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.34	s	2	N ⁺ CH ₂ CH ₂ CH ₂
2.08	s	4	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂
3.89	s	6	2xOCH ₃
4.73-4.78	t (<i>J</i> = 7.0 Hz)	4	2xN ⁺ CH ₂
7.40-7.45	dd (<i>J</i> = 2.5, 9.0 Hz)	2	arom., H7, H7'
7.71-7.74	d (<i>J</i> = 9.1 Hz)	2	arom., H8, H8'
8.03-8.04	d (<i>J</i> = 2.4 Hz)	2	arom., H5, H5'
8.70-8.73	d (<i>J</i> = 6.6 Hz)	2	arom., H4, H4'
8.79-8.82	d (<i>J</i> = 6.5 Hz)	2	arom., H3, H3'
9.49	s	2	arom., H1, H1'
12.73	s	2	2xNH

¹³C-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
22.44	N ⁺ CH ₂ CH ₂ CH ₂
30.88	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂
56.25	2 x OCH ₃
60.28	2xN ⁺ CH ₂
104.33	arom.
114.48	arom.
118.27	arom.
120.06	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
123.51	arom.
130.10	arom.
132.07	arom.
132.19	arom.
135.40	arom.
139.70	arom.
155.12	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3041, 2993, 2955, 2914, 2860, 2803, 2762, 2642, 1648, 1578-1477, 1328, 1296, 1204, 1154, 1021, 827, 631

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	54,50	4,97	8,86
berechnet für C ₂₉ H ₃₀ Br ₂ N ₄ O ₂ x 1/2 H ₂ O	54,82	4,92	8,82

6-Hydroxy-β-carboline (4OH)

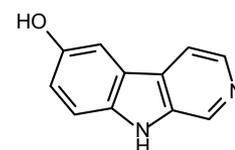
Nach Tanaka et al. [Tanaka et al., 1978] werden 0,73 g (3,7 mmol) 6-Methoxy-β-carboline (**4MeO**) in 80 ml Dichlorethan gelöst, 1,5 ml Bortribromid zugegeben und bei 60°C unter N₂-Atmosphäre für 24 h gerührt. Das Bortribromid wird mit 10 ml Eiswasser zerstört, der Ansatz mit Ammoniak alkalisiert und mit einem Gemisch aus Dichlormethan/Isopropanol (1:3) extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und verdampft, der Rückstand im Vakuum getrocknet.

MG: C₁₁H₈N₂O (184,20 g/mol)

Ausbeute: 0,56 g (30%), ockerfarbenes Pulver

Rf: 0,65 (FM Methanol + 1 Tr. NH₃)

Smp.: 289°C, Lit.:189-190 °C [Rocca et al., 1995]

¹H-NMR: 200 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
7.04-7.10	dd (J = 2.3, 8.8 Hz)	1	arom., H7
7.39-7.43	d (J = 8.8 Hz)	1	arom., H8
7.51-7.52	d (J = 2.4 Hz)	1	arom., H5
7.96-7.98	d (J = 5.1 Hz)	1	arom., H4
8.23-8.25	d (J = 5.2 Hz)	1	arom., H3
8.82	s	1	arom., H1
9.14	s	1	OH
11.25	s	1	NH

¹³C-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
105.56	arom.
112.36	arom.
114.53	arom.
118.06	arom.
121.13	arom.
127.07	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
133.78	arom.
134.47	arom.
136.40	arom.
137.17	arom.
150.65	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3268, 2548, 1579, 1464, 1373, 1186, 810, 602

6-Hydroxy-2-[5-(6-hydroxy-β-carbolin-2-ium-2-yl)pentyl]-β-carbolin-2-iumdibromid (5OH-5)

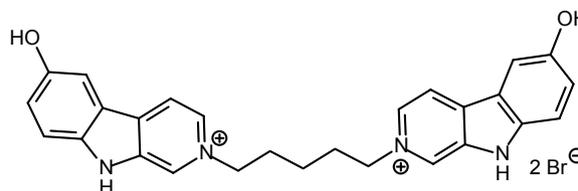
0,56 g (3,0 mmol) 6-Hydroxy-β-carbolin (**4OH**) wurden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, mit 0,31 g (1,4 mmol) 1,5-Dibrompentan in 10 ml DMF umgesetzt.

MG: C₂₇H₂₆Br₂N₄O₂ (598,33 g/mol)

Ausbeute: 0,30 g (35%),

ockerfarbenes Pulver

Smp.: 314°C

¹H-NMR: 400 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.36-1.37	mc	2	N ⁺ CH ₂ CH ₂ CH ₂
2.06-2.09	t (J = 6.5 Hz)	4	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂
4.72-4.76	t (J = 6.8 Hz)	4	2xN ⁺ CH ₂
7.34-7.37	dd (J = 2.1, 8.9 Hz)	2	arom., H7,H7'
7.65-7.67	d (J = 8.9 Hz)	2	arom., H8,H8'
7.72-7.73	d (J = 1.7 Hz)	2	arom., H5,H5'
8.65-8.67	d (J = 6.5 Hz)	2	arom., H4,H4'
8.72-8.74	d (J = 6.4 Hz)	2	arom., H3,H3'
9.43	s	2	arom., H1,H1'
9.63	s	2	2xOH
12.60	s	2	2xNH

¹³C-NMR: 400 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
22.54	N ⁺ CH ₂ CH ₂ CH ₂
30.99	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂
60.29	2xN ⁺ CH ₂
106.59	arom.
114.22	arom.
118.25	arom.
120.42	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
123.48	arom.
129.80	arom.
131.86	arom.
131.92	arom.
135.50	arom.
138.93	arom.
152.97	arom.

IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 3057, 2927, 2854, 1625, 1578, 1527, 1328, 1201, 821, 634

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	52,68	4,56	8,99
berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_2 \times 1 \text{H}_2\text{O}$	52,61	4,58	9,09

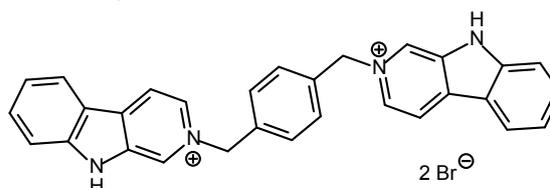
2-[4-(β -Carbolin-2-ium-2-ylmethyl)benzyl]- β -carbolin-2-iumdibromid (5-Xy)

0,50 g (3.0 mmol) β -Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, mit 0,36 g (1,4 mmol) 1,4-Bis-(bromomethyl)benzen in 5 ml DMF umgesetzt.

MG: $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{Br}_2\text{N}_4$ (600,35 g/mol)

Ausbeute: 0,79 g (98%), Pulver

Smp.: 294-297°C



$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz in $[\text{D}_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
6.03	s	4	$2 \times \text{N}^+\text{CH}_2$
7.37-7.47	mc	2	arom.
7.63	s	4	arom.
7.77-7.79	d ($J = 2.9$ Hz)	4	arom.
8.45-8.48	d ($J = 8.1$ Hz)	2	arom.
8.83	s	4	arom.
9.65	s	2	arom.
12.87	s	2	$2 \times \text{NH}$

$^{13}\text{C-NMR}$: 250 MHz in $[\text{D}_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
62.71	$2 \times \text{N}^+\text{CH}_2$	130.09	arom.
113.49	arom.	132.58	arom.
118.69	arom.	132.90	arom.
119.55	arom.	133.07	arom.
122.11	arom.	135.41	arom.
124.10	arom.	136.60	arom.
129.61	arom.	144.61	arom.

IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 3417, 3003, 2816, 2765, 2651, 1635, 1521, 1334, 1258, 1119, 758

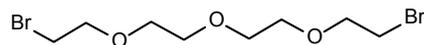
Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gefunden	56,58	4,59	8,55
berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{Br}_2\text{N}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	56,62	4,43	8,80

1-Bromo-2-[2-[2-(2-bromoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethan (24)

Nach Biron et al. [Biron et al., 2004] werden 93 g (0,35 mol) Triphenylphosphin in 400 ml Acetonitril unter N₂-Atmosphäre bei 0°C suspendiert und 57 g (18 ml, 0,35 mol) Brom werden bei maximal 5°C über 45 min zugetropft. Anschließend wird eine Lösung aus 34 g (0,18 mol) Tetraethylenglykol in 60 ml Acetonitril tropfenweise zugegeben. Die Lösung wird für 2 d bei RT gerührt, der entstandene weiße Niederschlag abfiltriert und mit Acetonitril gewaschen. Die vereinigten Acetonitrilphasen werden eingengt und der gelbe, ölige Rückstand mindestens 10 mal mit n-Hexan gewaschen. Die vereinigten Hexan-Phasen werden eingengt und es verbleibt ein farbloses Öl.

MG: C₈H₁₆Br₂O₃ (320,02 g/mol)



Ausbeute: 43 g (75%), farbloses Öl

¹H-NMR: 250 MHz in CDCl₃

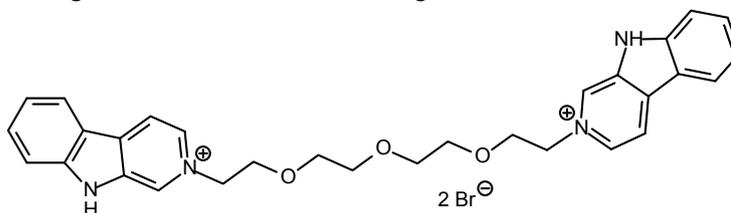
δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
3.43-3.48	t (J = 6.3 Hz)	4	CH ₂ CH ₂ Br
3.66	s	8	OCH ₂ CH ₂ O
3.77-3.82	t (J = 6.1 Hz)	4	CH ₂ CH ₂ Br

¹³C-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
30.32	2xBrCH ₂
70.53	2xOCH ₂ CH ₂ O(CH ₂) ₂ Br
70.64	2xBrCH ₂ CH ₂
71.19	2xBrCH ₂ CH ₂ OCH ₂

2-[2-(2-[2-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)ethoxy]ethoxy)ethoxy]ethyl]-β-carbolin-2-iumdi-bromid (5-110)

0,50 g (3,0 mmol) β-Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, mit 0,43 g (1,4 mmol) **24** in 7,5 ml DMF umgesetzt. Nach Zugabe von Aceton entsteht ein Niederschlag. Die Suspension wird abdekantiert, der Rückstand mehrmals in Ether suspendiert und jeweils abdekantiert. Dies wird wiederholt, bis laut DC kein Edukt **4** mehr zu sehen ist. Anschließend wird der harzartige Rückstand im Vakuum getrocknet.



MG: C₃₀H₃₂Br₂N₄O₃ (656,41 g/mol)

Ausbeute: 0,90 g (98%), braunes Harz

¹H-NMR: 400 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
3.43-3.44	m	8	2xOCH ₂ CH ₂ O
3.90-3.91	t (J = 4.9 Hz)	4	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂ O
4.89	m	4	2xN ⁺ CH ₂
7.42-7.46	mc	2	arom., H6,H6'
7.79-7.80	d (J = 3.6 Hz)	4	arom., H7,H7',H8,H8'
8.46-8.48	d (J = 8.1 Hz)	2	arom., H5,H5'
8.63-8.65	d (J = 6.5 Hz)	2	arom., H4,H4'
8.76-8.77	d (J = 6.5 Hz)	2	arom., H3,H3'
9.37	s	2	arom., H1,H1'
12.85	s	2	2xNH

¹³C-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
60.43	2xOCH ₂ CH ₂ O(CH ₂) ₂ N ⁺
69.73	2xOCH ₂ CH ₂ O(CH ₂) ₂ N ⁺
69.91	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂ O
70.13	2xN ⁺ CH ₂
113.47	arom.
117.91	arom.
119.54	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
124.02	arom.
130.39	arom.
132.48	arom.
132.73	arom.
133.37	arom.
135.08	arom.
144.47	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹):

Hochauflösende Masse:

berechnet für C₃₀H₃₂N₄O₃ (M²⁺):248,1232

gemessen: 248,1240

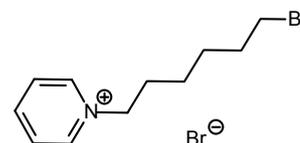
1-(6-Bromohexyl)pyridiniumbromid (25)

0,81 ml (10,0 mmol) Pyridin in 20 ml Acetonitril werden tropfenweise zu einer Lösung aus 7,33 g (30,0 mmol) 1,6-Dibromhexan in 50 ml Acetonitril gegeben. Nach 24 h rühren bei RT wird der Niederschlag abfiltriert, mehrmals mit Acetonitril gewaschen und der Rückstand im Vakuum getrocknet.

MG: C₁₁H₁₇Br₂N (323,07 g/mol)

Ausbeute: 1,26 g (39%), weiße Nadeln

Smp.: 141°C, Lit.: 127-128°C [Gray et al., 1985]



¹H-NMR: 250 MHz in MeOD

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.37-1.61	m	4	N ⁺ (CH ₂) ₂ (CH ₂) ₂ (CH ₂) ₂ Br
1.82-1.94	m	2	CH ₂ CH ₂ Br
2.00-2.12	m	2	N ⁺ CH ₂ CH ₂
3.43-3.49	t (J = 6.7 Hz)	2	CH ₂ Br
4.65-4.71	t (J = 7.5 Hz)	2	N ⁺ CH ₂
8.11-8.17	t (J = 6.9 Hz)	2	arom., H2,H6
8.58-8.66	m	1	arom., H3
9.04-9.11	m	2	arom., H3,H5

¹³C-NMR: 250 MHz in MeOD

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
24.84	N ⁺ (CH ₂) ₂ CH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₂ Br	61.56	N ⁺ CH ₂
27.09	N ⁺ (CH ₂) ₂ CH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₂ Br	128.13	arom.
30.86	CH ₂ CH ₂ Br	144.57	arom.
32.13	N ⁺ CH ₂ CH ₂	145.48	arom.
32.74	CH ₂ Br		

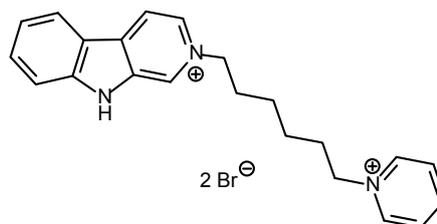
IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3006, 2920, 2857, 1635, 1486, 1166, 786, 695, 638**2-(6-Pyridinium-1-yl-hexyl)-β-carbolin-2-iumdibromid (6)**

0,34 g (2,0 mmol) β-Carbolin (**4**) werden mit 0,65 g (2,0 mmol) 1-(6-Bromohexyl)pyridinium (**25**) in 100 ml Acetonitril bei RT umgesetzt. Nach 72 h wird das Produkt mit Ether ausgefällt, abfiltriert und mit Ether mehrmals gewaschen.

MG: C₂₂H₂₅Br₂N₃ (491,26 g/mol)

Ausbeute: 0,5 g (51%), gelbes Pulver

Smp.: 248°C

¹H-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.34	s	4	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂ CH ₂
1.89-1.99	m	4	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂
4.61-4.67	t (J = 7.3 Hz)	2	N ⁺ CH ₂
4.75-4.80	t (J = 7.3 Hz)	2	N ⁺ CH ₂
7.41-7.48	m	1	arom., H6
7.75-7.83	m	2	arom.
8.13-8.18	t (J = 6.7 Hz)	2	arom.
8.50-8.53	d (J = 8.1 Hz)	1	arom.
8.57-8.63	t (J = 7.8 Hz)	1	arom.
8.79-8.87	q (J = 6.6 Hz)	2	arom., H3,H4
9.16-9.18	d (J = 5.6 Hz)	2	arom.
9.55	s	1	arom., H1
12.89	s	1	NH

¹³C-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
25.22	N ⁺ (CH ₂) ₂ <u>CH</u> ₂
25.25	N ⁺ (CH ₂) ₂ <u>C</u> H ₂
30.85	N ⁺ CH ₂ <u>CH</u> ₂
31.34	N ⁺ CH ₂ <u>C</u> H ₂
60.62	N ⁺ <u>CH</u> ₂
60.92	N ⁺ <u>C</u> H ₂
113.47	arom.
118.35	arom.
119.62	arom.
122.01	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
124.07	arom.
128.50	arom.
130.00	arom.
132.38	arom.
132.65	arom.
133.03	arom.
135.30	arom.
144.47	arom.
145.21	arom.
145.94	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3047, 2911, 2854, 2806, 2651, 1638, 1477, 1334, 1258, 1169, 1140, 783, 739, 688

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	53,36	5,27	8,42
berechnet für C ₂₂ H ₂₅ Br ₂ N ₃	53,79	5,13	8,55

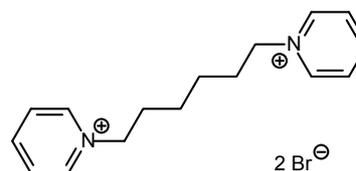
1-(6-Pyridinium-1-yl)-hexyl)-pyridiniumdibromid (7)

0,66 ml (8,2 mmol) Pyridin werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, mit 0,90 g (3,7 mmol) 1,6-Dibromhexan in 10 ml DMF umgesetzt.

MG: C₁₆H₂₂Br₂N₂ (402,17 g/mol)

Ausbeute: 1,18 g (79%), beiges Pulver

Smp.: 245-247°C, Lit.: 238-241°C [Chen et al., 1977]

¹H-NMR: 250 MHz in MeOD

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.50-1.55	m	4	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂ CH ₂
2.06-2.11	m	4	2xN ⁺ CH ₂ CH ₂
4.69-4.75	t (J = 7.7 Hz)	4	2xN ⁺ CH ₂
8.12-8.17	t (J = 7.1 Hz)	4	arom., H3,H5,H3',H5'
8.59-8.66	t (J = 7.8 Hz)	2	arom., H4,H4'
9.10-9.13	d (J = 5.6 Hz)	4	arom., H2,H6,H2',H6'

¹³C-NMR: 250 MHz in MeOD

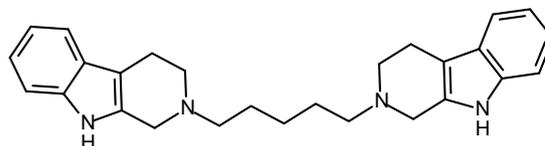
δ [ppm]	Zuordnung
24.96	2xN ⁺ (CH ₂) ₂ <u>CH</u> ₂
30.64	2xN ⁺ CH ₂ <u>C</u> H ₂
61.36	2xN ⁺ <u>CH</u> ₂

δ [ppm]	Zuordnung
128.13	arom.
144.64	arom.
145.48	arom.

IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 3047, 2927, 2848, 1632, 1480, 1166, 1144, 770, 672, 476

2-[5-(1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin-2-yl)pentyl]-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (8-5)

0,20 g (0,35 mmol) 2-[5-(β -carbolin-2-ium-2-yl)pentyl]- β -carbolin-2-iumdibromid (**5-5**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, in 50 ml Methanol gelöst und mit 0,50 g Natriumborhydrid umgesetzt.



MG: $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_4$ (412,57 g/mol)

Ausbeute: 0,07 g (45%), gelbes Pulver

Rf: 0,26 (FM Chloroform/Methanol (9:1) + 1 Tr. NH_3)

Smp.: 198-202°C

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz in $[\text{D}_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.37-1.43	m	2	$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$
1.55-1.57	mc	4	$2 \times \text{NCH}_2\text{CH}_2$
2.53-2.57	t ($J = 7.2$ Hz)	4	$2 \times \text{NCH}_2$
2.67-2.68	m	4	aliph., H3, H3'
2.74-2.77	m	4	aliph., H4, H4'
3.59	s	4	aliph., H1, H1'
6.91-6.95	dt ($J = 1.1, 7.9$ Hz)	2	arom.
6.98-7.02	dt ($J = 1.1, 7.2$ Hz)	2	arom.
7.26-7.28	d ($J = 7.9$ Hz)	2	arom.
7.33-7.35	d ($J = 7.6$ Hz)	2	arom.
10.63	s	2	NH

$^{13}\text{C-NMR}$: 250 MHz in $[\text{D}_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
21.67	aliph., C4, C4'
25.30	$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$
27.19	$2 \times \text{NCH}_2\text{CH}_2$
50.55	aliph., C3, C3'
51.30	$2 \times \text{NCH}_2$
57.71	aliph., C1, C1'
106.93	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
111.29	arom.
117.73	arom.
118.64	arom.
120.66	arom.
127.13	arom.
133.35	arom.
136.32	arom.

IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 3142, 3050, 2939, 2803, 2749, 1625, 1451, 1236, 1163, 736

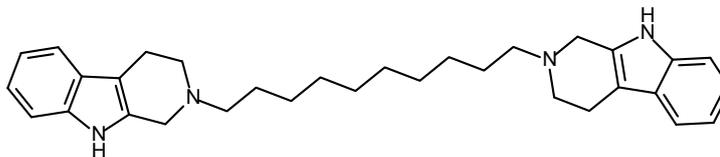
Hochauflösende Masse:

berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_4$ ($\text{M} + \text{H}^+$): 413,2700

gemessen: 413,2687

2-[10-(1,2,3,4-Tetrahydro- β -carbolin-2-yl)decyl]-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin (8-10)

0,21 g (0,33 mmol) 2-[10-(β -carbolin-2-ium-2-yl)decyl]- β -carbolin-2-iumdibromid (**5-10**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, in 50 ml Methanol gelöst und mit 0,50 g Natriumborhydrid umgesetzt.



MG: $C_{32}H_{42}N_4$ (482,70 g/mol)

Ausbeute: 0,05 g (31%), gelbes Pulver

Rf: 0,72 (FM Chloroform/Methanol (9:1) + 1 Tr. NH_3)

Smp.: 176°C

1H -NMR: 400 MHz in $[D_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.30	m	12	$NCH_2CH_2(CH_2)_6$
1.51-1.54	m	4	$2xNCH_2CH_2$
2.49-2.53	m	4	$2xNCH_2$
2.66-2.67	m	4	aliph., H3,H3'
2.72-2.75	m	4	aliph., H4,H4'
3.57	s	4	aliph., H1,H1'
6.90-6.94	dt ($J = 1.0, 7.8$ Hz)	2	arom.
6.97-7.01	dt ($J = 1.2, 8.0$ Hz)	2	arom.
7.25-7.27	d ($J = 8.1$ Hz)	2	arom.
7.33-7.35	d ($J = 7.6$ Hz)	2	arom.
10.63	s	2	NH

^{13}C -NMR: 250 MHz in $[D_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
19.00	aliph., C4,C4'
21.69	$2xNCH_2CH_2CH_2$
27.27	$2xNCH_2CH_2$
27.40	$2xN(CH_2)_3CH_2$
29.47	$2xN(CH_2)_4CH_2$
50.56	aliph., C3,C3'
51.31	$2xNCH_2$
57.76	aliph., C1,C1'

δ [ppm]	Zuordnung
106.91	arom.
111.28	arom.
117.71	arom.
118.63	arom.
120.65	arom.
127.13	arom.
133.37	arom.
136.31	arom.

IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 3053, 2924, 2848, 1625, 1454, 1328, 1236, 1163, 739

Hochauflösende Masse:

berechnet für $C_{32}H_{42}N_4$ ($M + H^+$): 483,3482

gemessen: 483,3493

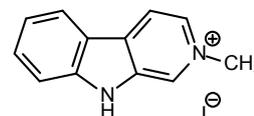
2-Methyl- β -carbolin-2-iumiodid (9-1)

1,50 g (8,9 mmol) β -Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, in 300 ml Aceton gelöst und mit dreifachem Überschuß an Methyljodid umgesetzt.

MG: $C_{12}H_{11}IN_2$ (310,14 g/mol)

Ausbeute: 2,37 g (85%), gelbes Pulver

Smp.: 236-238°C, Lit.: 234°C [Ruiz et al., 1997]



1H -NMR: 250 MHz in $[D_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
4.48	s	3	N^+CH_3
7.39-7.49	mc	1	arom., H6
7.78-7.79	d ($J = 3.7$ Hz)	2	arom., H7,H8
8.46-8.49	d ($J = 8.0$ Hz)	1	arom., H5
8.62-8.64	d ($J = 6.3$ Hz)	1	arom., H4
8.77-8.80	d ($J = 6.5$ Hz)	1	arom., H3
9.34	s	1	arom., H1
12.76	s	1	NH

^{13}C -NMR: 250 MHz in $[D_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
48.16	N^+CH_3
113.46	arom.
118.05	arom.
119.59	arom.
121.98	arom.
123.98	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
130.80	arom.
132.30	arom.
132.33	arom.
133.82	arom.
135.24	arom.
144.34	arom.

IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 3079, 1641, 1524-1480, 1344, 1258, 1141, 774, 733, 587, 422

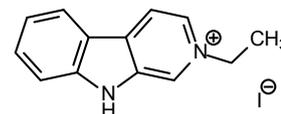
2-Ethyl- β -carbolin-2-iumiodid (9-2)

0,2 g (1,2 mmol) β -Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, in Acetonitril gelöst und mit dreifachem Überschuß an 1-Iodethan bei 40°C 12 h lang umgesetzt.

MG: $C_{13}H_{13}IN_2$ (324,16 g/mol)

Ausbeute: 0,27 g (69%), gelbes Pulver

Smp.: 200°C, Lit.: 198-199°C [Leonard et al., 1942]



¹H-NMR: 400 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.61-1.64	t (<i>J</i> = 7.3 Hz)	3	N ⁺ CH ₂ CH ₃
4.76-4.81	q (<i>J</i> = 7.0 Hz)	2	N ⁺ CH ₂
7.44-7.48	mc	1	arom., H6
7.81-7.81	d (<i>J</i> = 3.5 Hz)	2	arom., H7,H8
8.50-8.52	d (<i>J</i> = 8.2 Hz)	1	arom., H5
8.75-8.77	dd (<i>J</i> = 1.0, 6.7 Hz)	1	arom., H4
8.83-8.85	d (<i>J</i> = 6.4 Hz)	1	arom., H3
9.45	s	1	arom., H1
12.99	s	1	NH

¹³C-NMR: 400 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
17.44	N ⁺ CH ₂ CH ₃
56.51	N ⁺ CH ₂
113.49	arom.
118.45	arom.
119.65	arom.
122.03	arom.
124.04	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
129.87	arom.
132.38	arom.
132.65	arom.
132.71	arom.
135.43	arom.
144.49	arom.

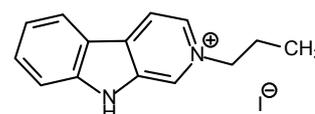
IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3148, 3050, 3965, 1638, 1499, 1337, 1249, 1144, 723, 606**2-Propyl-β-carbolin-2-iumiodid (9-3)**

0,2 g (1,2 mmol) β-Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, in Acetonitril gelöst und mit dreifachem Überschuß an 1-Iodpropan bei 40°C 12 h lang umgesetzt.

MG: C₁₄H₁₅IN₂ (338,19 g/mol)

Ausbeute: 0,36 g (87,5%), gelbes Pulver

Smp.: 191-194°C, Lit.:201-202°C [Spenser, 1956]

¹H-NMR: 400 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.92	t (<i>J</i> = 7.2 Hz)	3	N ⁺ CH ₂ CH ₂ CH ₃
2.00-2.06	h (<i>J</i> = 7.3 Hz)	2	N ⁺ CH ₂ CH ₂
4.70-4.74	t (<i>J</i> = 7.3 Hz)	2	N ⁺ CH ₂
7.43-7.50	hept (<i>J</i> = 3.5 Hz)	1	arom., H6
7.81-7.82	d (<i>J</i> = 3.5 Hz)	2	arom., H7,H8
8.50-8.52	d (<i>J</i> = 8.3 Hz)	1	arom., H5
8.74-8.76	dd (<i>J</i> = 0.9, 6.7 Hz)	1	arom., H4
8.84-8.85	d (<i>J</i> = 6.6 Hz)	1	arom., H3
9.44	s	1	arom., H1
12.78	s	1	NH

¹³C-NMR: 400 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
10.81	N ⁺ CH ₂ CH ₂ CH ₃
25.09	N ⁺ CH ₂ CH ₂
62.27	N ⁺ CH ₂
113.50	arom.
118.33	arom.
119.67	arom.
122.05	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
124.06	arom.
129.99	arom.
132.42	arom.
132.73	arom.
133.01	arom.
135.42	arom.
144.40	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3164, 3053, 2952, 2867, 1641, 1499, 1344, 1258, 1112, 878, 751, 593

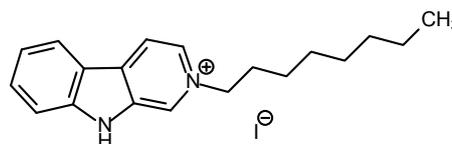
2-Octyl-β-carbolin-2-iumiodid (9-8)

0,34 g (2,0 mmol) β-Carbolin (**4**) werden in 10 ml Aceton/Ether 1:1 gelöst und mit 0,48 mg (2,0 mmol) 1-Iodoctan bei 50°C 72 h lang gerührt. Die Lösungsmittel werden vollständig im Vakuum entfernt, der Rückstand mehrmals in Ether suspendiert und der Ether jeweils abdekantiert. Dies wird wiederholt bis laut DC kein Edukt **4** mehr zu sehen ist. Anschließend wird der pulverige Rückstand im Vakuum getrocknet.

MG: C₁₉H₂₅IN₂ (408,32 g/mol)

Ausbeute: 0,70g (85%), gelbes Pulver

Smp.: 97-99°C

¹H-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.79-0.84	m	3	N ⁺ (CH ₂) ₇ CH ₃
1.22-1.29	m	10	N ⁺ CH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₅ CH ₃
1.98-2.00	m	2	N ⁺ CH ₂ CH ₂
4.69-4.75	t (J = 7.3 Hz)	2	N ⁺ CH ₂
7.42-7.49	mc	1	arom., H6
7.79-7.81	d (J = 3.6 Hz)	2	arom., H7,H8
8.48-8.52	d (J = 8.0 Hz)	1	arom., H5
8.72-8.75	d (J = 6.5 Hz)	1	arom., H4
8.82-8.84	d (J = 6.3 Hz)	1	arom., H3
9.44	s	1	arom., H1
12.77	s	1	NH

^{13}C -NMR: 250 MHz in $[\text{D}_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
14.35	$\text{N}^+(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$
22.46	$\text{N}^+(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}_3$
25.96	$\text{N}^+(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$
28.84	$\text{N}^+(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$
28.90	$\text{N}^+(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$
31.56	$\text{N}^+(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
31.67	$\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$
60.95	N^+CH_2
113.48	arom.
118.33	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
119.64	arom.
122.04	arom.
124.03	arom.
129.97	arom.
132.41	arom.
132.68	arom.
132.99	arom.
135.40	arom.
144.50	arom.

IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 3003, 2920, 2851, 1644, 1518, 1340, 1252, 1141, 755, 733

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	55,72	6,13	6,85
berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{IN}_2$	55,89	6,17	6,86

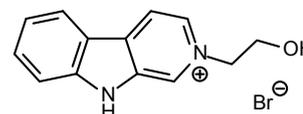
2-(2-Hydroxyethyl)- β -carbolin-2-iumbromid (9-2OH)

0,34 g (2,0 mmol) β -Carbolin (**4**) werden in 20 ml Acetonitril gelöst und mit 0,22 g (1,8 mmol) 2-Bromoethanol versetzt. Nach 24 h wird der entstandene Niederschlag abfiltriert und mit Ether gewaschen. Anschließend wird der pulvrige Rückstand im Vakuum getrocknet.

MG: $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O}$ (293,16 g/mol)

Ausbeute: 0,18 g (34%), gelbes Pulver

Smp.: 198°C

 ^1H -NMR: 400 MHz in $[\text{D}_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
3.94-3.95	m	2	$\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$
4.80-4.82	t ($J = 4.9$ Hz)	2	N^+CH_2
5.20	s	1	OH
7.44-7.48	dt ($J = 1.9, 6.0$ Hz)	1	arom., H6
7.78-7.84	m	2	arom., H7, H8
8.50-8.52	d ($J = 8.1$ Hz)	1	arom., H5
8.68-8.70	d ($J = 6.5$ Hz)	1	arom., H4
8.83-8.85	d ($J = 6.4$ Hz)	1	arom., H3
9.38	s	1	arom., H1
12.81	s	1	NH

¹³C-NMR: 400 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
61.06	N ⁺ CH ₂ CH ₂
63.32	N ⁺ CH ₂
113.52	arom.
118.03	arom.
119.65	arom.
122.03	arom.
124.04	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
130.53	arom.
132.38	arom.
132.75	arom.
133.46	arom.
135.20	arom.
144.44	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3262, 3050, 2908, 2867, 2645, 1942, 1644, 1518. 1340, 1258, 758-726

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	53,27	4,54	9,51
berechnet für C ₁₃ H ₁₃ BrN ₂ O	53,26	4,47	9,56

9-[5-(β-Carbolin-9-yl)pentyl]-β-carbolin (10-5)

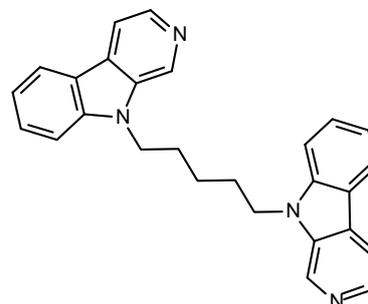
0,50 g (3,0 mmol) β-Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, in 7,5 ml DMSO gelöst, mit 3,44 g (85 mmol) Natriumhydroxid und 0,35 g (1,5 mmol) 1,5-Dibrompentan versetzt.

MG: C₂₇H₂₄N₄ (404,51 g/mol)

Ausbeute: 0,10 g (16%), gelbes Pulver

Rf: 0,39 (FM Chloroform/Methanol (9:1) + 1 Tr. NH₃)

Smp.: 174°C

¹H-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.30-1.43	mc	2	NCH ₂ CH ₂ CH ₂
1.75-1.86	mc	4	2xNCH ₂ CH ₂
4.37-4.43	t (J = 7.1 Hz)	4	2xNCH ₂
7.21-7.27	dt (J = 1.4, 7.8 Hz)	2	arom., H6, H6'
7.50-7.54	dd (J = 0.8, 8.2 Hz)	2	arom., H7, H7'
7.56-7.60	d (J = 7.8 Hz)	2	arom., H8, H8'
8.08-8.10	d (J = 5.2 Hz)	2	arom., H4, H4'
8.21-8.24	d (J = 7.8 Hz)	2	arom., H5, H5'
8.35-8.37	d (J = 5.2 Hz)	2	arom., H3, H3'
8.99	s	2	arom., H1, H1'

¹³C-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
24.61	NCH ₂ CH ₂ CH ₂
28.93	2xNCH ₂ CH ₂
42.93	2xNCH ₂
110.53	arom.
114.97	arom.
119.80	arom.
120.72	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
122.34	arom.
127.65	arom.
128.69	arom.
133.00	arom.
136.42	arom.
138.70	arom.
141.15	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3034, 2933, 2857, 1622, 1556, 1473, 1442, 1328, 1027, 812, 729

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	79,92	6,08	13,93
berechnet C ₂₇ H ₂₄ N ₄	80,17	5,98	13,85

9-[9-(β-Carbolin-9-yl)nonyl]-β-carbolin (10-9)

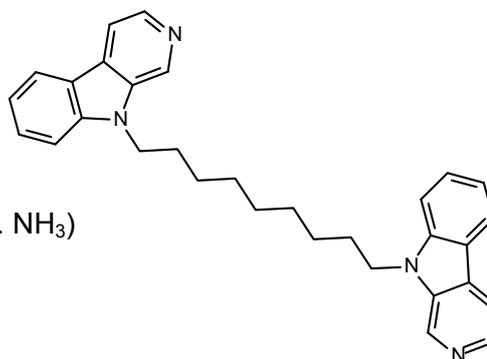
0,50 g (3,0 mmol) β-Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, in 7,5 ml DMSO gelöst, mit 3,44 g (85 mmol) Natriumhydroxid und 0,43 g (1,5 mmol) 1,9-Dibromnonan versetzt.

MG: C₃₁H₃₂N₄ (460,62 g/mol)

Ausbeute: 0,30 g (43%), gelbes Pulver

Rf: 0,53 (FM Chloroform/Methanol (9:1) + 1 Tr. NH₃)

Smp.: 131°C

¹H-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.08-1.15	m	10	NCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₅
1.69-1.74	mc	4	2xNCH ₂ CH ₂
4.39-4.45	t (J = 7.1 Hz)	4	2xNCH ₂
7.20-7.27	dt (J = 1.1, 8.0 Hz)	2	arom., H6, H6'
7.52-7.59	dt (J = 1.2, 6.9 Hz)	2	arom., H7, H7'
7.63-7.67	d (J = 8.4 Hz)	2	arom., H8, H8'
8.08-8.10	dd (J = 0.8, 5.4 Hz)	2	arom., H4, H4'
8.21-8.24	d (J = 7.8 Hz)	2	arom., H5, H5'
8.34-8.36	d (J = 5.2 Hz)	2	arom., H3, H3'
9.01	s	2	arom., H1, H1'

¹³C-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
26.70	2xN(CH ₂) ₂ CH ₂
28.93	2xN(CH ₂) ₃ CH ₂
28.99	N(CH ₂) ₄ CH ₂
29.12	2xNCH ₂ CH ₂
42.92	2xNCH ₂
110.57	arom.
114.96	arom.
119.77	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
120.75	arom.
122.36	arom.
127.56	arom.
128.66	arom.
133.09	arom.
136.51	arom.
138.75	arom.
141.14	arom.

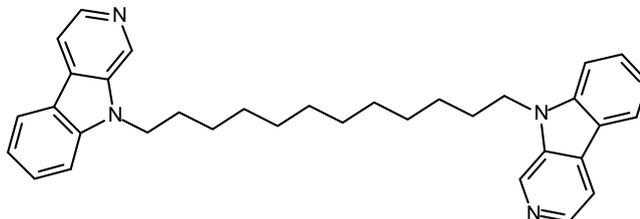
IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3038, 2920, 2848, 1885, 1625, 1556, 1445, 1328, 1239, 1030, 815, 720

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	78,51	6,93	11,77
berechnet C ₃₁ H ₃₂ N ₄ x 2/3 H ₂ O	78,78	7,11	11,85

9-[12-(β-Carbolin-9-yl)dodecyl]-β-carbolin (10-12)

0,50 g (3,0 mmol) β-Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, in 7,5 ml DMSO gelöst, mit 3,44 g (85 mmol) Natriumhydroxid und 0,49 g (1,5 mmol) 1,12-Dibromdodecan versetzt.

MG: C₃₄H₃₆N₄ (502,69 g/mol)

Ausbeute: 0,18 g (24%), gelbes Pulver

Rf: 0,66 (FM Chloroform/Methanol (9:1) + 1 Tr. NH₃)

Smp.: 85°C

¹H-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.03-1.16	m	16	NCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₈
1.72-1.77	mc	4	2xNCH ₂ CH ₂
4.42-4.47	t (J = 6.9 Hz)	4	2xNCH ₂
7.20-7.26	dt (J = 1.0, 7.8 Hz)	2	arom., H6, H6'
7.53-7.60	dt (J = 1.2, 7.1 Hz)	2	arom., H7, H7'
7.68-7.68	d (J = 8.4 Hz)	2	arom., H8, H8'
8.07-8.09	dd (J = 1.0, 5.4 Hz)	2	arom., H4, H4'
8.21-8.24	d (J = 7.7 Hz)	2	arom., H5, H5'
8.34-8.36	d (J = 5.2 Hz)	2	arom., H3, H3'
9.02	s	2	arom., H1, H1'

¹³C-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
26.76	2xN(CH ₂) ₂ <u>CH</u> ₂
29.03	2xN(CH ₂) ₃ <u>CH</u> ₂
29.10	N(CH ₂) ₄ (<u>CH</u> ₂) ₄
29.17	2xNCH ₂ <u>CH</u> ₂
42.94	2xN <u>CH</u> ₂
110.59	arom.
114.95	arom.
119.77	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
120.75	arom.
122.35	arom.
127.56	arom.
128.65	arom.
133.09	arom.
136.52	arom.
138.74	arom.
141.15	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3050, 3009, 2920, 2848, 1622, 1442, 1328, 1255, 1217, 818, 726

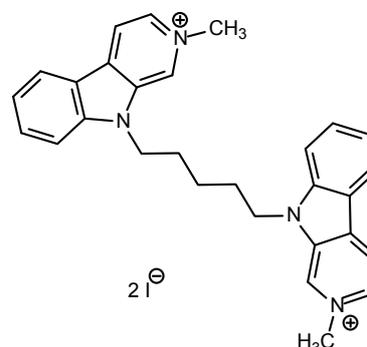
Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	79,28	7,60	10,70
berechnet C ₃₄ H ₃₈ N ₄ x 2/3 H ₂ O	79,34	7,70	10,89

2-Methyl-9-[5-(2-methyl-β-carbolin-9-yl)pentyl]-β-carbolin-2-iumdiodid (11-5)0,05 g (0,1 mmol) 9-[5-(β-carbolin-9-yl)pentyl]-β-carbolin (**10-5**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, in 10 ml Aceton gelöst und mit 0,06 ml (0,8 mmol) Methyljodid versetzt.MG: C₂₉H₃₀I₂N₄ (688,38 g/mol)

Ausbeute: 0,08 g (97%), gelbes Pulver

Smp.: 329°C

¹H-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.22-1.35	m	2	NCH ₂ CH ₂ <u>CH</u> ₂
1.84-1.90	mc	4	2xNCH ₂ <u>CH</u> ₂
4.46	s	6	2xN ⁺ <u>CH</u> ₃
4.50-4.56	t (J = 6.7 Hz)	4	2xN <u>CH</u> ₂
7.45-7.51	t (J = 7.6 Hz)	2	arom., H6,H6'
7.76-7.85	m	4	arom., H7,H7', H8,H8'
8.49-8.52	d (J = 8.0 Hz)	2	arom., H5,H5'
8.65-8.67	d (J = 6.5 Hz)	2	arom., H4,H4'
8.80-8.83	d (J = 6.3 Hz)	2	arom., H3,H3'
9.61	s	2	arom., H1,H1'

¹³C-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
24.21	NCH ₂ CH ₂ CH ₂
28.87	2xNCH ₂ CH ₂
43.91	2xN ⁺ CH ₃
48.30	2xNCH ₂
111.77	arom.
118.06	arom.
119.39	arom.
122.19	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
124.24	arom.
129.86	arom.
131.85	arom.
132.36	arom.
133.96	arom.
135.68	arom.
144.43	arom.

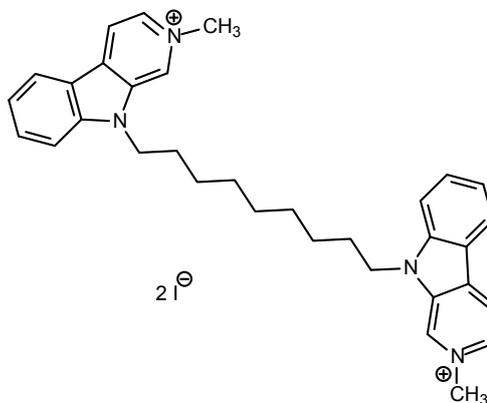
IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3038, 3003, 2936, 2851, 1638, 1511, 1340, 1245, 770

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	50,71	4,52	7,94
berechnet C ₂₉ H ₃₀ I ₂ N ₄	50,60	4,39	8,14

2-Methyl-9-[9-(2-methyl-β-carbolin-9-yl)nonyl]-β-carbolin-2-iumdiiodid (11-9)

0,10 g (0,2 mmol) 9-[9-(β-carbolin-9-yl)nonyl]-β-carbolin (**10-9**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, in 25 ml Aceton gelöst und mit 0,13 ml (1,6 mmol) Methyljodid versetzt.

MG: C₃₃H₃₈I₂N₄ (744,49 g/mol)

Ausbeute: 0,15 g (98%), gelbes Pulver

Smp.: 250-251°C

¹H-NMR: 400 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.17-1.30	m	10	NCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₅
1.78-1.85	mc	4	2xNCH ₂ CH ₂
4.51	s	6	2xN ⁺ CH ₃
4.55-4.59	t (J = 7.3 Hz)	4	2xNCH ₂
7.47-7.51	dt (J = 0.6, 7.8 Hz)	2	arom., H6, H6'
7.83-7.87	dt (J = 1.0, 8.2 Hz)	2	arom., H7, H7'
7.92-7.95	d (J = 8.5 Hz)	2	arom., H8, H8'
8.52-8.53	d (J = 7.9 Hz)	2	arom., H5, H5'
8.67-8.68	dd (J = 0.9, 6.5 Hz)	2	arom., H4, H4'
8.82-8.84	d (J = 6.4 Hz)	2	arom., H3, H3'
9.69	s	2	arom., H1, H1'

¹³C-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

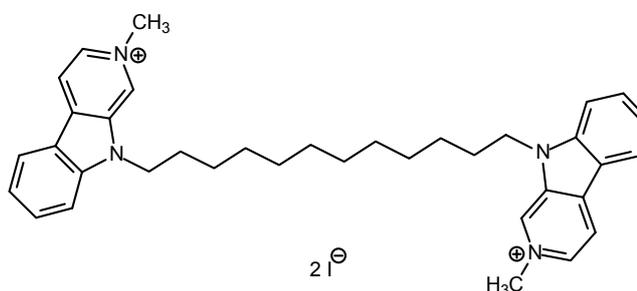
δ [ppm]	Zuordnung
26.70	NCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₅
29.16	2xNCH ₂ CH ₂
44.07	2xN ⁺ CH ₃
48.31	2xNCH ₂
111.84	arom.
118.10	arom.
119.45	arom.
122.15	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
124.24	arom.
130.01	arom.
131.85	arom.
132.47	arom.
133.95	arom.
135.78	arom.
144.50	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3038, 2927, 2851, 1635, 1508, 1458, 1340, 758

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	53,41	5,38	7,57
berechnet C ₃₃ H ₃₈ I ₂ N ₄	53,24	5,14	7,53

2-Methyl-9-[12-(2-methyl-β-carbolin-9-yl)dodecyl]-β-carbolin-2-iumdiodid (11-12)0,05 g (0,1 mmol) 9-[12-(β-carbolin-9-yl)dodecyl]-β-carbolin (**10-12**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, in 10 ml Aceton gelöst und mit 0,06 ml (0,8 mmol) Methyljodid versetzt.MG: C₃₆H₄₄I₂N₄ (786,57 g/mol)

Ausbeute: 0,07 g (89%), gelbes Pulver

Smp.: 274°C

¹H-NMR: 400 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.16-1.31	m	16	NCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₈
1.80-1.87	mc	4	2xNCH ₂ CH ₂
4.51	s	6	2xN ⁺ CH ₃
4.56-4.60	t (J = 7.3 Hz)	4	2xNCH ₂
7.48-7.51	t (J = 7.6 Hz)	2	arom., H6,H6'
7.84-7.88	dt (J = 0.9,7.2 Hz)	2	arom., H7,H7'
7.94-7.96	d (J = 8.6 Hz)	2	arom., H8,H8'
8.52-8.54	d (J = 7.9 Hz)	2	arom., H5,H5'
8.67-8.69	d (J = 6.4 Hz)	2	arom., H4,H4'
8.83-8.84	d (J = 6.4 Hz)	2	arom., H3,H3'
9.68	s	2	arom., H1,H1'

¹³C-NMR: 400 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
26.76	NCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₅
29.38	2xNCH ₂ CH ₂
44.12	2xN ⁺ CH ₃
48.35	2xNCH ₂
111.88	arom.
118.08	arom.
119.49	arom.
122.22	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
124.28	arom.
129.95	arom.
131.93	arom.
132.47	arom.
133.98	arom.
135.80	arom.
144.53	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 2924, 2854, 1641, 1511, 1457, 1337, 770, 755, 723

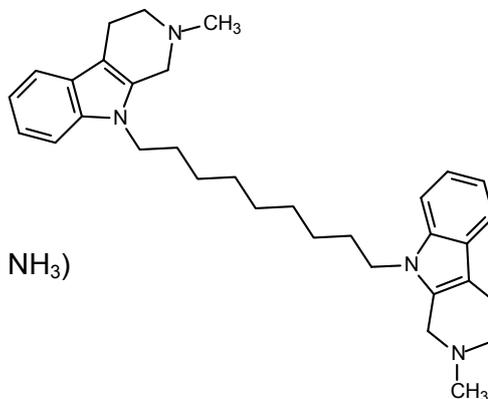
Hochauflösende Masse:

berechnet für C₃₆H₄₄N₄ (M²⁺): 266,1778

gemessen: 266,1787

2-Methyl-9-[9-(2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolin-9-yl)nonyl]-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolin (12-9)

0,13 g (0,2 mmol) 2-Methyl-9-[9-(2-methyl-β-carbolin-9-yl)nonyl]-β-carbolin-2-iumdiiodid (11-9) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, in 40 ml Methanol gelöst und mit 0,5 g Natriumborhydrid versetzt.

MG: C₃₃H₄₄N₄ (496,73 g/mol)

Ausbeute: 0,07 g (70%), ockerfarbenes Pulver

Rf: 0,34 (FM Chloroform/Methanol (9:1) + 1 Tr. NH₃)

Smp.: 131°C

¹H-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.20	s	10	NCH ₂ CH ₂ (CH ₂) ₅
1.58	m	4	NCH ₂ CH ₂
2.41	s	6	2xNCH ₃
2.66	s	8	aliph., H3,H3',H4,H4'
3.54	s	4	aliph., H1,H1'
3.93-3.99	t (J = 7.1 Hz)	4	2xNCH ₂
6.91-6.97	t (J = 7.7 Hz)	2	arom.
7.00-7.06	t (J = 6.9 Hz)	2	arom.
7.31-7.37	t (J = 6.7 Hz)	4	arom.

¹³C-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Zuordnung
21.49	aliph., C4,C4'
27.02	2xN(CH ₂) ₂ C ₂ H ₂
29.33	2xN(CH ₂) ₃ C ₂ H ₂
29.69	2xNCH ₂ C ₂ H ₂
30.34	N(CH ₂) ₄ C ₂ H ₂
43.26	2xNCH ₂
45.83	2xNCH ₃
51.74	aliph., C3,C3'
52.91	aliph., C1,C1'

δ [ppm]	Zuordnung
106.88	arom.
108.95	arom.
118.00	arom.
118.68	arom.
120.68	arom.
126.83	arom.
132.75	arom.
136.45	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3044, 2924, 2848, 2778, 2360, 1654, 1467, 1353, 1325, 1179, 1147, 736

Hochauflösende Masse:

berechnet für C₃₃H₄₄N₄ (M + H⁺): 497,3639

gemessen: 497,3644

9-Methyl-β-carbolin-2-iumchlorid (13-1)

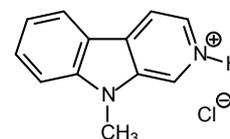
1,00 g (5,95 mmol) β-Carbolin (**4**), werden wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, in 10 ml DMF unter N₂-Atmosphäre mit 0,36 g (14,90 mmol) Natriumhydrid und 0,84 g (5,95 mmol) Methyljodid umgesetzt.

MG: C₁₂H₁₁ClN₂ (218,68 g/mol)

Ausbeute: 0,70 g (64%), gelbe Kristalle

Rf: 0,38 (FM Chloroform/Methanol (12:1))

Smp.: 295°C, Lit.: 288-290°C [Taborsky et al., 1965]

¹H-NMR: 250 MHz in MeOD

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
4.06	s	3	NCH ₃
7.28-7.35	dt (J = 1.2, 6.8 Hz)	1	arom., H6
7.58-7.70	m	2	arom., H7, H8
8.13-8.16	d (J = 5.4 Hz)	1	arom., H4
8.18-8.21	d (J = 7.9 Hz)	1	arom., H5
8.31-8.33	d (J = 5.4 Hz)	1	arom., H3
8.89	s	1	arom., H1

¹³C-NMR: 250 MHz in MeOD

δ [ppm]	Zuordnung
29.06	NCH ₃
110.34	arom.
116.68	arom.
119.47	arom.
121.57	arom.
122.89	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
125.04	arom.
129.37	arom.
131.86	arom.
133.43	arom.
136.16	arom.
144.78	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3076, 3034, 2924, 2502, 1638, 1505, 1331, 1264, 1135, 837, 758, 720

9-Ethyl-β-carbolin-2-iumchlorid (13-2)

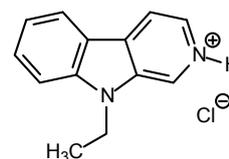
1,00 g (5,95 mmol) β-Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, in 10 ml DMF unter N₂-Atmosphäre mit 0,36 g (14,90 mmol) Natriumhydrid und 0,93 g (5,95 mmol) 1-Iodethan umgesetzt.

MG: C₁₃H₁₃ClN₂ (232,71 g/mol)

Ausbeute: 1,16 g (83%), ockerfarbenes Pulver

Rf: 0,41 (FM Chloroform/Methanol (12:1))

Smp.: 250-255°C, Lit.: 249-252°C [Ho et al., 1969]

¹H-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.33-1.39	t (<i>J</i> = 7.1 Hz)	3	NCH ₂ CH ₃
4.64-4.72	q (<i>J</i> = 7.1 Hz)	2	NCH ₂ CH ₃
7.41-7.48	dt (<i>J</i> = 1.1, 7.1 Hz)	1	arom., H6
7.78-7.85	dt (<i>J</i> = 1.2, 6.9 Hz)	1	arom., H7
7.89-7.92	d (<i>J</i> = 8.4 Hz)	1	arom., H8
8.51-8.54	d (<i>J</i> = 7.8 Hz)	1	arom., H5
8.58-8.60	d (<i>J</i> = 6.1 Hz)	1	arom., H4
8.76-8.79	d (<i>J</i> = 6.1 Hz)	1	arom., H3
9.57	s	1	arom., H1

¹³C-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
14.41	NCH ₂ CH ₃
38.80	NCH ₂ CH ₃
111.47	arom.
117.82	arom.
119.83	arom.
121.82	arom.
124.19	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
125.98	arom.
129.80	arom.
132.07	arom.
133.00	arom.
135.24	arom.
143.56	arom.

IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 3041, 2962, 2455, 2015, 1635, 1499, 1337, 1242, 1131, 831, 742-720, 438

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	66,43	5,93	11,99
berechnet $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{ClN}_2 \times 1/5 \text{H}_2\text{O}$	66,07	5,72	11,85

9-Propyl- β -carbolin-2-iumchlorid (13-3)

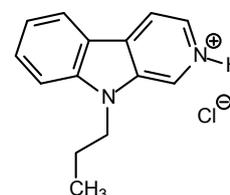
1,00 g (5,95 mmol) β -Carbolin (4) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, in 10 ml DMF unter N_2 -Atmosphäre mit 0,36 g (14,90 mmol) Natriumhydrid und 1,01 g (5,95 mmol) 1-Iodpropan umgesetzt.

MG: $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{ClN}_2$ (246,74 g/mol)

Ausbeute: 1,31 g (89%), ockerfarbenes Pulver

Rf: 0,44 (FM Chloroform/Methanol (12:1))

Smp.: 250-255°C, Lit.: 229-231°C [Ho et al., 1969]



$^1\text{H-NMR}$: 250 MHz in $[\text{D}_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.83-0.89	t ($J = 7.4$ Hz)	3	$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
1.75-1.90	sext ($J = 7.3$ Hz)	2	$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
4.58-4.64	t ($J = 7.3$ Hz)	2	$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
7.42-7.49	dt ($J = 1.0, 7.8$ Hz)	1	arom., H6
7.79-7.86	dt ($J = 1.2, 7.1$ Hz)	1	arom., H7
7.91-7.95	d ($J = 8.4$ Hz)	1	arom., H8
8.53-8.56	d ($J = 7.9$ Hz)	1	arom., H5
8.59-8.61	d ($J = 6.1$ Hz)	1	arom., H4
8.80-8.82	d ($J = 6.1$ Hz)	1	arom., H3
9.62	s	1	arom., H1

$^{13}\text{C-NMR}$: 250 MHz in $[\text{D}_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
11.52	$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	124.20	arom.
22.47	$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	125.84	arom.
45.25	$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	129.45	arom.
111.76	arom.	132.18	arom.
117.93	arom.	133.09	arom.
119.67	arom.	135.79	arom.
121.89	arom.	144.17	arom.

IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 3019, 2958, 2924, 2512, 2024, 1631-1610, 1501, 1461, 1331, 824, 745, 790, 416

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	66,15	6,34	10,86
berechnet C ₁₄ H ₁₅ ClN ₂ x 1/4 H ₂ O	66,53	6,25	11,08

9-(2-Fluoroethyl)-β-carbolin-2-iumchlorid (13-2F)

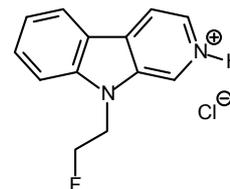
0,50 g (3,00 mmol) β-Carbolin (**4**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, in 5 ml DMF unter N₂-Atmosphäre mit 0,11 g (4,56 mmol) Natriumhydrid und 0,38 g (3 mmol) 1-Bromo-2-fluoroethan umgesetzt.

MG: C₁₃H₁₂ClFN₂ (250,70 g/mol)

Ausbeute: 0,31 g (41%), ockerfarbenes Pulver

Rf: 0,32 (FM Chloroform/Methanol (12:1))

Smp.: 235-239°C

¹H-NMR: 250 MHz in CDCl₃

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
4.76-4.80	m	1	NCH ₂ CH ₂ F
4.86-4.91	m	1	NCH ₂ CH ₂ F
4.94-5.01	m	2	NCH ₂ CH ₂ F
7.46-7.52	m	1	arom., H6
7.83-7.85	m	2	arom., H7,H8
8.39-8.43	d (J = 8.0 Hz)	1	arom., H5
8.47-8.50	d (J = 6.1 Hz)	1	arom., H4
8.62-8.64	d (J = 6.1 Hz)	1	arom., H3
9.27	s	1	arom., H1

¹³C-NMR: 250 MHz in MeOD

δ [ppm]	Zuordnung
43.94	NCH ₂ CH ₂ F
44.27	NCH ₂ CH ₂ F
80.95	NCH ₂ CH ₂ F
83.64	NCH ₂ CH ₂ F
110.72	arom.
116.75	arom.
119.79	arom.
121.83	arom.

δ [ppm]	Zuordnung
122.95	arom.
125.76	arom.
130.05	arom.
131.82	arom.
133.70	arom.
136.25	arom.
144.12	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3047, 2946, 2531, 2005, 1635, 1499, 1470, 1337, 1014, 827, 748, 720

Hochauflösende Masse:

berechnet für C₁₃H₁₂FN₂ (M⁺):215,0979

gemessen: 215,1016

6-Bromo- β -carbolin (4Br)

Nach Heineke [Heineke, 1992] werden 0,50 g (2,96 mmol) β -Carbolin (**4**) in 150 ml Dichlormethan gelöst, 30 mg Eisenpulver und tropfenweise 0,48 g (3,00 mmol) Brom zugegeben. Danach wird der Ansatz 75 min gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert, in Wasser suspendiert und mit verdünnter Ammoniak-Lösung neutralisiert. Die Lösung wird mit Dichlormethan extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird über Kieselgel 60 mit einer Mischung aus Chloroform und Methanol (9:1) säulenchromatographisch gereinigt. Die organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, eingedampft und der Rückstand im Vakuum getrocknet.

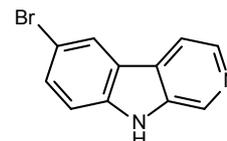
MG: $C_{11}H_7BrN_2$ (247,09 g/mol)

Ausbeute: 0,20 g (27%), braunes Pulver

Rf: 0,35 (FM Chloroform/Methanol (9:1) + 1 Tr. NH_3)

Smp.: 265-268°C, Lit.: 271°C [Heineke, 1992]

1H -NMR: 250 MHz in $[D_6]$ -DMSO



δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
7.54-7.58	dd ($J = 0.4, 8.5$ Hz)	1	arom., H8
7.63-7.67	dd ($J = 2.0, 8.8$ Hz)	1	arom., H7
8.14-8.16	d ($J = 5.0$ Hz)	1	arom., H4
8.34-8.36	d ($J = 5.3$ Hz)	1	arom., H3
8.50-8.51	d ($J = 2.0$ Hz)	1	arom., H5
8.91-8.92	d ($J = 1.0$ Hz)	1	arom., H1
11.76	s	1	NH

^{13}C -NMR: 250 MHz in $[D_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
111.65	arom.
114.46	arom.
115.46	arom.
123.01	arom.
124.84	arom.
126.95	arom.

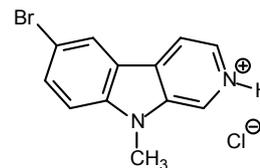
δ [ppm]	Zuordnung
130.98	arom.
134.89	arom.
136.71	arom.
138.87	arom.
139.62	arom.

IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 3120, 3047, 2933, 2835, 2737, 1625, 1562, 1432, 1274, 1017, 808, 606

6-Bromo-9-methyl- β -carbolin-2-iumchlorid (13Br-1)

1,08 g (4,36 mmol) 6-Bromo- β -carbolin (**4Br**) werden, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, in 15 ml DMF unter N_2 -Atmosphäre mit 0,30 g (14,90 mmol) Natriumhydrid und 0,62 g (4,36 mmol) Methyljodid umgesetzt und aufgearbeitet. Der Rückstand wird über Kieselgel 60 mit einer Mischung aus Chloroform und Methanol (12:1) säulenchromatographisch gereinigt. Die organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, eingedampft und der Rückstand im Vakuum getrocknet.

MG: $C_{12}H_{10}BrClN_2$ (297,58 g/mol)
 Ausbeute: 0,34 g (26%), ockerfarbenes Pulver
 Rf: 0,40 (FM Chloroform/Methanol (12:1))
 Smp.: 121°C



1H -NMR: 250 MHz in $[D_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
3.95	s	3	NCH ₃
7.63-7.67	d ($J = 8.8$ Hz)	1	arom., H8
7.70-7.74	dd ($J = 1.9, 8.8$ Hz)	1	arom., H7
8.14-8.16	dd ($J = 1.1, 5.2$ Hz)	1	arom., H4
8.38-8.41	d ($J = 5.4$ Hz)	1	arom., H3
8.50-8.51	dd ($J = 0.6, 1.9$ Hz)	1	arom., H5
9.04	s	1	arom., H1

^{13}C -NMR: 250 MHz in $[D_6]$ -DMSO

δ [ppm]	Zuordnung
29.87	NCH ₃
111.87	arom.
112.57	arom.
115.25	arom.
122.54	arom.
124.86	arom.

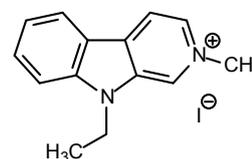
δ [ppm]	Zuordnung
126.53	arom.
131.06	arom.
133.44	arom.
137.26	arom.
139.12	arom.
140.46	arom.

IR-Daten (KBr, cm^{-1}): 3041, 2927, 1619, 1556, 1502-1461, 1271, 1014, 808, 720, 619, 422

9-Ethyl-2-methyl-β-carboline-2-iumiodid (14-2)

0,20 g (0,85 mmol) 9-Ethyl-β-carboline-2-iumchlorid (**13-2**) werden in 30 ml Wasser suspendiert, mit 10%iger Natriumhydroxid-Lösung auf pH 10-12 eingestellt und mit Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden verdampft und der Rückstand wird, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, in 10 ml Aceton gelöst und mit 0,5 ml (8,00 mmol) Methyljodid umgesetzt.

MG: $C_{14}H_{15}IN_2$ (338,19 g/mol)
 Ausbeute: 0,22 g (82%), gelbe Kristalle
 Smp.: 285-290°C



¹H-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.37-1.43	t (J = 7.1 Hz)	3	NCH ₂ CH ₃
4.49	s	3	N ⁺ CH ₃
4.59-4.68	q (J = 7.1 Hz)	2	NCH ₂ CH ₃
7.46-7.51	t (J = 7.1 Hz)	1	arom., H6
7.82-7.89	t (J = 7.1 Hz)	1	arom., H7
7.93-7.97	d (J = 8.4 Hz)	1	arom., H8
8.50-8.53	d (J = 8.0 Hz)	1	arom., H5
8.65-8.67	d (J = 6.5 Hz)	1	arom., H4
8.80-8.82	d (J = 6.3 Hz)	1	arom., H3
9.68	s	1	arom., H1

¹³C-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
14.45	NCH ₂ CH ₃	124.31	arom.
40.99	NCH ₂ CH ₃	129.92	arom.
48.31	N ⁺ CH ₃	131.94	arom.
111.68	arom.	132.46	arom.
118.04	arom.	133.89	arom.
119.56	arom.	135.36	arom.
122.20	arom.	144.00	arom.

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3044, 2971, 1638, 1511, 1641, 1340, 1245, 862, 764, 720, 425

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	49,52	4,54	8,25
berechnet C ₁₄ H ₁₅ N ₂	49,72	4,47	8,28

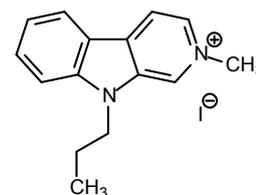
2-Methyl-9-propyl-β-carbolin-2-iumiodid (14-3)

0,20 g (0,81 mmol) 9-Propyl-β-carbolin-2-iumchlorid (**13-3**) werden in 30 ml Wasser suspendiert, mit 10%-iger NaOH-Lösung auf pH 10-12 eingestellt und mit Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden verdampft und der Rückstand wird, wie in Abschnitt G.1.2 beschrieben, in 10 ml Aceton gelöst und mit 0,5 ml (8,00 mmol) Methyljodid umgesetzt.

MG: C₁₅H₁₇N₂ (352,21 g/mol)

Ausbeute: 0,18 g (62%), gelbe Kristalle

Smp.: 232-235°C



¹H-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.87-0.92	t (<i>J</i> = 7.3 Hz)	3	NCH ₂ CH ₂ <u>CH</u> ₃
1.80-1.94	sext (<i>J</i> = 7.3 Hz)	2	NCH ₂ <u>CH</u> ₂ CH ₃
4.49-4.58	m	5	N ⁺ <u>CH</u> ₃ , NCH ₂ CH ₂ CH ₃
7.45-7.51	t (<i>J</i> = 7.1 Hz)	1	arom., H6
7.82-7.88	t (<i>J</i> = 7.1 Hz)	1	arom., H7
7.95-7.98	d (<i>J</i> = 8.4 Hz)	1	arom., H8
8.50-8.53	d (<i>J</i> = 8.0 Hz)	1	arom., H5
8.65-8.67	d (<i>J</i> = 6.5 Hz)	1	arom., H4
8.81-8.83	d (<i>J</i> = 6.3 Hz)	1	arom., H3
9.69	s	1	arom., H1

¹³C-NMR: 250 MHz in [D₆]-DMSO

δ [ppm]	Zuordnung	δ [ppm]	Zuordnung
11.55	NCH ₂ CH ₂ <u>CH</u> ₃	124.23	arom.
22.41	NCH ₂ <u>CH</u> ₂ CH ₃	129.96	arom.
45.40	N <u>CH</u> ₂ CH ₂ CH ₃	131.84	arom.
48.31	N ⁺ <u>CH</u> ₃	132.44	arom.
111.91	arom.	133.92	arom.
118.04	arom.	135.86	arom.
119.43	arom.	144.56	arom.
122.19	arom.		

IR-Daten (KBr, cm⁻¹): 3038, 2962, 2927, 1635, 1508, 1340, 1236, 758, 419

Elementaranalyse:

	C [%]	H [%]	N [%]
gemessen	51,14	4,95	7,99
berechnet C ₁₅ H ₁₇ IN ₂	51,15	4,86	7,95

G.2 Untersuchung auf Neurotoxizität, MTS-Assay, β -Carbolin-Uptake-Assay

Der Test wird, wie bei Wernicke et al. beschrieben, durchgeführt [Wernicke et al., 2007].

G.3 Untersuchung auf neuroprotektive Eigenschaften

Der Test auf Neuroprotektion wird, wie bei Hamann et al. beschrieben, durchgeführt [Hamann et al., 2008].

G.4 Bestimmung der inhibitorischen Aktivität an der AChE und BChE, Ellman-Test

Die verwendete Methode wurde von Ellman entwickelt und von Kapková et al. modifiziert [Ellman et al., 1961; Kapkova et al., 2003].

G.4.1 Allgemeine Angaben zu Materialien und Geräten

Der im Folgenden beschriebene Ellman-Test wurde von Herrn Dr. habil. Michael Decker aus unserem Arbeitskreis etabliert.

Phosphatpuffer pH 8,0

13,61 g Kaliumdihydrogenphosphat (Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)) wird in 1 l Wasser gelöst und mit Kaliumhydroxid auf pH $8,0 \pm 0,1$ eingestellt. Der Puffer wird durch einen Filter der Porengröße $0,22 \mu\text{m}$ filtriert. Der Puffer wird bei 4°C gelagert und ist eine Woche haltbar.

5,5'-Dithiobis-,2-nitrobenzoesäure-Lösung (DTNB-Lösung) (0,01 M)

0,396 g DTNB (Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)) und 0,15 g Natriumhydrogencarbonat (Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)) werden in 100 ml Wasser gelöst und in 1 ml Aliquote geteilt. Die Aliquote werden direkt verwendet oder bei -30°C aufbewahrt.

Acetylthiocholiniumiodid-Lösung (ATC-Lösung) (0,075 M)

0,217 g ATC (Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)) werden in 10 ml Wasser gelöst und in 0,4 ml Aliquote geteilt. Diese werden bei -30°C aufbewahrt.

Butyrylthiocholiniumiodid-Lösung (BTC-Lösung) (0,075 M)

0,237g BTC (Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)) werden in 10ml Wasser gelöst und in 0,4 ml Aliquote geteilt. Diese werden bei -30°C aufbewahrt.

Acetylcholinesterase (AChE) (E.C.3.1.1.7, Typ V-S, Electric Eel, Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) und **Butyrylcholinesterase (BChE)** (E.C.3.1.1.8, horse serum, Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)

500 Einheiten des jeweiligen Enzyms werden in 1 ml einer 1%igen Gelatinelösung gelöst und mit Wasser auf 100 ml verdünnt. Die Stammlösung wird in 0,7 ml Aliquoten bei -30°C eingefroren. Vor dem Gebrauch werden 0,7 ml Wasser zugegeben um die Meßkonzentration von 2,5 Einheiten/ml zu erhalten.

UV-VIS Spektrophotometer

Spektrophotometer V-570 (Jasco Labor und Datentechnik GmbH (Groß-Umstadt, Deutschland)

G.4.2 Versuchsdurchführung

Vor Beginn der Messung werden die eingefrorenen Reagenzien bei RT aufgetaut. Alle Messungen erfolgen in Quarzküvetten durch UV-Spektrometrie. Die zu prüfenden Substanzen werden je nach Löslichkeit in einer Konzentration von 10^{-4} M oder 10^{-5} M in Wasser oder Ethanol gelöst. Die Konzentration der Stammlösung wird so berechnet, daß die vermessene Lösung mit einem Endvolumen von 3,32 ml eine 10^{-4} bzw. 10^{-5} molare Lösung der Testsubstanz enthält. Aus dieser Stammlösung wird eine Verdünnungsreihe in geeigneten Verdünnungsstufen hergestellt. Bei β -Carbolinen mit geringerer Affinität wird eine 10^{-5} M - Verdünnung hergestellt und dreifach bestimmt. Die Durchführung wird im Anschluß nur für die Bestimmung der AChE-Inhibition dargestellt, die Messung an der BChE erfolgt analog mit BTC statt ATC als Enzymsubstrat. Alle Proben werden nach Zugabe von ATC und nach Durchmischung der Probenlösung mit einer 5 ml Pipette für 3 min inkubiert und anschließend bei 412 nm an einem Spektrophotometer vermessen. Die Verdünnungsreihen der Testsubstanzen werden jeweils dreifach vermessen, wobei vor jeder Meßreihe der Blind- und Leerwert erneut vermessen werden und für die jeweilige Meßreihe als Berechnungsgrundlage der prozentualen Enzymaktivität herangezogen werden.

Zur Vermessung der Proben werden 3 ml Puffer, 100 μl Testsubstanz-Verdünnung, 100 μl DTNB, 100 μl AChE-Lösung und zuletzt 20 μl ATC zugegeben, gemischt, 3 min inkubiert und vermessen.

Die Berechnung der verbleibenden prozentualen Enzymaktivität erfolgte durch Einbeziehung eines 100%-Wertes (Leerwert), dessen Zusammensetzung sich nur durch die Zugabe von 100 μl Wasser anstatt der Testsubstanz unterschied.

Der Blindwert wurde durch die Messung einer Mischung aus 3 ml Puffer, 200 μl Wasser, 100 μl DTNB und 20 μl ATC erhalten.

Die prozentuale Enzyminhibition (100% – Enzymaktivität%) wird gegen den Logarithmus der entsprechenden InhibitorKonzentration aufgetragen. Die Dosis-Wirkungs-Kurven und die entsprechenden IC₅₀-Werte werden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism™ (GraphPad Software, Inc.) mit den Parametern „non-linear regression“ und „sigmoidal dose-response-variable slope“ berechnet.

G.5 Aβ-Aggregation und deren Beeinflussung durch verschiedene Faktoren

G.5.1 Allgemeine Angaben zu Materialien und Methoden

Alle Reagenzien werden mit bidestilliertem Wasser hergestellt.

Phosphatpuffer pH 8 (0,1 M)

Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei, Natriumdihydrogenphosphat x 2 H₂O
3,4334 g Dinatriumhydrogenphosphat (Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)) und 0,1270 g Natriumdihydrogenphosphat (Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)) werden in 200 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird mit verdünnter Phosphorsäure auf pH 8 eingestellt und auf 250 ml mit Wasser aufgefüllt.

Thioflavin T-Lösung (THT-Lösung) (15 µM)

0,5 mg THT (Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)) werden in 1 ml Wasser gelöst. Davon werden 10 µl auf 1 ml mit Phosphatpuffer verdünnt.

Hexafluoro-2-propanol (HFIP) (Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland))

Aβ-Lösung (400 µM)

Aβ 42 (H-1368, Bachem (Bubendorf, Schweiz)), Aβ 40 (wurde von der Arbeitsgruppe von PD Dr. habil. Marcus Fändrich (Max-Planck-Institut Halle/Saale) zur Verfügung gestellt)
1,90 mg mit HFIP behandeltes Aβ 40/Aβ 42 werden in 176 µl DMSO (2,5 mM) (99,9%; Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)) 5-10 s unter vorsichtigem Mischen mit dem Vortexer gelöst und anschließend 920 µl Phosphatpuffer zugeben und für 5-10 s erneut mit dem Vortexer vorsichtig mischen. Aus dieser Lösung werden anschließend adäquate Verdünnungen hergestellt und diese werden sofort verbraucht.

AChE-Lösung (5 µM)

eeAChE (E.C.3.1.1.7, Typ V-S, Electric Eel, Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland))
huAChE (E.C.3.1.1.7, C1682, human rekombinant, Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland))

0,46 mg eeAChE (70 kDa) werden in 657 μ l Phosphatpuffer unter vorsichtigem mischen mit dem Vortexer gelöst und anschließend 1:10 mit Phosphatpuffer verdünnt. Aus dieser Lösung werden anschließend adäquate Verdünnungen hergestellt und diese werden sofort verbraucht.

Fluorimeter

NOVOstar Microplate-Reader, BMG Labtechnologies GmbH (Offenburg, Deutschland)

Einstellungen: Exzitation: 450 nm; Emission: 490 nm; Shake width (mm): 1,0; Shake mode: orbital; Additional shaking: 20 s before each cycle; Temperatur: 37°C

G.5.2 Versuchsdurchführung

Vor der eigentlichen Versuchsdurchführung wird das Desaggregationsprotokoll nach Klein [Klein, 2002] durchgeführt. Hierzu wird das bei -80°C gelagerte A β und HFIP für 15 min auf Eis gelegt. A β wird nun in ein nicht beschichtetes Glasgefäß eingewogen und gekühltes HFIP zugegeben, so daß eine 1 mM Lösung (z.B. 1,76 mg A β 40 in 1,015 ml HFIP) entsteht. Das Peptid muß vollständig gelöst sein, gegebenenfalls muß die Suspension für wenige Sekunden mit dem Vortexer vorsichtig gemischt oder im Ultraschallbad behandelt werden. Das geschlossene Gefäß wird für eine Stunde bei RT stehen gelassen und bei schlechter Löslichkeit wird die Lösung alle 10 min erneut mit dem Vortexer gemischt. Die Lösung verbleibt unverschlossen über Nacht bei RT, wofür das Gläschen in die maximale Schräglage gebracht wird. Das noch verbliebene HFIP wird am Rotationsverdampfer bei RT 10 min lang bei 0 bar entfernt. Es soll ein klarer dünner A β -Film entstehen, welcher nun wieder bei -80°C für mehrere Monate gelagert werden kann.

Die Experimente werden in einer 96well-Mikrotiterplatte durchgeführt. Bei allen Experimenten wird ein Blindwert (45 μ l Puffer und 5 μ l THT) mitgeführt. Die Proben enthalten 5 μ l THT, die weiteren Volumina ergeben sich aus den jeweiligen Konzentrationen und der Zusammensetzung der Proben. Letztendlich werden sie mit Puffer auf ein Gesamtvolumen von 50 μ l aufgefüllt. Jede Probe wird vier- bis achtfach auf einer 96well-Platte und in 2-3 unabhängigen Experimenten wiederholt. Die Reihenfolge der Pipettierung ist stets gleich, zuerst werden Puffer und THT, anschließend eventuell AChE und zuletzt A β zugegeben. Die 96well-Platte wird dann im Fluorimeter bei 37°C für 2-4 d inkubiert und halbstündlich vermessen. Die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten erfolgt mit den Programmen GraphPad PrismTM (GraphPad Software, Inc.) und Microcal(TM) Origin[®] (Microcal Software, Inc.).

Die elektronenmikroskopischen Proben werden durch Negativkontrastierung mit Uranylacetat vorbereitet. Die Untersuchungen wurden am Elektronenmikroskopischen Zentrum (EMZ) des Universitätsklinikums Jena am Transmissionselektronenmikroskop

Zeiss-CEM 902A (Auflösung: 0,6 nm) durchgeführt. Die Abbildungen werden mit Hilfe der TVIPS FastScann CCD-Kamera aufgenommen.

G.6 Bestimmung der inhibitorischen Aktivität am NMDA-Rezeptor

Der NMDA-Exzitotoxizitätassay wird mit wenigen Modifikationen nach Steinmetz et al. mit Hilfe des LDH-Tests durchgeführt [persönliche Mitteilung von Kai-Uwe Schmidtke; Steinmetz et al., 2002].

H Abkürzungsverzeichnis

A β	beta-Amyloid
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
APP	Amyloid-Precursor-Protein (Amyloid-Vorläufer-Protein)
ATC	Acetylthiocholin
BCh	Butyrylcholin
BChE	Butyrylcholinesterase
BTC	Butyrylthiocholin
CDCl ₃	deutერიertes Chloroform
d	Dublett
DAT	Dopamintransporter
dd	Dublett vom Dublett
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
[D ₆]-DMSO	deutერიertes Dimethylsulfoxid
dt	Dublett vom Triplet
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
eeAChE	Acetylcholinesterase isoliert aus <i>Electrophorus electricus</i> (Zittelaal)
equBChE	Butyrylcholinesterase isoliert aus Pferdeserum
FBS-AChE	Acetylcholinesterase isoliert aus Rinderserum
FM	Fließmittel
HFIP	Hexafluoroisopropanol
huAChE	human rekombinant gewonnene oder aus humanen Erythrozyten isolierte Acetylcholinesterase
huBChE	human rekombinant gewonnene oder aus humanen Serum isolierte Butyrylcholinesterase
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IR	Infrarot
<i>J</i>	Kopplungskonstante
LDH	Lactatdehydrogenase
m	Multiplet
MAO	Monoaminoxidase
mc	zentriertes Multiplet
MeOD	deutერიertes Methanol

MG	Molekulargewicht
MPP ⁺	1-Methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-tetrahydropyridin
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy-phenyl)-2-(4-sulfophenyl)- 2 <i>H</i> -tetrazolium
NMDA	<i>N</i> -Methyl- <i>D</i> -aspartat
NMDAR	<i>N</i> -Methyl- <i>D</i> -aspartat-Rezeptor
PAS	peripheric anionic site (periphere anionisches Bindungsstelle der AChE)
ppm	parts per million
q	Quartett
R _f	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Smp	Schmelzpunkt
t	Triplett
THT	Thioflavin T

I Literaturverzeichnis

Abou-Sleiman, P.M., Muqit, M.M., Wood, N.W.: Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* **2006**, 7, 207-219.

Agarwal, S.K., Saxena, A.K., Jain, P.C., Malviya, B., Chandra, H., Anand, N.: Studies on Beta-Carbolines - Synthesis of 2-Substituted, 3-Substituted and 6-Substituted 9H-Pyrindo[3,4-B]Indoles As Tubal Occluding Agents. *Indian J Chem Sect B* **1987**, 26, 757-760.

Akimoto, H., Okamura, K., Yui, M., Shioiri, T., Kuramoto, M., Kikugawa, Y., Yamada, S.I.: Amino-Acids and Peptides .13. New Approach to Biogenetic-Type, Asymmetric Synthesis of Indole and Isoquinoline Alkaloids by 1,3-Transfer of Asymmetry. *Chem Pharm Bull* **1974**, 22, 2614-2623.

Alzheimer Forschungsinitiative e.V.: www.alzheimer-forschung.de **2009**.

Atack, J.R., Perry, E.K., Bonham, J.R., Candy, J.M., Perry, R.H.: Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *J Neurochem* **1986**, 47, 263-277.

Ballard, C.G.: Advances in the treatment of Alzheimer's disease: benefits of dual cholinesterase inhibition. *Eur Neurol* **2002**, 47, 64-70.

Barger, G., Jacob, A., Madinaveitia, J.: Calycanthidine, a new simple indole alkaloid. *Recl Trav Chim Pays-Bas* **1938**, 57, 548-554.

Bartolini, M., Bertucci, C., Cavrini, V., Andrisano, V.: beta-Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem Pharmacol* **2003**, 65, 407-416.

Biron, E., Otis, F., Meillon, J.C., Robitaille, M., Lamothe, J., Van Hove, P., Cormier, M.E., Voyer, N.: Design, synthesis, and characterization of peptide nanostructures having ion channel activity. *Bioorg Med Chem* **2004**, 12, 1279-1290.

Bischler, A., Napieralski, B.: A new synthesis of isoquinoline. *Ber* **1893**, 26, 1903-1908.

Bobbitt, J.M., Willis, J.P.: Electrochemistry of Natural-Products .7. Oxidative Decarboxylation of Some "Tetrahydro-Beta-Carbolinecarboxylic Acids. *J Org Chem* **1980**, 45, 1978-1984.

Boeira, J.M., da Silva, J., Erdtmann, B., Henriques, J.A.P.: Genotoxic effects of the alkaloids harman and harmine assessed by comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells in vitro. *Pharmacol Toxicol* **2001**, 89, 287-294.

Bolognesi, M.L., Andrisano, V., Bartolini, M., Banzi, R., Melchiorre, C.: Propidium-based polyamine ligands as potent inhibitors of acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced amyloid-beta aggregation. *J Med Chem* **2005**, 48, 24-27.

Booth, R.G., Trevor, A., Singer, T.P., Castagnoli, N.: Studies on Semirigid Tricyclic Analogs of the Nigrostriatal Toxin 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine. *J Med Chem* **1989**, 32, 473-477.

BPI Rote Liste **2009**.

Braun, D., Langendorf, R.: Vitrigens. I - Synthesis and characterization of low molecular weight organic glasses. *J Prakt Chem /Chem-Ztg* **1999**, 341, 128-137.

Brufani, M., Filocamo, L.: Rational design of cholinesterase inhibitors in Cholinesterases and cholinesterase inhibitors, Giacobini, E., ed. *Martin Dunitz Ltd London* **2000**, 27-46.

Buck, K.J., Amara, S.G.: Chimeric dopamine-norepinephrine transporters delineate structural domains influencing selectivity for catecholamines and 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, 91, 12584-12588.

- Cao, R., Chen, Q., Hou, X., Chen, H., Guan, H., Ma, Y., Peng, W., Xu, A.: Synthesis, acute toxicities, and antitumor effects of novel 9-substituted beta-carboline derivatives. *Bioorg Med Chem* **2004**, *12*, 4613-4623.
- Carrier, P.R., Han, Y.F., Chow, E.S., Li, C.P., Wang, H., Lieu, T.X., Wong, H.S., Pang, Y.P.: Evaluation of short-tether bis-THA AChE inhibitors. A further test of the dual binding site hypothesis. *Bioorg Med Chem* **1999**, *7*, 351-357.
- Chen, W.S., Cocolas, G.H., Cavallito, C.J., Chai, K.J.: Potent reversible anticholinesterase agents. Bis- and mono-N-substituted benzoquinolinium halides. *J Med Chem* **1977**, *20*, 1617-1623.
- Cokugras, A.N.: Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Turk J Biochem* **2003**, *28*, 54-61.
- Collins, M.A., Neafsey, E.J.: Beta-Carboline Analogs of N-Methyl-4-Phenyl-1,2,5,6-Tetra-Hydropyridine (Mptp) - Endogenous Factors Underlying Idiopathic Parkinsonism. *Neurosci Lett* **1985**, *55*, 179-184.
- Collins, M.A., Neafsey, E.J., Matsubara, K., Cobuzzi, R.J., Jr., Rollema, H.: Indole-N-methylated beta-carbolinium ions as potential brain-bioactivated neurotoxins. *Brain Res* **1992**, *570*, 154-160.
- Cory, A.H., Owen, T.C., Bartrop, J.A., Cory, J.G.: Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun* **1991**, *3*, 207-212.
- Dale, H.H.: The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J Pharmacol* **1914**, *6*, 147-190.
- Darvesh, S., Hopkins, D.A., Geula, C.: Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci* **2003**, *4*, 131-138.
- Davis, G.C., Williams, A.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Caine, E.D., Reichert, C.M., Kopin, I.J.: Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* **1979**, *1*, 249-254.
- Dawson, V.L., Dawson, T.M., Bartley, D.A., Uhl, G.R., Snyder, S.H.: Mechanisms of Nitric-Oxide Mediated Neurotoxicity in Primary Brain Cultures. *J Neurosci* **1993**, *13*, 2651-2661.
- Dekhane, M., Dubois, L., Blanchet, G., Garrigue, H., Sentenacroumanou, H., Potier, P., Dodd, R.H.: N-2 Methylated Quaternary Derivatives of Beta-Carboline-3-Carboxylates Inhibit Acetylcholinesterase In-Vitro. *Bioorg Med Chem Lett* **1993**, *3*, 2831-2836.
- Di Francesco, C., Brodbeck, U.: Interaction of human red cell membrane acetylcholinesterase with phospholipids. *Biochim Biophys Acta* **1981**, *640*, 359-364.
- Diener, H.C., Putzki, N., eds.: Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. *Thieme Verlag Stuttgart* **2008**, *4. Auflage*.
- Drucker, G., Raikoff, K., Neafsey, E.J., Collins, M.A.: Dopamine Uptake Inhibitory Capacities of Beta-Carboline and 3,4-Dihydro-Beta-Carboline Analogs of N-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (Mptp) Oxidation-Products. *Brain Res* **1990**, *509*, 125-133.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M.: A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem Pharmacol* **1961**, *7*, 88-95.
- Erhard, M.H., Jungling, A., Schoneberg, T., Szinicz, L., Losch, U.: A homogeneous immunological detection system for soman using the in vitro protection of acetylcholinesterase by a monoclonal antibody. *Arch Toxicol* **1993**, *67*, 220-223.
- Fändrich, M.: Absolute correlation between lag time and growth rate in the spontaneous formation of several amyloid-like aggregates and fibrils. *J Mol Biol* **2007**, *365*, 1266-1270.
- Fang, L., Appenroth, D., Decker, M., Kiehnopf, M., Roegler, C., Deufel, T., Fleck, C., Peng, S., Zhang, Y., Lehmann, J.: Synthesis and biological evaluation of NO-donor-tacrine hybrids as hepatoprotective anti-Alzheimer drug candidates. *J Med Chem* **2008**, *51*, 713-716.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Förstermann, U., Starke, K., eds.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *Urban & Fischer Verlag München Jena* **2005**, *9. Auflage*.

Freedland, C.S., Mansbach, R.S.: Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. *Drug Alcohol Depend* **1999**, *54*, 183-194.

Gearhart, D.A., Collins, M.A., Lee, J.M., Neafsey, E.J.: Increased beta-carboline 9N-methyltransferase activity in the frontal cortex in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **2000**, *7*, 201-211.

Gearhart, D.A., Neafsey, E.J., Collins, M.A.: Phenylethanolamine N-methyltransferase has beta-carboline 2N-methyltransferase activity: hypothetical relevance to Parkinson's disease. *Neurochem Int* **2002**, *40*, 611-620.

Gergel, D., Cederbaum, A.I.: Interaction of nitric oxide with 2-thio-5-nitrobenzoic acid: Implications for the determination of free sulfhydryl groups by Ellman's reagent. *Arch Biochem Biophys* **1997**, *347*, 282-288.

Giacobini, E.: Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol Res* **2004**, *50*, 433-440.

Giros, B., Wang, Y.M., Suter, S., McLeskey, S.B., Pifl, C., Caron, M.G.: Delineation of discrete domains for substrate, cocaine, and tricyclic antidepressant interactions using chimeric dopamine-norepinephrine transporters. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 15985-15988.

Glennon, R.A., Dukat, M., Grella, B., Hong, S., Costantino, L., Teitler, M., Smith, C., Egan, C., Davis, K., Mattson, M.V.: Binding of beta-carbolines and related agents at serotonin (5-HT₂) and 5-HT_{1A}), dopamine (D₂) and benzodiazepine receptors. *Drug Alcohol Depend* **2000**, *60*, 121-132.

Gray, A.P., Platz, R.D., Chang, T.C.P., Leverone, T.R., Ferrick, D.A., Kramer, D.N.: Synthesis of Some Quaternary Ammonium Alkylating-Agents and Their Effects on Soman-Inhibited Acetylcholinesterase. *J Med Chem* **1985**, *28*, 111-116.

Gray, A.P., Spinner, E.E., Cavallito, C.J.: Bis Ammonium Salts - Derivatives of Some Carboline and Related Heterocyclic Bases. *J Am Chem Soc* **1954**, *76*, 2792-2797.

Greig, N.H., Utsuki, T., Ingram, D.K., Wang, Y., Pepeu, G., Scali, C., Yu, Q.S., Mamczarz, J., Holloway, H.W., Giordano, T., Chen, D.M., Furukawa, K., Sambamurti, K., Brossi, A., Lahiri, D.K.: Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer beta-amyloid peptide in rodent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 17213-17218.

Guillozet, A.L., Smiley, J.F., Mash, D.C., Mesulam, M.M.: Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Ann Neurol* **1997**, *42*, 909-918.

Hamann, J., Wernicke, C., Lehmann, J., Reichmann, H., Rommelspacher, H., Gille, G.: 9-Methyl-beta-carboline up-regulates the appearance of differentiated dopaminergic neurones in primary mesencephalic culture. *Neurochem Int* **2008**, *52*, 688-700.

Hannig, E., Schobess, B.: Carbazole derivatives. I. α,ω -Bis(N-carbazolyl)alkanes. Über Carbazolderivate. *Pharmaz Zentralhalle* **1963**, *102*, 500-502.

Harper, J.D., Lansbury, P.T., Jr.: Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem* **1997**, *66*, 385-407.

Heineke, D.: Zur Synthese und Pharmakologie von Liganden am Norharman-Rezeptor. *Dissertation Bonn* **1992**.

Herraiz, T., Chaparro, C.: Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: beta-carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *326*, 378-386.

Hestrin, S.: The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. *J Biol Chem* **1949**, *180*, 249-261.

Ho, B.T., Li, K.C., Walker, K.E., Tansey, L.W., Kralik, P.M., Mcisaac, W.M.: Inhibitors of Monoamine Oxidase .6. Effects of Substitution on Inhibitory Activity of 6 (Or 8)-Substituted Beta-Carbolines. *J Pharm Sci* **1970**, *59*, 1445-8.

Ho, B.T., Mcisaac, W.M., Tansey, L.W., Walker, K.E.: Inhibitors of Monoamine Oxidase .3. 9-Substituted-Beta-Carbolines. *J Pharm Sci* **1969**, *58*, 219-8.

Ho, B.T., Taylor, D., Walker, K.E., Mcisaac, W.M.: The mode of action of 6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline on brain serotonin. *Can J Biochem* **1973**, *51*, 482-485.

Ho, B.T., Walker, K.E.: 1,2,3,4-Tetrahydro-β-Carboline. *Org Synth* **1988**, *50-9*, 965-966.

Holmstedt, B.: Cholinesterase inhibitors: an introduction in Cholinesterases and cholinesterase inhibitors, Giacobini, E., ed. *Martin Dunitz Ltd London* **2000**, 1-8.

Holzgrabe, U., Kapkova, P., Alptuzun, V., Scheiber, J., Kugelmann, E.: Targeting acetylcholinesterase to treat neurodegeneration. *Expert Opin Ther Targets* **2007**, *11*, 161-179.

Holzner, J.H.: Arbeitsbuch Pathologie. *Urban & Schwarzenberg Verlag* **1989**, 5. Auflage.

Hortschansky, P., Schroeckh, V., Christopheit, T., Zandomenighi, G., Fandrich, M.: The aggregation kinetics of Alzheimer's beta-amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation. *Protein Sci* **2005**, *14*, 1753-1759.

Inestrosa, N.C., Alvarez, A., Dinamarca, M.C., Perez-Acle, T., Colombres, M.: Acetylcholinesterase-amyloid-beta-peptide interaction: effect of Congo Red and the role of the Wnt pathway. *Curr Alzheimer Res* **2005a**, *2*, 301-306.

Inestrosa, N.C., Alvarez, A., Dinamarca, M.C., Perez-Acle, T., Colombres, M.: Acetylcholinesterase-amyloid-beta-peptide interaction: effect of Congo Red and the role of the Wnt pathway. *Curr Alzheimer Res* **2005b**, *2*, 301-306.

Inestrosa, N.C., Alvarez, A., Perez, C.A., Moreno, R.D., Vicente, M., Linker, C., Casanueva, O.I., Soto, C., Garrido, J.: Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* **1996**, *16*, 881-891.

Irvine, G.B., El Agnaf, O.M., Shankar, G.M., Walsh, D.M.: Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mol Med* **2008**, *14*, 451-464.

Kapkova, P.: Biologische Untersuchungen zu Inhibitoren der Acetylcholinesterase und Erzeugung von neuen Leitstrukturen mittels "Random Chemistry". *Dissertation Würzburg* **2004**.

Kapkova, P., Stiefl, N., Surig, U., Engels, B., Baumann, K., Holzgrabe, U.: Synthesis, biological activity, and docking studies of new acetylcholinesterase inhibitors of the bispyridinium type. *Arch Pharm* **2003**, *336*, 523-540.

Klein, W.L.: A beta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* **2002**, *41*, 345-352.

Komulainen, H., Tuomisto, J., Airaksinen, M.M., Kari, I., Peura, P., Pollari, L.: Tetrahydro-β-carbolines and corresponding tryptamines: In vitro inhibition of serotonin, dopamine and noradrenaline uptake in rat brain synaptosomes. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* **1980**, *46*, 299-307.

Krebs, M.R.H., Bromley, E.H.C., Donald, A.M.: The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J Struct Biol* **2005**, *149*, 30-37.

Lee, A.W.M., Chan, W.H., Tao, Y., Lee, Y.K.: Chiral Acetylenic Sulfoxide in Enantioselective Synthesis of Tetrahydroisoquinoline and Tetrahydro-β-Carboline Alkaloids - Total Synthesis of (R)-(+)-Carnegine and (R)-(+)-Tetrahydroharman. *J Chem Soc, Perkin Trans 1* **1994**, 477-481.

Leonard, N.J., Elderfield, R.C.: Alstonia alkaloids. I. Degradation of alstonine to β-carboline bases and the reduction of tetrahydroalstonine with sodium and butyl alcohol. *J Org Chem* **1942**, *7*, 556-572.

Mahboobi, S., Wagner, W., Burgemeister, T.: Syntheses of (R_s)-Nazlinin and (S)-(-)-Nazlinin and (R_s)-6-Azacyclodeca[5,4-B]Indol-1-Amine and (+)-6-Azacyclodeca[5,4-B]Indol-1-Amine. *Arch Pharm* **1995**, *328*, 371-376.

Masson, P., Xie, W., Froment, M.T., Levitsky, V., Fortier, P.L., Albaret, C., Lockridge, O.: Interaction between the peripheral site residues of human butyrylcholinesterase, D70 and Y332, in binding and hydrolysis of substrates. *Biochim Biophys Acta* **1999**, *1433*, 281-293.

- Massoulie, J., Anselmet, A., Bon, S., Krejci, E., Legay, C., Morel, N., Simon, S.: Acetylcholinesterase: C-terminal domains, molecular forms and functional localization. *J Physiol Paris* **1998**, *92*, 183-190.
- Massoulie, J., Anselmet, A., Bon, S., Krejci, E., Legay, C., Morel, N., Simon, S.: The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. *Chem Biol Interact* **1999**, *119-120*, 29-42.
- Matsubara, K., Collins, M.A., Akane, A., Ikebuchi, J., Neafsey, E.J., Kagawa, M., Shiono, H.: Potential bioactivated neurotoxicants, N-methylated beta-carbolinium ions, are present in human brain. *Brain Res* **1993**, *610*, 90-96.
- Matsubara, K., Gonda, T., Sawada, H., Uezono, T., Kobayashi, Y., Kawamura, T., Ohtaki, K., Kimura, K., Akaike, A.: Endogenously occurring beta-carboline induces parkinsonism in nonprimate animals: a possible causative protoxin in idiopathic Parkinson's disease. *J Neurochem* **1998**, *70*, 727-735.
- Matsubara, K., Kobayashi, S., Kobayashi, Y., Yamashita, K., Koide, H., Hatta, M., Iwamoto, K., Tanaka, O., Kimura, K.: beta-Carbolinium cations, endogenous MPP+ analogs, in the lumbar cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Neurology* **1995**, *45*, 2240-2245.
- Mattson, M.P.: Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* **2004**, *430*, 631-639.
- Mattson, M.P., Chan, S.L.: Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium* **2003**, *34*, 385-397.
- Matveeva, I.A.: Action of dimebon on histamine receptors. *Farmakol Toksikol* **1983**, *46*, 27-29.
- Menshikov, G.P., Gurevich, E.L., Samsonova, G.A.: Issledovanie Alkaloidov Elaeagnus-Angustifolia - Stroenie Eleagnina. *Zh Obshch Khim* **1950**, *20*, 1927-1928.
- Michel, H.O.: An Electrometric Method for the Determination of Red Blood Cell and Plasma Cholinesterase Activity. *J Lab Clin Med* **1949**, *34*, 1564-1568.
- Milen, M., Hazai, L., Kolonits, P., Gömöry, A., Szantay, Cs., Fekete, J.: Preparation and separation of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline enantiomers by HPLC using a new derivatisation reagent. *J Liq Chromatogr* **2004**, *27*, 2921-2933.
- Millard, C.B., Broomfield, C.A.: A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. *Biochem Biophys Res Commun* **1992**, *189*, 1280-1286.
- Montenegro, M.F., Moral-Naranjo, M.T., Paez, d.I.C., Campoy, F.J., Munoz-Delgado, E., Vidal, C.J.: The level of aryl acylamidase activity displayed by human butyrylcholinesterase depends on its molecular distribution. *Chem Biol Interact* **2008**, *175*, 336-339.
- Munoz, F.J., Inestrosa, N.C.: Neurotoxicity of acetylcholinesterase amyloid beta-peptide aggregates is dependent on the type of A beta peptide and the AChE concentration present in the complexes. *Febs Lett* **1999**, *450*, 205-209.
- Musilek, K., Kuca, K., Jun, D., Dohnal, V., Dolezal, M.: Synthesis of the novel series of bispyridinium compounds bearing (E)-but-2-ene linker and evaluation of their reactivation activity against chlorpyrifos-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, *16*, 622-627.
- Nachmansohn, D., Lederer, E.: Sur la biochimie de la cholinestérase. Préparation de l'enzyme, rôle de groupements SH. *Bull Soc Chim Biol* **1939**, 797-808.
- Nachmansohn, D., Rothenberg, M.A.: Studies on Cholinesterase .1. on the Specificity of the Enzyme in Nerve Tissue. *J Biol Chem* **1945**, *158*, 653-666.
- Nagatsu, I., Ikemoto, K., Takeuchi, T., Arai, R., Karasawa, N., Fujii, T., Nagatsu, T.: Phenylethanolamine-N-methyltransferase - immunoreactive nerve terminals afferent to the mouse substantia nigra. *Neurosci Lett* **1998**, *245*, 41-44.
- Neumeyer, J.L., Zhang, A., Xiong, W.N., Gu, X.H., Hilbert, J.E., Knapp, B.I., Negus, S.S., Mello, N.K., Bidlack, J.M.: Design and synthesis of novel dimeric morphinan ligands for kappa and mu opioid receptors. *J Med Chem* **2003**, *46*, 5162-5170.

- Pachter, I.J., Mohrbacher, R.J., Zacharias, D.E.: Chemistry of Hortiamine and 6-Methoxyrhetsinine. *J Am Chem Soc* **1961**, *83*, 635.
- Pahkla, R., Zilmer, M., Kullisaar, T., Rago, L.: Comparison of the antioxidant activity of melatonin and pinoline in vitro. *J Pineal Res* **1998**, *24*, 96-101.
- Pang, Y.P., Quiram, P., Jelacic, T., Hong, F., Brimjojn, S.: Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase - Steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 23646-23649.
- Paoletti, P., Neyton, J.: NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* **2007**, *7*, 39-47.
- Park, T.H., Kwon, O.S., Park, S.Y., Han, E.S., Lee, C.S.: N-methylated beta-carbolines protect PC12 cells from cytotoxic effect of MPP+ by attenuation of mitochondrial membrane permeability change. *Neurosci Res* **2003**, *46*, 349-358.
- Payne, C.S., Saeed, M., Wolfe, A.D.: Ligand stabilization of cholinesterases. *Biochim Biophys Acta* **1989**, *999*, 46-51.
- Pictet, A., Spengler, T.: Über die Bildung von Isocholininderivaten durch Einwirkung von Methylal auf Phenylethylamin, Phenylalanin und Tyrosin. *Ber* **1911**, *44*, 950-954.
- Potter, L.T.: A radiometric microassay of acetylcholinesterase. *J Pharmacol Exp Ther* **1967**, *156*, 500-506.
- Ramsay, R.R., Singer, T.P.: Energy-Dependent Uptake of N-Methyl-4-Phenylpyridinium, the Neurotoxic Metabolite of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine, by Mitochondria. *J Biol Chem* **1986**, *261*, 7585-7587.
- Reed, D.J., Goto, K., Wang, C.H.: A direct radioisotopic assay for acetylcholinesterase. *Anal Biochem* **1966**, *16*, 59-64.
- Rocca, P., Marsais, F., Godard, A., Queguiner, G., Adams, L., Alo, B.: Carbolines .7. Anisidines, Convenient Tools to Synthesize Hydroxy-Beta-Carbolines. *J Heterocycl Chem* **1995**, *32*, 1171-1175.
- Rommelspacher, H., Meier-Henco, M., Smolka, M., Kloft, C.: The levels of norharman are high enough after smoking to affect monoamineoxidase B in platelets. *Eur J Pharmacol* **2002**, *441*, 115-125.
- Rommelspacher, H., Strauss, S.M., Rehse, K.: beta-Carbolines: a tool for investigating structure-activity relationships of the high-affinity uptake of serotonin, noradrenaline, dopamine, GABA and choline into a synaptosome-rich fraction of various regions from rat brain. *J Neurochem* **1978**, *30*, 1573-1578.
- Rothenberg, M.A., Nachmansohn, D.: Studies on Cholinesterase .3. Purification of the Enzyme from Electric Tissue by Fractional Ammonium Sulfate Precipitation. *J Biol Chem* **1947**, *168*, 223-231.
- Ruiz, A., Rocca, P., Marsais, F., Godard, A., Queguiner, G.: Pyridinium chloride: a new reagent for N-demethylation of N-methylazinium derivatives. *Tetrahedron Lett* **1997**, *38*, 6205-6208.
- Sayre, L.M., Wang, F.J., Arora, P.K., Riachi, N.J., Harik, S.I., Hoppel, C.L.: Dopaminergic neurotoxicity in vivo and inhibition of mitochondrial respiration in vitro by possible endogenous pyridinium-like substances. *J Neurochem* **1991**, *57*, 2106-2115.
- Schneider, A., Mandelkow, E.: Tau-based treatment strategies in neurodegenerative diseases. *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 443-457.
- Schott, Y.: β -Carboline als potentielle endogene Neurotoxine bei der Parkinson- und Alzheimererkrankung - Synthese und Inhibition der Acetyl- und Butyrylcholinesterase -. *Diplomarbeit Jena* **2005**.
- Schott, Y., Decker, M., Rommelspacher, H., Lehmann, J.: 6-Hydroxy- and 6-methoxy-beta-carbolines as acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, *16*, 5840-5843.
- Sennhenn, P., Mantoulidis, A., Treu, M., Tontsch-Grunt, U., Spevak, W., McConnell, D., Schoop, A., Brueckner, R., Jacobi, A., Guertler, U., Schnapp, G., Klein, C., Himmelsbach, F., Pautsch, A., Betzemeier, B., Herfurth, L., Mack, J., Wiedenmayer, D., Bader, G., und Reiser, U. *Preparation of α -carbolines as CDK1 inhibitors*. 2006[WO 2006131552].

- Shevtsova, E.F., Kireeva, E.G., Bachurin, S.O.: [Mitochondria as the target for neuroprotectors]. *Vestn Ross Akad Med Nauk* **2005**, 13-17.
- Silman, I., Sussman, J.L.: Structural studies on acetylcholinesterase in Cholinesterases and cholinesterase inhibitors, Giacobini, E., ed. *Martin Dunitz Ltd London* **2000**, 9-26.
- Sisodia, S.S., George-Hyslop, P.H.: gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci* **2002**, 3, 281-290.
- Skovronsky, D.M., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q.: Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu Rev Pathol* **2006**, 1, 151-170.
- Soreq, H., Seidman, S.: Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nature Rev Neurosci* **2001**, 2, 294-302.
- Speitel, R., Schittler, E.: The ring structure of yohimbine.III.Acylation of norharmane. *Helv Chim Acta* **1949**, 32, 860-865.
- Spenser, I.D.: The Structure of N Beta-Alkyl-Beta-Carboline Anhydro-Bases. *J Chem Soc* **1956**, 3659-3663.
- Squires, P.E., Hills, C.E., Rogers, G.J., Garland, P., Farley, S.R., Morgan, N.G.: The putative imidazoline receptor agonist, harmane, promotes intracellular calcium mobilisation in pancreatic beta-cells. *Eur J Pharmacol* **2004**, 501, 31-39.
- Steinmetz, R.D., Fava, E., Nicotera, P., Steinhilber, D.: A simple cell line based in vitro test system for N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor ligands. *J Neurosci Methods* **2002**, 113, 99-110.
- Stevens, A., Lowe, J., eds.: Pathologie. *Ullstein Mosby GmbH & Co KG* **1997**.
- Stine, W.B., Jr., Dahlgren, K.N., Krafft, G.A., LaDu, M.J.: In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem* **2003**, 278, 11612-11622.
- Sussman, J.L., Harel, M., Frolov, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., Silman, I.: Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **1991**, 253, 872-879.
- Taborsky, R.G., Delvigs, P., Page, I.H., Crawford, N.: Synthesis and Preliminary Pharmacology of Some 1-Methylindoles. *J Med Chem* **1965**, 8, 460-&.
- Tanaka, T., Hayasaka, T., Saito, K., Narita, S.I.: Synthesis of 5,6,7,8,9,14-Hexahydrodibenz[D,G]Azecine Derivatives. *J Pharm Soc Japan* **1978**, 98, 649-652.
- Torres, G.E., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G.: Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci* **2003**, 4, 13-25.
- Velan, B., Kronman, C., Ordentlich, A., Flashner, Y., Leitner, M., Cohen, S., Shafferman, A.: N-glycosylation of human acetylcholinesterase: effects on activity, stability and biosynthesis. *Biochem J* **1993**, 296 (Pt 3), 649-656.
- von Bohlen und Halbach, O.: Animal Models of Parkinson's Disease. *Neurodegenerative Dis* **2005**, 2, 313-320.
- Wange, J.: Synthese, Racemattrennung und pharmakologische Prüfung neuer chiraler Fomocainderivate. *Dissertation Jena* **2005**.
- Wernicke, C., Schott, Y., Enzensperger, C., Schulze, G., Lehmann, J., Rommelspacher, H.: Cytotoxicity of beta-carbolines in dopamine transporter expressing cells: structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* **2007**, 74, 1065-1077.
- Werning, C., ed: Medizin für Apotheker.Ein Handbuch mit Grundwissen für die Praxis. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart* **1997**, 2.Auflage.
- Whaley, W.M., Govindachari, T.R.: The Pictet-Spengler Synthesis of Tetrahydroisoquinolines and Related Compounds. *Org React* **1951**, 6, 151-190.

Wrona, M.Z., Waskiewicz, J., Han, Q.P., Han, J.L., Li, H., Dryhurst, G.: Putative oxidative metabolites of 1-methyl-6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline of potential relevance to the addictive and neurodegenerative consequences of ethanol abuse. *Alcohol* **1997**, *14*, 213-223.

Yakuphanoglu, F., Liu, H.T., Xu, J.K.: Electrical, optical, thermoelectric power, and dielectrical properties of organic semiconductor poly(1,12-bis(carbazolyl) dodecane) film. *J Phys Chem B* **2007**, *111*, 7535-7540.

Yamada, K., Takeda, M., Iwakuma, T.: Asymmetric Reduction of Cyclic Imines with Chiral Sodium Acyloxyborohydrides. *J Chem Soc, Perkin Trans 1* **1983**, 265-270.

Zhukov, V.N., Orekhov, S.N.: Tranquilizing Properties of Some Beta-Carbolines and Their Possible Role in the Control of Alcohol-Consumption. *Bulletin Exp Biol Med* **1983**, *95*, 820-821.

Persönliche Daten

Name: Yvonne Rook geb. Schott
geboren am: 13.03.1981 in Sonneberg / Thüringen
Familienstand: verheiratet

Schulischer Werdegang

1987 – 1991 Grundschule Thomas-Münzer in Sonneberg / Thüringen
1991 – 1999 1. Staatliches Gymnasium Sonneberg
1999 Erhalt des Abiturs

Studium

10.1999 - 03.2004 Pharmazie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
08.2003 - 12.2003 Auslandssemester an der University of Kuopio / Finnland;
Biotechnologisches Forschungsprojekt
09.2005 Approbation

Praktische Tätigkeiten

02.2005 – 07.2005 Apotheke im Kaufland, Jena

Wissenschaftliche Tätigkeiten

05.2004 – 01.2005 Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena,
wissenschaftliche Hilfskraft, Anfertigung einer Diplomarbeit
10.2005 – 03.2006 Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena,
wissenschaftliche Hilfskraft
seit 01.04.2006 Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena,
wissenschaftlicher Mitarbeiter

Berufliche Tätigkeiten

seit 10.2005 Nebenberufliche Tätigkeit während der Promotion in der Apotheke
im Kaufland, Jena

Originalarbeiten

β -Carboline als potentielle endogene Neurotoxine bei der Parkinson- und Alzheimererkrankung – Synthese und Inhibition der Acetyl- und Butyrylcholinesterase –

Schott, Y.

Diplomarbeit, 2005

6-Hydroxy- and 6-methoxy- β -carbolines as acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors

Schott, Y.; Decker, M.; Rommelspacher, H.; Lehmann, J.

Bioorg. Med. Chem. Let., 2006, 18, 4528-4533

Cytotoxicity of β -carbolines in dopamine transporter expressing cells: structure-activity relationships

Wernicke, C.; **Schott, Y.**; Enzensperger, C.; Schulze, G.; Lehmann, J.; Rommelspacher, H.

Biochem. Pharmacol., 2007, 16, 5840-5843

Poster

β -Carboline as potential drugs in neurodegenerative diseases

Schott, Y.; Enzensperger, C.; Wernicke, C.; Rommelspacher, H.; Lehmann, J.

DPhG-Jahrestagung, Mainz, 2005, C134, book of abstracts S. 131

Bivalency enhances the cholinesterase inhibitor activity of β -carbolinium derivatives

Schott, Y.; Lehmann, J.

DPhG-Jahrestagung, Erlangen, 2007, A05, book of abstracts S. 84

Cytotoxicity of β -carbolines in dopamine transporter expressing cells: Structure activity relationships

Wernicke, C.; **Schott, Y.**; Enzensperger, C.; Schulze, G.; Lehmann, J.; Rommelspacher, H.

DPhG-Jahrestagung, Erlangen, 2007, A33, book of abstracts S. 91

Vorträge

β -Carboline als potentielle Arzneistoffe oder endogene Toxine bei neurodegenerativen Erkrankungen

Schott, Y.; Enzensperger, C.; Wernicke, C.; Rommelspacher, H.; Decker, M.; Lehmann, J.;

Doktorandentagung der DPhG, Heroldsberg, 2006

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich,

daß mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist,

daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe,

daß ich weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen habe, noch Dritte unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen im Zusammenhang mit dem Inhalt meiner Dissertation von mir erhalten haben und

daß ich die vorliegende Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung und keine weitere Dissertation an einer anderen Hochschule eingereicht habe.

Jena, 2. Juli 2009