

Synthese und biologische Evaluierung von Zimtsäure-Derivaten

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II

Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Josephine Michelle Gießel

geb. am 01. März 1991 in Magdeburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. René Csuk (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
2. Prof. Dr. Danina Muntean (Victor Babes University of Medicine and Pharmacy Timisoara)

Halle (Saale), 03. November 2019

Datum der Verteidigung: 06. Februar 2020

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2015 bis November 2019 am Institut für Chemie im Bereich der Organischen Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Arbeitskreis von Prof. Dr. René Csuk angefertigt. Die Dissertation wurde in kumulativer Form verfasst und die zugrundeliegenden Forschungsergebnisse wurden bereits in international anerkannten Fachzeitschriften publiziert.

Danksagung

Für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit durchführen zu dürfen, möchte ich meinen Doktorvater, Prof. Dr. René Csuk von Herzen danken. Vor allem die Weiterführung des ursprünglichen Themas nach eigenen Ideen gestalten zu dürfen, machten diese Arbeit zu meiner Arbeit. Ich danke Prof. Csuk auch für die stets sehr gute Zusammenarbeit bei Fragen und Problemen und für den gegebenen Freiraum.

Bei der Arbeitsgruppe möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima bedanken. Bei Isabell Wiengarn bedanke ich mich für die Durchführung einiger Experimente und die schöne Laborzeit im Rahmen ihrer Bachelorarbeit. Bei Mathias Kalina, Immo Serbian und Tim Kohlmann möchte ich mich für die alltäglichen Mittagpausen und großartigen Gespräche bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Dr. Schäfer, welche immer ein offenes Ohr für Probleme bei Synthese, Extraktion und Aufreinigung hatte. Herrn Dr. Ströhl und dem gesamten NMR-Team danke ich für die zügige Aufnahme von unzähligen NMR-Spektren und die Unterstützung bei Sonderaufnahmen zur Strukturaufklärung. Für die Messung von einer Vielzahl von ESI-MS-Spektren und deren Auswertung, sowie die Unterstützung bei der Aufklärung der Dimerstrukturen, danke ich Herrn Dr. Kluge.

Frau Simon danke ich für die Messung von IR-, UV-Vis-Spektren und Drehwerten. Für die enzymatischen und zytotoxischen Untersuchungen, durchgeführt wurden von Frau Loesche und Frau Hoenke, bedanke ich mich, da diese einen wichtigen Teil meiner Arbeit darstellen.

Für die Finanzierung dieser Promotionsarbeit danke ich dem Studienförderwerk Klaus Murmann von der Stiftung der Deutschen Wirtschaft.

Da in einer solchen Zeit immer für genug Ausgleich gesorgt werden muss und Unterstützung beim Durchhalten unabdingbar ist, möchte ich vor allem bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken. Es gab in den letzten vier Jahren Ereignisse und Probleme, die ich ohne euch nicht so gut hätte bewältigen können. Danke, dass ihr immer für mich da wart und seid!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Pathologische Betrachtung von Morbus Alzheimer	1
1.2. Therapiemöglichkeiten von Morbus Alzheimer	2
1.3. Vom Indanon zur Zimtsäure	3
1.4. Zimtsäuren.....	4
1.5. Oleuropein.....	7
2. Zielstellung	9
3. Forschungsergebnisse – Zusammenfassung und Einordnung.....	10
3.1. Einführung des SRB-Assays	10
3.2. Einführung der enzymatischen Untersuchung.....	11
3.3. Indanon-Analoga und ihre potentielle pharmakologische Wirkung	12
3.4. Stabile Anhydride als potentielle Cholinesterase-Inhibitoren	15
3.5. Cyclopropane als Duftstoffe	16
3.6. CAPE-Derivate und ihre potentiellen inhibitorischen Eigenschaften	17
3.7. Photodimere und ihre potentiellen pharmakologischen Eigenschaften	18
3.8. Die Alternative für die Gewinnung von Oleuropein	19
4. Zusammenfassung	21
5. Literaturverzeichnis.....	23
6. Abkürzungsverzeichnis	29
7. Abbildungsverzeichnis.....	30
8. Tabellenverzeichnis.....	31
Anhang.....	I
Publikationen	I
Manuskript M1.....	I
Publikation P1	II
Publikation P2	III
Publikation P3	IV
Publikation P4	V

Publikation P5	VI
<i>Lebenslauf</i>	<i>VII</i>
<i>Publikationsliste</i>	<i>VIII</i>
<i>Selbstständigkeitserklärung.....</i>	<i>IX</i>

1. Einleitung

Seit Jahrzehnten leiden Menschen vermehrt an neurodegenerativen Krankheiten. Eine dieser Krankheiten ist Morbus Alzheimer, die häufigste und bekannteste der Demenzerkrankungen. Allein in Deutschland leben mehr als 1.6 Millionen Menschen mit Demenz und jährlich gibt es 300.000 Neuerkrankungen.^[1] Bei Prognosen zu unseren demografischen Entwicklungen ergibt sich damit ein fortwährender Anstieg an Patienten, so dass von bis zu 3 Millionen Erkrankten im Jahr 2050 ausgegangen wird. Das Fatale an neurodegenerativen Krankheiten ist, dass es bisher keine Möglichkeit der Heilung gibt, da langlebige Nervenzellen sich nicht oder nur schwer regenerieren können.^[2] Dies zeigt deutlich, dass in der Prävention und Heilung von Alzheimer noch ein weiter Weg zu beschreiten ist. Der Weg der Prävention setzt Kenntnisse über die Entstehung der Krankheit und deren Ursachen voraus. Neueste Studien erklären einen Zusammenhang zwischen einem gesunden Lebensstil mit viel Bewegung sowie ausgewogener Ernährung und sinkendem Erkrankungszahlen.^[1] Allerdings ist dies keine Garantie für eine Nichterkrankung und ohne eine allumfängliche Forschung, ist es beinahe unmöglich präventive Maßnahmen zu ergreifen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin eine Heilung der Krankheit zu finden. Derzeitige Therapieansätze können nur die Symptome der Krankheit lindern und ein Voranschreiten verzögern; eine Heilung ist derzeit nicht möglich.^[3] Ein wichtiger Aspekt einer erfolgreichen Therapie ist, die anatomischen Veränderungen zu erkennen und die physischen und psychischen Folgen nicht nur zu unterdrücken, sondern einzudämmen.

1.1. Pathologische Betrachtung von Morbus Alzheimer

Durch Schädigung des Nervensystems verlieren Alzheimer Patienten nach und nach ihre kognitiven Fähigkeiten. Bisweilen konnten für Morbus Alzheimer verschiedene physische Veränderungen im Gehirn, deren Ursachen noch nicht endgültig aufgeklärt sind, gefunden werden. Eine der Hauptursachen für Schäden im Hippocampus der Großhirnrinde sind unlösliche, fibrillare Plaques, die aus falsch gefalteten Beta-Amyloid-Peptiden (A β) mit einer Länge von 42 Aminosäuren aufgebaut sind.^[4,5] Die Akkumulationen der unlöslichen A β 1-42-Plaques wirken toxisch auf Nervenzellen.^[6] Dabei ist noch nicht gänzlich geklärt, welcher Mechanismus zu Grunde liegt. Es wird vermutet, dass die A β - Aggregationen auf die Nervenzellen membranschädigend wirken und sowohl die Transmembranproteine wie p-Typ APTasen sowie Glukose- und Glutamattransporter hemmt. Dies führt zu einem Übermaß an Calcium-Ionen und damit zu Beeinträchtigung der Mitochondrien in den Zellen.^[7,8] Neben A β -Plaques gibt es im zentralen Nervensystem Bindungsproteine, die *Tau*-Proteine.^[9] Diese sind für die zelluläre Architektur und den axonalen Transport verantwortlich.^[10-12] Bei der Zusammenlagerung von hyperphosphorylierten *Tau*-Proteinen zu intrazellulären Aggregationen oder Oligomeren, bilden sich unlösliche neurofibrillare Bündel (NFTs), die eine synaptische Dysfunktion und die Einschränkung des axonalen Transportes zur Folge

haben.^[13,14] Somit wird das Nervensystem geschädigt und bis zur Unfähigkeit eingeschränkt, wodurch eine Kaskade an Folgeerscheinungen beginnt, an welchem die Patienten schlussendlich versterben.^[15]

1.2. Therapiemöglichkeiten von Morbus Alzheimer

Um kognitive Fähigkeiten zu besitzen, wird ein funktionierendes Reiz-Leit-System benötigt. Externe und interne Reize werden von den jeweiligen Sinnesorganen aufgenommen und über sensorische Nervenzellen zum Gehirn geleitet. Dort wird die Information verarbeitet und eine entsprechende Reaktion an die Körperteile via motorische Nervenbahnen ausgesandt. Dabei muss der synaptische Spalt zwischen den einzelnen Nervenzellen überwunden werden. Dafür ist neben anderen der Neurotransmitter Acetylcholin verantwortlich. Durch dessen Freisetzung in den synaptischen Spalt wird der Reiz an die folgende Zelle übertragen. Während, aber auch im Anschluss an diesen Vorgang wird Acetylcholin entweder durch das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) abgebaut oder von der präsynaptischen Membran erneut in Vesikeln aufgenommen. Da Alzheimer-Patienten einen stark reduzierten Acetylcholin-Gehalt besitzen, ist ein Therapieansatz, den hydrolytischen Abbau durch Inhibierung von AChE zu unterbinden und die Konzentration von Acetylcholin im synaptischen Spalt zu erhöhen. Als Folge bleibt der Gehalt an Neurotransmittern stabil. Sehr gut bekannte AChE-Inhibitoren sind Tacrin, Galantamin, Rivastigmin und Donepezil (Abbildung 1).

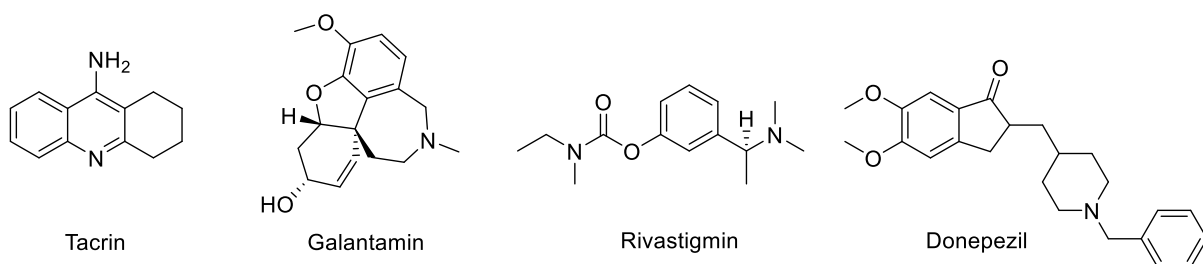


Abbildung 1: Die am meisten verwendeten Wirkstoffe zur Bekämpfung von Alzheimer.

Die vier gezeigten Substanzen können in den frühen und mittleren Alzheimer-Stadien bewirken, dass der Gehalt an Acetylcholin im Gehirn verlangsamt abnimmt. In späteren Stadien, welche mit einem rapiden Abfall von Acetylcholin einhergehen, kann diese Therapie keine Verzögerung des Vorschreitens von AD bewirken.^[16] Allerdings wurden Tacrin-Präparate in den 90er Jahren vom Markt genommen, da es hepatotoxische Eigenschaften aufweist.^[17] Heutige Therapieansätze konzentrieren sich auf Präparate, die neben AChE auch die Butyrylcholinesterase (BChE) hemmen können. BChE hydrolysiert nicht nur Acetylcholin, sondern begünstigt außerdem, dass sich A β -Plaques bilden können.^[18] Da im Verlauf der Krankheit ein Anstieg an Plaques einen erhöhten Ausfall von Nervenzellen bewirkt, ist es wichtig durch Inhibierung von BChE diesem Prozess entgegen zu wirken. Für die multifunktionellen Anwendungen werden vor allem weiterentwickelte Analoge der oben

beschriebenen Substanzen verwendet.^[3] Auch wir haben uns an diesen Leitstrukturen orientiert um neue Verbindungen zu entwickeln, die für die Alzheimer-Therapie in Frage kommen. Dabei haben wir uns über Indanon-Derivate, welche dem Donepezil ähneln, der Naturstoffklasse der Zimtsäuren genähert.

1.3. Vom Indanon zur Zimtsäure

Donepezil, welches bereits erfolgreich in der Alzheimertherapie eingesetzt wird, gilt auf Grund der bekannten Struktur-Wirkungs-Beziehung als Leitstruktur. Anhand der gegebenen Struktur können Analoga hergestellt werden. Über weitere biologische Betrachtungen kann festgestellt werden, welche weiteren Strukturmerkmale biologische Effekte hervorrufen und in welcher Kombination. In der vorliegenden Arbeit wurden neue Leitstrukturen untersucht. Dabei wurde bei den Strukturanaloga vom Donepezil ausgegangen, den Indanonamiden (Abbildung 2).

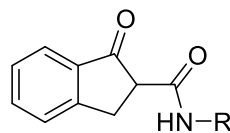


Abbildung 2: Strukturanalogon vom Donepezil – das Indanonamid.

1-Indanon ist ein Grundbaustein vieler Naturstoffe. Seit 1926 wird es auf den verschiedensten Wegen hergestellt und auf seine biologischen Eigenschaften untersucht.^[19] Ebenfalls rückten durch diese Untersuchungen strukturelle Analoga in den Fokus der Wissenschaft und es wurden antivirale und antibakterielle^[20] sowie antikanzerogene Derivate^[21] gefunden. Neben diesen konnten insektizide, antifungale und herbizide^[22] Substanzen sowie Arzneimittel gegen die Bekämpfung von Hepatitis C^[23,24] entdeckt werden. Die Arbeiten von Petrignet *et al.*^[25] führten zu Indanon-Derivate, welche sowohl kardiovaskuläre Eigenschaften als auch Wirkung gegen Alzheimer besitzen. Wie Koca *et al.*^[26] beschrieben, weisen aromatische Indanonamide IC₅₀ – Werte um 1 µM im Ellman´s Test gegen Butyrylcholinesterase auf. Damit sind sie durch die stärkere Inhibierung der BChE potentielle BChE-Inhibitoren. Da Alkylamide des Indanons bisher unbekannt waren, sind sie von großem Interesse. Sie wurden analog zur Synthese der Koca´s Derivate zugänglich gemacht und auf ihre biologische Aktivität überprüft.

Isatine sind Strukturanaloga des 1-Indanons, welche zur Gruppe der Indigoide gehören. In Abbildung 3 sind neben Isatin, das 5-Brom- und das 5,7-Dibrom-isatin, sowie die Grundstruktur des Isatin-3-oxims dargestellt.

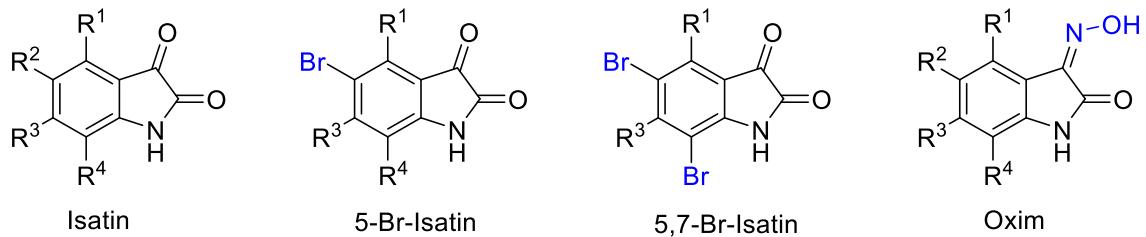


Abbildung 3: Grundgerüste der synthetisierten Isatin-Derivate.

Diese Verbindungen zeichnen sich durch ihre Farbigkeit aus und werden vor allem in der Kolorimetrie eingesetzt. Allerdings konnten auch einige biologische Aktivitäten, wie antikanzerogen^[27], sowie eine inhibitorische Wirkung auf verschiedene Kinasen (Bsp. GSK-3)^[28] und Carboxylesterasen^[29] nachgewiesen werden. Vor allem letztere Aktivitäten weisen auf mögliche inhibitorische Eigenschaften der Isatine bezüglich der Cholinesterasen hin, da diese ebenfalls Esterasen sind und damit ähnliche Mechanismen zu Grunde liegen. Isatin wurde lange Zeit aus Indigo durch Oxidation hergestellt. Neben der Isolation aus zum Beispiel Färberwaid (*Isatis tinctoria*), von dem es auch den Namen trägt, gibt es verschiedene synthetische Routen. Adolf Baeyer entwickelte unter anderem eine Totalsynthese^[30,31], ausgehend von *o*-Nitrozimtsäure^[32] und 2-Nitrobenzaldehyd^[33]. Später ersetzte das Verfahren von Sandmeyer^[34] die früheren Verfahren. Da Isatin und vor allem seine mehrfach substituierten Derivate weitestgehend unbekannt sind, eröffnen sie ein neues Feld in der Alzheimer Forschung.

Während der Herstellung der zwei genannten Strukturklassen rückten ebenfalls deren Edukte in den Fokus. Damit bilden Phenylpropanoide den Grundstein für weiterführende Forschung und biologische Aktivitätsbestimmung.

1.4. Zimtsäuren

Ein Großteil der natürlich vorkommenden Aromaten und Phenole gehört der Klasse der sekundären Pflanzenstoffe – den Phenylpropanoiden – an. Strukturelle Hauptmerkmale sind ein aromatisches System, welches eine Propylkette trägt. Ein sehr bekannter Vertreter ist die Zimtsäure, die den Ausgangspunkt unserer Forschung darstellt. Zimtsäure ist ein wichtiger Bestandteil des Zimtes, welcher seit Jahrtausenden vor allem für religiöse Riten als Räuchermittel und vorrangig im asiatischen Raum als Gewürz verwendet wird. Neben diesen Anwendungen wird Zimt seit der Antike nachgesagt, eine heilende Wirkung bei Husten, Schnupfen, Magenproblemen und Hämorrhoiden zu haben^[35,36]. Heutzutage wird kontrovers diskutiert, ob Zimt im Frühstadium von *Diabetes mellitus* eine blutzuckersenkende Wirkung hat.^[37–39] Da Zimt eine Mischung aus vielen einzelnen Substanzen, unter anderem Cumarin, Zimtaldehyd und Zimtsäure ist, ist es notwendig zu ermitteln, welcher dieser Bestandteile biologische Aktivitäten aufweist. Wie bereits bekannt, gibt es Zimtarten, die einen hohen Anteil an Cumarin aufweisen, welches bei übermäßigem Verzehr Kopfschmerzen und

Unverträglichkeiten auslösen kann. Bisher gilt die Zimtsäure als unbedenklich und unser Ziel war es, herauszufinden, ob Derivate der Zimtsäure ebenfalls biologische Aktivitäten hinsichtlich einer Cholinesterase-Inhibition aufweisen.

Bei der Betrachtung der Grundstruktur der Zimtsäure (Abbildung 4) fällt auf, dass es drei funktionelle Gruppen gibt, die modifiziert werden können.

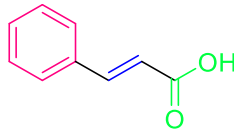


Abbildung 4: Zimtsäure-Grundgerüst mit drei Varianten der Substitution.

Die Substitution am aromatischen Ring (Abbildung 4, pink) ist vielfältig möglich und synthetisch von geringem Aufwand. Um am Ring modifizierte Zimtsäuren zu erhalten, werden bei der Knoevenagel-Kondensation^[40] als Edukt entsprechend substituierte Benzaldehyde verwendet. Als Beispiel kann der häufig eingesetzte 3,4-Dimethoxybenzaldehyd genannt werden. Mit diesem läuft die Kondensation mit Malonsäure in sehr guten Ausbeuten ab. Die Reaktivität und damit die Ausbeute werden direkt vom Substituenten beeinflusst. Elektronenziehende oder -schiebende Gruppen bewirken induktive und mesomere Effekte und beeinflussen die Größe der Partialladung der Carbonylgruppe des Aldehyds, so dass die Aktivität für die Kondensation zu oder abnimmt. Um auch den Einfluss auf die biologischen Tests der unterschiedlichen Gruppen zu finden, wurden zahlreiche Modifikationen vorgenommen.

Eine weitere Modifikation der Zimtsäure kann an der Doppelbindung (Abbildung 4, blau) durchgeführt werden. Durch katalytische Hydrierung wird die Doppelbindung zur Einfachbindung reduziert (Abbildung 5, I).^[41] Werden andere Reaktionsbedingungen gewählt, wie die von Simmons und Smith^[42,43] ist es möglich, mittels eines Carbenoids an der Doppelbindung einen Cyclopropan-Ring (Abbildung 5, II) einzuführen.

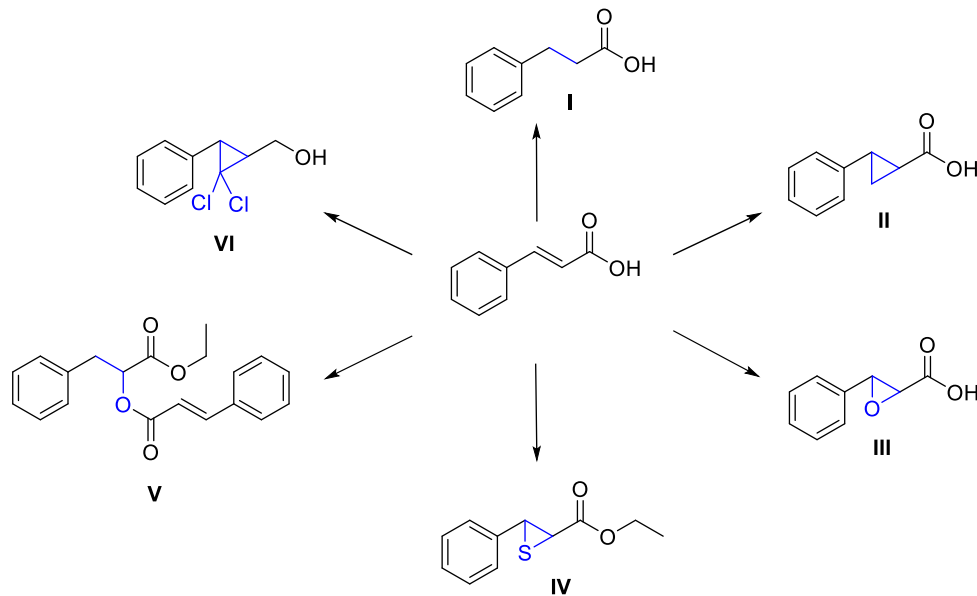


Abbildung 5: Durchgeführte Doppelbindungssubstitutionen.

Als weitere Variante kann ein Glycidester (Abbildung 5, III) synthetisiert werden. Dabei wird entsprechend substituierter Benzaldehyd unter Basenkatalyse mit Chloressigsäureethylester zur Reaktion gebracht. Besonders bewährt hat sich dabei, diese Mischung zu frisch vorbereitetem Natriumethanolat bei -10 °C zuzugeben.^[44] Das Epoxid dient wiederum als Ausgangspunkt für weitere Substanzen – das Thiiran (Abbildung 5, IV)^[45] und Rosmarinsäure-Derivate (Abbildung 5, V)^[46], welche durch ein zum Alkohol geöffnetes Epoxid mit einem zweiten Zimtsäure-Rest gekuppelt^[47] werden kann. Eine ebenfalls bisher unbekannte Möglichkeit besteht darin, ein halogeniertes Cyclopropan^[48] an Zimtalkohol zu addieren.

Um die Carboxylgruppe der Zimtsäure (Abbildung 4, grün) zu verändern, wird neben der Reduktion zum Alkohol, vor allem die Veresterung mit Alkoholen verwendet. Die Länge der Ester entscheidet möglicherweise über die biologischen Eigenschaften. Häufig als Schutzgruppe werden Methyl-, Ethyl- und Benzylester angewendet. Von großem Interesse sind zurzeit auch 2-Phenylethylester, da für Kaffeesäurephenylethylester (*englisch*: CAPE) und seinen Derivate einige Wirksamkeit in den *in vitro* Tests gegen Alzheimer und Krebs nachgewiesen wurden^[49–53]. Eine weitere Möglichkeit kann in der Verwendung von Cholin-Estern gefunden werden. Da diese dem Acetylcholin durch die Ammoniumgruppe sehr ähnlich sind, kann vermutet werden, dass im Bereich der Inhibierung der Acetylcholinesterase Erfolge verzeichnet werden. Durch die Ähnlichkeit sollten Probleme, wie schlechte Löslichkeit in den im Ellman's Test vorhandenen Bedingungen unterbunden werden und auch das Binden an das aktive Zentrum der Enzytasche müsste gewährleistet sein.

Neben den jeweiligen einzelnen Substituierungen, kann auch eine Kombination von allen drei Varianten durchgeführt werden. Durch Verwendung eines modularen Baukastensystems wurde eine kombinatorische Bibliothek erstellt. Dadurch können eventuell weitere Struktur-

Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden. Um die Bibliothek noch auszuweiten, wurden zum einen symmetrische Dimere über lichtinduzierte Cyclobutan-Synthese hergestellt.

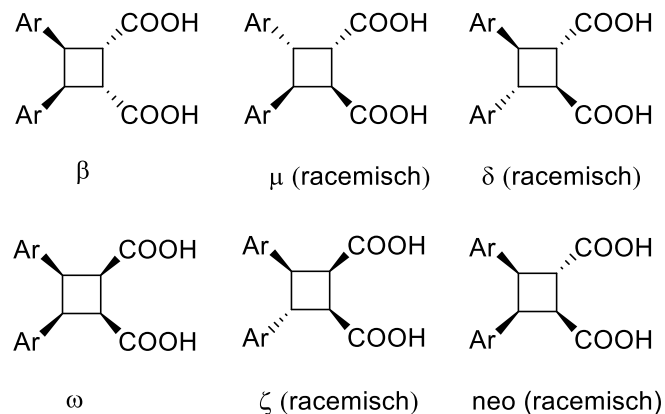


Abbildung 6: Isomere der Truxinsäuren.^[54,55]

Durch die Verwendung einer photo-induzierten Reaktion können Homodimere hergestellt werden, die durch thermische Verfahren nicht erhalten werden können.^[56,57] Bei dieser Cyclisierung ist es ebenfalls interessant zu erfahren, ob eines der sechs möglichen Isomeren bevorzugt hergestellt wird. Somit eröffnet sich ein Weg zu unbekanntem und biologisch interessanten Molekülen. Truxill- und Truxinsäuren repräsentieren eine Klasse von sekundären Metaboliten, welche durch eine [2+2]-Cyclodimerisierung von Phenylpropensäuren entstehen. In früheren Untersuchungen konnten bereits biologisch aktive Substanzen aus dieser Klasse gefunden werden.^[58] Truxinsäuren sind von biologischer Wichtigkeit, weil sie die Verdaulichkeit von Polysacchariden und deren biologische Abbaubarkeit verbessern. Die Dimerisierung kann mit vielfältigen Substituenten am aromatischen Ring und der Carboxylgruppe durchgeführt werden. Auf Grund der Reaktionsführung von Du *et al.*^[59] und den darin verwendeten Aminzusatz ist es von Vorteil eine durch Ester geschützte Carboxylgruppe zu verwenden. Für die genannten Reaktionen wird ein Photokatalysator benötigt, welcher sich dadurch auszeichnet, durch Licht in den angeregten Zustand überzugehen – oft wird ein Ruthenium Katalysator verwendet. Damit die Reaktion ablaufen kann, muss nach dem von Ischay *et al.*^[60] aufgestellten Mechanismus die Triplet Energie der Rutheniumspezies (hier: $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$) höher sein, als die des zu dimerisierenden Moleküls. Um im Vorfeld abschätzen zu können, ob die Reaktion gelingt, können Literaturwerte^[61] zu Rate gezogen werden oder falls diese nicht vorhanden sind, können DFT-Rechnungen durchgeführt werden.

1.5. Oleuropein

Ein weiteres biologisch interessantes Molekül ist Oleuropein (Abbildung 7). Eine Variante Oleuropein zu gewinnen, ist die für viele Naturstoffe mögliche Extraktion.

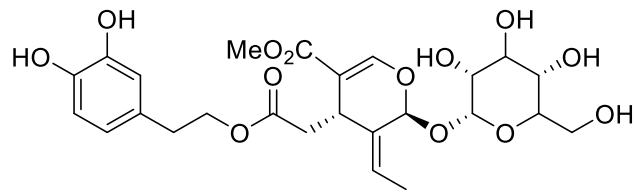


Abbildung 7: Oleuropein.

Oleuropein wird größtenteils aus frischen Oliven und den Blättern des Olivenbaumes (*Olea europaea* L.) extrahiert.^[62,63] Da diese Spezies hauptsächlich im mediterranen Raum anzufinden ist, kommt eine Extraktion in unseren Breitengraden nicht in Frage. Scognamiglio *et al.*^[64] fanden heraus, dass Oleuropein nicht nur in weiteren Ölbaumgewächsen, wie *Phillyrea angustifolia* L. gefunden werden kann, sondern dass die Jahreszeit einen entscheidenden Einfluss auf den Gehalt an Oleuropein hat. Eine Pflückzeit in den Wintermonaten scheint eine höhere Ausbeute zu bewirken. In früheren Untersuchungen zeigte Oleuropein kardio-^[65–69], gastro-^[70,71], neuro-^[72–74], radio-^[75] und leberschützende^[76–81] Eigenschaften. Durch seine orthodiphenolische Struktur ist Oleuropein anti-oxidativ. Außerdem besitzt es biologische Eigenschaften hinsichtlich verschiedener Krebszelllinien^[82–86], Diabetes^[82–87] und Fettleibigkeit^[88].

Neben der Extraktion besteht die Möglichkeit Oleuropein mittels Synthese zu erhalten. Oleuropein kann, wenn auch nicht direkt von Zimtsäure abgeleitet, aus den Vorstufen aufgebaut werden.^[89] Der phenolische dieser Bausteine ist Hydroxytyrosol (Abbildung 8), welches vom 2-Phenylethylester abgeleitet werden kann.

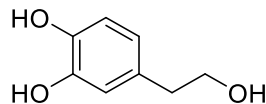


Abbildung 8: Struktur des Hydroxytyrosols.

Auf Grund der vielfältigen Eigenschaften, wurde Hydroxytyrosol bereits intensiv untersucht. Bisher konnte nachgewiesen werden, dass es vor allem auf die Lebensader des Menschen, Blut, positive Wirkungen hat. Nach einer Mahlzeit senkt es den Blutzuckerspiegel von *Diabetes mellitus* Patienten.^[90] Außerdem beeinflusst es den Gehalt an Lipiden im Blut, so dass das Risiko, an Herzerkrankungen zu erkranken, sinkt.^[91–96] Hydroxytyrosol erhöht das Level an endogenem Vitamin C^[97] und es wirkt entzündungshemmend^[98–100].

Die Wahrscheinlichkeit an neurodegenerativen Krankheiten oder Krebs zu erkranken, scheint durch die mediterrane Diät verringert zu sein.^[101–103] Diese Art der Ernährung beinhaltet viele Einzelheiten, die in der Summe eine erstaunliche Wirkung haben^[104]. Wir haben uns gefragt, ob nicht einzelne Vertreter besonderen Einfluss auf diese Wirkung haben. Deshalb werden Oleuropein und Hydroxytyrosol in Hinsicht auf Cholinesterase-Hemmung und antikanzerogene Eigenschaften untersucht.

2. Zielstellung

Naturstoffe sind auf Grund ihrer vielseitigen biologischen Eigenschaften in der modernen Forschung fest verankert. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Synthese einer Substanzbibliothek neuartiger Phenylpropanoide. Ausgehend vom 1-Indanon soll das Grundgerüst so substituiert werden, dass ein Spektrum an bicyclischen Verbindungen mit Indanon-, Isatin- und Oxim-Derivaten entsteht. Außerdem soll auch Zimtsäure vielseitig, sowohl am Phenylsubstituenten, an der Doppelbindung und an der Carboxylgruppe modifiziert werden. Dabei sollen die verschiedenen Substituenten und deren Kombination die möglichen elektronischen und sterischen Einflüsse abbilden um eine eventuelle Struktur-Wirkungs-Beziehung ableiten zu können.

Nach erfolgreicher Synthese werden die Substanzen hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität untersucht; das Hauptaugenmerk wird auf dem Ellman's Test liegen. Neben der Untersuchung auf mögliche inhibitorische Aktivitäten bezüglich der Enzyme AChE und BChE (Ellman's Test), werden die Produkte im SRB Assay auf ihre Zytotoxizität untersucht. In Hinblick auf die Anwendbarkeit in *in vivo* Studien wird außerdem die Selektivität zwischen Normalzellen und Tumorzellen der Substanzen ermittelt.

Weiterhin wird untersucht, ob die Variation der Molekülgröße einen Effekt auf die biologische Wirkung hat. Dafür werden stabile Anhydride, Dimere und dimere CAPE-Strukturen synthetisiert und getestet. Da die Molekülgröße meist Löslichkeitsprobleme mit sich bringt, wird neben einiger weiterer Rosmarinsäure-Derivate, das glykosidische Oleuropein aus *Ligustrum vulgare* extrahiert und untersucht werden.

In einer zweiten Extraktion wird aus *Sinapis alba* Sinapin erhalten. Dieses trägt ein quaternäres Ammoniumsalz. In einer photoinduzierte Homodimerisierung soll das Dimer des Sinapins dargestellt werden. Der ionische Charakter und die Ähnlichkeit zu Acetylcholin sollten Löslichkeitsproblemen entgegen wirken. Außerdem könnte dadurch eine gute Bindungsfähigkeit in der Enzymtasche der AChE hervorgerufen werden.

3. Forschungsergebnisse – Zusammenfassung und Einordnung

Die Anwendung von Medikamenten im menschlichen Körper setzt voraus, dass diese die gesunden Bereiche des Körpers nicht schädigen. Oft kann eine völlige Unschädlichkeit nicht gewährleistet werden und das Medikament bewirkt neben den Linderungen der Krankheit auch Nebenwirkungen. Diese sollten in einem sehr geringen Maß auftreten, vor allem bei neu auf dem Markt gebrachten Medikamenten, um eine Chance auf Etablierung zu haben. Aus diesem Grund werden auch unsere neuen Substanzen neben der Wirkung auf Cholinesterasen parallel im Zytotoxizitätstest vermessen. Dabei geht es zum einen um die Wirkung auf eine Auswahl von menschlichen Tumorzellen und zum anderen um die Aktivität gegenüber einer non-maligne Referenzlinie. Die Zytotoxizitätstests werden mit Hilfe eines Sulforhodamin-B-Assay (SRB-Assay) durchgeführt.

3.1. Einführung des SRB-Assays

Nach einem Tag Inkubationszeit auf einer 96-Loch-Platte werden die Zellen mit sechs verschiedenen Substratkonzentrationen (1, 3, 7, 12, 20 und 30 μM) versetzt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Konzentration an DMSO oder DMF 0.5 % nicht übersteigt. Eine höhere Konzentration hätte eine toxische Wirkung auf die Zellen zur Folge. Nach weiteren 96 h wird das Medium verworfen und die Zellen werden mit Trifluoressigsäure (10 %) fixiert und werden bei 4 °C gelagert. Wenn die Fixierung nach 24 h abgeschlossen ist, folgt ein Waschvorgang und im Anschluss werden die Zellen mit Sulforhodamin B (Abbildung 9) angefärbt. Der Farbstoff wird zum Anfärben verwendet, da es quantitativ an Zellproteine binden kann.

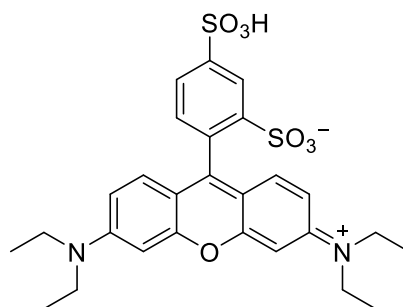


Abbildung 9: Sulforhodamin B (SRB).

Nach wiederholten Waschvorgängen und Trocknung der Zellen, wird die optische Dichte gemessen, wodurch die Anzahl der überlebenden Zellen berechnet werden kann. Um fehlerhafte EC_{50} -Werte zu vermeiden, wird das Experiment dreifach durchgeführt.

Der Test macht es möglich, Aussagen darüber zu treffen, ab welcher Konzentration die Hälfte aller Zellen abgestorben ist. Diese Konzentration, der EC_{50} -Wert zeigt, ab wann eine Substanz als zytotoxisch gilt. Je kleiner der Wert umso aktiver ist die Verbindung. Allerdings ist der SRB-

Assay nicht in der Lage zwischen den drei möglichen Zelltod-Mechanismen – Apoptose, Nekrose und Autophagie zu unterscheiden. Dazu bedarf es weiterführender Untersuchungen.

Da verschiedene menschliche Tumorzelllinien und eine non-maligne Linie, die Mausfibroblasten (NIH 3T3) vermessen werden, können Aussagen zur Selektivität der Verbindung getroffen werden. Die verwendeten menschlichen Linien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Zelllinien und der jeweilige Zelltyp.

Zelllinie	Zelltyp
FaDu	Schlundrachen
A2780	Eierstock
HT29	Dickdarm
MCF-7	Brust
A549	Lunge
A375	Melanom
512A2	Melanom
SW1736	Schilddrüse
8505C	Schilddrüse

Im Laufe des Forschungszeitraumes kam es zur Änderung der Melanom- und Schilddrüsen-Zelllinien. Die Auswahl hängt mit der Verfügbarkeit der Zellen zusammen.

3.2. Einführung der enzymatischen Untersuchung

Enzyme besitzen ein aktives Zentrum, welches einen spezifischen Aufbau besitzt, so dass nur passende Substrate, nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“, umgesetzt werden können. Eine der Möglichkeiten eine reversible Inhibierung zu erreichen, besteht darin, dass der Inhibitor ebenfalls in das aktive Zentrum passen muss und dieses blockiert ohne umgesetzt zu werden. Eine reversible Hemmung kann vollständig oder partiell erfolgen; sie verläuft kompetitiv, nicht-kompetitiv oder unkompetitiv. In Abbildung 10 sind die verschiedenen Hemmungsmechanismen gezeigt. Bei einer kompetitiven Hemmung wird das aktive Zentrum durch den Inhibitor direkt blockiert und das eigentliche Substrat kann nicht angreifen. Die nicht-kompetitive Hemmung steuert die Struktur des aktiven Zentrums über eine Hemmung an einer anderen Seite des Enzyms. Die unkompetitive Hemmung tritt erst ein, wenn das

Substrat bereits gebunden ist. Der Inhibitor bindet an den Substrat-Enzym-Komplex und verhindert die Abspaltung des Substrates.

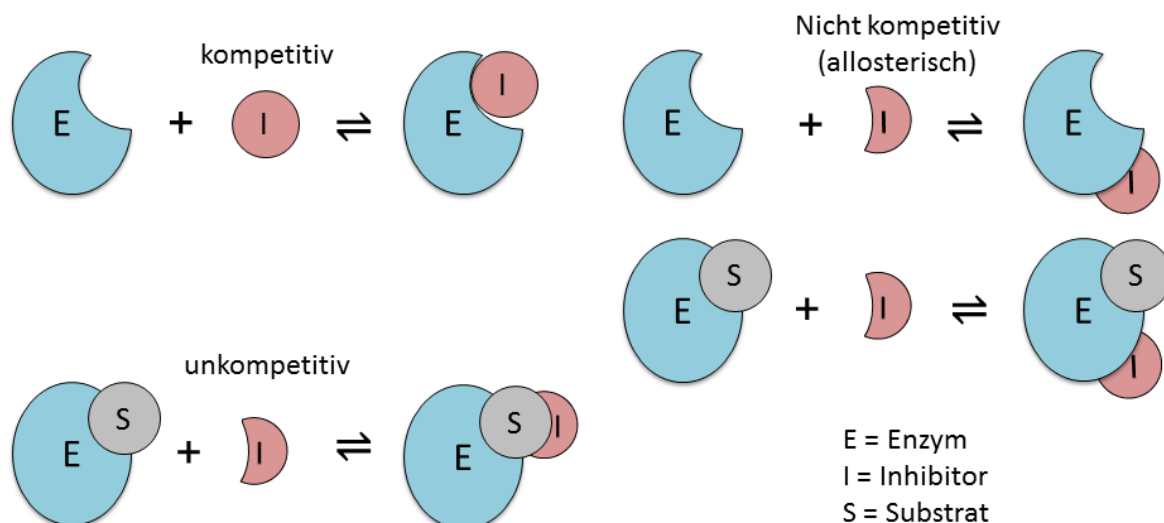


Abbildung 10: Die drei Arten der reversiblen Enzymhemmung.^[105]

Bei der irreversiblen Hemmung bindet der Inhibitor kovalent an das Enzym, so dass er nicht wieder abgespalten werden kann. Somit geht die Enzymaktivität verloren.

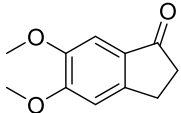
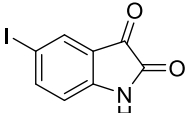
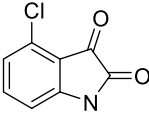
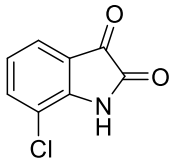
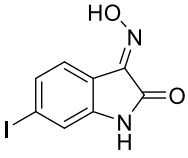
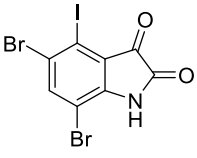
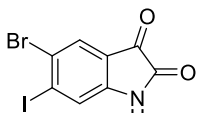
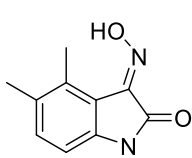
Häufig wird bei enzymatischen Untersuchungen, welche sich mit der Inhibierung der Cholinesterasen AChE und BChE befassen, auf den Test nach Ellman^[106] zurückgegriffen. Bei diesem kann die Enzymaktivität optisch über ein Mikrotiter-Photometer (Tecan) bestimmt werden. Über die Auswertungen nach Cornish-Bowden^[107], Lineweaver-Burk^[108] und Dixon^[109] werden die Inhibierungskonstanten K_i und K_i ermittelt, was allerdings zeitlich sehr aufwendig ist. Aus diesem Grund wird im Vorfeld eine Grobbestimmung durchgeführt, bei der die Inhibierungsprozente der jeweiligen Verbindung ermittelt werden. Als Alternative soll ein Schnelltest am Beispiel von Isatin-Derivaten auf DC-Platten etabliert werden.

3.3. Indanon-Analoga und ihre potentielle pharmakologische Wirkung

Zur Etablierung eines Schnelltests ist es notwendig, aktive und inaktive Substanzen einer bestimmten Verbindungsklasse vorliegen zu haben. Wir entschieden uns für die donepezil-ähnlichen alkyliischen Indanonamide und halogenierten Isatine. Die 49 neuartigen Vertreter beider Gruppen wurden zunächst synthetisch hergestellt. Nach der Synthese erfolgen die biologischen Aktivitätsuntersuchungen mit Hilfe des Ellman's Assay und des SRB Assay. Als Resultat des Ellman's Assay konnte gezeigt werden, dass die Indanonamide **M1-1** bis **M1-14** ausschließlich Aktivität gegenüber der AChE zeigen. Dabei war die Verbindung **M1-3** die aktivste, kann aber nur als moderater Inhibitor angesehen werden. Bei den Isatin-Derivaten konnten Trends bezüglich der Substituenten ausgemacht werden. In der Gruppe der einfach substituierten Isatine (**M1-16a-r**) konnten moderate Aktivitäten gegen AChE aufgezeigt

werden, wobei **M1-16e**, die aktivste war, und vier (**M1-16a,b,f,p**) waren gleichzeitig moderate BChE-Inhibitoren. Die Verbindungen **M1-17a-h**, welche an Position 5 bromiert sind und somit zweifach substituiert, zeigten bis auf **M1-17d** keine Aktivität gegen Cholinesterasen. **M1-18a-d** besitzen Aktivitäten sowohl gegen AChE als auch gegen BChE. Hervorzuheben ist Verbindung **M1-18c**, welche einen sehr guten Inhibitor gegen AChE darstellt und ebenfalls eine gute inhibitorische Wirkung gegen BChE aufzeigt. Die Oxime **M1-19a-n** zeigen hingegen ein umgekehrtes Verhalten zu der Gruppe **M1-16a-r**. Waren die Verbindungen **M1-16** moderate AChE-Inhibitoren, so sind die Verbindungen **M1-19** moderate BChE-Inhibitoren. Eine Ausnahme stellt **M1-19j** dar, welches ein AChE Inhibitor ist. In Tabelle 2 sind die Strukturen der aktivsten Verbindungen dargestellt. Es ist auffällig, dass vor allem Chlor- und Iod-Substituenten mit gleichem Substitutionsmuster bei den Isatinen und Oximen Aktivität auslösen.

Tabelle 2: Übersicht über die aktivsten Cholinesterase-Inhibitoren des Manuskriptes 1.

Aktivität gegen AChE	Aktivität gegen BChE	Aktivität gegen AChE + BChE
 M1-3	 M1-16p	 M1-16a
 M1-16e	 M1-19d	 M1-18c
 M1-17d		
 M1-19m		

Bei den Untersuchungen im SRB-Assay konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Ein Großteil der getesteten Verbindungen war allenfalls moderat zytotoxisch und nicht tumorzellenselektiv.

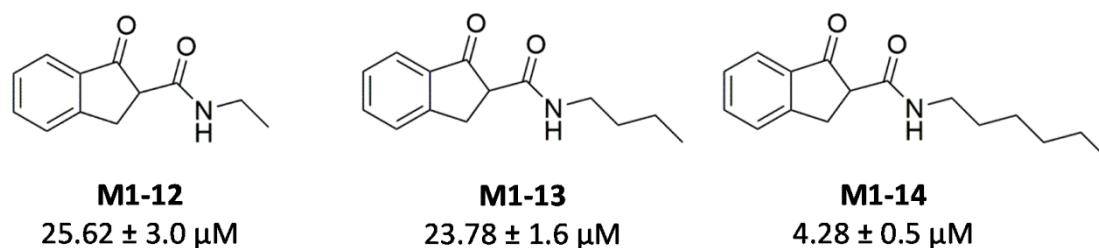


Abbildung 11: Vergleich Strukturen und Aktivitäten gegenüber MCF-7.

Ausnahmen bildeten hier die Verbindungen **M1-12** bis **M1-14** (Abbildung 11), welche selektiv gegen **MCF-7** wirken. Während **M1-12** und **M1-13** weiterhin nur moderate Aktivität aufwiesen, zeigt **M1-14** selektive und gute zytotoxische Eigenschaften gegenüber menschlichen Adenokarzinoma Brustzellen. Die Länge der Alkylkette scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität zu haben.

Während der Untersuchung zu neuartigen Indanon- und Isatinderivaten wurden an Hand von fünf Beispielsubstanzen 1 (**M1-19e**), 2 (**M1-16j**), 3 (**M1-19k**), 4 (**M1-16r**), 5 (**M1-19h**) die zwei literaturbekannten DC-Schnelltests^[110–113] mit Fast Blue B und Azur Blau II miteinander verglichen. Die Verbindungen wurden auf Grund ihrer unterschiedlichen Aktivität gegenüber den Cholinesterasen ausgewählt. Da für den Test und die Etablierung vorerst mehrere Versuche durchgeführt werden, ist es notwendig, dass ausreichend Substanz vorhanden ist. Dieser Faktor spielte bei der Auswahl der Verbindungen eine entscheidende Rolle. Beide Schnelltests beruhen auf einer Farbveränderung. Abbildung 12 zeigt beide Varianten im Vergleich.

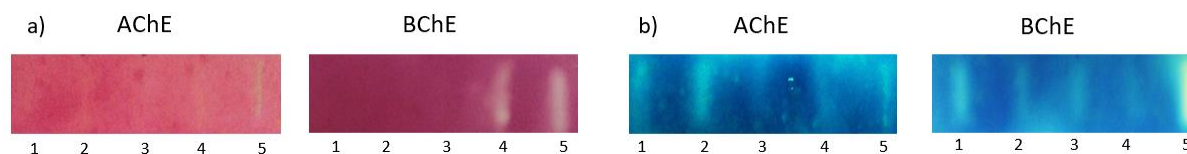


Abbildung 12: Isatin-Derivate im Vergleich zwischen a) Fast Blue B Test und b) Azur Blau II Test.

Bei Fast Blue B (a) werden alle inaktiven Bereiche der DC-Platte violett und aktive Substanzen bleiben so gefärbt wie nach Auftragung. Da die Isatin-Derivate gelblich sind, ist der Unterschied schwer auszumachen. Azur Blau II (b) hat anstelle der violetten Färbung einen tiefblauen Farbton, der auf das unlösliche Preußisch Blau zurückzuführen ist, das während der Reaktion entsteht. Auch bei dem Test nach Yang *et al.*^[113] bleiben aktive Substanzen farblich unverändert. Es wird deutlich, dass der Farbkontrast vom zweiten Test für das menschliche Auge deutlicher ist und wäre somit die Variante der Wahl. Allerdings hängen die Schnelltest stark von der Löslichkeit der Substanzen ab und sind daher nicht sehr zuverlässig in einzelnen Fällen. Außerdem lassen die DC-Tests keine prozentualen Einschätzungen zu – im Gegensatz zum Grobtest von Ellman's Test. Aus diesen Gründen, haben wir verzichtet, diese Tests weiter

zu verfolgen und haben weitere Verbindungen nur noch mit Hilfe von Ellman's Test vermessen.

Die experimentellen Vorgehensweisen und die Ergebnisse der biologischen Evaluierungen können aus dem unveröffentlichten Manuskript „Development of indanones and isatins as non-cytotoxic inhibitors of cholinesterases“ (Anhang, M1) entnommen werden.

3.4. Stabile Anhydride als potentielle Cholinesterase-Inhibitoren

Auf der Suche nach weiteren aktiven Verbindungen kamen die Ausgangsstoffe für die oben dargestellten Indanone und Isatine in Frage – Zimtsäure-Derivate. Durch ihr breites Vorkommen in vielen Bestandteilen unserer Nahrung^[114–116], ergibt sich ein wissenschaftliches Interesse hinsichtlich der inhibitorischen Effekte auf Cholinesterasen. Dafür wurde eine Vielzahl an substituierten Zimtsäuren mit Hilfe der Knoevenagel-Doebner-Kondensation^[40,117] hergestellt. Im Zuge der explorativen Synthese wurden ebenfalls symmetrische Anhydride dargestellt. Im Anschluss an erste erfolgreiche Messungen der inhibitorischen Fähigkeiten gegenüber AChE und BChE, rückte die Stabilität in wässrigen Lösungen in den Fokus. Die synthetisierten Substanzen wurden auf ihre Stabilität im wässrigen Medium untersucht, um zu überprüfen, ob das Anhydrid oder ein entsprechendes Hydrolyseprodukt für die Aktivität gegenüber AChE verantwortlich ist. Dies wurde mit Hilfe eines DC-Experimentes durchgeführt. Dabei werden die zwei möglichen Verbindungen Säure und Anhydrid nebeneinander auf einer DC-Platte entwickelt. Dadurch konnten Referenz-R_F-Werte ermittelt werden, um im Verlauf des Experiments darauf zurückgreifen zu können. Anschließend wird der Ellman's Test in Gegenwart und Abwesenheit des Enzyms in mehreren Eppendorf-Gefäßen simuliert, indem die verschiedenen Bestandteile im gleichen Verhältnis zusammengegeben werden. Bei diesem Experiment konnte herausgefunden werden, dass die Anhydride der Zimtsäuren unter den Bedingungen 72 h stabil waren, da in der Enzymprobe maximal 10 % zur Säure hydrolysiert wurden. Weiterführende Untersuchung zur Enzymkinetik ergaben einen reversiblen Misch-typ und mit Hilfe eines Moleküldockings unter Verwendung des Programms Autodock^[118] wurde die Position der Verbindungen in der Enzymtasche simuliert. Dabei wird deutlich, dass die Anhydride wesentlich besser in die Tasche passen als die Zimtsäuren. Demnach konnten in der Serie von insgesamt 33 hergestellten Säure- und Anhydrid-Derivaten sechs aktive Anhydride (Tabelle 3) ermittelt werden.

Tabelle 3: Unerwartet stabile Anhydrid-Inhibitoren gegenüber AChE.

Verbindung	K _i [μM]	K _i ' [μM]
P1-2c	8.30 ± 0.94	9.54 ± 0.38
P1-2d	17.81 ± 0.95	53.70 ± 1.19

P1-2j	11.15 ± 1.36	
P1-2t	13.42 ± 1.06	> 50
P1-2u	8.23 ± 0.93	13.07 ± 0.46
P1-2v	12.19 ± 1.16	21.46 ± 0.13

Alle Substanzen wirken ausschließlich als reversible Misch-typ Inhibitoren gegenüber der Acetylcholinesterase, sind nicht zytotoxisch gegen die getesteten menschlichen Krebszelllinien und die nicht-malignen Mausfibroblasten. Herauszuheben sind Verbindung **P1-2c** und **P1-2u**, welche gute inhibitorische Eigenschaften aufweisen. Die Strukturen der aktiven Anhydride sowie die ausführlichen experimentellen Beschreibungen sind in der Publikation „*Substituted cinnamic anhydrides act as selective inhibitors of acetylcholinesterase*“ (Anhang, P1) zu finden.

3.5. Cyclopropane als Duftstoffe

In dem nächsten Projekt wurde die Derivatisierung der Doppelbindung der Zimtsäuren näher beleuchtet. Dafür wurde anstelle dieser ein Cyclopropan-Rest (Abbildung 13) eingeführt.

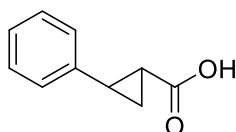


Abbildung 13: Cyclopropan statt Doppelbindung.

Cyclopropane sind nicht nur synthetisch sehr interessant; sie ermöglichen auch eine Änderung der Moleküleigenschaften. Physikochemische Eigenschaften, die Flüchtigkeit und daraus resultierend der Duft, hängen stark von der Struktur der Verbindung ab. Es konnte an einigen Beispielen gezeigt werden, dass ein Molekül mit Doppelbindung süßlicher und lieblicher riecht. Wird die Doppelbindung synthetisch zu einem Cyclopropan umgesetzt, wird das Molekül als würziger riechend wahrgenommen.^[119] Dieses Phänomen konnten wir ebenfalls beobachten. Während Zimtsäureester die Duftnote Vanille mit einem Hauch von Zimt tragen, wurde der süßliche Duft nach Derivatisierung zum Cyclopropan ebenfalls würziger und teilweise scharf – ähnlich einem konzentrierten Zimtöl. Eine industrielle Anwendung mit Fokus auf Aroma- und Duftstoffe ist demnach denkbar. Diese ist allerdings mit hohen Auflagen verbunden, da viele Inhaltsstoffe allergen wirken und daher die Verwendung immer weiter eingeschränkt wird. Da Parfüme hauptsächlich mit der Haut in Kontakt treten, ist es von Vorteil, wenn die Ingredienzien nicht allergen sind und sogar Krankheiten der Haut vorbeugen. Bestimmte Zimtsäure-Derivate besitzen diese Eigenschaften. Es gibt Forschungsberichte, bei denen eben diese das Wachsen von Mikroorganismen auf der Haut einschränken und dem

Entstehen des schwarzen Melanoms vorbeugen können^[120], eine der aggressivsten Formen von Hautkrebs^[121]. Um sicherzustellen, dass unsere neuartigen Derivate nicht wachstumshemmend gegenüber Normalzellen sind, wurden sie einem SRB-Assay unterzogen. Dabei wurde festgestellt, dass die Substanzen keine zytotoxischen Eigenschaften aufweisen, weder gegen maligne noch gegen nicht-maligne Zellen. Da vorherige Derivate ebenfalls inhibitorische Eigenschaften gegenüber Cholinesterasen aufwiesen, wurden auch die Derivate der Doppelbindungssubstitution im Ellman's Test vermessen, wiesen allerdings keine nennenswerten Aktivitäten auf. Die gewählten Synthesewege und exakten Ergebnisse der biologischen Untersuchungen können der Publikation „*In search of new cinnamic acid derived flavours and fragrances*“ (Anhang, P2) entnommen werden.

3.6. CAPE-Derivate und ihre potentiellen inhibitorischen Eigenschaften

Einige der bekannten CAPE-Derivate zeigen vielseitige biologischen Eigenschaften, wie Zytotoxizität^[10,122] oder inhibieren die Enzyme AChE und BChE^[53]. Aus den oben bereits erwähnten, unterschiedlich substituierten Zimtsäuren wurde eine Vielzahl an Phenethylestern unter Mitsunobu Bedingungen^[123] hergestellt. Phenolische Hydroxylgruppen werden unter diesen Reaktionsbedingungen verethert, was am Beispiel von **P3-15** (Abbildung 14) zur Entdeckung eines sehr guten AChE-Inhibitors führte.

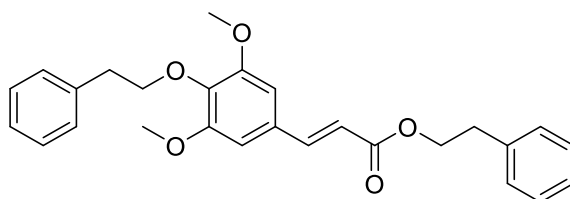


Abbildung 14: Sehr guter AChE-Inhibitor P3-15.

Um weitere Derivate zu erhalten, wurden Allyl- und Benzylether als Schutzgruppe gewählt. Die Phenethylester der geschützten Moleküle wurden unter Steglich Bedingungen^[124] hergestellt. Der Einfluss einer freien OH-Gruppe auf die Aktivität in der Enzymtasche konnte dadurch nicht geklärt werden.

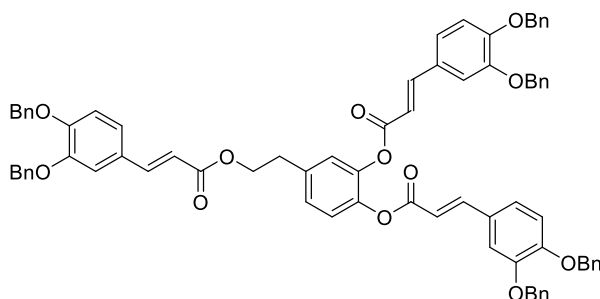


Abbildung 15: Verbindung P3-26.

Während bei der Kupplungsreaktion mit 2-(*o*-Hydroxyphenyl)-ethanol das gewünschte Produkt mit freier OH-Gruppe entstand, reagierte beim *m*-, *p*- und 2,3-substituierten 2-Phenylethanol die Hydroxylgruppe direkt mit weiteren Säuremolekülen zu „Dimerstrukturen“. Die entstandenen Strukturen waren vom Molekulargewicht zwei- bis dreimal so groß wie die erwarteten Produkte und brachten Löslichkeitsprobleme in wässrigen Lösungen mit sich. Das erschwerte die biologische Untersuchung, aber eine der Strukturen (**P3-26**) zeigte herausragende Aktivität in der Inhibierung von Acetylcholinesterase. Mit den in Tabelle 4 gezeigten Inhibierungskonstanten konnten bei diesem Projekt zwei sehr gute Misch-typ Inhibitoren, die keine zytotoxische Wirkung aufweisen, entdeckt werden.

Tabelle 4: Darstellung der aktivsten Verbindungen von P3.

Verbindung	K_i [μM]	K_i' [μM]
P3-15	1.97 ± 0.38	2.44 ± 0.07
P3-26	0.72 ± 0.31	1.80 ± 0.21

An Hand dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass nicht nur freie Hydroxylgruppen zu sehr guten Inhibitoren führen, sondern auch die Molekülgröße entscheidend sein kann. Die aktiven Moleküle sind so groß, dass sie den Eingang der Enzymtasche vollständig blockieren und so das Enzym inhibieren oder kleine Moleküle, die an beiden Enden Benzylreste tragen, welche sich gut in das aktive Zentrum der Tasche anlagern können. Mit Hilfe eines Molekularen Modellings können diese zwei Thesen bestätigt werden.

Die Darstellungen des Modellings und die vollständigen Syntheserouten sowie biologischen Evaluierungen können in der Publikation „*Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)-derivatives act as selective inhibitors of acetylcholinesterase*“ (Anhang P3) nachgelesen werden.

3.7. Photodimere und ihre potentiellen pharmakologischen Eigenschaften

Ausgehend von den zuvor synthetisierten „Dimerstrukturen“, die jeweils zwei bis drei Einheiten der Zimtsäure tragen, stehen nun klassische Dimere im Fokus der weiteren Untersuchung. Diese sollen durch [2+2]-Cycloaddition von Alkenen hergestellt werden und weisen als zentralen Baustein einen Cyclobutan-Ring auf. Dabei lag das Interesse auf jener Reaktionsführung, die photochemisch erlaubt ist. Der Butanring entsteht dabei über eine suprafaciale Überlappung der π -Orbitale. Bei der Untersuchung konnten photochemisch zwei neuartige Dimere, das Sinapindimer und das Dimer des Sinapinsäureethylesters (Abbildung 16), hergestellt werden.

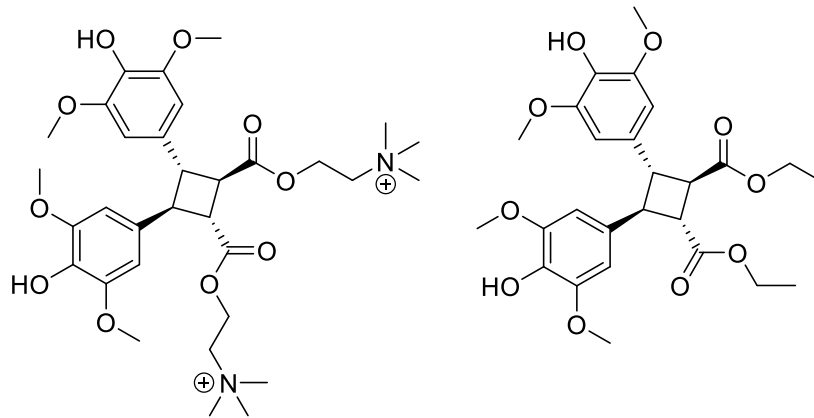


Abbildung 16: Dimer mit Cholin-Rest und mit Ethyl-Rest.

Wie zu erkennen ist, wurde erneut ein Cholin-Ester mit einem Ethylester verglichen. Während der Synthese sind beide ähnlich, eine einzige Problematik stellte sich durch die Wasserlöslichkeit des Sinapindimers bei dessen Aufarbeitung heraus. Durch Wahl eines ungewöhnlichen Lösungsmittelgemisches ($\text{H}_2\text{O}/n\text{-Butanol}/n\text{-Propanol}$ 1:1:1) für die Säulenchromatographie konnte diese, allerdings mit hohen Ausbeuteeinbußen, behoben werden. Um das Dimer des Sinapins herstellen zu können, musste im Vorfeld Sinapin gewonnen werden. Dies wurde über eine Extraktion aus weißem Senf (*Sinapis alba*) bzw. eine 4-stufige Synthese bewerkstelligt.

Bei den biologischen Untersuchungen konnten keine Aktivitäten gegenüber den Cholinesterasen AChE und BChE festgestellt werden. Auch die Ergebnisse des SRB-Assay zeigten keine zytotoxischen Eigenschaften gegen maligne Menschenzellen und den non-malignen Mausfibroblasten.

Die detaillierten Synthesevorschriften sowie die Ergebnisse der biologischen Aktivitätstests können der Publikation „*Synthesis of sinapine and its unprecedented ruthenium-catalyzed [2+2] photodimerization*“ (Anhang, P4) entnommen werden.

3.8. Die Alternative für die Gewinnung von Oleuropein

Naturstoffe können meist über mehrstufige Synthesewege mit geringen Ausbeuten erhalten werden. Deshalb wird häufig auf Extraktionen zurückgegriffen, welche zwar ebenfalls aufwendig sind, aber oft schneller zum Ergebnis führen. Dies ist auch der Fall beim Oleuropein, aus welchem wiederum das Hydroxytyrosol erhalten werden kann. Bisher wurde Oleuropein nur aus den Blättern des Olivenbaums gewonnen. Da dieser in mitteleuropäischen Breitengraden nicht natürlich vorkommt, sollte eine alternative Quelle für dieses Molekül gefunden werden, z.B. in einer einheimischen Pflanze. Eine bei uns sehr weit verbreitete Pflanze aus der Pflanzenfamilie der Ölbaumgewächse, ist der Gewöhnliche Liguster (*Ligustrum vulgare*). Aus eben jenem konnten wir erfolgreich Oleuropein extrahieren (Abbildung 17).

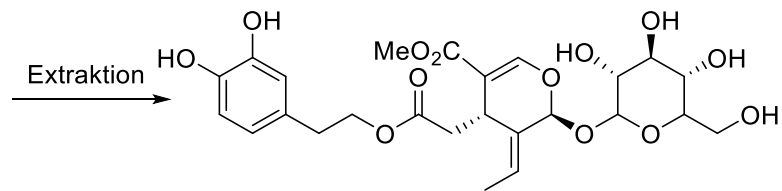


Abbildung 17: Gewinnung von Oleuropein aus Gewöhnlichem Liguster^[125].

Auch die These von Scognamiglio *et al.*^[64], dass die Pflückzeit einen entscheidenden Einfluss auf den Gehalt der gewünschten Substanz hat, konnte bestätigt werden. Werden die Blätter im Juni geerntet, enthalten sie nur die Hälfte des Gehaltes an Oleuropein im Vergleich zu im November geernteten. Wird der Gehalt im Liguster mit dem aus den Olivenblättern verglichen, ist festzustellen, dass die im Winter gepflückten Blätter in *Ligustrum vulgare* nur die Hälfte des Oleuropein enthalten, was aus Blättern von *Olea europaea* extrahiert werden kann. Trotzdem stellt der Gewöhnliche Liguster eine alternative Quelle für die Gewinnung von Oleuropein, aus welchem durch saure Hydrolyse Hydroxytyrosol gewonnen werden kann, dar. Ein weiterer Vorteil ist, dass Liguster ganzjährig geerntet werden kann, auch wenn der Gehalt variiert.

Die detaillierten Ergebnisse können der Publikation „*Facile access to oleuropein and hydroxytyrosol from Ligustrum vulgare – a plant material growing all over Eurasia*“ (Anhang, P5) entnommen werden.

4. Zusammenfassung

Durch die erfolgreiche Synthese einer Vielzahl neuartiger Zimtsäure-Derivate konnte eine umfangreiche Substanzbibliothek aufgebaut werden. Innerhalb dieser wurde die Zimtsäure mit verschiedenen Resten funktionalisiert, sodass die elektronischen und sterischen Einflüsse auf die Inhibierung gegenüber den Cholinesterasen AChE und BChE sowie die Zytotoxizität untersucht werden konnten.

Es konnte festgestellt werden, dass unter den donepezil-ähnlichen Derivaten, vor allem die Isatine moderate bis gute Inhibitoren entweder gegen AChE und/oder BChE sind. Dabei spielt die Anzahl von Substituenten eine entscheidende Rolle. Während einfach substituierte Isatine vorrangig AChE-Inhibitoren sind, wirken mehrfach substituierte auf beide Cholinesterasen inhibitorisch. Einfach halogenierte Oxime hingegen, sind reine BChE-Inhibitoren. Aus zytotoxischer Sicht konnte ein selektiv gegen die Zelllinie MCF-7 (Brustkrebs) aktives Indanon-Derivat gefunden werden. Unterdessen konnte eine Untersuchung zu einem Enzym-DC-Schnelltest erfolgreich abgeschlossen werden. Das Ergebnis zeigte, dass dieser prinzipiell möglich ist, allerdings für farbige Verbindungen, wie den Isatinen und Oximen, ungeeignet ist. Ebenfalls wurde herausgefunden, dass eine prozentuale Abstufung der Aktivität mit dem bloßen Auge nicht möglich ist, weswegen auf der Grobtest des Ellman's Test dem Schnelltest bei weiteren Teilen dieser Arbeit vorgezogen wurde.

Des Weiteren konnten Zimtsäure-Anhydride mit herausragenden Eigenschaften hergestellt werden. Auf Grund ihrer optimalen Bindung an das aktive Zentrum der Enzymtasche, zeigten sie gute inhibitorische Eigenschaften gegen AChE, wobei sie erstaunlicherweise im wässrigen Milieu über einen Zeitraum von 72 h stabil waren.

Im weiteren Teil der Arbeit konnten neuartige Cyclopropan-Derivate substituierter Zimtsäuren synthetisiert werden. Dabei wurden auch Oxiran- und Thiiran-Derivate charakterisiert und untersucht. Auf Grund ihrer nicht vorhandenen Zytotoxizität und Inhibitor-Eigenschaften ist eine Anwendung als Medikament weder gegen Krebs noch gegen Alzheimer denkbar. Allerdings besitzen diese Verbindungen ein sehr interessantes Duftprofil – neben den typischen Vanille- und Zimtnoten, die den Zimtsäuren eigen sind – haben sie würzige und scharfe Anteile, die vor allem im Bereich der Duftölherstellung gute Anwendung finden können.

Ein Abschnitt dieser Arbeit beschäftigte sich mit CAPE-Derivaten. Diese bereits viel untersuchten Verbindungen wurden um einige unbekannte Strukturen erweitert. Dabei gelang es vier dimerartige Strukturen zu generieren, welche durch ihre Größe und Wasserunlöslichkeit hervorstachen. Trotz dieser Problematik erwies sich eines dieser Derivate als sehr guter Inhibitor gegenüber Acetylcholinesterase. Durch Modelling konnte gezeigt

werden, dass dieses Molekül wie ein Deckel vor dem Eingang der Enzymtasche liegt. Daraus ergeben sich vielseitige Möglichkeiten, wenn eine Art Schaltung dieses Deckels machbar wäre.

Neben den dimerartigen wurden auch klassische Dimere mit einer Cyclobutan-Struktur hergestellt werden. Dabei wurde eine photoinduzierte Homodimerisierung auf Ruthenium-Basis verwendet, welche laut Literatur eigentlich nicht für Zimtsäure-Derivate geeignet ist. Es konnte gezeigt werden, dass die zwei ausgewählten Sinapinsäure-Derivate über diesen Mechanismus erhalten werden konnten.

Im letzten Teil der Untersuchungen rückte Oleuropein in den Vordergrund. Dieses ist synthetisch schwer und aufwendig zu erhalten, weswegen eine Variante gesucht wurde um das für weitere Untersuchungen interessante Molekül zu gewinnen. Es konnte neben der bekannten Extraktion aus frischen Olivenbaum-Blättern, welche in unseren Breitengraden in den nötigen Mengen schwer zu erwerben sind, eine Extraktion aus einem heimischen Ölbaumgewächs etabliert werden. In den Blättern des Gewöhnlichen Ligusters (*Ligustrum vulgare*), welcher ganzjährig geerntet werden kann, vor allem in den Wintermonaten gute Ausbeuten an Oleuropein erzielt werden. Diese entsprechen mindestens der Hälfte derer, die aus *Olea europaea* gewonnen werden.

Die Ergebnisse, auf denen diese Arbeit aufbaut, zeigen das Potential von der Naturstoffklasse der Zimtsäuren auf und wurden in fünf Publikationen veröffentlicht.

5. Literaturverzeichnis

- [1] H. Bickel, "Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen," can be found under https://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/infoblatt1_haeufigkeit_demenzerkrankungen_dalzg.pdf, **2018**.
- [2] Bundesministerium für Bildung und Forschung, "Neurodegenerative Erkrankungen: Wenn Nervenzellen zugrunde gehen - DLR Gesundheitsforschung," can be found under <https://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/de/neurodegenerative-erkrankungen-wenn-nervenzellen-zugrunde-gehen-5947.php>, **2019**.
- [3] K. Green, M. Fosso, S. Garneau-Tsodikova, *Molecules* **2018**, *23*, 3252.
- [4] K. Fassbender, C. Masters, K. Beyreuther, *Naturwissenschaften* **2001**, *88*, 261–267.
- [5] A. B. Clippingdale, J. D. Wade, C. J. Barrow, *J. Pept. Sci.* **2001**, *7*, 227–249.
- [6] D. H. Small, C. A. McLean, *J. Neurochem.* **2002**, *73*, 443–449.
- [7] M. P. Mattson, *Nature* **2004**, *430*, 631–639.
- [8] P. Flagmeier, S. De, D. C. Wirthensohn, S. F. Lee, C. Vincke, S. Muyldermans, T. P. J. Knowles, S. Gandhi, C. M. Dobson, D. Klenerman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 7750–7754.
- [9] V. M.-Y. Lee, M. Goedert, J. Q. Trojanowski, *Annu. Rev. Neurosci.* **2001**, *24*, 1121–1159.
- [10] Y.-T. Lee, *Comput. Biol. Med.* **2011**, *41*, 506–511.
- [11] C. Ballatore, V. M.-Y. Lee, J. Q. Trojanowski, *Nat. Rev. Neurosci.* **2007**, *8*, 663.
- [12] Y. Yoshiyama, V. M. Y. Lee, J. Q. Trojanowski, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2013**, *84*, 784–795.
- [13] M. J. Guerrero-Muñoz, J. Gerson, D. L. Castillo-Carranza, *Front. Cell. Neurosci.* **2015**, *9*, 1–10.
- [14] G. S. Gibbons, R. A. Banks, B. Kim, L. Changolkar, D. M. Riddle, S. N. Leight, D. J. Irwin, J. Q. Trojanowski, V. M. Y. Lee, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2018**, *77*, 216–228.
- [15] H. Förstl, A. Kurz, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **1999**, *249*, 288–290.
- [16] I. Łozińska, A. Świerczyńska, Z. Molęda, A. M. Hartman, A. K. H. Hirsch, Z. Czarnocki, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2018**, 1–10.
- [17] D. Ä. G. Ärzteblatt Redaktion Deutsches, "Arznei-mittel-kommission der deutschen Ärzteschaft: Tacrin-Zulassung mit besonderen Auflagen," can be found under <https://www.aerzteblatt.de/archiv/471/Arznei-mittel-kommission-der-deutschen-Aerzteschaft-Tacrin-Zulassung-mit-besonderen-Auflagen>, **1996**.
- [18] G. A. Reid, S. Darvesh, *Neuroscience* **2015**, *298*, 424–435.
- [19] M. Turek, D. Szczęsna, M. Koprowski, P. Bałczewski, *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 451–494.
- [20] L. M. Finkielstein, E. F. Castro, L. E. Fabián, G. Y. Moltrasio, R. H. Campos, L. V. Cavallaro, A. G. Moglioni, *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1767–1773.
- [21] E. Fillion, D. Fishlock, A. Wilsily, J. M. Goll, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1316–1327.

- [22] L. Huang, H. Miao, Y. Sun, F. Meng, X. Li, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *87*, 429–439.
- [23] L. Chan, S. K. Das, T. J. Reddy, C. Poisson, M. Proulx, O. Pereira, M. Courchesne, C. Roy, W. Wang, A. Siddiqui, C. Yannopoulos, N. Nguyen-Ba, D. Labrecque, R. Bethell, M. Hamel, P. Courtemanche-Asselin, L. L'Heureux, M. David, O. Nicolas, S. Brunette, D. Bilimoria, J. Bédard, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 793–796.
- [24] L. Chan, O. Pereira, T. J. Reddy, S. K. Das, C. Poisson, M. Courchesne, M. Proulx, A. Siddiqui, C. G. Yannopoulos, N. Nguyen-Ba, C. Roy, D. Nasturica, C. Moinet, R. Bethell, M. Hamel, L. L'Heureux, M. David, O. Nicolas, P. Courtemanche-Asselin, S. Brunette, D. Bilimoria, J. Bédard, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 797–800.
- [25] J. Petrignet, T. Roisnel, R. Grée, *Chem. - Eur. J.* **2007**, *13*, 7374–7384.
- [26] M. Koca, K. O. Yerdelen, B. Anil, Z. Kasap, H. Sevindik, I. Ozyurek, G. Gunesacar, K. Turkeydin, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 13–23.
- [27] K. Vine, L. Matesic, J. Locke, M. Ranson, D. Skropeta, *Anticancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 397–414.
- [28] P. Polychronopoulos, P. Magiatis, A.-L. Skaltsounis, V. Myrianthopoulos, E. Mikros, A. Tarricone, A. Musacchio, S. M. Roe, L. Pearl, M. Leost, et al., *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 935–946.
- [29] J. L. Hyatt, T. Moak, M. J. Hatfield, L. Tsurkan, C. C. Edwards, M. Wierdl, M. K. Danks, R. M. Wadkins, P. M. Potter, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1876–1885.
- [30] A. Baeyer, *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1878**, *11*, 582–584.
- [31] A. Baeyer, *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1878**, *11*, 1228–1229.
- [32] A. Baeyer, *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1880**, *13*, 2254–2263.
- [33] A. Baeyer, *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1881**, *14*, 1741–1746.
- [34] T. Sandmeyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 234–242.
- [35] G. Roszbach, P. Proff, Eds., *Cassius-Felix-Interpretationen: Teile I Und II*, Königshausen Und Neumann, Würzburg, **1991**.
- [36] P. Dioscorides, *Kräuterbuch ... Pedacii Dioscoridis Anazarbaei: von allerley wolriechenden Kräutern, Gewürtzen, köstlichen Oelen und Salben, Bäumen, Hartzen, Gummi, Geträyt, Kochkräutern, scharpffschmäckenden Kräutern, und andern, so allein zur Artzney gehörig; Kräuterwein, Metalln, Steinen, allerley Erden, allem und jedem Gifft, viel und mancherley Thieren und derselbigen heylsamen und nutzbaren Stück; in siben sonderbare Bücher unterschieden*, Corthoys, **1614**.
- [37] B. Mang, M. Wolters, B. Schmitt, K. Kelb, R. Lichtinghagen, D. O. Stichtenoth, A. Hahn, *Eur. J. Clin. Invest.* **2006**, *36*, 340–344.
- [38] A. Khan, M. Safdar, M. M. Ali Khan, K. N. Khattak, R. A. Anderson, *Diabetes Care* **2003**, *26*, 3215–3218.
- [39] T. Lechler, "Wässriger Zimtextrakt TC 112 – unverzichtbarer Bestandteil in der Ernährungstherapie des Typ-2- Diabetikers - Dr. rer. nat. Tobias Lechler - OM & Ernährung," can be found under <https://www.omundernaehrung.com/waessriger->

- zimtextrakt-tc-112-unverzichtbarer-bestandteil-in-der-ernaehrungstherapie-des-typ-2-diabetikers-dr-rer-nat-tobias-lechler.html, **2006**.
- [40] E. Knoevenagel, *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1898**, *31*, 2596–2619.
- [41] T. Takahashi, M. Miyazawa, *Pharm.- Int. J. Pharm. Sci.* **2010**, *65*, 913–918.
- [42] H. E. Simmons, R. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 5323–5324.
- [43] A. Burger, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 3415–3416.
- [44] W. Schneider, E. Kämmerer, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1966**, *299*, 817–833.
- [45] B. Das, V. S. Reddy, M. Krishnaiah, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8471–8473.
- [46] G. Giorgioni, B. Accorroni, A. Di Stefano, G. Marucci, A. Siniscalchi, F. Claudi, *Med. Chem. Res.* **2005**, *14*, 57–73.
- [47] W. Albrecht, R. Selig, R. Sebastian, R. Guserle, A. Maier, *Prodrugs of Monomethyl Fumarate (Mmf)*, Patent PS., **2013**.
- [48] D. Sakuma, J. Ito, R. Sakai, R. Taguchi, Y. Nishii, *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 610–611.
- [49] J. Xie, F. Yang, M. Zhang, C. Lam, Y. Qiao, J. Xiao, D. Zhang, Y. Ge, L. Fu, D. Xie, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 131–134.
- [50] C. Chiao, A. M. Carothers, D. Grunberger, G. Solomon, G. A. Preston, J. C. Barrett, **1995**, 3576–3583.
- [51] H. K. Erdemli, S. Akyol, F. Armutcu, M. A. Gulec, M. Canbal, O. Akyol, *Life Sci.* **2016**, *148*, 305–312.
- [52] D. Grunberger, R. Banerjee, K. Eisinger, E. M. Oltz, L. Efros, M. Caldwell, V. Estevez, K. Nakanishi, *Experientia* **1988**, *44*, 230–232.
- [53] İ. Gülçin, A. Scozzafava, C. T. Supuran, H. Akincioğlu, Z. Koksall, F. Turkan, S. Alwasel, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 1095–1101.
- [54] A. W. K. de Jong, *Berichte Dtsch. Chem. Ges. B Ser.* **1923**, *56*, 818–832.
- [55] “Truxillsäuren und Truxinsäuren - RÖMPP, Thieme,” can be found under <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-20-03363>, **2019**.
- [56] G. Domínguez, J. Pérez-Castells, *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **2016**, *22*, 6720–6739.
- [57] D. M. Bassani, V. Darcos, S. Mahony, J.-P. Desvergne, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8795–8796.
- [58] M. Krauze-Baranowska, *Acta Pol. Pharm.* **2002**, *59*, 403–410.
- [59] J. Du, T. P. Yoon, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14604–14605.
- [60] M. A. Ischay, M. E. Anzovino, J. Du, T. P. Yoon, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12886–12887.
- [61] W. G. Herkstroeter, S. Farid, *J. Photochem.* **1986**, *35*, 71–85.
- [62] A. Lama-Muñoz, M. del Mar Contreras, F. Espínola, M. Moya, A. de Torres, I. Romero, E. Castro, *Food Chem.* **2019**, *293*, 161–168.
- [63] N. Vural, Ö. Algan Cavuldak, A. Kenar, M. A. Akay, *Sep. Sci. Technol.* **2019**, 1–16.
- [64] M. Scognamiglio, B. D’Abrosca, V. Fiumano, M. Golino, A. Esposito, A. Fiorentino, *Phytochem. Lett.* **2014**, *8*, 163–170.
- [65] I. Andreadou, D. Benaki, P. Efentakis, S.-I. Bibli, A.-I. Milioni, A. Papachristodoulou, A. Zoga, A.-L. Skaltsounis, E. Mikros, E. Iliodromitis, *Planta Med.* **2014**, *81*, 655–663.

- [66] F. Hadrach, A. Mahmoudi, Z. Bouallagui, I. Feki, H. Isoda, B. Feve, S. Sayadi, *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *252*, 54–60.
- [67] Z. Janahmadi, A. A. Nekooeian, A. R. Moaref, M. Emamghoreishi, *Cardiovasc. Toxicol.* **2015**, *15*, 61–68.
- [68] A. Nekooeian, A. Khalili, M. Khosravi, *Indian J. Pharmacol.* **2014**, *46*, 398–403.
- [69] S. H. Omar, *Saudi Pharm. J.* **2010**, *18*, 111–121.
- [70] S. Al-Quraishy, M. S. Othman, M. A. Dkhil, A. E. Abdel Moneim, *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *91*, 338–349.
- [71] I. Hassen, H. Casabianca, K. Hosni, *J. Funct. Foods* **2015**, *18*, 926–940.
- [72] A. R. Khalatbary, H. Ahmadvand, *Neurol. Res.* **2012**, *34*, 44–51.
- [73] S. Pourkhodadad, M. Alirezaei, M. Moghaddasi, H. Ahmadvand, M. Karami, B. Delfan, Z. Khanipour, *J. Physiol. Sci.* **2016**, *66*, 397–405.
- [74] H. Yu, P. Liu, H. Tang, J. Jing, X. Lv, L. Chen, L. Jiang, J. Xu, J. Li, *Eur. J. Pharmacol.* **2016**, *775*, 113–119.
- [75] O. Benavente-García, J. Castillo, J. Lorente, M. Alcaraz, *J. Med. Food* **2002**, *5*, 125–135.
- [76] R. Domitrović, H. Jakovac, V. V. Marchesi, I. Šain, Ž. Romić, D. Rahelić, *Pharmacol. Res.* **2012**, *65*, 451–464.
- [77] A. Hegazy, A. Abdel-Azeem, H. Zeidan, K. Ibrahim, E. E. Sayed, *Hum. Exp. Toxicol.* **2018**, *37*, 420–430.
- [78] W. Hur, S. W. Kim, Y. K. Lee, J. E. Choi, S. W. Hong, M. J. Song, S. H. Bae, T. Park, S.-J. Um, S. K. Yoon, *Nutr. Res.* **2012**, *32*, 778–786.
- [79] S. W. Kim, W. Hur, T. Z. Li, Y. K. Lee, J. E. Choi, S. W. Hong, K.-S. Lyoo, C. R. You, E. S. Jung, C. K. Jung, et al., *Exp. Mol. Med.* **2014**, *46*, e92.
- [80] Y. Kim, Y. Choi, T. Park, *Biotechnol. J.* **2010**, *5*, 950–960.
- [81] A. Mahmoudi, F. Hadrach, I. Feki, H. Ghorbel, Z. Bouallagui, R. Marrekchi, H. Fourati, S. Sayadi, *Food Funct.* **2018**, *9*, 3220–3234.
- [82] J.-S. Cheng, C.-T. Chou, Y.-Y. Liu, W.-C. Sun, P. Shieh, D.-H. Kuo, C.-C. Kuo, C.-R. Jan, W.-Z. Liang, *Food Chem. Toxicol.* **2016**, *91*, 151–166.
- [83] M. H. Elamin, S. S. AL-Maliki, *Int J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2014**, *52*, 880–888.
- [84] M. Leri, R. Oropesa-Nuñez, C. Canale, S. Raimondi, S. Giorgetti, E. Bruzzone, V. Bellotti, M. Stefani, M. Bucciantini, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2018**, *1862*, 1432–1442.
- [85] A. Papachristodoulou, M. Tsoukala, D. Benaki, S. Kostidis, K. Gioti, N. Aligiannis, H. Pratsinis, D. Kletsas, A.-L. Skaltsounis, E. Mikros, et al., *J. Cancer Res. Treat.* **2018**, *4*, 61–68.
- [86] P. Samara, N. Christoforidou, C. Lemus, A. Argyropoulou, K. Ioannou, K. Vougiannopoulou, N. Aligiannis, E. Paronis, N. Gaboriaud-Kolar, O. Tsitsilonis, et al., *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *137*, 11–29.
- [87] K. J. Park, W. S. Suh, L. Subedi, S. Y. Kim, S. U. Choi, K. R. Lee, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2017**, *65*, 359–364.

- [88] A. Casado-Díaz, J. Anter, S. Müller, P. Winter, J. M. Quesada-Gómez, G. Dorado, *Food Funct.* **2017**, *8*, 1254–1270.
- [89] A. Bianco, G. Naccarato, P. Passacantilli, G. Righi, M. L. Scarpati, *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 760–766.
- [90] J. J. Reyes, B. Villanueva, J. A. López-Villodres, J. P. De La Cruz, L. Romero, M. D. Rodríguez-Pérez, G. Rodríguez-Gutierrez, J. Fernández-Bolaños, J. A. González-Correa, *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 4378–4383.
- [91] M. Fitó, M. Cladellas, R. de la Torre, J. Martí, M. Alcántara, M. Pujadas-Bastardes, J. Marrugat, J. Bruguera, M. C. López-Sabater, J. Vila, M. I. Covas, *Atherosclerosis* **2005**, *181*, 149–158.
- [92] R. Estruch, E. Ros, J. Salas-Salvadó, M.-I. Covas, D. Corella, F. Arós, E. Gómez-Gracia, V. Ruiz-Gutiérrez, M. Fiol, J. Lapetra, R. M. Lamuela-Raventos, L. Serra-Majem, X. Pintó, J. Basora, M. A. Muñoz, J. V. Sorlí, J. A. Martínez, M. Fitó, A. Gea, M. A. Hernán, M. A. Martínez-González, *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, e34.
- [93] J. Marrugat, M. Fitó, H. Schröder, E. Miró-Casas, E. Gimeno, M. C. López-Sabater, R. de la Torre, M. Farré, *Eur. J. Nutr.* **2004**, *43*, 140–147.
- [94] A. Pedret, Ú. Catalán, S. Fernández-Castillejo, M. Farràs, R.-M. Valls, L. Rubió, N. Canela, G. Aragonés, M. Romeu, O. Castañer, R. de la Torre, M.-I. Covas, M. Fitó, M.-J. Motilva, R. Solà, *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0129160.
- [95] R. Takeda, T. Koike, I. Taniguchi, K. Tanaka, *Phytomedicine* **2013**, *20*, 861–864.
- [96] S. Tejada, S. Pinya, M. del Mar Bibiloni, J. A. Tur, A. Pons, A. Sureda, *Curr. Drug Targets* **2017**, *18*, 1477–1486.
- [97] E. Lopez-Huertas, J. Fonolla, *Redox Biol.* **2017**, *11*, 384–389.
- [98] B. Braam, M. Langelaar-Makkinje, A. Verkleij, H. Bluysen, T. Verrips, H. A. Koomans, J. A. Joles, J. A. Post, *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *542*, 154–161.
- [99] A. Facchini, S. Cetrullo, S. D’Adamo, S. Guidotti, M. Minguzzi, A. Facchini, R. M. Borzì, F. Flamigni, *PLoS ONE* **2014**, *9*, e109724.
- [100] V. Konstantinidou, O. Khymentis, M.-I. Covas, R. de la Torre, D. Muñoz-Aguayo, R. Anglada, M. Farré, M. Fito, *OMICS J. Integr. Biol.* **2009**, *13*, 431–438.
- [101] F. Casamenti, M. Stefani, *Expert Rev. Neurother.* **2017**, *17*, 345–358.
- [102] M. Debbabi, A. Zarrouk, M. Bezine, W. Meddeb, T. Nury, A. Badreddine, E. M. Karym, R. Sghaier, L. Bretillon, S. Guyot, et al., *Chem. Phys. Lipids* **2017**, *207*, 151–170.
- [103] H. Gardener, M. R. Caunca, *Curr. Nutr. Rep.* **2018**, *7*, 10–20.
- [104] J. López-Miranda, F. Pérez-Jiménez, E. Ros, R. De Caterina, L. Badimón, M. I. Covas, E. Escrich, J. M. Ordovás, F. Soriguer, R. Abiá, C. Alarcón de la Castra, M. Battino, D. Corella, J. Chamorro-Quirós, J. Delgado-Lista, D. Giugliano, K. Esposito, R. Estruch, J. M. Fernandez-Real, J. J. Gaforio, C. La Vecchia, D. Lairon, F. López-Segura, P. Mata, J. A. Menéndez, F. J. Muriana, J. Osada, D. B. Panadiotakos, J. A. Paniagua, P. Pérez-Martinez, J. Perona, M. A. Peinado, M. Pireda-Priego, H. E. Poulsen, J. L. Quiles, M. C. Ramírez-Tortosa, J. Ruano, L. Serra-Majem, R. Solá, M. Solanas, V. Solfrizzi, R. de la Torre-Fornell,

- A. Trichopoulou, M. Uceda, J. M. Villialba-Montoro, J. R. Villar-Ortíz, F. Visioli, N. Yiannakouris, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2010**, *20*, 284–294.
- [105] “Enzyme,” can be found under <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/enzyme/3715>, **2019**.
- [106] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres Jr, R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.
- [107] A. Cornish-Bowden, *Biochem. J.* **1974**, *137*, 143–144.
- [108] H. Lineweaver, D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 658–666.
- [109] M. Dixon, *Biochem. J.* **1953**, *55*, 170–171.
- [110] F. Zhang, H. W. Ren, Y. G. Wang, R. Wang, J. Sheng, *Adv. Mater. Res.* **2013**, *634–638*, 1225–1228.
- [111] A. Marston, J. Kissling, K. Hostettmann, *Phytochem. Anal.* **2002**, *13*, 51–54.
- [112] Z. Yang, X. Zhang, D. Duan, Z. Song, M. Yang, S. Li, *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 3257–3259.
- [113] Z.-D. Yang, Z.-W. Song, J. Ren, M.-J. Yang, S. Li, *Phytochem. Anal.* **2011**, *22*, 509–515.
- [114] G. Angeloni, L. Guerrini, P. Masella, M. Innocenti, M. Bellumori, A. Parenti, *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 391–399.
- [115] S. Lafay, A. Gil-Izquierdo, *Phytochem. Rev.* **2008**, *7*, 301–311.
- [116] V. L. Singleton, P. Esau, *Adv. Food Res. Suppl.* **1969**, *1*, 1–261.
- [117] O. Doebner, *Ber. Dt. Chem. Ges.* **1902**, *35*, 1147–1148.
- [118] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791.
- [119] F. Schröder, *Chem. Biodivers.* **2014**, *11*, 1734–1751.
- [120] A. Gunia-Krzyżak, K. Słoczyńska, J. Popiół, P. Koczurkiewicz, H. Marona, E. Pękała, *Int. J. Cosmet. Sci.* **2018**, *40*, 356–366.
- [121] M. C. Foletto, S. E. Haas, *An. Bras. Dermatol.* **2014**, *89*, 301–310.
- [122] Y.-T. Lee, M.-J. Don, P.-S. Hung, Y.-C. Shen, Y.-S. Lo, K.-W. Chang, C.-F. Chen, L.-K. Ho, *Cancer Lett.* **2005**, *223*, 19–25.
- [123] A. Maresca, G. Akyuz, S. M. Osman, Z. AlOthman, C. T. Supuran, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 7181–7188.
- [124] T. Eicher, M. Ott, A. Speicher, *Synth.* **1996**, 755–766.
- [125] “Gewöhnlicher Liguster,” can be found under https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Gew%C3%B6hnlicher_Liguster&oldid=188228870, **2019**.

6. Abkürzungsverzeichnis

AChE	Acetylcholinesterase
BChE	Butyrylcholinesterase
CAPE	caffeic acid phenethyl ester (Kaffeesäurephenethylester)
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀ -Wert	mittlere effektive Konzentration
GSK-3	glycogen synthase kinase-3
IC ₅₀ -Wert	mittlere inhibitorische Konzentration
K _i und K _{i'}	Inhibierungskonstanten
R _F -Wert	ratio of fronts (Retentionswert für DC)
SRB	Sulforhodamin B

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die am meisten verwendeten Wirkstoffe zur Bekämpfung von Alzheimer.	2
Abbildung 2: Struktur analogon vom Donepezil – das Indanonamid.	3
Abbildung 3: Grundgerüste der synthetisierten Isatin-Derivate.	4
Abbildung 4: Zimtsäure-Grundgerüst mit drei Varianten der Substitution.	5
Abbildung 5: Durchgeführte Doppelbindungssubstitutionen.	6
Abbildung 6: Isomere der Truxinsäuren. ^[54,55]	7
Abbildung 7: Oleuropein.	8
Abbildung 8: Struktur des Hydroxytyrosols.	8
Abbildung 9: Sulforhodamin B (SRB).	10
Abbildung 10: Die drei Arten der reversiblen Enzymhemmung. ^[105]	12
Abbildung 11: Vergleich Strukturen und Aktivitäten gegenüber MCF-7.	14
Abbildung 12: Isatin-Derivate im Vergleich zwischen a) Fast Blue B Test und b) Azur Blau II Test.	14
Abbildung 13: Cyclopropan statt Doppelbindung.	16
Abbildung 14: Sehr guter AChE-Inhibitor P3-15.	17
Abbildung 15: Verbindung P3-26.	17
Abbildung 16: Dimer mit Cholin-Rest und mit Ethyl-Rest.	19
Abbildung 17: Gewinnung von Oleuropein aus Gewöhnlichem Liguster ^[124]	20

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Zelllinien und der jeweilige Zelltyp.	11
Tabelle 2: Übersicht über die aktivsten Cholinesterase-Inhibitoren des Manuskriptes 1.....	13
Tabelle 3: Unerwartet stabile Anhydrid-Inhibitoren gegenüber AChE.....	15
Tabelle 4: Darstellung der aktivsten Verbindungen von P3.....	18

Anhang

Publikationen

Im Folgenden werden das dieser Arbeit zugrunde liegende Manuskript (M1) und die Publikationen (P1 bis P5) aufgelistet.

M1: „Development of indanones and isatins as non-cytotoxic inhibitors of cholinesterases”

J. M. Gießel, A. Loesche, S. Hoenke, I. Serbian, A. Al-Harrasi, René Csuk, **2019**, unpublished.

P1: „Substituted cinnamic anhydrides act as selective inhibitors of acetylcholinesterase”

J. M. Gießel, I. Serbian, A. Loesche, R. Csuk, *Bioorganic Chem.* **2019**, *90*, 103058.

P2: „In search of new cinnamic acid derived flavours and fragrances”

J. M. Gießel, A. Loesche, S. Hoenke, R. Csuk *Results Chem.* **2019**, *1*, 100010.

P3: „Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)-derivatives act as selective inhibitors of acetylcholinesterase”

J. M. Gießel, A. Loesche, I. Serbian, R. Csuk *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *177*, 259 – 268.

P4: „Synthesis of sinapine and its unprecedented ruthenium-catalyzed [2+2] photodimerization”

J. M. Gießel, T. Kohlmann, T. Zeitz, R. Kluge, R. Csuk *Mediterr. J. Chem.* **2019**, *9*, 258 – 265.

P5: „Facile access to oleuropein and hydroxytyrosol from *Ligustrum vulgare* – a plant material growing all over Eurasia”

J. M. Gießel, A. Zaar, R. Schäfer, A. Al-Harrasi, R. Csuk *Mediterr. J. Chem.* **2018**, *7*, 217 – 222.

Manuskript M1

Development of indanones and isatins as non-cytotoxic inhibitors of cholinesterases

J. M. Gießel, A. Loesche, S. Hoenke, I. Serbian, A. Al-Harrasi, René Csuk, **2019**, unpublished.

Abstract

A small library of indanone-amides and substituted isatin derivatives has been prepared; these compounds have been investigated for their ability to act as inhibitors for the enzymes acetyl- and butyrylcholinesterase (AChE, BChE). Several of them were moderate inhibitors for AChE and not cytotoxic for a variety of human tumor cell lines as well as for non-malignant mouse fibroblasts. In this library consisting of 49 derivatives, 5,7-dibromo-4-iodoisatin (**18c**) was shown to be a good mixed-type inhibitor for AChE ($K_i = 2.52 \pm 0.61 \mu\text{M}$ and $K_{i'} = 11.74 \pm 1.31 \mu\text{M}$) but this compound also acted as a dual inhibitor for BChE ($K_i = 4.49 \pm 0.32 \mu\text{M}$ and $K_{i'} = 6.56 \pm 0.57 \mu\text{M}$). Interestingly, *N*-hexyl-1-oxo-2,3-dihydro-1H-indene-2-carboxamide (**14**) was cytotoxic especially for MCF-7 breast adenocarcinoma cells ($EC_{50} = 4.28 \pm 0.5 \mu\text{M}$).

Keywords

acetylcholinesterase; butyrylcholinesterase; inhibitors; isatins; indanons

Publikation P1**Substituted cinnamic anhydrides act as selective inhibitors of
acetylcholinesterase**

J. M. Gießel, I. Serbian, A. Loesche, R. Csuk, *Bioorganic Chem.* **2019**, *90*, 103058.

Abstract

Cinnamic anhydrides have been shown to be more than reactive reagents, but they also act as inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase (AChE). Thus, out of a set of 33 synthesised derivatives, several of them were mixed type inhibitors for AChE (from electric eel). Thus, (*E*)-3-(2,4-dimethoxyphenyl)acrylic anhydride (**2c**) showed $K_i = 8.30 \pm 0.94 \mu\text{M}$ and $K_r = 9.54 \pm 0.38 \mu\text{M}$, and for (*E*)-3-(3-chlorophenyl)acrylic anhydride (**2u**) $K_i = 8.23 \pm 0.93 \mu\text{M}$ and $K_r = 13.07 \pm 0.46 \mu\text{M}$ were measured. While being not cytotoxic to many human cell lines, these compounds showed an unprecedented and noteworthy inhibitory effect for AChE but not for butyrylcholinesterase (BChE).

Keywords

cinnamic anhydrides; acetylcholinesterase; butyrylcholinesterase; inhibitors

DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103058

Publikation P2**In search of new cinnamic acid derived flavours and fragrances**

J. M. Gießel, A. Loesche, S. Hoenke, R. Csuk *Results Chem.* **2019**, *1*, 100010.

Abstract

In the search for new, non-cytotoxic substances for use as flavours and fragrances, isovanillin (**1**), vanillin (**6**), 3,4-dimethoxy-styrene (**11**) and veratraldehyde (**14**) were used as starting materials to access cyclopropanated analogues as well as analogues holding an additional oxirane or thiirane ring. The olfactory examination of the compounds showed that all compounds smell like cinnamon, but hold also an amber note; they are fruity and to some extent balsamic. It can safely be assumed that none of the substances has a major impact on cholinesterases, since their rate of inhibition for acetylcholinesterase (from *Electrophorus electricus*) and butyrylcholinesterase (from *equine serum*) and their cytotoxicity was far too low to have physiological effects to be expected.

Keywords

flavour; fragrance; cinnamic acid

DOI: 10.1016/j.rechem2019.100010

Publikation P3**Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)-derivatives act as selective inhibitors of acetylcholinesterase**

J. M. Gießel, A. Loesche, I. Serbian, R. Csuk *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *177*, 259 – 268.

Abstract

Unexpected inhibitory effects against *ee*AChE could be found for a newly synthesized class of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) derivatives. Thus, phenethyl-(*E*)-3-(3,5-dimethoxy-4-phenethoxyphenyl)-acrylate ($K_i = 1.97 \pm 0.38 \mu\text{M}$ and $K_r = 2.44 \pm 0.07 \mu\text{M}$) and 4-(2-(((*E*)-3-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)acryloyl)oxy)ethyl)-1,2-phenylene (*2E,2'E*)-bis(3-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)acrylate) ($K_i = 0.72 \pm 0.31 \mu\text{M}$ and $K_r = 1.80 \pm 0.21 \mu\text{M}$) showed very good inhibition of *ee*AChE, while being non cytotoxic for malignant human cancer cells and non-malignant mouse fibroblasts. Also, they are weak inhibitors for BChE (from *equine serum*).

Keywords

cinnamic acid phenethyl esters; caffeic acid phenethyl ester; acetylcholinesterase; butyrylcholinesterase; inhibitors

DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.05.059

Publikation P4**Synthesis of sinapine and its unprecedented ruthenium-catalyzed [2+2]
photodimerization**

J. M. Gießel, T. Kohlmann, T. Zeitz, R. Kluge, R. Csuk *Mediterr. J. Chem.* **2019**, *9*, 258 – 265.

Abstract

Sinapine was easily synthesized from commercially available starting materials in an overall yield of 32 % while 0.47 % were obtained by its extraction from white mustard. Irradiation of **1** in the presence of Ru(dndp)₃Cl₂ furnished in a [2+2] cycloaddition cyclobutanoid dimer, a δ-truxinic acid. The putative mechanism of this reaction was supported by DFT calculations.

Keywords

sinapic acid; sinapine; dimerization; photoinduced; truxinic acid; ruthenium catalyst

DOI: 10.13171/mjc941911051057rc

Publikation P5**Facile access to oleuropein and hydroxytyrosol from *Ligustrum vulgare* – a plant material growing all over Eurasia**

J. M. Gießel, A. Zaar, R. Schäfer, A. Al-Harrasi, R. Csuk *Mediterr. J. Chem.* **2018**, 7, 217 – 222.

Abstract

Leaves of *Ligustrum vulgare* are an alternative, sustainable source for oleuropein. Acidic hydrolysis of oleuropein furnishes hydroxytyrosol in good yield. This approach is one of the most convenient ways to access significant amounts of oleuropein as well as of hydroxytyrosol from plant material readily accessible all over the year and throughout Eurasia. Harvesting the leaves in winter doubles the amount of oleuropein that can be extracted from the plant material.

Keywords

oleuropein; hydroxytyrosol; *Ligustrum vulgare*; extraction

DOI: 10.13171/mjc7318101113-csuk

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Josephine Michelle Gießel

Geburtsdatum: 01.03.1991

Geburtsort: Magdeburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildungsweg

Seit 01/2015 Promotionsstudium am Institut für Chemie im Bereich Organische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Prof. Dr. René Csuk

10/2012 – 11/2014 Master of Science Chemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

10/2009 – 09/2012 Bachelor of Science Chemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

08/2003 – 07/2009 Allgemeine Hochschulreife
Europaschule Gymnasium Stephaneum Aschersleben

Auszeichnungen & Stipendien

01/2015 – 12/2017 Promotions-Stipendiatin
Stiftung der Deutschen Wirtschaft (sdw)

06/2011 – 11/2014 Stipendiatin
Stiftung der Deutschen Wirtschaft (sdw)

Publikationsliste

„Synthesis of sinapine and its unprecedented ruthenium-catalyzed [2+2] photodimerization”

J. M. Gießel, T. Kohlmann, T. Zeitz, R. Kluge, R. Csuk, *Mediterr. J. Chem.* **2019**, *9*, 258 – 265.

„In search of new cinnamic acid derived flavours and fragrances”

J. M. Gießel, A. Loesche, S. Hoenke, R. Csuk *Results Chem.* **2019**, *1*, 100010.

„Substituted cinnamic anhydrides act as selective inhibitors of acetylcholinesterase”

J. M. Gießel, I. Serbian, A. Loesche, R. Csuk, *Bioorganic Chem.* **2019**, *90*, 103058.

„Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)-derivatives act as selective inhibitors of acetylcholinesterase”

J. M. Gießel, A. Loesche, I. Serbian, R. Csuk *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *177*, 259 – 268.

„Facile access to oleuropein and hydroxytyrosol from *Ligustrum vulgare* – a plant material growing all over Eurasia”

J. M. Gießel, A. Zaar, R. Schäfer, A. Al-Harrasi, R. Csuk *Mediterr. J. Chem.* **2018**, *7*, 217 – 222.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe, und dass ich alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken, auch elektronischen Medien, entnommen sind, durch Angabe der Quellen als Entlehnung kenntlich gemacht habe.

Halle, den 03.11.2019

Josephine Michelle Gießel