

**Synthese von Triterpenderivaten  
und ihre biologische Evaluierung hinsichtlich  
Zytotoxizität und  
Inhibierung von Cholinesterasen**

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

Frau Lucie Heller

geb. am 15.06.1987 in Lutherstadt Eisleben

Gutachter: Prof. Dr. R. Csuk (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)  
Prof. Dr. R. Beckert (Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Tag der Verteidigung: 03. Juli 2017



## Danksagung

Ich danke Prof. Dr. R. Csuk für die Überlassung des interessanten Themas verbunden mit den vielen Ausgestaltungsmöglichkeiten, die ich mir im Rahmen der Arbeit selbst wählen konnte, für die langjährige Betreuung und Zusammenarbeit seit 2009 und für die eingeräumten Möglichkeiten, meine Forschungsergebnisse im In- und Ausland präsentieren zu können.

Bei Prof. Dr. R. Paschke möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, die Arbeiten an der Zellkultur im Rahmen der Gründerwerkstatt durchführen zu können. Fr. M.Sc. G. Liebscher möchte ich für die schöne Zeit und die anregenden Diskussionen im Biozentrum danken und auch Fr. Dr. I. Z. Pavel, die mich in der Zeit ihres Aufenthaltes bei der biologischen Evaluierung unterstützt hat. Vielen Dank an Fr. Dr. B. Siewert für die Einarbeitung in die Zellkultur und die unvergessliche Zeit.

Meinen Kollegen und Freunden S. Sommerwerk und A.E. Kramell sei gedankt für die fachlichen Diskussionen und gelungene Zusammenarbeit und auch J. Wiemann für die stetige Hilfsbereitschaft. Ein besonderer Dank gilt Fr. Dr. R. Schäfer, die seit Beginn meiner Bachelorarbeit immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Des Weiteren danke ich der gesamten Arbeitsgruppe und ihren ehemaligen Mitgliedern für die gemeinsame Zeit und die entgegengebrachte Unterstützung. Ein besonderer Dank gilt Fr. B.Sc. F. Flemming, Fr. M.Sc. A. Obernauer, Hr. M.Sc. V. Perl, Fr. B.Sc. P. Grabandt, Fr. M.Sc. A. Knorrscheidt, Hr. M.Sc. B. Weber und Hr. M.Sc. M. Kahnt, die mit ihrem Fleiß zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die Aufnahme von zahlreichen ESI-Massenspektren bedanke ich mich bei Hr. Dr. R. Kluge. Fr. J. Pech danke ich für die durchgeführten Elementaranalysen. Dem NMR-Team um Hr. Dr. D. Ströhl, Fr. Y. Schiller und Fr. B.Sc. S. Kuring möchte ich für die Aufnahme der NMR-Spektren danken. Bei Fr. M.Sc. J. Wiese bedanke ich mich für die durchgeführten IR- und Drehwertmessungen.

Hr. Dr. S. Schwarz möchte ich für die Bestimmung der ChE-Inhibierungsfähigkeit für den Großteil der Verbindungen danken, aber vor allem auch für den Austausch von Erfahrungen und die gemeinsame Zeit. Fr. M.Sc. A. Loesche danke ich ebenfalls für die Durchführung, die Auswertung und den Einblick in die Testungen. Bei Hr. Dr. W. Brandt möchte ich mich für die Durchführung der Molecular Modelling-Untersuchungen bedanken.

Außerdem danke ich meiner Familie dafür, dass sie zu jeder Zeit für mich da ist und ich immer auf sie zählen kann!

## **Vorwort**

Diese vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Januar 2012 bis Dezember 2016 am Institut für Chemie im Bereich Organische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Arbeitskreis von Prof. Dr. René Csuk. Die vorliegende Dissertation wurde in kumulativer Form angefertigt. Die Forschungsergebnisse sind bereits in internationalen englischsprachigen „peer-reviewed“ Fachzeitschriften erschienen. Dort sind alle experimentellen Daten, die Ergebnisse und deren Diskussion nachzulesen. Im Mittelpunkt dieser Dissertation stehen die Einordnung der Forschungsergebnisse, sowie eine übergreifende Diskussion der wissenschaftlichen Veröffentlichungen.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	V
1. Einleitung .....	1
1.1. Ein Einblick in die Geschichte der Triterpenforschung .....	1
1.2. Die Klassifizierung der Triterpene .....	5
1.3. Die pharmakologischen Eigenschaften der Triterpene .....	7
2. Grundlagen und Stand der Forschung.....	9
2.1. Pentazyklische Triterpene – potentielle Wirkstoffe zur Behandlung maligner Tumore.....	9
2.1.1. Die Krankheit Krebs und ihre Behandlung .....	9
2.1.2. Zytostatika.....	11
2.1.2.1. Die Zelltod-Modalitäten .....	11
2.1.2.2. Methoden zur Aufklärung der Zelltod-Modalitäten.....	12
2.1.3. Die zytotoxischen Eigenschaften der pentazyklischen Triterpene .....	13
2.2. Pentazyklische Triterpene – potentielle Wirkstoffe zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit .....	15
2.2.1. Die Pathogenese der Alzheimer-Krankheit und ihre Behandlung.....	15
2.2.2. Cholinesterase-Inhibitoren .....	17
2.2.2.1. Selektivität .....	18
2.2.2.2. Wirkungsmechanismus – Enzymkinetik .....	19
2.3. Die Eigenschaften der pentazyklischen Triterpenoide .....	20
3. Zielstellung .....	22
4. Ergebnisse .....	23
4.1. Pentazyklische Triterpenderivate als potentielle Zytostatika .....	23
4.2. Pentazyklische Triterpenderivate als Cholinesterase-Inhibitoren .....	27
4.3. Übergreifende Diskussion .....	30
5. Zusammenfassung und Ausblick .....	35
6. Literaturverzeichnis .....	37
Anhang .....	40
Lebenslauf .....	VI
Erklärung zu den Autorenanteilen der Publikationen .....	XII
Selbständigkeitserklärung .....	XIV

## Abkürzungsverzeichnis

AChE	Acetylcholinesterase
AD	Alzheimer-Demenz
AO	Acridinorange
B10	28- <i>O</i> -Acetyl-betulin-3-yl- $\beta$ -D-glucopyranosid
BA	Betulinsäure
BChE	Butyrylcholinesterase
ChE	Cholinesterase
CDDO	2-Cyano-3,12-dioxo-olean-1,9-dien-28-säure, Bardoxolon
CDDO-Me	2-Cyano-3,12-dioxo-olean-1,9-dien-28-säuremethylester
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHA	Docosahexaensäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC <sub>50</sub>	Mittlere effektive Konzentration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GA	Glycyrrhetinsäure
IPMB	Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie
NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death
NCI	National Cancer Institute
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NVX-207	3- <i>O</i> -Acetyl-betulinsäure-(2-amino-3-hydroxy-2-hydroxymethyl)-propylester
OA	Oleanolsäure
PA	Platansäure
PAS	Peripheral Anionic Site, periphere anionische Bindungsstelle
PI	Propidiumiodid
ROS	Reactive Oxygen Species, reaktive Sauerstoffspezies
SI	Selektivitätsindex
Topo	Topoisomerase
UA	Ursolsäure
UV	Ultraviolett

## 1. Einleitung

Eines der wohl wertvollsten Güter des Altertums war *sntr*; aus dem altägyptischen *sntr* wurde später sprachlich *frankincense* – das Harz des Weihrauchs. Über bedeutungsvolle Handelswege wurde diese Kostbarkeit bereits im 3. Jahrtausend v.Chr. nach Ägypten importiert.<sup>[1]</sup> Archäologische und ikonographische Funde belegen, dass Weihrauch als Räucherwerk für kultische Zwecke verwendet wurde. Eine der bekanntesten Aufzeichnungen ägyptischer Arzneimittel, der Papyrus Ebers (1600 v.Chr.)<sup>[2]</sup>, beinhaltet eine Vielzahl von Zubereitungen, die auf der Verwendung von *sntr* basieren.

Das Harz der Weihrauchbäume (*Olibanum*, *Salai guggal*) der Gattung *Boswellia* enthält bis zu 300 verschiedene Inhaltsstoffe.<sup>[3]</sup> Für die desinfizierende und entzündungshemmende Wirkung des Weihrauchs sind u.a. die enthaltenen Boswelliasäuren, als Vertreter der pentazyklischen Triterpenoide, verantwortlich. Die pharmakologischen Eigenschaften dieser Substanzklasse finden seit jeher Anwendung in der traditionellen Medizin; das Wissen über die einzelnen, wirksamen Inhaltsstoffe ist jedoch gerade einmal wenige Jahrzehnte alt. Vor welchen Herausforderungen die Wissenschaftler des 20. Jahrhunderts bei der Identifizierung der Inhaltsstoffe standen, zeigt ein Blick in die Geschichte.

### 1.1. Ein Einblick in die Geschichte der Triterpenforschung

Einer der bedeutendsten Schritte auf dem Weg der Identifizierung von Naturstoffen war die Strukturaufklärung der Verbindungen. Dabei spielte die von O. WALLACH im Jahr 1887 beschriebene Annahme über die Aufteilbarkeit des Kohlenstoffgerüsts in Isoprenmoleküle<sup>[4]</sup> eine sehr wichtige Rolle. Der Nobelpreisträger L. RUZICKA erweiterte diese empirisch aufgestellte Isopren-Regel, welche die Grundlage für die Aufklärung zahlreicher Strukturen der Sesquiterpene, Diterpene und Triterpene bildete. Unter Verwendung der Isopren-Regel war es möglich, die Anzahl denkbarer Stellungen von Methyl-, Isopropyl- oder funktionellen Gruppen auf wenige wahrscheinliche einzugrenzen. Die Annahmen von A. ESCHENMOSER über aliphatische Vorstufen und deren Zyklisierungs- und Umlagerungsreaktionen<sup>[5]</sup> gaben einen weiteren wichtigen Impuls für die Strukturaufklärung der Terpene. Basierend auf diesen formal-mechanistischen Zusammenhängen formulierte L. RUZICKA im Jahr 1953 die biogenetische Isoprenregel,<sup>[6],[7]</sup> welche sich als wertvolles Instrument zur Ermittlung der Konstitution von Naturstoffen herausstellte.

Der Arbeitskreis von L. RUZICKA leistete seit Beginn des 20. Jahrhunderts herausragende Arbeit auf dem Gebiet der Terpenforschung. Die Bestimmung von Bruttoformeln verschiedener Terpene und Terpenoide, und vor allem die Konstitutionsaufklärung der jeweiligen Verbindungen zeichnete die Arbeit der Forscher aus. In der Promotionsarbeit eines Doktoranden aus dem Arbeitskreis steht:

Es war ein Ziel unserer Untersuchung, einen Beitrag zur Kenntnis des Kohlenstoffgerüsts zu liefern. Der Weg dazu führt über die jetzt schon klassischen Methoden zur Konstitutionsaufklärung der Triterpenchemie, die sich in den Schlagworten Dehydrierung, Isoprenregel, gegenseitige Umwandlungen und oxydativer Aufbau zusammenfassen lassen. (G. ROSENKRANZ)<sup>[8]</sup>

Im Jahr 1932 erschien ein Beitrag der Autoren L. RUZICKA, H. BRÜNGGER und E. L. GUSTUS in der *Helvetica Chimica Acta*, in dem von einem leicht zugänglichen Triterpen die Rede ist – dem Betulin, dem weißen Pigment der Birkenrinde.<sup>[9]</sup> Betulin wurde bereits 1788 von J. T. LOWITZ<sup>[10]</sup> durch Sublimation aus Birkenrinde isoliert. Erste maßgebende Erkenntnisse lieferte U. HAUSMANN<sup>[11]</sup> im Jahr 1876. Er berichtete über die Reindarstellung und die Eigenschaften des Betulins und führte erste Reaktionen durch, wie die Acetylierung mit Essigsäureanhydrid zur Gewinnung des Diacetats oder die Oxidation mit Chrom(VI)oxid in Eisessig, die zur Bildung von Betulinsäure führte. Die im Jahr 1922 veröffentlichten Resultate von H. SCHULZE und K. PIEROH<sup>[12]</sup> über die Umlagerung des Betulins zum Allobetulin unter Einsatz von 90%iger Ameisensäure gaben der Betulinforschung einen neuen Anstoß. Die Abbildung 1 zeigt den Ausschnitt eines Reaktionsschemas aus einer Veröffentlichung von L. RUZICKA *et al.*<sup>[9]</sup> mit dem Titel „Zur Kenntnis des Betulins“.

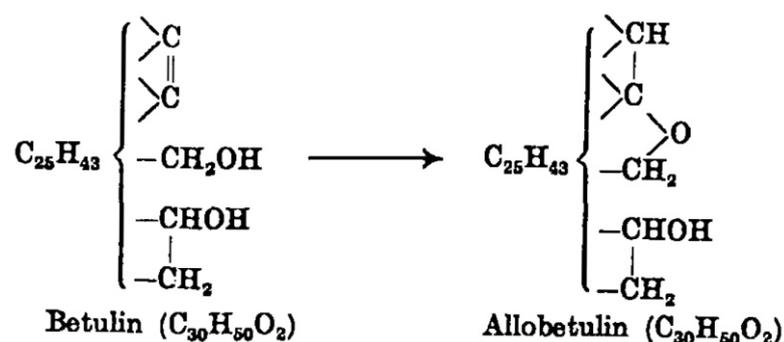
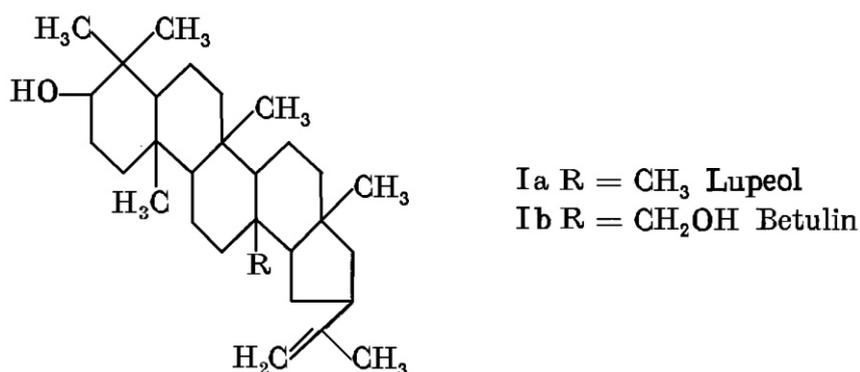


Abb. 1 Ausschnitt eines Reaktionsschemas zur Darstellung von Allobetulin

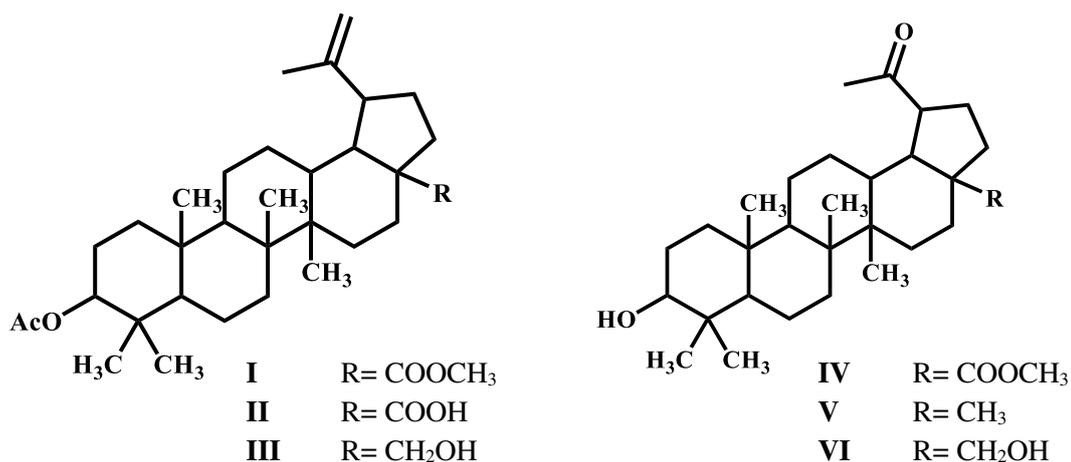
Basierend auf der von K. A. VESTERBERG<sup>[13]</sup> und O. DISCHENDORFER<sup>[14]</sup> korrekt ermittelten Bruttoformel des Betulins  $C_{30}H_{50}O_2$ , sowie den gewonnenen Erkenntnissen über das Verhalten von Betulin und Allobetulin unter Hydrier-, Dehydrier- und oxidativen Bedingungen<sup>[10]</sup>, konnten die Forscher das Vorliegen einer primären und sekundären Hydroxylgruppe, sowie einer Kohlenstoffdoppelbindung (verantwortlich für die Umlagerung des Betulins zum Allobetulin) für das Betulin nachweisen. M. BRENNER und G. ROSENKRANZ, war es gelungen, durch Oxidations- und Abbauersuche am Betulin<sup>[15],[16]</sup> und Lupeol<sup>[8]</sup> das Vorliegen einer Isopropenylgruppe nachzuweisen (Abb. 2). Zuvor war man von einer semizyklischen Lage der Kohlenstoffdoppelbindung ausgegangen. Da bereits durch vorhergehende Experimente die Position der primären und sekundären Hydroxylgruppen am Grundgerüst geklärt worden war, konnte zu diesem Zeitpunkt die Konstitution des Betulins als eindeutig bewiesen angesehen werden.



**Abb. 2** Die Struktur von Lupeol und Betulin entnommen aus der Veröffentlichung von L. RUZICKA und M. BRENNER aus dem Jahr 1940.<sup>[15]</sup>

H. BRÜNGGER beschrieb in seiner Promotionsarbeit<sup>[10]</sup> (1932) auch die Durchführung von Ozonisationsversuchen am Betulin. Als problematisch erwies sich jedoch die vollständige Abtrennung des Lösungsmittels. Erst 10 Jahre später gelang E. REY, unter der Verwendung eines Lösungsmittelgemisches, die Darstellung und Charakterisierung der Spaltprodukte.<sup>[17]</sup> Eine Verbindung konnte als das bereits im Jahr 1940 von L. RUZICKA und M. BRENNER<sup>[15]</sup> synthetisierte Dioxy-nor-lupanon (Abb. 3, VI) identifiziert werden. Im gleichen Jahr, 1940, synthetisierte A. H. LAMBERTON<sup>[18]</sup> durch die Oxidation von Acetyl-betulinsäuremethylester (Abb. 3, I) und anschließender Verseifung eine weitere Ketoverbindung.

A. H. LAMBERTON nannte diese Verbindung Nor-lupanon-säure-methylester (Abb. 3, **IV**), als Analogie zu den bereits bekannten, und ebenfalls durch Oxidation erhaltenen Produkten, Nor-lupanon (Abb. 3, **V**)<sup>[19]</sup> und Dioxy-nor-lupanon (Abb. 3 **VI**)<sup>[15]</sup>. Acetyl-betulinsäure (Abb. 3, **II**) wurde bereits 1938, durch Oxidation von Betulin-mono-acetat (Abb. 3, **III**) mit Chrom(VI)oxid, synthetisiert.<sup>[20]</sup>



**Abb. 3** Strukturen von Derivaten der Betulinsäure (**I+II**), des Betulins (**III**) und des Nor-lupans (**IV, V, VI**)

Erst 20 Jahre später erhielt die Ketoverbindung ihren heutigen Namen – Platansäure. Bei näheren Untersuchungen von *Platanus occidentalis* L. durch A. F. THOMAS und J. M. MÜLLER<sup>[21]</sup> im Jahr 1961 konnte dieses pentazyklische Triterpen, neben der zuvor bereits bekannten Betulinsäure, als Bestandteil der Rinde nachgewiesen werden. Die endgültige Aufklärung der Struktur gelang R. APLIN *et al.*<sup>[21]</sup>, die zeitgleich Untersuchungen der Rindenextrakte von *Platanus x hybrida* durchführten. Durch die Derivatisierung der aufgereinigten Extrakte und einem anschließenden Vergleich der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Verbindungen mit Referenzsubstanzen<sup>[22]</sup>, konnte 3 $\beta$ -Hydroxy-20-oxo-30-norlupan-28-säure (Platansäure, PA) als Inhaltsstoff beider Arten nachgewiesen werden.

Maßgeblich zur Identifizierung der Platansäure beigetragen haben die zahlreich durchgeführten Partialsynthesen des Arbeitskreises von L. RUZICKA. Doch nicht nur die bereits erwähnten Reaktionen am Betulin und Lupeol waren Teil ihrer wissenschaftlichen Arbeit, auch die Strukturaufklärung von weiteren Triterpenen stand im Fokus der Untersuchungen.

## 1.2. Die Klassifizierung der Triterpene

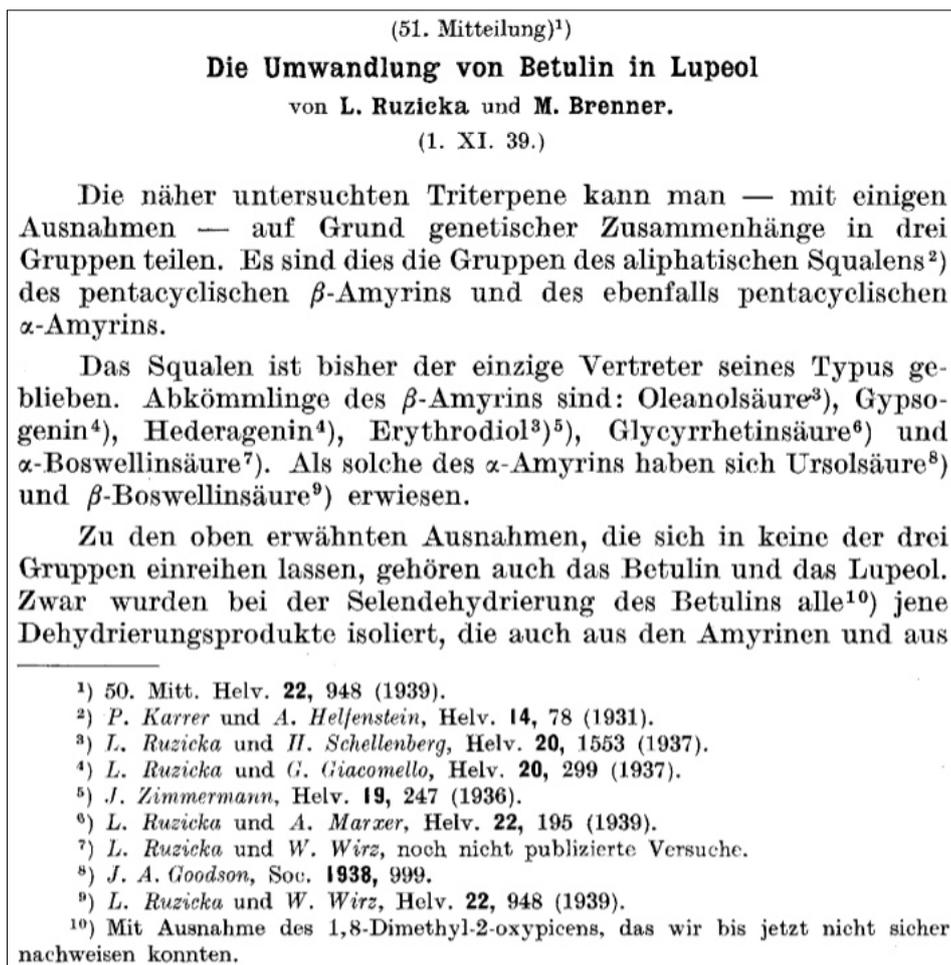
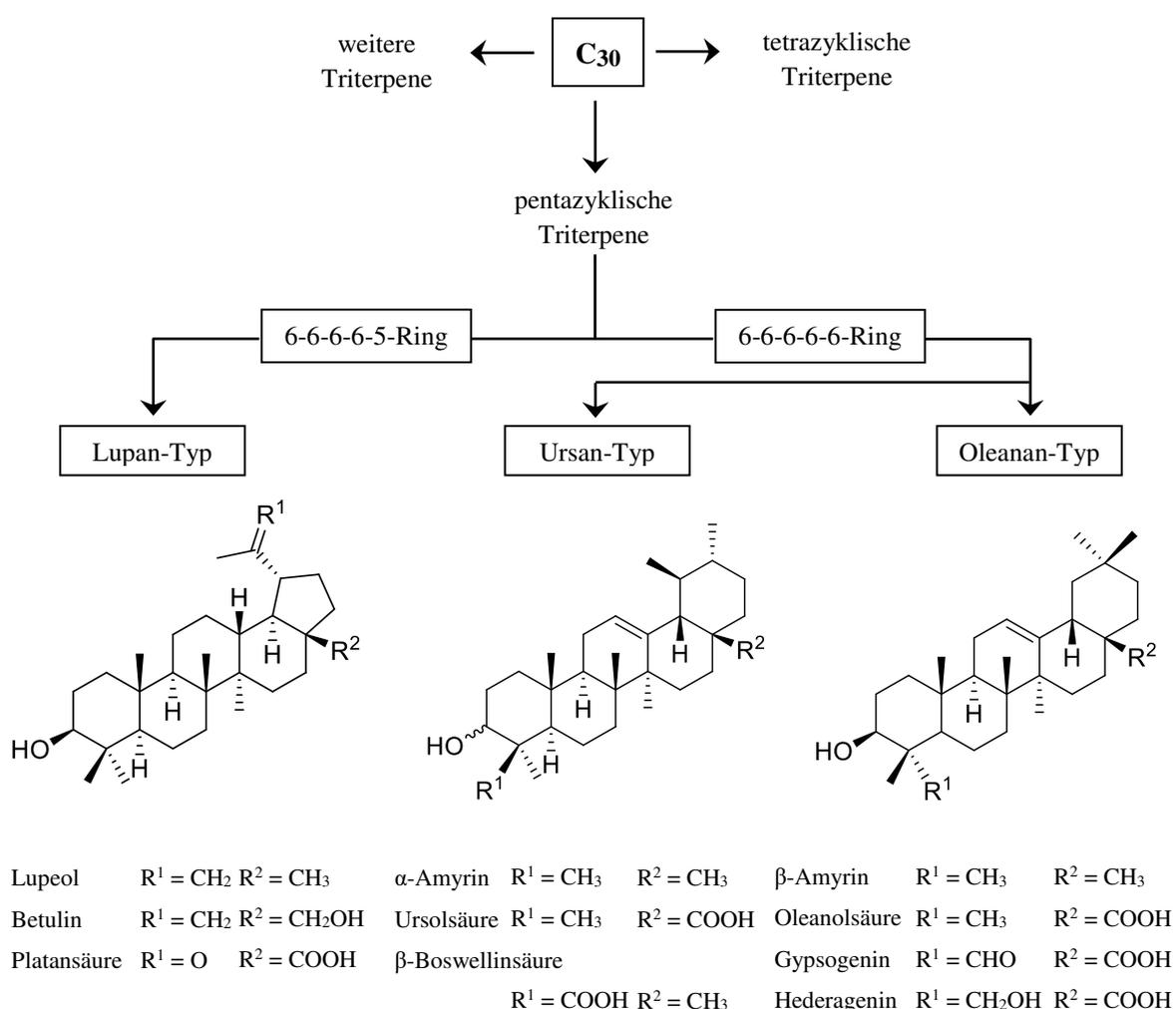


Abb. 4 Ein Ausschnitt aus der Veröffentlichung von RUZICKA und BRENNER aus dem Jahr 1939.

Die Abbildung zeigt den Ausschnitt einer Veröffentlichung von L. RUZICKA und M. BRENNER über „Die Umwandlung von Betulin in Lupeol“<sup>[23]</sup> aus dem Jahr 1939. Die dort beschriebenen „genetischen Zusammenhänge“ basieren auf der bereits erwähnten Isopren-Regel. Betulin und Lupeol gehören folglich zu den Triterpenen, welche aus 6 Isopren-einheiten aufgebaut sind. Obwohl der Beitrag bereits vor L. RUZICKAS biogenetischen Isopren-Regel (1953) erschien, ist die Klassifizierung der pentacyclischen Triterpene, wie sie in dieser Veröffentlichung von L. RUZICKA und M. BRENNER vorgenommen wurde, auch heute noch zutreffend; sie kann und muss jedoch, aufgrund der in den darauf folgenden Jahren erzielten Fortschritte bei der Strukturaufklärung von Naturstoffen, um eine Vielzahl erweitert werden.

Die Zahl der bis heute bekannten Triterpengrundgerüste liegt bei fast 200.<sup>[24]</sup> In der Natur am häufigsten zu finden sind die tetrazyklischen (z.B. Steroide) und pentazyklischen Triterpene, Letztere liegen zumeist 6-6-6-6-5- oder 6-6-6-6-6-Ring verknüpft vor. Die Komplexität dieser Gruppe von Naturstoffen liegt begründet in ihrer Biosynthese. Als Untergruppe der Stoffklasse der Terpene können die pentazyklischen Triterpene, und die sich daraus abgeleiteten Terpenoide, in verschiedene Typen eingeteilt werden z.B. Taraxerane, Friedelane, Multiflorane, Taraxastane oder Fernane. Die am häufigsten vorkommenden Typen sind jedoch Lupane, Ursane und Oleanane. Das in Abbildung 5 dargestellte Schema veranschaulicht die beschriebene Klassifizierung der Triterpene. Weiterhin sind einige Vertreter von Triterpenoiden gezeigt, die einerseits eine große Rolle bei der Anfertigung der Arbeit gespielt haben oder bereits von L. RUZICKA und M. BRENNER (Abb. 4) beschrieben wurden.



**Abb. 5** Schema zur Klassifizierung der Triterpene mit einigen wichtigen Vertretern

### 1.3. Die pharmakologischen Eigenschaften der Triterpene

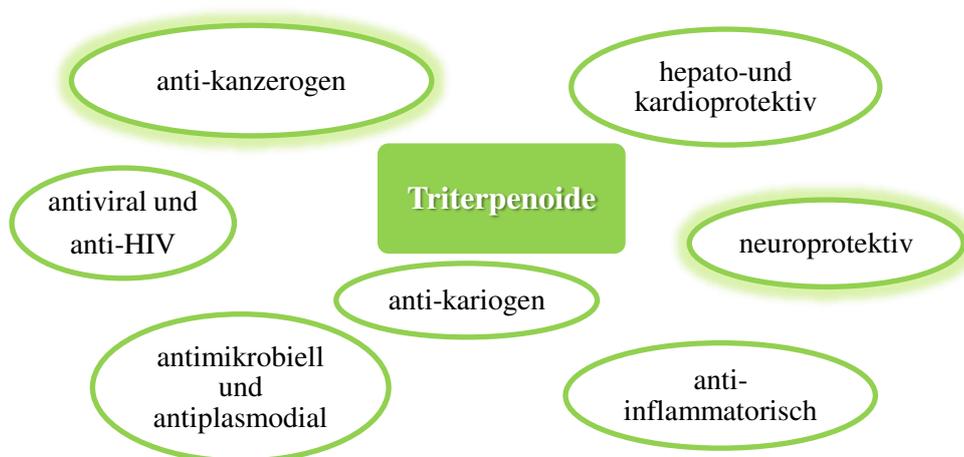
Anhand der Klassifizierung der Triterpene ist zu erahnen, wie mannigfaltig ihr Vorkommen als sekundärer Pflanzeninhaltsstoff ist. Aber wozu benötigt die Natur diese komplexen Moleküle? PROF. DR. M. WINK, IPMB Heidelberg, berichtete 1992 in einem Tagungsband<sup>[25]</sup> über die chemische Verteidigung der Pflanzen, dort heißt es:

Wir können als gesichert annehmen, dass es nicht das Lebensziel einer Pflanze ist, gefressen zu werden, sondern dass jede Pflanzenart in der Evolution Strategien erworben hat, die ihr Überleben gewährleisten.

Um dieses Ziel zu erreichen, setzt die Pflanze nicht nur Pheromone und Flavanoide zur Anlockung von Insekten ein oder produziert giftige Alkaloide und Phenole zur Abwehr von Schädlingen sowie Herbivoren, auch Triterpene, vor allem Triterpensaponine,<sup>[26]</sup> werden zum Schutz vor Krankheitserregern in der Pflanze gebildet. Über die Birkenrinde weiß man, dass durch die Einlagerung von Betulin, diese u.a. gegen Mikroorganismen geschützt ist.<sup>[27]</sup> Welche Funktionen die Triterpene in den Pflanzen genau übernehmen ist noch unklar und Bestandteil aktueller Forschungen, aber die pharmakologischen Eigenschaften dieser Inhaltsstoffe werden von den Menschen bereits seit Jahrtausenden genutzt. PARACELSUS (1493-1541) war einer der Ersten, der die Inhaltsstoffe einer Pflanze für die Heilung von Krankheiten verantwortlich machte.<sup>[28]</sup> Bis zu diesem Zeitpunkt beruhte die Volksmedizin auf über Jahrhunderte hinweg gesammelten Beobachtungen. Heute weiß man, dass u.a. die terpenoiden Pflanzeninhaltsstoffe für die Wirkung von Heiltees, -schnäpsen oder -salben verantwortlich sind. Zum Beispiel wurden Ursol- und Oleanolsäure als die gesundheitsfördernden Inhaltsstoffe der Apfelschale identifiziert<sup>[29]</sup> und die erhöhte Lebenserwartung in den mediterranen Ländern wird mit dem regelmäßigen Genuss von Oliven und Olivenöl in Zusammenhang gebracht, folglich auch mit einer kontinuierlichen Aufnahme von Oleanol- und Maslinsäure.<sup>[30]</sup>

Zahlreiche Untersuchungen und Studien wurden in den letzten Jahrzehnten durchgeführt, um die pflanzlichen Wirkstoffe zu identifizieren. Diesbezüglich existiert eine Vielzahl von biologischen und pharmakologischen Testsystemen, die bei der Auffindung von Wirkstoffen zum Einsatz kommen. Als Testobjekte können isolierte subzelluläre Systeme (Enzyme), Mikroorganismen, Viren, wirbellose Organismen (Insekten, Weichtiere), tierische oder menschliche Zellkulturen, isolierte Organe oder lebende Tiere eingesetzt werden.<sup>[31]</sup>

Auf der Suche nach neuen Therapeutika werden sowohl die Extrakte verschiedenster Pflanzen, als auch die isolierten Reinsubstanzen hinsichtlich ihrer pharmakologischen Eigenschaften untersucht. P. DZUBAK *et al.*<sup>[32]</sup> haben von einigen Triterpenoiden dieses Repertoire an Merkmalen zusammengefasst. Eine Übersicht der pharmakologischen Eigenschaften ist in Abbildung 6 dargestellt. Die anti-karzerogenen und neuroprotektiven Eigenschaften der Triterpenoide sollen an dieser Stelle besonders hervorgehoben werden.



**Abb. 6** Auswahl der pharmakologischen Eigenschaften von Triterpenoiden

## **2. Grundlagen und Stand der Forschung**

### **2.1. Pentazyklische Triterpene – potentielle Wirkstoffe zur Behandlung maligner Tumore**

#### **2.1.1. Die Krankheit Krebs und ihre Behandlung**

Die Zelle ist die kleinste lebende Einheit aller Organismen. Der menschliche Körper besteht aus etwa  $10^{13}$  einzelnen Zellen, die in genau festgesetzten Proportionen und mit definierter räumlicher Anordnung verschiedene Funktionseinheiten bilden.<sup>[33]</sup> Je nach Art der Zelle unterscheidet sich z.B. ihre Regenerationsfähigkeit. So liegt die durchschnittliche Lebensdauer von Deckepithelien des Dünndarms bei nur 1,4 Tagen, die von Drüsenepithelien der Leber bei 222 Tagen und die der Knochenzellen sogar bei 25-30 Jahren.<sup>[34]</sup> Dabei entspricht die Anzahl der neu produzierten Zellen genau der der abgebauten Zellen. Liegt eine Störung dieses Gleichgewichts vor und eine erhöhte Proliferation der Zellen tritt ein, ist meist die Bildung harmloser Wucherungen (benigne Tumore) oder die Bildung bösartiger Krebsgeschwulste (maligne Tumoren) die Folge.<sup>[33]</sup> Für die Kontrolle von Zellwachstum und Zellproliferation sind insbesondere zwei Gengruppen verantwortlich, die Protoonkogene (Stimulation) und die Tumorsuppressorgene (Suppression). Im genetisch unveränderten Zustand sind sie häufig Bestandteil von Signaltransduktionskaskaden. Kommt es zu einer Akkumulation von Gendefekten sind Fehlregulationen bei den Teilungs- und Differenzierungsprozessen der Zelle die Folge. Kanzerogene Substanzen, UV- oder radioaktive Strahlung, virale Erkrankungen, oder auch zufällige Veränderungen der ursprünglichen DNA zählen zu den Auslösern der Mutationen. Die molekularen Unterschiede zwischen gesunden und neoplastischen Zellen äußern sich in einer genetischen Instabilität, die aus dem veränderten DNA-Gehalt der Chromosomen, dem Verlust der Zellzyklus-Kontrollpunkte und der Fehlregulation von Apoptose-Signalübertragungswegen resultiert.<sup>[35]</sup>

Da verschiedene Defekte in unterschiedlichen Genen für die Ausbildung von Tumoren verantwortlich sind, ist der Verlauf von Tumorerkrankungen sehr individuell. Demensprechend existieren verschiedene Behandlungsmöglichkeiten, die dem jeweiligen Patienten angepasst werden. Bei Früherkennung der Krebserkrankung können operative Eingriffe und Strahlentherapie ausreichende Behandlungsmethoden darstellen. Sind diese Verfahren nicht erfolgreich oder ist bereits ein spätes Stadium der Krankheit erreicht, so

kann nur noch die Chemotherapie die Proliferation der Tumorzellen eindämmen. Die dafür verwendeten Medikamente werden als Zytostatika bezeichnet. Sie greifen vornehmlich an definierten Stellen des Zellzyklus ein und führen zu einer direkten oder indirekten Schädigung der DNA. Der großen Breite von Wirkungsmechanismen können verschiedene Substanzklassen zugeordnet werden. Eine Auswahl ist in der folgenden Tabelle zusammengetragen.<sup>[36-38]</sup>

**Tab. 1** Übersicht ausgewählter Wirkungsmechanismen von Zytostatika

<b>Wirkungsmechanismus</b>	<b>Substanzklasse (Beispiel)</b>
<b>Schädigung der DNA</b>	
kovalente Bindung an die DNA	Alkylanzien (Lomustin, Cyclophosphamid) u. Platinverbindungen (Cisplatin, Carboplatin)
Interkalierung	Antracycline (Doxorubicin, Daunorubicin)
DNA-Topoisomerase-Hemmung Topo II	Epipodophyllotoxine (Etoposid) Anthracendione (Mitoxantron, Bisantren)
Topo I	Camptothecinderivat (Topotecan)
<b>Interferenz mit der DNA-Synthese</b>	
Hemmung der Synthese von DNA-Bausteinen - Hemmung der Dihydrofolsäure-Reduktase - Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase	Folsäure-Antagonist (Methotrexat) Hydroxycarbamid
Einschleusung falscher DNA-Bausteine	Purin-Antimetabolite (6-Mercaptopurin) Pyrimidin-Antimetabolite (5-Fluorouracil)
<b>Interferenz mit Mikrotubuli (Mitosespindel)</b>	
Hemmung der Tubulin-Polymerisation	Vinca-Alkaloide (Vinblastin, Vinorelbin)
Bildung anomaler Mikrotubuli und Hemmung der Depolymerisation	Taxoide (Paclitaxel, Docetaxel)

## 2.1.2. Zytostatika

### 2.1.2.1. Die Zelltod-Modalitäten

Der Begriff Zytostatikum beschreibt die Wirkung der Medikamente nicht ganz korrekt, denn nicht nur die Zellteilung wird durch die Hemmung der Replikation unterbunden, auch können Störungen im regulären Ablauf der Mitose zum Zelltod führen.<sup>[37]</sup> Welcher Mechanismus dabei im Speziellen in der Zelle ausgelöst wird, ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Die Wirkung der meisten Medikamente beruht auf der indirekten Induktion des Zelltods. Im Jahr 1997 veröffentlichte ein Ad-hoc-Ausschuss der Society of Toxicologic Pathologists, bekannt unter dem Namen Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD), eine erste Empfehlung für die Unterscheidung von Apoptose und Nekrose.<sup>[39]</sup> In den Jahren 2005 und 2009 erschienen weitere Empfehlungen des NCCD zur Definition von Zelltod-Modalitäten basierend auf den morphologischen Eigenschaften der Zellen,<sup>[40]</sup> wie:

1. Apoptose, charakterisiert durch das Abrunden der Zelle, Chromatinkondensation an der Kernmembran (Marginalisierung) und anschließende Einbeziehung des gesamten Zellkerns (Pyknose), Kernfragmentierung (Karyorrhexis), minimale Veränderungen anderer Organellen sowie die Bildung von Ausstülpungen der Zellmembran (apoptotic bodies) ohne Verlust der Plasmamembranintegrität;
2. Autophagischer Zelltod, mit einer ausgedehnten Vakuolisierung des Zytoplasmas und der Bildung von Autophagosomen (Vakuolen mit Fragmenten von Mitochondrien, ER- und Golgi-Membranen) und Autolysosomen (nach Fusionierung mit Lysosomen);
3. Nekrose, gekennzeichnet durch zytoplasmatische Schwellung (Onkose), Ruptur der Plasmamembran, Schwellung von zytoplasmatischen Organellen und einer moderaten Chromatinkondensation.

Seit Beginn des neuen Jahrtausends führten die immensen Fortschritte im Bereich der Forschung und Technik zu neuen Erkenntnissen über die komplexen biochemischen Abläufe in der neoplastischen Zelle, z.B. nach der Induktion von Apoptose.<sup>[41],[42]</sup> Die Klassifizierung des Zelltods auf Basis der biochemischen Eigenschaften war die logische Konsequenz. Jedoch erst im Jahr 2012 erklärte die NCCD, dass es an der Zeit wäre die systematische Klassifizierung des Zelltods auf der Basis messbarer biochemischer Eigenschaften durchzuführen.<sup>[43]</sup>

Die Zelltod-Modalitäten werden in zwei Kategorien unterschieden, den passiven, nichtregulierten Zelltod und den regulierten Zelltod, der den programmierten Zelltod als eine spezielle Form einschließt.<sup>[43]</sup> Neben den bereits erwähnten Zelltod-Modalitäten Apoptose und autophagischer Zelltod ist eine weitere Form bekannt, die regulierte/ programmierte Nekrose.<sup>[44]</sup> Die Klassifizierung der Zelltod-Modalitäten auf ihren zugrunde liegenden Signalwegen, führte zur Entstehung multipler Neologismen, wie die Nekroptose, Parthanatos, Oxytose, Ferroptose, ETose, NETose, Pyronekrose und Pyroptose. Die genannten Zelltod-Modalitäten können als Unterformen der regulierten/ programmierten Nekrose angesehen werden.<sup>[45]</sup> In der Literatur sind sie auch als nicht-apoptotische Zelltodmechanismen aufgeführt.<sup>[46]</sup> Die Apoptose kann über einen extrinsischen oder intrinsischen Signalweg erfolgen, wobei letzterer in Caspase-abhängig und -unabhängig unterteilt werden kann.<sup>[43]</sup>

### **2.1.2.2. Methoden zur Aufklärung der Zelltod-Modalitäten**

Tot oder lebendig? - Eine Zelle gilt als tot, wenn eine irreversible Permeabilität der Plasmamembran oder eine vollständige Fragmentierung der Zelle vorliegt.<sup>[47]</sup>

Es existiert eine Vielzahl von Methoden<sup>[48]</sup>, die nicht nur darüber Aufschluss geben ob, sondern auch wie eine Zelle abgestorben ist. Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen spielt dabei eine immens wichtige Rolle. Mit dem Einzug der Durchflusszytometrie in die Labore und der Entwicklung innovativer Mikroskopiemethoden, ist neben der Untersuchung der morphologischen Eigenschaften, die Aufklärung der biochemischen Vorgänge in der Zelle in den Fokus der Wissenschaft getreten. Zahlreiche Kits und Fluoreszenzfarbstoffe sind entwickelt wurden, um eine genaue Abgrenzung zwischen den einzelnen Zelltod-Modalitäten vornehmen zu können. Zum Beispiel werden Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper eingesetzt, die spezifisch an Proteine binden, um z.B. die Aktivierung von Caspasen und apoptotischen Proteasen nachzuweisen. Zellmembran-permeable DNA-Farbstoffe (Höchst 33342, DAPI, Acridinorange), sowie Zellkompartiment/-organell-spezifische Farbstoffe (MitoTracker<sup>®</sup>, LysoTracker<sup>®</sup>, ER-Tracker<sup>™</sup>) können Aufschluss über den Zustand einer Zelle geben. Propidiumiodid, ein membran-impermeabler DNA-Farbstoff, zeigt eine fehlende Zellmembranintegrität an.

Die im Rahmen der Arbeit genutzten Analysemethoden basieren auf fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen der Zellmorphologie und der Zellmembranintegrität durch Doppelfärbung mit Acridinorange (AO) und Propidiumiodid (PI). Zusätzlich wurden

Zellzyklusanalysen, sowie Doppelfärbungen unter dem Einsatz von Annexin V-FITC und PI, zur quantitativen Bestimmung von Phosphatidylserin und gleichzeitigem Ausschluss von Zellmembran-Permeabilität, am Durchflusszytometer durchgeführt. Dabei handelt es sich um Standardmethoden zur Bestimmung der Apoptose, die in der Literatur sehr gut beschrieben und etabliert sind. Auf einen detaillierten Überblick der durchgeführten Experimente soll aufgrund dessen an dieser Stelle verzichtet werden. Wichtige Anmerkungen sind der jeweiligen Publikation zu entnehmen.

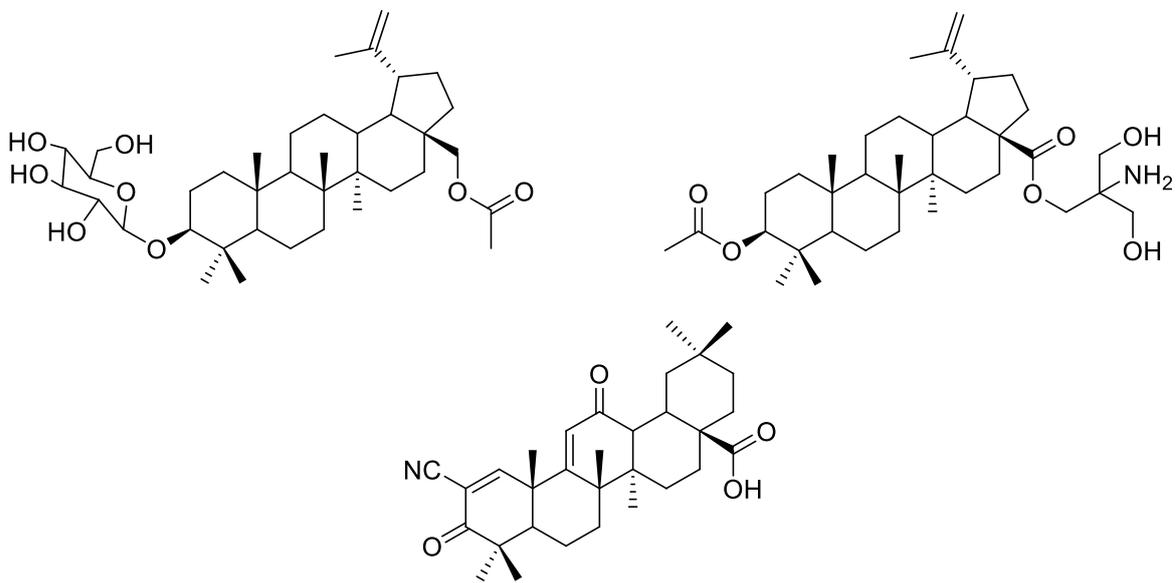
### **2.1.3. Die zytotoxischen Eigenschaften der pentazyklischen Triterpene**

Ein Beispiel für die umfangreichen Anstrengungen, die zum Auffinden neuartiger Zytostatika unternommen wurden, ist das im Jahr 1960 initiierte Screeningprogramm des National Cancer Institutes (NCI), welches innerhalb von 22 Jahren etwa 114000 Extrakte von geschätzten 35000 Pflanzen auf ihre anti-tumor Aktivität testete.<sup>[49]</sup> Bei einem weiteren, vom NCI initiierten Screening von über 2500 Pflanzenextrakten stach der Rindenextrakt der Indischen Jujube (*Ziziphus mauritiana* Lam.) heraus, welcher als aktiven Wirkstoff das pentazyklische Triterpenoid Betulinsäure (BA) enthält.<sup>[50]</sup> In den darauf folgenden Untersuchungen konnte E. PISHA *et al.*<sup>[50]</sup> im Jahr 1995 *in vitro* und *in vivo* die antineoplastische Wirkung der BA nachweisen, wobei eine akute Toxizität im Tiermodell ausblieb. Zusätzlich wurde ein apoptotischer Wirkungsmechanismus bei menschlichen Melanomzellen postuliert. Darauf folgende Tests konnten auch für weitere verschiedene Krebszelllinien die zytotoxische Aktivität belegen und die Aufklärung des Wirkungsmechanismus vorantreiben.<sup>[51-54]</sup> In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass BA in der Lage ist, sowohl durch die Hochregulierung von pro-apoptotischen Signalen, als auch durch die Reduktion von anti-apoptotischen Signalen die Apoptose in der Zelle direkt, sowie indirekt auszulösen. Der vollständige Mechanismus wurde bisher jedoch noch nicht aufgeklärt.<sup>[55]</sup>

Derzeit wird in einer klinischen Studie der Phase I/II (NCT00346502) die Wirkung einer 20%igen Salbe zur Behandlung Dysplastischer Nävi (moderate bis schwere Dysplasie) untersucht und in einer weiteren Studie der Phase I die Sicherheit und Verträglichkeit von BA bei der Behandlung von Patienten mit kutan-metastasierenden Melanomen (NCT00701987) erforscht. (<http://clinicaltrials.gov/>)

Ähnlich wie Betulinsäure induzieren z.B. auch Maslin-<sup>[56]</sup> und Ursolsäure<sup>[57]</sup>, sowie Hederagenin<sup>[58]</sup> die Apoptose bei unterschiedlichen Krebszelllinien.

Neben der Untersuchung von Pflanzeninhaltsstoffen ist die Erforschung von semi-synthetisierten Zytostatika eine stetige Aufgabe der Wissenschaftler. Dabei steht die Verbesserung der Aktivität, der Selektivität und der pharmakologischen Eigenschaften im Vordergrund. Zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit wurde z.B. B10 (Abb. 7, links), ein Glykosid des Betulins,<sup>[59]</sup> synthetisiert. Diese Verbindung zeigt primär ein Potential für die Behandlung apoptose-resistenter Krebserkrankungen.<sup>[60]</sup> Ein anderes, vielversprechendes Derivat der Betulinsäure, welches bereits zur experimentellen Tumorbehandlung bei fünf Hunden<sup>[61]</sup> und zwei Pferden<sup>[62]</sup> eingesetzt wurde, ist NVX-207 (Abb.7, rechts).



**Abb. 7** Struktur von B10 (links), NVX-207 (rechts) und CDDO (Mitte)

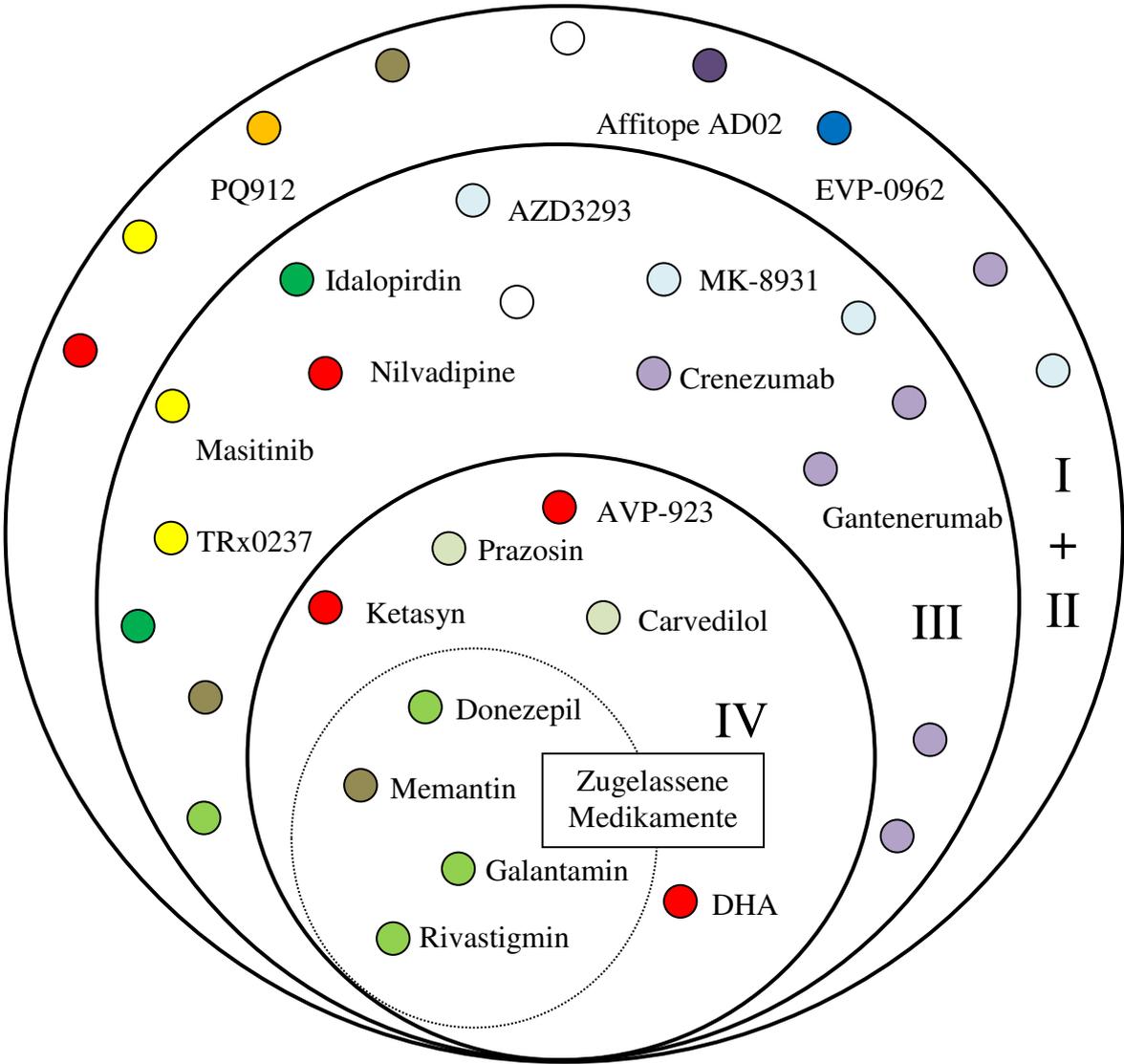
Die pentazyklischen Triterpencarbonsäurederivate mit dem größten anti-karzinogenen Potential sind Bardoxolon (CDDO; Abb. 7, Mitte) und Bardoxolon-methylester (CDDO-Me, RTA 402), die sich bereits in der klinischen Erprobung (Phase I, NCT00322140 bzw. NCT00508807) befinden haben. (<http://clinicaltrials.gov/>)

## **2.2.Pentazyklische Triterpene – potentielle Wirkstoffe zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit**

### **2.2.1.Die Pathogenese der Alzheimer-Krankheit und ihre Behandlung**

Im Jahr 1907 berichtete A. ALZHEIMER bei mikroskopischen Untersuchungen von histologischen Präparaten des Cortex über eine eigenartige Degeneration der Ganglienzellen der Hirnrinde, deren wesentliche Merkmale darin bestanden, dass sich ihre Fibrillen zusammenklumpten und eigenartige fleckenförmige Herdchen ausbildeten.<sup>[64]</sup> Die Pathologie der Alzheimer-Demenz (AD) wird auch heute durch zwei wesentliche Merkmale charakterisiert: die Bildung seniler Plaques aufgrund der Aggregation von Amyloid- $\beta$ -Peptiden, ausgelöst durch eine gesteigerte Produktion, einen reduzierten Metabolismus oder genetisch bedingte Veränderungen dieser, sowie die Akkumulation hyperphosphorylierter Tau-Proteine, welche durch Aggregation die Bildung von intrazellulären Filamenten fördert.<sup>[65]</sup> Da die Ausübung der eigentlichen Funktion des Tau-Proteins in diesem Zustand beeinträchtigt wird, tritt eine neuronale Dysfunktion ein, die schließlich zu einer irreversiblen neuronalen Degeneration führt.<sup>[66]</sup>

In den letzten Jahren konnten erhebliche Fortschritte durch die Anwendung molekularbiologischer und molekulargenetischer Techniken bei der Aufklärung der Pathogenese erzielt werden, jedoch gibt es bisher kein kausales Modell für den Entstehungsmechanismus der Alzheimer-Krankheit. Derzeit werden verschiedene Hypothesen zur Pathogenese der AD diskutiert, wie die cholinerge Hypothese, die Tau-Protein-Hypothese oder die Amyloid-Hypothese. Auch Entzündungsprozesse und oxidativer Stress (ROS) stehen im Verdacht, zu Schädigungen im Kortex zu führen. Basierend auf den neu gewonnenen Erkenntnissen, wurden verschiedene Therapiestrategien zur Behandlung der AD entwickelt. Ohne auf eine detaillierte Beschreibung der Wirkungsmechanismen einzugehen, soll die folgende Abbildung (Abb. 7) einen Ausschnitt der derzeitigen, in klinischen Studien befindlichen, potentiellen Therapeutika zeigen.<sup>[67], [63]</sup>



<u>Neurotransmitter-Ansatz:</u>	<u>β-Amyloid-Ansatz:</u>	<u>Tau-Ansatz und weitere Ansätze:</u>
● Cholinerges System	● β-Sekretase-Inhibitoren	● Tau-Protein-Ansatz
● Serotonerges System	● γ-Sekretase-Inhibitoren	● Glutaminyl-Zyklase-Inhibitor
● Adrenerges System	● aktive Immunisierung	● Neuroprotektiva/Nootropika
● Weitere	● passive Immunisierung	● Weitere

**Abb. 8** Übersicht der in klinischen Studien befindlichen Medikamente zur Behandlung der AD

In den Empfehlungen der S3-Leitlinie Demenzen<sup>[68]</sup> wird ausschließlich für die Acetylcholinesterase-Hemmer Galantamin, Rivastigmin und Donepezil, sowie für den Glutamatmodulator (NMDA-Rezeptor-Antagonist) Memantin eine Verbesserung der Kognition, der Alltagsfunktion und dem klinischen Gesamteindruck von Patienten beschrieben. Diese pharmakologischen Behandlungsoptionen zielen ausschließlich auf die Behebung des cholinergen Defizits ab. In den letzten Jahrzehnten gab es wiederholt Versuche, neue Therapieansätze für die Behandlung der AD zu etablieren, jedoch scheiterten viele Substanzen in den späten Phasen der klinischen Studien. Ein Beispiel ist der monoklonale Antikörper Solanezumab des US-Pharmakonzerns Eli Lilly. In der aktuell abgeschlossenen Phase-III-Studie (NCT01900665)<sup>[63]</sup>, zeigt das Medikament keine signifikante Verlangsamung des Gedächtnisabbaus bei Patienten mit leichter Demenz im Vergleich zum Placebo.

### 2.2.2. Cholinesterase-Inhibitoren

Für die Entwicklung neuer Inhibitoren ist der Wirkungsmechanismus von entscheidender Bedeutung. Eine irreversible Hemmung der Acetylcholinesterase (AChE), wie z.B. durch das bekannte Pflanzenschutzmittel Parathion, führt zu Vergiftungen. Weiterhin können Untersuchungen hinsichtlich der Selektivität gegenüber Acetyl- und Butyrylcholinesterase (BChE) nicht nur Aufschluss über die Bindungsaffinität liefern, sie eröffnen auch neue therapeutische Behandlungsmöglichkeiten. Die Effektivität des Inhibitors sollte dabei nicht außer Betracht gelassen werden, da diese u. a. Einfluss auf die Dosis des potentiellen Medikamentes hat. Die folgende Tabelle (Tab. 2) zeigt einen Vergleich der zur Behandlung von AD empfohlenen Medikamente<sup>[68]</sup>, sowie von Tacrin, welches aufgrund der geringen Verträglichkeit keine Anwendung mehr findet.

**Tab. 2** Empfohlene Medikamente zur Behandlung der AD

Wirkstoff (Handelsname)	Hemmtyp	Selektivität	Dosis <sup>1</sup>
Donepezil (Aricept®)	reversibel	AChE Hemmer	5-10 mg
Rivastigmin (Exelon®)	pseudo-irreversibel (sehr langsam)	AChE und BChE Hemmer	6-12 mg
Galantamin (Reminyl®)	reversibel	AChE Hemmer (und allosterischer Nikotin- Rezeptor-Modulator)	16-24 mg
Tacrin (Cognex®, Romotal®)	reversibel	AChE Hemmer	-

<sup>1</sup>Empfohlene Tagesdosis (orale Einnahme)

### 2.2.2.1. Selektivität

Basierend auf der Substratspezifität der Hydrolasen kann in Acetyl- und Butyrylcholinesterase unterschieden werden, wobei Letztere auch als nicht-spezifische Cholinesterase bezeichnet wird. BChE katalysiert die Hydrolyse verschiedener Cholinester, wobei ihre katalytische Effizienz geringer als jene der AChE ist, die „[...] mit einer Wechselzahl von 25000 pro Sekunde und einem Verhältnis  $k_{cat}/K_M = 2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  katalytische Perfektion erreicht.“ (Stryer Biochemie<sup>[69]</sup> S.402).

Die Struktur der AChE und die Orientierung des aktiven Zentrums wurden erstmals von J. SUSSMAN *et al.*<sup>[70]</sup> an der *Torpedo californica*-AChE (*TcAChE*) untersucht. Das Enzym verfügt über mehrere Bindungsstellen innerhalb einer etwa 20 Å tiefen Tasche. Die katalytische Triade, bestehend aus den drei Aminosäuren Serin (Ser200), Histidin (His440) und Glutaminsäure (Glu327), befindet sich am Boden der Tasche und bildet das Zentrum der katalytischen Reaktion. Weiterhin sind das Oxyanion-Loch, die anionische Cholinbindungsstelle, die Acylbindungstasche und die PAS (periphere anionische Bindungsstelle) verantwortlich für das Dirigieren des Substrates zum aktiven Zentrum und der korrekten Ausrichtung des Acetylcholins.<sup>[71]</sup> Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen und der räumlichen Strukturen von AChE verschiedener Spezies [z.B. *Homo sapiens* (*HuAChE*), *Electrophorus electricus* (*EeAChE*), *Torpedo californica*], zeigt eine Vielzahl von Übereinstimmungen, besonders im Bereich des aktiven Zentrums.<sup>[72], [73]</sup> Auch eine Gegenüberstellung von *TcAChE* und *HuBChE* weist eine signifikante Homologie<sup>[74]</sup> auf, wobei die größten Unterschiede in der Zusammensetzung der Aminosäuren der Acylbindungstasche und der PAS<sup>[75]</sup> liegen. In der *HuBChE* sind 6 der 14 aromatischen Aminosäuren der Bindungstasche durch aliphatische Aminosäuren ersetzt,<sup>[76]</sup> wodurch die Möglichkeit besteht größere Substrate effizient umzusetzen. Diese Unterschiede sind auch für die verschiedenen inhibitorischen Eigenschaften von Substanzen gegenüber der AChE und BChE verantwortlich.

In Hinblick auf die aktuell zugelassenen Medikamente, ist die selektive Hemmung der AChE bevorzugt. Studien haben jedoch gezeigt, dass durch die Einnahme von Rivastigmin, einem dualen Inhibitor, signifikante Vorteile für einige Patienten verzeichnet werden können.<sup>[77]</sup> Basierend auf neu erworbenen Erkenntnissen über die BChE, wurden in den letzten Jahren die Vorteile dualer bzw. BChE-selektiver Inhibitoren in der Literatur<sup>[78-81]</sup> diskutiert, doch gibt es bisher keinen Beweis für eine verbesserte therapeutische Wirkung.

### 2.2.2.2. Wirkungsmechanismus – Enzymkinetik

Abgeleitet aus der Michaelis-Menten-Gleichung ergibt sich die in der Abbildung 9 dargestellte allgemeine Formel für eine reversible, vollständige Hemmung. Durch die Anwesenheit des Inhibitors ändert sich das kinetische Verhalten des Enzyms und mehrere Dissoziationskonstanten müssen berücksichtigt werden, wobei je nach Effekt verschiedene Hemmtypen definiert werden können.

$$v = \frac{V [A]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [A] \left(1 + \frac{[I]}{K_i'}\right)}$$

Abb. 9 Formel zur Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit

Vereinfacht ausgedrückt, entspricht die Bindung des Inhibitors am aktiven Zentrum des Enzyms, anstelle des Substrats, einer kompetitiven Hemmung, wobei vor allem substratanaloge Verbindungen dieses Verhalten zeigen. Die relativ selten vorkommende, unkompetitive Hemmung ist definiert als die Bindung des Inhibitors am Enzym-Substrat-Komplex. Gelegentlich werden diese zwei Hemmtypen als die beiden Extreme der nicht-kompetitiven Hemmung in der Literatur aufgeführt. Diese Aussage ist jedoch nicht ganz korrekt, da aus kinetischer Sicht eine Unterscheidung der Begriffe zwingend notwendig ist.

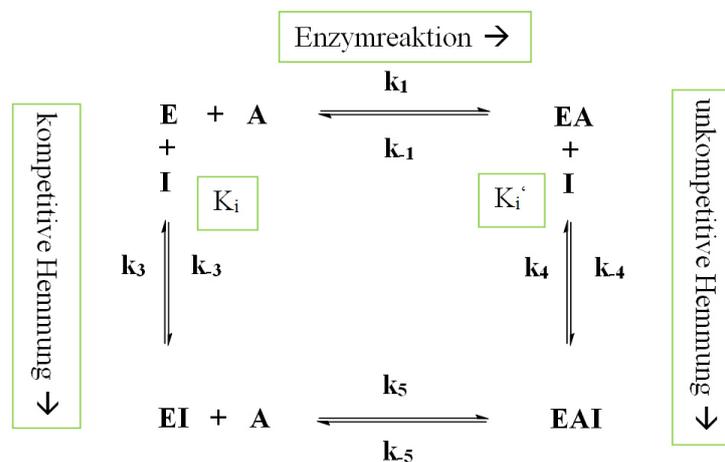


Abb. 10 Modellmechanismus der nicht-kompetitiven Hemmung

Mechanistisch gesehen beschreibt die nicht-kompetitive Hemmung die in der Abbildung 10 gezeigte Reaktionsgleichung. Der Inhibitor (I) bindet sowohl am aktiven Zentrum des Enzyms (E), als auch an einem separaten Bindungsort des Enzym-Substrat-Komplexes (EA). Die Geschwindigkeitsgleichung dieser Reaktion ist relativ kompliziert

und wird durch Annahme eines vorliegenden Fließgleichgewichts vereinfacht. Ob es sich bei  $K_m$ ,  $K_i$  und  $K_i'$  um echte Gleichgewichtsdissoziationskonstanten handelt, ist experimentell schwierig zu ermitteln, allerdings resultiert aus dieser Annahme der mechanistische Unterschied der nicht-kompetitiven Hemmung zu der kompetitiven und unkompetitiven Hemmung, deren Bindungsgleichgewicht eine notwendige Bedingung ist.<sup>[82]</sup>

Die klassische Vorgehensweise für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten, als ein Maß für die Affinität des Inhibitors zum Enzym ( $K_i$ ) oder des Inhibitors zum Enzym-Substrat-Komplex ( $K_i'$ ), beruht auf der Auswertung linearisierter Grafiken. Diese ermöglichen durch meist doppeltreziproke Auftragung eine direkte Bestimmung der Konstanten.

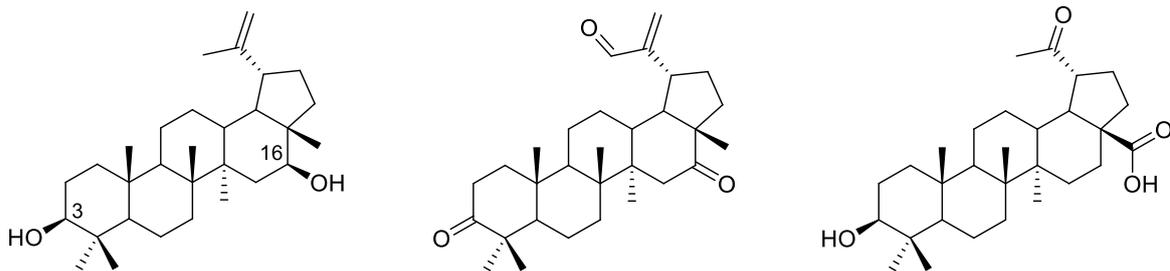
Eine in der Literatur übliche Angabe der Inhibierungsaktivität ist der  $IC_{50}$ -Wert, jedoch ist die Vergleichbarkeit dieser Werte unter Variation der Testbedingungen nur bedingt gegeben.<sup>[82]</sup> Eine einfache Beziehung zwischen  $IC_{50}$ -Werten und Inhibierungskonstanten kann mit der Ausnahme der rein unkompetitiven Hemmung nicht aufgestellt werden. Aus diesem Grund erfolgt die Angabe der Enzymaktivität durch die Werte von  $K_i$  und  $K_i'$ , welche unter dem Einfluss von unterschiedlichen Inhibitor- und Substratkonzentrationen experimentell ermittelt wurden.

### 2.3. Die Eigenschaften der pentazyklischen Triterpenoide

Neuroprotektive Strategien für die Behandlung von AD basieren unter anderem auf der Verwendung von Antiphlogistika und Antioxidantien. Unter dem Begriff Nootropika, auch Neuroprotektiva, werden Substanzen zusammengefasst, die zu einer Erhöhung der Resistenz des ZNS gegen schädliche Einflüsse, einer Förderung von Lern- und Gedächtnisprozessen, sowie einer Begünstigung des telenzephalen Informationstransfers führen.<sup>[83]</sup> Der Nachweis einer positiven Wirkung dieser Medikamente blieb jedoch, mit Ausnahme von Ginko-Extrakt EGb761<sup>®</sup><sup>[68]</sup>, in klinischen Studien bisher aus.<sup>[83]</sup>

Viele Triterpenoide zeigen ebenfalls anti-oxidative und anti-inflammatorische Eigenschaften. Basierend auf diesem Wissen und auf der Suche nach neuen Therapeutika lag es nah, diese Substanzklasse ebenfalls hinsichtlich ihrer ChE-inhibierenden Fähigkeiten zu erforschen. In der Literatur sind zahlreiche Veröffentlichungen zu finden, die sich mit der neuroprotektiven und inhibierenden Wirkung von Triterpenoiden und anderen Naturstoffen auseinandersetzen (u.a. zusammengefasst von P. RUSZKOWSKI *et al.*<sup>[84]</sup>, K.-Y. YOO *et al.*<sup>[85]</sup> und P. J. HOUGHTON *et al.*<sup>[71]</sup>).

Im Jahr 2007 haben P. K. MUKHERJEE *et al.*<sup>[86]</sup> eine Liste von Pflanzen zusammengestellt, deren Extrakte oder Inhaltsstoffe eine signifikante Inhibitor-Aktivität gegenüber AChE aufweisen. Neben Galantamin, das Steroidalkaloid aus dem Kleinen Schneeglöckchen (*Galanthus nivalis*), sei an dieser Stelle das pentazyklische Triterpenoid Ursolsäure hervorzuheben, welches von Y.-K. CHUNG *et al.*<sup>[87]</sup> aus Majoran (*Origanum majorana*) extrahiert und auf AChE-Inhibierung getestet wurde. Ursolsäure zeigt außerdem *in vitro* die Reduktion von A $\beta$ -induziertem oxidativen Schaden<sup>[88]</sup>, die Inhibierung der Bindung von A $\beta$  an Mikrogliazellen<sup>[89]</sup>, sowie *in vivo* eine Verbesserung der Gehirnfunktion bei Mäusen<sup>[90]</sup>. Eine bisher untergeordnete Rolle bei der Suche von neuen ChE-Inhibitoren spielten semi-synthetisierte Triterpenderivate. M. J. CASTRO *et al.*<sup>[91-93]</sup> stellten, ausgehend von dem natürlich vorkommenden Calenduladiol (Abb. 11, links), eine Reihe von Lupanderivaten dar, welche sich durch Modifikationen der Hydroxylgruppen an Position C-3 und C-16, sowie der Isopropenylfunktion auszeichnen.



**Abb. 11** Struktur von Calenduladiol, 3,16,30-Trioxolup-20(29)-en und Platansäure

Als aktivste und BChE-selektive Verbindung konnte das 3,16,30-Trioxolup-20(29)-en (Abb. 11, Mitte) erhalten werden, welches im Anschluss mit Hydroxylamin-Hydrochlorid zum Oximderivat umgesetzt wurde. Dem Calenduladiol strukturell sehr ähnlich ist die bereits erwähnte Platansäure (Abb. 11, rechts).

### 3. Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist, ausgehend von unterschiedlichen pentazyklischen Triterpenoiden geeignete strukturelle Modifikationen zu identifizieren, welche die zytotoxischen und inhibitorischen Eigenschaften der Leitstruktur erhöhen.

Nachweise über die Steigerung der Zytotoxizität von Naturstoffen sind u.a. für die Einführung von Michael-Akzeptoren bekannt.<sup>[94]</sup> Ausgehend von verschiedenen pentazyklischen Triterpenen (UA, OA, GA, PA) soll daher der Einfluss von  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Systemen untersucht werden. Weiterhin stellt die Öffnung des Ringsystems eine Methode zur Synthese potentieller zytotoxischer Verbindungen dar. Diese Art der Strukturänderung soll an einem bisher nur wenig untersuchten Molekül durchgeführt werden, dem Allobetulin. Diese Verbindung wird, wie bereits erwähnt, durch Umlagerung des Betulins erhalten. Da Betulin einen sehr geeigneten Ausgangsstoff für die Synthese neuartiger Zytostatika darstellt, soll neben den Allobetulinderivaten eine Reihe Betulin-substituierter Verbindungen untersucht werden.

Eine weniger gut zugängliche Verbindung stellt Maslinsäure dar. Dagegen ist die strukturell sehr ähnliche Oleanolsäure ubiquitär in der Natur vorzufinden. Eine systematische Darstellung von C28-modifizierten Oleanolsäurederivaten soll daher Rückschlüsse auf eine potentielle zytotoxische Aktivität von Derivaten der Maslinsäure liefern.

Die Quantifizierung der Zytotoxizität wird mittels des Sulforhodamin-B-Tests an verschiedenen humanen Krebszelllinien erfolgen. Um eine Aussage über die selektive Wirkung einer Verbindung treffen zu können, werden zusätzlich non-maligne embryonale Mausfibroblasten (NIH 3T3) untersucht. Darüber hinaus sollen für die aktivsten Verbindungen die Zelltod-Modalitäten aufgeklärt werden.

Einen weiteren Schwerpunkt der Arbeit stellt die Ermittlung der inhibitorischen Fähigkeit von pentazyklischen Triterpenderivaten dar. Inwieweit Derivate des Allobetulins, sowie der Gypsogenin- und Platansäure in der Lage sind die AChE oder BChE zu hemmen, soll Gegenstand der Untersuchungen sein.

## 4. Ergebnisse

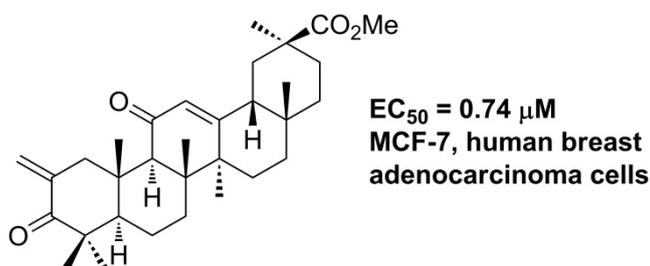
### 4.1. Pentazyklische Triterpenderivate als potentielle Zytostatika

#### Publikation 1

“Incorporation of a Michael acceptor enhances the antitumor activity of triterpenoic acids“

Lucie Heller, Stefan Schwarz, Vincent Perl, Alexander Köwitsch, Bianka Siewert,

René Csuk, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 391-399. DOI:10.1016/j.ejmech.2015.07.004



#### Abstract

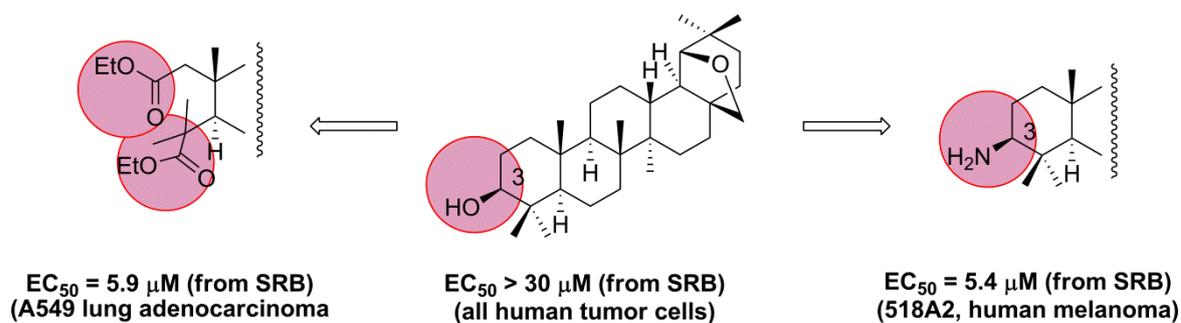
Finding and developing drugs for the treatment of cancer has been challenging scientists for many decades, and using compounds of natural origin represents one of several strategies. Triterpenoic acids are a very promising class of secondary metabolites being able to induce apoptosis while their cytotoxicity is low. Therefore, derivatizations have to be conducted to improve cytotoxicity while retaining their ability to induce programmed cell death. The incorporation of a Michael acceptor into molecules resulted very often in drugs of improved cytotoxicity. Thus, in this study we synthesized and evaluated several Michael acceptor substituted compounds derived from glycyrrhetic, ursolic, oleanolic and platanic acid. The influence of the presence of such a functional group onto the cytotoxicity was investigated in colorimetric sulforhodamine B assays employing several human cancer cell lines. EC<sub>50</sub> values in the single-digit micromolar range were measured. Thus, the incorporation of a Michael acceptor unit into triterpenoic acids enhances the cytotoxicity of these compounds significantly.

## Publikation 2

“Simple structural modifications confer cytotoxicity to allobetulin”

Lucie Heller, Anja Obernauer, René Csuk, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (13), 3002-3012.

DOI:10.1016/j.bmc.2015.05.015



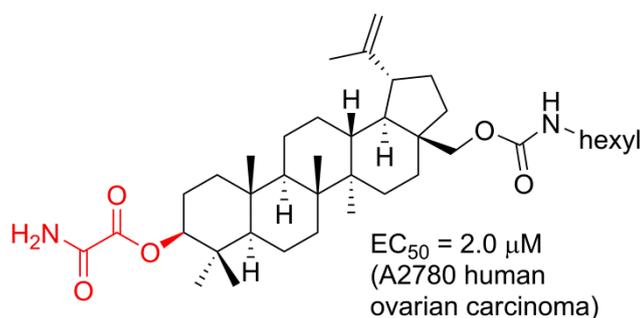
### Abstract

A variety of allobetulin derivatives was synthesized from allobetulin or allobetulone. These compounds were screened for their cytotoxic activity using a photometric SRB assay employing six different human tumor cell lines. In summary, opening of ring A of allobetulin in general lowers the cytotoxicity, but the 2,3-*seco* diethyl ester was highly cytotoxic and remarkable selective for A549 lung carcinoma cells while being significantly less cytotoxic for non-malignant mouse fibroblasts. The introduction of an amino group at position C-3 in the allobetulin skeleton enhances cytotoxicity and furnishes highly cytotoxic compounds. Their selectivity to distinguish between cancer cell and non-malignant cell depends on the configuration at position C-3.

**Publikation 3**

“Amino(oxo)acetate moiety: a new functional group to improve the cytotoxicity of betulin derived carbamates”

Lucie Heller, Vincent Perl, Jana Wiemann, Ahmed Al-Harrasi, René Csuk, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26 (12), 2852-2854. DOI:10.1016/j.bmcl.2016.04.055

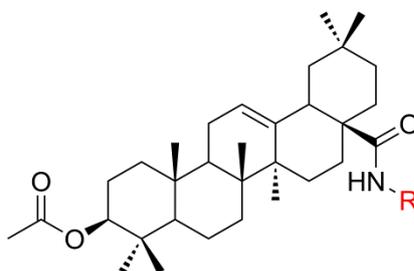
**Abstract**

While 3-*O*-acetylated betulin derivatives carrying a carbamate moiety at position C-28 are of rather low cytotoxicity for human tumor cell lines, the corresponding C-3 amino(oxo)acetates show good cytotoxicity. For example, an EC<sub>50</sub> as low as 2.0 μM was found for (3β) 28-[[hexylamino]carbonyloxy]lup-20 (29)-en-3-yl amino(oxo)acetate (**16**) employing the ovarian cancer cell line A2780.

## Publikation 4

“Synthesis and proapoptotic activity of oleanolic acid derived amides”

Lucie Heller, Anja Knorrscheidt, Franziska Flemming, Jana Wiemann, Sven Sommerwerk, Ioana Z. Pavel, Ahmed Al-Harrasi, René Csuk, *Bioorg. Chem.* **2016**, *68*, 137-151.  
DOI:10.1016/j.bioorg.2016.08.004



A2780 human ovarian tumor cell line

no apoptosis ← **R = 3-picolinyl, EC<sub>50</sub> = 3.4 μM**  
**R = dimethylaminoethyl, EC<sub>50</sub> = 1.6 μM** → apoptosis

## Abstract

Thirty-one different 3-*O*-acetyl-OA derived amides have been prepared and screened for their cytotoxic activity. In the SRB assays nearly all the carboxamides displayed good cytotoxicity in the low μM range for several human tumor cell lines. Low EC<sub>50</sub> values were obtained especially for the picolinylamides **14–16**, for a *N*-[2-(dimethylamino)-ethyl] derivative **27** and a *N*-[2-(pyrrolinyl)-ethyl] carboxamide **28**. These compounds were submitted to an extensive biological testing and proved compound **15** to act mainly by an arrest of the tumor cells in the S phase of the cell cycle. Cell death occurred by autophagy while compounds **27** and **28** triggered apoptosis.

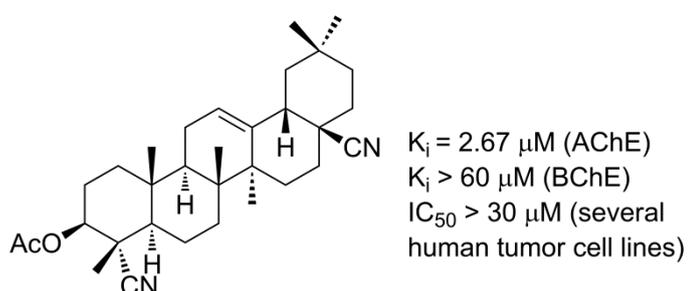
## 4.2. Pentazyklische Triterpenderivate als Cholinesterase-Inhibitoren

### Publikation 5

“Gypsogenin Derivatives: An unexpected class of inhibitors of cholinesterases”

Lucie Heller, Stefan Schwarz, Björn A. Weber, René Csuk, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*

2014, 347, 1-10. DOI: 10.1002/ardp.201400103



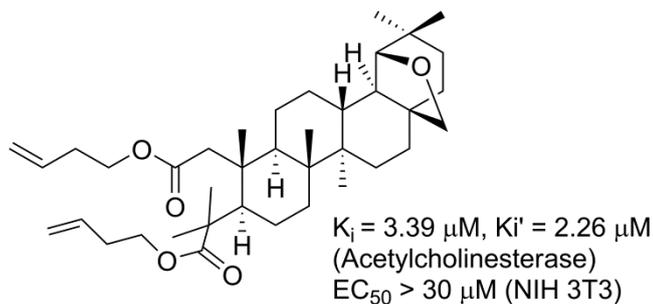
### Abstract

Gypsogenin (**1**) was obtained by acidic hydrolysis from its saponin. While the parent compound **1** acted as a selective inhibitor for butyrylcholinesterase (from equus) possessing a moderate mixed-type inhibition of the enzyme,  $K_i$  values as low as 2.67-0.59  $\mu\text{M}$  were determined for (3 $\beta$ ,4 $\alpha$ ) 3-*O*-acetylolean-12-ene-23,28-dinitrile (**11**) and acetylcholinesterase (AChE, from electric eel). Thus, **11** possesses one-fifth of the inhibitory activity of the “gold standard” galantamine hydrobromide; this compound is one of the first pentacyclic triterpenoids described as a potent AChE-selective inhibitor.

**Publikation 6**

“Allobetulin derived seco-oleananedicarboxylates act as inhibitors of acetylcholinesterase”

Lucie Heller, Stefan Schwarz, Anja. Obernauer, René Csuk, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25 (13), 2654-2656. DOI:10.1016/j.bmcl.2015.04.086

**Abstract**

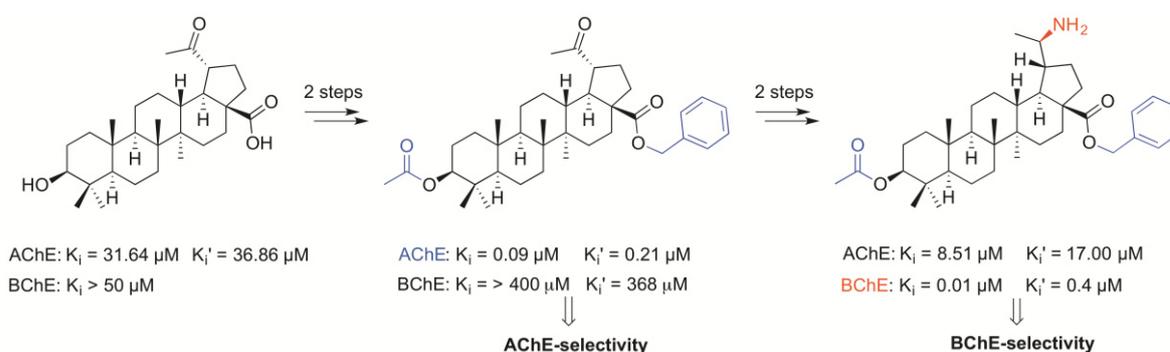
Ring opening of allobetulone gave either seco-acid **8** or di-acid **4**. These acids were converted into esters that were screened by Ellman's assay. A dibutenylester of low cytotoxicity (NIH 3T3 murine embryonic fibroblasts) was shown to be a good mixed-type inhibitor ( $K_i = 3.39$ ,  $K_i' = 2.26 \mu\text{M}$ ) for acetylcholinesterase.

## Publikation 7

“Amino derivatives of platanic acid act as selective and potent inhibitors of butyrylcholinesterase”

Lucie Heller, Michael Kahnt, Anne Loesche, Patricia Grabandt, Stefan Schwarz, Wolfgang Brandt, René Csuk, *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, *126*, 652-668.

DOI:10.1016/j.ejmech.2016.11.056



## Abstract

A set of thirtyfive 30-norlupan derivatives (**2–36**) was prepared from the natural triterpenoid platanic acid (**PA**), and the hydroxyl group at C-3, the carboxyl group at C-17 and the carbonyl group at C-20 were modified. These derivatives were tested for their inhibitory activity for the enzymes acetylcholinesterase (AChE, from electric eel) and butyrylcholinesterase (BChE, from equine serum) using Ellman’s assay. Extra enzyme kinetic studies were performed. The most active compound was (3 $\beta$ , 20R)-3-acetyloxy-20-amino-30-norlupan-28-oate (**32**) showing a  $K_i$  value of  $0.01 \pm 0.003 \mu\text{M}$  for BChE. This compound proved to be a selective ( $F_B = 851$ ), mixed-type inhibitor for BChE.

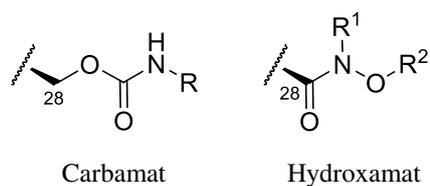
### 4.3.Übergreifende Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausgehend von unterschiedlichen pentazyklischen Triterpenoiden verschiedene Modifikationen durchgeführt. Die Variationen basierten, neben der klassischen Derivatisierung der funktionellen Gruppen, auf der Einführung von Strukturelementen (Michael-Akzeptoren) und der Öffnung des Ringsystems. Die Highlights dieser Modifikationen sind in den jeweiligen Abstracts der vorherigen Unterkapitel beschrieben.

In diesem Kapitel soll auf wichtige Erkenntnisse eingegangen werden, die im Rahmen der Promotion erhalten wurden. Die folgende Diskussion dieser Ergebnisse beinhaltet Resultate aus weiteren Veröffentlichungen:

- V-1** “Betulinic acid derived hydroxamates and betulin derived carbamates are interesting scaffolds for the synthesis of novel cytotoxic compounds”  
J. Wiemann, L. Heller, V. Perl, R. Kluge, D. Ströhl, R. Csuk, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *106*, 194-210. DOI:10.1016/j.ejmech.2015.10.043.
- V-2** “Targeting cancer cells with oleanolic and ursolic acid derived hydroxamates”  
J. Wiemann, L. Heller, R. Csuk, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (3), 907-909. DOI:10.1016/j.bmcl.2015.12.064.
- V-3** “Hederagenin as a triterpene template for the development of new antitumor compounds”  
D. Rodríguez-Hernández, A. J. Demuner, Luiz C.A. Barbosa, R. Csuk, L. Heller, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *105*, 57-62. DOI:10.1016/j.ejmech.2015.10.006.
- V-4** “Selective killing of cancer cells with triterpenoic acid amides - The substantial role of an aromatic moiety alignment”  
S. Sommerwerk, L. Heller, J. Kuhfs, R. Csuk, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *122*, 452-464. DOI:10.1016/j.ejmech.2016.06.053.

Die Untersuchungen der zytotoxischen Eigenschaften der 28-Carbamatderivate des Betulins haben gezeigt, dass die Amino(oxo)acetat-Funktion eine interessante und alternative funktionelle Gruppe zur *O*-Acetyl-Funktion der Position C-3 darstellt (**P-3**). Während letztere eine geringe Zytotoxizität aufweisen, liegen die EC<sub>50</sub>-Werte der Amino(oxo)acetatderivate (und der Hydroxylderivate) im Bereich von 2,0 bis 21,4 µM. Zusätzlich zu den drei genannten Substituenten (-OH, -OAc, -OCOCONH<sub>2</sub>) wurde der Einfluss einer Carbonylfunktion, sowie einer weiteren Carbamatgruppe (-OCONHR) an Position C-3 analysiert (**V-1**). Diese Derivate verfügen, bis auf eine Ausnahme, über keine zytotoxischen Eigenschaften. Ein Vergleich der 3-Hydroxyl-, 3-*O*-Acetyl- und 3-Oxo-Derivate von Betulinsäure abgeleiteten Hydroxamaten und Hydroxamsäuren (**V-1**) zeigen jedoch ähnliche Aktivitäten auf; dies gilt auch für Hydroxamsäurederivate der Oleanol- und Ursolsäure (**V-2**).

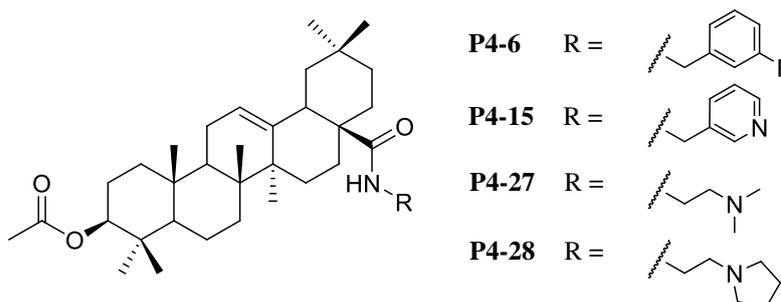


Schlussfolgernd kann keine allgemeingültige Aussage über eine an Position C-3 geeignetste funktionelle Gruppe, bezogen auf die genannten, getroffen werden.

Die Identifizierung geeigneter Substitutionsmuster unbekannter Leitstrukturen kann über die Durchführung einfacher Modifikationen erfolgen, um erste Hinweise auf die biologische Aktivität einer Substanz zu erhalten. Einen bisher kaum untersuchten, semi-synthetischen Naturstoff stellt Gypsogeninsäure dar (**P-5**). Die Einführung einer 3-*O*-Acetyl-Funktion oder die Darstellung der Dimethyl- und Diethylester zeigte keine Verbesserung der zytotoxischen Eigenschaften im Vergleich zum isolierten Naturstoff, Gypsogenin. Zeitgleich wurden von S. EMIRDAĞ-ÖZTÜRK *et al.*<sup>[95]</sup> die zytotoxischen Eigenschaften einiger anderer Derivate des Gypsogenins evaluiert. Diese Resultate zeigten ebenfalls kaum einen positiven Effekt nach der strukturellen Modifikation.

Liegen bereits Erkenntnisse über bevorzugte Strukturelemente vor, ist es konstruktiv dieses Wissen in die Synthesewege einzubauen. B. SIEWERT *et al.*<sup>[96]</sup> konnten für Benzyllderivate der Maslin- und Oleanolsäure eine Steigerung der Zytotoxizität durch die Einführung einer 3-*O*-Acetyl-Funktion nachweisen. Folglich wurden ausgehend von 3-*O*-Acetyl-oleanolsäure, Benzylamidderivate mit zusätzlicher Funktionalisierung (Cl, F, CF<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>) in variierenden Positionen (*meta*, *ortho*, *para*) synthetisiert und untersucht (**P-4**).

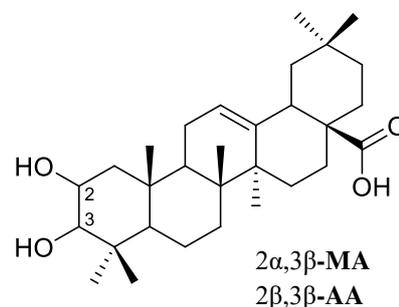
Die Verbindung **P4-6** ist an dieser Stelle hervorzuheben, da sie neben einer hohen Zytotoxizität ( $EC_{50} = 4,5 \mu\text{M}$ ; A2780) eine gute Selektivität ( $SI > 13$ ) zwischen Krebszelllinien und non-malignen Mausfibroblasten aufweist. Ferner konnte durch die Einführung eines Stickstoffsubstituenten eine weitere Steigerung der zytotoxischen Eigenschaften erreicht werden (z.B. **P4-27**;  $EC_{50} = 1,6 \mu\text{M}$ ; A2780). Dieser Trend zeichnet sich sowohl für aromatische (**P4-15**), als auch für alkylkettige Carbonsäureamide (**P4-27** und **P4-28**) ab.



Die Umsetzung von 3-*O*-Acetyl-oleanolsäure mit 1-(2-Aminoethyl)pyrrolidin lieferte das Derivat mit der höchsten Zytotoxizität ( $EC_{50} = 1,3 \mu\text{M}$ ; HT29). Dieser Substituent scheint die zytotoxische Aktivität einer Verbindung in einem besonders hohen Maß zu verbessern, wie auch an einem Konstitutionsisomer der Maslinsäure, dem Hederagenin, gezeigt werden konnte (**V-3**). Weiterführende Untersuchungen wurden an den Verbindungen **P4-6**, **P4-15**, **P4-27** und **P4-28** durchgeführt, um Aufschluss über die Zelltod-Modalitäten zu erhalten. Bereits die fluoreszenzspektroskopischen Beobachtungen (AO/PI-Doppelfärbung) gaben Hinweise auf unterschiedliche Wirkungsmechanismen der Substanzen, welche durch weitere Untersuchungen am Durchflusszytometer bestätigt wurden. Anzeichen für einen autophagischen Zelltod liefern die Verbindungen **P4-6** und **P4-15**, die Derivate **P4-27** und **P4-28** hingegen zeigen die charakteristischen Merkmale der Apoptose.

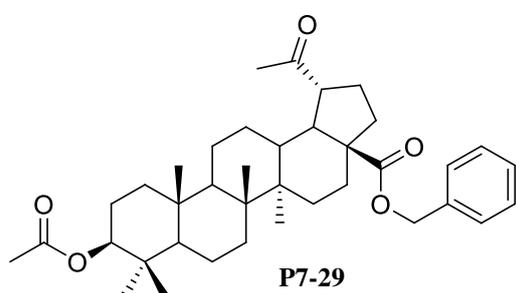
Zusammengefasst übt die Einführung eines Stickstoffsubstituenten einen positiven Effekt auf die zytotoxische Aktivität der Verbindungen aus. Ein ähnlicher Effekt konnte auch für das 5-Quinolinamidderivat der Oleanolsäure beobachtet werden (**V-4**). In Hinblick auf die Selektivität zwischen Krebszelllinien und non-malignen Mausfibroblasten ist jedoch keine bevorzugte Wirkung zu verzeichnen. Auffällig ist, dass durch die Einführung einer weiteren *O*-Acetylgruppe an Position C-2, die Selektivität um einen Faktor größer 10 gesteigert werden kann (**V-4**).

Im Speziellen handelt es sich bei der Verbindung um Augustussäure (**AA**), ein Epimer der Maslinsäure (**MA**). S. SOMMERWERK *et al.*<sup>[97]</sup> konnten zeigen, dass sowohl Maslin-, als auch Augustussäure über mehrere Syntheseschritte in guten Ausbeuten aus Oleanolsäure erhalten werden kann. Der Ansatz, ausgehend von Oleanolsäure geeignete Modifikationen der Leitstruktur zu identifizieren, und die gewonnenen Erkenntnisse im Anschluss auf Maslin- bzw. Augustussäure zu übertragen, stellt folglich einen vielversprechenden Weg für die Synthese potentiell aktiver und selektiver Zytostatika dar.



Die biologische Evaluierung der von Allobetulin abgeleiteten *seco*-Oleananderivate verzeichnet, mit Ausnahme weniger Verbindungen, kaum eine Steigerung der Zytotoxizität (**P-2**) oder Inhibierungsfähigkeit (**P-6**). Mittels reduktiver Aminierung des Allobetulons konnten die beiden aktiven 3-Aminoderivate **P2-6** und **P2-7** erhalten werden; die EC<sub>50</sub>-Werte sind im Bereich von 5,9 bis 15,5  $\mu$ M zu finden. Infolge weiterer Anwendung dieser Reaktion konnten die wohl erstaunlichsten Ergebnisse dieser Arbeit, hinsichtlich der ChE-Inhibierungsfähigkeit, erhalten werden (**P-7**).

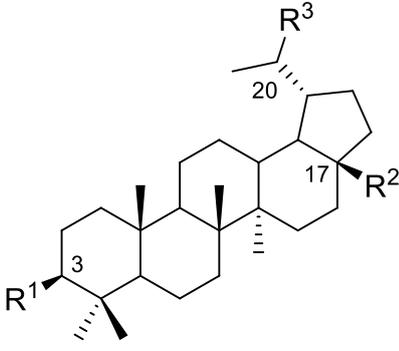
Platansäure, als ein pentazyklisches Triterpenoid mit geringen zytotoxischen Eigenschaften, war in den Fokus der Arbeit gerückt. In Anlehnung an die Synthese und die Untersuchungen des Gypsogenins wurden verschiedene Carbonsäureester und -amide dargestellt. Erstere zeigen eine überragend gute AChE-Inhibierung; im Speziellen ist die Verbindung **P7-29** mit



$K_i = 0,09 \mu$ M und einem Selektivitätsfaktor  $F_A = 368$  für AChE zu nennen. Das Aminoethylamidderivat **P7-5** hingegen liefert sowohl eine gute Inhibierung der AChE, als auch der BChE. Um den Einfluss einer NH<sub>2</sub>-Gruppe weiter zu untersuchen, wurden verschiedene Aminoderivate der Platansäure synthetisiert; mit einem unerwarteten Ergebnis.

**Tab. 3** Eine Übersicht der inhibitorischen Aktivität ( $K_i$  in  $\mu\text{M}$ ) ausgewählter Verbindungen bezogen auf BChE. Der Selektivitätsfaktor wird berechnet nach:  $F_B = K_i(\text{AChE})/K_i(\text{BChE})$ .

Nr.	Position			$K_i$ in $\mu\text{M}$	$F_B$
	$R^1$	$R^2$	$R^3$		
<b>PA</b>	OH	COOH	=O	> 50	
<b>P7-7</b>	OH	NH <sub>2</sub>	=O	6,39	3,3
<b>P7-11</b>	NH <sub>2</sub>	COOBn	=O	0,56	24
<b>P7-27</b>	OH	CH <sub>2</sub> OH	NH <sub>2</sub>	0,14	378
<b>P7-36</b>	OAc	COOH	NH <sub>2</sub>	0,10	209
<b>P7-24</b>	OAc	COOMe	NH <sub>2</sub>	0,09	> 44
<b>P7-34</b>	OH	COOBn	NH <sub>2</sub>	0,07	157
<b>P7-28</b>	OAc	CH <sub>2</sub> OAc	NH <sub>2</sub>	0,06	75
<b>P7-32</b>	OAc	COOBn	NH <sub>2</sub>	0,01	851



Die Einführung einer NH<sub>2</sub>-Gruppe an den Positionen C-17 (**P7-7**) bzw. C-3 (**P7-11**) führt zu einer enormen Steigerung der BChE-Inhibierungsfähigkeit, im Vergleich zur Leitstruktur **PA** (Tab.3). Weiterhin liefert die reduktive Aminierung der Carbonylfunktion an Position C-20 extrem stark BChE-inhibierende Verbindungen (Tab.3). Auffällig ist, dass der Benzylester **P7-32** im Vergleich zum Methylester **P7-24** neben der gesteigerten Inhibierungsfähigkeit eine erhöhte Selektivität aufweist (beschrieben durch den Selektivitätsfaktor  $F_B$ ). Die Reduktion der Carbonsäurefunktion an Position C-28 (**P7-27** und **P7-28**) scheint keinen weiteren Vorteil für die Inhibierungsfähigkeit der Verbindungen gegenüber BChE zu liefern. Die Auswertungen der doppelt-reziproken Auftragung der experimentellen Ergebnisse weist auf eine Inhibierung des Mischtyps hin. Demnach erfolgt die Bindung des Inhibitors sowohl am freien Enzym, als auch am Enzym-Substrat-Komplex. Hinweise über mögliche Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und Enzym liefern die Docking-Studien. Entscheidend für die hohe Affinität und Spezifität der Verbindung **P7-32** sind sehr wahrscheinlich eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen der (protonierten) Aminogruppe und H433, sowie eine Kation- $\pi$ -Wechselwirkung mit W79.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in sieben Publikationen veröffentlicht. Es konnte gezeigt werden, dass die Einführung eines Michael-Akzeptors im A-Ring zu einer intensiven Leistungssteigerung hinsichtlich der Zytotoxizität, im Vergleich zur Leitstruktur, führt. Die Modifikationen des Grundgerüsts durch die Öffnung des Ringsystems (A-Ring) zeigten bei den Untersuchungen von 2,3-*seco*-Allobetulinderivaten kaum eine Verbesserung der zytotoxischen Eigenschaften. Lediglich die Einführung einer Aminofunktion an Position C-3 des Allobetulins liefert gute EC<sub>50</sub>-Werte.

Weitere strukturelle Modifikationen des Betulins, durch die Einführung eines Carbamat-substituenten an Position C-28, ergaben in den Experimenten eine Steigerung der Zytotoxizität. Insbesondere konnte die bisher wenig untersuchte Amino(oxo)acetat-Gruppe, als eine Alternative zur *O*-Acetylfunktion der Position C-3, ermittelt werden.

Die Identifizierung geeigneter Substituenten für die Darstellung von Maslinsäurederivaten kann ebenfalls als erfolgreich bezeichnet werden. Vier Amidderivate der Oleanolsäure zeigen potentielle Eigenschaften für die Darstellung neuer Zytostatika, die Zelltod-Modalitäten sind dabei stark von dem jeweiligen Substituenten abhängig. Gegenstand zukünftiger Experimente sollte die Aufklärung über die Notwendigkeit eines Heteroatom-beinhaltenen Substituenten sein. Zusammenfassend konnten die Ergebnisse zeigen, dass bereits durch einfache, geringfügige Strukturmodifikationen eine hohe Zytotoxizität der Substanzen erreicht werden kann.

Die Evaluierung der Inhibierungsfähigkeit von Derivaten der Gypsogeninsäure und des Allobetulins hat gezeigt, dass einige Verbindungen in der Lage sind als AChE-Inhibitor zu agieren. Die Untersuchungen der Platansäurederivate zur Fähigkeit, die AChE oder BChE zu hemmen, haben einen enormen Beitrag zur Darstellung aktiver Verbindungen geleistet. Durch relativ einfache strukturelle Modifikationen des Naturstoffs konnten sowohl AChE- als auch BChE-hemmende Substanzen hergestellt werden, die nicht nur eine hohe Aktivität, sondern auch Selektivität aufweisen. Diese wertvollen Eigenschaften wurden, meines Wissens, bisher an keinem anderen pentazyklischen Triterpen beobachtet. Die Auswertungen der doppelt-reziproken Auftragung der experimentellen Ergebnisse, sowie die Docking-Studien lieferten erste Erkenntnisse zum Inhibierungsmechanismus. Nähere Untersuchungen zu den pharmakologischen Eigenschaften der Verbindungen werden nötig sein, um das Potential dieser neuartigen Cholinesterase-Inhibitoren weiter zu erforschen.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] E. Speck, *Handelsgeschichte des Altertums*, Bd.1, *Die orientalischen Völker*, Friedrich Brandstetter Verlag, Leipzig, **1900**, Nachdruck 2012, S. 82.
- [2] Universitätsbibliothek Heidelberg, <http://digi.ub.uni-heidelberg.de/diglit/ebers1875ga>, **(zuletzt aufgerufen am 23.11.2016)**.
- [3] M. Leutzsch, A. Roth, K. Steinke, D. Sicker, H. U. Siehl, M. Schmid, K. P. Zeller, S. Berger, *Chem. Unserer Zeit* **2013**, 47 (6), 344-354.
- [4] O. Wallach, *Liebigs Ann. Chem.* **1887**, 239 (1), 1-54.
- [5] A. Eschenmoser, *Zur säurekatalysierten Zyklisierung bei Mono- und Sesquiterpenverbindungen*, Dissertation, Techn. Wiss. ETH Zürich, **1952**.
- [6] L. Ruzicka, *Experientia* **1953**, 9 (10), 357-367.
- [7] L. Ruzicka, A. Eschenmoser, H. Heusser, *Experientia* **1953**, 9, 362.
- [8] G. Rosenkranz, *Zur Kenntnis des Lupeols*, Dissertation, Techn. Wiss. ETH Zürich, **1941**.
- [9] L. Ruzicka, H. Brüngger, E. Gustus, *Helv. Chim. Acta* **1932**, 15 (1), 634-648.
- [10] H. Brüngger, *Über das Betulin*, Dissertation, Techn. Wiss. ETH Zürich, **1932**.
- [11] U. Hausmann, *Liebigs Ann. Chem.* **1876**, 182 (3), 368-380.
- [12] H. Schulze, K. Pieroh, *Ber. Dt. Chem. Ges.* **1922**, 55 (8), 2332-2346.
- [13] K. A. Vesterberg, *Liebigs Ann. Chem.* **1922**, 428 (2-3), 243-246.
- [14] O. Dischendorfer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges. (A and B Series)* **1922**, 55 (11), 3692-3693.
- [15] L. Ruzicka, M. Brenner, *Helv. Chim. Acta* **1940**, 23 (1), 1325-1337.
- [16] M. Brenner, *Abbau-Versuche am Betulin*, Dissertation, Techn. Wiss. ETH Zürich, **1940**.
- [17] L. Ruzicka, E. Rey, *Helv. Chim. Acta* **1942**, 25 (1), 171-179.
- [18] L. Ruzicka, A. H. Lamberton, *Helv. Chim. Acta* **1940**, 23 (1), 1338-1345.
- [19] L. Ruzicka, G. Rosenkranz, *Helv. Chim. Acta* **1940**, 23 (1), 1311-1324.
- [20] L. Ruzicka, A. H. Lamberton, E. W. Christie, *Helv. Chim. Acta* **1938**, 21 (1), 1706-1717.
- [21] R. Aplin, T. Halsall, T. Norin, *J. Chem. Soc.* **1963**, 3269-3273.
- [22] C. Djerassi, R. Hodges, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78 (14), 3534-3538.
- [23] L. Ruzicka, M. Brenner, *Helv. Chim. Acta* **1939**, 22 (1), 1523-1528.
- [24] R. Xu, G. C. Fazio, S. P. Matsuda, *Phytochemistry* **2004**, 65 (3), 261-291.
- [25] M. Wink, *Tagungsband VDBiol* **1992**, 41-58.
- [26] A. Osbourn, R. J. Goss, R. A. Field, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, 28 (7), 1261-1268.
- [27] České Vysoké Učení Technické V Praze, J. Sarek, M. Vlk, *Topical product*, EP2384741 A2, **2011**.
- [28] G. Klebe, *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2009**, S.10.
- [29] X. He, R. H. Liu, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55 (11), 4366-4370.
- [30] M. E. Juan, U. Wenzel, V. Ruiz-Gutierrez, H. Daniel, J. M. Planas, *J. Nutr.* **2006**, 136 (10), 2553-2557.
- [31] J. Heilmann, *Chem. Unserer Zeit* **2007**, 41 (5), 376-389.
- [32] P. Dzubak, M. Hajduch, D. Vydra, A. Hustova, M. Kvasnica, D. Biedermann, L. Markova, M. Urban, J. Sarek, *Nat. Prod. Rep.* **2006**, 23 (3), 394-411.
- [33] G. Löffler, P. E. Petrides, P. C. Heinrich, *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, **2006**, S.1142.
- [34] S. Schaal, K. Kunsch, S. Kunsch, *Der Mensch in Zahlen: Eine Datensammlung in Tabellen mit über 20000 Einzelwerten*, Springer, Berlin Heidelberg, **2015**, S.8.

- [35] K. Jungermann, H. Möhler, C. Barth, A. Heidwolf, H. Baumgartner, G. Brandner, W. Gerok, H. H. Heißmeyer, H. Henrichs, N. Katz, *Biochemie: Ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, Biologie und Pharmazie*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **1980**, S.494.
- [36] T. Efferth, *Molekulare Pharmakologie und Toxikologie: Biologische Grundlagen von Arzneimitteln und Giften*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2007**, S.80-84.
- [37] H. Lüllmann, K. Mohr, L. Hein, G. Kuschinsky, *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2010**, S.456-464.
- [38] U. Dettmer, M. Folkert, E. Kächler, A. Sönnichsen, *Intensivkurs Biochemie*, Urban & Fischer, München, **2005**, S.269.
- [39] S. Levin, T. J. Bucci, S. M. Cohen, A. S. Fix, J. F. Hardisty, E. K. Legrand, R. R. Maronpot, B. F. Trump, *Toxicol. Pathol.* **1999**, *27* (4), 484-490.
- [40] G. Kroemer, W. S. El-Deiry, P. Golstein, M. E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele, B. Zhivotovsky, M. V. Blagosklonny, W. Malorni, R. A. Knight, M. Piacentini, S. Nagata, G. Melino, *Cell Death Differ.* **2005**, *12* (S2), 1463-1467.
- [41] M. D. Brush, *The Scientist* **2000**, *14* (16), 25-25.
- [42] S. Van Cruchten, W. Van den Broeck, *Anat. Histol. Embryol.* **2002**, *31* (4), 214-223.
- [43] L. Galluzzi, I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D. R. Green, M. O. Hengartner, O. Kepp, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nunez, M. E. Peter, M. Piacentini, D. C. Rubinsztein, Y. Shi, H. U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, G. Kroemer, *Cell Death Differ.* **2012**, *19* (1), 107-120.
- [44] P. Vandenabeele, L. Galluzzi, T. Vanden Berghe, G. Kroemer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11* (10), 700-714.
- [45] T. V. Berghe, A. Linkermann, S. Jouan-Lanhouet, H. Walczak, P. Vandenabeele, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15* (2), 135-147.
- [46] S. W. G. Tait, G. Ichim, D. R. Green, *J. Cell Sci.* **2014**, *127* (10), 2135-2144.
- [47] L. Galluzzi, J. Bravo-San Pedro, I. Vitale, S. Aaronson, J. Abrams, D. Adam, E. Alnemri, L. Altucci, D. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, *Cell Death Differ.* **2015**, *22* (1), 58-73.
- [48] R. Khosravi-Far, Z. Zakeri, R. A. Lockshin, M. Piacentini, *Methods in Enzymology Volume 442*, Elsevier Academic Press Inc., San Diego, **2008**.
- [49] G. M. Cragg, M. R. Boyd, J. Cardellina, M. Grever, S. Schepartz, K. Snadar, M. Suffness, *New Crops* **1993**, 161-167.
- [50] E. Pisha, H. Chai, I.-S. Lee, T. E. Chagwedera, N. R. Farnsworth, G. A. Cordell, C. W. W. Beecher, H. H. S. Fong, A. D. Kinghorn, D. M. Brown, M. C. Wani, M. E. Wall, T. J. Hieken, T. K. Das Gupta, J. M. Pezzuto, *Nat. Med.* **1995**, *1* (10), 1046-1051.
- [51] S. Fulda, C. Friesen, M. Los, C. Scaffidi, W. Mier, M. Benedict, G. Nuñez, P. H. Kramer, M. E. Peter, K.-M. Debatin, *Cancer Res.* **1997**, *57* (21), 4956-4964.
- [52] V. Zuco, R. Supino, S. C. Righetti, L. Cleris, E. Marchesi, C. Gambacorti-Passerini, F. Formelli, *Cancer Lett.* **2002**, *175* (1), 17-25.
- [53] S. Fulda, *Int J Mol Sci.* **2008**, *9* (6), 1096-1107.
- [54] R. Csuk, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2014**, *24* (8), 913-923.
- [55] D.-M. Zhang, H.-G. Xu, L. Wang, Y.-J. Li, P.-H. Sun, X.-M. Wu, G.-J. Wang, W.-M. Chen, W.-C. Ye, *Med. Res. Rev.* **2015**, *35* (6), 1127-1155.
- [56] M. E. Juan, J. M. Planas, V. Ruiz-Gutierrez, H. Daniel, U. Wenzel, *Br. J. Nutr.* **2008**, *100* (1), 36-43.
- [57] P. O. Harmand, R. Duval, C. Delage, A. Simon, *Int. J. Cancer* **2005**, *114* (1), 1-11.

- [58] B.-X.-Z. Liu, J.-Y. Zhou, Y. Li, X. Zou, J. Wu, J.-F. Gu, J.-R. Yuan, B.-J. Zhao, L. Feng, X.-B. Jia, R.-P. Wang, *BMC Complement. Altern. Med.* **2014**, *14*, 412.
- [59] Deutsches Krebsforschungszentrum - Stiftung des öffentlichen Rechts, K.M. Debatin, *Betulinic acid derivatives useful for the treatment of neuroectodermal tumors*, WO2000024762A1, **2000**.
- [60] P. Gonzalez, I. Mader, A. Tchoghandjian, S. Enzenmuller, S. Cristofanon, F. Basit, K. M. Debatin, S. Fulda, *Cell Death Differ.* **2012**, *19* (8), 1337-1346.
- [61] M. Willmann, V. Wacheck, J. Buckley, K. Nagy, J. Thalhammer, R. Paschke, T. Triche, B. Jansen, E. Selzer, *Eur. J. Clin. Invest.* **2009**, *39* (5), 384-394.
- [62] G. Liebscher, K. Vanchangiri, T. Mueller, K. Feige, J. M. V. Cavalleri, R. Paschke, *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *246*, 20-29.
- [63] U.S. National Institutes of Health, [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) (**zuletzt aufgerufen am 23.11.2016**).
- [64] A. Alzheimer, *Z. Ges. Neurol. Psychiatr.* **1911**, *4* (1), 356-385.
- [65] M. Freissmuth, S. Offermanns, S. Böhm, *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2016**, S. 358.
- [66] J. Q. Trojanowski, V. M. Lee, *FASEB J.* **1995**, *9* (15), 1570-1576.
- [67] [www.alzforum.org](http://www.alzforum.org) (**zuletzt aufgerufen am 24.09.2016**).
- [68] G. Deuschl, W. Maier, S3-Leitlinie Demenzen in *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie* (Hrsg.: Deutsche Gesellschaft für Neurologie), **2016**, Online: [www.dgn.org/leitlinien](http://www.dgn.org/leitlinien) (**zuletzt aufgerufen am 24.09.2016**).
- [69] J. M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Stryer Biochemie*, 7. Auflage, Springer Spektrum, Heidelberg, **2015**, S.402.
- [70] J. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science* **1991**, *253* (5022), 872-879.
- [71] P. J. Houghton, Y. Ren, M.-J. Howes, *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23* (2), 181-199.
- [72] J. Wiesner, Z. Kříž, K. Kuča, D. Jun, J. Koča, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22* (4), 417-424.
- [73] V. Sepsova, J. Z. Karasova, J. Korabecny, R. Dolezal, F. Zemek, B. J. Bennion, K. Kuca, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (8), 16882-16900.
- [74] Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J. C. Fontecilla-Camps, F. Nachon, *J. Biolog. Chem.* **2003**, *278* (42), 41141-41147.
- [75] D. Suárez, M. J. Field, *Proteins.* **2005**, *59* (1), 104-117.
- [76] M. Harel, J. Sussman, E. Krejci, S. Bon, P. Chanal, J. Massoulie, I. Silman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89* (22), 10827-10831.
- [77] R. Bullock, J. Touchon, H. Bergman, G. Gambina, Y. He, G. Rapatz, J. Nagel, R. Lane, *Curr. Med. Res. Opin.* **2005**, *21* (8), 1317-1327.
- [78] A. Nordberg, C. Ballard, R. Bullock, T. Darreh-Shori, M. Somogyi, *Prim. Care Companion CNS Disord.* **2013**, *15* (2). <http://dx.doi.org/10.4088/PCC.12r01412>.
- [79] E. Giacobini, *Pharmacol. Res.* **2004**, *50* (4), 433-440.
- [80] P. Anand, B. Singh, *Arch. Pharm. Res.* **2013**, *36* (4), 375-399.
- [81] N. H. Greig, D. K. Lahiri, K. Sambamurti, *Int Psychogeriatr.* **2002**, *14* (S1), 77-91.
- [82] A. Cornish-Bowden, *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 4. Auflage, Wiley, Weinheim, **2013**, S.138.
- [83] S. Kasper, H. P. Volz, B. Blanz, J. P. Doerr, M. de Zwaan, *Psychiatrie und Psychotherapie compact: Das gesamte Facharztwissen*, 3. überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2014**, S.345-346.

- [84] P. Ruszkowski, T. Bobkiewicz-Kozłowska, *Mini Rev. Org. Chem.* **2014**, *11* (3), 307-315.
- [85] K.-Y. Yoo, S.-Y. Park, *Molecules* **2012**, *17* (3), 3524-3538.
- [86] P. K. Mukherjee, V. Kumar, M. Mal, P. J. Houghton, *Phytomedicine* **2007**, *14* (4), 289-300.
- [87] Y.-K. Chung, H.-J. Heo, E.-K. Kim, H.-K. Kim, T.-L. Huh, Y. Lim, S.-K. Kim, D.-H. Shin, *Mol. Cells* **2001**, *11* (2), 137-143.
- [88] H.-J. Heo, H.-Y. Cho, B. Hong, H.-K. Kim, T.-R. Heo, E.-K. Kim, S.-K. Kim, C.-J. Kim, D.-H. Shin, *Mol. Cells* **2002**, *13* (1), 5-11.
- [89] K. Wilkinson, J. D. Boyd, M. Glicksman, K. J. Moore, J. El Khoury, *J. Biolog. Chem.* **2011**, *286* (40), 34914-34922.
- [90] W. Liang, X. Zhao, J. Feng, F. Song, Y. Pan, *Arq. Neuropsiquiatr.* **2016**, *74* (6), 482-488.
- [91] M. J. Castro, V. Richmond, C. Romero, M. S. Maier, A. Estévez-Braun, Á. G. Ravelo, M. B. Faraoni, A. P. Murray, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (13), 3341-3350.
- [92] M. J. Castro, A. P. Murray, M. B. Faraoni, *15th Int. Electron. Conf. Synth. Org. Chem.*, **2011**.
- [93] M. J. Castro, A. E. Braun, Á. G. Ravelo, A. P. Murray, M. B. Faraoni, *17th Int. Electron. Conf. Synth. Org. Chem., Lugo, Spain*, **2013**.
- [94] M. Gersch, J. Kreuzer, S. A. Sieber, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29* (6), 659-682.
- [95] S. Emirdağ-Öztürk, T. Karayıldırım, A. Çapcı-Karagöz, Ö. Alankuş-Çalışkan, A. Özmen, E. Poyrazoğlu-Çoban, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *82*, 565-573.
- [96] B. Siewert, E. Pianowski, A. Obernauer, R. Csuk, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (1), 594-615.
- [97] S. Sommerwerk, L. Heller, I. Serbian, R. Csuk, *Tetrahedron* **2015**, *71* (45), 8528-8534.

## Anhang

### Publikationen

1. Incorporation of a Michael acceptor enhances the antitumor activity of triterpenoic acids A-1
2. Simple structural modifications confer cytotoxicity to allobetulin A-15
3. Amino(oxo)acetate moiety: a new functional group to improve the cytotoxicity of betulin derived carbamates A-26
4. Synthesis and proapoptotic activity of oleanolic acid derived amides A-35
5. Gypsogenin Derivatives: An unexpected class of inhibitors of cholinesterases A-71
6. Allobetulin derived seco-oleananedicarboxylates act as inhibitors of acetylcholinesterase A-81
7. Amino derivatives of platanic acid act as selective and potent inhibitors of butyrylcholinesterase A-101

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Lucie Heller  
Adresse: Paul-Thiersch-Straße 3  
06124 Halle (Saale)  
Geburtsdaten: 15.06.1987 in Lutherstadt Eisleben  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: ledig

### Ausbildung

seit 01/2012 Promotionsstudium am Institut für Chemie / Organische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Prof. Dr. René Csuk

- 2009-2011 Master-Studiengang Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Masterarbeit: "Synthese und biologische Evaluierung von Platansäure-Derivaten" (Bewertung: sehr gut)  
Abschluss: Master of Science (Gesamtprädikat: gut)
- 2006-2009 Bachelor-Studiengang Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Bachelorarbeit: "Isolierung von Pomolsäure" (Bewertung: sehr gut)  
Abschluss: Bachelor of Science (Gesamtprädikat: gut)
- 1999-2006 Martin-Luther-Gymnasium Lutherstadt Eisleben, Abschluss: Abitur
- 1997-1999 Sekundarschule Hedersleben
- 1993-1997 Grundschule Hedersleben

**Publikationen****2016**

I. Z. Pavel, L. Heller, S. Sommerwerk, A. Loesche, A. Al-Harrasi, R. Csuk, Drotaverine – a concealed cytostatic!, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2016**, *349*, 1-5.

DOI: 10.1002/ardp.201600289.

Keywords: Cytostatic activity; Drotaverine; No-Spa®

L. Heller, A. Knorrscheidt, F. Flemming, J. Wiemann, S. Sommerwerk, I. Z. Pavel, A. Al-Harrasi, R. Csuk, Synthesis and proapoptotic activity of oleanolic acid derived amides, *Bioorg. Chem.* **2016**, *68*, 137-151.

DOI:10.1016/j.bioorg.2016.08.004.

Keywords: Oleanolic acid; Amides; Tumor cells; Cell-cycle arrest; Apoptosis; Autophagy

S. Sommerwerk, L. Heller, J. Kuhfs, R. Csuk, Selective killing of cancer cells with triterpenic acid amides – The substantial role of an aromatic moiety alignment, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *122*, 452-464.

DOI:10.1016/j.ejmech.2016.06.053.

Keywords: Maslinic acid; Oleanolic acid; Asiatic acid; Tumor cells; SRB assay; Apoptosis

S. Sommerwerk, L. Heller, J. Kuhfs, R. Csuk, Urea derivatives of ursolic, oleanolic and maslinic acid induce apoptosis and are selective cytotoxic for several human tumor cell lines, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *119*, 1-16.

DOI:10.1016/j.ejmech.2016.04.051.

Keywords: Ursolic acid; Oleanolic acid; Maslinic acid; Tumor cells; SRB assay; Apoptosis

L. Heller, V. Perl, J. Wiemann, A. Al-Harrasi, R. Csuk, Amino(oxo)acetate moiety: A new functional group to improve the cytotoxicity of betulin derived carbamates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (12), 2852-2854.

DOI:10.1016/j.bmcl.2016.04.055.

Keywords: Betulin; Cytotoxicity; Triterpene

D. Rodríguez-Hernández, A. J. Demuner, L. C.A. Barbosa, L. Heller, R. Csuk, Novel hederagenin-triazolyl derivatives as potential anti-cancer agents, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *115*, 257-267.

DOI:10.1016/j.ejmech.2016.03.018.

Keywords: Sapindus saponaria; Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition; Hederagenin derivatives; SRB assay

S. Sommerwerk, R. Kluge, D. Ströhl, L. Heller, A. E. Kramell, S. Ogiolda, P. Liebing, R. Csuk, Synthesis, characterization and cytotoxicity of new piplartine dimers, *Tetrahedron* **2016**, 72 (11), 1447-1454.

DOI:10.1016/j.tet.2016.01.045.

Keywords: Piplartine; Piperlongumine; Photodimerization; Truxinic acid; Cytotoxicity

J. Wiemann, L. Heller, R. Csuk, Targeting cancer cells with oleanolic and ursolic acid derived hydroxamates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26 (3), 907-909.

DOI:10.1016/j.bmcl.2015.12.064.

Keywords: Triterpenes; Oleanolic acid; Ursolic acid; Hydroxamates; SRB assay; Cancer

## 2015

J. Wiemann, L. Heller, V. Perl, R. Kluge, D. Ströhl, R. Csuk, Betulinic acid derived hydroxamates and betulin derived carbamates are interesting scaffolds for the synthesis of novel cytotoxic compounds, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 106, 194-210.

DOI:10.1016/j.ejmech.2015.10.043.

Keywords: Triterpenes; Betulinic acid; Betulin; Hydroxamates; Carbamates; Tumor cells

D. Rodríguez-Hernández, A. J. Demuner, Luiz C.A. Barbosa, R. Csuk, L. Heller, Hederagenin as a triterpene template for the development of new antitumor compounds, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 105, 57-62.

DOI:10.1016/j.ejmech.2015.10.006.

Keywords: Sapindus saponaria; Pentacyclic triterpenes; Hederagenin derivatives; SRB assay; Folk medicinal plant

L. Heller\*, S. Sommerwerk\*, F. Tzschöckell, J. Wiemann, S. Schwarz, B. Siewert, A. Al-Harrasi, R. Csuk, First occurrence of a furano-glycyrrhetoate and its cytotoxicity, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2015**, 348, 889-896.

DOI: 10.1002/ardp.201500318.

Keywords: Cytotoxicity; Furano-glycyrrhetoate; Glycyrrhetic acid; Selenophene; SeO<sub>2</sub> oxidation

S. Sommerwerk, L. Heller, I. Serbian, R. Csuk, Straightforward partial synthesis of four diastereomeric 2,3-dihydroxy-olean-12-en-28-oic acids from oleanolic acid, *Tetrahedron* **2015**, 71 (45), 8528-8534.

DOI:10.1016/j.tet.2015.09.037.

Keywords: Maslinic acid; Augustic acid; Bredemolic acid; 3-epi-Maslinic acid; Cytotoxicity

S. Sommerwerk, L. Heller, B. Siewert, R. Csuk, Chemoenzymatic synthesis and cytotoxicity of oenanthotoxin and analogues, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23 (17), 5595-5602.

DOI:10.1016/j.bmc.2015.07.031.

Keywords: Oenanthotoxin; Water dropwort; Antitumor; SRB assay

L. Heller, S. Schwarz, V. Perl, A. Köwitsch, B. Siewert, R. Csuk, Incorporation of a Michael acceptor enhances the antitumor activity of triterpenoic acids, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 391-399.

DOI:10.1016/j.ejmech.2015.07.004.

Keywords: Triterpenoic acid; Ursolic acid; Oleanolic acid; Glycyrrhetic acid; Platantic acid; Tumor cells

L. Heller, A. Obernauer, R. Csuk, Simple structural modifications confer cytotoxicity to allobetulin, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23 (13)*, 3002-3012.

DOI:10.1016/j.bmc.2015.05.015.

Keywords: Allobetulin; Betulin; Cytotoxicity; SRB-assay

L. Heller, S. Schwarz, A. Obernauer, R. Csuk, Allobetulin derived seco-oleananedicarboxylates act as inhibitors of acetylcholinesterase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25 (13)*, 2654-2656.

DOI:10.1016/j.bmcl.2015.04.086.

Keywords: Allobetulin; Acetylcholinesterase inhibitor; Alzheimer's disease; Triterpene

S. Sommerwerk, L. Heller, R. Csuk, Synthesis and cytotoxic activity of pentacyclic triterpenoid sulfamates, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2015**, *347*, 1-10.

DOI:10.1002/ardp.201400297

Keywords: Carbamoylsulfamates; Cytotoxic activity; Triterpenoids; Sulfamates

R. Sczepek, C. Nitsche, L. Heller, B. Siewert, R. Schäfer, F. Flemming, C. Otgonbayar, R. Csuk, Synthesis and cytotoxic properties of alkynic triterpenoid Mannich compounds, *Mediterr. J. Chem.* **2015**, *4 (3)*, 126-137

DOI:10.13171/mjc.4.3.2015.05.26.14.18/csuk.

Keywords: Betulin; Betulinic acid; Glycyrrhetic acid; Mannich compounds; Antitumor.

## 2014

S. Sommerwerk, S. Kern, L. Heller, R. Csuk, First total synthesis of piperodione and analogs, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55 (45)*, 6243-6244,

DOI:10.1016/j.tetlet.2014.09.079.

Keywords: Piperodione; Mannich reaction; Stetter reaction; Cytotoxicity; SRB assay

S. Schwarz, S. Sommerwerk, S. D. Lucas, L. Heller, R. Csuk, Sulfamates of methyl triterpenoates are effective and competitive inhibitors of carbonic anhydrase II, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *86*, 95-102.

DOI:10.1016/j.ejmech.2014.08.051.

Keywords: Carbonic anhydrase II; Triterpenoic acids; Enzyme inhibition; Sulfamates

R. Csuk, L. Heller, B. Siewert, A. Gutnov, O. Seidelmann, V. Wendisch,  $\beta$ -Nitro substituted carboxylic acids and their cytotoxicity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (16), 4011-4013. DOI:10.1016/j.bmcl.2014.06.021.

Keywords:  $\beta$ -Nitro carboxylic acids; Cytotoxicity; SRB assay; Cancer

L. Heller, S. Schwarz, B. A. Weber, R. Csuk, Gypsogenin Derivatives: An unexpected class of inhibitors of cholinesterases, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2014**, *347*, 1-10.

DOI: 10.1002/ardp.201400103

Keywords: Acetylcholinesterase; Alzheimer's disease; Anticancer activity

## Posterbeiträge

J. Wiemann, L. Heller, R. Csuk: Novel oleanolic acid derivatives and their selectivity towards ovarian carcinoma A2780 cells, Bioactive Natural Products: translating promise into practice, 11.-13.07.2016, Oxford, United Kingdom.

D. Rodríguez-Hernández, A. J. Demuner, L. C. A. Barbosa, L. Heller, R. Csuk: Synthesis of Hederagenin-triazolyl derivatives as potential anti-cancer agents, 16 th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 15-18.11.2015, Búzios, Brasilien.

L. Heller, A. Knorrscheidt, F. Flemming, R. Csuk: Oleanolic carboxamides – selective anticancer agents; 2 nd European Conference on Natural Products, 06.-09.09.2015, Frankfurt am Main, Deutschland.

L. Heller, S. Schwarz, A. Obernauer, R. Csuk: Allobetulin derived *seco*-oleananedicarboxylates as potential acetylcholinesterase inhibitors; 16 th Tetrahedron Symposium: Challenges in Bioorganic and Organic Chemistry, 16.-19.06.2015, Berlin, Deutschland.

L. Heller, S. Schwarz, R. Csuk: The battle against oblivion – Triterpenoids as new and selective BChE inhibitors; 17. JCF- Frühjahrssymposium, 25.-28.03.2015, Münster, Deutschland.

J. Wiese, L. Heller, S. Sommerwerk, R. Csuk: Isolation and modification of brazilin; 17. JCF- Frühjahrssymposium, 25.-28.03.2015, Münster, Deutschland.

J. Wiemann, L. Heller, R. Csuk: Synthesis and biological screening of triterpenoid hydroxamic acids; 17. JCF- Frühjahrssymposium, 25.-28.03.2015, Münster, Deutschland.

L. Heller, S. Schwarz, R. Csuk: The battle against oblivion – Triterpenoids as new and selective BChE inhibitors; XXIII International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISMIC 2014), 07.-11.09.2014, Lissabon, Portugal.

S. Sommerwerk, L. Heller, R. Csuk: Synthesis and derivatisation of oenanthotoxin; 16. JCF-Frühjahrssymposium, 26-29.03.2014, Jena, Deutschland.

I. Serbian, S. Sommerwerk, L. Heller, R. Csuk: Antitumor activity of A-ring modified maslinic acid derivatives; 16. JCF-Frühjahrssymposium, 26-29.03.2014, Jena, Deutschland.

Halle (Saale), 12.12.2016

---

Lucie Heller

## Erklärung zu den Autorenanteilen der Publikationen

Die Dissertation basiert auf sieben Manuskripten; in vier Publikationen liegt der Schwerpunkt auf der Zytotoxizität der Triterpenderivate und in drei der Publikationen stehen die inhibitorischen Eigenschaften der Triterpenoide gegenüber der AChE und BChE im Vordergrund. Die Manuskripte wurden in Zusammenarbeit mit allen Koautoren verfasst. R. Csuk betreute zusätzlich die Arbeit und stand jederzeit für fachliche Diskussionen zur Verfügung. Im Folgenden sollen die Anteile der Autoren an den durchgeführten Synthesen und der biologischen Evaluierung der Derivate näher erläutert werden.

**1. “Incorporation of a Michael acceptor enhances the antitumor activity of triterpenoic acids“** Lucie Heller, Stefan Schwarz, Vincent Perl, Alexander Köwitsch, Bianka Siewert, René Csuk, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 391-399.

Die Synthese wurde von V. Perl, A. Köwitsch, S. Schwarz und mir durchgeführt. Die Bestimmung der EC<sub>50</sub>-Werte wurde von B. Siewert und mir vorgenommen

**2. “Simple structural modifications confer cytotoxicity to allobetulin”** Lucie Heller, Anja Obernauer, René Csuk, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23 (13)*, 3002-3012.

Die Synthese wurde im Rahmen der betreuten Masterarbeit von A. Obernauer durchgeführt. Die Bestimmung der EC<sub>50</sub>-Werte wurde von mir vorgenommen.

**3. “Amino(oxo)acetate moiety: a new functional group to improve the cytotoxicity of betulin derived carbamates”** Lucie Heller, Vincent Perl, Jana Wiemann, Ahmed Al-Harrasi, René Csuk, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26 (12)*, 2852-2854.

Die Synthese wurde im Rahmen der betreuten Masterarbeit von V. Perl durchgeführt. Die Bestimmung der EC<sub>50</sub>-Werte wurde von mir vorgenommen.

**4. “Synthesis and proapoptotic activity of oleanolic acid derived amides”** Lucie Heller, Anja Knorrscheidt, Franziska Flemming, Jana Wiemann, Sven Sommerwerk, Ioana Z. Pavel, Ahmed Al-Harrasi, René Csuk, *Bioorg. Chem.* **2016**, *68*, 137-151.

Der Großteil der Synthese erfolgte im Rahmen der betreuten Bachelorarbeit durch A. Knorrscheidt und im Rahmen eines Vertiefungspraktikums durch F. Flemming. J. Wiemann und S. Sommerwerk haben einige, zu ergänzende Derivate synthetisiert. Die Bestimmung der EC<sub>50</sub>-Werte erfolgte unter Assistenz von I. Z. Pavel durch mich. Die weiterführenden Untersuchungen der Zelltod-Modalitäten wurden von mir durchgeführt.

**5. “Gypsogenin Derivatives: An unexpected class of inhibitors of cholinesterases”** Lucie Heller, Stefan Schwarz, Björn A. Weber, René Csuk, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2014**, *347*, 1-10.

Die Synthese wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von B. A. Weber durchgeführt. Die Bestimmung der Cholinesterase-Inhibierung wurde von S. Schwarz und die Bestimmung der EC<sub>50</sub>-Werte von mir vorgenommen.

**6. “Allobetulin derived *seco*-oleananedicarboxylates act as inhibitors of acetylcholinesterase”** Lucie Heller, Stefan Schwarz, Anja Obernauer, René Csuk, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25 (13)*, 2654-2656.

Die Synthese wurde im Rahmen der betreuten Masterarbeit von A. Obernauer durchgeführt. Die Bestimmung der Cholinesterase-Inhibierung wurde von S. Schwarz und die Bestimmung der EC<sub>50</sub>-Werte von mir vorgenommen.

**7. “Amino derivatives of platanic acid act as selective and potent inhibitors of butyrylcholinesterase”** Lucie Heller, Michael Kahnt, Anne Loesche, Patricia Grabandt, Stefan Schwarz, Wolfgang Brandt, René Csuk, *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, *126*, 652-668.

Der Großteil der Synthese wurde von mir durchgeführt. Weiterhin wurden im Rahmen der betreuten Masterarbeit von M. Kahnt, sowie im Rahmen der betreuten Bachelorarbeit von P. Grabandt einige Derivate synthetisiert. Die Cholinesterase-Inhibierung wurde in einem Pre-screening von S. Schwarz bestimmt. Die Evaluierung der Cholinesterase-Aktivität erfolgte unter meiner Assistenz durch A. Loesche, die ebenfalls die graphische Auswertung der experimentellen Daten durchführte. W. Brandt führte die Docking-Studien durch.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität oder Hochschule vorgelegt.

Halle (Saale), 12.12.2016

Lucie Heller