

**Entdeckung von Inhibitoren des Lactat-Transporters  
aus dem Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum***

**Dissertation**

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

vorgelegt von

**André Golldeck**

Kiel 2017

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Eric Beitz

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Christian Peifer

Tag der mündlichen Prüfung:

19.01.2018

## Vorbemerkung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Eric Beitz an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Pharmazeutisches Institut, Abteilung Pharmazeutische/Medizinische Chemie, im Zeitraum Oktober 2014 bis Dezember 2017 angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits an folgenden Stellen veröffentlicht:

## Fachzeitschriften:

A. Gollmack, B. Henke, B. Bergmann, M. Wiechert, H. Erler, A. Blancke Soares, T. Spielmann, E. Beitz

„Substrate-analogous inhibitors exert antimalarial action by targeting the *Plasmodium* lactate transporter PfFNT at nanomolar scale.“

*PLoS Pathog.* **2017**, 13, e1006172.

M. Wiechert, H. Erler, A. Gollmack, E. Beitz

„A widened substrate selectivity filter of eukaryotic formate-nitrite transporters enables high-level lactate conductance.“

*FEBS J.* **2017**, 284, 2663–2673.

## Posterbeiträge:

A. Gollmack, M. Wiechert, E. Beitz

„Inhibition of formate-nitrite transporters.“

Frontiers in Medicinal Chemistry, **2016**, Bonn, Deutschland.

A. Gollmack, B. Henke, B. Bergmann, M. Wiechert, H. Erler, A. Blancke Soares, T. Spielmann, E. Beitz

„Substrate-analogous blockers of the *Plasmodium* lactate transporter PfFNT exert antimalarial action at nanomolar scale.“

8<sup>th</sup> Summer School Medicinal Chemistry, **2016**, Regensburg, Deutschland.





# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung und Zielsetzung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Malaria .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Der Malariaerreger .....	1
1.1.2 Therapie und Prophylaxe der Malaria.....	3
1.1.3 Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Malaria .....	8
1.1.4 <i>Medicines for Malaria Venture</i> Malaria-Box .....	10
<b>1.2 Formiat-Nitrit-Transporter .....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Bedeutung .....	12
1.2.2 Struktureller Aufbau der Formiat-Nitrit-Transporter.....	14
1.2.3 Transportmechanismus.....	16
1.2.4 Der Lactat-Transporter aus <i>P. falciparum</i> – ein vielversprechendes Wirkstoffziel.....	17
<b>1.3 Zielsetzung.....</b>	<b>22</b>
<b>2 Geräte und Materialien .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Molekularbiologie und Aufnahmeassay mit <sup>14</sup>C-radiomarkierten Substraten.....</b>	<b>24</b>
2.1.1 Chemikalien, Kits, Materialien.....	24
2.1.2 Geräte.....	25
2.1.3 Plasmide und codierende DNA-Sequenzen.....	27
2.1.4 <i>Escherichia coli</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme .....	27
2.1.5 Antikörper.....	27
2.1.6 Puffer, Medien, Lösungen .....	28
2.1.6.1 Molekularbiologie.....	28
2.1.6.2 Proteinchemie .....	28
2.1.6.3 Aufnahmeassay mit <sup>14</sup> C-radiomarkierten Substraten .....	29
<b>2.2 Synthesen und Analytik.....</b>	<b>30</b>
2.2.1 Chemikalien .....	30
2.2.2 MPLC.....	30
2.2.3 NMR-Spektroskopie.....	30
2.2.4 Massenspektrometrie .....	31
2.2.5 Dünnschichtchromatographie.....	31

## Inhaltsverzeichnis

2.2.6	Schmelzpunkt-Bestimmung.....	31
<b>2.3</b>	<b>Software .....</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>32</b>
3.1.1	Schnelltransformation von <i>E. coli</i> .....	32
3.1.2	DNA-Isolierung .....	32
3.1.3	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	32
3.1.4	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	32
3.1.5	Dauerkulturen von <i>E. coli</i> .....	33
3.1.6	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	33
<b>3.2</b>	<b>Proteinchemische Methoden.....</b>	<b>33</b>
3.2.1	Aufschluss von <i>S. cerevisiae</i> für die SDS-PAGE.....	33
3.2.2	SDS-PAGE und Western Blot .....	34
<b>3.3</b>	<b>Aufnahmeassay mit <sup>14</sup>C-radiomarkierten Substraten .....</b>	<b>35</b>
3.3.1	Prinzip .....	35
3.3.2	Herstellung von Inhibitorverdünnungsreihen .....	36
3.3.3	IC <sub>50</sub> -Bestimmung in <i>S. cerevisiae</i> .....	37
3.3.4	Malaria-Box-Screening .....	38
3.3.5	Zeitabhängige Substrataufnahme .....	38
3.3.6	Zeitabhängige Inhibition: Bindung .....	38
3.3.7	Zeitabhängige Inhibition: Dissoziation .....	39
3.3.8	Zeitabhängige Inhibition: Bindung über 24 Stunden.....	39
<b>3.4</b>	<b><i>P. falciparum</i> Kultur .....</b>	<b>40</b>
3.4.1	IC <sub>50</sub> -Bestimmung in <i>P. falciparum</i> .....	40
3.4.2	Generierung einer Resistenz .....	40
<b>3.5</b>	<b>Synthese .....</b>	<b>40</b>
<b>3.6</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>41</b>
3.6.1	Hefesystem.....	41
3.6.2	<i>P. falciparum</i> Kultur.....	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>43</b>
4.1	Inhibition von PfFNT im Hefe-basierten Aufnahmeassay: Nifluminsäure, 16.....	43
4.2	Screening der Verbindungen aus der Malaria-Box.....	45
4.3	Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte von MMV007839, 18 und MMV000972, 19 in Hefe und in der <i>P. falciparum</i> Kultur.....	46
4.4	Einfluss von MMV007839, 18 auf den MCT1-vermittelten L-Lactat-Transport .....	48

## Inhaltsverzeichnis

<b>4.5</b>	<b>Bindungskinetik von MMV007839, 18 an PfFNT .....</b>	<b>50</b>
4.5.1	Bindung.....	50
4.5.2	Dissoziation.....	50
4.5.3	Bindung über 24 Stunden.....	51
4.5.4	Bestimmung der Inhibitionskonstanten.....	52
<b>4.6</b>	<b>Quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von MMV007839, 18 .....</b>	<b>53</b>
4.6.1	Bedeutung der Hemiketalfunktion.....	54
4.6.2	Bedeutung der Position des aromatischen Substituenten.....	54
4.6.3	Bedeutung der Carbonylfunktion.....	55
4.6.4	Bedeutung der Methylenfunktion.....	56
4.6.5	Bedeutung der Kettenlänge und der Anzahl der Fluoratome des Fluoralkylrestes .....	57
4.6.6	Bedeutung des sterischen Anspruchs des aromatischen Substituenten .....	59
<b>4.7</b>	<b>Aufklärung des Pharmakophors von MMV007839, 18.....</b>	<b>60</b>
4.7.1	Gleichgewicht zwischen Hemiketal und vinyloger Säure .....	60
4.7.2	Die offenkettige vinyloge Carbonsäure als aktive Form von MMV007839 <b>18</b> .....	63
4.7.3	Identifizierung der vinylogen Fluoralkylcarbonsäure als Pharmakophor .....	65
4.7.4	Bedeutung der Fluoratome des Pharmakophors für die Affinität zu PfFNT .....	66
4.7.5	Einfluss des pH-Wertes auf die Affinität von MMV007839 <b>18</b> zu PfFNT .....	71
<b>4.8</b>	<b>Bestätigung von PfFNT als Target von MMV007839, 18 .....</b>	<b>72</b>
4.8.1	Generierung von MMV007839-resistenten Parasiten mit einem mutierten Lactat-Transporter.....	72
4.8.2	Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte von MMV007839 <b>18</b> in PfFNT G107S-herstellender Hefe und in resistenten Parasiten.....	74
4.8.3	Bestätigung des Resistenzmechanismus am Lactat-Transporter aus <i>Babesia bovis</i> ....	75
4.8.4	Folgen der G107S-Mutation für den L-Lactat-Transport über PfFNT und das Parasitenwachstum .....	77
<b>4.9</b>	<b>Umgehung der Resistenz von PfFNT G107S.....</b>	<b>79</b>
4.9.1	BH-296 <b>37</b> und Pharmakophor <b>41</b> als Inhibitoren von PfFNT G107S .....	79
4.9.2	Bedeutung des aromatischen Substituenten .....	81
4.9.3	Einfluss des sterischen Anspruchs des aromatischen Systems .....	82
4.9.4	Potenz eines Inhibitors ohne aromatisches System.....	83
4.9.5	Einfluss eines Linkers zwischen Pharmakophor und aromatischem System .....	84
4.9.6	Inhibition von PfFNT G107S mit Nifluminsäure <b>16</b> .....	86
<b>4.10</b>	<b>Hemmung des prokaryotischen Nitrit-Transporters NirC.....</b>	<b>86</b>
4.10.1	Substratselektivität und pH-Abhängigkeit von EcNirC .....	87
4.10.2	Inhibition von EcNirC im Hefe-basierten Aufnahmeassay: MMV007839 <b>18</b> .....	89

4.10.3	Inhibition von <i>EcNirC</i> mit Nifluminsäure <b>16</b> : Struktur-Aktivitäts-Beziehungen .....	90
<b>5</b>	<b>Analytischer Teil.....</b>	<b>93</b>
<b>5.1</b>	<b>NMR-Spektroskopie .....</b>	<b>93</b>
5.1.1	MMV007839 <b>18</b> .....	93
5.1.1.1	Einleitung.....	93
5.1.1.2	<sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie.....	93
5.1.1.3	<sup>13</sup> C-NMR-Spektroskopie.....	94
5.1.1.4	<sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C-HSQC- und HMBC-Spektren .....	96
5.1.1.5	<sup>19</sup> F-NMR-Spektroskopie .....	98
5.1.2	BH-296 <b>37</b> .....	99
5.1.2.1	Einleitung.....	99
5.1.2.2	Keto-Enol-Tautomerie .....	100
5.1.2.3	<sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie.....	101
5.1.2.4	<sup>13</sup> C-NMR-Spektroskopie.....	102
5.1.2.5	<sup>19</sup> F-NMR-Spektroskopie .....	103
5.1.3	Zusammenfassung.....	104
<b>5.2</b>	<b>Synthetisierte Verbindungen .....</b>	<b>107</b>
5.2.1	Hemiketale .....	107
5.2.2	Vinyloge Fluoralkylcarbonsäuren .....	117
<b>6</b>	<b>Diskussion und Ausblick .....</b>	<b>134</b>
<b>6.1</b>	<b>Eignung des Hefe-basierten Aufnahmeassays für die Untersuchung von FNT-Inhibitoren.....</b>	<b>134</b>
6.1.1	<i>PfFNT</i> .....	134
6.1.2	<i>EcNirC</i> .....	137
6.1.3	Fazit zur Eignung des Assays .....	139
<b>6.2</b>	<b><i>PfFNT</i> – ein valides <i>Drug-Target</i> .....</b>	<b>140</b>
<b>6.3</b>	<b>Bindemodus von MMV007839, 18 an <i>PfFNT</i> .....</b>	<b>141</b>
<b>6.4</b>	<b>Umgehen der Resistenz.....</b>	<b>147</b>
<b>6.5</b>	<b><i>EcNirC</i>.....</b>	<b>150</b>
<b>7</b>	<b>Kurzfassung.....</b>	<b>153</b>
<b>8</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>154</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>155</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>i</b>

**Eidesstattliche Erklärung**

**Danksagung**

**Lebenslauf**

## Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolutiert
ACT	<i>Artemisinin-based Combination Therapy</i>
Ar-H	aromatisches Proton (NMR-Spektroskopie)
ATP	Adenosintriphosphat
<i>BbFNT</i>	Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>Babesia bovis</i>
br	verbreitertes Signal (NMR-Spektroskopie)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ci	Curie (1 Ci entspricht $3,7 \cdot 10^{10}$ Bq)
d	Dublett (NMR-Spektroskopie)
D	Deuterium
$\delta$	chemische Verschiebung in ppm (NMR-Spektroskopie)
D <sub>2</sub> O	Deuteriumoxid
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Dublett eines Dubletts (NMR-Spektroskopie)
ddd	Dublett eines Dubletts eines Dubletts (NMR-Spektroskopie)
[D <sub>6</sub> ]-DMSO	deutერიertes Dimethylsulfoxid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dt	Dublett eines Triplets (NMR-Spektroskopie)
ECL	Elektrochemilumineszenz
<i>EcNirC</i>	Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> )
ESI	Elektrospray-Ionisierung
FNT	Formiat-Nitrit-Transporter
HA	Hämagglutinin

## Abkürzungsverzeichnis

HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
<i>J</i>	Kopplungskonstante in Hz (NMR-Spektroskopie)
kDa	Kilodalton
K <sub>i</sub>	Inhibitionskonstante
LB	<i>Lysogeny Broth</i> (reichhaltiges <i>Escherichia coli</i> Medium)
m	Multiplett (NMR-Spektroskopie)
M	mol/l
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MHz	Megahertz
MMV	<i>Medicines for Malaria Venture</i>
MPLC	<i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i>
MS	Massenspektrometrie
M-TBST	TBST mit Milchpulver
NMR	Kernspinresonanz ( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>PfCRT</i>	<i>Chloroquine Resistance Transporter</i> aus <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>PfFNT</i>	Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>PfMDR1</i>	<i>Multi-Drug Resistance Transporter 1</i> aus <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>PfMRP</i>	<i>Multi-Drug Resistance-associated Protein</i> aus <i>Plasmodium falciparum</i>
ppm	<i>Parts per Million</i>
q	Quartett (NMR-Spektroskopie)
qt	Quartett eines Triplets (NMR-Spektroskopie)
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
s	Singulett (NMR-Spektroskopie)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bäckerhefe)

## Abkürzungsverzeichnis

SD-Medium	<i>Synthetic Defined Medium</i> (Minimalmedium für <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
SD-AHLW-Medium	SD-Medium mit Zusatz von Adenin, Histidin, Leucin und Tryptophan (Selektionsmedium für <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittels ( <i>Standard Error of the Mean</i> )
StNirC	Formiat Nitrit-Transporter aus <i>Salmonella typhimurium</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
t	Triplett (NMR-Spektroskopie)
TE	TRIS-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>TRIS Buffered Saline</i> )
TBST	TBS mit Tween 20
TM	Transmembranspanne
tq	Triplett eines Quartetts (NMR-Spektroskopie)
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
U/min	Umdrehungen pro Minute
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organization</i> )
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i> (reichhaltiges Medium für <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )

Die in dieser Arbeit erwähnten Unternehmens-, Produkt- oder Markenbezeichnungen können Marken oder eingetragene Markenzeichen der jeweiligen Eigentümer sein. Die Wiedergabe von Marken- und Warenzeichen in dieser Arbeit berechtigt nicht zu der Annahme, dass diese als frei von den Rechten Dritter zu betrachten seien.



# 1 Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Malaria

### 1.1.1 Der Malariaerreger

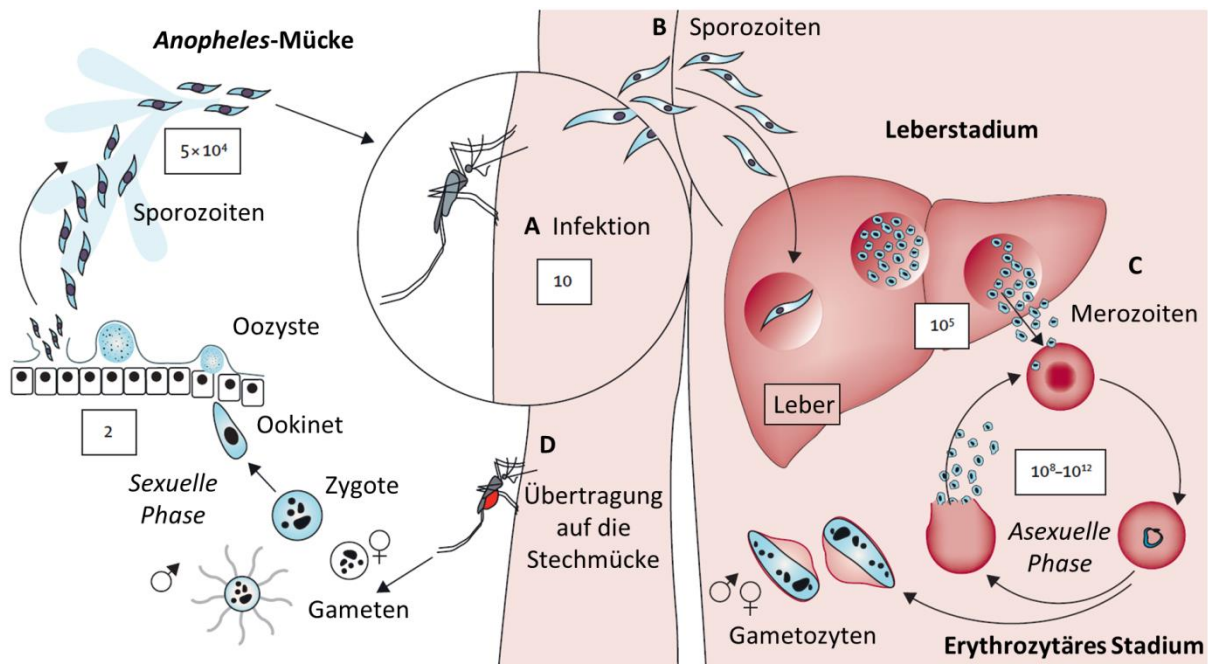
Malaria zählt mit weltweit 429.000 verursachten Todesfällen und 212 Millionen Neuinfektionen im Jahr 2015 zu den bedeutsamsten, durch Parasiten hervorgerufenen Krankheiten im Menschen. Die Erkrankung tritt in allen tropischen und subtropischen Regionen der Erde auf – nahezu die Hälfte der Erdbevölkerung lebt unter dem Risiko einer Infektion mit dem Malariaerreger. Besonders betroffen sind hierbei die tropischen Regionen Afrikas südlich der Sahara und Südostasien. So waren allein über 90 % der 2015 auf Malaria zurückzuführenden Todesfälle in Afrika zu beobachten.<sup>1</sup> In den besonders von der Krankheit betroffenen Gebieten wird Malaria zudem mit einem geringeren wirtschaftlichen Wachstum und Armut in Verbindung gebracht, so dass der Erkrankung dort auch eine große soziale und ökonomische Bedeutung zukommt.<sup>2</sup> Weiterhin wird eine Ausbreitung der Risikogebiete im Zuge des Klimawandels diskutiert, so könnten in Zukunft auch bisher nicht betroffene Teile der Weltbevölkerung mit Malaria konfrontiert werden.<sup>3</sup>

Ausgelöst wird Malaria durch Parasiten der Gattung *Plasmodium*, einzelligen eukaryotischen Mikroorganismen, die den Apicomplexa zugeordnet werden.<sup>4</sup> Fünf Spezies dieser Gattung gelten dabei als humanpathogen: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium knowlesi*.<sup>5-7</sup> Die mit Abstand meisten Todesfälle (99 %) werden von *P. falciparum* verursacht. *P. vivax* ist für weniger als 1 % der Todesfälle verantwortlich, außerhalb Afrikas ist deren Anteil jedoch mit 86 % vergleichsweise hoch.<sup>1</sup>

Die Übertragung von Plasmodien auf den Menschen erfolgt durch weibliche Stechmücken der Gattung *Anopheles*. Während einer Blutmahlzeit gelangen Plasmodien im infektiösen Stadium, sogenannte Sporoziten, über den Speichel der Mücke in den Körper des Menschen (Abbildung 1.1 A). Über den Blutkreislauf gelangen die Sporoziten in die Leber und dringen dort in die Hepatozyten ein (B). Dort entstehen aus einer einzigen Sporozoite durch ungeschlechtliche Zellteilungen mehrere zehntausend Merozoiten. Diese werden in den menschlichen Blutkreislauf freigesetzt, wo sie wiederum in die Erythrozyten eindringen. Bei Infektionen mit *P. vivax* und *P. ovale* können zusätzlich einige Parasiten ruhend als Hypnozoiten im intrahepatischen Stadium überdauern, bis sie nach mehreren Wochen oder Monaten erwachen und Erkrankungsrückfälle verursachen. In den Erythrozyten kommt es durch ungeschlechtliche Zellteilungen zu einer starken Vermehrung des Parasiten (C). Die neu gebildeten Merozoiten werden unter Zerstörung der Wirtszelle freigesetzt und befallen wiederum neue Erythrozyten. Der menschliche Körper reagiert auf die Lyse der roten Blutkörperchen mit einem Temperaturanstieg – hier tritt das für die Malariaerkrankung typische Fieber auf. Während der starken Vermehrung zeigen die Parasiten im erythrozytären Stadium eine hohe metabolische Aktivität: Über die Glykolyse wird Glucose, welche aus der Wirtszelle importiert wird, zur Energiegewinnung umgesetzt. Zusätzlich werden über die Proteolyse des Hämoglobins der Erythrozyten die für das Wachstum des Parasiten benötigten Aminosäuren generiert. Ein geringer Anteil an Merozoiten differenziert in

## Einleitung und Zielsetzung

männliche und weibliche Gametozyten, die bei einem erneuten Stich einer *Anopheles*-Mücke von dieser aufgenommen werden und im Darm der Mücke die sexuelle Phase im Lebenszyklus des Parasiten vollziehen (D). Zunächst entstehen durch Zellteilungen aus einer männlichen Gametozyte jeweils acht Mikrogameten, die weibliche Gametozyte reift zur Makrogamete. Mikrogamete und Makrogamete verschmelzen schließlich unter Bildung einer diploiden Zygote, die weiter in einen Ookineten differenziert, welcher beweglich ist und durch das Darmepithel der Mücke migriert. Der Ookinet entwickelt sich dort in eine Oozyste, welche letztendlich nach mehreren Replikationszyklen neue Sporozoiten freisetzt. Diese wandern in die Speicheldrüsen der *Anopheles*-Mücke und können von dort, bei einer erneuten Blutmahlzeit der Stechmücke, in einen menschlichen Wirt gelangen.<sup>6-9</sup>



**Abbildung 1.1:** Der Entwicklungszyklus des Malariaerregers modifiziert nach WHITE *et al.*<sup>9</sup> Während der Blutmahlzeit injiziert eine *Anopheles*-Mücke Sporozoiten in den Körper des Menschen (A, vergrößert). Diese wandern in die Leber (B) und vermehren sich dort. Aus den Hepatozyten werden Merozoiten in das Blut freigesetzt, befallen dort die Erythrozyten und vermehren sich asexuell (C). Einige Parasiten entwickeln sich zu Gametozyten, die bei einem erneuten Stich einer Mücke von dieser aufgenommen werden und dort die sexuelle Entwicklungsphase vollziehen (D).

Eine Infektion mit Plasmodien kann asymptomatisch verlaufen oder in einer unkomplizierten Malariaerkrankung resultieren, die durch Fieber und andere unspezifische Symptome wie Kopfschmerzen, Übelkeit und Muskelschmerzen gekennzeichnet ist. Vor allem die Infektion mit *P. falciparum* kann jedoch bei einigen Personen zu einer schweren Malariaerkrankung führen, die letale Konsequenzen haben kann – insbesondere wenn eine adäquate Behandlung nicht rechtzeitig erfolgt. Bei jungen Kindern, die vor allem in Gebieten mit hohen Übertragungsraten besonders von schwerer Malaria betroffen sind, geht die komplizierte Verlaufsform der Erkrankung unter anderem mit schwerer Anämie, Koma und Hypoglykämie einher. Bei älteren Menschen zeigt sich eine schwere Malaria dagegen häufiger in einem akuten Atemnotsyndrom sowie Nieren- und Leberversagen.<sup>6,7,9</sup>

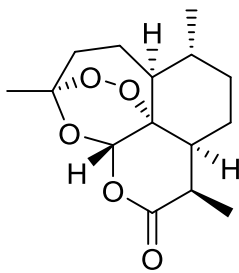
### 1.1.2 Therapie und Prophylaxe der Malaria

Die Kontrolle der Malaria bis hin zu deren Ausrottung ist auf drei unterschiedlichen Wegen möglich: Erstens durch Bekämpfung des für die Übertragung benötigten Vektors, zweitens über die Immunisierung des Menschen durch die Applikation eines Impfstoffes und drittens über die Anwendung von Wirkstoffen gegen die Malariaerkrankung selbst.<sup>10</sup> Zur Vektorkontrolle, also zur Bekämpfung der Stechmücken der Gattung *Anopheles*, werden heute vor allem Insektizid-behandelte Moskitonetze eingesetzt sowie Insektizide auf die Innenwände von Wohnungen aufgetragen. Dabei konnten vor allem durch den Einsatz der Insektenetze Erfolge im Kampf gegen die Übertragung der Malaria verzeichnet werden.<sup>11,12</sup> Diese werden jedoch durch das zunehmende Auftreten von Insektizid-resistenten *Anopheles*-Mücken gefährdet.<sup>13</sup> Neuere Ansätze sehen daher die Eindämmung der Insektenpopulation, beispielsweise durch das Ausbringen steriler männlicher Stechmücken, als Möglichkeit, die Übertragung der Malaria zu unterbinden. Solche Strategien der Vektorkontrolle sind jedoch noch weit von einer tatsächlichen Anwendung entfernt.<sup>14</sup>

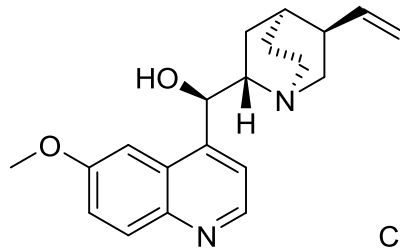
Für die Bekämpfung von Infektionskrankheiten, insbesondere für deren endgültige Ausrottung, sind Impfstoffe von größter Bedeutung – ein Impfstoff gegen Malaria wurde jedoch bis heute nicht zugelassen.<sup>15</sup> Die größten Herausforderungen in der Entwicklung eines wirksamen Malariaimpfstoffes stellen vor allem die Variabilität der Oberflächenantigene des Malariaerregers sowie dessen komplexer Lebenszyklus dar.<sup>6,16</sup> Momentan sind einige gegen *P. falciparum* gerichtete Impfstoffkandidaten Gegenstand früher klinischer Studien. Am weitesten fortgeschritten ist die Entwicklung von RTS,S (Handelsname: Mosquirix), einem Impfstoff der von GlaxoSmithKline in Kooperation mit der *PATH Malaria Vaccine Initiative* entwickelt wurde.<sup>7,16</sup> Für diesen konnte in einer Phase-III-Studie eine moderate Wirksamkeit bei schwacher Langzeitwirkung gezeigt werden.<sup>17</sup> Nach einer positiven Einschätzung seitens der *European Medicines Agency* (EMA) für die Anwendung von RTS,S als zusätzliche Maßnahme zur Bekämpfung der Malaria bei Kindern in Hochrisikogebieten, wurden von der *World Health Organization* (WHO) weitere Studien angefordert, so dass eine endgültige Empfehlung für die Anwendung des Impfstoffes vorerst noch aussteht.<sup>18,19</sup> Ein entscheidender Beitrag zur globalen Eradikation der Malaria ist dabei jedoch aufgrund der eingeschränkten Wirksamkeit von RTS,S nicht zu erwarten.

Da sowohl die Anwendung effektiver Methoden zur Ausrottung der *Anopheles*-Mücke als auch die Entwicklung eines hochwirksamen Impfstoffes gegen Malaria in naher Zukunft nicht zu erwarten sind, bilden gegen Plasmodien gerichtete Wirkstoffe nach wie vor die Grundlage der Prophylaxe und Behandlung der Malaria. Gegenwärtig steht eine größere Anzahl von Arzneistoffen aus unterschiedlichen Substanzklassen für die Behandlung einer Infektion mit Plasmodien zur Verfügung (Tabelle 1.1). Diese richten sich hauptsächlich gegen die erythrozytären Formen der Parasiten.<sup>20,21</sup> Einige Arzneistoffe mit teilweise unterschiedlichen Wirkmechanismen sind in Abbildung 1.2 dargestellt. Selbst gegen die neueren Wirkstoffe wurden jedoch bereits Resistenzen beobachtet; die Möglichkeiten für die Anwendung einiger Arzneistoffe sind zum Teil sehr stark eingeschränkt und müssen sich nach den jeweils vorherrschenden Resistenzbedingungen richten.<sup>10,22–26</sup> Zudem ist der Einsatz der verfügbaren Arzneistoffe oftmals nur in Form einer Kombination möglich, um der Entstehung weiterer Resistenzen vorzubeugen.<sup>20</sup>

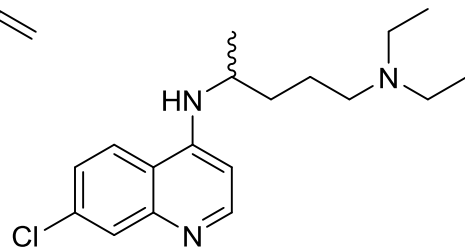
## Einleitung und Zielsetzung



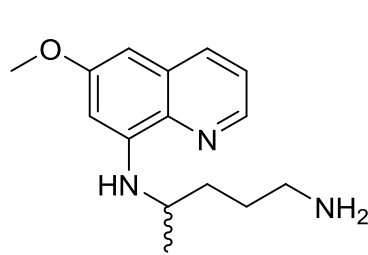
**Artemisinin, 1**



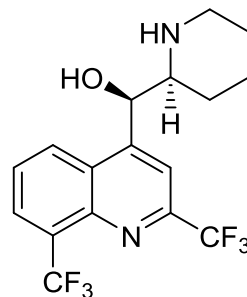
**Chinin, 2**



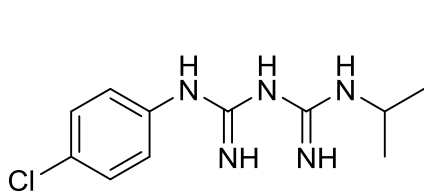
**Chloroquin, 3**



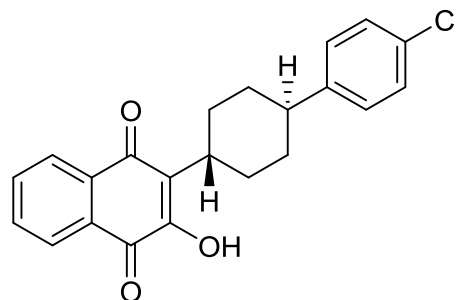
**Primaquin, 4**



**Mefloquin, 5**



**Proguanil, 6**



**Atovaquon, 7**

**Abbildung 1.2:** Einige Wirkstoffe, die aktuell gegen Malaria eingesetzt werden. Artemisinin, 1 wird nur in Form seiner Derivate Artesunat, Artemether und Dihydroartemisinin angewendet.<sup>10,20,21</sup>

Die heute bedeutsamste Substanzklasse stellen die Derivate des Sesquiterpenlactons Artemisinin **1** dar, das eine Endoperoxidbrücke aufweist. Durch Spaltung der Peroxidfunktion werden hochreaktive radikalische Spezies gebildet, die eine Vielzahl von metabolischen Stoffwechselwegen und Biosyntheseprozessen, welche für das Überleben der Malariaerreger von essentieller Bedeutung sind, stören.<sup>27,28</sup> Da die Aktivierung der Artemisinin-Derivate durch Häm erfolgt, das während des erythrozytären Stadiums der Parasiten in großen Mengen aus dem Verdau des Hämoglobins entsteht (siehe Abschnitt 1.1.1), erreicht Artemisinin **1** eine hohe antiplasmodiale Wirkung in infizierten Erythrozyten bei gleichzeitig geringen Nebenwirkungen auf gesunde Blutzellen.<sup>27</sup> Die Artemisinin-Derivate Artemether, Artesunat und Dihydroartemisinin sind hochwirksam gegen akute Formen unkomplizierter

Malaria, da sie in kurzer Zeit eine starke Reduktion der Parasitendichte im Blut erzielen. Die Arzneistoffe selbst zeigen nur kurze Halbwertszeiten, daher werden sie ausschließlich in Kombination mit einem länger wirksamen Wirkstoff gegeben, der eventuell überlebende Parasiten zuverlässig eliminiert und zudem die Entwicklung von Resistenzen verhindern soll. In Form dieser sogenannten *Artemisinin-based combination therapy* (ACT) gelten die Artemisinin-Derivate heute als Goldstandard bei der Behandlung der unkomplizierten Malaria.<sup>20,29</sup> Ausgehend von Südostasien traten jedoch auch gegen diese Wirkstoffklasse bereits Resistenzen auf. Diese zeigen sich vielmehr in einer verminderten Eliminierungsrate der Parasiten aus dem Blut, als in einer Verschiebung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) der Wirkstoffe.<sup>30</sup> Die molekularen Mechanismen, die dieser Resistenzentwicklung zu Grunde liegen, sind noch nicht vollständig verstanden, als eine Ursache gelten jedoch Mutationen im plasmodialen Kelch-Gen *K13*, die möglicherweise mit einer Antagonisierung der Artemisininwirkung in Zusammenhang stehen.<sup>7,26</sup>

Chinin **2**, ein Arylaminoalkohol, ist der älteste Wirkstoff gegen Malaria und wurde bereits im 17. Jahrhundert in Form von Chinarinde, aus der es später isoliert werden konnte, eingesetzt.<sup>31</sup> In der Nahrungsvakuole der sich intraerythrozytär vermehrenden Parasiten entsteht als Nebenprodukt des Hämoglobinabbaus das für den Erreger toxische Häm. Dieses wird durch die Plasmodien zu dem unreaktiven kristallinen Pigment Hämazoin polymerisiert und in der Nahrungsvakuole abgelagert. Chinin **2** hemmt diese Häm-Entgiftung, so dass die Erreger durch ihre eigenen Stoffwechselprodukte geschädigt werden.<sup>21,32,33</sup> Heute wird Chinin **2** aufgrund seiner vergleichsweise hohen Toxizität nur noch als Reserve bei schweren Formen der Malariaerkrankung eingesetzt.<sup>20</sup>

Das 4-Aminochinolin-Derivat Chloroquin **3** wirkt ebenso wie Chinin **2** durch Inhibition der Häm-Entgiftung in der Nahrungsvakuole des Parasiten. Es war lange Zeit das Mittel der Wahl in der Malariatherapie, ist jedoch heute nahezu auf der gesamten Welt von Resistenzen, insbesondere bei *P. falciparum*, betroffen. Chloroquin **3** wird daher gegen diesen Malariaerreger nur noch in Regionen eingesetzt, in denen bislang keine Resistenzen beobachtet wurden.<sup>20</sup> Auf molekularer Ebene ist die Vermittlung der Chloroquin-Resistenz in *P. falciparum* auf Veränderungen in Transporterproteinen zurückzuführen. So führen Mutationen im *chloroquine resistance transporter* (*PfCRT*) zum verstärkten Efflux von Chloroquin **3** aus der Nahrungsvakuole des Malariaerregers und damit zu einer Verringerung der Konzentration des Arzneistoffes an seinem Wirkort. Daneben leisten auch Polymorphismen im *multi-drug resistance transporter 1* (*PfMDR1*) sowie im *multi-drug resistance-associated protein* (*PfMRP*) einen Beitrag zur Vermittlung der Chloroquin-Resistenz. *PfMDR1*, der vor allem in der Membran der Nahrungsvakuole vorkommt, und *PfMRP*, welches sich in der Plasmamembran der Parasiten befindet, werden wie *PfCRT* mit einem veränderten Chloroquin-Transport in Verbindung gebracht.<sup>10,34-36</sup> Die Wirkstoffe Amodiaquin und Piperaquin sind als 4-Aminochinoline in Struktur und Wirkmechanismus dem Chloroquin **3** ähnlich, zeigen jedoch zusätzlich Wirksamkeit gegen einige Chloroquin-resistente *Plasmodium* Stämme. Sie werden daher als Partnerwirkstoffe im Rahmen der ACTs eingesetzt.<sup>20</sup>

Primaquin **4**, ein 8-Aminochinolin-Derivat, zeigt als einziger der verfügbaren Wirkstoffe eine große Wirksamkeit gegen exoerythrozytäre Formen der Plasmodien. Aus diesem Grund wird der Wirkstoff zur Eliminierung der in der Leber überdauernden Hypnozoiten von *P. vivax* und

## Einleitung und Zielsetzung

*P. ovale* angewendet.<sup>20</sup> Es wird angenommen, dass in der Leber aus Primaquin **4** reaktive Metabolite generiert werden, die wiederum metabolische Prozesse in den Mitochondrien der Plasmodien stören.<sup>37</sup>

Die Arylaminoalkohole Mefloquin **5** (Handelsname: Lariam) und Lumefantrin (in Kombination mit Artemether unter der Handelsbezeichnung Riamet zugelassen) sind strukturell mit Chinin **2** verwandt und wirken ebenfalls über die Hemmung der Häm-Polymerisation. Sie zeigen zusätzliche Wirksamkeit gegen Chloroquin-resistente *P. falciparum* Stämme und werden in Kombination mit einem Artemisinin-Derivat im Rahmen einer ACT eingesetzt. Mefloquin **5** eignet sich neben der therapeutischen Anwendung außerdem zur Prophylaxe.<sup>20</sup> Das Biguanid Proguanil **6** und das Diaminopyrimidin-Derivat Pyrimethamin sind Hemmstoffe der parasitären Dihydrofolatreduktase, einem für die Nucleinsäuresynthese essentiellen Enzym. Unter der Handelsbezeichnung Malarone wird Proguanil **6** in Kombination mit Atovaquon **7**, einem Naphthochinon-Derivat, welches die parasitäre Atmungskette hemmt, insbesondere zur Malariaphylaxe eingesetzt. Wird Atovaquon **7** nicht mit einem weiteren Wirkstoff kombiniert, ist eine rasche Resistenzentwicklung sehr wahrscheinlich, da bereits einzelne, durch Punktmutationen bedingte Aminosäureaustausche im Cytochrom *b*-Protein ausreichen, um die Sensitivität der Plasmodien für diesen Wirkstoff stark zu vermindern.<sup>21,38</sup> Kombiniert mit dem Sulfonamid Sulfadoxin, einem Hemmstoff der Dihydropteroatsynthese, findet Pyrimethamin zusammen mit Artesunat im Rahmen der ACT Anwendung. Ebenfalls angewendet werden die Antibiotika Clindamycin und Doxycyclin, die die Proteinbiosynthese in den Apicoplasten, speziellen Organellen der Apicomplexa mit prokaryotischem Ursprung, inhibieren.<sup>20,39,40</sup>

## Einleitung und Zielsetzung

**Tabelle 1.1: Aktuell gegen Malaria eingesetzte Arzneistoffe.**<sup>20,21</sup>

Verbindungsklasse	Arzneistoff	Anwendung
Sesquiterpen Endoperoxide (Derivate des Artemisinin <b>1</b> )	Artesunat	+ Amodiaquin, + Mefloquin <b>5</b> , + Sulfadoxin/Pyrimethamin als ACT erste Wahl bei komplizierter Malaria
	Artemether	+ Lumefantrin als ACT
	Dihydroartemisinin	+ Piperaquin als ACT
4-Aminochinoline	Chloroquin <b>3</b>	Behandlung unkomplizierter <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i> und <i>P. knowlesi</i> Malaria
	Amodiaquin	+ Artesunat als ACT
	Piperaquin	+ Dihydroartemisinin als ACT
8-Aminochinoline	Primaquin <b>4</b>	Eliminierung und Rezidivprophylaxe von <i>P. vivax</i> und <i>P. ovale</i>
Arylaminoalkohole	Chinin <b>2</b>	Alternative bei komplizierter Malaria
	Mefloquin <b>5</b>	+ Artesunat als ACT, Prophylaxe
	Lumefantrin	+ Artemether als ACT
Antifolate	Sulfadoxin/ Pyrimethamin	+ Artesunat als ACT
	Proguanil <b>6</b>	+ Atovaquon <b>7</b> zur Prophylaxe und Behandlung unkomplizierter Malaria
Naphthochinone	Atovaquon <b>7</b>	+ Proguanil <b>6</b> zur Prophylaxe und Behandlung unkomplizierter Malaria
Antibiotika	Clindamycin	in Kombination mit Artesunat oder Chinin <b>2</b> zur Behandlung unkomplizierter oder schwerer Malaria
	Doxycyclin	Prophylaxe, in Kombination mit Artesunat oder Chinin <b>2</b> zur Behandlung von <i>P. falciparum</i> Malaria

### 1.1.3 Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Malaria

Da, wie unter Abschnitt 1.1.2 beschrieben, die Wirksamkeit der aktuell zugelassenen Arzneistoffe zunehmend von Resistenzentwicklungen bedroht ist, werden neue Verbindungen mit antiplasmodialer Wirksamkeit benötigt, um Malaria auch in Zukunft zuverlässig behandeln und kontrollieren zu können. Insbesondere Wirkstoffe, die sich gegen bislang nicht adressierte *Targets* richten, könnten dabei helfen, auch multiresistente *Plasmodium* Stämme zu eliminieren. Die Anforderungen an neue Wirkstoffe sind dabei vergleichsweise hoch: Idealerweise sollten sie über eine schnelle Eliminierung der Parasiten die Dauer der Behandlung einer Malariaerkrankung verkürzen und somit zusätzlich zu einer Verbesserung der Compliance der Patienten beitragen. So würde ein Wirkstoff, der nach einmaliger Applikation die Parasiten im Patienten zuverlässig eliminiert, das Risiko der Entwicklung neuer Resistenzen erheblich vermindern. Zur Unterbrechung des fortwährenden Kreislaufes der Krankheit wäre weiterhin eine Hemmung der Übertragung des Malariaerregers vom menschlichen Wirt auf die *Anopheles*-Mücke von Vorteil. Aufgrund des breiten Einsatzes sollten neue Wirkstoffe eine geringe Toxizität auf den Menschen zeigen und möglichst nicht mit anderen, gegen Malaria angewendeten, Arzneistoffen wechselwirken. Die Stabilität der Wirkstoffe unter den anspruchsvollen klimatischen Bedingungen der Tropen und Subtropen sollte zusätzlich gewährleistet sein. Nicht zuletzt sind auch die Kosten einer neuen Therapie sehr entscheidend für deren breite Anwendung in der Bevölkerung der von Malaria besonders betroffenen Gebiete.<sup>41–43</sup>

Die in den vergangenen Jahren unternommenen Anstrengungen zur Identifizierung neuer antiplasmodial wirksamer Verbindungen führten zur Entdeckung vieler potentieller Arzneistoffkandidaten und Leitstrukturen.<sup>44–48</sup> Der größte Anteil der Verbindungen wurde dabei in phänotypischen *Screenings* gefunden. Die Identifizierung der jeweiligen *Targets* dieser Inhibitoren erfolgte zumeist erst im Anschluss. Besonders erfolgreich für die Entwicklung klinischer Wirkstoffkandidaten war hierbei die Zusammenarbeit des *Medicines for Malaria Venture* (MMV) mit Partnern an Hochschulen und aus der Industrie – aus diesen Kooperationen resultierten mehrere Verbindungen, die in frühe Phasen der klinischen Prüfung eintraten.<sup>49</sup> MMV ist eine nicht-gewinnorientierte Organisation, die, finanziert von Regierungsbehörden und privaten Stiftungen, ihre Partner in der Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Malaria unterstützt. Sie hat zum Ziel, durch die Entwicklung neuer Arzneistoffe und deren erleichterte Bereitstellung, die Belastung durch Malaria in den betroffenen Regionen zu reduzieren.<sup>49</sup> In Abbildung 1.3 sind vier Verbindungen gezeigt, die aus solchen Kooperationen entstanden sind. Diese Wirkstoffe, auf die im Folgenden genauer eingegangen werden soll, wurden auf sehr unterschiedliche Weise entdeckt und richten sich gegen verschiedene, zum Teil neuartige *Targets*.

Eine in Kooperation von Sanofi und MMV entwickelte Wirkstoffkombination, bestehend aus Artefenomel **8** und Ferroquin **9**, befindet sich momentan in einer Phase IIb Studie, in der beide Wirkstoffe als Kombinationstherapie an Patienten untersucht werden. Beide Substanzen entstammen ursprünglich der akademischen Forschung und sind Resultate des Versuches, bereits auf dem Markt befindliche Wirkstoffe durch rationales Design zu verbessern. So konnte mit dem Trioxolan-Derivat Artefenomel **8**, basierend auf der für die antiplasmodiale Wirksamkeit der Artemisinin-Derivate entscheidenden Endoperoxidfunktion,



ein synthetisches Endoperoxid entwickelt werden. Dieses zeigt gegenüber den Sesquiterpen-Endoperoxiden eine deutlich verlängerte Halbwertszeit, so dass eine einmalige Applikation von Artefenomel **8** zur Eradikation der Parasiten aus dem Blut möglich erscheint. Zusätzlich wurde für Artefenomel **8** eine Wirksamkeit gegen Artemisinin-resistente Plasmodienstämme nachgewiesen.<sup>41,49,50</sup> Der Partnerwirkstoff Ferroquin **9** stellt ein weiterentwickeltes 4-Aminochinolin-Derivat dar, welches wie Chloroquin **3** die Hämazoin-Bildung inhibiert, dabei jedoch keine Kreuzresistenz zu Chloroquin **3**, Amodiaquin oder Piperaquin zeigt.<sup>7,49,51</sup> Durch das in die Seitenkette integrierte Ferrocen zählt Ferroquin **9** zu den metallorganischen Verbindungen – eine besondere strukturelle Klasse unter Arzneistoffen. Es wird angenommen, dass das in der Ferrocen-Funktion enthaltene Eisen(II) an der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt ist, die zur Eliminierung des Malariaerregers beitragen.<sup>51</sup>

Die Entdeckung von DSM265 **10**, einem weiteren Wirkstoff, der sich momentan in Phase II der klinischen Prüfung befindet, basiert auf einem völlig anderen Ansatz: Das *Target* in *P. falciparum*, die plasmodiale Dihydroorotatdehydrogenase (*PfDHODH*), war bereits vor der Identifizierung dieses Wirkstoffes als ein für den Parasiten essentielles Enzym in der Synthese von Pyrimidinen identifiziert worden. Da Plasmodien die zur Synthese von Nucleinsäuren benötigten Pyrimidine ausschließlich *de novo* erzeugen können, sind sie auf die Aktivität der beteiligten Enzyme angewiesen.<sup>52</sup> Ausgehend von einem Triazolopyrimidin-Derivat, welches in einem Hochdurchsatz-Screening an *PfDHODH* als potenter Inhibitor des Enzymes identifiziert wurde, konnte nach Optimierung der chemischen Struktur hinsichtlich einer verbesserten Pharmakodynamik und Pharmakokinetik DSM265 **10** erhalten werden. Dieser Wirkstoff richtet sich nicht nur gegen ein bislang nicht adressiertes *Target*, sondern zeigt zusätzlich Aktivität sowohl gegen das Blutstadium als auch gegen das Leberstadium der Parasiten.<sup>7,41,49</sup> Zudem weist DSM265 **10** eine vergleichsweise lange Halbwertszeit im menschlichen Körper auf.<sup>53</sup> Auch DSM265 **10** ist universitären Ursprungs und wird nun von Takeda in Kooperation mit MMV weiterentwickelt.<sup>49</sup>

In einem phänotypischen *Screening* von über 300.000 Verbindungen wurde die antiplasmodiale Wirksamkeit von Dihydroisochinolon-Derivaten gefunden.<sup>48</sup> Nach deren struktureller Optimierung wurde mit SJ733 **11** ein Wirkstoff erhalten, der vielversprechende pharmakokinetische Eigenschaften aufweist und momentan ebenfalls Gegenstand einer frühen klinischen Studie ist. SJ733 **11** inhibiert die Na<sup>+</sup>-ATPase 4 (*PfATP4*) in *P. falciparum*, ein bereits seit längerer Zeit als potentiell *Target* erkanntes Protein.<sup>41</sup> Durch Inhibition der *PfATP4* wird das intraparasitäre Na<sup>+</sup>-Gleichgewicht gestört, was in einer schnellen Eliminierung der Parasiten resultiert.<sup>49,54</sup> Der Abschluss einer ersten Studie zur Anwendung von SJ733 **11** wird in naher Zukunft erwartet.

Da ein neuer Arzneistoff gegen Malaria im Zuge seiner Entwicklung viele Hürden zu überwinden hat, bis eine breite Anwendung tatsächlich erfolgen kann, ist die Verfügbarkeit einer großen Anzahl an Leitstrukturen und klinischen Kandidaten von Vorteil. Momentan ist daher angesichts einer Vielzahl von Arzneistoffkandidaten in der präklinischen und frühen klinischen Entwicklung die Zulassung eines neuen Wirkstoffes oder einer neuen Wirkstoffkombination in den nächsten Jahren vergleichsweise wahrscheinlich. Da sich die meisten Verbindungen gegen neuartige *Targets* richten, ist dabei auch eine dringend benötigte Wirksamkeit gegen die vermehrt auftretenden multiresistenten *P. falciparum* Stämme zu erwarten.<sup>43,49</sup>

## Einleitung und Zielsetzung

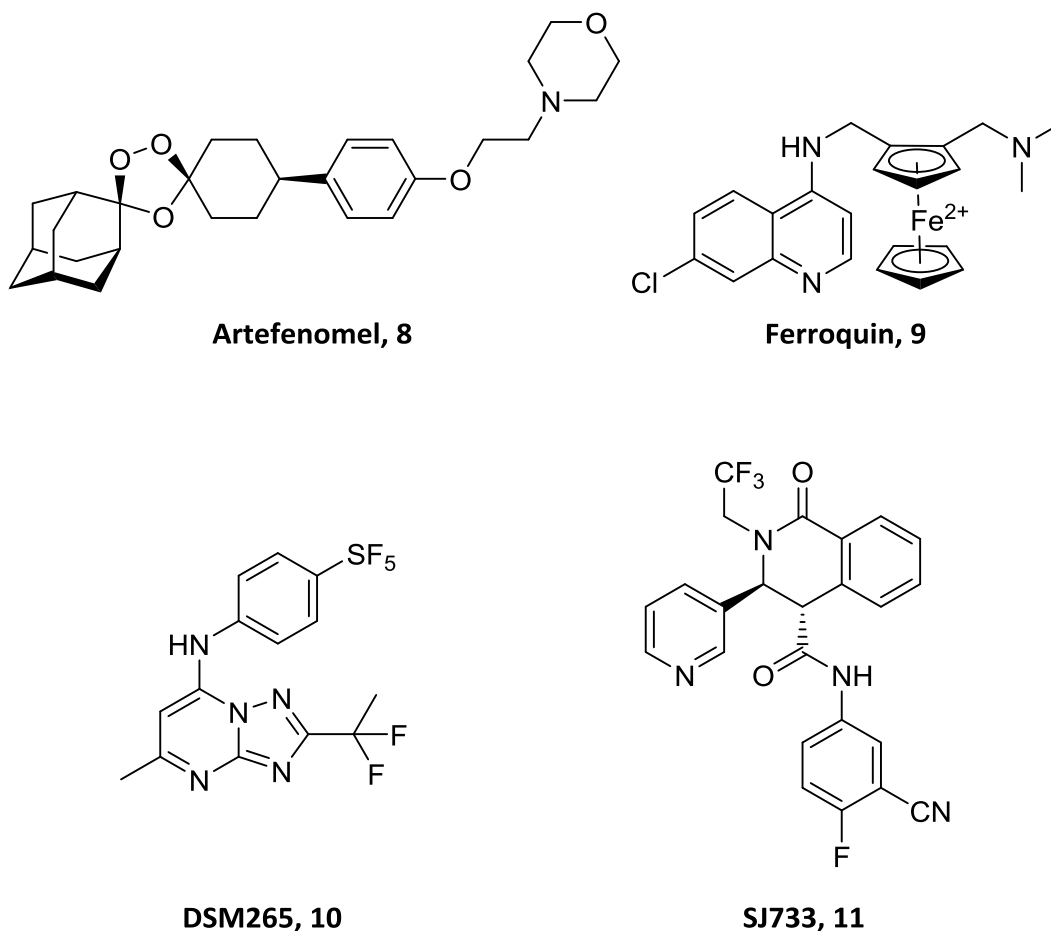


Abbildung 1.3: Einige neue Wirkstoffe mit antiplasmodialer Wirksamkeit, die sich momentan in der klinischen Entwicklung befinden.<sup>7,49</sup>

### 1.1.4 Medicines for Malaria Venture Malaria-Box

Ein konkretes Beispiel für die unter Abschnitt 1.1.3 beschriebene Unterstützung der akademischen Forschung an neuen Wirkstoffen gegen Malaria durch MMV ist die Malaria-Box. Hierbei handelt es sich um eine Sammlung von 400 antiplasmodial wirksamen Verbindungen, die vom MMV bis Dezember 2015 kostenfrei an Forschungslaboratorien auf der gesamten Welt verteilt wurde, um die Identifizierung neuer *Targets* und Leitstrukturen voranzutreiben. Die einzige Bedingung für den Erhalt der Malaria-Box bestand darin, die daraus generierten Ergebnisse der Öffentlichkeit zugänglich zu machen.<sup>49</sup> Die in der Box enthaltenen Substanzen haben ihren Ursprung größtenteils in der industriellen Forschung, wo für diese im Rahmen phänotypischer *Screenings* eine Wirksamkeit gegen das erythrozytäre Stadium von *P. falciparum* gefunden wurde. Durch die Bereitstellung dieser Verbindungen in Form der Malaria-Box durch das MMV wurde den Forschungsergebnissen aus der industriellen medizinischen Chemie der Weg an die Hochschulen bereitet. Damit wurde über 250 Forschungsgruppen weltweit ermöglicht, eine große Anzahl auf anderem Wege schwer beschaffbarer Substanzen in etablierten Assays hinsichtlich ihres Wirkmechanismus auf *P. falciparum* zu untersuchen und so die Zahl pharmakologisch validierter *Targets* und Wirkstoffe innerhalb kurzer Zeit deutlich zu erhöhen.<sup>55</sup> Ferner sollte die Malaria-Box als Aus-

gangspunkt für die Entdeckung von Wirkstoffen gegen weitere, in der industriellen Arzneistoffentwicklung vernachlässigte, Infektionskrankheiten dienen. Hintergrund hierbei ist der Gedanke, dass die gegen Plasmodien aktiven Verbindungen ähnliche *Targets* auch in anderen Parasiten, insbesondere solchen, die wie *P. falciparum* zu den Apicomplexa zählen, adressieren könnten.<sup>49,55,56</sup>

Der Auswahlprozess für die in der Malaria-Box enthaltenen Verbindungen ist in Abbildung 1.4 dargestellt. Ausgangspunkt für die Zusammenstellung der Box waren 20.000 Verbindungen, die in phänotypischen *Screenings* von über sechs Millionen Substanzen gegen das erythrozytäre Stadium von *P. falciparum* eine antiplasmodiale Aktivität im unteren mikromolaren Bereich und darunter zeigten. Diese *Screenings* wurden von GlaxoSmithKline, Novartis und dem St. Jude Children's Research Hospital durchgeführt, die ihre Daten und die Strukturen der *Hit*-Substanzen anschließend der Allgemeinheit zur Verfügung stellten. Da diese vergleichsweise große Anzahl an Verbindungen von Forschungsgruppen an Universitäten nur schwer vollständig zu untersuchen ist, erfolgte durch das MMV eine Auswahl der vielversprechendsten Wirkstoffe. Zunächst wurden identische chemische Strukturen sowie strukturell besonders ungeeignete Verbindungen aussortiert. Im Anschluss wurde der Datensatz ausschließlich auf kommerziell verfügbare Substanzen eingeschränkt, um den forschenden Laboratorien den Zugang zu den Verbindungen auch für nachfolgende Experimente zu ermöglichen. Die verbleibenden Substanzen wurden anhand ihrer chemischen Struktur entweder als „*drug-like*“ (wirkstoffähnlich, zum Beispiel unter Berücksichtigung der potentiellen oralen Bioverfügbarkeit oder unter Ausschluss möglicher toxischer Strukturelemente) oder als „*probe-like*“ eingestuft. Aus beiden Gruppen erfolgte im Anschluss die Auswahl von Verbindungen von untereinander möglichst großer chemischer Diversität. Diese wurden zuletzt an *P. falciparum* hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht, an *Human Embryonic Kidney* Zellen (HEK-293) erfolgte eine Bestimmung der Zytotoxizität. Nachdem alle Verbindungen von zu geringer Aktivität bzw. zu hoher Toxizität ausgeschlossen wurden, erfolgte eine abschließende Auswahl von jeweils 200 Substanzen für die *drug-like* und die *probe-like* Gruppe. Die so ausgesuchten Verbindungen wurden in Form von Stammlösungen zu jeweils 10 mM in DMSO auf 96-well Platten in der Malaria-Box zusammengefasst.<sup>55,56</sup>

Ein Beispiel für die erfolgreiche Aufklärung des Wirkmechanismus von Verbindungen aus der Malaria-Box sind 28 Substanzen, welche in initialen *Screenings* eine Beeinflussung des Na<sup>+</sup>-Gleichgewichtes in *P. falciparum* zeigten. In nachfolgenden Experimenten konnte für diese Strukturen eine ähnliche Veränderung des parasitären Ionenhaushaltes nachgewiesen werden, wie sie durch bereits bekannte *PfATP4*-Inhibitoren hervorgerufen wird (siehe SJ733 **11** unter Abschnitt 1.1.3). Weiterhin wurden sechs dieser Wirkstoffe hinsichtlich möglicher Kreuzresistenzen in *P. falciparum* Stämmen mit bereits bekannter Resistenz gegen *PfATP4*-Inhibitoren untersucht. Dabei zeigten alle Verbindungen eine verringerte antiplasmodiale Wirksamkeit. Aus wiederum zwei Wirkstoffen dieser Gruppe wurden resistente Parasiten generiert, die Mutationen im *PfATP4*-Gen trugen, so dass letztendlich *PfATP4* als sehr wahrscheinliches *Target* dieser Verbindungen angenommen werden kann.<sup>57</sup> Die Tatsache, dass die antiplasmodiale Aktivität von sieben Prozent der 400 in der Malaria-Box enthaltenen Verbindungen auf der Störung des Ionengleichgewichtes im Parasiten basiert, zeigt dabei auch, dass *PfATP4* für das Überleben von *P. falciparum* von sehr großer Bedeutung ist.<sup>55,57</sup>

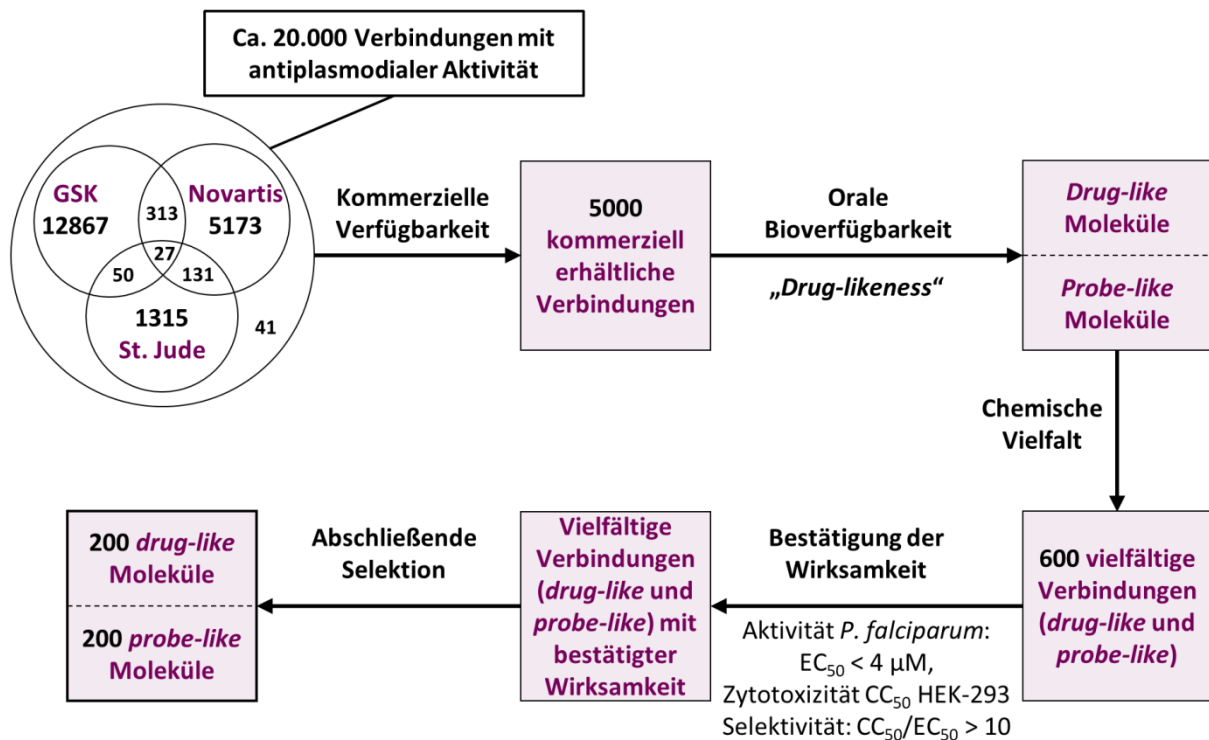


Abbildung 1.4: Auswahlprozess der Verbindungen für die Malaria-Box, modifiziert nach SPANGENBERG *et al.*<sup>56</sup> Aus den 20.000 Verbindungen mit antiplasmodialer Aktivität resultierten durch die Selektion der kommerziell verfügbaren Substanzen mit großer chemischer Vielfalt bei akzeptabler Wirksamkeit und Zytotoxizität die 400 Moleküle der Malaria-Box. GSK = GlaxoSmithKline,  $EC_{50}$  = halbmaximale effektive Konzentration,  $CC_{50}$  = halbmaximale zytotoxische Konzentration.

## 1.2 Formiat-Nitrit-Transporter

### 1.2.1 Bedeutung

Die lipophilen Membranen von Zellen sind für polare und geladene Moleküle nicht durchlässig, so dass der Transport dieser Moleküle über die Barriere ausschließlich über Proteine erfolgen kann. Diese Membranproteine durchspannen die Plasmamembran der Zellen und bilden eine Pore, die den Durchtritt von polaren und geladenen Teilchen ermöglicht. Innerhalb der Klasse der Transportproteine bilden die Formiat-Nitrit-Transporter (FNT) eine eigene Familie. FNTs leiten ausschließlich die Anionen monovalenter Säuren, zeigen dabei jedoch nur eine geringe Substratspezifität. Neben den Anionen verschiedener organischer Säuren wie Formiat, Acetat, Lactat und Pyruvat, werden auch anorganische Ionen wie Chlorid, Hydrogensulfid, Hypophosphit, Nitrit und Nitrat über die Zellmembran transportiert.<sup>58</sup> FNTs sind in Mikroorganismen weit verbreitet und wurden bereits in Bakterien, Archaeen, Algen, Pilzen und einzelligen eukaryotischen Parasiten gefunden.<sup>58,59</sup> Hier übernehmen sie essentielle Funktionen im Stoffwechsel, insbesondere im Rahmen des Energiestoffwechsels. In höheren Organismen kommen FNTs dagegen nicht vor, dort übernehmen Monocarboxylat-Transporter (MCT) den Transport einiger der genannten Substrate, insbesondere von Lactat und Pyruvat.<sup>60</sup> MCTs unterscheiden sich hinsichtlich ihres Aufbaus und des Transportmechanismus jedoch grundlegend von den FNTs.<sup>61</sup>

## Einleitung und Zielsetzung

Durch den Formiat-Transporter FocA wird das Wachstum von Enterobakterien wie *Escherichia coli* unter anaeroben Bedingungen ermöglicht. Dabei werden während der gemischten Säuregärung von Glucose aufgrund der Aktivität der Pyruvat-Formiat-Lyase neben Acetyl-Coenzym A große Mengen Formiat gebildet.<sup>62</sup> Zur Vermeidung einer intrazellulären Akkumulation des Formiates und einer damit verbundenen Abnahme des zytosolischen pH-Wertes, wird Formiat durch FocA aus der Zelle ins Periplasma transportiert, wo es zu CO<sub>2</sub> oxidiert wird (Abbildung 1.5 A).<sup>58,63</sup>

Neben dem Formiat-Transporter FocA ist der Nitrit-Transporter NirC das zweite namensgebende Transportprotein der FNT-Familie. Auch NirC ist bakteriellen Ursprungs, dient jedoch zur Aufnahme von Nitrit, einem zentralen Molekül des Stickstoffmetabolismus, aus dem Periplasma in die Zelle.<sup>64,65</sup> Im Zytoplasma erfolgt die Reduktion des für die Mikroorganismen toxischen Nitrites über die Nitrit-Reduktase NIR zu Ammonium, welches in weitere metabolische Prozesse eingebracht wird (Abbildung 1.5 B).<sup>58</sup> Neben der Beteiligung an der Stickstoffassimilation dient NirC dem humanpathogenen Enterobakterium *Salmonella typhimurium* auch dazu, die durch den Wirt vermittelte Immunabwehr zu überwinden. Makrophagen, die mit *S. typhimurium* infiziert sind, produzieren über eine induzierbare NO-Synthase die für die Prokaryoten toxischen Spezies Nitrit und Peroxinitrit. Über den Nitrit-Transporter NirC können diese jedoch in *S. typhimurium* aufgenommen werden, wo im Anschluss über die Nitrit-Reduktase die Entgiftung zu Ammonium erfolgt.<sup>58,64</sup> Dementsprechend wurde für einen  $\Delta nirC$ -Knockout Stamm von *S. typhimurium* eine verringerte Proliferation in infizierten Makrophagen beobachtet – damit stellt NirC als Virulenzfaktor auch ein potentielles Ziel antibiotischer Wirkstoffe dar.<sup>66</sup>

Eine dem NirC aus *S. typhimurium* sehr ähnliche Struktur weist der Hydrogensulfid-Transporter HSC auf, der in *Clostridium difficile* entdeckt wurde. Im Gegensatz zum Nitrit-Transporter, der sein Substrat in die Zelle aufnimmt, besteht die Aufgabe des HSC im Export von Hydrogensulfid aus dem Zytoplasma. Dieses fällt als toxisches Endprodukt bei der Reduktion von Sulfid durch die Sulfid-Reduktase ASR im Zuge der anaeroben bakteriellen Energiegewinnung an (Abbildung 1.5 C).<sup>58,67</sup>

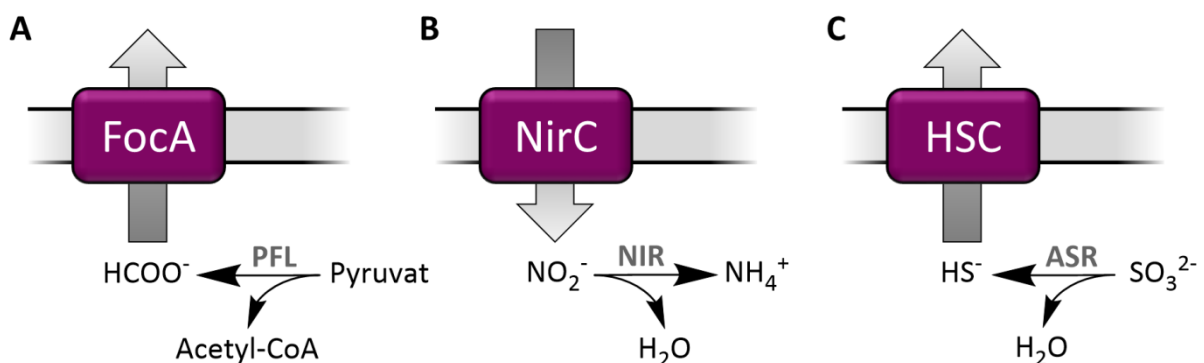
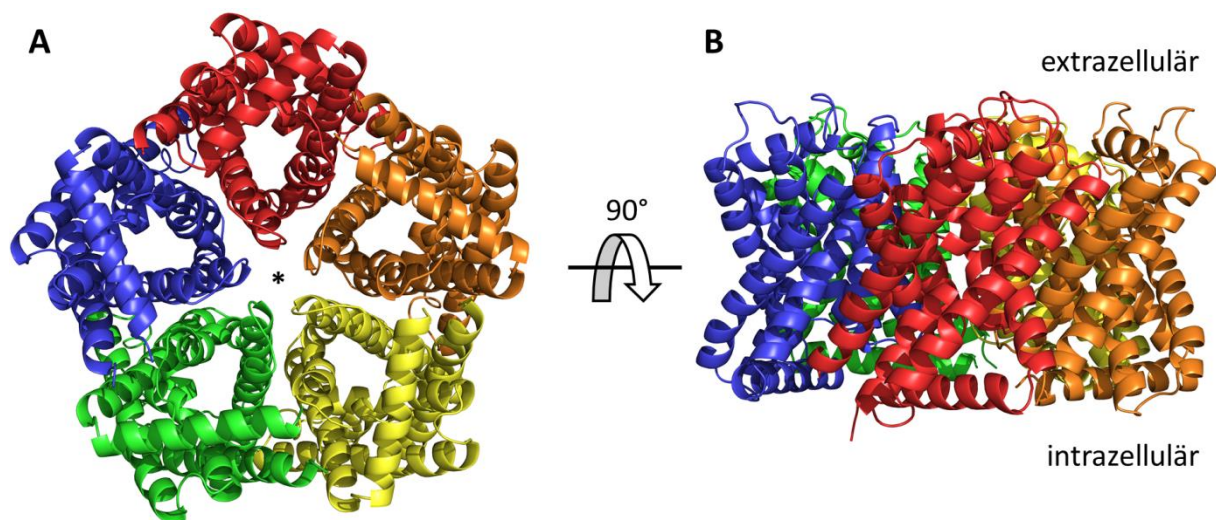


Abbildung 1.5: Die prokaryotische FNT-Familie modifiziert nach Lü *et al.*:<sup>58</sup> (A) Der Formiat-Transporter FocA exportiert das aus der Spaltung von Pyruvat resultierende Formiat. (B) Der Nitrit-Transporter NirC importiert Nitrit in die Zelle, wo es zu Ammonium reduziert wird. (C) Der Hydrogensulfid-Transporter HSC exportiert das für die Zelle toxische Hydrogensulfid, welches durch Reduktion von Sulfid entsteht. PFL = Pyruvat-Formiat-Lyase, Acetyl-CoA = Acetyl-Coenzym A, NIR = Nitrit-Reduktase, ASR = Sulfid-Reduktase.

## 1.2.2 Struktureller Aufbau der Formiat-Nitrit-Transporter

Der Nitrit-Transporter NirC aus *S. typhimurium*, von dem bereits eine Kristallstruktur erzeugt werden konnte, zeigt die typische Struktur eines FNT:<sup>64</sup> Die Quartärstruktur von StNirC ist in Abbildung 1.6 dargestellt. Strukturell handelt es sich bei den FNTs um integrale Membranproteine, die in die Zellmembranen der Mikroorganismen eingelagert sind und einen Transportpfad für die jeweiligen Substrate bilden. Jeweils fünf FNT-Protomere finden in der Membran zu einem stabilen Homopentamer mit einem Durchmesser von ca. 80 Å und einer Höhe von ca. 50 Å zusammen. Hierbei stellt jedes Protomer einen eigenen Transportpfad durch die Membran dar. Die aus der Anordnung der FNT-Protomere resultierende lipophile Zentralpore des Pentamers ist nicht an der Anionen-Leitfähigkeit beteiligt und sehr wahrscheinlich mit Lipiden der Zellmembran gefüllt (Abbildung 1.6 A, markiert mit einem schwarzen Stern).<sup>58,59,64,67–69</sup>



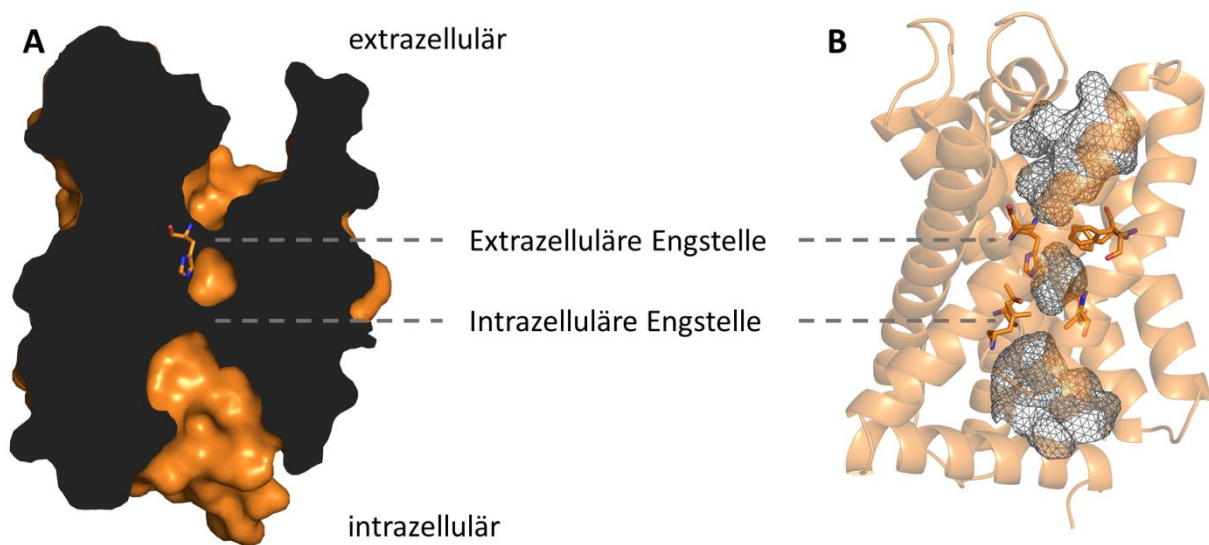
**Abbildung 1.6:** Struktur des Nitrit-Transporters NirC aus *S. typhimurium* (PDB ID 4FC4):<sup>64</sup> (A) Aufsicht auf das NirC-Pentamer von der zytoplasmatischen Seite. Die Zentralpore ist mit einem schwarzen Stern gekennzeichnet. (B) Seitliche Ansicht des NirC-Pentamers.

Alle fünf Protomere, die in der Zellmembran jeweils ein FNT-Pentamer ausbilden, zeigen eine identische Tertiärstruktur. Der Aufbau eines solchen Protomers von StNirC sowie dessen Transportpore, sind in Abbildung 1.7 gezeigt. Ein FNT-Protomer besteht aus jeweils sechs Transmembranhelices, die in ihrem Inneren den senkrecht zur Zellmembran verlaufenden Transportpfad für das Substrat ausbilden (Abbildung 1.7 A und B). Der N- und der C-Terminus des Proteins ragen in das Zytoplasma. Von der Seite betrachtet, lassen sich im Transportpfad zwei Engstellen finden, die von den Seitenketten lipophiler Aminosäuren ausgebildet werden (Abbildung 1.7 B). Die Passage des Substrates als hydrophiles Anion ist aufgrund der ausgeprägten Lipophilie dieser Engstellen daher unwahrscheinlich, vielmehr muss der Durchtritt in Form der im FNT vorübergehend vorliegenden protonierten Säure erfolgen (siehe Abschnitt 1.2.3). Gegen die periplasmatische und die zytoplasmatische Öffnung der Substratpore begrenzen die Engstellen einen zentralen Hohlraum, in dessen Bereich die Imidazol-Seitenkette eines über fast alle FNTs konservierten Histidins ragt. Die



## Einleitung und Zielsetzung

beiden Transmembranspannen TM2 und TM5 sind in zwei einzelne Helices unterbrochen, die jeweils über eine in der FNT-Familie stark konservierte Schleifenregion (*loop*) verbunden werden. Diese Schleifenregionen sind an der Ausbildung der beiden Engstellen beteiligt: *loop* L2, die TM2 unterbricht, auf der zytoplasmatischen Seite und *loop* L5 in TM5 im periplasmatischen Bereich.<sup>58</sup> In den Kristalldaten, die zusätzlich zu StNirC bereits auch von FocA und HSC verfügbar sind, erscheinen die Engstellen in der Transportpore als deutlich zu schmal für die Passage der Substrate, selbst ein Wassermolekül könnte, abgesehen von der Lipophilie des Transportpfades, nicht über die Engstellen gelangen. Daher muss an dieser Stelle ausreichende Flexibilität im Protein vorhanden sein, die die Passage von deutlich größeren Substratmolekülen erlaubt.<sup>58,59,64,67–69</sup>



**Abbildung 1.7:** Struktur des Nitrit-Transporters NirC aus *S. typhimurium* (PDB ID 4FC4):<sup>64</sup> (A) Querschnitt eines Protomers des FNTs, das zentrale Histidin ist hervorgehoben. (B) Substratpore eines NirC-Protomers (grau). Die an der Ausbildung der Engstellen beteiligten Aminosäuren sind hervorgehoben.

Die Sekundär- und Tertiärstruktur der FNTs erinnert sehr deutlich an die der Wasserkanäle (Aquaporine) – die Protomere eines FNTs und eines Aquaporins lassen sich mit hoher Genauigkeit zur Deckung bringen. Auch Aquaporine bestehen aus sechs Transmembranspannen, und auch dort sind TM2 und TM5 von hoch konservierten Schleifen unterbrochen. Die Termini ragen wie bei den FNTs in das Zytoplasma. Hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz und Funktion zeigen FNTs und Aquaporine jedoch keine Ähnlichkeit. So transportieren FNTs monovalente Anionen über die Zellmembran, wohingegen Aquaporine neutrale Moleküle wie Wasser oder Glycerol leiten.<sup>70</sup> Zusätzlich bestehen auch einige entscheidende strukturelle Unterschiede zwischen FNTs und Aquaporinen: Beispielsweise finden sich die Wasserkanäle in der Zellmembran zu Tetrameren zusammen, wohingegen die FNTs Pentamere ausbilden. Außerdem zeigen bei Aquaporinen die Carbonylfunktionen der *loops*, welche die Transmembranspannen TM2 und TM5 unterbrechen, in Richtung des Transportpfades. Dies ermöglicht die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zum Substrat, wodurch der Transport von polaren Molekülen ermöglicht wird.<sup>71</sup> Bei FNTs hingegen ragen die Seitenketten der Aminosäuren in den Transportweg. Eine Passage von Wasser wird in

FNTs zudem über den lipophilen Charakter der beiden Engstellen unterbunden. Ferner lassen sich Aquaporine in allen Lebensformen, von Bakterien bis zu den Säugetieren, finden, wohingegen die FNTs auf Mikroorganismen beschränkt sind.<sup>58,59,69</sup>

### 1.2.3 Transportmechanismus

Erste Untersuchungen des Transportmechanismus der FNTs wurden mittels elektrophysiologischer Studien der Formiat-Aufnahme über FocA, welches in Lipiddoppelschichten rekonstituiert wurde, durchgeführt. Hierbei wurde eine Leitfähigkeit für Formiat-Anionen bei neutralem pH-Wert nachgewiesen. Unterhalb eines pH-Wertes von 5,1 wurde jedoch eine abrupte Beendigung der Formiat-Leitfähigkeit beobachtet, so dass ein plötzliches Schließen (*gating*) der Transportpore durch den N-Terminus von FocA im Sauren postuliert wurde.<sup>68</sup> Später wurde in ähnlichen Experimenten für FocA der Transport vieler weiterer monovalenter Anionen wie beispielsweise Chlorid, Nitrit, Acetat und Lactat nachgewiesen. In diesem Zusammenhang wurde ein pH-abhängiges Umschalten des FNTs von einer Formiat-Leitfähigkeit im Neutralen zu einem Transport der ungeladenen Ameisensäure bei sauren pH-Werten diskutiert.<sup>72</sup> Im Rahmen weiterer Untersuchungen, unter anderem an StNirC, wurde dem Histidin, welches innerhalb des Transportpfades in den zentralen Hohlraum zwischen den Engstellen ragt (Abbildung 1.7 A in Abschnitt 1.2.2), eine entscheidende Rolle für den Transportmechanismus zugeschrieben: Durch die Übertragung eines Protons auf das Substrat-Anion während dessen Passage durch den FNT sollte es die ungeladene, korrespondierende Säure generieren und so den Durchtritt des Substrates durch die lipophilen Engstellen ermöglichen.<sup>58,64,73</sup>

Unter Verwendung von <sup>14</sup>C-radiomarkiertem Formiat, welches im Gegensatz zu den elektrophysiologischen Messungen auch in seiner neutralen, protonierten Form detektierbar ist, wurde mit sinkenden pH-Werten eine Zunahme der Transportrate in FocA beobachtet. Zusätzlich konnte der Co-Transport von Protonen zusammen mit dem Substrat über die Zellmembran nachgewiesen werden. Ein Umschalten im Transportverhalten wurde dabei nicht detektiert. Auch hier wurde das zentrale Histidin als eine für die Funktion des Transporters essentielle Aminosäure identifiziert, eine Beteiligung bei der Protonierung des Substrates wurde jedoch ausgeschlossen. Stattdessen zeigte sich ein im Poreneingang befindliches und über alle FNTs hoch konserviertes Lysin als verantwortlich für die elektrostatische Anziehung des Substrat-Anions. Dieses wird zunächst durch das Lysin in den Transportpfad des FNTs gezogen, aufgrund der im Verlauf der Substratpore zunehmend hydrophoben Umgebung erfährt das Substrat eine Abnahme der Acidität und kann so leicht vom Bulkwasser protoniert werden – als neutrale Säure überwindet es schließlich die lipophilen Engstellen (Abbildung 1.8).<sup>74,75</sup> Aufgrund der in den elektrophysiologischen Studien bei neutralen pH-Werten beobachteten Anionen-Leitfähigkeit ist davon auszugehen, dass FNTs zu einem geringen Teil auch negativ geladene Teilchen passieren lassen. Insbesondere für Chlorid-Ionen ist aufgrund der hohen Säurestärke von Salzsäure die Passage der protonierten Säureform ausgeschlossen. Angesichts des vorherrschenden Symportes von Substrat-Anion und Proton scheint der alleinige Anionen-Transport jedoch vielmehr auf einer Leckage der FNTs für solche Ionen zu beruhen und von geringer physiologischer Relevanz zu sein.<sup>74</sup>



## Einleitung und Zielsetzung

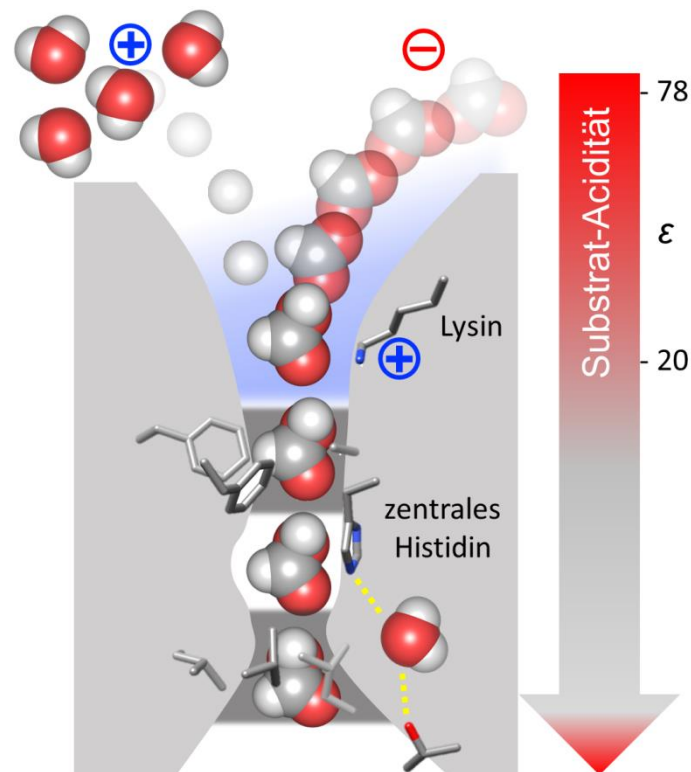


Abbildung 1.8: Transportmechanismus der FNT-Transporter modifiziert nach WIECHERT und BEITZ.<sup>75</sup> Das Substrat, beispielsweise Formiat, wird von einem konservierten Lysin im Poreneingang elektrostatisch angezogen. In der zunehmend hydrophoben Umgebung des Transporters sinkt aufgrund der abnehmenden dielektrischen Leitfähigkeit  $\epsilon$  die Substrat-Acidität. Dadurch wird die Übertragung eines Protons vom Bulkwasser auf das Substrat erleichtert – in der neutralen, protonierten Form passiert das Substrat die lipophilen Engstellen.

Aufgrund des beobachteten Transportmechanismus lassen sich FNTs nicht ohne weiteres entweder den Kanalproteinen oder den Transportern zuordnen. Der strukturelle Aufbau ist dem der Aquaporine, klassischen Kanälen für Wasser, sehr ähnlich. Auch die geringen Substrataffinitäten, welche im zwei- bis dreistelligen millimolaren Bereich liegen, sind typisch für Kanalproteine.<sup>69,72,74</sup> Auf der anderen Seite nutzen FNTs jedoch den Protonengradienten für den Substrat-Transport, welches wiederum eine Eigenschaft sekundärer Transporter ist. Aus diesem Grund wurde vorgeschlagen, die FNTs zusammen mit den mechanistisch sehr ähnlich funktionierenden Ammonium-Transportern in einer neuen Transporterklasse zusammenzufassen: den Schwache-Säuren-und-Basen-neutralisierenden Transportern.<sup>74</sup>

### 1.2.4 Der Lactat-Transporter aus *P. falciparum* – ein vielversprechendes Wirkstoffziel

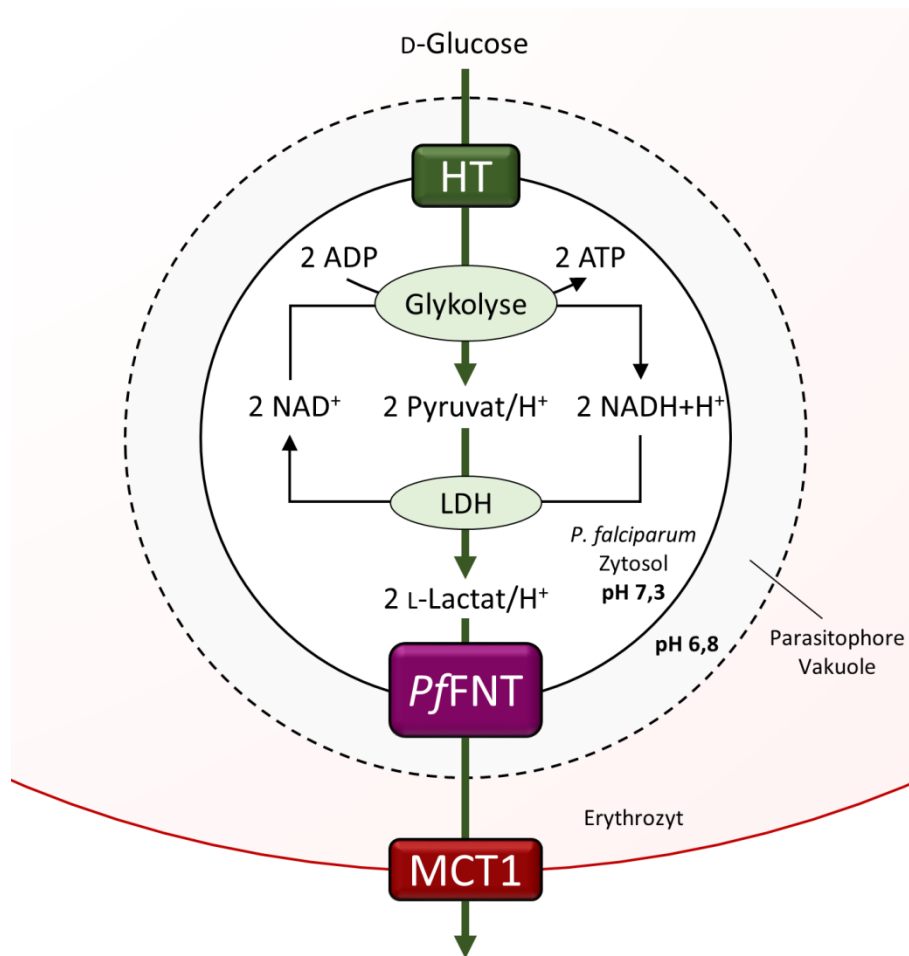
Der Malariaerreger *P. falciparum* ist während seiner asexuellen Vermehrungsphase in den Erythrozyten (siehe Abschnitt 1.1.1) in einem hohen Maße auf Glucose als Energiequelle angewiesen. So setzen Erythrozyten, die mit Plasmodien infiziert sind, Glucose bis zu 75-fach schneller um, als gesunde Erythrozyten. Dabei resultieren aufgrund der unvollständigen Oxidation des Zuckers im anaeroben Stoffwechsel des Parasiten große Mengen an Milchsäure,

die zum größten Teil dissoziiert in Form des Lactat-Anions und des Protons vorliegt. Um den Stoffwechselfluss im Parasiten aufrecht zu erhalten und um einen intrazellulären pH-Abfall zu vermeiden, wird das Lactat im Symport mit Protonen aus den Parasiten in die Wirtszelle exportiert.<sup>76–80</sup>

Der Energiefluss von *P. falciparum* im asexuellen Stadium ist in Abbildung 1.9 dargestellt. D-Glucose wird hauptsächlich über den erythrozytären Glucosetransporter in die infizierten Erythrozyten importiert (nicht abgebildet).<sup>81</sup> Dort diffundiert der Zucker zunächst in die den Parasiten umgebende parasitophore Vakuole – aus dieser erfolgt über den plasmodialen Hexosetransporter *PfHT* die Aufnahme der Glucose in die Zelle.<sup>82,83</sup> Im Rahmen der Glykolyse wird die Glucose unter Generierung des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) zu Pyruvat oxidiert, zusätzlich findet die Reduktion von Nicotinamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) zu NADH statt. Durch die anschließende Reduktion des Pyruvates zu L-Lactat erfolgt die Regeneration des für den kontinuierlichen Ablauf der Glykolyse benötigten NAD<sup>+</sup>. Dieser Schritt wird von der Lactat-Dehydrogenase (LDH) katalysiert. Insgesamt entstehen so aus einem Mol Glucose zwei Mol ATP sowie als Endprodukte des Energiemetabolismus jeweils zwei Mol Lactat und Protonen.<sup>79,84</sup> Diese werden durch einen weiteren Vertreter der FNT-Familie, den Lactat-Transporter aus *P. falciparum*, *PfFNT*, über einen Symport-Mechanismus aus dem Parasiten in die Wirtszelle transportiert.<sup>85,86</sup> Aus den Erythrozyten, die ihre Energie wie die Parasiten durch die unvollständige Oxidation von Glucose zu Lactat gewinnen, wird die Milchsäure wiederum hauptsächlich über MCT1 in den Blutstrom entfernt.<sup>84,87</sup>

Während die unter Abschnitt 1.2.1 vorgestellten FNTs alle prokaryotischen Ursprungs sind, wurde infolge der Entdeckung des Lactat-Transporters *PfFNT* aus dem Malariaerreger erstmals ein eukaryotischer FNT genauer charakterisiert.<sup>85,86</sup> Wie in den prokaryotischen Organismen übernimmt auch *PfFNT* in *P. falciparum* eine Schlüsselfunktion im Energiestoffwechsel: Der Export von Lactat und Protonen als Endprodukte der glykolytischen Energiegewinnung ist essentiell für die Aufrechterhaltung des Energieflusses im Parasiten. Da die intraerythrozytär proliferierenden Plasmodien auf die Bereitstellung von Energie durch die Glykolyse angewiesen sind, stellt dieser Stoffwechselweg ein mögliches Ziel zur Bekämpfung der Parasiten dar. So konnte bereits für Inhibitoren von *PfHT*, welche die Aufnahme von Glucose in die Parasiten unterbrechen, eine Wirksamkeit gegen das intraerythrozytäre Stadium von *P. falciparum* gezeigt werden.<sup>88,89</sup> Eine Herausforderung für Wirkstoffe, welche die plasmodiale Energiegewinnung adressieren sollen, besteht jedoch in der hohen Konservierung der Glykolyse. So ist dieser Stoffwechselweg auch zentraler Bestandteil der menschlichen Energiegewinnung – diese darf zur Vermeidung schwerer Nebenwirkungen jedoch nicht beeinträchtigt werden.<sup>84</sup> Eine große Ausnahme stellt hierbei der Lactat-Transporter *PfFNT* dar: Als Mitglied der FNT-Familie ist dieses Protein auf Mikroorganismen beschränkt, im menschlichen Organismus existiert kein vergleichbares Protein. Der humane Monocarboxylat-Transporter MCT1, welcher im Menschen für den Transport von Lactat und Protonen über die Zellmembran der Erythrozyten verantwortlich ist, unterscheidet sich grundlegend von *PfFNT* hinsichtlich der Proteinstruktur und des Transportmechanismus. Aufgrund dessen stellt *PfFNT* innerhalb der parasitären Energiegewinnung ein potentiell für selektive und hochwirksame Arzneistoffe gegen Malaria dar.<sup>61,85,86</sup>

## Einleitung und Zielsetzung



**Abbildung 1.9:** Energiefluss in *P. falciparum* modifiziert nach Wu *et al.*<sup>85</sup> Über den Hexosetransporter (HT) wird D-Glucose aus der Wirtszelle in den Parasiten transportiert und unter Generierung von Adenosin-triphosphat (ATP) zu Pyruvat umgesetzt. Die Lactat-Dehydrogenase (LDH) reduziert dieses zu L-Lactat, welches im Symport mit ebenfalls entstehenden Protonen durch PfFNT in den Erythrozyten exportiert wird. Aus den roten Blutkörperchen werden Lactat und Protonen über MCT1 in das Blut transportiert. ADP = Adenosin-diphosphat, NAD<sup>+</sup> = Nicotinamidadeninucleotid.

Strukturell und mechanistisch zeigt PfFNT eine große Ähnlichkeit zu den prokaryotischen FNTs (siehe Abschnitt 1.2.2 und 1.2.3). Da bisher keine Kristalldaten von eukaryotischen FNTs verfügbar sind, können Aussagen zur Proteinstruktur ausschließlich anhand von Modellen getroffen werden, die auf bereits vorhandenen Kristallstrukturen basieren (Abbildung 1.10 A). Hierbei zeigt PfFNT die für die FNTs typische Tertiärstruktur mit einem Transportpfad, in dessen Verlauf zwei lipophile Engstellen einen zentralen Hohlraum gegen die extrazelluläre und die intrazelluläre Porenöffnung begrenzen. Die lipophilen Aminosäuren, welche die beiden Engstellen ausbilden, sind nahezu identisch mit denen der prokaryotischen FNTs. Auch die in den zentralen Hohlraum ragende Imidazol-Seitenkette des Histidins ist im PfFNT vorhanden (H230 in Abbildung 1.10 A). Wie die prokaryotischen FNTs leitet PfFNT monovalente Anionen kleiner organischer Säuren mittels des unter Abschnitt 1.2.3. beschriebenen pH-abhängigen Transportmechanismus. Der Transport über die Membran funktioniert in beide Richtungen, die Substrataffinitäten sind analog zu weiteren Vertretern der FNT-Familie gering.<sup>85,86,90</sup>

## Einleitung und Zielsetzung

Untersuchungen mit  $^{14}\text{C}$ -radiomarkierten Monocarboxylaten zeigten jedoch, dass eukaryotische FNTs wie *PfFNT* in der Lage sind, größere Substrate zu transportieren als prokaryotische FNTs. So zeigt *PfFNT* dort neben einer ausgeprägten Leitfähigkeit für Formiat und Acetat zusätzlich hohe Transportraten für Lactat und Pyruvat.<sup>85,90</sup> Die Leitfähigkeit von *FocA* beschränkt sich bei der Verwendung von radioaktiv markierten Monocarboxylaten hingegen auf Formiat und Acetat. *NirC* leitet sogar ausschließlich das zum physiologischen Substrat Nitrit bioisostere Formiat, zeigt also eine besonders hohe Selektivität innerhalb der FNT-Familie.<sup>90</sup> Die verschiedenen Transportprofile werden hierbei durch Unterschiede in den jeweiligen Substratselektivitätsfiltern der FNTs bedingt (dargestellt in Abbildung 1.10 B und C für *PfFNT* bzw. *StNirC*). Dieser Filter befindet sich am Grund der extrazellulären Porenöffnung und setzt sich aus insgesamt fünf Aminosäuren zusammen, die in etwa parallel in einer Ebene zur Plasmamembran lokalisiert sind. Zwei dieser Aminosäuren haben lediglich einen geringen Einfluss auf die Selektivität bezüglich der Größe des Substrates: Das Lysin, welches für die elektrostatische Anziehung des Substrat-Anions verantwortlich ist (siehe Abschnitt 1.2.3), ist über alle FNTs hoch konserviert. Die zweite Aminosäure, welche im Falle von *PfFNT* und *StNirC* ein Tyrosin ist, begrenzt die Transportpore unabhängig von der Seitenkette ausschließlich über das *backbone*. Die verbleibenden Aminosäuren zeigen jedoch eine größere Variabilität: Im eukaryotischen *PfFNT* sind dies zwei Alanine und ein Serin, kleine Aminosäuren, die eine Transportpore mit großem Durchmesser bilden (Abbildung 1.10 B). Im prokaryotischen *StNirC* begrenzen dagegen drei wesentlich voluminösere Isoleucine den Transportpfad, was diesen gegenüber *PfFNT* deutlich verengt (Abbildung 1.10 C).<sup>64</sup> Dies hat zur Folge, dass große Substrate wie beispielsweise Lactat den Nitrit-Transporter nicht passieren können (Abbildung 1.10 D). Zusätzlich wird ein Einfluss der Form des extrazellulären Poreneinganges auf die unterschiedliche Substratleitfähigkeit der prokaryotischen und eukaryotischen FNTs diskutiert. Im eukaryotischen *PfFNT* ist dieser trichterartig verbreitert, die engste Stelle bildet der Substratselektivitätsfilter am Grund des Einganges. Dies bedingt, dass entsprechend der physiologischen Funktion im Malariaerreger auch großvolumige Substrate wie Lactat transportiert werden können. In prokaryotischen FNTs wie *StNirC* erinnert der periplasmatische Poreneingang in seiner Form eher an einen schmalen Flaschenhals, der in seinem gesamten Verlauf zum Selektivitätsfilter dessen Durchmesser aufweist. Dies hat die Bevorzugung kleiner Substrate wie Formiat zur Folge.<sup>90</sup>

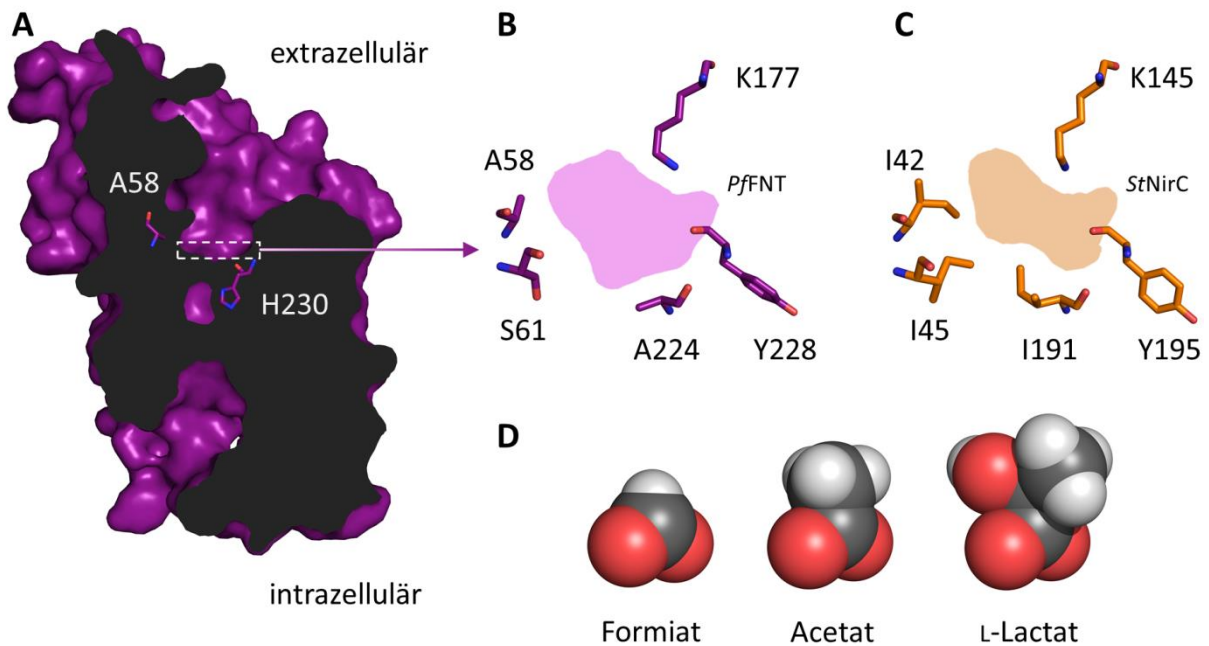


Abbildung 1.10: (A) Strukturmodell des Lactat-Transporters *PfFNT* aus *P. falciparum* basierend auf dem Hydrogensulfid-Transporter HSC (PDB ID 3TDO).<sup>67</sup> Die Position des Substratselektivitätsfilters in der Transportpore ist weiß umrandet, das den Filter begrenzende Alanin an Position 58 sowie das zentrale Histidin an Position 230 sind hervorgehoben. (B) Aufsicht von der extrazellulären Seite auf den Selektivitätsfilter von *PfFNT* in Anlehnung an WIECHERT *et al.*<sup>90</sup> (C) Zum Vergleich: Selektivitätsfilter des prokaryotischen *StNirC* (PDB ID 4FC4).<sup>64</sup> (D) Größenvergleich der Van-der-Waals-Oberflächen einiger Substrat-Anionen.

Ausgehend von Verbindungen, die als Inhibitoren des plasmodialen Lactat-Transportes bekannt waren, konnten WU *et al.* und MARCHETTI *et al.* bereits erste Hemmstoffe von *PfFNT* identifizieren (Abbildung 1.11).<sup>76,77,85,86,91</sup> Phloretin **12**, das Schleifendiuretikum Furosemid **13**,  $\alpha$ -Fluorzimtsäure **14** und  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymzimtsäure **15** wurden dabei hinsichtlich ihrer Hemmung der L-Lactat-Aufnahme in *PfFNT*-herstellende Hefezellen untersucht und zeigten  $IC_{50}$ -Werte von ca. 1 mM.<sup>85</sup> Für die Zimtsäurederivate wurde zuvor bereits eine Inhibition des Parasitenwachstums *in vitro* nachgewiesen – auch dort waren ähnlich hohe Konzentrationen nötig, um eine 50%ige Inhibition des Wachstums zu erzielen.<sup>91</sup> Eine etwas höhere Affinität zum plasmodialen Lactat-Transporter zeigten der Cyclooxygenase-Hemmstoff Nifluminsäure **16** und 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoesäure **17**. Diese führten bereits bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M in *PfFNT*-herstellenden Frosch-Oozyten zu einer 70%igen Aufnahmehemmung von Formiat und Lactat. Eine ähnlich ausgeprägte Hemmung der Substrataufnahme konnte für diese Verbindungen auch an isolierten *P. falciparum* Parasiten beobachtet werden.<sup>86</sup> Auffällig ist, dass alle genannten *PfFNT*-Inhibitoren Säuren darstellen, die unter den jeweiligen Testbedingungen zum Teil deprotoniert in Form des korrespondierenden Anions vorliegen (siehe Abbildung 1.11, rot markiert). Hingegen konnte für das neutrale Zimtsäureamid keine Beeinträchtigung der Lactat-Leitfähigkeit nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass die Säurefunktion für die Affinität zum Protein eine große Bedeutung hat – denkbar wäre hier beispielsweise eine Substrat-analoge Interaktion mit dem konservierten Lysin des extrazellulären Poreneinganges im *PfFNT*. Die Affinitäten dieser Verbindungen sind jedoch zu gering, um einen therapeutischen Nutzen zu erzielen.

## Einleitung und Zielsetzung

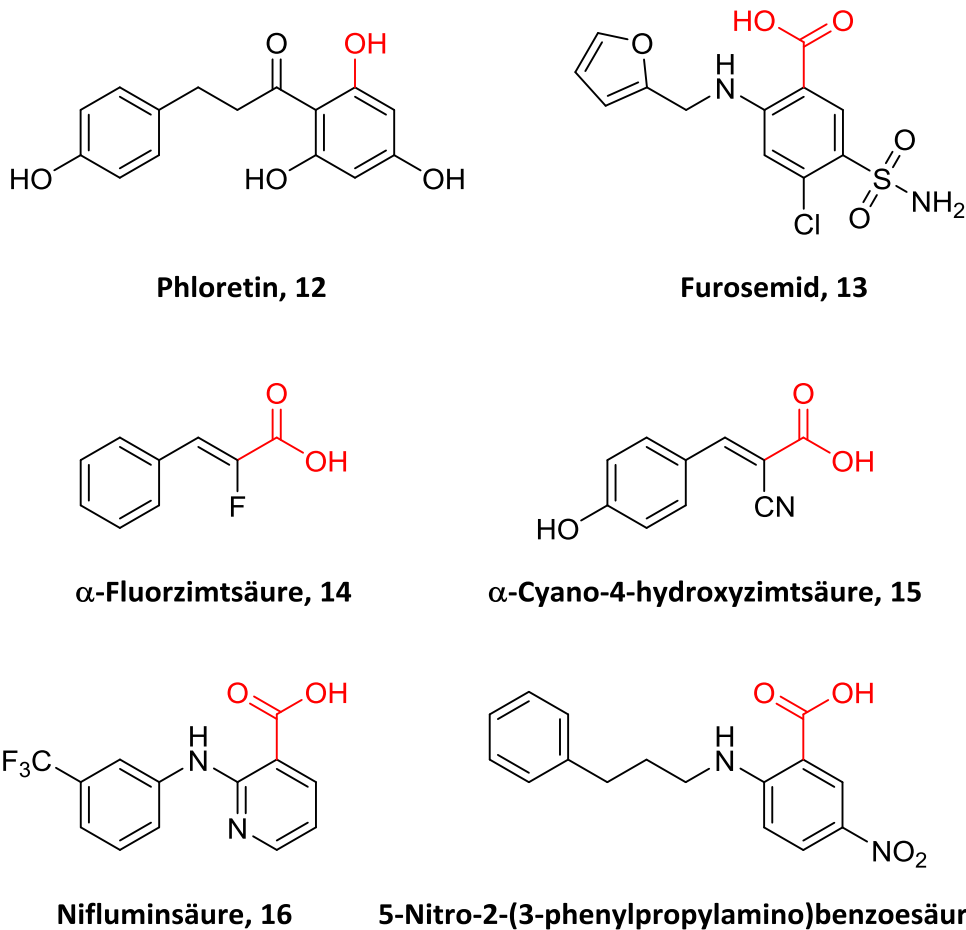


Abbildung 1.11: Bisher bekannte Inhibitoren von PfFNT.<sup>85,86</sup> Die saure Funktion im Molekül ist rot hervorgehoben.

### 1.3 Zielsetzung

Ein Hemmstoff, der den Export von Milchsäure aus Plasmodien effektiv unterbindet, stellt einen vielversprechenden Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer, selektiver Arzneistoffe gegen Malaria dar. Die bisher identifizierten PfFNT-Inhibitoren zeigen jedoch nur eine geringe Affinität zum Protein.<sup>85,86</sup> Obwohl sie den Lactat-Transport in *P. falciparum* hemmen und, wie für die Zimtsäurederivate beobachtet, eine Inhibition des Parasitenwachstums *in vitro* verursachen, ist nicht klar, ob diese Wirkung wirklich auf einer Bindung der Moleküle an PfFNT beruht.<sup>91</sup> Zudem ist die tatsächliche Bedeutung des Lactat-Transporters für den Parasiten noch nicht vollständig geklärt. So konnte zwar gezeigt werden, dass PfFNT in die Membran von Parasiten im intraerythrozytären Stadium eingelagert wird und dort in der Lage ist, Lactat über die Membran zu transportieren, über mögliche alternative Transportmechanismen im Parasiten, die eine PfFNT-Inhibition umgehen könnten, liegen jedoch bisher keine Erkenntnisse vor.<sup>86</sup> Ein  $\Delta fnt$ -Knockout Stamm von *P. falciparum* könnte diese offenen Fragen beantworten, doch dieser konnte bislang nicht erzeugt werden. Voraussetzung für die Nutzung des plasmodialen Lactat-Transporters als Wirkstoffziel ist jedoch, dass dieser tatsächlich eine Schlüsselposition innerhalb des parasitären Stoffwechsels einnimmt und

## Einleitung und Zielsetzung

*P. falciparum* keinerlei Möglichkeit besitzt, den Verlust der Transportfunktion infolge der Bindung eines Inhibitors zu kompensieren.

Die Malaria-Box umfasst ausschließlich Verbindungen, die ihre Wirksamkeit gegen *P. falciparum* bereits in phänotypischen *Screenings* bewiesen haben. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher die in der Box enthaltenen Substanzen bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zunächst in einem Hefe-basierten Testsystem hinsichtlich ihrer vollständigen *PfFNT*-Hemmung untersucht werden. Eine Verbindung, die diese Anforderung erfüllt, hätte eine deutlich höhere Affinität als die bereits bekannten *PfFNT*-Inhibitoren (siehe Abschnitt 1.2.4) und könnte damit erste Hinweise auf die tatsächliche Bedeutung von *PfFNT* für den Parasiten geben – neben der Identifizierung wirksamer Inhibitoren stand in dieser Arbeit vor allem die allgemeine Validierung von *PfFNT* als Wirkstoffziel für antiplasmodial wirksame Verbindungen im Mittelpunkt.

Im Falle der Entdeckung eines *PfFNT*-Inhibitors infolge des Malaria-Box-*Screenings* sollte von diesem zunächst an *PfFNT*-herstellender Hefe der  $\text{IC}_{50}$ -Wert der L-Lactat-Aufnahmehemmung bestimmt werden, auch eine Charakterisierung der Kinetik der Verbindung am Protein war von Interesse. Weiterhin sollte am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin die Untersuchung der Wirksamkeit des entdeckten Inhibitors an den Parasiten erfolgen. Von besonders großer Bedeutung war die Identifizierung von Strukturmerkmalen, welche einerseits die Affinität zum Lactat-Transporter selbst bedingen und andererseits für die Hemmung des Parasitenwachstums *in vitro* verantwortlich sind. Hierfür sollten durch systematische strukturelle Veränderungen am Molekül weitere Inhibitor-Analoga generiert werden diese hinsichtlich ihrer Wirksamkeit im Hefe-basierten Aufnahmeassay und in der Parasitenkultur untersucht werden. Dabei war ein zusätzliches Ziel, eine erste Steigerung der Wirksamkeit in den Parasiten zu erreichen. Umgekehrt war durch eine Reduktion der Leitstruktur auf die für die Hemmung des Transporters entscheidenden Strukturmerkmale auch die Identifizierung des Pharmakophors von Interesse. Basierend auf den aufgestellten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen war ein abschließendes Ziel dieser Arbeit die Postulierung des ersten Bindemodus eines Inhibitors an *PfFNT*.

## 2 Geräte und Materialien

### 2.1 Molekularbiologie und Aufnahmeassay mit $^{14}\text{C}$ -radiomarkierten Substraten

#### 2.1.1 Chemikalien, Kits, Materialien

##### **AppliChem, Darmstadt**

Natrium-L-Lactat, SDS, Tween 20.

##### **Avantor Performance Materials, Gliwice**

J.T. Baker Ethanol, Isopropanol, Methanol, Salzsäure.

##### **Becton Dickinson, Heidelberg**

*Bacto Peptone, Bacto Yeast Extract, Difco Yeast Nitrogen Base.*

##### **Bio-Rad, München**

Clarity Western ECL Substrate.

##### **ChemBridge, San Diego**

Verbindung **20**.

##### **Fagron, Barsbüttel**

Diclofenac-Natrium **57**.

##### **GE Healthcare, Freiburg**

Amersham ECL Prime *Western Blotting Detection Reagent*, Amersham Hybond P 0.45 PVDF Blotmembran, Whatman Grade 3MM Chr *Blotting Paper*, Whatman Grade GF/C *Glass Micro-fiber Filter* (25 mm circle).

##### **Genaxxon bioscience, Ulm**

Agarose LE, Ampicillin (Natriumsalz), TEMED.

##### **Hartmann Analytic, Braunschweig**

$^{14}\text{C}$ -Natriumformiat,  $[1-^{14}\text{C}]$ -Natriumacetat,  $[1-^{14}\text{C}]$ -Natrium-L-Lactat.

##### **Key Organics BioNet, Camelford**

Verbindung **58**.

##### **Manchester Organics, Runcorn**

Pharmakophor **41**.



**Merck, Darmstadt**

Natriumformiat.

**Promega, Mannheim**

Wizard Plus SV Minipreps DNA *Purification System*.

**Roth, Karlsruhe**

1,4-Dithiothreitol, Agar-Agar (Kobe I), Ammoniumperoxodisulfat, Bromphenolblau, Calciumchlorid, Citronensäure (wasserfrei), Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat, EDTA, Glucose, Glycerol, Glycin, HEPES, L-Leucin, LB-Agar (Lennox), LB-Medium (Lennox), MES, Milchpulver (*blotting grade*), Natriumacetat (wasserfrei), Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat, Natriumhydroxid, Rotiphorese Gel 40 (29:1), TRIS.

**Sigma-Aldrich, Steinheim**

Adenin, DMSO, Flufenaminsäure **55**, *Glass beads (acid-washed)*, L-Histidin, L-Tryptophan, Lithiumacetat, Polyethylenglycol 3015-3685, *single-stranded DNA* (aus Lachssperma).

**Simport, Beloeil**

Snaptwist S207 6,5 ml Szintillationsgefäße.

**Vitas-M Laboratory, Apeldoorn**

MMV007839 **18**, MMV000972 **19**, Verbindungen **21-23, 25, 28-30, 32**.

**von Heyden, Regensburg**

Nifluminsäure **16**.

**VWR, Darmstadt**

Peqlab peqGOLD Protein-Marker III (*Prestained*).

**Zinsser Analytic, Frankfurt**

Quicksafe A Szintillationscocktail.

**2.1.2 Geräte**

**B. Braun, Melsungen**

Certomat MO Laborschüttler.

**Binder, Tuttlingen**

KB-240 Kühlinkubator.

**Bio-Rad, München**

PowerPac 200 Energieversorgung, Trans-Blot SD *Semi-Dry Transfer Cell*.

**Edmund Bühler, Hechingen**

Wippschüttler WS-10.

**Eppendorf, Hamburg**

BioPhotometer.

**H+P Labortechnik, München**

Variomag MONO Magnetrührer.

**Heraeus, Hanau**

Biofuge pico Mikrozentrifuge, HERAGuard Reinluftwerkbank.

**Ilmvac, Ilmenau**

Membranpumpe chemiefest Typ 400171.

**Infors HT, Bottmingen**

Minitron Inkubationsschüttler.

**Kern, Balingen-Frommern**

Analysenwaage Typ ABS 120-4.

**Mettler-Toledo, Gießen**

Balance MS205DU Präzisionswaage, PB3002-S DeltaRange Präzisionswaage.

**New Brunswick Scientific, Edison**

Innova U535 Ultratiefkühlschrank.

**Packard Instrument Company, Downers Grove**

Tri-Carb 2900TR Flüssigszintillationszähler.

**Peqlab, Erlangen**

PerfectSpin 24R gekühlte Mikrozentrifuge, SDS-Gelgießstand und Laufkammer.

**Roche Diagnostics, Mannheim**

Lumi-Imager F1.

**Schott Instruments, Mainz**

Lab 850 pH-Meter.

**Scientific Industries, Bohemia**

Vortex-Genie 2.

**SI Analytics, Mainz**

pH-Elektrode BlueLine 12 pH.

### **Techne, Duxford**

Dri-Block DB-2D.

### **Thermo Electron Corporation, Osterode**

Heraeus Multifuge 1S-R Kühlzentrifuge.

### **VWR, Darmstadt**

Puranity TU 6 UV/UF Wasseraufbereitungssystem.

## **2.1.3 Plasmide und codierende DNA-Sequenzen**

Plasmid: pDR196 mit *N*-terminalem Hämagglutinin-Tag (HA-Tag) und *C*-terminalem His<sub>10</sub>-Tag, beschrieben von Wu *et al.*<sup>85</sup>

DNA-Sequenzen: *Pf*FNT (Formiat-Nitrit-Transporter aus *Plasmodium falciparum*, Codon-optimiert, NCBI Gen-ID: 814480), beschrieben von Wu *et al.*<sup>85</sup>

MCT1 (Monocarboxylat-Transporter aus *Rattus norvegicus*, NCBI Gen-ID: 25027), zur Verfügung gestellt von H. Becker (Kaiserslautern).

*Bb*FNT (Formiat-Nitrit-Transporter aus *Babesia bovis*, NCBI Gen-ID: 5476906), synthetisiert von GenScript.

*Ec*NirC (Formiat-Nitrit-Transporter aus *Escherichia coli*, NCBI Gen-ID: 2847757), ursprünglich im Arbeitskreis aus genomischer *E. coli* DH5 $\alpha$ -DNA amplifiziert.

## **2.1.4 Escherichia coli und Saccharomyces cerevisiae Stämme**

*E. coli* Stamm: DH5 $\alpha$   
(F<sup>-</sup>  $\phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1*  $\lambda$ <sup>-</sup>).

*S. cerevisiae* Stamm: W303-1A  $\Delta$ *jen1*  $\Delta$ *ady2*, zur Verfügung gestellt von M. CASAL (Braga, Portugal).<sup>92</sup>  
(MATa, *can1-100, ade2-1<sup>oc</sup>, his3-11-15, leu2-3,-112, trp1-1-1, ura3-1, jen1::kanMX4, ady2::hphMX4*).

## **2.1.5 Antikörper**

Anti-HA (12CA5) (Roche): Primärantikörper aus der Maus gegen das Hämagglutinin-Epitop YPYDVPDYA.

Anti-Penta-His (Qiagen, Hilden): Primärantikörper aus der Maus gegen das HHHHH-Epitop.

Anti-Maus (Jackson ImmunoResearch, West Grove): Sekundärantikörper aus der Ziege gegen Maus-IgG, konjugiert mit Meerrettichperoxidase.

## 2.1.6 Puffer, Medien, Lösungen

### 2.1.6.1 Molekularbiologie

- LB-Agarplatten: 35 g LB-Agar (Lennox), 1000 ml gereinigtes Wasser, autoklavieren, bei Bedarf Zusatz von 0,01 % Ampicillin.
- LB-Flüssigmedium: 20 g LB-Medium (Lennox), 1000 ml gereinigtes Wasser, autoklavieren, bei Bedarf Zusatz von 0,01 % Ampicillin.
- YPD-Agarplatten: 20 g *Peptone*, 10 g *Yeast Extract*, 20 g Glucose, 0,1 g NaOH, 20 g Agar, 1000 ml gereinigtes Wasser, autoklavieren.
- YPD-Flüssigmedium: 20 g *Peptone*, 10 g *Yeast Extract*, 20 g Glucose, 1000 ml gereinigtes Wasser, autoklavieren.
- SD-AHLW-Selektionsplatten: 1,7 g *Yeast Nitrogen Base*, 20 g Glucose, 1000 ml gereinigtes Wasser, pH-Wert auf 5,6 einstellen und 20 g Agar zusetzen, autoklavieren, nach dem Abkühlen 5 ml Adenin (5 mg/ml), 1 ml L-Histidin (20 mg/ml), 5 ml L-Leucin (20 mg/ml) und 2 ml L-Tryptophan (5 mg/ml) zusetzen.
- SD-AHLW-Flüssigmedium: 1,7 g *Yeast Nitrogen Base*, 20 g Glucose, 1000 ml gereinigtes Wasser, pH-Wert auf 5,6 einstellen, autoklavieren, nach dem Abkühlen 5 ml Adenin (5 mg/ml), 1 ml L-Histidin (20 mg/ml), 5 ml L-Leucin (20 mg/ml) und 2 ml L-Tryptophan (5 mg/ml) zusetzen.
- TE-Puffer: 121 mg TRIS ( $\cong$ 10 mM), 29 mg EDTA ( $\cong$ 1 mM), mit gereinigtem Wasser auf 100 ml auffüllen, dabei pH-Wert auf 8,0 einstellen, autoklavieren.

### 2.1.6.2 Proteinchemie

- Puffer B: 3 g TRIS ( $\cong$ 25 mM), 800 ml gereinigtes Wasser, 10 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ( $\cong$ 5 mM), pH-Wert mit HCl auf 7,5 einstellen, mit gereinigtem Wasser auf 1 l auffüllen, autoklavieren.
- Puffer M: 93,2 ml 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6,8 ml 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,9 g NaCl ( $\cong$ 50 mM), mit gereinigtem Wasser auf 1 l auffüllen, autoklavieren.
- 4x SDS-Ladepuffer: 3,5 ml gereinigtes Wasser, 2,5 ml 1 M TRIS (pH 6,8) ( $\cong$ 0,25 M), 4 ml Glycerol ( $\cong$ 40,0 %), 2 mg Bromphenolblau ( $\cong$ 0,02 %), 0,8 g SDS ( $\cong$ 8,0 %), 0,62 g 1,4-Dithiothreitol ( $\cong$ 0,4 M).
- 4x Trenngelpuffer: 18,2 g TRIS ( $\cong$ 1,5 M), 0,4 g SDS ( $\cong$ 0,4 %), mit gereinigtem Wasser auf 100 ml auffüllen, dabei pH-Wert auf 8,8 einstellen.

## Geräte und Materialien

4x Sammelgelpuffer:	12,1 g TRIS ( $\pm 0,5$ M), 0,8 g SDS ( $\pm 0,4$ %), mit gereinigtem Wasser auf 200 ml auffüllen, dabei pH-Wert auf 6,8 einstellen.
10x Kathodenpuffer:	144,1 g Glycin ( $\pm 1,92$ M), 30,3 g TRIS ( $\pm 0,25$ M), 10,0 g SDS ( $\pm 1,0$ %), mit gereinigtem Wasser auf 1000 ml auffüllen.
1x Kathodenpuffer:	100 ml 10x Kathodenpuffer, 900 ml gereinigtes Wasser.
5x Transferpuffer:	7,6 g TRIS ( $\pm 0,125$ M), 36,0 g Glycin ( $\pm 0,96$ M), 0,93 g SDS ( $\pm 0,19$ %), mit gereinigtem Wasser auf 500 ml auffüllen.
1x Transferpuffer:	10 ml 5x Transferpuffer, 10 ml Methanol, 30 ml gereinigtes Wasser.
10x TBS-Puffer:	80,0 g NaCl ( $\pm 1,37$ M), 24,3 g TRIS ( $\pm 0,2$ M), mit gereinigtem Wasser auf 1000 ml auffüllen, dabei pH-Wert mit HCl auf 7,6 einstellen.
TBST-Puffer:	100 ml 10x TBS-Puffer, 900 ml gereinigtes Wasser, 1 ml Tween 20.
M-TBST-Puffer:	1,2 g Milchpulver ( <i>blotting grade</i> ) ( $\pm 3,0$ %), 40 ml TBST-Puffer.

### 2.1.6.3 Aufnahmeassay mit $^{14}\text{C}$ -radiomarkierten Substraten

Puffer pH 6,8 und pH 7,8:	1192 mg HEPES ( $\pm 50$ mM), 606 mg TRIS ( $\pm 50$ mM), mit gereinigtem Wasser auf 100 ml auffüllen, dabei pH-Wert mit 25%iger HCl-Lösung bzw. 1 M NaOH-Lösung auf $6,8 \pm 0,1$ bzw. $7,8 \pm 0,1$ einstellen, sterilfiltrieren. Lagerung bei 4 °C.
Puffer pH 5,8:	976 mg MES ( $\pm 50$ mM), 606 mg TRIS ( $\pm 50$ mM), mit gereinigtem Wasser auf 100 ml auffüllen, dabei pH-Wert mit 25%iger HCl-Lösung bzw. 1 M NaOH-Lösung auf $5,8 \pm 0,1$ einstellen, sterilfiltrieren. Lagerung bei 4 °C.
Puffer pH 3,8 und pH 4,8:	960 mg Citronensäure (wasserfrei) ( $\pm 50$ mM), 606 mg TRIS ( $\pm 50$ mM), mit gereinigtem Wasser auf 100 ml auffüllen, dabei pH-Wert mit 25%iger HCl-Lösung bzw. 1 M NaOH-Lösung auf $4,8 \pm 0,1$ bzw. $3,8 \pm 0,1$ einstellen, sterilfiltrieren. Lagerung bei 4 °C.
10x Substrat-Stammlösung:	200 $\mu\text{l}$ 0,25 M wässrige Substrat-Lösung ( $\pm 50$ mM), 800 $\mu\text{l}$ pH-Puffer, Lagerung bei 4 °C.
Substrat-Stammlösung:	10 % des insgesamt benötigten Volumens an Substrat-Stammlösung entsprechen der 10x Substrat-Stammlösung, 90 % entsprechen dem jeweiligen pH-Puffer, das erforderliche Volumen an radioaktiv markiertem Substrat wird im Anschluss hinzugesetzt. Die Substratkonzentration beträgt 5 mM.

## 2.2 Synthesen und Analytik

### 2.2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von ABCR, Acros, Alfa-Aesar, Fluka, Roth, Sigma-Aldrich und TCI bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

### 2.2.2 MPLC

Die Aufreinigung der Syntheseprodukte erfolgte durch Björn Henke mittels Mitteldruck-flüssigchromatographie (MPLC) bei einem Druck von 4-5 bar an Kieselgel 60 (40-63  $\mu\text{m}$ ) der Firma Roth. Die Elution erfolgte mit einem Fließmittelgemisch aus Cyclohexan und Essigsäureethylester (9:1). Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm. Die MPLC wurde unter Verwendung folgender Instrumente durchgeführt:

Pumpe:	Labomatic MD-80/100 Mitteldruck-Kolbenpumpe
Druck-Mess-Begrenzer:	Labomatic MB-10
Pulsationsdämpfer:	Labomatic MDP-20
Steuereinheit:	Labomat VS-200
Detektor:	Labocord-200 UV-Spektralphotometer
Schreiber:	Flachbrettschreiber BD 40 04 (Kipp & Zonen (Holland))
Säule:	Labochrom MPGC-Chromatographiesäule 205 ml.

### 2.2.3 NMR-Spektroskopie

Kernresonanzspektrometer Bruker Avance III 300, Bruker Topspin 2.1 Software, 298 K.

$^1\text{H}$ -NMR: Messfrequenz = 300.13 MHz

Die chemischen Verschiebungen wurden auf die Signale der eingesetzten Lösungsmittel bezogen:  $[\text{D}_5]$ -DMSO in  $[\text{D}_6]$ -DMSO: 2.50 ppm,  $\text{CHCl}_3$  in  $\text{CDCl}_3$ : 7.26 ppm,  $[\text{D}_5]$ -Aceton in  $[\text{D}_6]$ -Aceton: 2.05 ppm.<sup>93</sup>

$^{13}\text{C}$ -NMR: Messfrequenz = 75.47 MHz

Die chemischen Verschiebungen wurden auf die Signale der eingesetzten Lösungsmittel bezogen:  $[\text{D}_6]$ -DMSO: 39.52 ppm,  $\text{CDCl}_3$ : 77.16 ppm,  $[\text{D}_6]$ -Aceton: 29.84 ppm und 206.26 ppm.<sup>93</sup>

$^{19}\text{F}$ -NMR: Messfrequenz = 282.40 MHz

Die Spektren wurden auf den externen Standard Trichlorfluormethan ( $\text{CFCl}_3$ ) in  $[\text{D}_6]$ -DMSO kalibriert.

Die zur Charakterisierung der Signale verwendeten Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Auswertung der NMR-Spektren nach den Regeln zur Auswertung von Spektren erster Ordnung. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde für die Angabe der Werte der chemischen Verschiebungen und der Kopplungskonstanten in dieser Arbeit stets ein Punkt als Dezimaltrennzeichen verwendet.

### 2.2.4 Massenspektrometrie

Bruker Amazon SL Ionenfallen-Massenspektrometer mit vorgeschaltetem Agilent 1260 HPLC-System (Säule: Waters Xterra MS C8, 4,6 × 50 mm, 3,5 µm, mit Phenomenex Security Guard C18-Vorsäule 3 × 4 mm), Elektrospray-Ionisierung (ESI), Bruker Data Analysis 4.0 Software.

Elutionsparameter (Eluent A: 0,1%ige Essigsäure in destilliertem Wasser; Eluent B: Acetonitril): Gradient: 0-2,5 min (97 % A, 3 % B), 2,5-5,5 min (95 % A, 5 % B), 5,5-10 min (35 % A, 65 % B), 10-11 min (100 % B).

### 2.2.5 Dünnschichtchromatographie

Verwendet wurden Polygram SIL G/UV<sub>254</sub>-Polyester-Fertigfolien mit 0,20 mm Kieselgel 60 und Fluoreszenz-Indikator (Macherey-Nagel, Düren); die Detektion der Spots erfolgte durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge von 254 nm (Fluoreszenzlöschung).

### 2.2.6 Schmelzpunkt-Bestimmung

Es wurde die Stuart Scientific SMP3 Schmelzpunktapparatur (Bibby Sterilin, Stone) verwendet, die Angabe der Schmelzpunkte erfolgt unkorrigiert.

## 2.3 Software

Die Proteinstrukturen sowie die Van-der-Waals-Oberflächen der Substrat-Moleküle und PffNT-Inhibitoren wurden mit PyMOL (Schrödinger) erstellt.

Die Darstellung der chemischen Strukturen erfolgte mittels ChemDraw Professional 15.1 (PerkinElmer).

Die Berechnung der pK<sub>s</sub>-Werte der PffNT-Inhibitoren erfolgte mit MarvinSketch (ChemAxon).

Das Fitting sämtlicher Kurven (Hemmung, Substrataufnahme, Bindung, Dissoziation, K<sub>i</sub>-Wert, pH-Abhängigkeit) und deren Darstellung erfolgten mittels SigmaPlot 11.0 (Systat Software).

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Schnelltransformation von *E. coli*

Für eine Schnelltransformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen (Herstellung siehe Abschnitt 3.1.4) wurden diese zunächst für 5 min auf Eis angetaut. Anschließend wurden 0,2 µl der jeweiligen Plasmid-DNA-Lösung zugesetzt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Jeweils 25 µl der Zellsuspension wurden auf LB-Ampicillin-Selektionsplatten ausgestrichen und diese im Anschluss über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 3.1.2 DNA-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte als Minipräparation mit dem Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System. Zunächst wurde eine einzelne *E. coli* Kolonie von einer LB-Ampicillin-Selektionsplatte entnommen und in 5 ml flüssigem LB-Medium, welchem Ampicillin zugesetzt war, über Nacht bei 37 °C inkubiert. 4,5 ml dieser Flüssigkultur wurden anschließend zur Plasmidpräparation eingesetzt. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die abschließende Elution der DNA erfolgte unter Verwendung von 50 µl sterilem Wasser.

#### 3.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Überprüfung der erfolgreichen DNA-Isolierung wurden Konzentration und Reinheit einer Plasmid-DNA-Lösung mittels BioPhotometer bestimmt. Die Ausgabe der Konzentration erfolgte dabei durch das Photometer nach Messung der Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm unter Berücksichtigung der verwendeten Verdünnung und der Art der Nucleinsäure. Die Reinheit resultierte aus der Angabe des Verhältnisses der Absorption der DNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm zur Absorption bei 280 nm, bei der verunreinigende Proteine detektiert werden. Ein Verhältnis von  $\geq 1,8$  war Voraussetzung für die weitere Verwendung der Plasmid-DNA-Lösung für die Transformation von *S. cerevisiae*.

#### 3.1.4 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Die Herstellung der kompetenten *E. coli* Zellen erfolgte in Anlehnung an COHEN *et al.* über die Calciumchlorid-Methode:<sup>94</sup> Eine einzelne Kolonie eines DH5 $\alpha$ -Stammes wurde von einer LB-Agarplatte in 5 ml LB-Flüssigmedium überführt und ca. 9 h bei 37 °C und 200 U/min inkubiert. Anschließend wurde mit dieser Vorkultur eine 100-ml-Hauptkultur in LB-Flüssigmedium angeimpft und bei 20 °C und 200 U/min bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6 wachsen gelassen. Nach anschließendem Kühlen der Zellen für 10 min auf Eis erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 2000 g und 4 °C. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde mit 30 ml einer kalten wässrigen CaCl<sub>2</sub>-Lösung (0,1 M) aufgefüllt, 10 min auf Eis inkubiert, die Zellen vorsichtig resuspendiert und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde wiederum für 10 min bei 2000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand ent-



fernt und 20 ml einer kalten wässrigen  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (0,1 M) zugegeben. Nachdem das Zellpellet vorsichtig resuspendiert wurde, erfolgte eine weitere 20-minütige Lagerung auf Eis. Anschließend folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 2000 g und 4 °C. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden 10 ml einer mit 20 % Glycerol versetzten, wässrigen  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (0,1 M) zugegeben. Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und über einen Zeitraum von mindestens 4 h auf Eis gelagert; zuletzt wurde die Zellsuspension aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Qualität der kompetenten *E. coli* Zellen wurde über eine Transformation mit 1 ng Plasmid-DNA überprüft, dabei war eine Anzahl von mindestens  $10^6$  koloniebildenden Einheiten je Mikrogramm eingesetzter DNA Voraussetzung für die weitere Verwendung der Zellen.

### 3.1.5 Dauerkulturen von *E. coli*

Durch Zugabe von 500 µl einer sterilen 80%igen wässrigen Glycerol-Lösung zu jeweils 1000 µl einer frischen *E. coli* Übernachtskultur und anschließendem Vermischen wurden Dauerkulturen angelegt, die bei einer Temperatur von -80 °C gelagert wurden.

### 3.1.6 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation erfolgte in Anlehnung an GIETZ und SCHIESTL:<sup>95</sup> Eine einzelne Kolonie des Hefestammes wurde über Nacht in 5 ml YPD-Flüssigmedium bei 30 °C und 220 U/min inkubiert. Ausgehend von dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag in 50 ml YPD-Flüssigmedium eine frische Hefekultur mit einer Start- $\text{OD}_{600}$  von 0,2 hergestellt. Diese wurde bei 30 °C und 220 U/min so lange inkubiert, bis eine Ziel- $\text{OD}_{600}$  von  $0,6 \pm 0,1$  erreicht war. Anschließend wurde diese Hefekultur bei 2500 g für 5 min zentrifugiert, die so gesammelte Hefe mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen und schließlich in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert. Jeweils 100 µl dieser Zellsuspension wurden für eine Transformation eingesetzt und dafür zunächst mit einer frisch hergestellten Lösung aus 240 µl 50%igem (m/V) PEG 3500, 36 µl einer 1 M wässrigen Lithiumacetatlösung, 50 µl *single-stranded* DNA (2 mg/ml in TE-Puffer, vor der Verwendung für 5 min auf 100 °C erhitzt) und 33 µl sterilem Wasser versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 µl der Plasmid-DNA-Lösung. Der Transformationsansatz wurde bei einer Temperatur von 42 °C für 60 min inkubiert und anschließend 30 s bei 17.200 g zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Hefezellpellet in 1 ml sterilem Wasser suspendiert, 100 µl dieser Suspension wurden entnommen und mit 900 µl sterilem Wasser um den Faktor 10 verdünnt. 100 µl der Verdünnung wurden auf einer SD-AHLW-Selektionsplatte ausgestrichen. Die Inkubation der Selektionsplatten erfolgte bei einer Temperatur von 30 °C für 5 Tage.

## 3.2 Proteinchemische Methoden

### 3.2.1 Aufschluss von *S. cerevisiae* für die SDS-PAGE

Zunächst wurde eine einzelne Kolonie der aufzuschließenden Hefe von einer Selektionsplatte entnommen und über Nacht in 5 ml SD-AHLW-Flüssigmedium bei 30 °C und 220 U/min inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 100 ml SD-AHLW-Medium angeimpft und bei 30 °C und 220 U/min so lange inkubiert, bis eine Ziel- $\text{OD}_{600}$  von  $1,0 \pm 0,1$  erreicht war. Die

## Methoden

Hefekultur wurde für 5 min bei 4000 *g* zentrifugiert und die gesammelte Hefe jeweils einmal mit 50 ml kaltem Wasser und 10 ml kaltem Puffer B gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet für mindestens 30 min bei einer Temperatur von  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Nachdem die Zellen langsam auf Eis aufgetaut waren, erfolgte die Zugabe von 0,5 ml Puffer B und 0,5 ml säurebehandelten Glaskügelchen. Durch zehnmaliges Schütteln dieser Mischung auf dem Vortex Genie 2 für jeweils 30 s, wurden die Zellen aufgeschlossen. Dabei wurden die Zellen nach dem Abschluss jedes 30-s-Intervalls für 1 min auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden die so behandelten Zellen für 5 min bei 1000 *g* und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Die Glaskügelchen wurden einmal mit 0,5 ml Puffer B gewaschen und die vereinigten Überstände für 5 min bei 1000 *g* und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zelltrümmerpellet in 100  $\mu\text{l}$  Puffer M resuspendiert. Im Anschluss wurde diese Suspension nach Zusatz von 35  $\mu\text{l}$  4x SDS-Ladepuffer bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 30 min inkubiert. Falls eine elektrophoretische Auftrennung nicht direkt im Anschluss erfolgte, wurden die Proben bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und bei Bedarf aufgetaut.

### 3.2.2 SDS-PAGE und Western Blot

Über die SDS-PAGE wurden die Proteine aus den Proben der aufgeschlossenen Hefe ihrer Größe entsprechend in 12,5%igen Polyacrylamidgelen (Tabelle 3.1) aufgetrennt, der spezifische Nachweis der Transportproteine erfolgte mittels Western Blot.

**Tabelle 3.1: Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels mit 12,5 % Acrylamid im Trenngel.**

Komponente	Sammelgel	Trenngel
Gereinigtes Wasser	2,40 ml	5,25 ml
4x Sammelgel- bzw. Trenngelpuffer	1,00 ml	3,00 ml
Acrylamid-Lösung (Rotiphorese Gel 40 (29:1))	0,60 ml	3,75 ml
TEMED	6 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
10%ige Ammoniumperoxodisulfat-Lösung	25 $\mu\text{l}$	80 $\mu\text{l}$

Das SDS-Gel wurde mit 10-15  $\mu\text{l}$  Probe beladen, weiterhin wurden 3-5  $\mu\text{l}$  des vorgefärbten peqGOLD Protein-Markers III aufgetragen. Freie Geltaschen wurden mit 4  $\mu\text{l}$  4x SDS-Ladepuffer befüllt. Zunächst erfolgte im Sammelgel die Konzentrierung der Proteine bei einer Spannung von 160 V. Die größenabhängige Auftrennung im Trenngel wurde bei 200 V durchgeführt.

Der Western Blot wurde per Elektrotransfer unter Verwendung des Semidry-Systems durchgeführt. Dafür wurden zunächst sechs Whatman-Papiere und eine zuvor in Methanol aktivierte Polyvinylidenfluorid-Membran im Transferpuffer inkubiert. In der Blot-Kammer, deren unterer Teil die Anode bildete, wurden drei Whatman-Papiere übereinander geschichtet. Anschließend folgten die Membran, das SDS-Trenngel und zuletzt die verbleibenden drei Whatman-Papiere. Der Blotvorgang in Richtung der Anode erfolgte im Anschluss über einen

Zeitraum von 1 h bei einer Spannung von 17 V. Im Anschluss wurde die Membran zunächst für 1 h bei Raumtemperatur in 10 ml 3%igem M-TBST geschüttelt, der Puffer wurde danach verworfen und der Blot über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C mit 10 ml der Primärantikörper-Lösung (in M-TBST) inkubiert. Nachfolgend wurde die Primärantikörper-Lösung entfernt, dreimal aufeinanderfolgend mit jeweils 10–20 ml TBST gewaschen (10 min geschüttelt) und für 1 h mit 10 ml Anti-Maus-Antikörper-Lösung (konjugiert mit Meerrettichperoxidase; in M-TBST) inkubiert. Die Sekundärantikörper-Lösung wurde entfernt und der Blot nach dreimaligem Waschen mit je 10–20 ml TBST mit dem ECL-Reagenz versetzt. Die resultierende Chemilumineszenzreaktion wurde im Lumi-Imager detektiert.

### 3.3 Aufnahmeassay mit $^{14}\text{C}$ -radiomarkierten Substraten

#### 3.3.1 Prinzip

Die Verwendung  $^{14}\text{C}$ -markierter Monocarboxylate erlaubt einen direkten Nachweis der über die Formiat-Nitrit-Transporter in Hefezellen aufgenommenen Substrate.  $^{14}\text{C}$  ist ein instabiles Isotop des Kohlenstoffs, welches mit einer Halbwertszeit von 5730 Jahren unter Freisetzung eines Elektrons in einem  $\beta^-$ -Zerfall zu  $^{14}\text{N}$  zerfällt.<sup>96,97</sup> Das chemische Verhalten, folglich auch das Transportverhalten  $^{14}\text{C}$ -markierter Monocarboxylate über einen FNT, ist dabei nahezu identisch zu Substratmolekülen, die sich ausschließlich aus den stabilen Kohlenstoffisotopen zusammensetzen.<sup>98</sup> Wird eine Suspension FNT-herstellender Hefezellen mit einer Substratlösung versetzt, bei dem ein Anteil des Substrates  $^{14}\text{C}$ -markiert ist, so nimmt die Hefe markiertes und nicht-markiertes Substrat gleichermaßen auf (Abbildung 3.1 A). Nach der Überführung der Hefezellen in einen Szintillationscocktail werden die darin enthaltenen Szintillatormoleküle unter Einfluss der von den zerfallenden  $^{14}\text{C}$ -Isotopen ausgesendeten  $\beta^-$ -Strahlung angeregt. Im Anschluss erfolgt die Emission der durch die Szintillatoren aufgenommenen Energie in Form von Licht, welches, verstärkt über Photomultiplier, detektiert werden kann. Über die Zählung der über einen bestimmten Zeitraum detektierten Lichtsignale kann letztlich auf die Aktivität der untersuchten Probe und damit auf die insgesamt über den FNT aufgenommene Menge Substrat geschlossen werden.<sup>99</sup>

Wird ein FNT-Inhibitor zugesetzt, bindet dieser an das Transportprotein und blockiert dieses. Eine Aufnahme von Monocarboxylaten in die Hefezellen ist nun nicht mehr oder nur eingeschränkt möglich (Abbildung 3.1 B). Dies hat zur Folge, dass die Probe weniger  $\beta^-$ -Strahlung emittiert und somit weniger Lichtsignale am Detektor registriert werden (Abbildung 3.1 C).

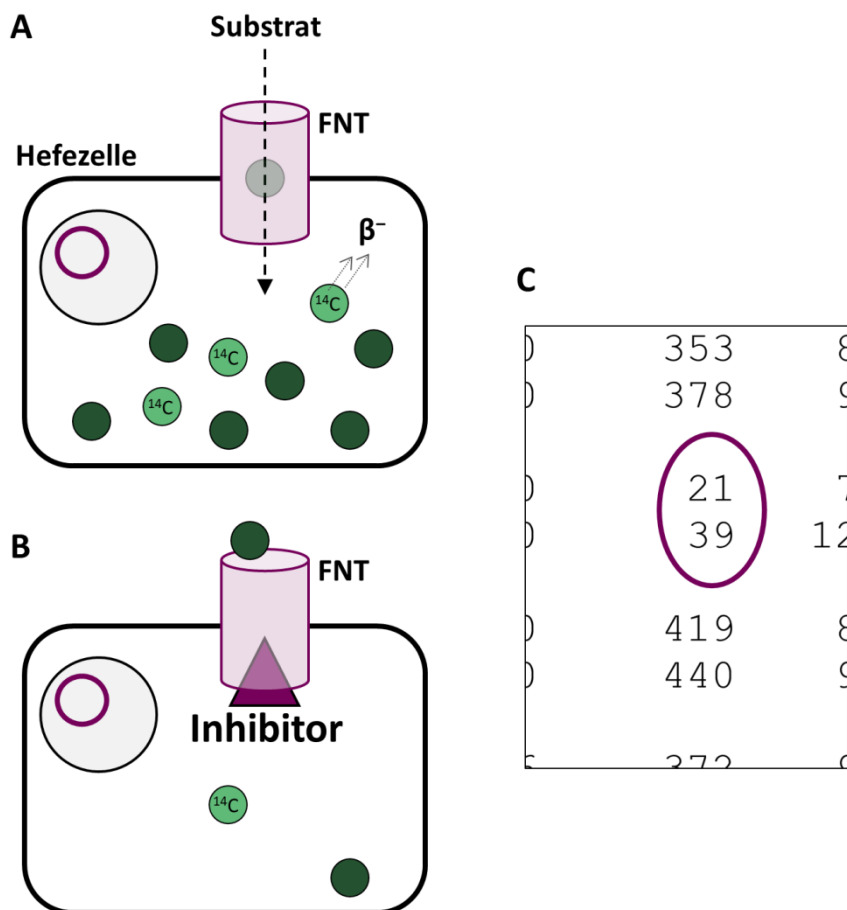


Abbildung 3.1: Prinzip des Aufnahmeassays mit  $^{14}\text{C}$ -radiomarkierten Substraten. (A) Über den FNT wird nicht-markiertes (dunkelgrün) und  $^{14}\text{C}$ -markiertes (hellgrün) Substrat gleichermaßen in die Hefezellen transportiert. Das  $^{14}\text{C}$ -Isotop ist instabil und zerfällt unter Emission von  $\beta^-$ -Strahlung. (B) Wird der FNT inhibiert, gelangt weniger Substrat in die Zellen. (C) Über einen Zeitraum von zwei Minuten detektierte Ereignisse mit (violette Markierung) und ohne Inhibitor (Originaldaten der PfFNT-Hemmung mit  $10\ \mu\text{M}$  MMV007839, 18 im Rahmen des in dieser Arbeit durchgeführten Malaria-Box-Screenings).

### 3.3.2 Herstellung von Inhibitorverdünnungsreihen

In einem tarierten 1,5-ml-Reagiergefäß wurde jeder PfFNT-Inhibitor auf der Präzisionswaage genau eingewogen und anschließend so viel DMSO zugesetzt, dass eine Ausgangslösung mit einer Inhibitorkonzentration von 80 mM (bei Verbindung **72** aufgrund einer geringen Löslichkeit 8 mM) resultierte. Aufgrund der späteren 80-fachen Verdünnung der Inhibitorlösungen im Rahmen des Aufnahmeassays entspricht dies einer Testkonzentration von  $1000\ \mu\text{M}$  (welche damit die höchstmögliche zu testende Konzentration darstellte) sowie einer DMSO-Konzentration von 1,25 %. Ausgehend von dieser Ausgangslösung wurden weitere Inhibitor-Stammlösungen hergestellt, üblicherweise durch 1:10-Verdünnung in den Konzentrationen 8 mM, 0,8 mM,  $80\ \mu\text{M}$  und so weiter. Diese entsprechen im Aufnahmeassay somit Testkonzentrationen von  $100\ \mu\text{M}$ ,  $10\ \mu\text{M}$ ,  $1\ \mu\text{M}$  und so weiter. Nach ungefährender Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -Bereiches einer Substanz wurden gegebenenfalls weitere Verdünnungen in diesem Bereich hergestellt. Für die Verbindungen **27** und **42** wurden zusätzlich separate Stammlösungen in den Konzentrationen 800 mM und 400 mM (diese entsprechen im Aufnahme-

assay den Testkonzentrationen von 10 mM bzw. 5 mM) hergestellt. Die Lagerung der Inhibitor-Stammlösungen erfolgte bei einer Temperatur von  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Im Falle der sehr leicht flüchtigen Verbindung Pharmakophor **41** wurden die Stammlösungen vor jedem Versuch stets frisch hergestellt. Dadurch sollte eine Verschiebung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes vermieden werden, die aufgrund von möglichen Substanzverlusten während der Lagerung des Inhibitors verursacht werden könnte.

Die Herstellung der Ausgangslösungen der *EcNirC*-Inhibitoren erfolgte analog, jedoch wurde hier eine Konzentration von 240 mM gewählt, welche aufgrund der 80-fachen Verdünnung im Hefe-basierten Aufnahmeassay einer Testkonzentration von 3 mM entspricht.

### 3.3.3 $\text{IC}_{50}$ -Bestimmung in *S. cerevisiae*

Der Einfluss von Hemmstoffen auf den Transport von L-Lactat über *PffNT* unter Verwendung von  $^{14}\text{C}$ -markierten Substraten wurde bereits von *Wu et al.*<sup>85</sup> untersucht, die Durchführung des Aufnahmeassays in dieser Arbeit erfolgte in Anlehnung daran: Zunächst wurde eine einzelne Kolonie der Hefe, welche den zu untersuchenden Transporter herstellt, von einer Selektionsplatte entnommen und über Nacht in 5 ml SD-AHLW-Flüssigmedium bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 220 U/min inkubiert. Ausgehend von dieser Vorkultur wurde ein ausreichend großes Volumen einer Hauptkultur angesetzt (aus 200 ml Hefekultur konnten im anschließenden Experiment maximal 50 Messpunkte (Proben) generiert werden). Die Hauptkultur wurde bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von  $1,0\pm 0,1$  wachsen gelassen. Anschließend wurde die Hefe durch Zentrifugation für 5 min bei  $4000\text{ g}$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  geerntet und danach einmal mit 50 ml Wasser gewaschen. Das so erhaltene Hefezellpellet wurde für mindestens 30 min auf Eis gelagert. Im Anschluss wurde, sofern nicht anders angegeben, mit Puffer pH 6,8 eine  $\text{OD}_{600}$  von  $50\pm 5$  eingestellt und die Hefesuspension auf Eis gelagert.

Weiterhin wurden in 1,5-ml-Reagiergefäßen jeweils dreimal  $1\text{ }\mu\text{l}$  einer zu testenden Inhibitorkonzentration bzw. für Kontrollwerte dreimal  $1\text{ }\mu\text{l}$  DMSO vorgelegt, das heißt, für jede Inhibitorkonzentration wurden im Rahmen eines Experimentes drei Replikate erzeugt. Zusätzlich wurde eine 5 mM Substrat-Stammlösung hergestellt, zu der das erforderliche Volumen an radioaktiv markiertem Substrat hinzugegeben wurde.

Im Rahmen des Aufnahmeassays wurden stets  $80\text{ }\mu\text{l}$  der Hefezellsuspension auf den vorgelegten Inhibitor (Abschnitt 3.3.2) bzw. das vorgelegte DMSO gegeben und die Probe auf dem Vortex-Genie 2 durchmischt. Einzig das leicht flüchtige Pharmakophor **41** wurde zur Vermeidung von Substanzverlusten nicht vorgelegt, sondern direkt in die Hefesuspension pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15–20 min erfolgte der Start der Substrataufnahme durch Zugabe von  $20\text{ }\mu\text{l}$  der Substrat-Stammlösung, die Substratkonzentration wurde durch diesen Schritt auf die Zielkonzentration von 1 mM verdünnt. Nach Ablauf der Substratinkubationszeit, welche vom untersuchten Transporter abhängig war (*PffNT*: 30 s, *BbFNT*: 30 s, *BbFNT S93G*: 60 s, *EcNirC*: 60 s (Analoge der Nifluminsäure **16**) und 120 s (*MMV007839* **18**), *PffNT G107S*: 120 s, *MCT1*: 180 s), wurde die Substrataufnahme durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Wasser gestoppt, der gesamte Ansatz auf einen mit einem Glasmikrofaser-Filter bestückten Trichter einer Vakuum-Filtrationseinheit gegeben und mit 7 ml eiskaltem Wasser gespült. Die mit den Hefen beladenen Filter wurden in Szintillationsgefäße, welche mit 3 ml Szintillationscocktail befüllt waren, überführt und nach 24 h die aufgenommene Menge an radioaktivem Substrat im Flüssigszintillationszähler bestimmt.

Ausgehend von der aufgenommenen Menge des radioaktiven Substrates und der Substratinkubationszeit, wurde die Aufnahmerate für das Gesamtsubstrat berechnet. Dabei wurde die vollständige Hemmung eines Transporters (100 % Hemmung bzw. 0 % Aktivität) als diejenige Rate definiert, die Hefe, welche kein Transportprotein produziert, in Gegenwart von 1,25 % DMSO zeigte. Für Hefe, die das zu untersuchende Transportprotein herstellt, resultierte dementsprechend unter Einfluss von 1,25 % Inhibitor-freiem DMSO eine 100%ige Aktivität bzw. 0 % Hemmung. Da die Werte für die Aufnahmeraten ungehemmter Hefe von vielen Faktoren abhängig sind (beispielsweise vom Alter der Hefekulturen auf der Selektionsplatte oder der Lagerzeit der Hefen vor Beginn des Versuches), wurden diese für jedes Experiment neu bestimmt. Die Transportrate der Hefe, die mit dem Inhibitor inkubiert wurde, konnte schließlich nach Abzug der Rate von Hefe, die kein Protein produziert, prozentual auf die Rate der ungehemmten Hefe, von der zuvor ebenfalls die Hintergrund-Transportrate abgezogen wurde, bezogen werden. So konnte für jede getestete Substanzkonzentration eine entsprechende prozentuale Aktivität erhalten werden, die, gegen die jeweilige Konzentration in logarithmischer Darstellung aufgetragen, die sigmoidale Hemmkurve lieferte.

### **3.3.4 Malaria-Box-Screening**

Verteilt auf fünf 96-well-Platten waren in der Malaria-Box insgesamt 390 in DMSO gelöste Substanzen in einer Konzentration von 10 mM vertreten. Durch Verdünnen von jeweils 2 µl dieser Inhibitorlösungen in 23 µl DMSO wurden 0,8 mM Stammlösungen mit einem Volumen von 25 µl generiert. Von diesen Lösungen wurde, wie unter Abschnitt 3.3.3 beschrieben, je 1 µl im Aufnahmeassay eingesetzt, durch die 80-fache Verdünnung mit einer Suspension *PfFNT*-produzierender Hefe resultierte so eine Testkonzentration von 10 µM. Die Inkubationszeit der Hefezellsuspension mit einer Verbindung betrug zwischen 20 und 40 min. Jede Substanz wurde einmal in einer Zweifachbestimmung untersucht. Das *Screening* wurde bei einem pH-Wert von 6,8 unter Zusatz von Natriumformiat als Substrat durchgeführt. Die Inkubationszeit mit dem Formiat betrug 30 s. Dabei entsprach die finale Formiatkonzentration 1 mM, die Aktivität an [<sup>14</sup>C]-Natriumformiat betrug 0,04 µCi/Probe. Eine unter diesen Bedingungen erzeugte vollständige Hemmung von *PfFNT* war Voraussetzung für die weitergehende Untersuchung eines Inhibitors.

### **3.3.5 Zeitabhängige Substrataufnahme**

Zur Generierung der Kurven der zeitabhängigen Aufnahme von Substraten über die untersuchten Transporter wurde der Aufnahmeassay in Abwesenheit von DMSO bzw. Inhibitor durchgeführt. Die Substratinkubationszeit zwischen den einzelnen Proben wurde variiert, die berechnete Menge an insgesamt aufgenommenem Substrat wurde gegen die Substratinkubationszeit aufgetragen.

### **3.3.6 Zeitabhängige Inhibition: Bindung**

*PfFNT*-Hefezellsuspensionen wurden für genau definierte Zeitspannen in dem Bereich zwischen 30 s und 20 min einer ausgewählten Konzentration von MMV007839 **18** ausgesetzt. Anschließend folgte für 30 s die Inkubation mit Natrium-L-Lactat (1 mM Gradient) in

Gegenwart von [1-<sup>14</sup>C]-Natrium-L-Lactat (0,04 µCi/Probe) wie unter Abschnitt 3.3.3 beschrieben. Durch das Auftragen der erzielten *Pff*FNT-Hemmung gegen die Inkubationszeit von MMV007839 **18** wurden zeitabhängige Bindungskurven erhalten.

### 3.3.7 Zeitabhängige Inhibition: Dissoziation

Zur Untersuchung der Dissoziation von MMV007839 **18** von *Pff*FNT wurden entsprechende Hefezellsuspensionen mit der Inhibitor-Stammlösung inkubiert, so dass eine Testkonzentration von 1 µM bzw. 0,17 µM MMV007839 **18** erreicht wurde und 1,25 % DMSO enthalten war. Die Inkubationszeit mit dem Inhibitor wurde nicht verändert, so dass vergleichbar der IC<sub>50</sub>-Kurve von MMV007839 **18** an *Pff*FNT (Abbildung 4.5) eine vollständige (1 µM) bzw. halbmaximale (0,17 µM) Hemmung resultierte. Im Anschluss wurde MMV007839 **18** quantitativ durch zwei aufeinanderfolgende Waschschriffe mit Inhibitor-freiem Puffer pH 6,8 entfernt, mit Inhibitor-freiem Puffer pH 6,8 auf eine OD<sub>600</sub> von 50±5 eingestellt und die Hefezellsuspension bei 18 °C gelagert. Die Substrataufnahme wurde durch Inkubation mit 1 mM Natrium-L-Lactat und [1-<sup>14</sup>C]-Natrium-L-Lactat (0,04 µCi/Probe) für 30 s über einen Zeitraum von bis zu 120 min nach Entfernen von MMV007839 **18** untersucht, der Zeitpunkt  $t = 0$  min wurde hierbei als Zugabe des Inhibitor-freien Puffers im Zuge des ersten Waschschriffes definiert. Durch das Auftragen der beobachteten *Pff*FNT-Hemmung gegen die Zeit wurden zeitabhängige Dissoziationskurven erhalten. Da in diesem Experiment aufgrund der langen Lagerzeiten der Hefen bei 18 °C eine Abnahme der *Pff*FNT-Aktivität zu beobachten war, wurden die erhaltenen Kurven um den Aktivitätsverlust, den eine DMSO-Kontrolle zeigte, korrigiert.

### 3.3.8 Zeitabhängige Inhibition: Bindung über 24 Stunden

Ausgehend von einer Flüssigkultur *Pff*FNT-produzierender Hefe mit einer OD<sub>600</sub> von 1±0,1, wurden 50-ml-Flüssigkulturen so angesetzt, dass nach einer Zeit von 6 h bei 30 °C und 220 U/min eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 erreicht wurde. Zusätzlich wurde direkt zu Beginn der 6-stündigen Inkubation jeder Kultur eine definierte Konzentration zwischen 200 nM und 1 nM MMV007839 **18** zugesetzt, eine Kultur wurde mit Inhibitor-freiem DMSO versetzt und diente als Kontrolle der vollständigen *Pff*FNT-Aktivität. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Hefekulturen für weitere 18 h bei 4 °C gelagert, so dass die Hefen insgesamt 24 h dem Inhibitor ausgesetzt waren. Im Anschluss wurden die Hefekulturen, wie unter Abschnitt 3.3.3 beschrieben, ohne weiteren Zusatz von MMV007839 **18** vorbereitet und für 30 s einem L-Lactat-Gradienten von 1 mM in Gegenwart von 0,04 µCi/Probe [1-<sup>14</sup>C]-Natrium-L-Lactat ausgesetzt. Die *Pff*FNT-Restaktivität wurde gegen die logarithmisch dargestellten Inhibitor-konzentrationen aufgetragen. Der Einfluss von MMV007839 **18** auf das Hefewachstum wurde zusätzlich durch die Verwendung *Bbf*FNT-herstellender Hefe kontrolliert: Auch dort wurde zu Beginn der 24-stündigen Inkubation 200 nM MMV007839 **18** zugesetzt, da *Bbf*FNT jedoch bei dieser, im Rahmen dieses Experimentes, höchsten verwendeten Inhibitor-konzentration nicht hemmbar ist (siehe Abschnitt 4.8.3) und zugleich die volle Aktivität in Bezug auf eine DMSO-Kontrolle zeigte, konnte eine Beeinträchtigung des Hefewachstums durch MMV007839 **18** ausgeschlossen werden.

### 3.4 *P. falciparum* Kultur

Alle Experimente mit den Malariaparasiten wurden am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg von Dr. Tobias Spielmann, Dr. Alexandra Blancke Soares und Bärbel Bergmann durchgeführt.

#### 3.4.1 IC<sub>50</sub>-Bestimmung in *P. falciparum*

*P. falciparum* Parasiten (Stamm 3D7) wurden in Anlehnung an TRAGER und JENSEN<sup>100</sup> in 5 % Erythrozyten (0+) in RPMI 1640 Medium und 0,5 % Albumax kultiviert. Jeweils 2 ml einer Parasitenkultur wurden einer definierten Inhibitorkonzentration bzw. als Kontrolle Inhibitorfreiem DMSO ausgesetzt, nach 24 h wurde frisches Medium mit neuem Inhibitor zugesetzt. Nach weiteren 24 h wurde die Parasitämie in den Kulturen mittels Fluoreszenz-basierter Durchflusszytometrie bestimmt. Bezogen auf die DMSO-Kontrolle wurde daraus die Viabilität berechnet und abhängig von der jeweiligen Inhibitorkonzentration aufgetragen.

#### 3.4.2 Generierung einer Resistenz

50-ml-Kulturen von *P. falciparum* (Stamm 3D7) wurden der dreifachen IC<sub>50</sub>-Konzentration von MMV007839 **18** ausgesetzt, dabei wurde täglich frisches Medium mit Inhibitor zugesetzt. Nachdem keine Parasiten mehr detektierbar waren, wurde das Medium alle 48 h gewechselt, der Selektionsdruck durch MMV007839 **18** wurde aufrechterhalten. Bei anschließendem erneutem Nachweis von Parasiten wurde deren DNA isoliert (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden) mittels Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt und anschließend sequenziert (Seqlab, Göttingen).

### 3.5 Synthese

Alle synthetischen Arbeiten wurden von Björn Henke am Pharmazeutischen Institut in Kiel durchgeführt. Sofern die Synthesen unter Inertgasatmosphäre erfolgten, wurden die Glasgeräte vor dem Beginn der Reaktion mit Argon begast.

Die Auswertung der Daten aus der NMR-Spektroskopie und der Massenspektrometrie sowie die Schmelzpunkt- und *R<sub>f</sub>*-Wert-Bestimmung erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Sofern unter Abschnitt 5.2 nicht anders angegeben, erfolgte die Synthese der MMV007839-Analoga im Sinne einer Claisen-Kondensation in Anlehnung an SOSNOVSKIKH und USACHEV:<sup>101</sup> 0,34 g (42,8 mmol) Lithiumhydrid wurden in 7,5 ml Tetrahydrofuran (abs.) vorgelegt und unter Rühren zum Sieden erhitzt. Zu dieser Suspension wurde ein Gemisch aus 15,0 mmol des entsprechenden Carbonsäureesters und 12,5 mmol der CH-aciden Komponente in 5,0 ml Tetrahydrofuran (abs.) langsam zugetropft und das Reaktionsgemisch drei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz vom Lösungsmittel befreit und der erhaltene Rückstand mit 60 ml einer kalten Mischung aus Eisessig und Wasser (7:50) versetzt. Nach zweimaliger Extraktion mit jeweils 100 ml Essigsäureethylester wurden die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (MPLC) an Kieselgel mit einem Fließ-



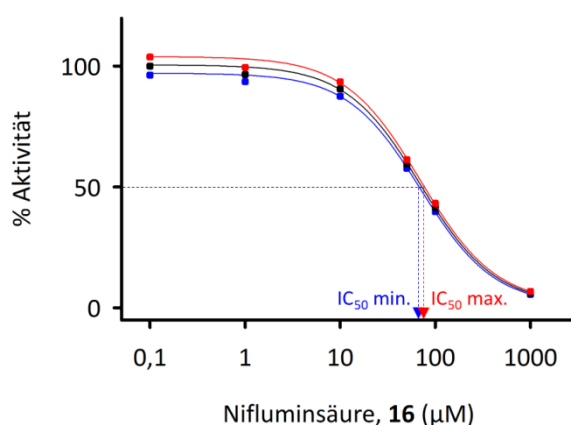
mittelgemischt aus Cyclohexan und Essigsäureethylester (9:1) aufgereinigt. Einige Produkte wurden zusätzlich aus *n*-Hexan umkristallisiert.

### 3.6 Statistische Auswertung

In Abhängigkeit vom untersuchten Transportprotein wurden in den Abbildungen dieser Arbeit jeweils verschiedene Symbole verwendet: *Pf*FNT (inklusive *P. falciparum* Kultur) = Quadrate; MCT1 = Dreiecke; Hefe, die kein Protein herstellt = Rauten; *Bb*FNT = Kreise; *Ec*NirC = Sechsecke. Bei Daten, die an Wildtyp-Proteinen (inklusive *P. falciparum* 3D7) generiert wurden, sind die entsprechenden Symbole ausgefüllt, für mutierte Transporter (inklusive resistenten Plasmodien) wurden offene, nicht ausgefüllte Symbole verwendet.

#### 3.6.1 Hefesystem

Sofern nicht explizit anders angegeben, erfolgte die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte im Hefe-basierten Aufnahmeassay, indem jede verwendete Inhibitorkonzentration stets in einer Dreifachbestimmung hinsichtlich der Hemmung der Substrataufnahme über einen Transporter untersucht wurde. Die Inkubationszeiten mit dem Substrat orientierten sich dabei an der initialen, linearen Phase der entsprechenden Aufnahmekurven und sind in Abschnitt 3.3.3 wiedergegeben. Die angegebenen  $IC_{50}$ -Werte wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten kontrolliert. Die Erstellung sämtlicher Hemmkurven erfolgte mittels SigmaPlot unter Verwendung der Hill-Gleichung für sigmoidale Kurvenverläufe oder über lineares Fitting bei keiner sichtbaren Hemmung durch einen Inhibitor. Die abgebildeten Fehlerbalken geben stets den Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) an. Der zusätzlich zu jedem  $IC_{50}$ -Wert angegebene Fehlerbereich resultierte aus den  $IC_{50}$ -Werten der maximalen und minimalen  $IC_{50}$ -Kurven der Inhibitoren (Abbildung 3.2). Diese wurden ausgehend von den für jede Inhibitorkonzentration ermittelten Aktivitätswerten durch Addition und Subtraktion des SEM erhalten.



**Abbildung 3.2:** Beispielhafte Darstellung der Fehlerbestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes von Nifluminsäure, 16 für die *Pf*FNT-Hemmung in Hefe. Der Abstand der roten (Maximum) und blauen (Minimum) Quadrate vom Mittelwert (schwarz) entspricht der Höhe des Fehlerbalkens (SEM).

In einigen Abbildungen ist eine gestrichelte Linie gezeigt, welche die  $IC_{50}$ -Kurve der L-Lactat-Aufnahmehemmung von MMV007839 **18** an *PfFNT*-herstellender Hefe bei einem pH-Wert von 6,8 zeigt. Diese Kurve umfasst sämtliche für den Inhibitor an *PfFNT* generierten Datenpunkte (111 Werte), die zum Teil zusätzlich im Rahmen dieser Arbeit in Kontrollexperimenten erhalten wurden. Dabei wurde MMV007839 **18** von insgesamt drei verschiedenen Quellen verwendet: aus der Malaria-Box, von einem kommerziellen Anbieter (Vitas-M Laboratory) und als Produkt der im Arbeitskreis erfolgten Synthese (hier unter der Bezeichnung „BH-312“). Die so erhaltene Kurve zeigt einen identischen  $IC_{50}$ -Wert und eine identische Fehlerspanne der *PfFNT*-Hemmung wie die Kurve, die in Abbildung 4.5 dargestellt ist. Für bestimmte *PfFNT*-Inhibitoren ist in einigen weiteren Abbildungen zur Orientierung zudem eine gepunktete Linie dargestellt. Diese gibt stets die originale  $IC_{50}$ -Kurve der L-Lactat-Aufnahmehemmung des entsprechenden Inhibitors an *PfFNT* bei einem pH-Wert von 6,8 wieder.

Der  $K_i$ -Wert von MMV007839 **18** an *PfFNT* wurde aus fünf unabhängig durchgeführten Bindungsexperimenten mit 0,17, 0,4, 1,0, 4,0 und 10,0  $\mu$ M Inhibitor bestimmt. Die dabei generierten Bindungskurven von MMV007839 **18** an *PfFNT* wurden exponentiell mit Sigma-Plot gefittet.

Für die Herstellung der Inhibitor-Stammlösungen wurde DMSO verwendet, welches stets in einer Konzentration von 1,25 % eingesetzt wurde. Ein negativer Einfluss des DMSO auf die Aufnahmeraten der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Transportproteine wurde dabei nicht beobachtet.

### 3.6.2 *P. falciparum* Kultur

Die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte, die für einige Verbindungen zusätzlich an Parasiten generiert wurden, erfolgte am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg. Sofern nicht explizit anders angegeben, wurden hierfür jeweils drei unabhängige *P. falciparum* Kulturen (biologische Replikate) verwendet – der angegebene Fehlerbereich zeigt den SEM. Die in den Abbildungen dieser Arbeit dargestellten  $IC_{50}$ -Kurven aus den Parasiten sind stets rot gefärbt (Ausnahme: BH-296-Ethylester-Prodrug **38** = orange). Im Falle einiger  $IC_{50}$ -Bestimmungen wurden für die einzelnen biologischen Replikate teils unterschiedliche Inhibitorkonzentrationen verwendet. In dieser Arbeit wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit daher teilweise lediglich eine repräsentative Kurve eines Replikates abgebildet. Diese weist folglich für die einzelnen Konzentrationen keine Fehlerbalken auf.

Die Bestimmung des Parasitenwachstums nach initialer Behandlung mit MMV007839 **18** sowie der *Fitness* MMV007839-resistenter Parasiten erfolgte ebenfalls an drei unabhängigen *P. falciparum* Kulturen, die in den Abbildungen gezeigten Fehlerbalken stellen den SEM dar.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Inhibition von *PfFNT* im Hefe-basierten Aufnahmeassay: Nifluminsäure, 16

Für die Untersuchung von Inhibitoren des plasmodialen Lactat-Transporters wurde ein Hefe-basiertes System verwendet, welches bereits im Zuge der erstmaligen Charakterisierung von *PfFNT* genutzt wurde.<sup>85</sup> Der dabei verwendete *S. cerevisiae* Stamm (W303-1A) kann aufgrund von *Gen-knockouts* der endogenen Transporter für Monocarboxylate Jen1 und Ady2 keine Anionen einwertiger organischer Säuren wie Formiat oder Lactat leiten. Durch das Einbringen der *PfFNT*-DNA wird die Hefe jedoch dazu befähigt, den plasmodialen Lactat-Transporter herzustellen und über diesen die Monocarboxylate zu transportieren.<sup>85,92,102-104</sup> Durch Zusatz von <sup>14</sup>C-radiomarkierten Substraten zu dieser Hefe kann der *PfFNT*-vermittelte Transport in die Zelle, in Abhängigkeit von der Zeit, als Transportrate bestimmt werden (siehe Abschnitt 3.3.1).

Die Kontrolle der erfolgreichen Proteinherstellung erfolgte mittels Western Blot (Abbildung 4.1). Funktionelles *PfFNT* wurde bereits zuvor von Wu *et al.* in Hefe hergestellt, auch die Lokalisation des Proteins in der Plasmamembran der Hefe wurde in diesem Zusammenhang nachgewiesen.<sup>85</sup> Neben der Wirkung eines Inhibitors auf *PfFNT* ist auch dessen Einfluss auf den Lactat-Transporter MCT1 der Wirtszelle des Malariaerregers von Interesse. Daher wurde weiterhin die DNA des MCT1 in die Hefe eingebracht – auch dieser Transporter wird, wie im Western Blot ersichtlich, von der Hefe hergestellt (Abbildung 4.1).

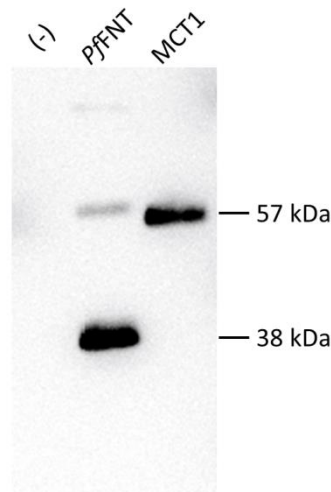


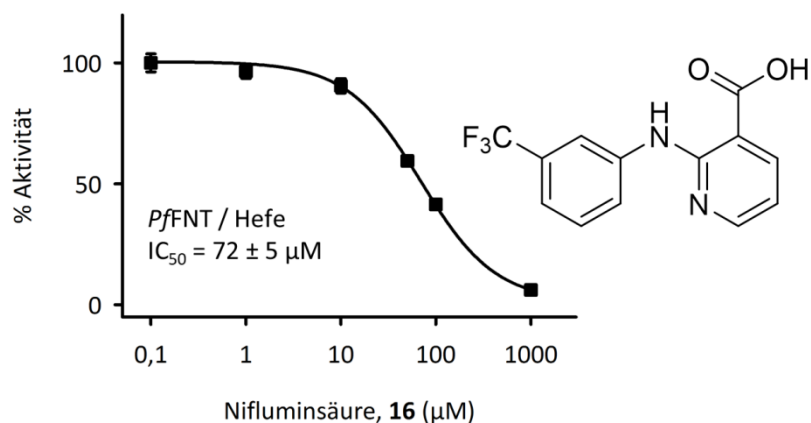
Abbildung 4.1: Western Blot von *PfFNT* und MCT1. Als Primärantikörper wurde der Anti-HA-Antikörper eingesetzt. *PfFNT* besitzt inklusive HA-Tag und His<sub>10</sub>-Tag ein Molekulargewicht von 38 kDa. Neben dem Monomer sind schwächere Banden von SDS-resistenten Oligomeren sichtbar, was auf eine korrekte Proteinfaltung hinweist. Das Molekulargewicht von MCT1 inklusive HA-Tag und His<sub>10</sub>-Tag liegt bei 57 kDa. (-) = Hefe, die kein Protein herstellt.

## Ergebnisse

Die Möglichkeit der Hemmung des *Pff*FNT-vermittelten Lactat-Transportes durch kleine Moleküle wurde ebenfalls bereits von Wu *et al.* gezeigt.<sup>85</sup> Die Inkubationszeiten mit den getesteten Inhibitoren betragen in diesen Untersuchungen zwischen zehn und zwanzig Minuten. Die verwendeten Stammlösungen der Hemmstoffe wurden mit verschiedenen Lösungsmitteln wie DMSO oder Ethanol hergestellt. Die Hefezellsuspension war im Aufnahmeassay einer Konzentration von bis zu 3 % DMSO ausgesetzt, was bereits zu einer 13%igen Inhibitor-unabhängigen Hemmung führte. Eine vollständige Inhibition von *Pff*FNT wurde aufgrund der geringen Affinitäten der getesteten Verbindungen zum Transporter nicht erzielt.<sup>85</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Bedingungen für den Aufnahmeassay hinsichtlich einer größeren Vergleichbarkeit der inhibitorischen Wirkung aller untersuchten Verbindungen angepasst: Die Inkubationszeit der Hefezellsuspension mit dem Inhibitor betrug bei der Bestimmung von  $IC_{50}$ -Werten stets 15–20 Minuten, als Lösungsmittel für die Stammlösungen wurde ausschließlich DMSO verwendet. Dieses wurde im Aufnahmeassay stets in einer Endkonzentration von 1,25 % eingesetzt. Weiterhin wurde zur Bestimmung der Aufnahmezeiten die Suspension der *Pff*FNT-herstellenden Hefe ausschließlich für 30 Sekunden mit dem Substrat inkubiert – ein Zeitraum, nach dem sich der L-Lactat-Transport über *Pff*FNT noch in der initialen linearen Phase befindet.<sup>85</sup>

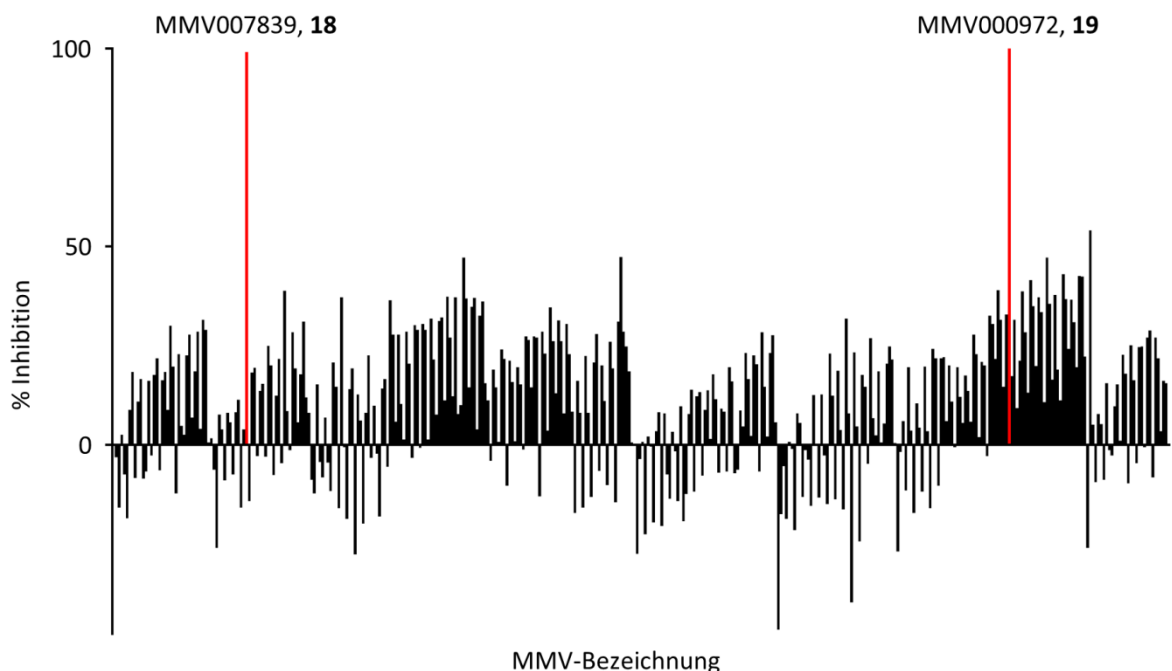
Unter diesen Bedingungen erfolgte zunächst die Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes von Nifluminsäure **16** (Abbildung 4.2), einem *Pff*FNT-Inhibitor, der bereits von MARCHETTI *et al.* identifiziert wurde.<sup>86</sup> Dieser besitzt eine deutlich höhere Affinität zum Transporter als die von Wu *et al.* im Aufnahmeassay untersuchten Hemmstoffe (Abschnitt 1.2.4).<sup>85</sup> So konnte in dieser Arbeit für die höchste der verwendeten Konzentrationen von 1 mM Nifluminsäure **16** erstmalig eine vollständige Hemmung der L-Lactat-Aufnahme über *Pff*FNT beobachtet werden. Hierbei wurde der  $IC_{50}$ -Wert zu  $72 \mu\text{M}$  bestimmt. Bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  wurden dabei 40 % *Pff*FNT-Aktivität bzw. 60 % Inhibition beobachtet – ein Wert, welcher in etwa dem der 70%igen *Pff*FNT-Inhibition entspricht, die bei der gleichen Konzentration von Nifluminsäure **16** bereits von MARCHETTI *et al.* in Frosch-Oozyten ermittelt wurde.<sup>86</sup>



**Abbildung 4.2:** Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes von Nifluminsäure, **16** für die *Pff*FNT-Hemmung in Hefe. Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat +  $0,04 \mu\text{Ci}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 30 s. pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

## 4.2 Screening der Verbindungen aus der Malaria-Box

Die in der Malaria-Box enthaltenen Inhibitorlösungen wurden, wie unter Abschnitt 3.3.4 beschrieben, so verdünnt, dass im Aufnahmeassay eine Testkonzentration von jeweils 10  $\mu\text{M}$  eines entsprechenden Inhibitors resultierte. Da auch Formiat wie L-Lactat von *PfFNT* über die Zellmembran transportiert wird, dabei jedoch in  $^{14}\text{C}$ -markierter Form deutlich kostengünstiger verfügbar ist, wurde es aufgrund der hohen Anzahl an Datenpunkten für das Inhibitor-Screening verwendet.<sup>85,86</sup> Formiat zeigt jedoch im Vergleich zu Lactat eine wesentlich stärkere Transporter-unabhängige Diffusion über die Hefezellmembran, so dass die Intensität der Rauschsignale zunimmt.<sup>105</sup> Die Inkubationszeit der Hefezellsuspension mit den Inhibitoren wurde auf 20 bis 40 Minuten verlängert, um bei gleichbleibendem Zeitaufwand eine höhere Anzahl an Substanzen hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung auf *PfFNT* untersuchen zu können. Zusätzlich wurde die Anzahl der Messpunkte je Verbindung auf zwei Replikate beschränkt. Für das ausschließliche Ziel des Screenings, diejenigen Verbindungen zu identifizieren, welche unter diesen Bedingungen den *PfFNT*-vermittelten Formiat-Transport vollständig hemmen, war die Qualität der so gewonnenen Messergebnisse jedoch völlig ausreichend. Unter den insgesamt 390 in der Malaria-Box enthaltenen Inhibitoren fanden sich schließlich zwei Verbindungen, die bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine vollständige Blockade des plasmodialen Lactat-Transporters verursachten: MMV007839 **18** und MMV000972 **19** (Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3:** Screening der 390 Verbindungen aus der Malaria-Box bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ : MMV007839, 18 und MMV000972, 19 inhibieren den Formiat-Transport in *PfFNT*-herstellende Hefe vollständig.

Inkubationszeit Inhibitor: 20–40 min. Substrat: 1 mM Formiat + 0,04  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Formiat, Substratinkubationszeit: 30 s. pH 6,8.

Die chemischen Strukturen von MMV007839 **18** und MMV000972 **19** sind in Abbildung 4.4 gezeigt. Beide Moleküle sind sich strukturell sehr ähnlich. Sie besitzen das identische 2-Hydroxychromanon-Grundgerüst mit einem zusätzlichen Pentafluorethylrest an Position 2. MMV007839 **18** ist an Position 7 zusätzlich mit einer Methoxyfunktion substituiert. Dieses Substitutionsmuster fehlt in MMV000972 **19**. Aufgrund der dem Ring-Sauerstoff des Chromanons benachbarten Hydroxyfunktion an Position 2 sind beide Moleküle gleichzeitig auch als zyklische Hemiketale aufzufassen, die aus einer intramolekularen Zyklisierungsreaktion einer phenolischen Hydroxygruppe mit einer Ketofunktion resultierten.

Aufgrund des in beiden Verbindungen vorhandenen Phenylrestes ist davon auszugehen, dass MMV007839 **18** und MMV000972 **19** zu groß sind, um die schmale Transportpore von *Pf*FNT zu passieren und die antiplasmodiale Wirksamkeit daher aus der Bindung der Moleküle an den Lactat-Transporter resultiert, was mit einer Unterbrechung des Lactat-Exportes aus den Parasiten einhergeht.

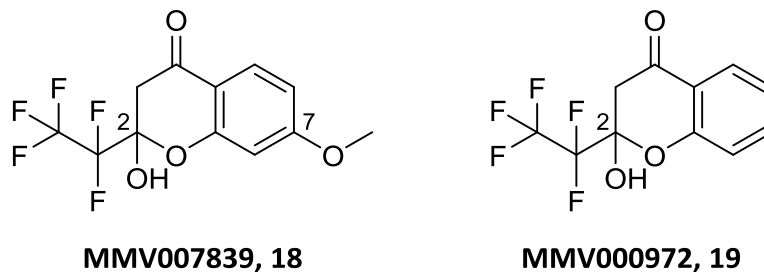


Abbildung 4.4: Strukturen der *Hit*-Verbindungen aus der Malaria-Box, MMV007839, **18** und MMV000972, **19**.

### 4.3 Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte von MMV007839, **18** und MMV000972, **19** in Hefe und in der *P. falciparum* Kultur

Im Hefe-basierten Aufnahmeassay wurden die für eine halbmaximale *Pf*FNT-Hemmung benötigten Konzentrationen für beide *Hit*-Verbindungen aus der Malaria-Box zu jeweils 170 nM bestimmt (schwarze Kurven in Abbildung 4.5 und Abbildung 4.6) – verglichen mit dem IC<sub>50</sub>-Wert von 72 μM für den bisher potentesten *Pf*FNT-Inhibitor, Nifluminsäure **16**, ist dies eine 423-fach gesteigerte Affinität. Unterschiede bestanden jedoch in den am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin bestimmten IC<sub>50</sub>-Werten für die Hemmung des Parasitenwachstums *in vitro* (rote Kurven in Abbildung 4.5 und Abbildung 4.6): Hier war MMV007839 **18** mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 140 nM gegenüber MMV000972 **19** mit einer halbmaximalen inhibitorischen Konzentration von 1,6 μM deutlich potenter. Dies wurde bereits während der im Zuge der Zusammenstellung der Malaria-Box erfolgten Wirksamkeitsbestätigung der Inhibitoren (Abschnitt 1.1.4) beobachtet: Beide Moleküle wurden als sogenannte „*near neighbors*“, also Verbindungen mit hoher struktureller Ähnlichkeit, aber unterschiedlicher antiplasmodialer Aktivität, in die Box aufgenommen.<sup>56</sup> Daraus können bereits erste Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden. So hat der Substituent am Aromaten keinen Einfluss auf die Bindung des Inhibitors an das Transportprotein, die Affinität wird folglich nicht beeinflusst. Im Parasiten spielt dieser Rest jedoch eine entscheidende Rolle. Möglicherweise

## Ergebnisse

ist für MMV000972 **19** die Aufnahme über die Zellmembran des Parasiten beeinträchtigt oder die Abwesenheit der Methoxyfunktion führt zu einer geringeren metabolischen Stabilität. Aufgrund der höheren antiplasmodialen Wirksamkeit von MMV007839 **18**, wurde diese Verbindung in den folgenden Untersuchungen dieser Arbeit als Leitstruktur verwendet.

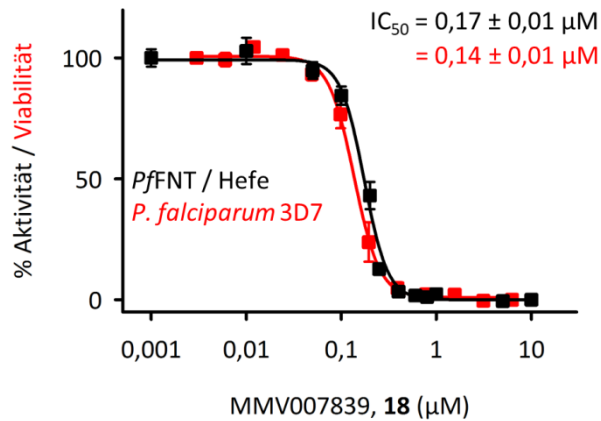


Abbildung 4.5: Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte von MMV007839, **18** für die PfFNT-Hemmung in Hefe (schwarz) und die Viabilität von *P. falciparum* Parasiten (rot).

Hefe: Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04 µCi [ $^{14}C$ ]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 30 s. pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

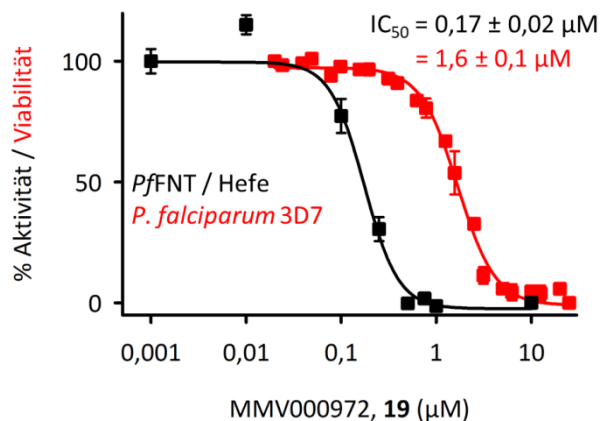


Abbildung 4.6: Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte von MMV000972, **19** für die PfFNT-Hemmung in Hefe (schwarz) und die Viabilität von *P. falciparum* Parasiten (rot).

Hefe: Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04 µCi [ $^{14}C$ ]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 30 s. pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

Die Parasiten wurden zusätzlich initial jeweils über einen Zeitraum von einer Stunde und über Nacht mit der  $IC_{90}$ -Konzentration von MMV007839 **18** inkubiert und anschließend in Abwesenheit des Inhibitors wachsen gelassen. Dies führte bei den einstündig mit MMV007839 **18** behandelten Parasiten zu einer 17%igen Wachstumsreduktion, die über Nacht mit dem Inhibitor inkubierten Plasmodien zeigten ein um 70 % vermindertes Wachs-

## Ergebnisse

tum (Abbildung 4.7). Hier wird deutlich, dass MMV007839 **18**, als eine den Energiemetabolismus der Parasiten adressierende Verbindung, über einen gewissen Zeitraum auf die Plasmodien wirken muss, um das Wachstum zu inhibieren – ein Gegensatz zu den eher akut toxisch wirkenden antiplasmodialen Arzneistoffen wie Artemisinin **1**.

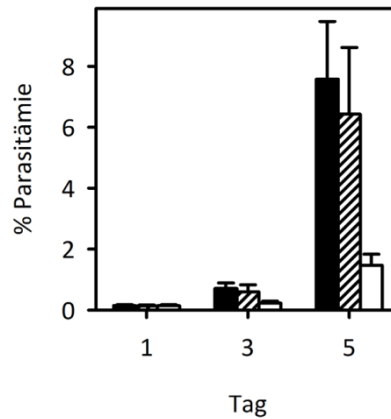


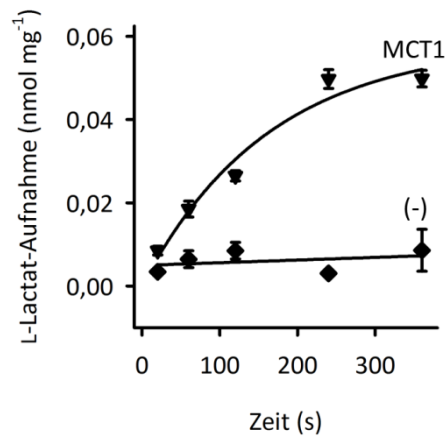
Abbildung 4.7: Wachstum von *P. falciparum* in Abwesenheit von MMV007839, **18** (schwarze Balken) und nach initialer Behandlung mit der  $IC_{90}$ -Konzentration des Inhibitors für eine Stunde (gestreifte Balken) und über Nacht (weiße Balken). Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

### 4.4 Einfluss von MMV007839, **18** auf den MCT1-vermittelten L-Lactat-Transport

Neben der Inhibition von *PfFNT* ist auch der Einfluss von MMV007839 **18** auf den Lactat-Transport der Wirtszelle der Parasiten von großem Interesse. So soll ein *PfFNT*-Inhibitor zwar den plasmodialen Energiemetabolismus beeinträchtigen, nicht jedoch den der Erythrozyten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher zusätzlich die Affinität des Inhibitors zum erythrozytären Lactat-Transporter MCT1 untersucht. Um eine geeignete Substratinkubationszeit zu finden, wurde zunächst der L-Lactat-Transport in MCT1-herstellende Hefezellen untersucht (Abbildung 4.8). Diese zeigten eine wesentlich geringere L-Lactat-Aufnahme als Hefezellen, die *PfFNT* herstellen. Während über MCT1 in einem Zeitraum von 240 s, der Zeit bis zum Erreichen des Aufnahme-Plateaus, nur 0,05 nmol L-Lactat je Milligramm trockener Hefe aufgenommen wurden, konnten Wu *et al.* an *PfFNT*-herstellender Hefe eine etwa vierfach höhere Aufnahme von 0,2 nmol je Milligramm Hefe beobachten.<sup>85</sup> Für die Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes von MMV007839 **18** an MCT1 wurde schließlich eine Substratinkubationszeit von 180 s gewählt. Nach dieser Zeit zeigte die MCT1-herstellende Hefe eine ca. siebenfach höhere L-Lactat-Aufnahme als Hefe, die kein Transportprotein bildet, was für die zuverlässige Detektion einer Hemmung des MCT1-vermittelten L-Lactat-Transportes ausreichend war (Abbildung 4.8).

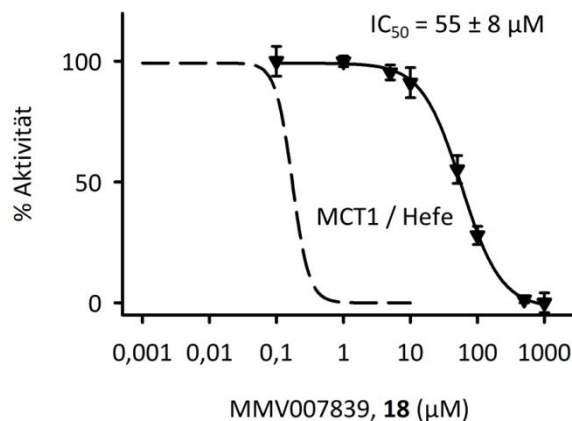


## Ergebnisse



**Abbildung 4.8:** Zeitabhängige L-Lactat-Aufnahme über MCT1 (Dreiecke) und über die Zellmembran von Hefezellen, die kein Transportprotein herstellen (Rauten). Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,08  $\mu$ Ci [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-L-Lactat. pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

Im Aufnahmeassay mit  $^{14}\text{C}$ -radiomarkiertem Substrat vermochte MMV007839 **18** auch den L-Lactat-Transport über den erythrozytären Lactat-Transporter MCT1 konzentrationsabhängig zu hemmen (Abbildung 4.9). Verglichen mit der für die halbmaximale Inhibition von *Pf*FNT benötigten InhibitorKonzentration von 170 nM liegt der  $\text{IC}_{50}$ -Wert für die MCT1-Hemmung mit 55  $\mu\text{M}$  jedoch um über das 300-Fache höher, die Verbindung zeigt also eine vergleichsweise hohe Selektivität für den plasmodialen Lactat-Transporter. Unter Berücksichtigung der großen Unterschiede zwischen FNTs und MCTs hinsichtlich ihrer Proteinstruktur und des Transportmechanismus deutet die trotzdem vorhandene Affinität von MMV007839 **18** zu MCT1 auf eine dem Substrat L-Lactat analoge Bindung an beide Proteine hin.



**Abbildung 4.9:** Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes von MMV007839, **18** für die MCT1-Hemmung in Hefe. Die gestrichelte Linie zeigt zum Vergleich die  $\text{IC}_{50}$ -Kurve von MMV007839, **18** an *Pf*FNT. Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04  $\mu$ Ci [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 180 s (MCT1). pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

## 4.5 Bindungskinetik von MMV007839, 18 an *PfFNT*

### 4.5.1 Bindung

Zur Charakterisierung der Bindungskinetik des *PfFNT*-Inhibitors MMV007839 **18** wurde zunächst dessen zeitabhängige Bindung an den Transporter untersucht. Auch hierfür wurde der Hefe-basierte Aufnahmeassay verwendet, die Bindung des Inhibitors also indirekt über die Hemmung des *PfFNT*-vermittelten L-Lactat-Transportes bestimmt. Dabei wurde die Inkubationszeit der Hefezellsuspension mit MMV007839 **18** variiert, die Konzentration des Inhibitors blieb für jede Bindungskurve konstant. Die zeitabhängige Inhibition von *PfFNT* ist in Abbildung 4.10 dargestellt: Bei einer Inhibitor-Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  wurde eine vollständige *PfFNT*-Hemmung bereits nach 90 Sekunden erreicht, auch niedrigere Inhibitor-Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  und 400 nM führten zu einer vollständigen Hemmung der L-Lactat-Aufnahme nach 4 bzw. 20 Minuten. Entsprechend der unter Abschnitt 4.3 aufgeführten  $\text{IC}_{50}$ -Kurve von MMV007839 **18** an *PfFNT*-herstellender Hefe, wurde für eine Inhibitor-Konzentration von 170 nM nach 20 Minuten, das heißt nach der für die Bestimmung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte standardmäßig verwendeten Inkubationszeit mit dem Inhibitor, eine halbmaximale Inhibition von *PfFNT* erhalten.

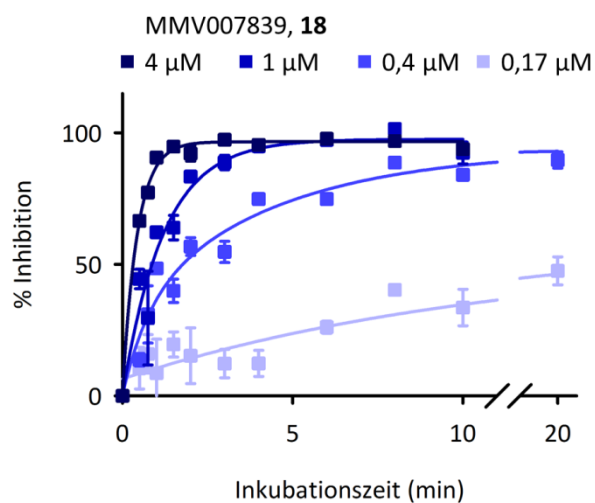


Abbildung 4.10: Zeitabhängige Hemmung des *PfFNT*-vermittelten L-Lactat-Transportes in Hefe durch unterschiedliche Konzentrationen von MMV007839, 18.

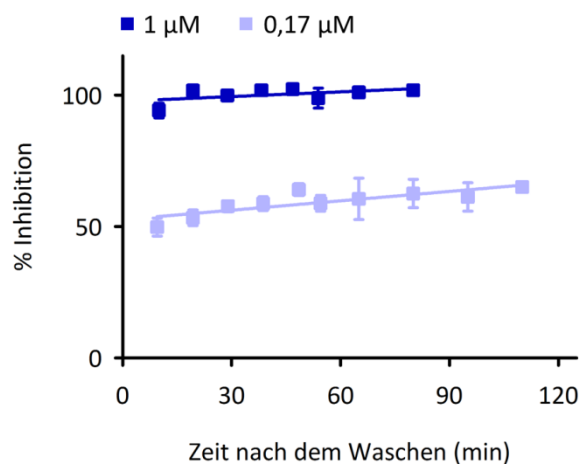
Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04  $\mu\text{Ci}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 30 s. pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

### 4.5.2 Dissoziation

Analog zur Bindung von MMV007839 **18** an *PfFNT* wurde dessen Dissoziation vom Transporter untersucht – über die zeitabhängige Bestimmung des Ausmaßes der Hemmung des L-Lactat-Transportes wurde indirekt auf die Bindung des Inhibitors geschlossen. Hierfür wurde *PfFNT*-herstellende Hefe zunächst für 20 Minuten, also der Zeit, die für die Bestimmung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte verwendet wurde, mit 1  $\mu\text{M}$  und 170 nM MMV007839 **18** inkubiert. Dabei resultierte entsprechend der unter Abschnitt 4.3 aufgeführten  $\text{IC}_{50}$ -Kurve des Inhibitors an

## Ergebnisse

*PffNT* eine vollständige bzw. halbmaximale Hemmung des Transporters (Abbildung 4.11). Anschließend wurde durch mehrmaliges Waschen der Hefe mit Inhibitor-freiem Puffer MMV007839 **18** entfernt und die Hefe zeitabhängig hinsichtlich des Wiedererlangens ihrer Transportfähigkeit für L-Lactat untersucht. Während des Versuches wurde dabei durch die Lagerung der Hefen in Nährstoff-freiem Puffer verhindert, dass diese neues *PffNT*-Protein bilden. Anhand der Hefe mit halbmaximal gehemmter L-Lactat-Leitfähigkeit wird ersichtlich, dass die Funktionalität des *PffNTs* über den Versuchszeitraum von zwei Stunden erhalten blieb (hellblaue Kurve in Abbildung 4.11). Überraschenderweise blieb jedoch auch die Hemmung des Transporters über die gesamte Zeit bestehen, ein Wiedererlangen der L-Lactat-Leitfähigkeit wurde nicht beobachtet. Die Stabilität der Hemmung ist insbesondere in Anbetracht der schnellen Bindung von MMV007839 **18** an *PffNT* bemerkenswert, typischerweise zeigen Hemmstoffe mit schneller Assoziation auch eine schnelle Dissoziation. Diese Ergebnisse deuten auf eine sehr starke, möglicherweise irreversible Bindung von MMV007839 **18** an *PffNT* hin.<sup>106</sup>



**Abbildung 4.11:** Dissoziation des Inhibitors MMV007839, **18** von *PffNT*. Vollständig und halbmaximal gehemmte *PffNT*-herstellende Hefe erlangt auch zwei Stunden nach dem Entfernen des Inhibitors die L-Lactat-Leitfähigkeit nicht zurück.

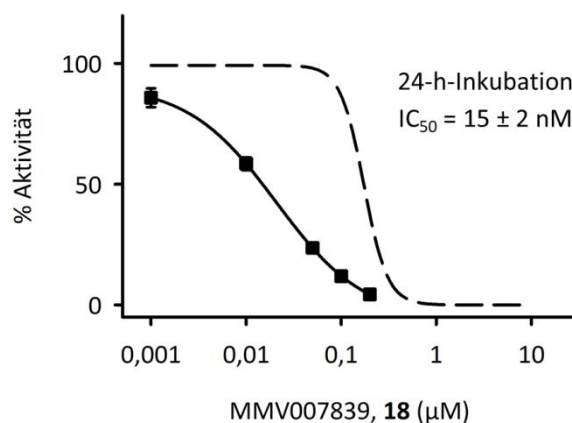
Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04  $\mu\text{Ci}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 30 s. pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

### 4.5.3 Bindung über 24 Stunden

Als irreversibler Inhibitor oder als Inhibitor, der nur sehr langsam vom *Target* dissoziiert, könnte MMV007839 **18** zeitabhängig mit *PffNT* interagieren. Dabei sollte die Verbindung jedoch nicht konzentrationsabhängig ein Gleichgewicht aus freiem Inhibitor und an *PffNT* gebundenem Inhibitor ausbilden, sondern vielmehr unabhängig von der Inhibitorkonzentration im Sinne einer chemischen Reaktion stets zu einer vollständigen Hemmung des Transporters führen, vorausgesetzt die Konzentration des Inhibitors ist höher als die des *Targets*.<sup>106</sup> In diesem Fall sollte bei einer Verlängerung der Inkubationszeit *PffNT*-herstellender Hefe mit MMV007839 **18** eine Abnahme des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes zu beobachten sein. Um eine zeitabhängige Verschiebung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes zu untersuchen, wurde der Inhibitor 24 Stunden vor Beginn des Aufnahmeassays zu wachsenden *PffNT*-Hefekulturen gegeben. Nach sechs Stunden wur-

## Ergebnisse

den die Kulturen bei 4 °C gelagert, um ein weiteres Hefewachstum und die Bildung von neuem *PfFNT* zu unterbinden. Tatsächlich zeigte die so behandelte Hefe eine ca. zehnfache Verringerung des  $IC_{50}$ -Wertes der Hemmung der *PfFNT*-vermittelten L-Lactat-Leitfähigkeit von 170 nM auf 15 nM (Abbildung 4.12). Hefe, welche zur Kontrolle den bei der höchsten verwendeten Inhibitorkonzentration von 200 nM nicht hemmbaren Lactat-Transporter aus *Babesia bovis*, *BbFNT*, herstellte (siehe Abschnitt 4.8.3), zeigte hingegen keine Beeinträchtigung des L-Lactat-Transportes. Somit spricht auch dieses Ergebnis für eine sehr langsame Dissoziation oder eine irreversible Bindung von MMV007839 **18** an *PfFNT*. Hinweise auf eine ebenfalls denkbare kovalente Bindung des Inhibitors im Transportpfad von *PfFNT* konnten in massenspektrometrischen Untersuchungen, welche unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas Tholey am Institut für Experimentelle Medizin der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt wurden, nicht gefunden werden, so dass diese Art der Interaktion von MMV007839 **18** mit dem *Target* als eher unwahrscheinlich erscheint. Nichtsdestotrotz wird an dieser Stelle deutlich, dass für das Aufstellen von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen verschiedener MMV007839-Derivate auf Grundlage von  $IC_{50}$ -Werten eine über alle Versuche konstante Inkubationszeit mit den Inhibitoren von großer Bedeutung ist.



**Abbildung 4.12:** Zeitabhängigkeit des  $IC_{50}$ -Wertes von MMV007839, **18** an *PfFNT* in der Hefe. Bei Verlängerung der Inkubationszeit mit dem Inhibitor auf 24 h sinkt der  $IC_{50}$ -Wert von 170 nM (gestrichelte Linie, beobachtet nach 20 min Inkubationszeit) auf 15 nM.

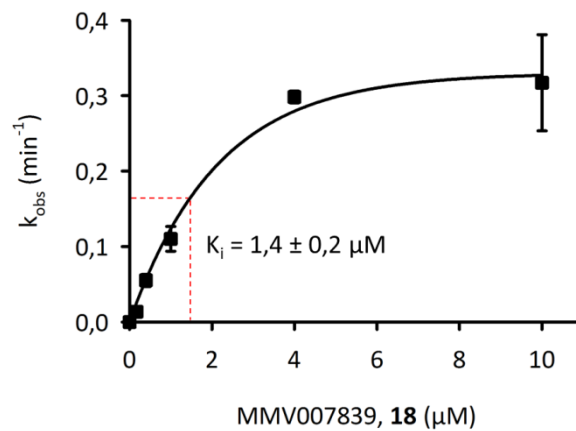
Inkubationszeit Inhibitor: 24 h. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04 µCi [ $^{14}$ C]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 30 s. pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

### 4.5.4 Bestimmung der Inhibitionskonstanten

Durch das Auftragen der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{obs}$  aus der zeitabhängigen Hemmung von *PfFNT* (Abbildung 4.10) gegen die entsprechende Inhibitorkonzentration konnte für MMV007839 **18** eine scheinbare Inhibitionskonstante  $K_i$  ermittelt werden.<sup>106</sup> Diese entspricht in der resultierenden Exponentialfunktion derjenigen Inhibitorkonzentration, bei der der Wert für die Geschwindigkeitskonstante halbmaximal ist und beträgt für MMV007839 **18** 1,4 µM (Abbildung 4.13). Verglichen mit der bereits von Wu *et al.* bestimmten Affinität von L-Lactat an *PfFNT* ( $K_m = 87$  mM) bedeutet dies, dass der im Rahmen

## Ergebnisse

dieser Arbeit identifizierte *Pf*FNT-Inhibitor mit über 60.000-fach höherer Affinität an den Transporter bindet als dessen physiologisches Substrat.<sup>85</sup>



**Abbildung 4.13:** Bestimmung des scheinbaren  $K_i$ -Wertes von MMV007839, 18 an *Pf*FNT aus den in Abbildung 4.10 ermittelten Inhibitionsraten  $k_{obs}$ . Die Geschwindigkeitskonstante für die *Pf*FNT-Hemmung bei einer Inhibitorkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  wurde zusätzlich ermittelt und ist in Abbildung 4.10 nicht gezeigt. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

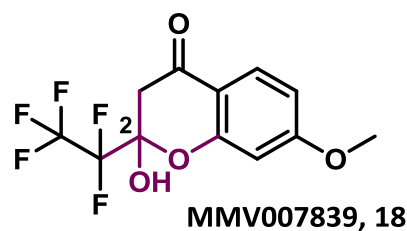
## 4.6 Quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von MMV007839, 18

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es, diejenigen Strukturelemente des *Pf*FNT-Inhibitors MMV007839 **18** zu identifizieren, welche für die Affinität der Verbindung zum plasmodialen Lactat-Transporter sowie für die antiplasmodiale Wirksamkeit *in vitro* verantwortlich sind. Durch systematische Modifikationen in der Molekülstruktur wurden MMV007839-analoga generiert, die anschließend im Hefe-basierten Aufnahmeassay unter Verwendung von  $^{14}\text{C}$ -radiomarkiertem L-Lactat hinsichtlich ihrer Wirksamkeit auf den *Pf*FNT-vermittelten Substrat-Transport untersucht wurden. Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte dieser Verbindungen wurden, wie bereits für MMV007839 **18** und MMV000972 **19** (Abschnitt 4.3), stets unter Verwendung einer Inhibitorinkubationszeit von 15–20 Minuten bestimmt, so dass trotz der Zeitabhängigkeit der  $\text{IC}_{50}$ -Werte eine vergleichende Betrachtung und das Aufstellen quantitativer Struktur-Aktivitäts-Beziehungen möglich war. Die *Pf*FNT-Hemmkurven, denen die nachfolgend gezeigten  $\text{IC}_{50}$ -Werte der MMV007839-Derivate zugrunde liegen, sind in der Abbildung A.1 im Anhang dieser Arbeit dargestellt.

Zusätzlich erfolgte für einige der MMV007839-Analoga, welche in der *Pf*FNT-herstellenden Hefe vielversprechende Resultate zeigten, am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin eine Bestimmung der für die halbmaximale Hemmung des Wachstums von *P. falciparum* Kulturen benötigten Konzentration. Hierbei wurde deutlich, dass, wie bereits für MMV007839 **18** und MMV000972 **19** beobachtet (siehe Abschnitt 4.3), eine Korrelation der Inhibitoraktivitäten am Protein und der Aktivitäten im Parasiten nicht immer möglich ist.

#### 4.6.1 Bedeutung der Hemiketalfunktion

Das Hydroxychromanon-Derivat MMV007839 **18** beinhaltet ein zyklisches Hemiketal, welches aus dem intramolekularen Ringschluss zwischen einer phenolischen Hydroxygruppe und einer Ketofunktion resultiert. In Verbindung **20**, einem 4*H*-Chromenon-Derivat, fehlt dieses Strukturmerkmal aufgrund der dort vorhandenen Doppelbindung, das Grundgerüst des Inhibitors aus der Malaria-Box ist sonst jedoch unverändert (Abbildung 4.14). Trotzdem zeigte **20** keine Aktivität am plasmodialen Lactat-Transporter, was darauf hindeutet, dass die Hemiketalfunktion für die Inhibition des *Pf*FNT-vermittelten Lactat-Transportes unverzichtbar ist. Die durch den zusätzlichen Verlust der Fluoralkylseitenkette bereits vergleichsweise stark modifizierte Verbindung **21**, ein Methylchromanon, bewirkte dementsprechend ebenfalls keine Inhibition von *Pf*FNT (Abbildung 4.14).



**0,17 ± 0,01 μM / *Pf*FNT Hefe**

**0,14 ± 0,01 μM / *P. falciparum* 3D7**

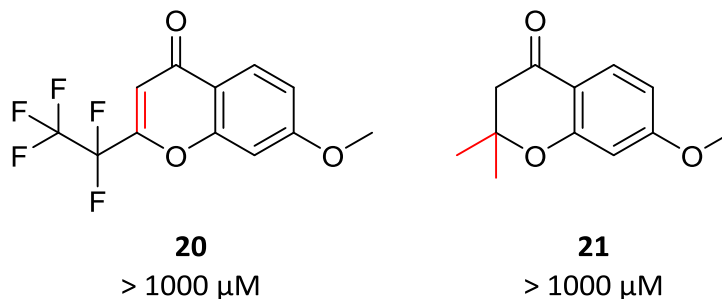


Abbildung 4.14: Bedeutung der Hemiketalfunktion von MMV007839, **18** (violett hervorgehoben) für die Inhibition der *Pf*FNT-vermittelten L-Lactat-Leitfähigkeit: Das Entfernen der Hydroxyfunktion an Position 2 geht mit einem Verlust der inhibitorischen Wirksamkeit einher.

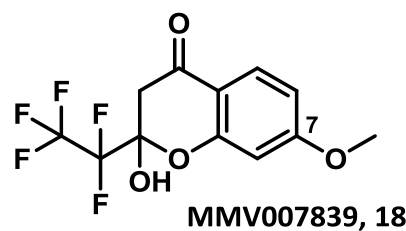
#### 4.6.2 Bedeutung der Position des aromatischen Substituenten

Die Veränderung des aromatischen Substitutionsmusters in MMV007839 **18** hatte, abhängig von der Position des Substituenten, sehr unterschiedliche Konsequenzen für die Wirksamkeit (Abbildung 4.15). So führte der Austausch des Methoxyrestes an Position 7 in MMV007839 **18** gegen eine Methoxyfunktion (Verbindung **22**) bzw. ein Chloratom (Verbindung **23**) an Position 6 zu einem ausgeprägten Aktivitätsverlust um mindestens zwei Größenordnungen. Dabei ist für **22** jedoch zusätzlich die deutliche Verkürzung der Fluoralkylseitenkette zu berücksichtigen, was bereits zu einer signifikanten Abnahme der inhibitorischen Wirkung führt (Abschnitt 4.6.5). Dagegen hat der in **23** erfolgte generelle Austausch der Methoxy-

## Ergebnisse

funktion gegen ein Chloratom auf die Affinität des Inhibitors zum Lactat-Transporter keinen großen Einfluss (Abschnitt 4.6.6), so dass insbesondere für den Aktivitätsverlust dieser Verbindung die veränderte Position des aromatischen Substituenten als Hauptursache angesehen werden kann.

Toleriert wurde hingegen der Austausch der Methoxyfunktion von MMV007839 **18** an Position 7 gegen ein Chloratom an Position 8, wie dies für Verbindung **24** der Fall ist. Der für **24** ermittelte  $IC_{50}$ -Wert für die Inhibition des *Pf*FNT-vermittelten L-Lactat-Transportes liegt mit 260 nM, verglichen mit dem des Inhibitors aus der Malaria-Box ( $IC_{50}$  MMV007839 **18** = 170 nM), nur wenig höher. Möglicherweise ragt der Substituent an Position 8 in Verbindung **24** in einen Freiraum im Protein, der von MMV007839 **18** nicht adressiert wird. Ebenfalls denkbar wäre, dass diese Position aus dem Transporter herausragt und somit für eine Interaktion des Inhibitors mit *Pf*FNT keine Bedeutung hat.



**0,17 ± 0,01 μM / *Pf*FNT Hefe**  
**0,14 ± 0,01 μM / *P. falciparum* 3D7**

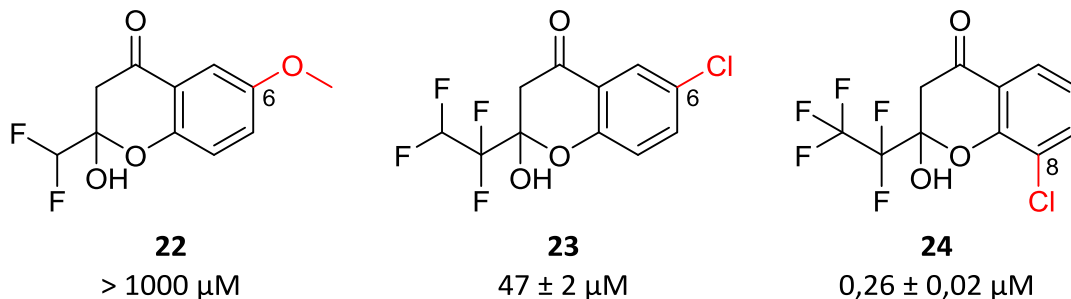


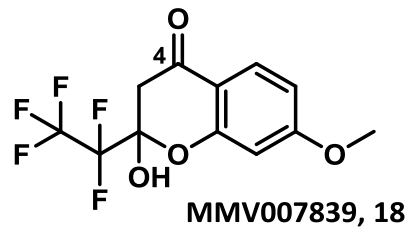
Abbildung 4.15: Bedeutung der Position des aromatischen Substituenten von MMV007839, **18** für die Inhibition des *Pf*FNT-vermittelten L-Lactat-Transportes: Ein Substituent an Position 6 führt im Vergleich zu MMV007839, **18** zu einem deutlichen Aktivitätsverlust, toleriert wird dagegen ein Substituent an Position 8.

### 4.6.3 Bedeutung der Carbonylfunktion

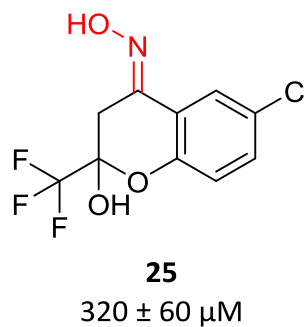
In der in Abbildung 4.16 dargestellten Verbindung **25** ist der Carbonylrest des Hydroxychromanon-Derivates MMV007839 **18** zu einer Oximfunktion verändert. Trotz des für die inhibitorische Wirksamkeit des Inhibitors zusätzlich nachteilig veränderten aromatischen Substitutionsmusters (siehe Abschnitt 4.6.2) sowie der Verkürzung der Fluoralkylseitenkette (siehe Abschnitt 4.6.5) zeigte die Verbindung noch eine geringe Aktivität. So wurde der L-Lactat-Transport in *Pf*FNT-herstellende Hefe bei einer Konzentration von 320 μM halbmaximal gehemmt. Da die Oximfunktion im Vergleich zum Carbonylrest in MMV007839 **18** den sterischen Anspruch des Inhibitors an dieser Position deutlich vergrößert, könnte dies

## Ergebnisse

auf einen möglichen Freiraum in der Transportpore von *Pf*FNT oder das Vorhandensein einer gewissen Flexibilität in diesem Bereich des Proteins hinweisen.



$0,17 \pm 0,01 \mu\text{M}$  / *Pf*FNT Hefe  
 $0,14 \pm 0,01 \mu\text{M}$  / *P. falciparum* 3D7



$320 \pm 60 \mu\text{M}$

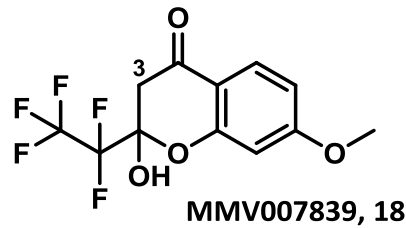
**Abbildung 4.16:** Bedeutung der Carbonylfunktion von MMV007839, 18 für die Inhibition der *Pf*FNT-vermittelten L-Lactat-Leitfähigkeit: Der Austausch des Carbonylrestes gegen eine Oximfunktion hat eine vergleichsweise moderate Auswirkung auf die Aktivität des Inhibitors (siehe Abschnitt 4.6.2 für das zusätzlich veränderte aromatische Substitutionsmuster und Abschnitt 4.6.5 für die Verkürzung der Fluoralkylseitenkette).

### 4.6.4 Bedeutung der Methylenfunktion

Die Methylenfunktion an Position 3 in MMV007839 **18** zeigt aufgrund der negativen induktiven Effekte der benachbarten Sauerstoffatome und des Fluoralkylrestes eine ausgeprägte CH-Acidität (siehe Abschnitt 5.1.1.2). Wird, wie im Falle der Verbindung **26**, ein Methylsubstituent an dieser Position eingefügt, so verringert sich die Aktivität des Inhibitors an *Pf*FNT verglichen mit MMV007839 **18** um drei Größenordnungen (Abbildung 4.17). Da in **26** trotz des zusätzlichen Methylrestes die CH-Acidität des verbleibenden Protons an Position 3 erhalten bleibt (nicht dargestellt), ist davon auszugehen, dass der eingefügte Substituent die Aktivitätsabnahme vorrangig aufgrund seines sterischen Einflusses bedingt – denkbar ist hier beispielsweise eine Kollision der Methylfunktion mit der Innenwand der Transportpore in *Pf*FNT.



## Ergebnisse



$0,17 \pm 0,01 \mu\text{M}$  / *PfFNT* Hefe  
 $0,14 \pm 0,01 \mu\text{M}$  / *P. falciparum* 3D7

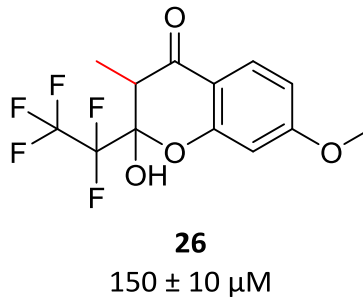


Abbildung 4.17: Bedeutung der Methylenfunktion von MMV007839, 18 für die Inhibition der *PfFNT*-vermittelten L-Lactat-Leitfähigkeit: Das Einfügen einer Methylgruppe an Position 3 bedingt eine Abnahme der inhibitorischen Wirksamkeit um drei Größenordnungen.

### 4.6.5 Bedeutung der Kettenlänge und der Anzahl der Fluoratome des Fluoralkylrestes

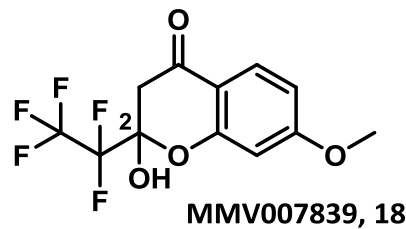
Die unter den Abschnitten 4.6.1 bis 4.6.4 diskutierten strukturellen Modifikationen betrafen vorrangig das Hydroxychromanon-Grundgerüst von MMV007839 **18** und resultierten zu meist in einer deutlichen Abnahme der Aktivität des Inhibitors an *PfFNT* bis hin zum vollständigen Verlust der inhibitorischen Wirksamkeit. Im Folgenden soll daher auf die im Rahmen dieser Arbeit getesteten MMV007839-Analoga mit modifizierter Fluoralkylseitenkette bzw. verändertem aromatischen Substituenten eingegangen werden. Diese Verbindungen zeigten teilweise eine gesteigerte Aktivität, sowohl am Protein, als auch in *P. falciparum*. In Abbildung 4.18 sind diejenigen MMV007839-Strukturvarianten dargestellt, welche hinsichtlich der Anzahl der Fluoratome und der Kettenlänge des Fluoralkylrestes an Position 2 verändert wurden. Dort wird deutlich, dass sowohl die Anzahl der Fluoratome, als auch die Länge der Seitenkette für die Affinität des *PfFNT*-Inhibitors zum Protein von großer Bedeutung sind. So führte der Austausch sämtlicher Fluoratome der Ethyl-Seitenkette gegen Wasserstoffatome in Verbindung **27** zu einem deutlichen Aktivitätsverlust – der  $\text{IC}_{50}$ -Wert liegt mit ca.  $3500 \mu\text{M}$  um vier Größenordnungen über dem von MMV007839 **18** ( $\text{IC}_{50} = 170 \text{ nM}$ ). Auch für Verbindung **28**, die an Position 2 einen Difluormethylrest aufweist, resultierte eine um drei Größenordnungen verminderte Affinität zu *PfFNT*.

Das Trifluormethyl-Analogon **29** von MMV007839 **18** stellt hingegen mit einem für die Inhibition des L-Lactat-Transportes über *PfFNT* ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $1,1 \mu\text{M}$  bereits einen vergleichsweise potenten Inhibitor dar. Der Verlust eines einzelnen Fluoratoms (ausgehend von MMV007839 **18**) zur Tetrafluorethyl-Seitenkette in Verbindung **30** führte zu einer Halbierung

## Ergebnisse

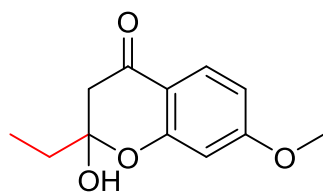
der MMV007839-Aktivität an *Pf*FNT. Überraschenderweise blieb jedoch bei der deutlichen Vergrößerung der Fluoralkylseitenkette zu einem um eine CF<sub>2</sub>-Einheit verlängerten Heptafluorpropylrest (Verbindung **31**) die inhibitorische Wirkung erhalten. So zeigt **31** mit einer für die halbmaximale Inhibition von *Pf*FNT benötigten Konzentration von 250 nM einen ähnlichen IC<sub>50</sub>-Wert wie MMV007839 **18** (IC<sub>50</sub> = 170 nM). Für die halbmaximale Hemmung des *P. falciparum* Wachstums *in vitro* war jedoch die vierfache Konzentration (570 nM) notwendig. Auch das Einfügen eines um zwei CF<sub>2</sub>-Einheiten verlängerten und damit sterisch deutlich anspruchsvolleren Nonafluorbutylrestes (Verbindung **32**) führte nur zu einer vergleichsweise geringen Affinitätsabnahme des Inhibitors zu *Pf*FNT (IC<sub>50</sub> = 4,9 μM).

Hier wird deutlich, dass der Pentafluorethylrest des Inhibitors aus der Malaria-Box hinsichtlich der Affinität zum plasmodialen Lactat-Transporter eine optimale Kettenlänge und eine optimale Anzahl an Fluoratomen aufweist. Insbesondere eine Verlängerung der Seitenkette um eine weitere CF<sub>2</sub>-Einheit wird jedoch, wie anhand der Verbindung **31** gezeigt, toleriert.

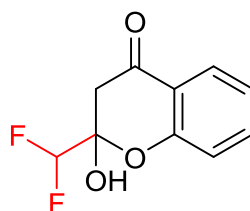


**0,17 ± 0,01 μM / *Pf*FNT Hefe**

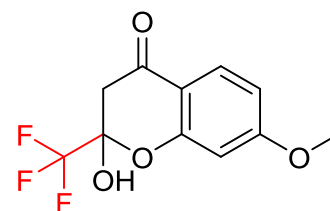
**0,14 ± 0,01 μM / *P. falciparum* 3D7**



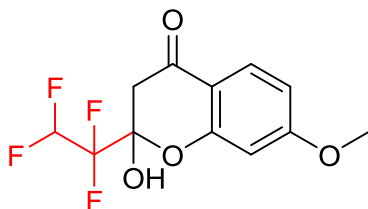
3500 ± 300 μM



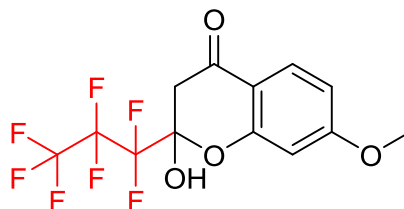
290 ± 30 μM



1,1 ± 0,1 μM

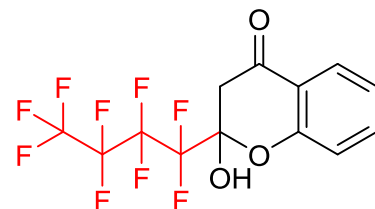


0,30 ± 0,02 μM



0,25 ± 0,02 μM

**0,57 ± 0,10 μM**



4,9 ± 0,2 μM

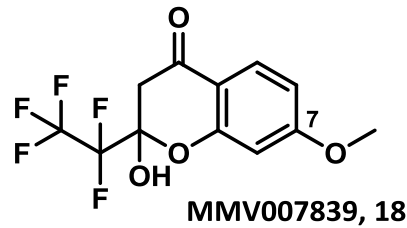
**Abbildung 4.18:** Bedeutung der Kettenlänge und der Anzahl der Fluoratome des Fluoralkylrestes von MMV007839, **18** für die Inhibition von *Pf*FNT (schwarz markierte IC<sub>50</sub>-Werte) und die Hemmung des Parasitenwachstums *in vitro* (rot markierte IC<sub>50</sub>-Werte). Sowohl eine begrenzte Verkürzung als auch eine Verlängerung der Seitenkette werden toleriert. Die perfluorierten Derivate weisen eine höhere Potenz auf.

#### 4.6.6 Bedeutung des sterischen Anspruchs des aromatischen Substituenten

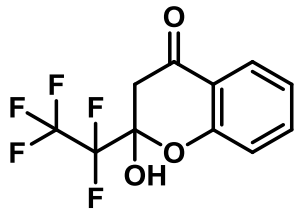
Den größten Spielraum hinsichtlich einer Modifikation im MMV007839-Molekül zeigte schließlich der aromatische Substituent an Position 7 (Abbildung 4.19). Für MMV000972 **19**, welches an dieser Stelle keinen Substituenten trägt, konnte bereits im Zuge der Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte der *Hit*-Substanzen aus der Malaria-Box eine zu MMV007839 **18** vergleichbare Potenz gezeigt werden ( $IC_{50} = 170$  nM, siehe Abschnitt 4.3). In der *P. falciparum* Kultur war MMV000972 **19** mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $1,6 \mu\text{M}$  deutlich weniger aktiv als MMV007839 **18** ( $IC_{50} = 140$  nM), was darauf hindeutet, dass der aromatische Substituent für die Bindung des Inhibitors an *PfFNT* eine untergeordnete Rolle spielt, auf die Wirksamkeit im Parasiten jedoch trotzdem einen beträchtlichen Einfluss haben kann. Ein Austausch der Methoxyfunktion von MMV007839 **18** gegen ein Chloratom (Verbindung **33**) führte erstmals zu einem Inhibitor mit höherer Affinität zum plasmodialen Lactat-Transporter: Die für die halbmaximale Hemmung der L-Lactat-Aufnahme über *PfFNT* benötigte Konzentration von **33** wurde zu  $120$  nM bestimmt. Hingegen ist auch hier der  $IC_{50}$ -Wert der Hemmung des Parasitenwachstums *in vitro* mit  $370$  nM höher als der von MMV007839 **18**. Im Gegensatz dazu führte das Einfügen des bereits deutlich größeren Ethoxy-Restes an Position 7 in Verbindung **34** zu einem Inhibitor, der zwar eine etwas geringere Affinität zu *PfFNT* im Aufnahmeassay zeigte ( $IC_{50} = 240$  nM), die halbmaximale inhibitorische Konzentration in der Parasitenkultur liegt jedoch mit  $50$  nM gegenüber MMV007839 **18** ( $IC_{50} = 140$  nM) um ein Dreifaches niedriger. Damit stellt **34** den bisher potentesten antiplasmodial wirksamen *PfFNT*-Inhibitor dar, welcher im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurde. Auch das an Position 7 substituierte Isopropoxy-Analogon zu MMV007839 **18** (Verbindung **35**) zeigte eine leicht gesteigerte Potenz der Inhibition des *P. falciparum* Wachstums ( $IC_{50} = 100$  nM). Sogar das Einfügen eines gegenüber dem Methoxyrest von MMV007839 **18** besonders voluminösen Benzyloxy-Substituenten (Verbindung **36**) führte nicht zu einem Verlust der nanomolaren Aktivität des Inhibitors am plasmodialen Lactat-Transporter. So wurde der  $IC_{50}$ -Wert von **36** für die Hemmung der L-Lactat-Aufnahme an *PfFNT*-herstellender Hefe zu  $890$  nM bestimmt, was lediglich einer Affinitätsabnahme um ca. das Fünffache entspricht.

Daraus wird ersichtlich, dass für das Aufrechterhalten der inhibitorischen Wirkung von MMV007839 **18** neben dem Verlust des aromatischen Substituenten an Position 7 und dessen Austausch gegen ein Chloratom auch eine deutliche Vergrößerung dieses Restes toleriert wird. Angesichts des vergleichsweise schmalen Transportpfades von *PfFNT* (siehe Abschnitte 1.2.2 und 1.2.4) liegt an dieser Stelle der Schluss nahe, dass der aromatische Substituent aus dem Transporter hinausragt und nicht an der Bindung des Inhibitors am Protein teilnimmt. Nichtsdestotrotz wurde hier mit Verbindung **34** ein Inhibitor gefunden, der in der Parasitenkultur eine signifikant höhere Wirksamkeit zeigt, als MMV007839 **18**.

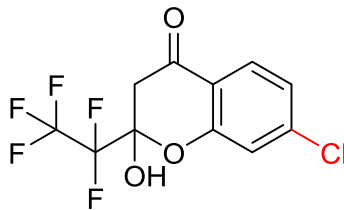
## Ergebnisse



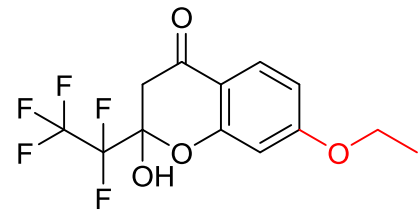
$0,17 \pm 0,01 \mu\text{M}$  / *Pf*FNT Hefe  
 $0,14 \pm 0,01 \mu\text{M}$  / *P. falciparum* 3D7



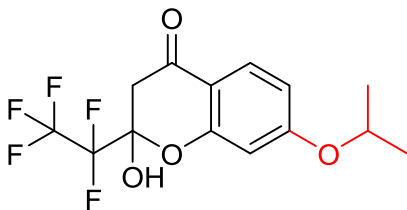
MMV000972, 19  
 $0,17 \pm 0,02 \mu\text{M}$   
 $1,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$



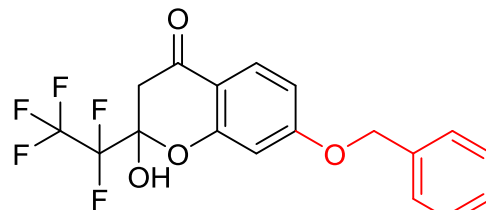
33  
 $0,12 \pm 0,01 \mu\text{M}$   
 $0,37 \pm 0,05 \mu\text{M}$



34  
 $0,24 \pm 0,01 \mu\text{M}$   
 $0,05 \pm 0,01 \mu\text{M}$



35  
 $0,40 \pm 0,01 \mu\text{M}$   
 $0,10 \pm 0,01 \mu\text{M}$



36  
 $0,89 \pm 0,03 \mu\text{M}$

Abbildung 4.19: Bedeutung des sterischen Anspruchs des aromatischen Substituenten an Position 7 von MMV007839, 18 für die Inhibition des L-Lactat-Transportes über *Pf*FNT (schwarz markierte IC<sub>50</sub>-Werte) und die Hemmung des Parasitenwachstums *in vitro* (rot markierte IC<sub>50</sub>-Werte). Die Affinität zum Protein bleibt bei Verlust des Substituenten, dessen Austausch gegen ein Chloratom sowie bei Vergrößerung bis hin zu einem Benzyloxy-Rest erhalten. Die Wirksamkeit an *P. falciparum* Parasiten ist teilweise erhöht.

## 4.7 Aufklärung des Pharmakophors von MMV007839, 18

### 4.7.1 Gleichgewicht zwischen Hemiketal und vinyloger Säure

Wie bereits unter Abschnitt 4.2 erwähnt, stellt der *Pf*FNT-Inhibitor MMV007839 **18** ein zyklisches Hemiketal dar. Dieses entsteht aus der intramolekularen nucleophilen Addition der phenolischen Hydroxyfunktion an eine Ketofunktion. Im resultierenden Hydroxychromanon-Grundgerüst von MMV007839 **18** entspricht der Sauerstoff an Position 1 dem der vormaligen phenolischen Hydroxygruppe, aus der Ketofunktion geht die an Position 2 gebundene Hydroxyfunktion hervor (siehe Abbildung 4.20 A und Abschnitt 5.1.1.1). Während die intermolekulare Bildung von Hemiketalen (wie auch die intermolekulare Bildung von Hemiacetalen) aus zwei einzelnen Molekülen, einem Alkohol und einer Carbonyl-

verbindung, aufgrund von Entropieverlusten nur selten stattfindet, ist die intramolekulare Reaktion zu fünf- und sechsgliedrigen Hemiketalen (und Hemiacetalen) häufig begünstigt.<sup>107,108</sup> In Lösung liegen diese zyklischen Hemiketale jedoch nicht zwangsläufig ausschließlich in der ringgeschlossenen Form vor, sondern stehen in einem tautomeren Gleichgewicht mit der entsprechenden offenkettigen Form, bei der Alkohol und Carbonylfunktion frei vorliegen. Besonders intensiv wurde dieser Zusammenhang für Monosaccharide, insbesondere Glucose, in wässriger Lösung untersucht. D-Glucose, eine Aldose, bildet infolge der intramolekularen Addition einer Hydroxygruppe an eine Aldehydfunktion überwiegend zwei zueinander diastereomere sechsgliedrige zyklische Hemiacetale: die  $\alpha$ -D-Glucopyranose und die  $\beta$ -D-Glucopyranose. In wässriger Lösung kommt es zu einem ständigen Öffnen und Schließen des Ringes, dabei liegt jedoch nur jeweils ein sehr geringer Anteil von 0,002 % der D-Glucose in der offenen Carbonylform vor. Besonders deutlich wird dieser Effekt, wenn nur jeweils eines der Diastereomere in Wasser gelöst wird: Durch das beständige Öffnen und Schließen des zyklischen Hemiacetals kommt es über das offenkettige Aldehyd der D-Glucose zu einer zeitabhängigen Umwandlung in das jeweils andere Diastereomer, bis sich schließlich ein charakteristisches Gleichgewicht aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Form einstellt. Dieser Effekt, der beispielsweise über die Änderung des Drehwinkels der Ausgangslösung verfolgt werden kann, wird als Mutarotation bezeichnet.<sup>108</sup>

Auch für MMV007839-ähnliche 2-Hydroxychromanone mit Fluoralkylseitenkette an Position 2 wurde eine Lösungsmittel-abhängige Ringöffnung bereits beschrieben: So beobachteten SOSNOVSKIKH *et al.*, dass diese Verbindungen in deuteriertem Chloroform als Gemisch aus zyklischem Hemiketal und einem offenkettigen Tautomer vorliegen.<sup>109</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein ähnliches Verhalten auch für den PffNT-Inhibitor MMV007839 **18** gefunden. In Abbildung 4.20 A sind die beiden Tautomere des Inhibitors dargestellt, deren Signale in CDCl<sub>3</sub> im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum zu identifizieren waren: das zyklische Hemiketal **18** und eine ringoffene Form **18a**. Die in Abbildung 4.20 A für die offenkettige Form **18a** in Klammern gezeigte Bezifferung der Atome orientiert sich aus Gründen der Übersichtlichkeit ausschließlich an der ringgeschlossenen Hemiketalform. Auffällig ist, dass die Hemiketal-bildende Ketofunktion in der ringoffenen Form **18a** nicht als solche vorliegt, sondern zusammen mit der  $\beta$ -ständigen Carbonylfunktion an Position 4 zur vinylogenen Carbonsäure (berechneter pK<sub>S</sub>-Wert: 5,0) tautomerisiert (siehe auch Abschnitt 5.1.2.2). Besonders deutlich wird dies anhand der Signale der Position 3 im <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC-Spektrum, welches unter Abbildung 4.20 B dargestellt ist. Das entsprechende Kohlenstoffatom der Methylengruppe im zyklischen Hemiketal trägt zwei Protonen, deren Signale im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum ein AB-System bilden (Abbildung 4.20 C, 3.04 ppm). In der vinylogenen Säure **18a** findet sich hier hingegen ein einzelnes Proton, welches im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum als vergleichsweise stark tieffeldverschobenes Singulett bei 6.59 ppm erkennbar ist. Ferner lassen sich für die Säure **18a** im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum das charakteristisch verbreiterte Singulett der Hydroxyfunktion der vinylogenen Carbonsäure und das Singulett der phenolischen Hydroxygruppe identifizieren. Aus den Integralverhältnissen im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum in Abbildung 4.20 C konnte ermittelt werden, dass MMV007839 **18** in CDCl<sub>3</sub> zu ca. 65 % als zyklisches Hemiketal vorliegt und zu ca. 35 % als ringoffene vinyloge Säure **18a**. Auch für die Verbindungen **31** und **36** wurde im Rahmen dieser Arbeit die Ausbildung eines Gleichgewichtes zwischen Hemiketal und Carbonsäure in CDCl<sub>3</sub> beobachtet (nicht dargestellt).

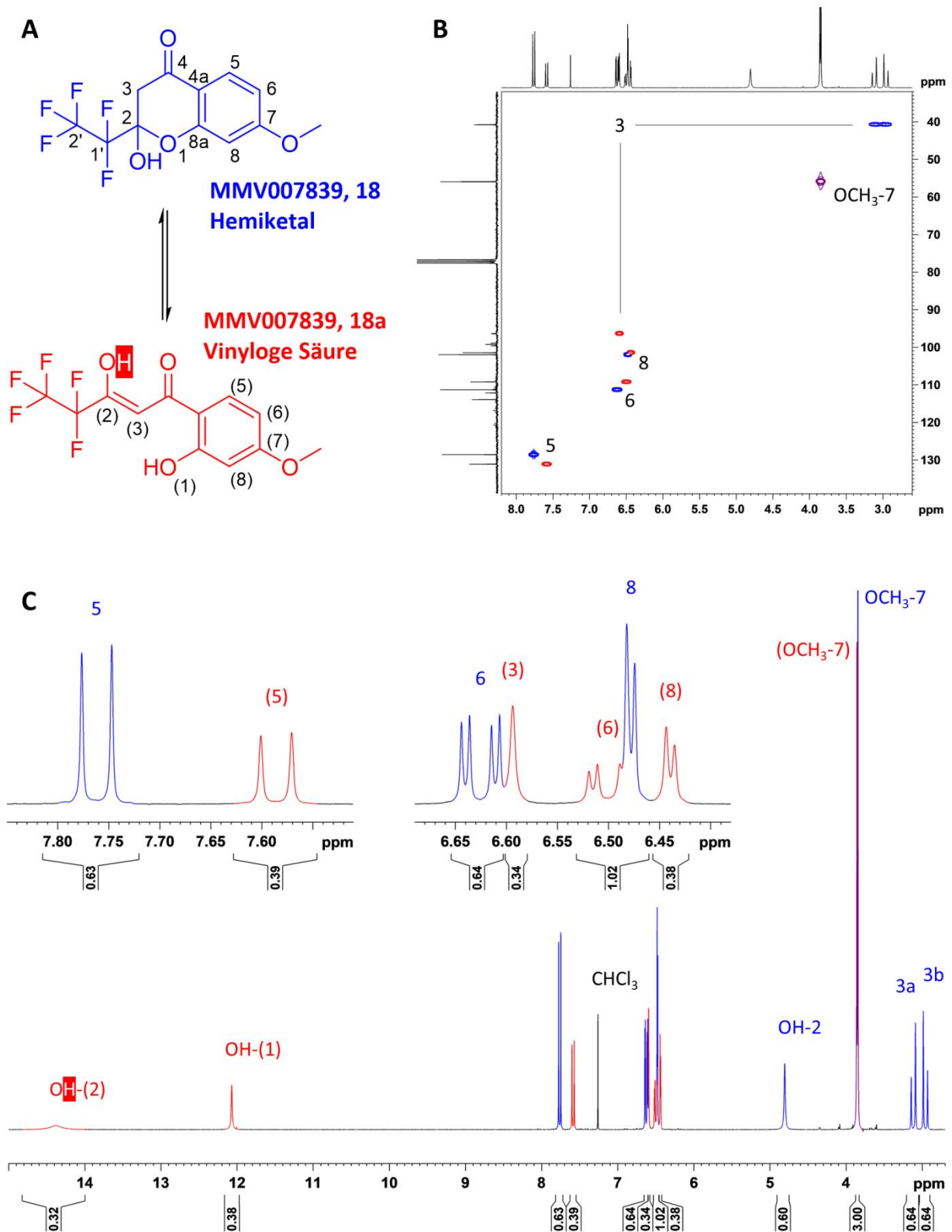


Abbildung 4.20: Ringöffnung von MMV007839, 18 in CDCl<sub>3</sub>: (A) Darstellung beider in CDCl<sub>3</sub> im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum beobachteten Tautomere: die zyklische Hemiketalform 18 (blau) und die vinyloge Säure 18a (rot, acides Proton invers dargestellt). Die Bezifferung von 18a orientiert sich an der ringgeschlossenen Verbindung. (B) <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-HSQC-Spektrum von MMV007839, 18 in CDCl<sub>3</sub>: Das Kohlenstoffatom an Position 3 trägt im Hemiketal zwei Protonen, in der vinylogen Säure dagegen nur ein Proton mit einem stark tieffeldverschoben Signal. (C) <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von MMV007839, 18 in CDCl<sub>3</sub>. Hemiketal (blaue Signale) und vinyloge Säure (rote Signale) liegen in etwa im Verhältnis von 65 % zu 35 % vor.

#### 4.7.2 Die offenkettige vinyloge Carbonsäure als aktive Form von MMV007839, **18**

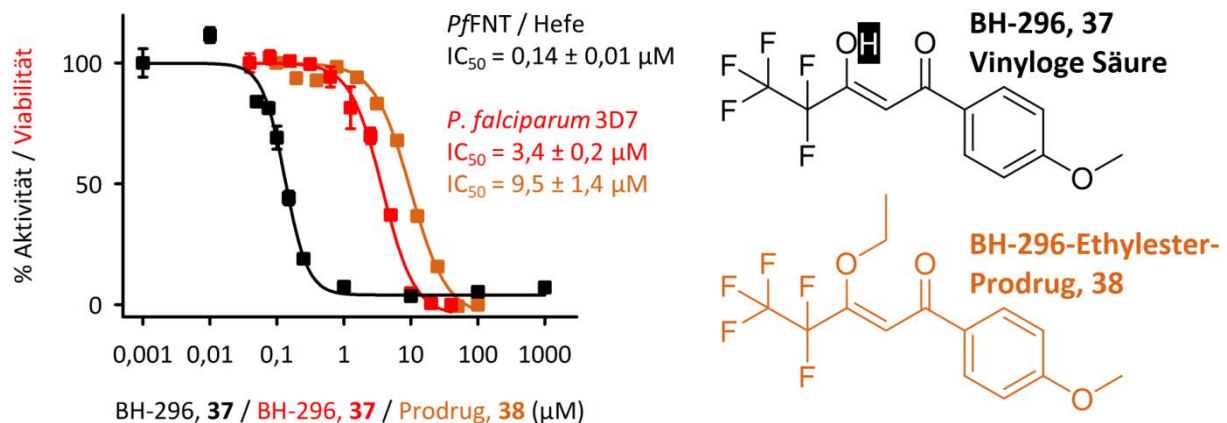
Unter Berücksichtigung des vergleichsweise engen Transportpfades des plasmodialen Lactat-Transporters und dessen Transportmechanismus – also die elektrostatische Anziehung eines Lactat-Anions, dessen Protonierung durch das Bulkwasser und die abschließende Passage der neutralen Milchsäure über die lipophilen Engstellen – erscheint es wahrscheinlich, dass das offenkettige Tautomer von MMV007839 **18** die aktive Form des PfFNT-Inhibitors darstellt. In dieser Form entspräche die Seitenkette aus Fluoralkylrest und vinyloger Carbonsäure hinsichtlich der Größe und der Ladung in etwa zwei aufeinanderfolgenden Lactat-Molekülen, einem in Form der neutralen Milchsäure (Fluoralkylrest) und einem in der geladenen, anionischen Form (deprotonierte vinyloge Carbonsäure). In diesem Fall könnte MMV007839 **18** möglicherweise, ähnlich wie das physiologische Substrat, mit dem Transporter interagieren und dabei gleichzeitig im lipophilen Transportpfad und im polaren, für die Anziehung des Lactates verantwortlichen, Bereich des Proteins binden. Um die offenkettige Form von MMV007839 **18** als aktiven Inhibitor zu bestätigen, wurde mit BH-296 **37** ein MMV007839-Analogon synthetisiert, welches keine phenolische Hydroxyfunktion aufweist und damit nicht in der Lage ist, in die Hemiketalform zu zyklisieren (Abbildung 4.21). Wie die offenkettige Form von MMV007839 **18** liegt auch BH-296 **37** in den im Rahmen der NMR-spektroskopischen Untersuchungen verwendeten deuterierten organischen Lösungsmitteln in Form der vinylogen Carbonsäure vor (berechneter  $pK_S$ -Wert: 5,1; siehe auch Abschnitt 5.1.2.3).

In Analogie zur *Hit*-Verbindung aus der Malaria-Box stellt auch BH-296 **37** einen potenten Inhibitor des PfFNT-vermittelten L-Lactat-Transportes dar (Abbildung 4.21, schwarze Kurve) – der  $IC_{50}$ -Wert liegt mit 140 nM leicht unter dem von MMV007839 **18** ( $IC_{50} = 170$  nM). Dies bestätigt, dass die offenkettige vinyloge Carbonsäure (siehe Abbildung 4.20 A, Verbindung **18a** unter Abschnitt 4.7.1) die aktive Form von MMV007839 **18** darstellt. Die für die halbmaximale Hemmung des Parasitenwachstums *in vitro* bestimmte Konzentration von BH-296 **37** (Abbildung 4.21, rote Kurve) ist mit 3,4  $\mu$ M jedoch 24-fach höher als die von MMV007839 **18** ( $IC_{50} = 140$  nM). Dies liegt möglicherweise in einer verringerten Absorption von BH-296 **37** durch die intraerythrozytär proliferierenden Plasmodien begründet – da diese Verbindung als dauerhaft vorliegende vinyloge Carbonsäure, verglichen mit der lipophilen zyklischen Hemiketalform von MMV007839 **18**, eine deutlich erhöhte Polarität aufweist, könnte der Übertritt über die lipophilen Membranen hin zu *P. falciparum* erschwert sein. In diesem Kontext kann daher die zyklische Hemiketalform von MMV007839 **18** als „internes Prodrug“ angesehen werden, welches den Übertritt der Verbindung über die aufeinanderfolgenden Membranen erleichtert. Das Hemiketal liegt dabei wie auch beispielsweise D-Glucose (siehe Abschnitt 4.7.1) in einem Gleichgewicht mit der offenkettigen Form vor, welche als vinyloge Carbonsäure mit hoher Affinität an PfFNT bindet. Da die offenkettige Verbindung hierbei aus dem Gleichgewicht entfernt wird, erfolgt fortwährend deren Nachbildung aus der Hemiketalform, so dass eine Anreicherung der Wirkform von MMV007839 **18** am plasmodialen Lactat-Transporter stattfindet.

Um eine gesteigerte Permeabilität von BH-296 **37** über die lipophilen Membranen zu erreichen, wurde Verbindung **38**, ein Ethylester der vinylogen Carbonsäure, synthetisiert. Dieser

## Ergebnisse

Inhibitor erwies sich jedoch in der Parasitenkultur als nicht wirksamer im Vergleich zur freien Carbonsäure – der  $IC_{50}$ -Wert liegt mit  $9,5 \mu\text{M}$  noch einmal um ca. ein Dreifaches höher (Abbildung 4.21, orange Kurve). Möglicherweise erfolgte hier die Aktivierung des Ester-Prodrugs bereits, bevor die Verbindung *Pf*FNT erreichte, beispielsweise durch Esterasen in den Erythrozyten, oder der Ester war für eine ausreichende Freisetzung des aktiven BH-296 **37** zu stabil. Dies verdeutlicht einmal mehr den Vorteil des „internen Prodrugs“ von MMV007839 **18**: Hier liegt die aktive Form als Teil eines Gleichgewichtes unabhängig von enzymatischen Aktivitäten in Parasiten und Wirtszellen vor, zudem kann die aktive, offenkettige Form jederzeit in die lipophile Hemiketalform zyklisieren, die Aktivierung ist demnach reversibel.



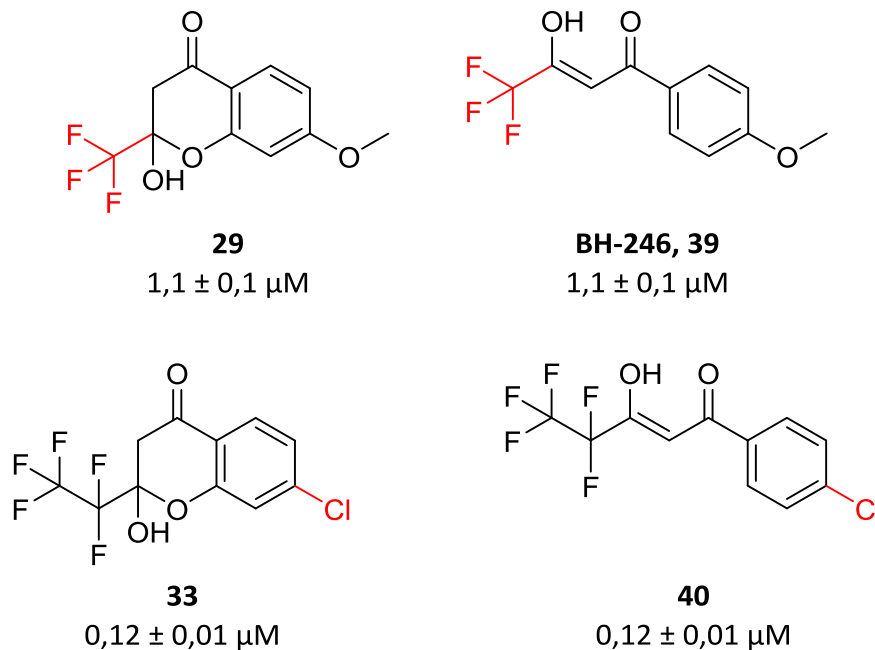
**Abbildung 4.21:** Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte von BH-296, **37** (schwarze Struktur, acides Proton invers dargestellt) für die *Pf*FNT-Hemmung in Hefe (schwarz) und die Viabilität von *P. falciparum* Parasiten (rot) sowie die Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes des BH-296-Ethylester-Prodrugs, **38** (orange) für die Viabilität von *P. falciparum* Parasiten.

Hefe: Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat +  $0,04 \mu\text{Ci}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 30 s. pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

Um die offenkettige vinylloge Carbonsäure des *Pf*FNT-Inhibitors zweifelsfrei als die aktive Form zu bestätigen, wurden zwei weitere Verbindungen synthetisiert, denen zwar eine phenolische Hydroxyfunktion fehlt, die ansonsten jedoch strukturell identisch zu bereits vorhandenen Verbindungen sind (Abbildung 4.22). So wurde mit Verbindung BH-246 **39** eine permanent offenkettig vorliegende Variante des Trifluormethyl-Analogons **29** (Abschnitt 4.6.5) erzeugt, die mit  $1,1 \mu\text{M}$  einen identischen  $IC_{50}$ -Wert der Inhibition der L-Lactat-Aufnahme über *Pf*FNT zeigte. In ähnlicher Weise resultierte für die dauerhaft als vinylloge Carbonsäure vorliegende Form des bislang höchstaktiven *Pf*FNT-Inhibitors **33** (Abschnitt 4.6.6) ein entsprechender  $IC_{50}$ -Wert der *Pf*FNT-Hemmung von  $120 \text{ nM}$ . Hier wird erneut deutlich, dass sich die Hemiketal-bildenden Hemmstoffe hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirksamkeit in der Hefe nicht von ihren offenkettigen Pendanten unterscheiden lassen: Die Wirkform ist zweifelsfrei die vinylloge Carbonsäure. Zudem wird an dieser Stelle die Bedeutung der phenolischen Hydroxyfunktion ersichtlich: Da die  $IC_{50}$ -Werte der untersuchten Hemiketal-Carbonsäure-Paare im Hefe-basierten Testsystem nahezu identisch sind, erscheint sowohl eine Beteiligung der Hydroxyfunktion an der Bindung des Inhibitors an das Protein als auch eine sterische Kollision dieser Funktion mit der Innenwand des Transporters



als unwahrscheinlich. Für die Wirksamkeit von MMV007839 **18** in den Parasiten ist sie jedoch aufgrund der Beteiligung an der Zyklisierung zum „internen Hemiketal-Prodrug“ unerlässlich.



**Abbildung 4.22:** Bestätigung der offenkettigen vinylogenen Carbonsäure als aktive Form des *Pf*FNT-Inhibitors: Die permanent offenkettig vorliegenden Analoga von Verbindung **29** (siehe Abschnitt 4.6.5) und Verbindung **33** (siehe Abschnitt 4.6.6), BH-246, **39** bzw. Verbindung **40**, zeigen im Hefe-basierten Aufnahmeassay  $IC_{50}$ -Werte, die zu denen der entsprechenden Hemiketal-bildenden Inhibitoren identisch sind.

### 4.7.3 Identifizierung der vinylogenen Fluoralkylcarbonsäure als Pharmakophor

Wie unter Abschnitt 4.6.6 gezeigt, ist das Vorhandensein eines aromatischen Substituenten für die hohe Affinität des *Pf*FNT-Inhibitors MMV007839 **18** zum Protein nicht ausschlaggebend. Auch das Entfernen der phenolischen Hydroxyfunktion bedingt keinen Aktivitätsverlust (Abschnitt 4.7.2). Daher wurde schließlich, ausgehend von der offenkettigen Form des Inhibitors (siehe Abbildung 4.20 A, Verbindung **18a** unter Abschnitt 4.7.1), der gesamte aromatische Substituent entfernt, so dass mit Verbindung **41** ein kleines Molekül resultierte, welches lediglich sechs Kohlenstoffatome beinhaltet (Abbildung 4.23). Wie auch die offenkettige Form von MMV007839 **18** und BH-296 **37**, tautomerisiert **41** in die Enolform (berechneter  $pK_S$ -Wert: 4,9) und repräsentiert damit die vinyloge Fluoralkylcarbonsäure-Seitenkette der bereits getesteten *Pf*FNT-Inhibitoren.

Trotz der geringen Molekülgröße und der damit verbundenen Limitation hinsichtlich einer Interaktion zwischen Wirkstoff und Protein und einer deutlich verringerten Möglichkeit der Abschirmung der Bindungsstelle gegen das Lösungsmittel in Gegenwart eines L-Lactat-Gradienten von 1 mM, zeigte Verbindung **41** mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 1,9 µM eine bemerkenswert hohe Potenz in der Inhibition des *Pf*FNT-vermittelten Substrat-Transportes (Abbildung 4.23). Aufgrund der hohen Affinität von Verbindung **41** zum Lactat-Transporter, kann die vinyloge Fluoralkylcarbonsäure-Seitenkette als Pharmakophor des *Pf*FNT-Inhibitors MMV007839 **18** angesehen werden. Auch **41** zeigt mit seinem Hexan-Grundgerüst die bereits in Abschnitt

## Ergebnisse

4.7.2 erwähnte strukturelle Ähnlichkeit zu zwei aufeinanderfolgenden Molekülen des jeweils drei Kohlenstoffatome umfassenden physiologischen Substrates L-Lactat: eines in Form der neutralen Milchsäure und eines als negativ geladenes Lactat-Anion.

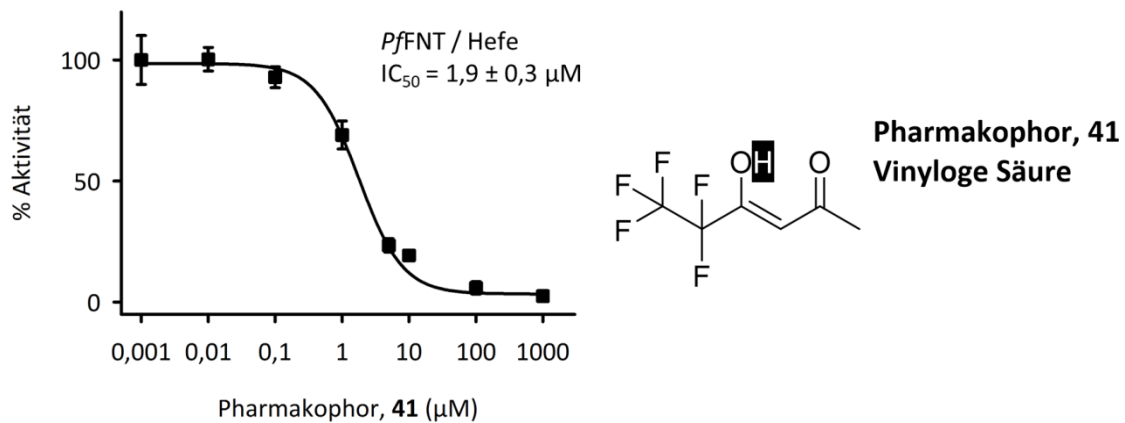


Abbildung 4.23: Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes des Pharmakophors, 41 (acides Proton invers dargestellt) für die *PfFNT*-Hemmung in Hefe.

Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04 μCi [1-<sup>14</sup>C]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 30 s. pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

### 4.7.4 Bedeutung der Fluoratome des Pharmakophors für die Affinität zu *PfFNT*

Nimmt man für den Fluoralkylrest des Pharmakophors **41** eine Imitation des neutralen, protonierten Substrates (Milchsäure) an, so sollte dieser sehr lipophile Teil des Inhibitors im Sinne des Transportmechanismus von *PfFNT* (siehe Abschnitt 1.2.3) im Bereich der lipophilen Engstellen binden, wohingegen der hydrophilere Bereich der vinyllogenen Carbonsäure möglicherweise in der Lage ist, mit positiv geladenen Aminosäuren im Poreneingang zu interagieren. Hierfür spricht auch die unter Abschnitt 4.6.5 beschriebene Variabilität des Fluoralkylrestes: Sowohl eine Verkürzung als auch eine Verlängerung der Kette wird in begrenztem Maße toleriert – die Länge des Fluoralkylrestes könnte demnach entlang des Verlaufes des Transportpfades variiert werden.

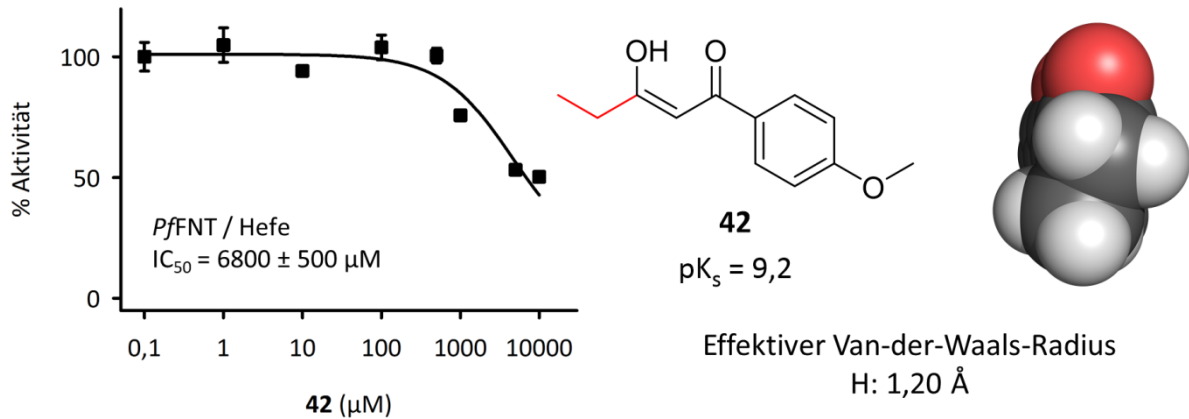
Fluor, das Element mit der höchsten Elektronegativität, ist in Arzneistoffen heutzutage weit verbreitet. Die Kohlenstoff-Fluor-Bindung ist eine der stärksten bekannten Bindungen überhaupt und dadurch von hoher metabolischer Stabilität. Häufig werden daher in Wirkstoffen Wasserstoffatome durch Fluoratome substituiert, um eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen den Abbau durch Enzyme wie Cytochrom P450 zu erreichen. Auch eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit über die Erhöhung der Lipophilie durch das Einfügen von Fluoratomen ist ein mögliches Ziel. Daneben besteht zusätzlich die Möglichkeit einer direkten Beteiligung der Fluoratome an der Interaktion mit dem *Target*, was in einer Erhöhung der Affinität des Arzneistoffs zum Protein resultiert.<sup>110–112</sup> Unter Abschnitt 4.6.5 wurde verdeutlicht, dass die jeweils perfluorierten MMV007839-Derivate hinsichtlich der Hemmung von *PfFNT* eine deutlich höhere Potenz aufweisen, als die entsprechenden Analoga, bei denen Fluoratome gegen Wasserstoffatome ausgetauscht sind. Da der enzymatische Abbau und die Bioverfügbarkeit

## Ergebnisse

im Rahmen des Hefe-basierten Aufnahmeassays mit  $^{14}\text{C}$ -radiomarkierten Substraten keine große Rolle spielen, erscheint es daher wahrscheinlich, dass die Fluoratome direkt für die Affinität von MMV007839 **18** zum Lactat-Transporter mitverantwortlich sind. Daneben ist jedoch zusätzlich ein indirekter Einfluss auf die Wirksamkeit zu beachten: Aufgrund der hohen Elektronegativität der Fluoratome und den damit verbundenen negativen induktiven Effekten, steigt die Acidität der benachbarten vinylogenen Carbonsäurefunktion, was die Wahrscheinlichkeit der Interaktion des Pharmakophors mit der Bindestelle für das Lactat-Anion erhöhen könnte. Um die Bedeutung der Fluoratome für die Affinität des Pharmakophors zu *PfFNT* genauer zu untersuchen, wurden weitere MMV007839-analoge Verbindungen synthetisiert, die keine phenolische Hydroxyfunktion aufweisen und somit ausschließlich in der Form der offenkettigen vinylogenen Carbonsäure vorliegen. Zudem wurde die untersuchte Fluoralkylkette auf eine Trifluormethylfunktion reduziert.

Um auszuschließen, dass dem deutlichen Anstieg des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes der nicht-fluorierten Verbindung **27** ( $\text{IC}_{50} = 3500 \mu\text{M}$ , siehe Abschnitt 4.6.5) gegenüber MMV007839 **18** ( $\text{IC}_{50} = 170 \text{ nM}$ ) lediglich eine veränderte Entstehung der offenkettigen Verbindung aus dem Hemiketal zugrunde liegt, wurde mit Verbindung **42** zunächst die permanent offenkettige Variante von **27** hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirksamkeit gegenüber *PfFNT* untersucht (Abbildung 4.24). In diesem Zusammenhang kann **42** als eine dem Inhibitor BH-296 **37** analoge Verbindung angesehen werden, die durch den Austausch sämtlicher Fluoratome gegen Wasserstoffatome resultiert. Wie bereits die entsprechende Hemiketalform **27**, zeigte auch Verbindung **42** eine deutliche Verschiebung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes der *PfFNT*-Hemmung auf  $6800 \mu\text{M}$ . Sie weist damit eine fast 50.000-fach schwächere Wirksamkeit als das perfluorierte Analogon BH-296 **37** ( $\text{IC}_{50} = 140 \text{ nM}$ ) auf. Dem gegenüber steht eine vergleichsweise moderate Abnahme der Lipophilie und der Größe des Alkylrestes in **42** gegenüber BH-296 **37** (effektiver Van-der-Waals-Radius: Wasserstoff:  $1,20 \text{ \AA}$ , Fluor:  $1,47 \text{ \AA}$ ).<sup>113,114</sup> Der für **42** berechnete  $\text{pK}_\text{S}$ -Wert von 9,2 liegt jedoch mehr als vier Einheiten über dem von BH-296 **37** (berechneter  $\text{pK}_\text{S} = 5,1$ ) – während also bei der perfluorierten Variante sowohl in Gegenwart eines zytosolischen pH-Wertes der Hefe von ca. 7,0 als auch im verwendeten pH-Puffer 6,8 die anionische, deprotonierte Form deutlich überwiegt, liegt Verbindung **42** nahezu vollständig protoniert vor.<sup>115,116</sup> Hier könnte demnach der Verlust der negativen Ladung in der Seitenkette für den ausgeprägten Affinitätsverlust zu *PfFNT* verantwortlich sein.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.24:** Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes der Verbindung **42** für die PffNT-Hemmung in Hefe. Zusätzlich dargestellt ist die Van-der-Waals-Oberfläche des Inhibitors in frontaler Aufsicht auf die Seitenkette (Wasserstoffatome = weiß, Sauerstoffatome = rot, Kohlenstoffatome = dunkelgrau). Der  $pK_s$ -Wert wurde berechnet (Abschnitt 2.3), der effektive Van-der-Waals-Radius wurde entnommen aus PATANI und LAVOIE.<sup>113</sup> Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04  $\mu\text{Ci}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 30 s. pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

Auch der bioisostere Austausch von Fluoratomen gegen Methylgruppen ist in der Literatur bekannt. Hierbei bleiben die Molekülgeometrie und die Lipophilie in etwa erhalten, mit einem effektiven Van-der-Waals-Radius von  $1,80 \text{ \AA}$  sind Methylgruppen dabei etwas voluminöser als Fluoratome ( $1,47 \text{ \AA}$ ).<sup>113</sup> Aufgrund der deutlich geringeren Elektronegativität der Methylfunktionen gehen im Falle eines Austauschs jedoch zum einen die negativen induktiven Effekte auf das Wirkstoff-Grundgerüst verloren, zum anderen sind die entstehenden Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen signifikant geringer polarisiert als Kohlenstoff-Fluor-Bindungen. Um die Möglichkeit eines bioisosteren Austauschs der Fluoratome des PffNT-Inhibitors zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit ausgehend von Verbindung BH-246 **39**, der ausschließlich offenkettig vorliegenden Variante des MMV007839-Trifluormethylanalogons **29** (siehe Abbildung 4.22 unter Abschnitt 4.7.2), sukzessive die Fluoratome gegen Methylgruppen ersetzt und der Einfluss auf den  $IC_{50}$ -Wert der Hemmung des plasmotischen Lactat-Transporters bestimmt (Abbildung 4.25). Bereits der Austausch eines einzelnen Fluoratoms gegen eine Methylfunktion in Verbindung **43** hatte einen sechsfachen Anstieg des  $IC_{50}$ -Wertes der PffNT-Hemmung von  $1,1 \mu\text{M}$  auf  $6,8 \mu\text{M}$  zur Folge. Der Austausch von zwei Fluoratomen (Verbindung **44**) bedeutete eine 190-fache Abnahme der Wirksamkeit ( $IC_{50} = 210 \mu\text{M}$ ) und Verbindung **45**, welche drei Methylgruppen aufweist, war mit einem  $IC_{50}$ -Wert von größer  $1000 \mu\text{M}$  nicht wirksam.

Die deutliche Affinitätsabnahme der Verbindungen zeigt, dass der bioisostere Austausch von Fluoratomen gegen Methylgruppen nicht möglich ist. Dabei ist insbesondere für Verbindung **43**, in welcher, ausgehend von BH-246 **39**, nur eines der Fluoratome ersetzt wurde, der Anstieg des  $IC_{50}$ -Wertes der PffNT-Hemmung aufgrund des größeren Volumens der eingefügten Methylfunktion unwahrscheinlich – **43** kann in diesem Fall ebenso als Difluorethyl-Variante von BH-296 **37** angesehen werden, einem Inhibitor, der trotz eines nochmals deutlich größeren Pentafluorethylrestes eine sehr hohe Affinität zu PffNT zeigte ( $IC_{50} = 140 \text{ nM}$ , siehe Abschnitt 4.7.2). Der für **43** berechnete  $pK_s$ -Wert der benachbarten vinylogenen Carbonsäure steigt jedoch auch in dieser Verbindung aufgrund der geringeren Elektronegativität der

## Ergebnisse

eingefügten Methylgruppe an. In diesem Fall ist der  $pK_s$ -Anstieg vergleichsweise moderat: Während die Ausgangsverbindung BH-246 **39** mit einem berechneten  $pK_s$ -Wert von 4,9 unter den gegebenen Bedingungen nahezu vollständig deprotoniert vorliegt, ist auch für **43** (berechneter  $pK_s = 6,4$ ) von einem über 50%igen Anteil in der anionischen Form auszugehen. Dennoch könnte in diesem Fall, wie bereits für Verbindung **42** in Erwägung gezogen, der geringere Anteil negativ geladener Wirkstoffmoleküle für den Affinitätsverlust des Inhibitors zum Lactat-Transporter verantwortlich sein.

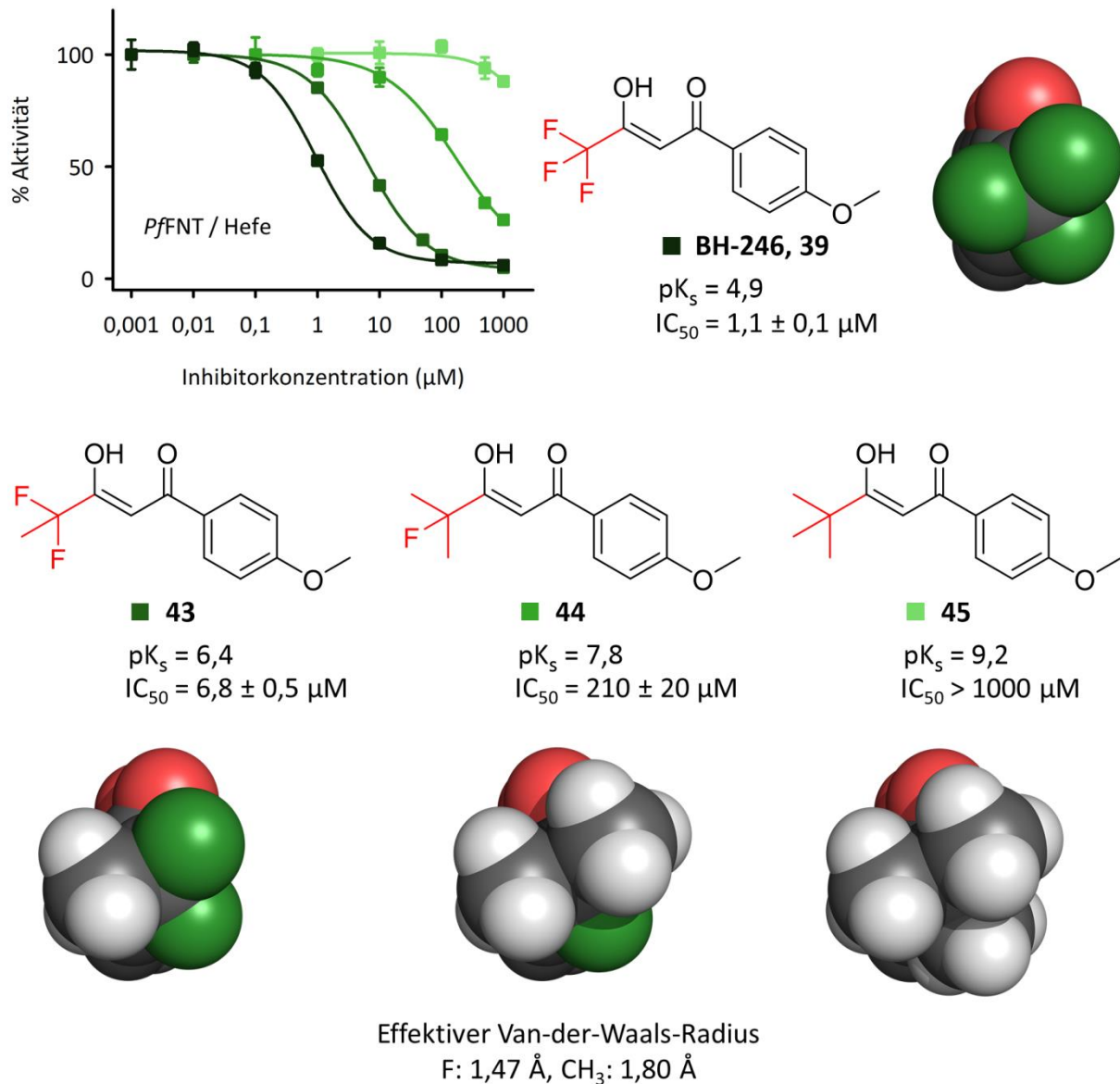
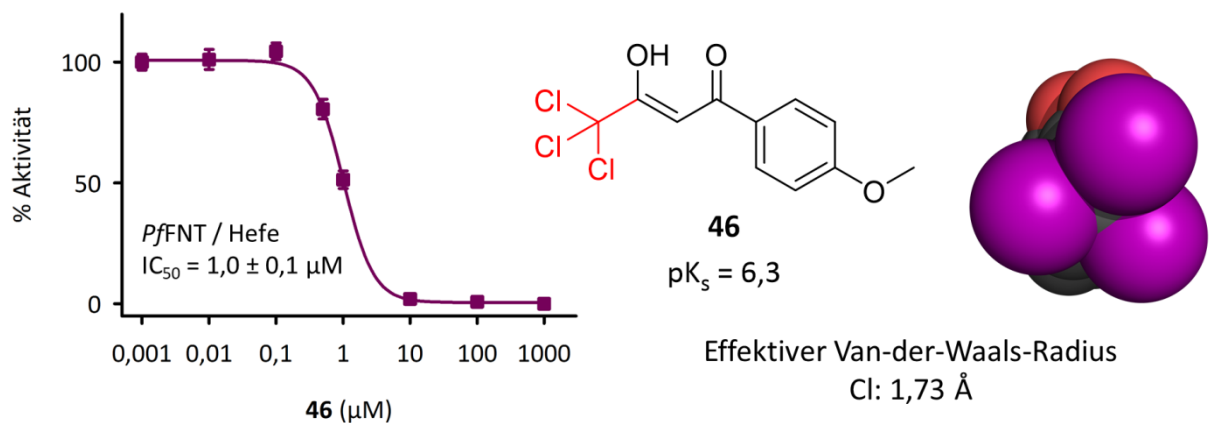


Abbildung 4.25: Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte (PfFNT-Hemmung in Hefe) der Trifluormethyl-Verbindung BH-246, **39** sowie der Verbindungen **43**, **44** und **45**, bei denen die Fluoratome sukzessive gegen Methylgruppen ausgetauscht wurden. Zusätzlich ist die Van-der-Waals-Oberfläche der Inhibitoren in frontaler Aufsicht auf die Seitenkette dargestellt (Fluoratome = grün). Die  $pK_s$ -Werte wurden berechnet (Abschnitt 2.3), die effektiven Van-der-Waals-Radien wurden entnommen aus PATANI und LAVOIE.<sup>113</sup> Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04  $\mu\text{Ci}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 30 s. pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

## Ergebnisse

Mit Verbindung **46** wurde schließlich eine Verbindung synthetisiert, in der, ausgehend von der Trifluormethyl-Verbindung BH-246 **39**, sämtliche Fluoratome gegen Chloratome ersetzt sind (Abbildung 4.26). Chlor, das in der 7. Hauptgruppe des Periodensystems auf Fluor folgende Halogen, weist als Substituent mit einem effektiven Van-der-Waals-Radius von 1,73 Å ein etwas größeres Volumen auf.<sup>113</sup> Damit ist es in seinem Radius der Methylgruppe (1,80 Å) ähnlicher als einem Fluoratom (1,47 Å). Aufgrund der geringeren Elektronegativität von Chlor gegenüber Fluor führt der in Verbindung **46** erfolgte Austausch zur Trichlormethylgruppe zudem zu einer Abnahme der Säurestärke der benachbarten vinylogenen Carbonsäure (berechneter  $pK_S = 6,3$ ) verglichen mit dem Trifluormethyl-Analogon BH-246 **39** (berechneter  $pK_S = 4,9$ ). So liegt unter den Testbedingungen nur etwas mehr als die Hälfte von **46** in der deprotonierten, anionischen Form vor. Bemerkenswerterweise war der  $IC_{50}$ -Wert der Hemmung der *Pf*FNT-vermittelten L-Lactat-Aufnahme in Hefezellen mit 1,0  $\mu$ M nahezu identisch zu der für eine halbmaximale *Pf*FNT-Hemmung benötigten Konzentration von BH-246 **39** ( $IC_{50} = 1,1 \mu$ M). Dies zeigt einerseits, dass sterisch anspruchsvollere Substituenten für das Aufrechterhalten der inhibitorischen Wirkung der *Pf*FNT-Inhibitoren prinzipiell toleriert werden. Andererseits wird deutlich, dass zumindest die begrenzte Verringerung der Säurestärke der vinylogenen Carbonsäure des Pharmakophors keine Auswirkungen auf die Affinität des Inhibitors zum Protein hat.



**Abbildung 4.26:** Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes der Verbindung **46** für die *Pf*FNT-Hemmung in Hefe. Zusätzlich ist die Van-der-Waals-Oberfläche des Inhibitors in frontaler Aufsicht auf die Seitenkette dargestellt (Chloratome = violett). Der  $pK_S$ -Wert wurde berechnet (Abschnitt 2.3), der effektive Van-der-Waals-Radius wurde entnommen aus PATANI und LAVOIE.<sup>113</sup>

Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04  $\mu$ Ci [ $1-^{14}$ C]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 30 s. pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

Anhand der Trichlormethyl-Verbindung **46** konnte gezeigt werden, dass das Einfügen sterisch anspruchsvollerer Substituenten in das Pharmakophor der *Pf*FNT-Inhibitoren anstelle der Fluoratome ohne Affinitätsverlust möglich ist. Korreliert man die beobachteten  $IC_{50}$ -Werte der *Pf*FNT-Hemmung der Trifluormethyl-Analoga mit den jeweiligen berechneten  $pK_S$ -Werten, so zeigt insbesondere der Vergleich von Verbindung **43** mit Verbindung **46**, dass zumindest ein Teil der Affinität in den physikochemischen Eigenschaften der Halogen-Substituenten begründet liegt (Abbildung 4.27). Beide Inhibitoren weisen eine nahezu identische Säurestärke auf (berechneter  $pK_S$  **43** = 6,4; berechneter  $pK_S$  **46** = 6,3) und liegen dem-

## Ergebnisse

nach unter den Bedingungen des Hefe-basierten Aufnahmeassays zu ähnlichen Anteilen als Anionen vor. In Verbindung **43** wurde ein einzelnes Fluoratom gegen eine sterisch anspruchsvollere Methylgruppe substituiert, in Verbindung **46** erfolgte der Austausch sämtlicher Fluoratome gegen Chloratome, die eine zu Methylfunktionen annähernd identische Van-der-Waals-Oberfläche aufweisen. Trotzdem zeigt **46** mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $1,0 \mu M$  eine 6,4-fach höhere Affinität zu *Pf*FNT als **43** ( $IC_{50} = 6,4 \mu M$ ). Die Ursache hierfür könnte demnach eine tatsächliche Interaktion der Halogen-Substituenten mit den Aminosäuren des Proteins über die Ausbildung sogenannter Halogenbindungen darstellen.<sup>112,117</sup> Jedoch lassen die für die Verbindungen **42** und **44** ermittelten hohen  $IC_{50}$ -Werte zusätzlich den Schluss zu, dass für die Interaktion mit dem Protein auch eine ausreichend hohe Säurestärke der vinylogenen Carbonsäurefunktion des Inhibitors Voraussetzung ist – möglicherweise resultiert oberhalb eines  $pK_s$ -Wertes, bei dem ein Großteil des *Pf*FNT-Inhibitors in der protonierten Form vorliegt, eine sprunghafte Abnahme der Affinität zum Lactat-Transporter.

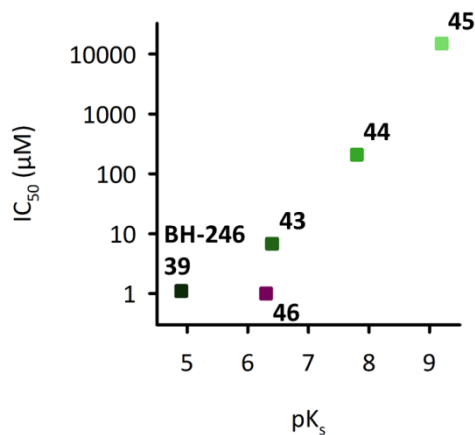


Abbildung 4.27: Zusammenhang zwischen den beobachteten  $IC_{50}$ -Werten (für Verbindung **45** erfolgte eine Extrapolation) der Trifluormethyl-Analoga und deren berechneten  $pK_s$ -Werten. Sowohl der sterische Anspruch der Substituenten an der Alkylkette des Pharmakophors (nicht dargestellt) als auch die Säurestärke der vinylogenen Carbonsäure sind nicht allein für die Affinität verantwortlich.

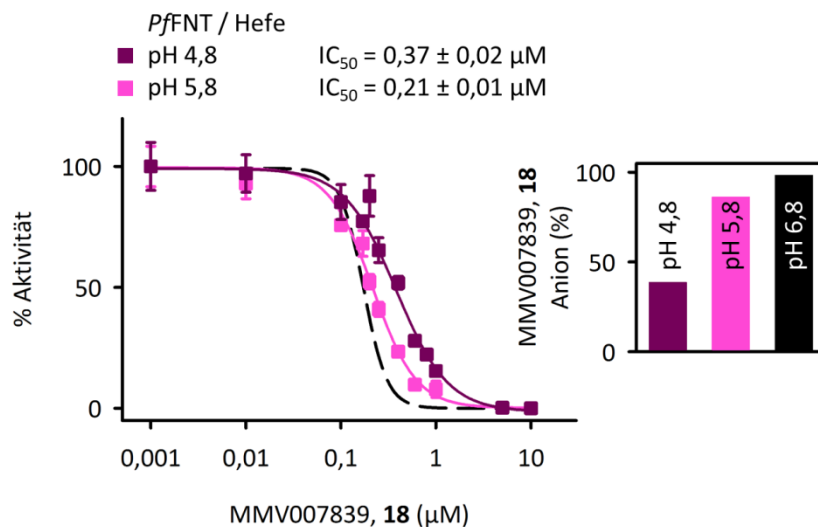
### 4.7.5 Einfluss des pH-Wertes auf die Affinität von MMV007839, **18** zu *Pf*FNT

Da der *Pf*FNT-Inhibitor MMV007839 **18** eine Säure darstellt, die in Gegenwart unterschiedlicher Protonenkonzentrationen zu jeweils verschiedenen Anteilen in der neutralen Form und als korrespondierendes Anion vorliegen kann, wurde der Einfluss verschiedener pH-Werte auf die Wirksamkeit des Inhibitors am plasmodialen Lactat-Transporter untersucht (Abbildung 4.28). In *Pf*FNT-herstellender Hefe zeigte eine Verringerung des im Aufnahmeassay üblicherweise verwendeten pH-Wertes von 6,8 auf 5,8 und 4,8 eine nur geringe Auswirkung auf die Affinität von MMV007839 **18** zum Transporter: Der  $IC_{50}$ -Wert der L-Lactat-Aufnahmehemmung stieg von 170 nM bei einem pH-Wert von 6,8 auf 210 nM (pH 5,8) bzw. 370 nM (pH 4,8). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass bereits die Entstehung der Hemiketalform von MMV007839 **18** eine Reaktion darstellt, die in Abhängigkeit vom pH-Wert abläuft, so dass möglicherweise der Anteil an offenkettig vorliegendem Inhibitor verändert wird. Zudem sind die Änderungen des pH-Wertes im Innern der für die Bestimmung des  $IC_{50}$ -



## Ergebnisse

Wertes verwendeten Hefezellen weniger stark ausgeprägt als dies extrazellulär durch einen entsprechenden Puffer der Fall ist.<sup>115,116</sup> Daher wird ein *PfFNT*-Inhibitor, der von der intrazellulären Seite an das Protein bindet, weitaus weniger von einer extrazellulären Änderung des pH-Wertes beeinflusst (siehe Abschnitt 4.8.1). Aus diesem Grund sind präzise Aussagen über pH-Wert-abhängige Struktur-Aktivitäts-Beziehungen nur schwer zu treffen. Dennoch wird auch hier die hohe Affinität von MMV007839 **18** zu *PfFNT* deutlich: Während durch die Abnahme des pH-Wertes die Aufnahmerate von L-Lactat über *PfFNT* ansteigt (pH 5,8: Verdopplung; pH 4,8: Verdreifachung), der Substratdruck auf den Inhibitor also zunimmt, ändert sich die für eine halbmaximale *PfFNT*-Hemmung benötigte Konzentration von MMV007839 **18** nur wenig.<sup>85</sup>



**Abbildung 4.28:** Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte von MMV007839, 18 für die *PfFNT*-Hemmung in Hefe bei pH 4,8 und pH 5,8. Die gestrichelte Linie zeigt zum Vergleich die  $IC_{50}$ -Kurve von MMV007839, 18 an *PfFNT* bei einem pH-Wert von 6,8. Die Balken zeigen den Anteil an negativ geladenem, deprotoniertem Inhibitor in der offenkettigen Form, basierend auf dem berechneten  $pK_s$ -Wert von 5,0.

Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04  $\mu\text{Ci}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 30 s. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

Die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Kurve bei einem pH-Wert von 4,8 erfolgte in zwei unabhängigen Experimenten.

## 4.8 Bestätigung von *PfFNT* als *Target* von MMV007839, 18

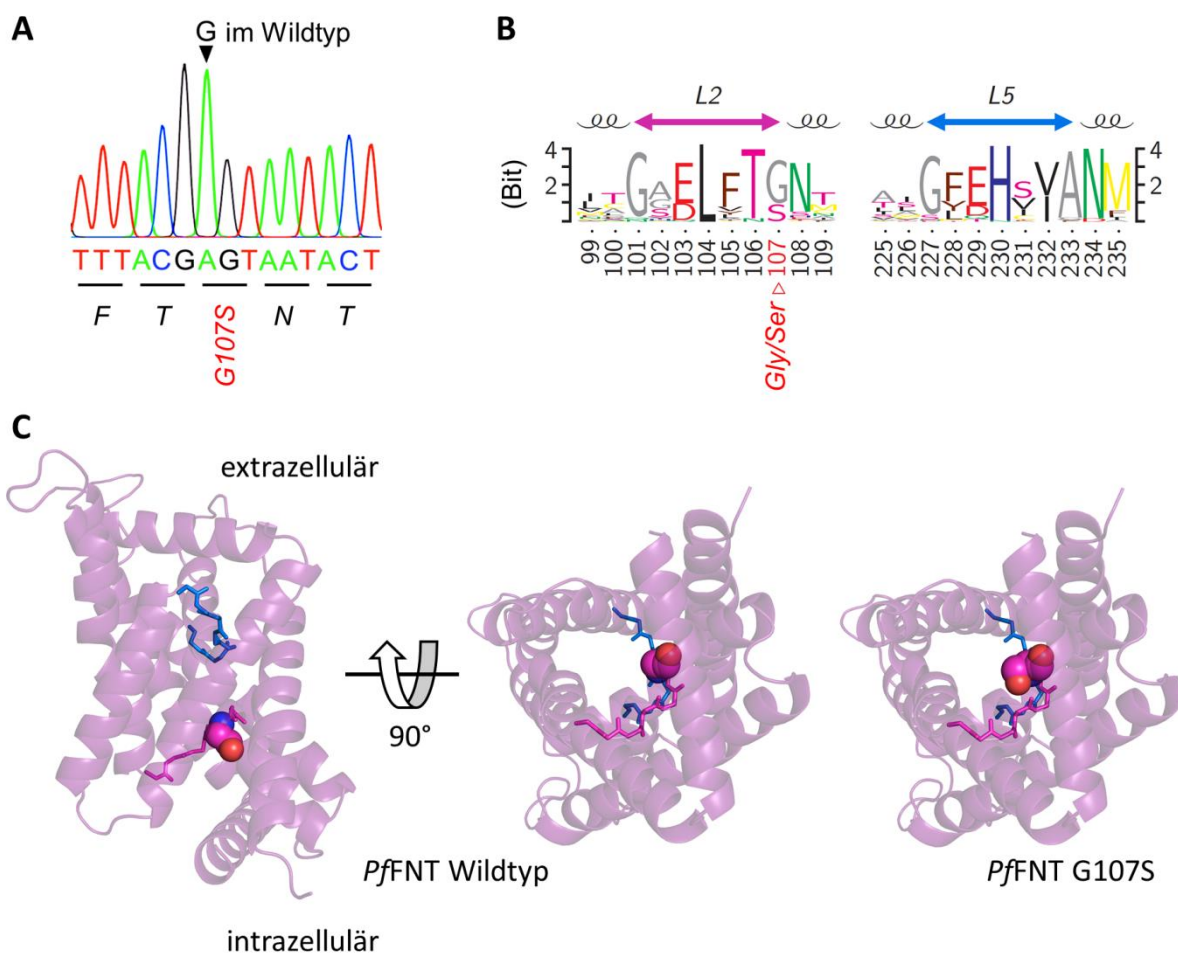
### 4.8.1 Generierung von MMV007839-resistenten Parasiten mit einem mutierten Lactat-Transporter

Indem am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin *P. falciparum* Kulturen fortwährend der dreifachen  $IC_{50}$ -Konzentration von MMV007839 **18** ausgesetzt wurden (siehe Abschnitt 3.4.2), bestand für die Parasiten die Möglichkeit zur Ausbildung von Resistenzen gegen den *PfFNT*-Inhibitor. Unter diesen Bedingungen erfolgte bereits nach einer Zeit von etwas weniger als drei Wochen die Selektion von MMV007839-resistenten Plasmodien. Die Sequenzierung des *PfFNT*-Gens der resistenten Parasiten offenbarte einen einzelnen Basenaustausch von Guanin zu Adenin, welcher auf Proteinebene den Austausch der Aminosäure Glycin an



## Ergebnisse

Position 107 (Gly107) zu Serin zur Folge hat (Abbildung 4.29 A). Gly107 befindet sich im hochkonservierten *loop* L2, der auf der intrazellulären Seite von *Pf*FNT die Transmembran-spanne TM2 unterbricht (siehe Abschnitt 1.2.2). In einer von Holger Erler durchgeführten Untersuchung von 71 repräsentativen FNTs aus Prokaryoten und eukaryotischen Einzellern, wurden für die Position, die dem des Gly107 in *Pf*FNT entspricht, ausschließlich Glycin und Serin gefunden, jedoch keine weiteren Aminosäuren (Abbildung 4.29 B).<sup>86</sup> Im Strukturmodell von *Pf*FNT wird deutlich, dass die Hydroxymethyl-Seitenkette des Serins in den zytoplasmatischen Poreneingang des Lactat-Transporters ragt und diesen etwas verengt (Abbildung 4.29 C). Aus diesem Grund erscheint eine beeinträchtigte Bindung von MMV007839 **18** in der intrazellulären Porenöffnung, möglicherweise aufgrund einer sterischen Kollision mit dem Serin, als wahrscheinlichste Ursache für die Resistenz.

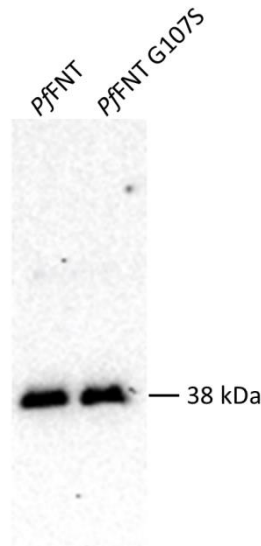


**Abbildung 4.29:** Die Mutation im plasmodialen Lactat-Transporter: (A) Ein einzelner Basenaustausch von Guanin zu Adenin im *Pf*FNT-Gen der MMV007839-resistenten Parasiten führt auf Proteinebene zu einem Austausch von Glycin an Position 107 zu Serin. (B) Position der G107S-Mutation im konservierten *loop* L2 der FNT-Familie (Bezeichnung entsprechend *Pf*FNT). Die Größe einer Aminosäure im Subfamily-Logo symbolisiert die Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens (angegeben in Bit): Je größer, desto höher ist sie konserviert. (C) Strukturmodell von *Pf*FNT basierend auf dem Hydrogensulfid-Transporter HSC (PDB ID 3TDO).<sup>67</sup> Für die Position 107 ist die Van-der-Waals-Oberfläche dargestellt (Glycin im Wildtyp: links und mittig, Serin rechts), die *loops* L2 und L5 sind rosa bzw. blau gefärbt.

Die Abbildungen (A) und (B) wurden von Prof. Dr. Eric Beitz erstellt.

#### 4.8.2 Bestimmung der $IC_{50}$ -Werte von MMV007839, **18** in *PfFNT* G107S-herstellender Hefe und in resistenten Parasiten

Die für die halbmaximale Inhibition des Wachstums der resistenten Parasiten benötigte Konzentration von MMV007839 **18** wurde zu 35  $\mu$ M bestimmt (rote Kurve in Abbildung 4.31) – verglichen mit der nicht-resistenten Wildtyp-Zelllinie ( $IC_{50}$  = 140 nM) ist dies ein 250-facher Anstieg des  $IC_{50}$ -Wertes. Um *PfFNT* zweifelsfrei als *Target* von MMV007839 **18** zu identifizieren, wurde der Inhibitor schließlich im Aufnahmeassay mit  $^{14}$ C-radiomarkiertem L-Lactat an Hefe, die den mutierten Lactat-Transporter *PfFNT* G107S herstellt, untersucht. Die für die Erzeugung von *PfFNT* G107S notwendige Punktmutation im *PfFNT*-Gen wurde von Marie Wiechert durchgeführt.<sup>105</sup> Zunächst erfolgte im Western Blot die Kontrolle der erfolgreichen Proteinherstellung (Abbildung 4.30). Dabei zeigte sich, dass *PfFNT* G107S gleichermaßen wie Wildtyp-*PfFNT* von der Hefe produziert wird.



**Abbildung 4.30:** Western Blot von Wildtyp-*PfFNT* (zum Vergleich) und *PfFNT* G107S. Als Primärantikörper wurde der Anti-HA-Antikörper eingesetzt. *PfFNT* und *PfFNT* G107S besitzen inklusive HA-Tag und His<sub>10</sub>-Tag ein Molekulargewicht von 38 kDa.

Da im Zuge der von Marie Wiechert durchgeführten Charakterisierung des Substrat-Transportes über *PfFNT* G107S eine, verglichen mit dem Wildtyp-Transporter, geringere L-Lactat-Aufnahme in die Hefe beobachtet wurde (siehe Abbildung 4.35 unter Abschnitt 4.8.4), erfolgte die Inkubation der *PfFNT* G107S-Hefen mit dem Substrat L-Lactat im Rahmen dieser Arbeit stets über einen verlängerten Zeitraum von 120 s. Hier zeigte der Malaria-Box-Inhibitor MMV007839 **18** eine ähnliche Verschiebung des  $IC_{50}$ -Wertes für die L-Lactat-Aufnahmehemmung, wie sie bereits für das Parasitenwachstum in der Kultur beobachtet wurde: von 170 nM in Hefe, die Wildtyp-*PfFNT* herstellt, zu 22  $\mu$ M in *PfFNT* G107S-Hefe (schwarze Kurve in Abbildung 4.31). Dies entspricht einer 130-fachen Zunahme der für die halbmaximale Hemmung der L-Lactat-Aufnahme benötigten Konzentration von MMV007839 **18**. Damit wird deutlich, dass die in den Parasiten beobachtete Resistenz gegenüber dem Inhibitor direkt mit der G107S-Mutation in *PfFNT* im Zusammenhang steht – der plasmodiale

## Ergebnisse

Lactat-Transporter stellt demnach tatsächlich das *Target* von MMV007839 **18** dar. Zusätzlich wird hierbei verdeutlicht, dass *PfFNT* im Energiestoffwechsel der Parasiten eine entscheidende Rolle spielen muss, der Lactat-Transporter ist für das Wachstum der Plasmodien essentiell.

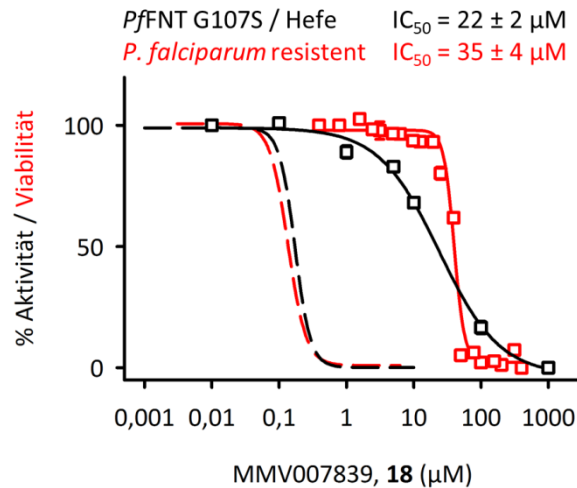


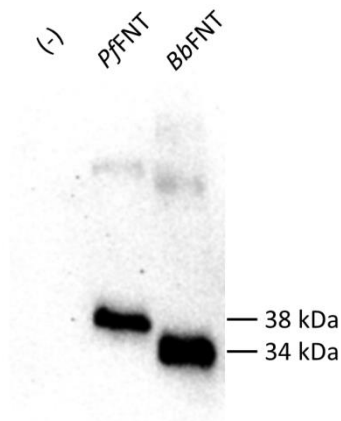
Abbildung 4.31: Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte von MMV007839, **18** für die *PfFNT* G107S-Hemmung in Hefe (schwarz) und die Viabilität von resistenten *P. falciparum* Parasiten (rot). Die gestrichelten Linien zeigen zum Vergleich die IC<sub>50</sub>-Kurven von MMV007839, **18** an Wildtyp-*PfFNT* (schwarz) und Wildtyp-Parasiten (rot). Hefe: Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04 μCi [1-<sup>14</sup>C]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 120 s (*PfFNT* G107S). pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

### 4.8.3 Bestätigung des Resistenzmechanismus am Lactat-Transporter aus *Babesia bovis*

Babesien sind Parasiten, die den Malariaerregern sehr ähnlich sind – wie die Plasmodien werden sie zu den Apicomplexa gezählt. Auch Babesien befallen die Erythrozyten ihrer Wirtsorganismen und vermehren sich dort, was zum Krankheitsbild der Babesiose führen kann. *Babesia bovis* ist ein Vertreter dieser Parasitengattung, der vor allem Rinder befällt.<sup>118</sup> Dessen Lactat-Transporter *BbFNT* zeigt in seiner Aminosäuresequenz eine hohe Ähnlichkeit zu *PfFNT*, an der Position, an der im plasmodialen Lactat-Transporter die G107S-Mutation auftritt, weist *BbFNT* jedoch natürlicherweise bereits ein Serin (Ser93) auf.<sup>119</sup> Damit könnte *BbFNT* eine natürliche Resistenz gegen MMV007839 **18** zeigen, die durch den Austausch des Serins gegen das in *PfFNT* von Natur aus vorkommende Glycin verloren gehen sollte. Der Inhibitor könnte in diesem Fall demnach ausschließlich aufgrund einer Mutation im *Target*, dem Lactat-Transporter aus *B. bovis*, an Affinität gewinnen.

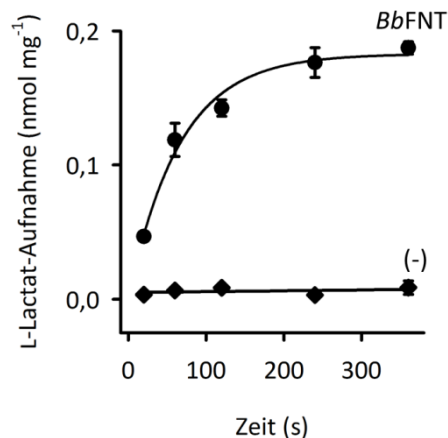
Um diese These zu überprüfen und damit den Resistenzmechanismus zu verifizieren sowie den intrazellulären Poreneingang als Bindungsstelle des Hemmstoffes zu bestätigen, wurde die inhibitorische Wirksamkeit von MMV007839 **18** an *BbFNT* im Hefe-basierten Aufnahmeassay untersucht. Die Klonierung des *BbFNT*-Gens in den Vektor pDR196 (Abschnitt 2.1.3) erfolgte hierbei durch Prof. Dr. Eric Beitz. Nach dem Einbringen der entsprechenden DNA in die Hefe wurde zunächst die erfolgreiche Herstellung von *BbFNT* mittels Western Blot bestätigt (Abbildung 4.32).

## Ergebnisse



**Abbildung 4.32:** Western Blot von *PfFNT* (zum Vergleich) und *BbFNT*. Als Primärantikörper wurde der Anti-HA-Antikörper eingesetzt. *PfFNT* besitzt inklusive HA-Tag und His<sub>10</sub>-Tag ein Molekulargewicht von 38 kDa, das von *BbFNT* liegt bei 34 kDa. (-) = Hefe, die kein Protein herstellt.

Um für den Lactat-Transporter aus *B. bovis* eine geeignete Inkubationszeit mit dem Substrat zu bestimmen, wurde anschließend die L-Lactat-Aufnahme in *BbFNT*-herstellende Hefe untersucht (Abbildung 4.33). Diese zeigte mit einem entsprechenden Aufnahme-Plateau von 0,2 nmol L-Lactat je Milligramm trockener Hefe nach einer Zeit von 240 s einen nahezu identischen L-Lactat-Transport zu *PfFNT*-produzierender Hefe (siehe auch L-Lactat-Transport über MCT1 in Abschnitt 4.4).<sup>85</sup> Aus diesem Grund wurde für die Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes des Inhibitors wie für *PfFNT* eine Substratinkubationszeit von 30 s gewählt.



**Abbildung 4.33:** Zeitabhängige L-Lactat-Aufnahme über *BbFNT* (Kreise) und über die Zellmembran von Hefezellen, die kein Transportprotein herstellen (Rauten). Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04  $\mu$ Ci [ $1$ -<sup>14</sup>C]-L-Lactat. pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

Im Hefe-basierten Aufnahmeassay mit <sup>14</sup>C-radiomarkiertem L-Lactat zeigte der *PfFNT*-Inhibitor MMV007839 **18** erst bei einer vergleichsweise hohen Konzentration von 120  $\mu$ M eine halbmaximale Hemmung der Substrataufnahme über *BbFNT* (Abbildung 4.34). An der *BbFNT* S93G-Mutante, die von Holger Erler über eine Punktmutation generiert und anschlie-

## Ergebnisse

ßend in der Hefe hinsichtlich ihrer Hemmbarkeit durch den Inhibitor untersucht wurde, resultierte für MMV007839 **18** hingegen ein signifikant (11-fach) verringerter  $IC_{50}$ -Wert der L-Lactat-Aufnahmehemmung von 11  $\mu$ M. Dies verdeutlicht, dass der Resistenzmechanismus direkt mit dem Serin in Verbindung gebracht werden kann und sich die Bindestelle des Inhibitors daher mit großer Wahrscheinlichkeit auf der intrazellulären Seite des plasmodialen Lactat-Transporters befindet.

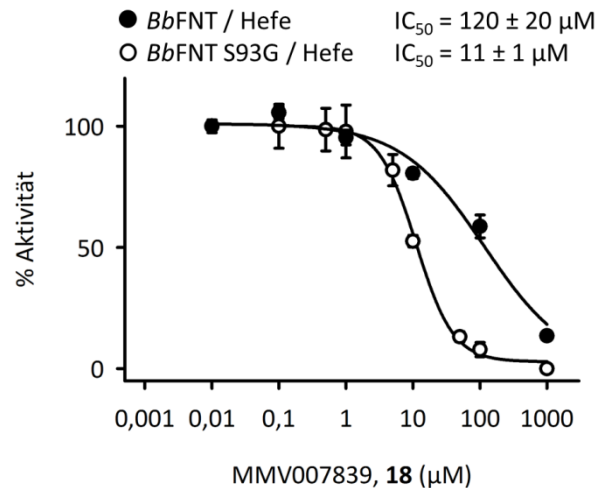


Abbildung 4.34: Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte von MMV007839, **18** für die *BbFNT*- und *BbFNT* S93G-Hemmung in Hefe. Die Daten der  $IC_{50}$ -Kurve für *BbFNT* S93G wurden von Holger Erler generiert. Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04  $\mu$ Ci [ $1-^{14}$ C]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 30 s (Wildtyp-*BbFNT*), 60 s (*BbFNT* S93G). pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

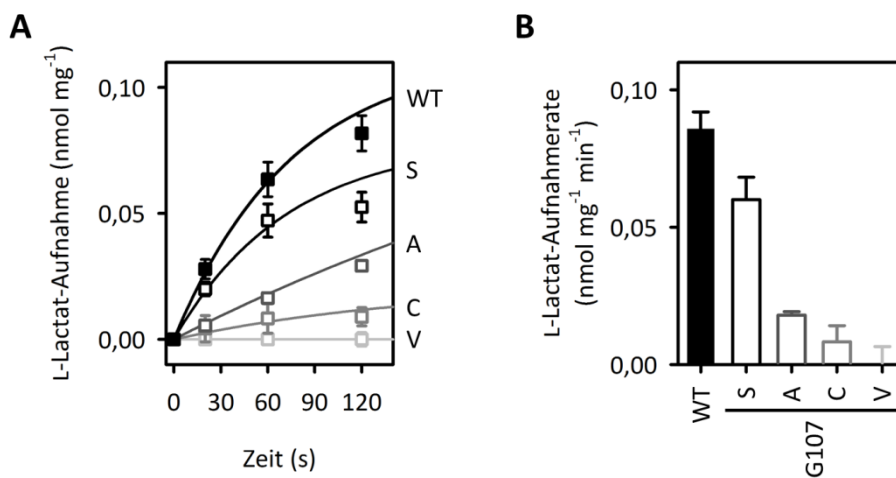
### 4.8.4 Folgen der G107S-Mutation für den L-Lactat-Transport über *PfFNT* und das Parasitenwachstum

Die Resistenz der Parasiten gegenüber MMV007839 **18** konnte durch den beobachteten Anstieg des  $IC_{50}$ -Wertes des Inhibitors im Aufnahmeassay an *PfFNT* G107S-Hefe direkt mit der Mutation von Gly107 zu Serin in Verbindung gebracht werden. Weiterhin war der Resistenzmechanismus auch auf den von Natur aus MMV007839-resistenten Lactat-Transporter aus *B. bovis* übertragbar. Zusammen mit der antiplasmodialen Wirksamkeit von MMV007839 **18** zeigen diese Ergebnisse, dass *PfFNT* ein valides *Target* im Malariaparasiten darstellt, welches zudem über geeignete Wirkstoffe adressierbar ist.

Während die im *PfFNT* aufgetretene Resistenz einerseits die Validierung des Transporters als *Drug-Target* ermöglicht, ist auf der anderen Seite der negative Einfluss auf die Affinität des Inhibitors zum Protein sehr ausgeprägt. Um die Folgen der Mutation für den Substrat-Transport über *PfFNT* zu untersuchen und Aussagen über die Wahrscheinlichkeit des Auftretens weiterer Mutationen an Position 107 treffen zu können, erfolgte durch Marie Wiechert, nach der mittels Western-Blot durchgeführten Überprüfung der erfolgreichen Proteinherstellung durch die Hefe, die Bestimmung der L-Lactat-Aufnahme in Hefezellen über *PfFNT* G107S und weitere *PfFNT* G107-Mutanten (Abbildung 4.35 A).<sup>105</sup> Bereits die im Parasiten erfolgte G107S-Mutation resultierte in einer um ca. 30 % verminderten L-Lactat-Aufnahmerate (Abbildung 4.35 B). Bemerkenswerterweise führte auch das Einfügen der Aminosäure Alanin,

## Ergebnisse

die mit einer Methylseitenkette etwas kleiner ist als Serin, zu einer *PfFNT*-Mutante (G107A), die nur noch ca. 20 % der L-Lactat-Transportrate des Wildtyps zeigte. Ebenso resultierte für die Mutante, bei der das Serin zu Cystein vergrößert ist (G107C), eine deutlich verringerte Transportrate von etwa 10 %. Die weitere Vergrößerung zu einem Valin (G107V), welches eine Isopropylseitenkette trägt, führte schließlich zu einem Verlust der L-Lactat-Leitfähigkeit. Hier zeigt sich, dass die Position des Gly107 in *PfFNT* hinsichtlich weiterer Mutationen nur wenig Toleranz zeigt. So ist insbesondere der weitere Austausch des Glycins zu Aminosäuren, die größer als Serin sind, sehr unwahrscheinlich, da dies zum Verlust des für die Parasiten essentiellen Lactat-Transportes führt. Damit könnte ein *PfFNT*-Inhibitor, der von der G107S-Mutation nicht betroffen ist, möglicherweise bereits in Wildtyp-Parasiten eine weniger ausgeprägte Anfälligkeit für Resistenzen zeigen.



**Abbildung 4.35:** (A) Zeitabhängige L-Lactat-Aufnahme über Wildtyp-*PfFNT* (WT) und *PfFNT* G107 S/A/C/V-Mutanten. (B) Die aus den Zeitkurven ermittelten L-Lactat-Transportraten des Wildtyps und der *PfFNT*-Mutanten. Die Generierung der Daten und die Erstellung der Abbildungen erfolgte durch Marie Wiechert. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04  $\mu$ Ci [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-L-Lactat. pH 6,8. Die Membrandiffusion von L-Lactat in Hefe, die kein Protein herstellt, wurde abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

Am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin wurde zusätzlich der Einfluss der G107S-Mutation in *PfFNT* auf das Wachstum der Parasiten *in vitro* untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass die Mutation auch nach Entfernen des Selektionsdruckes in Form des Inhibitors MMV007839 **18** bestehen blieb (nicht dargestellt). Zum anderen zeigten die MMV007839-resistenten Plasmodien in Abwesenheit des Inhibitors eine Zellproliferation, welche identisch zu der der Wildtyp-Parasiten war (Abbildung 4.36). Dies bedeutet, dass trotz der im Hefesystem beobachteten verminderten L-Lactat-Transportrate von *PfFNT* G107S, die *Fitness* der Parasiten unverändert bleibt und die Plasmodien durch die Mutation, zumindest in der Kultur, nicht in ihrem Wachstum eingeschränkt werden.



## Ergebnisse

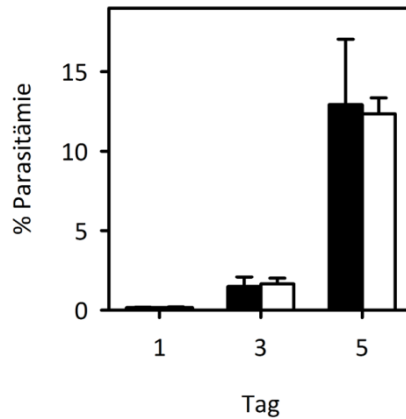


Abbildung 4.36: *Fitness* der MMV007839-resistenten Parasiten (weiße Balken) im Vergleich zu Wildtyp-Parasiten (*P. falciparum* 3D7, schwarze Balken). Die Ausgangs-Parasitämie betrug  $0,15 \pm 0,1$  %. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

## 4.9 Umgehung der Resistenz von *PfFNT* G107S

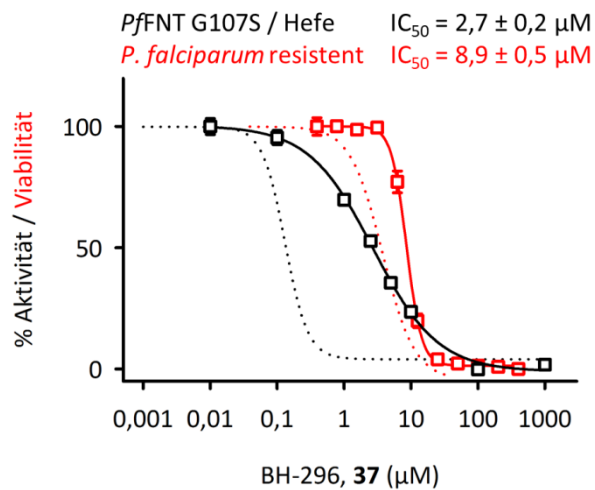
### 4.9.1 BH-296, 37 und Pharmakophor, 41 als Inhibitoren von *PfFNT* G107S

Wenn man, wie bereits unter Abschnitt 4.7.4 erwähnt, für MMV007839 **18** einen Bindemodus annimmt, bei dem der Fluoralkylrest der vinylogenen Säure in den Bereich der lipophilen Engstellen des plasmodialen Lactat-Transporters ragt, so erscheint es wahrscheinlich, dass die geringe Affinität des Inhibitors zu *PfFNT* G107S ( $IC_{50} = 22 \mu\text{M}$ , siehe Abschnitt 4.8.2) aus einer Kollision zwischen der phenolischen Hydroxyfunktion oder des gesamten Aromaten mit der Seitenkette des Serins an Position 107 resultiert. Tatsächlich erwies sich Verbindung BH-296 **37**, der als ausschließlich offenkettig vorliegender Form von MMV007839 **18** die aromatische Hydroxyfunktion fehlt, bereits als wesentlich potenter in der Inhibition des *PfFNT* G107S-vermittelten L-Lactat-Transportes in die Hefe (schwarze Kurve in Abbildung 4.37): Der für BH-296 **37** am MMV007839-resistenten Lactat-Transporter bestimmte  $IC_{50}$ -Wert liegt mit  $2,7 \mu\text{M}$  achtfach unter dem des Inhibitors aus der Malaria-Box. Da die  $IC_{50}$ -Werte beider Verbindungen am Wildtyp-Transporter nahezu identisch sind, bedeutet dies zudem, dass die relative Verschiebung des  $IC_{50}$ -Wertes für BH-296 **37**, verglichen mit MMV007839 **18**, um etwa eine Größenordnung geringer ausfällt (20-fach gegenüber 130-fach).

Auch an resistenten *P. falciparum* Kulturen zeigte BH-296 **37** eine größere inhibitorische Wirksamkeit als MMV007839 **18**. Mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $8,9 \mu\text{M}$  war die offenkettig vorliegende Verbindung hier um das Vierfache wirksamer (rote Kurve in Abbildung 4.37). Da BH-296 **37**, verglichen mit dem Hemiketal MMV007839 **18**, jedoch bereits an Wildtyp-Parasiten einen relativ hohen  $IC_{50}$ -Wert von  $3,4 \mu\text{M}$  aufweist (möglicherweise aufgrund einer geringeren Aufnahme der polaren offenkettigen Verbindung in die Zellen, siehe Abschnitt 4.7.2) bedeutet dies eine nur 2,5-fache Abnahme der inhibitorischen Wirksamkeit – ein deutlicher Unterschied zu dem 250-fachen Anstieg des  $IC_{50}$ -Wertes von MMV007839 **18** in der Parasitenkultur. Zusammenfassend stellt BH-296 **37** hinsichtlich der Hemmung der L-Lactat-Aufnahme über *PfFNT* G107S und der Wachstumshemmung resistenter Plasmodien eine signifikant wirksamere Verbindung dar als MMV007839 **18**. Dennoch ist auch dieser Inhibitor

## Ergebnisse

von der Resistenz betroffen, so dass die Hemiketal-bildende phenolische Hydroxygruppe nicht ausschließlich für die geringere Affinität von MMV007839 **18** zu *Pf*FNT G107S verantwortlich gemacht werden kann. Die Ausbildung einer neuen Resistenz war jedoch bei der am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin durchgeführten Behandlung von MMV007839-resistenten Parasiten mit der dreifachen  $IC_{50}$ -Konzentration von BH-296 **37** nicht zu beobachten. Dies steht im Einklang mit der im Hefesystem für die Aminosäureposition 107 im *Pf*FNT beobachteten Limitation hinsichtlich der Entwicklung weiterer Resistenzen (Abschnitt 4.8.4).



**Abbildung 4.37:** Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte von BH-296, 37 für die *Pf*FNT G107S-Hemmung in Hefe (schwarz) und die Viabilität von resistenten *P. falciparum* Parasiten (rot). Die gepunkteten Linien zeigen zum Vergleich die  $IC_{50}$ -Kurven von BH-296, 37 an Wildtyp-*Pf*FNT (schwarz) und Wildtyp-Parasiten (rot). Hefe: Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 120 s (*Pf*FNT G107S). pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

Da auch der in MMV007839 **18** enthaltene Aromat einen Beitrag zum Affinitätsverlust des Inhibitors zu *Pf*FNT G107S leisten könnte, wurde im Folgenden das Pharmakophor **41**, welches ausschließlich die vinyloge Fluoralkylcarbonsäure-Seitenkette des Inhibitors repräsentiert, hinsichtlich seiner Wirksamkeit am mutierten Lactat-Transporter untersucht (Abbildung 4.38). Die für die halbmaximale Hemmung des L-Lactat-Transportes über *Pf*FNT G107S benötigte Konzentration des Pharmakophors **41** wurde hierbei zu 8,1  $\mu\text{M}$  bestimmt – eine nur noch vierfache Verringerung der Affinität gegenüber Wildtyp-*Pf*FNT ( $IC_{50} = 1,9 \mu\text{M}$ ). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass das Pharmakophor **41** mit der Methylfunktion, die den Aromaten in MMV007839 **18** ersetzt, ein  $sp^3$ -hybridisiertes Kohlenstoffatom aufweist, welches aufgrund des leicht veränderten räumlichen Anspruchs ebenfalls einen Einfluss auf die Affinität des Inhibitors zum Transporter haben kann. Zudem wurde, wie unter Abschnitt 4.8.4 beschrieben, bereits für das physiologische Substrat L-Lactat eine Abnahme der Transportrate im mutierten *Pf*FNT beobachtet, was auf eine geringere Affinität des Substrates zum Transporter hindeutet. Für einen Inhibitor, der Substrat-analog mit *Pf*FNT interagiert, sollte daher zwangsläufig ein ähnlicher Affinitätsverlust zu erwarten sein. Aus diesem Grund stellt das Pharmakophor **41** als Verbindung, die eine vergleichsweise geringe Selektivität für den Wildtyp-Transporter zeigt, eine geeignete Leitstruktur für die Entwicklung neuer Inhibitoren dar, die auch *Pf*FNT G107S adressieren können.



## Ergebnisse

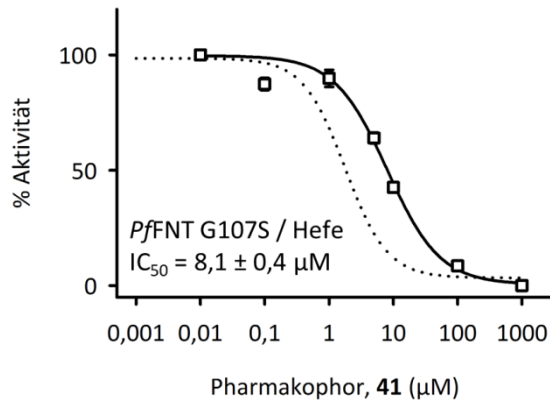


Abbildung 4.38: Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes des Pharmakophors, 41 für die *PfFNT* G107S-Hemmung in Hefe. Die gepunktete Linie zeigt zum Vergleich die  $IC_{50}$ -Kurve des Pharmakophors, 41 an Wildtyp-*PfFNT*. Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04  $\mu\text{Ci}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 120 s (*PfFNT* G107S). pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

### 4.9.2 Bedeutung des aromatischen Substituenten

Das Vorhandensein und der sterische Anspruch des aromatischen Substituenten des Inhibitors sind bereits für dessen Affinität zum Wildtyp-*PfFNT* wenig bedeutsam (Abschnitt 4.6.6). Auch am MMV007839-resistenten *PfFNT* G107S konnte kein Einfluss des, in Bezug auf den Carbonyl-Kohlenstoff, *para*-ständigen aromatischen Restes auf die Affinität des Inhibitors zum Transporter beobachtet werden (Abbildung 4.39). So resultierte für MMV000972 **19**, der Verbindung aus der Malaria-Box ohne aromatischen Substituenten, mit  $41 \mu\text{M}$  ein ähnlicher  $IC_{50}$ -Wert für die *PfFNT* G107S-Hemmung wie für MMV007839 **18** ( $IC_{50} = 22 \mu\text{M}$ ). Ebenso zeigte der Chlor-Substituent in Verbindung **40** nur wenig Einfluss auf die inhibitorische Wirksamkeit dieser Verbindung, die mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $5,8 \mu\text{M}$  an *PfFNT* G107S ähnlich potent war wie bereits das Methoxy-Analogon BH-296 **37** ( $IC_{50} = 2,7 \mu\text{M}$ ).

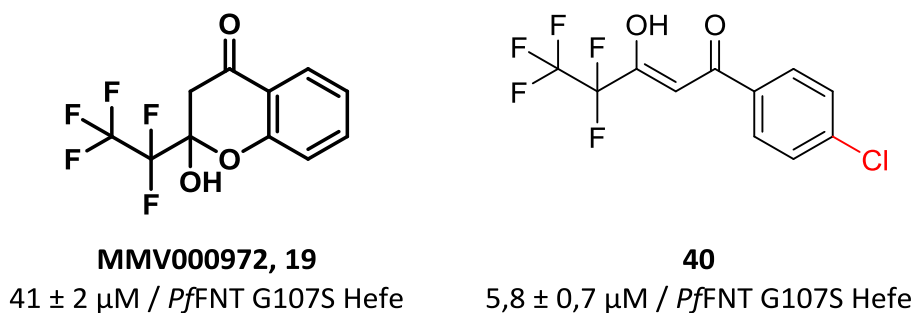


Abbildung 4.39: Bedeutung des aromatischen Restes für die Inhibition der *PfFNT* G107S-vermittelten L-Lactat-Leitfähigkeit: Ausgehend von den analogen Verbindungen MMV007839, 18 bzw. BH-296, 37, bleibt die Affinität von MMV000972, 19 und Verbindung 40 zum Protein unabhängig vom aromatischen Substituenten nahezu unverändert.

### 4.9.3 Einfluss des sterischen Anspruchs des aromatischen Systems

Unter Abschnitt 4.9.1 wurde für das Pharmakophor **41** eine schwächer ausgeprägte Verschiebung des  $IC_{50}$ -Wertes vom Wildtyp-*PfFNT* zur G107S-Mutante beobachtet, als für Verbindung BH-296 **37**, die zusätzlich einen 4-Methoxyphenyl-Rest aufweist. Aus diesem Grund erfolgte die Untersuchung weiterer Verbindungen hinsichtlich ihrer Affinität zu *PfFNT* G107S, bei denen das aromatische System auf einen kleineren, fünfgliedrigen Heterozyklus begrenzt wurde, um eine Kollision mit der in den Transportpfad ragenden Seitenkette des Serins zu vermeiden (Abbildung 4.40). An *PfFNT* zeigten diese Verbindungen mit  $IC_{50}$ -Werten zwischen 130 nM und 200 nM eine zu MMV007839 **18** vergleichbare Potenz. Insbesondere für Verbindung **50**, welche einen insgesamt eher voluminösen Benzofuranyl-Rest trägt, resultierte mit 180 nM ein überraschend niedriger  $IC_{50}$ -Wert der Hemmung des Wildtyp-*PfFNT*-vermittelten L-Lactat-Transportes – ein weiterer Hinweis auf einen Bindemodus, bei dem das aromatische System im Bereich des Einganges der Transportpore von *PfFNT* lokalisiert ist.

Trotz der hohen Potenz am nicht-resistenten Lactat-Transporter war die Affinität der Verbindungen **47** bis **50** zu *PfFNT* G107S relativ stark vermindert. Obwohl ebenfalls permanent offenkettig in Form der vinylogenen Fluoralkylcarbonsäure vorliegend, liegen die  $IC_{50}$ -Werte der Hemmung der L-Lactat-Aufnahme über den resistenten Transporter mit 12 bis 15  $\mu$ M etwa fünffach höher als bei BH-296 **37** ( $IC_{50} = 2,7 \mu$ M). Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der hohen Elektronendichte der fünfgliedrigen Heteroaromaten liegen. Diese könnte eine Abstoßung der freien Elektronenpaare der Hydroxyfunktion des Serins zur Folge haben, was letztlich in einer geringeren Affinität des Inhibitors zur *PfFNT* G107S-Mutante resultiert.

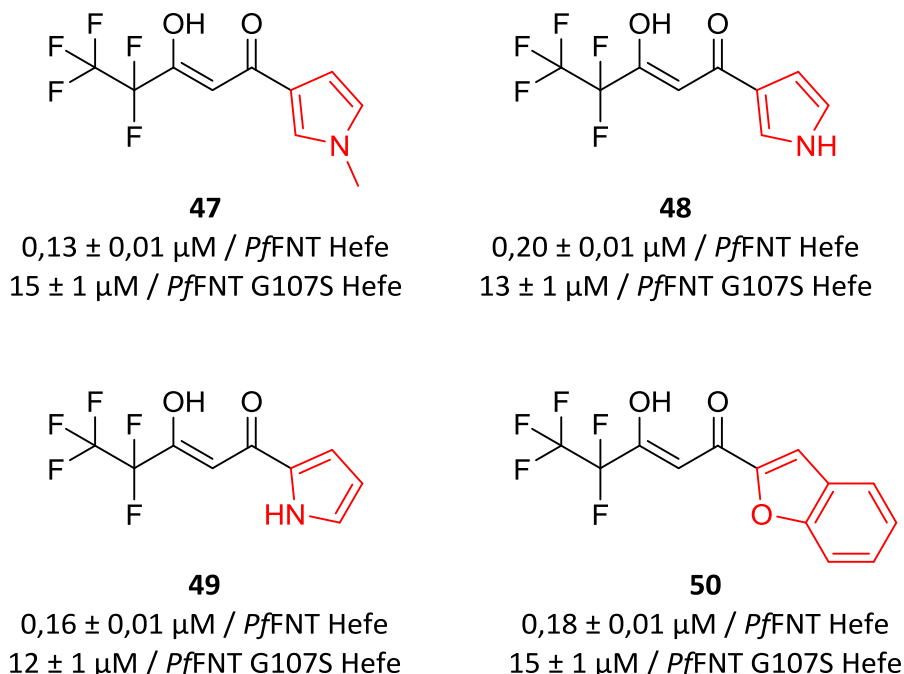


Abbildung 4.40: Bedeutung des sterischen Anspruchs des aromatischen Systems für die Inhibition der Wildtyp-*PfFNT*- und der *PfFNT* G107S-vermittelten L-Lactat-Leitfähigkeit: Verbindungen mit Pyrrolyl- und Benzofuranyl-Substituenten stellen potente Inhibitoren des Wildtyp-Transporters dar, die Affinität zum MMV007839-resistenten *PfFNT* G107S ist jedoch gering.

#### 4.9.4 Potenz eines Inhibitors ohne aromatisches System

Das Pharmakophor **41** ist eine leicht flüchtige Verbindung, die nur wenig „drug-likeness“ aufweist und sich daher nicht zur Untersuchung in der *P. falciparum* Kultur eignet. Die Affinität dieses Moleküls zum resistenten Lactat-Transporter war jedoch vergleichsweise hoch (Abschnitt 4.9.1). Durch die Vergrößerung des Grundgerüsts auf neun Kohlenstoffatome und das Einfügen einer Hydroxygruppe im entsprechenden Abstand zur vinylogenen Carbonsäurefunktion wurde mit Verbindung **51** ein Pharmakophor-analoger Inhibitor synthetisiert, der in der Lage ist, in die Hemiketalform zu tautomerisieren und sich zudem für die *in vitro* Testung an Plasmodien eignete. Im Hefe-basierten Aufnahmeassay mit  $^{14}\text{C}$ -radiomarkiertem L-Lactat zeigte **51** an Wildtyp-PfFNT mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $1,1 \mu\text{M}$  (Abbildung 4.41, schwarze Kurve, gefüllte Kästchen) eine ähnliche Potenz wie das Pharmakophor **41** ( $\text{IC}_{50} = 1,9 \mu\text{M}$ ). Bereits an nicht-resistenten Parasiten wies die Verbindung, trotz der Fähigkeit das „interne Hemiketal-Prodrug“ auszubilden, mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert der Wachstumshemmung von  $10 \mu\text{M}$  lediglich eine geringe Wirksamkeit auf (rote Kurve, gefüllte Kästchen). Die G107S-Mutation hatte für Verbindung **51** mit einem 450-fachen Anstieg des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes in der Hefe auf  $490 \mu\text{M}$  eine besonders deutliche Abnahme der Affinität zum plasmodialen Lactat-Transporter zur Folge (schwarze Kurve, offene Kästchen). In der Kultur mit MMV007839-resistenten Plasmodien war dieser Effekt etwas weniger stark ausgeprägt, jedoch stieg auch hier die für eine halbmaximale Wachstumshemmung benötigte Inhibitorkonzentration um das Siebenfache auf  $70 \mu\text{M}$  (rote Kurve, offene Kästchen). Insbesondere die deutliche Verschiebung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes von **51** in der Hefe deutet darauf hin, dass der sterische Anspruch des eingefügten Restes mit dem Serin in der PfFNT-Mutante kollidiert.

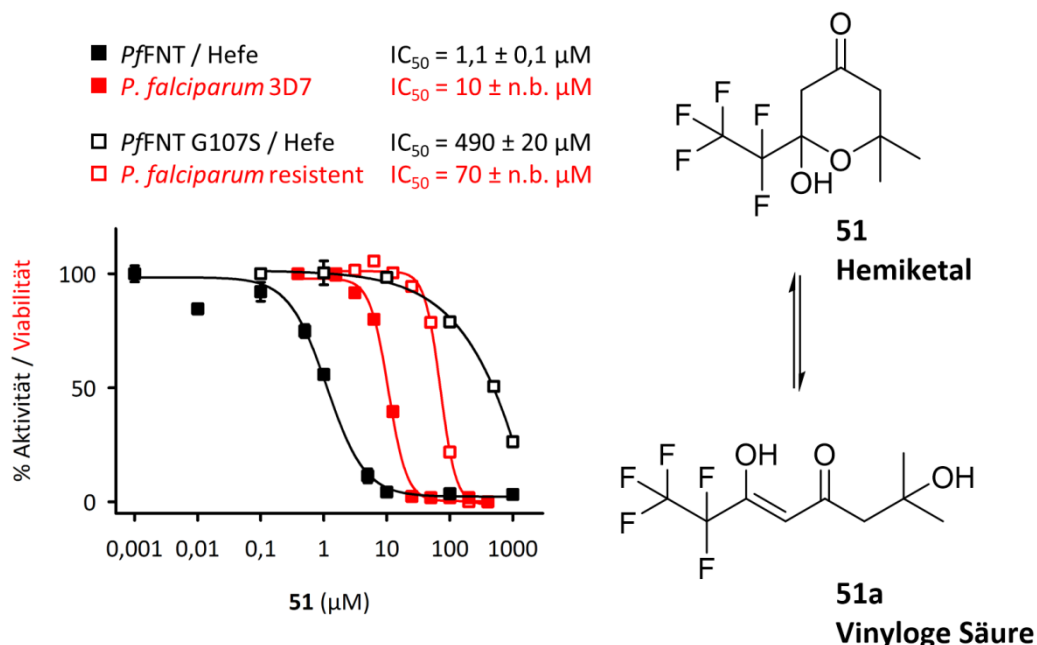


Abbildung 4.41: Bestimmung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte von **51** für die Inhibition von Wildtyp-PfFNT und PfFNT G107S in Hefe (schwarz) und die Viabilität von Wildtyp-Parasiten und resistenten Parasiten (rot).

Hefe: Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat +  $0,04 \mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 30 s (PfFNT) bzw. 120 s (PfFNT G107S). pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

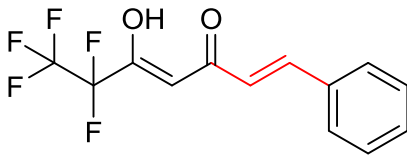
Die Bestimmung der  $\text{IC}_{50}$ -Kurven in den Plasmodien erfolgte an jeweils zwei unabhängigen Parasitenkulturen.

#### 4.9.5 Einfluss eines Linkers zwischen Pharmakophor und aromatischem System

Der deutliche Anstieg des  $IC_{50}$ -Wertes der Verbindung **51** von Wildtyp-*PfFNT* zu *PfFNT* G107S zeigt, dass Inhibitoren mit in Nachbarschaft zur vinylogenen Carbonsäurefunktion befindlichen  $sp^3$ -hybridisierten Kohlenstoffatomen für die Adressierung der *PfFNT*-Mutante nicht geeignet sind. Daher wurde im Folgenden mit Verbindung **52** ein Inhibitor untersucht, bei dem das aromatische System über einen Linker aus zwei  $sp^2$ -hybridisierten Kohlenstoffatomen mit dem Pharmakophor verbunden ist (Abbildung 4.42). Der Grundgedanke war hierbei die Überbrückung der möglicherweise durch die Serin-Seitenkette der *PfFNT* G107S-Mutante gebildeten Engstelle im Transportpfad unter Beibehaltung der durch den Aromaten bedingten Abschirmung des Pharmakophors gegen das Lösungsmittel. Der  $IC_{50}$ -Wert der durch **52** bedingten L-Lactat-Aufnahmehemmung am Wildtyp-*PfFNT* wurde zu 260 nM bestimmt und liegt damit vergleichsweise niedrig, für die Inhibition des MMV007839-resistenten Lactat-Transporters war die Verbindung jedoch ebenfalls nicht geeignet ( $IC_{50} = 25 \mu M$ ). Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der geringen Flexibilität des  $sp^2$ -hybridisierten Linkers liegen.

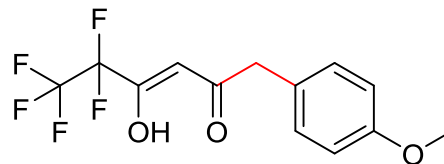
Mit den Verbindungen **53** und **54** wurden daher zwei Inhibitoren synthetisiert, bei denen die Linker zwischen dem aromatischen System und dem Pharmakophor aufgrund einer  $sp^3$ -Hybridisierung mehr Freiheitsgrade aufweisen, dabei jedoch anders als bei Verbindung **51** nicht substituiert sind (Abbildung 4.42). Verbindung **53**, bei der Pharmakophor und Aromat über eine Methylengruppe miteinander verbunden sind, zeigte bereits zum Wildtyp-*PfFNT* eine relativ geringe Affinität ( $IC_{50} = 1,5 \mu M$ ). Der an *PfFNT* G107S-herstellender Hefe beobachtete  $IC_{50}$ -Wert liegt mit  $70 \mu M$  noch einmal um das ca. 50-Fache höher. Dagegen wurde mit Verbindung **54**, bei der der Linker zwei Methyleneinheiten umfasst, zunächst ein wirksamer Inhibitor des Wildtyp-Transporters erhalten ( $IC_{50} = 160 \text{ nM}$ ). Die für die halbmaximale Hemmung der L-Lactat-Aufnahme über *PfFNT* G107S benötigte Konzentration beträgt  $6,3 \mu M$ , was einem 40-fachen Anstieg des  $IC_{50}$ -Wertes entspricht. Verglichen mit BH-296 **37**, der mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $2,7 \mu M$  bisher potentesten Verbindung an *PfFNT* G107S, wurde mit **54** erstmals ein Inhibitor mit ähnlicher Affinität erhalten, der sich jedoch strukturell deutlich unterscheidet. Dies zeigt, dass das Einfügen eines Linkers zwischen dem Pharmakophor und dem aromatischen System der *PfFNT*-Inhibitoren prinzipiell toleriert wird. Eine Affinitätserhöhung zu *PfFNT* G107S konnte jedoch gegenüber BH-296 **37** trotzdem nicht erzielt werden.

## Ergebnisse



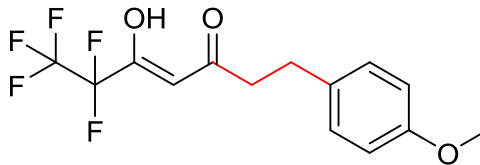
**52**

$0,26 \pm 0,01 \mu\text{M}$  / *PfFNT* Hefe  
 $25 \pm 1 \mu\text{M}$  / *PfFNT* G107S Hefe



**53**

$1,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$  / *PfFNT* Hefe  
 $70 \pm 5 \mu\text{M}$  / *PfFNT* G107S Hefe



**54**

$0,16 \pm 0,01 \mu\text{M}$  / *PfFNT* Hefe  
 $6,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$  / *PfFNT* G107S Hefe

Abbildung 4.42: Einfluss eines Linkers zwischen Pharmakophor und aromatischem System. Verbindung 54 zeigt sowohl zum Wildtyp-*PfFNT* als auch zu *PfFNT* G107S eine ähnliche Affinität wie BH-296, 37, eine Umgehung der Resistenz erfolgt jedoch nicht.

Die Quotienten aus den  $IC_{50}$ -Werten, die für die untersuchten Verbindungen in der Wildtyp-*PfFNT*-herstellenden Hefe beobachtet wurden, und den entsprechenden  $IC_{50}$ -Werten, die an *PfFNT* G107S resultierten, liefern einen relativen Wert für die Selektivität der Inhibitoren für den mutierten Lactat-Transporter (Abbildung 4.43). Ein Wert von eins entspräche hierbei einer Verbindung, die sowohl den Wildtyp-Transporter als auch die Mutante mit identischer Affinität inhibiert. Für nahezu alle untersuchten Verbindungen ergeben sich jedoch Werte von kleiner 0,1 – die Inhibitoren hemmen also selektiv Wildtyp-*PfFNT*. Lediglich das Pharmakophor 41, für welches ein Wert von 0,23 resultiert, zeigt entsprechend der Annahme eines Substrat-analogen Bindemodus eine vergleichsweise geringe Selektivität für einen der Transporter.

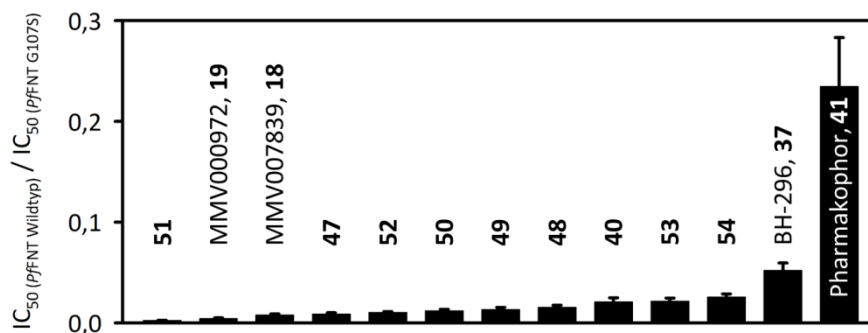
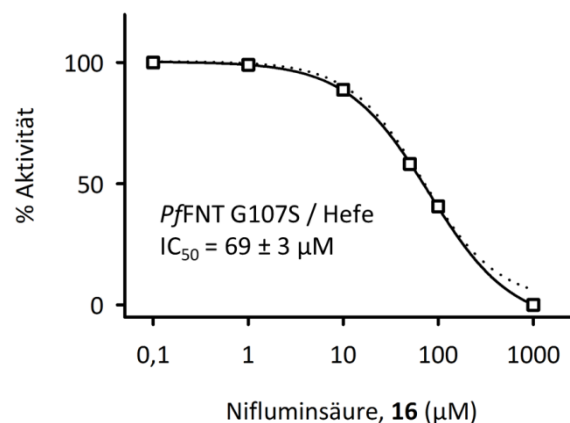


Abbildung 4.43: Relative Selektivität der untersuchten Inhibitoren für *PfFNT* G107S.

#### 4.9.6 Inhibition von *PfFNT G107S* mit Nifluminsäure, **16**

Nifluminsäure **16** war bis zu der in dieser Arbeit erfolgten Entdeckung der Verbindung MMV007839 **18** einer der Inhibitoren mit der höchsten Affinität zu *PfFNT*.<sup>86</sup> Die für eine halbmaximale Hemmung der Wildtyp-*PfFNT*-vermittelten L-Lactat-Aufnahme benötigte Konzentration wurde in der vorliegenden Arbeit zu 72  $\mu\text{M}$  bestimmt (Abschnitt 4.1). Um auch für Nifluminsäure **16** einen Hinweis auf den Ort der Bindung an den plasmodialen Lactat-Transporter zu erhalten, erfolgte abschließend eine Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes der Hemmung der L-Lactat-Aufnahme über *PfFNT G107S* (Abbildung 4.44). Hierbei blieb die Affinität der Verbindung zum mutierten Lactat-Transporter unverändert ( $\text{IC}_{50} = 69 \mu\text{M}$ ), die Bindung von Nifluminsäure **16** an den Transporter wird folglich durch das Serin nicht beeinflusst. Für diesen Inhibitor resultiert daher für die unter Abschnitt 4.9.5 erwähnte *PfFNT G107S*-Selektivität ein Wert von ca. eins. Dies zeigt, dass sich die Bindestellen von Nifluminsäure **16** und MMV007839 **18** an *PfFNT* unterscheiden. Denkbar ist, dass Nifluminsäure **16** auf der extrazellulären Seite des plasmodialen Lactat-Transporters bindet oder, was aufgrund der vergleichsweise geringen Affinität zu *PfFNT* ebenfalls wahrscheinlich erscheint, nicht tief genug in die intrazelluläre Transportpore gelangt, um mit der Hydroxymethyl-Seitenkette des Serins zu interagieren.



**Abbildung 4.44:** Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes von Nifluminsäure, **16** für die *PfFNT G107S*-Hemmung in Hefe. Die gepunktete Linie zeigt zum Vergleich die  $\text{IC}_{50}$ -Kurve von Nifluminsäure, **16** an Wildtyp-*PfFNT*. Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04  $\mu\text{Ci}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 120 s (*PfFNT G107S*). pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

#### 4.10 Hemmung des prokaryotischen Nitrit-Transporters NirC

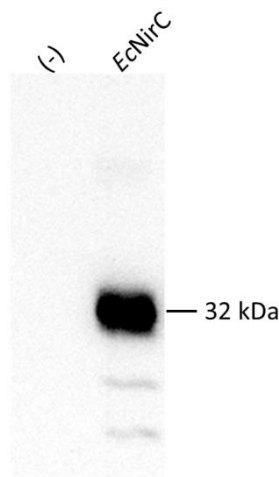
Bereits unter Abschnitt 1.2.1 wurde der Nitrit-Transporter NirC aus dem prokaryotischen, humanpathogenen Erreger *S. typhimurium* als potentielles Wirkstoffziel vorgestellt.<sup>64</sup> Die Salmonellen sind mittels NirC in der Lage, die Immunantwort des Wirtsorganismus zu umgehen, indem sie über den Transporter unter anderem durch den Wirt produziertes Nitrit, welches für die Mikroorganismen toxisch ist, aufnehmen und zu Ammonium entgiften.<sup>66</sup> Da bisher kein Inhibitor von StNirC entdeckt wurde, konnte dessen Eignung als Wirkstoffziel jedoch bislang nicht verifiziert werden. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die bereits

## Ergebnisse

an *PfFNT* untersuchten Inhibitoren Nifluminsäure **16** und MMV007839 **18** zusätzlich hinsichtlich einer inhibitorischen Wirksamkeit an NirC aus *E. coli*, welches zu 90 % mit dem Nitrit-Transporter aus *S. typhimurium* identisch ist, getestet.<sup>120,121</sup> Verglichen mit dem eukaryotischen *PfFNT*, erscheinen dabei jedoch die Voraussetzungen zur Inhibition von prokaryotischen FNTs mittels kleiner Moleküle als wesentlich ungünstiger, da deren Porenöffnungen noch einmal etwas schmaler sind (siehe Abschnitt 1.2.4).<sup>90</sup>

### 4.10.1 Substratselektivität und pH-Abhängigkeit von *EcNirC*

Die Untersuchung der Möglichkeit einer Hemmung von *EcNirC* erfolgte analog zu *PfFNT* im Hefe-basierten Aufnahmeassay unter Verwendung <sup>14</sup>C-radiomarkierter Substrate. Hierfür wurde die *EcNirC*-DNA im Hefektor pDR196 in den *S. cerevisiae* Stamm W303-1A  $\Delta$ *jen1*  $\Delta$ *ady2* eingebracht und zunächst die erfolgreiche Proteinherstellung in der Hefe mittels Western Blot überprüft (Abbildung 4.45).

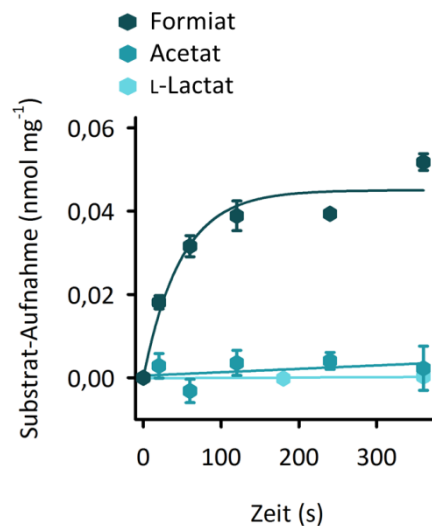


**Abbildung 4.45: Western Blot von *EcNirC*.** Als Primärantikörper wurde der Anti-Penta-His-Antikörper eingesetzt. *EcNirC* besitzt inklusive HA-Tag und His<sub>10</sub>-Tag ein Molekulargewicht von 32 kDa. (-) = Hefe, die kein Protein herstellt.

Um die für eine Inhibition von *EcNirC* günstigsten Parameter im Aufnahmeassay zu bestimmen, wurden anschließend die Transporteigenschaften des Nitrit-Transportes genauer untersucht. In Abbildung 4.46 ist die zeitabhängige Substrataufnahme über *EcNirC* dargestellt: Im Gegensatz zu *PfFNT*, welches, wie bereits von Wu *et al.* gezeigt, eine vergleichsweise geringe Selektivität für ein bestimmtes Substrat aufweist und neben L-Lactat auch Formiat, Acetat oder Pyruvat leitet, wurde von *EcNirC* ausschließlich das kleinste der untersuchten Substrate, Formiat, transportiert.<sup>85</sup> Die größeren Substrate Acetat und L-Lactat wurden dagegen vom Transport ausgeschlossen. Bereits hier wird deutlich, dass der Spielraum hinsichtlich der Molekülgröße für einen Inhibitor, der in die Transportpore des Nitrit-Transporters zu gelangen soll, wesentlich geringer ist, als bei *PfFNT*. Zudem ist in *EcNirC*-herstellender Hefe die Menge an transportiertem Formiat gegenüber Hefe, die *PfFNT* produziert, deutlich reduziert. Während der Nitrit-Transporter auch nach einer Zeit von 240 s eine Aufnahme von nur 0,04 nmol Formiat je Milligramm trockener Hefe zeigte, wurde

## Ergebnisse

durch WIECHERT *et al.* für *PfFNT*-herstellende Hefe im gleichen Zeitraum eine annähernd fünffach höhere Aufnahme von ca. 0,2 nmol je Milligramm Hefe beobachtet.<sup>90</sup> Zusammen mit einer vergleichsweise ausgeprägten Diffusion von Formiat über die Membran der Hefezellen, resultierte für *EcNirC*-herstellende Hefe eine nur etwa 4,5-fach höhere Formiat-Leitfähigkeit als für Hefezellen, die kein Transportprotein produzieren (Abschnitt 6.1.2). Da das *EcNirC*-vermittelte Aufnahmeplateau von Formiat bereits relativ schnell erreicht wird, erfolgte die anschließende Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte der Inhibitoren unter Verwendung einer Substratinkubationszeit von 60 bis 120 s.



**Abbildung 4.46:** Zeitabhängige Substrataufnahme von *EcNirC*: Eine geringe Leitfähigkeit wurde ausschließlich für das kleinste der untersuchten Substrate, Formiat, beobachtet. Acetat und L-Lactat werden ausgeschlossen.

Substrat: 1 mM Formiat, Acetat bzw. L-Lactat + 0,04  $\mu$ Ci [<sup>14</sup>C]-Formiat, [<sup>14</sup>C]-Acetat bzw. [<sup>14</sup>C]-L-Lactat. pH 6,8. Für jedes Substrat wurde die entsprechende Membrandiffusion in Hefe, die kein Protein herstellt, abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

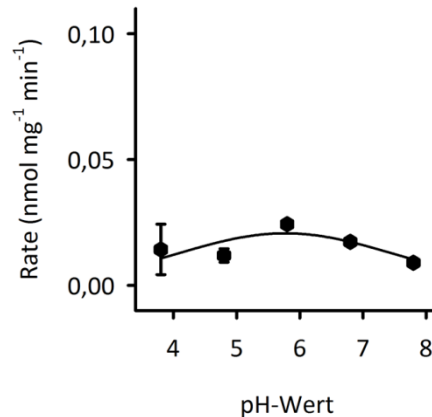
Für den prokaryotischen Formiat-Transporter *FocA* aus *E. coli* und für den eukaryotischen Lactat-Transporter *PfFNT* konnte durch WIECHERT und BEITZ eine pH-Abhängigkeit des Substrat-Transportes gezeigt werden: Dabei kommt es bei einer Verschiebung des pH-Wertes vom Neutralen zum Sauren stets zu einem Anstieg der Transportraten, das Transportmaximum liegt in etwa im Bereich des  $pK_S$ -Wertes des jeweiligen Substrates. So zeigt beispielsweise *FocA* bei der Abnahme des pH-Wertes von 6,8 auf 3,8, dem  $pK_S$ -Wert von Ameisensäure, eine ca. 20-fache Zunahme der Formiat-Transportrate.<sup>74</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls die pH-Abhängigkeit der *EcNirC*-vermittelten Aufnahme von Formiat untersucht (Abbildung 4.47). Um im Aufnahmeassay eine ausreichende Anzahl an Signalen zu generieren, erfolgte die Inkubation der *EcNirC*-herstellenden Hefe mit dem Substrat über einen verlängerten Zeitraum von 90 s, was letztlich in sehr geringen Aufnahmeleistungen resultierte. Diese veränderten sich überraschenderweise über den untersuchten pH-Wert-Bereich von 3,8 bis 7,8 nur wenig, der Transport über *EcNirC* erfolgt demnach pH-unabhängig. Dies steht in einem deutlichen Widerspruch zu dem bei *FocA* und *PfFNT* stark ausgeprägten Anstieg der Aufnahmeleistungen im Sauren – eine Beobachtung, die



## Ergebnisse

letztlich zur Postulierung des unter Abschnitt 1.2.3 beschriebenen Transportmechanismus der FNTs führte.<sup>74</sup> Da für den Nitrit-Transporter über eine Veränderung des pH-Wertes kein signifikanter Anstieg der Formiat-Transportrate zu erzielen ist, wurden die folgenden Untersuchungen zur Hemmung der Formiat-Aufnahme bei einem pH-Wert von 6,8 durchgeführt.



**Abbildung 4.47: pH-Abhängigkeit des *EcNirC*-vermittelten Formiat-Transportes:** Im Gegensatz zu *FocA* und *PfFNT*, bei denen, wie durch WIECHERT und BEITZ bzw. Wu *et al.* gezeigt, die Aufnahmeraten mit sinkenden pH-Werten ansteigen, ist für *EcNirC* bei einer Änderung des pH-Wertes keine Veränderung der Formiat-Aufnahme zu beobachten.<sup>74,85</sup>

Substrat: 1 mM Formiat + 0,04  $\mu\text{Ci}$  [<sup>14</sup>C]-Formiat. Substratinkubationszeit: 90 s. Für jeden pH-Wert wurde die entsprechende Membrandiffusion von Formiat in Hefe, die kein Protein herstellt, abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

### 4.10.2 Inhibition von *EcNirC* im Hefe-basierten Aufnahmeassay: MMV007839, 18

Wie unter Abschnitt 4.7.2 beschrieben, ist es wahrscheinlich, dass MMV007839 **18** ähnlich dem physiologischen Substrat L-Lactat in der Transportpore von *PfFNT* bindet und dadurch den plasmodialen Lactat-Transporter verschließt. Da der Nitrit-Transporter aus *E. coli* jedoch nur eine selektive Leitfähigkeit für Formiat zeigt, während Acetat und L-Lactat ausgeschlossen werden, ist davon auszugehen, dass der Inhibitor aus der Malaria-Box keine große Affinität zu *EcNirC* aufweist. Entsprechend dieser Vermutung resultierte für MMV007839 **18** bei einer Konzentration von 1 mM eine nur ca. 75%ige Inhibition der Formiat-Aufnahme über den Nitrit-Transporter (Abbildung 4.48). Die Hefe zeigte bei geringeren Inhibitor-konzentrationen, bei denen der Formiat-Transport über *EcNirC* nicht gehemmt wird, in Bezug auf die ungehemmte Kontrollhefe stark abweichende Werte für die Formiat-Aufnahme, so dass eine Definition des 100%igen Aktivitätsplateaus nicht möglich ist. Somit kann der IC<sub>50</sub>-Wert von MMV007839 **18** an *EcNirC* ausschließlich, und ohne die Bestimmung eines Fehlerbereiches, zu etwa 520  $\mu\text{M}$  abgeschätzt werden.

## Ergebnisse

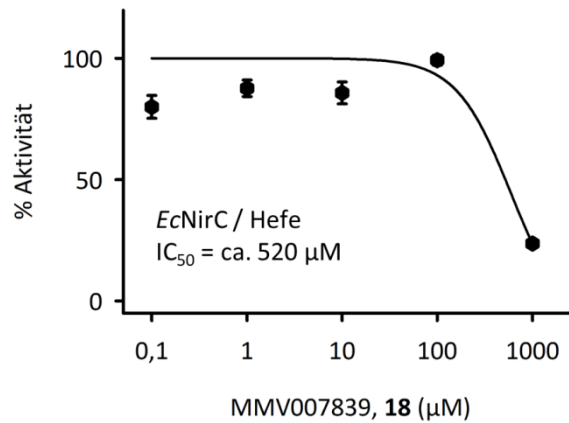


Abbildung 4.48: Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes von MMV007839, 18 für die *EcNirC*-Hemmung in Hefe. Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM Formiat + 0,04  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Formiat, Substratinkubationszeit: 120 s. pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM. Die Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes erfolgte in zwei unabhängigen Experimenten.

### 4.10.3 Inhibition von *EcNirC* mit Nifluminsäure, 16: Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

Weiterhin wurde Nifluminsäure **16** hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirksamkeit auf *EcNirC* untersucht (Abbildung 4.49). Auch hier lassen teilweise stark abweichende Werte keine genaue Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes der Formiat-Aufnahmehemmung zu, dieser kann jedoch auf eine Konzentration von etwa 200  $\mu\text{M}$  geschätzt werden. Damit weist Nifluminsäure **16** wahrscheinlich eine etwas höhere Affinität zu *EcNirC* auf als MMV007839 **18**. Dennoch ist auch die Inhibition des Nitrit-Transporters durch Nifluminsäure **16** zu schwach, um diese *in vitro* an *S. typhimurium* hinsichtlich einer spezifischen antibiotischen Wirkung untersuchen zu können.

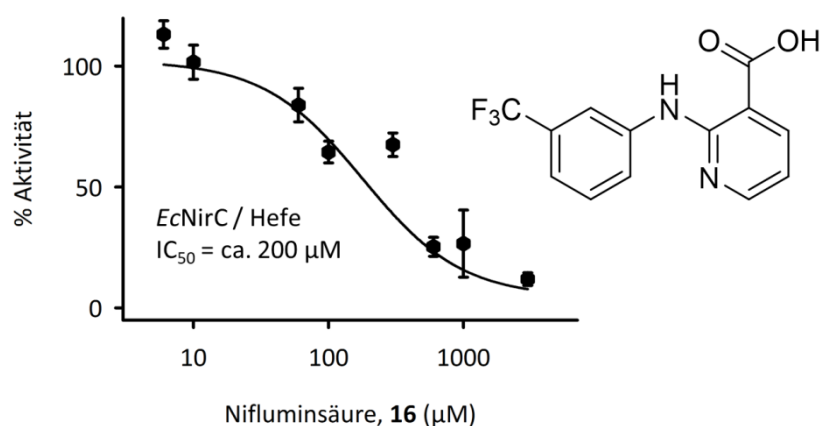


Abbildung 4.49: Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes von Nifluminsäure, 16 für die *EcNirC*-Hemmung in Hefe. Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM Formiat + 0,08–1,0  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Formiat, Substratinkubationszeit: 60 s. pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

## Ergebnisse

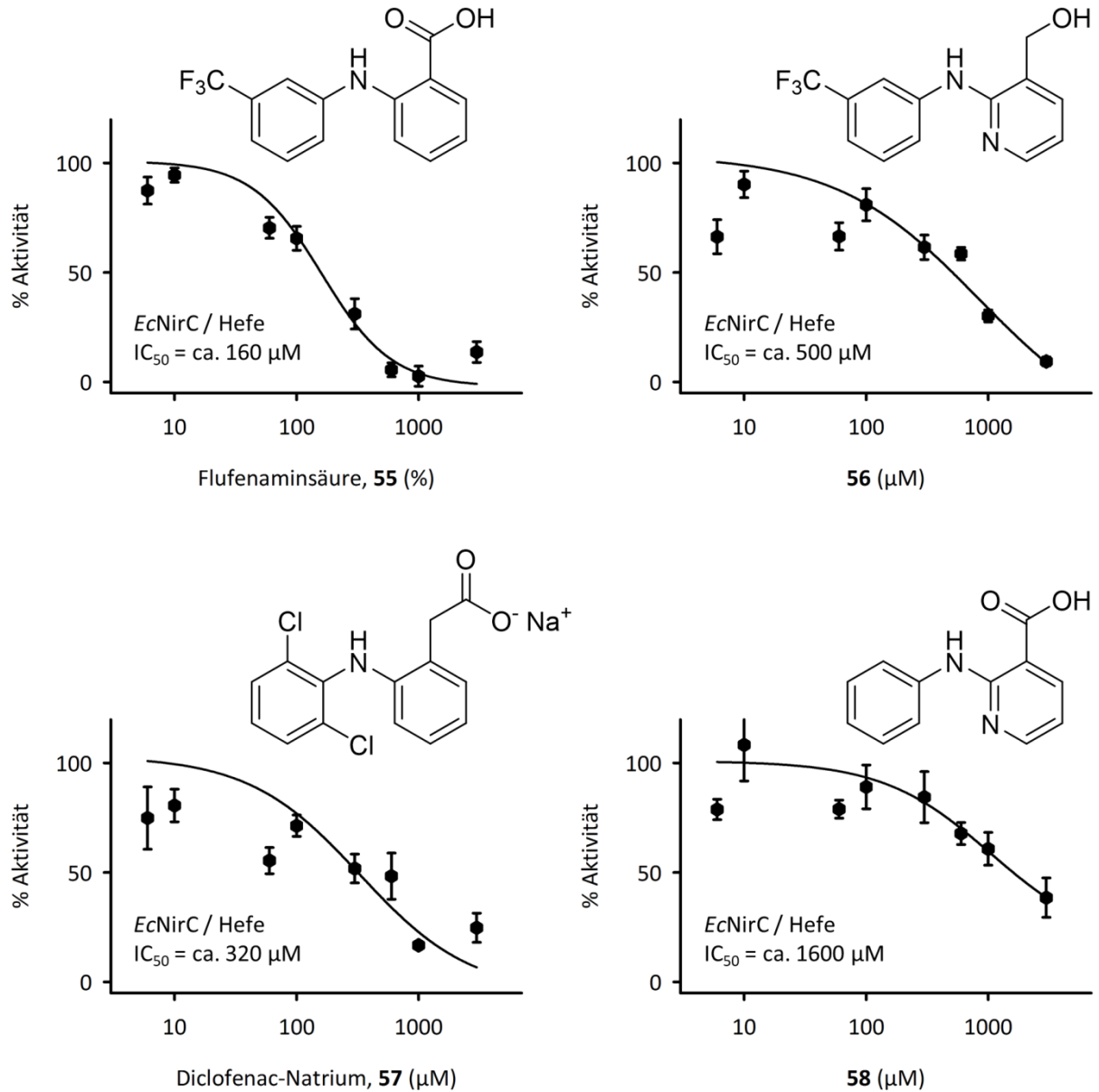
Um ausgehend von Nifluminsäure **16** Inhibitoren generieren zu können, die eine höhere Affinität zu *EcNirC* zeigen, wurden einige Strukturanaloga hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirksamkeit auf den Nitrit-Transporter untersucht. Wie bereits für MMV007839 **18** an *PfFNT*, wurde stets eine identische Inhibitorinkubationszeit verwendet, um Aussagen zum quantitativen Einfluss des jeweils veränderten Strukturmerkmals treffen zu können. Die  $IC_{50}$ -Kurven der Formiat-Aufnahmehemmung durch die Nifluminsäure-Analoga sind in Abbildung 4.50 dargestellt. Wird die Nicotinsäure-Struktur der Nifluminsäure **16** gegen eine Anthranilsäure ersetzt, so resultiert Flufenaminsäure **55**, die ebenfalls ein Cyclooxygenase-Hemmstoff ist. Flufenaminsäure **55** zeigte mit einem  $IC_{50}$ -Wert von ca. 160  $\mu\text{M}$  eine ähnliche Affinität zu *EcNirC* wie Nifluminsäure **16**, was darauf hindeutet, dass der Pyridin-Stickstoff bei der Interaktion des Inhibitors mit dem Protein keine entscheidende Funktion übernimmt. Daneben wurde mit der Flufenaminsäure **55** in der vorliegenden Arbeit, zumindest bei hohen Konzentrationen, erstmals eine vollständige Inhibition des *EcNirC*-vermittelten Formiat-Transportes beobachtet.

Wird ausgehend von Nifluminsäure **16** die Carboxylgruppe zum Alkohol reduziert, so geht die acide Funktion im Molekül verloren. Angesichts der Tatsache, dass alle bisher bekannten Hemmstoffe der FNTs Säuren darstellen (Abschnitt 1.2.4), wäre eine deutliche Abnahme der Affinität der Hydroxy-substituierten Verbindung **56** zu *EcNirC* zu erwarten. Die  $IC_{50}$ -Kurve von **56** ist insbesondere bei Konzentrationen kleiner als 1 mM nur wenig aussagekräftig, die für die halbmaximale Inhibition von *EcNirC* benötigte Konzentration liegt jedoch vermutlich bereits bei 500  $\mu\text{M}$ . Die ausgeprägte *EcNirC*-Hemmung oberhalb einer Konzentration von 1 mM der Verbindung **56** deutet darauf hin, dass hier die Säurefunktion offenbar nicht von übergeordneter Bedeutung für die Affinität des Moleküls zum Protein ist.

Der Cyclooxygenase-Hemmstoff Diclofenac **57** unterscheidet sich bereits relativ stark von Nifluminsäure **16**: Die Carboxylfunktion ist über eine Methylengruppe vom aromatischen System getrennt, letzteres beinhaltet keinen Pyridin-Stickstoff, und das aromatische Substitutionsmuster ist verändert. Auch für Diclofenac **57** deuten die Daten auf eine Hemmung des Nitrit-Transporters oberhalb einer Konzentration von 1 mM hin, eine Abschätzung des  $IC_{50}$ -Wertes ist aufgrund der stark schwankenden Aktivitäten der nicht-gehemmten Hefe jedoch schwer möglich, er könnte jedoch etwa 320  $\mu\text{M}$  betragen. Mit Verbindung **58** wurde weiterhin ein Nifluminsäure-Derivat ohne Fluormethyl-Substituent untersucht. Für dieses Molekül konnte erstmals eine deutliche Abnahme der Affinität zu *EcNirC* beobachtet werden – der  $IC_{50}$ -Wert der Formiat-Aufnahmehemmung liegt mit ca. 1,6 mM um eine Größenordnung über dem der Nifluminsäure **16** ( $IC_{50}$  = ca. 200  $\mu\text{M}$ ). Somit ist ähnlich wie für den Inhibitor MMV007839 **18** an *PfFNT* auch eine Interaktion des Fluoralkylrestes der Nifluminsäure **16** mit *EcNirC* denkbar.

Insgesamt wird jedoch deutlich, dass die Affinität der Inhibitoren zu *EcNirC* zu gering ist, um zweifelsfrei Strukturmerkmale identifizieren zu können, die für eine Interaktion mit dem Nitrit-Transporter notwendig sind. Dabei ist aufgrund der nur schwach ausgeprägten inhibitorischen Wirksamkeit auch eine eher unspezifische Bindung an *EcNirC* denkbar. Zudem sind die im Hefesystem generierten Daten aufgrund der sehr geringen Leitfähigkeit von *EcNirC* für Formiat nur sehr wenig aussagekräftig. Sigmoidale Hemmkurven, wie sie für die Hemmung der *PfFNT*-vermittelten L-Lactat-Aufnahme erhalten wurden, sind für den Nitrit-Transporter wesentlich schwieriger zu generieren.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.50: Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Inhibition des *EcNirC*-vermittelten Formiat-Transportes durch Nifluminsäure, 16. Das Anthranilsäure-Derivat Flufenaminsäure, 55 zeigt eine ähnliche Potenz, der Verlust des Trifluormethylrestes in Verbindung 58 führt zu einer Abnahme des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes um eine Größenordnung.**

**Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM Formiat + 0,08  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Formiat, Substratinkubationszeit: 60 s. pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.**

## 5 Analytischer Teil

### 5.1 NMR-Spektroskopie

#### 5.1.1 MMV007839, 18

##### 5.1.1.1 Einleitung

Die Struktur von 2-Pentafluorethyl-2-hydroxy-7-methoxychroman-4-on (MMV007839 **18**) ist in Abbildung 5.1 dargestellt. Um die Identität der Substanz aus der Malaria-Box zweifelsfrei zu bestätigen, wurde MMV007839 **18** kommerziell bezogen sowie zusätzlich unter der Bezeichnung „BH-312“ synthetisiert. Da für diese Verbindung im Rahmen dieser Arbeit einerseits eine potente Inhibition des plasmodialen Lactat-Transporters nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 4.3) und MMV007839 **18** andererseits auch als Leitstruktur für die Entwicklung weiterer analoger Verbindungen diente, wird im Folgenden die genaue NMR-spektroskopische Charakterisierung der synthetisierten Verbindung vorgenommen.

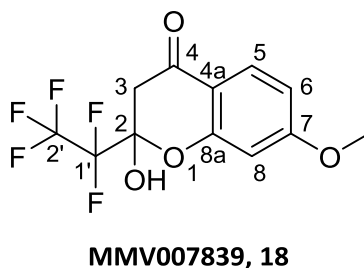


Abbildung 5.1: 2-Pentafluorethyl-2-hydroxy-7-methoxychroman-4-on (MMV007839, **18**) mit Bezifferung der Atompositionen.

##### 5.1.1.2 $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie

Das bei einer Feldstärke von 300 MHz und einer Temperatur von 25 °C in  $[\text{D}_6]$ -DMSO aufgenommene  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von MMV007839 **18** ist in Abbildung 5.2 dargestellt, Teile des aromatischen Bereiches sind zusätzlich vergrößert gezeigt. Die Zuordnung der Signale zu den entsprechenden Protonen ist hier bereits anhand ihrer chemischen Verschiebungen, der Integralverhältnisse und der Multipllettstruktur möglich. So lässt sich dem Dublett (Vergrößerung nicht gezeigt) im tiefen Feld (8.89 ppm) das Proton der Hydroxyfunktion an Position 2 zuordnen. Nach Zugabe von  $\text{D}_2\text{O}$  konnte aufgrund des erfolgten H-/D-Tauschs dieses Signal nicht mehr beobachtet werden. Das Dublett mit einer  $^4J$ -Kopplungskonstanten von 0.8 Hz entsteht hier durch eine Kopplung der Hydroxygruppe mit H-3a. Ein weiteres Signal ist das Dublett bei 7.74 ppm, welches dem aromatischen Proton an Position 5 zugeordnet werden kann. Die Multipllettstruktur resultiert dabei aus der  $^3J$ -Kopplung von 8.8 Hz zum Proton H-6. Die Signale der Protonen an Position 6 und 8 können aufgrund ihrer für aromatische Protonen vergleichsweise hochfeldverschobenen Signale, bedingt durch die Abschirmung aufgrund der *ortho*-ständigen Methoxygruppe, und der entsprechenden Multipllettstruktur

identifiziert werden. So lässt das Dublett eines Dubletts bei 6.75 ppm auf das Proton H-6 schließen. Neben der  $^3J(\text{H-6}/\text{H-5})$ -Kopplung zeigt dieses Proton auch die  $^4J$ -Kopplung von 2.4 Hz zum Proton an Position 8. Dieses wiederum zeigt ein zum Dublett aufgespaltenes Signal mit der korrespondierenden  $^4J(\text{H-8}/\text{H-6})$ -Kopplung bei 6.62 ppm. Die Protonen der Methoxyfunktion an Position 7 lassen sich eindeutig dem tieffeldverschobenen Singulett bei 3.85 ppm mit dem Integral von drei zuordnen.

Aufgrund des benachbarten Stereozentrums an Position 2 sind die beiden Protonen der Methylengruppe an Position 3 magnetisch nicht äquivalent – H-3a und H-3b bilden ein AB-System. Aufgrund der großen Differenz der chemischen Verschiebungen beider Signale (161 Hz) in Bezug auf deren Kopplungskonstante  $^2J(\text{H-3a}/\text{H-3b})$  von 16.6 Hz, ist jedoch eine Auswertung nach den für Spektren erster Ordnung geltenden Regeln sinnvoll. Das entsprechende Dublett eines Dubletts (aufgrund der zusätzlichen  $^4J(\text{H-3a}/\text{OH-2})$ -Kopplung von 0.8 Hz) bei 3.36 ppm und das Dublett bei 2.82 ppm ließen sich nach Zugabe von  $\text{D}_2\text{O}$  nicht mehr beobachten, die Methylengruppe weist daher eine CH-Acidität auf. Ursache hierfür sind die negativen induktiven Effekte der benachbarten Sauerstoffatome und des Perfluor-ethylrestes an Position 2.

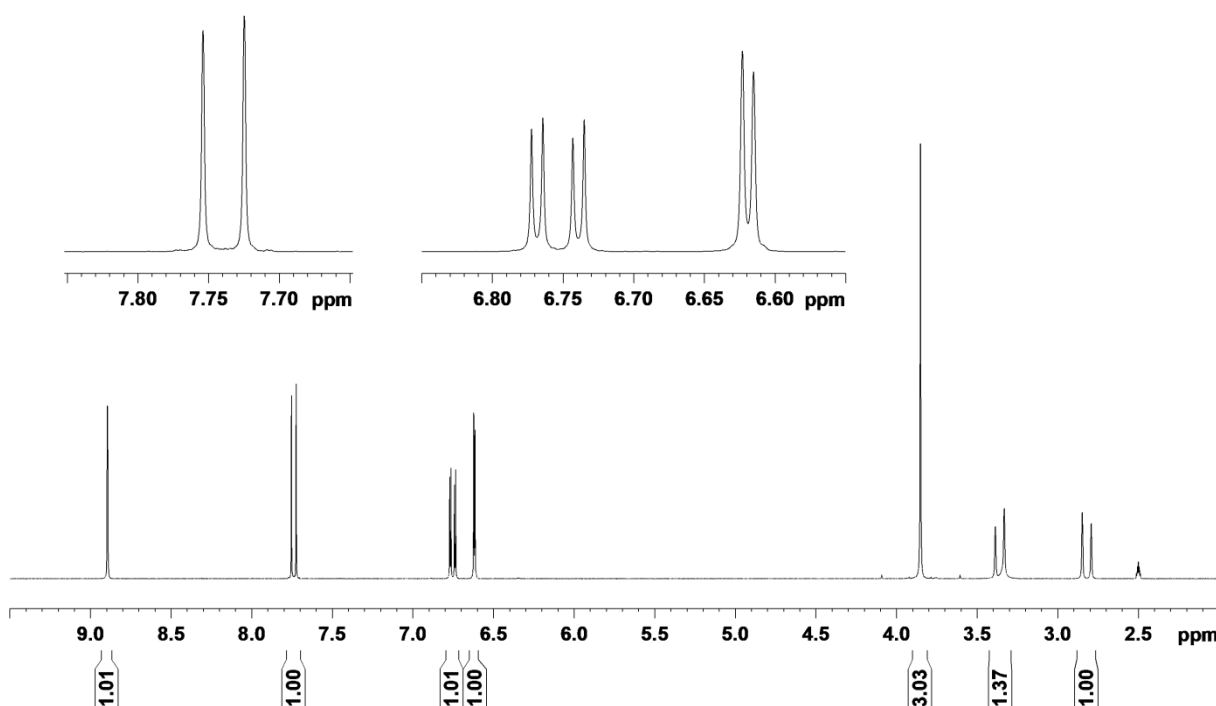


Abbildung 5.2:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von MMV007839, **18**.

### 5.1.1.3 $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie

Das protonenentkoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum und das DEPT135-Spektrum von MMV007839 **18** wurden bei einer Feldstärke von 75 MHz und einer Temperatur von 25 °C in  $[\text{D}_6]$ -DMSO aufgenommen (Abbildung 5.3). Zusätzlich wurde das *Uniform Driven Equilibrium Fourier Transform* (UDEFT) Pulsprogramm angewendet, welches am Ende eines Pulses mit hoher Genauigkeit die Grundmagnetisierung der Kohlenstoffkerne wiederherstellt.<sup>122</sup> Dadurch

werden die Signalintensitäten quartärer Kohlenstoffe vergrößert, so dass die durch Kopplung mit Fluorkernen zu Multipletts aufgespaltenen Signale besser sichtbar werden.

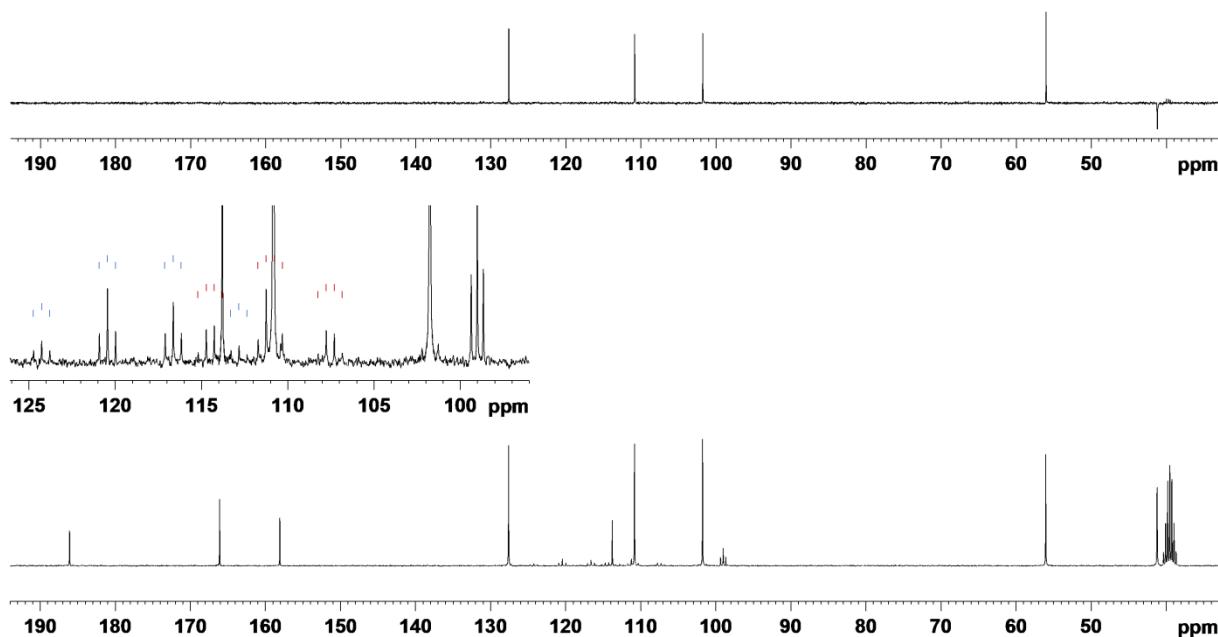


Abbildung 5.3: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (unten) und DEPT135-Spektrum (oben) von MMV007839, 18.

Im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum lassen sich insgesamt 12 Signale finden, davon liegen drei Signale als Multipletts vor. Auch hier lassen sich bereits einige Signale aufgrund ihrer chemischen Verschiebung und ihrer Multiplettstruktur zweifelsfrei zuordnen. Zusätzlich ermöglicht das DEPT135-Spektrum die Identifizierung der protonenträgenden Kohlenstoffatome. Die Tieffeldverschiebung des quartären Kohlenstoffkerns bei 186.1 ppm deutet auf die starke Entschirmung durch den negativen induktiven Effekt des Carbonyl-Sauerstoffs an Position 4 hin. Zwei weitere tieffeldverschobene Signale quartärer Kohlenstoffatome (166.1 ppm und 158.1 ppm) weisen auf die sauerstofftragenden aromatischen Kohlenstoffkerne C-7 und C-8a hin. Jedoch ist hier, wie auch für C-4, die Auswertung des heteronuklearen <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-HMBC-Spektrums für die zweifelsfreie Zuordnung notwendig. Im DEPT135-Spektrum lassen sich bei 127.6 ppm, 110.8 ppm und 101.8 ppm die protonenträgenden aromatischen Kohlenstoffkerne identifizieren, eine genaue Zuordnung ist hier über die Auswertung des <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-HSQC-Spektrums möglich. Daneben ist im aromatischen Bereich nur ein weiteres Singulett bei 113.8 ppm zu erkennen, welches mittels DEPT135-Spektrum als quartäres Kohlenstoffatom identifiziert werden kann. Aufgrund der Multiplettstruktur und der vergleichsweise starken Verschiebung zu hohem Feld, kann dieses Signal sicher Kern C-4a zugeordnet werden. Ebenfalls zweifelsfrei zuordnen lässt sich das Quartett eines Tripletts (blau markiert) bei 118.6 ppm dem Kohlenstoffatom an Position 2'. So resultiert das Quartett mit einer <sup>1</sup>J(C-2'/F-2')-Kopplung von 288 Hz der Multiplizitätsregel entsprechend aus der Kopplung von C-2' mit seinen drei benachbarten Fluorkernen. Die weitere Aufspaltung des Quartetts in Tripletts wird durch die kleinere <sup>2</sup>J(C-2'/F-1')-Kopplung von 35 Hz zu den beiden Fluoratomen an Position 1' bedingt. Dem Kohlenstoffatom an Position 1' kann das Triplet eines Quartetts (rot markiert) bei 111.0 ppm zugeordnet werden. Auch hier entsteht die Aufspaltung zum

Triplet mit der größeren  $^1J$ -Kopplungskonstanten von 262 Hz aus der Kopplung von C-1' mit den zwei direkt gebundenen Fluoratomen und die zusätzliche Aufspaltung in Quartetts mit der kleineren  $^2J$ -Kopplung von 35 Hz durch die Kopplung von C-1' mit den drei Fluorkernen an Position 2'.

Anhand der  $^2J$ -Kopplung von 27 Hz zu den zwei Fluoratomen der CF<sub>2</sub>-Gruppe und aufgrund der durch die negativen induktiven Effekte der Sauerstoffatome und des Perfluorethylrestes verursachten starken Entschirmung, lässt sich C-2 sicher als charakteristisches, stark tieffeldverschobenes (99.0 ppm) Triplet identifizieren. Weitere Signale sind ein Singulett bei 56.0 ppm, bei welchem aufgrund der Verschiebung zu tiefem Feld vom Kohlenstoffatom OCH<sub>3</sub>-7 ausgegangen werden kann, und ein weiteres Singulett bei 41.2 ppm, welches über das korrespondierende negative Signal im DEPT135-Spektrum dem Kohlenstoff der Methylengruppe an Position 3 zugeordnet werden kann.

#### 5.1.1.4 $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HSQC- und HMBC-Spektren

Eine vollständige Zuordnung der Signale des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums zu den Kohlenstoffatomen der Verbindung MMV007839 **18** kann durch die Anwendung zweidimensionaler heteronuklearer NMR-spektroskopischer Techniken erfolgen. Im  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum, welches die  $^1J(\text{H}/\text{C})$ -Kopplungen der Kerne als Kreuzsignale in einem Korrelationspektrum aus  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum wiedergibt (Abbildung 5.4), lassen sich die bereits im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum identifizierten aromatischen Protonen den entsprechenden Kohlenstoffatomen zuordnen. Auch die im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum erfolgte Zuordnung der Kohlenstoffkerne C-3 und OCH<sub>3</sub>-7 kann hier verifiziert werden.

Die eindeutige Zuordnung der verbleibenden quartären Kohlenstoffatome im tiefen Feld kann letztendlich über die Auswertung des  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrums (Abbildung 5.5) durchgeführt werden. Hier liefern vor allem Fernkopplungen zwischen Protonen und Kohlenstoffkernen über zwei und drei Bindungen ( $^2J(\text{H}/\text{C})$  und  $^3J(\text{H}/\text{C})$ ) starke Kreuzsignale, Kopplungen über vier oder fünf Bindungen liefern schwächere Signale,  $^1J(\text{H}/\text{C})$ -Kopplungen werden unterdrückt. Der Kohlenstoffkern bei einer chemischen Verschiebung von 186.1 ppm zeigt intensive Kopplungen mit den beiden Protonen an Position 3 und dem Proton an Position 5, außerdem ein schwächeres Kreuzsignal mit H-8. Zusammen mit der bereits in Kapitel 5.1.1.3 erwähnten starken Tieffeldverschiebung lässt sich dieses Signal eindeutig dem Carbonyl-Kohlenstoff an Position 4 zuordnen. Das Signal des quartären Kohlenstoffs bei 166.1 ppm kann C-7 zugeordnet werden, im  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum zeigt dieser Kern intensive  $^3J(\text{H}/\text{C})$ -Kopplungen zu den Protonen der Methoxygruppe an Position 7 und dem aromatischen Proton an Position 5, außerdem die schwächeren  $^2J(\text{H}/\text{C})$ -Kopplungen zu H-6 und H-8. Das verbleibende Signal im tiefen Feld des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums (158.1 ppm) kann damit C-8a zugeordnet werden. Es zeigt starke Kreuzsignale zu den Kernen H-5 und H-8, die aus der entsprechenden  $^3J(\text{H}/\text{C})$ -, bzw.  $^2J(\text{H}/\text{C})$ -Kopplung resultieren, sowie eine weitere schwache Kopplung mit dem aromatischen Proton an Position 6, die auf die  $^4J(\text{H}/\text{C})$ -Kopplung zurückzuführen ist. Die vollständige Zuordnung der im  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum beobachteten Kreuzsignale zu den entsprechenden Fernkopplungen ist in Tabelle 5.1 dargestellt.



Analytischer Teil

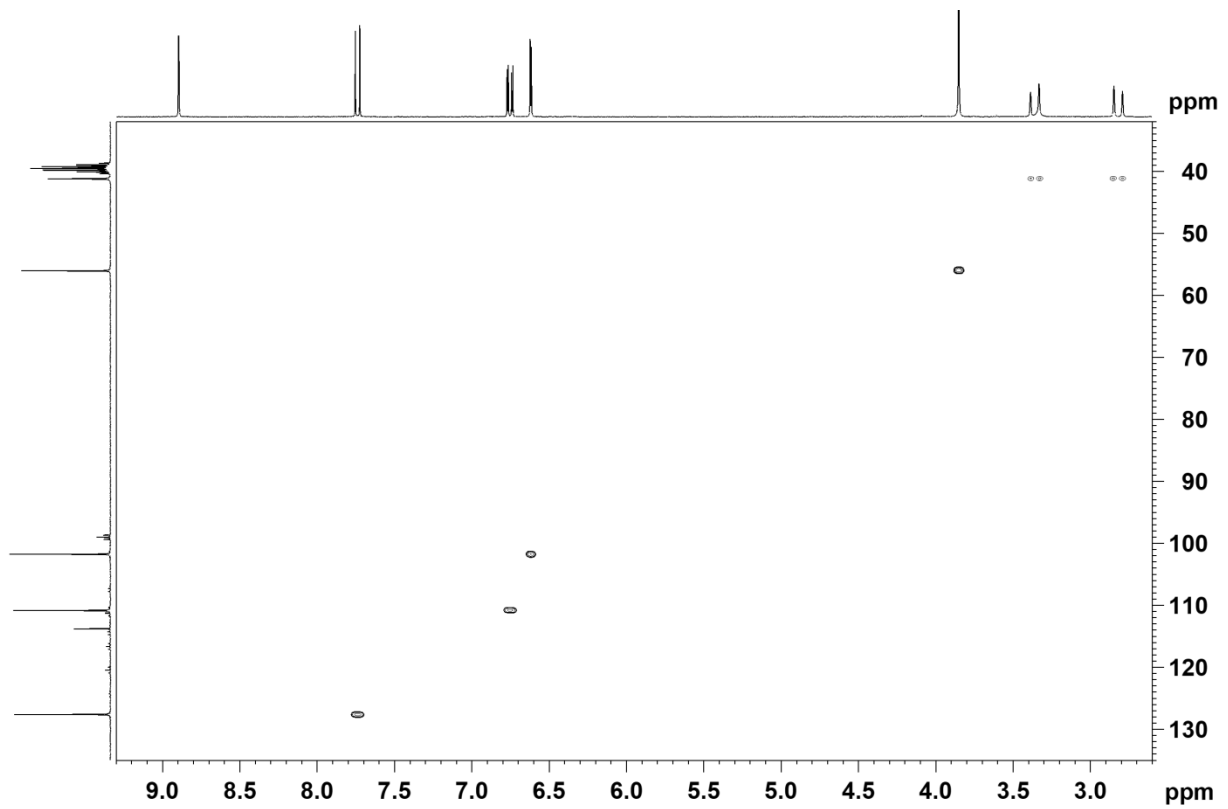


Abbildung 5.4:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum von MMV007839, 18.

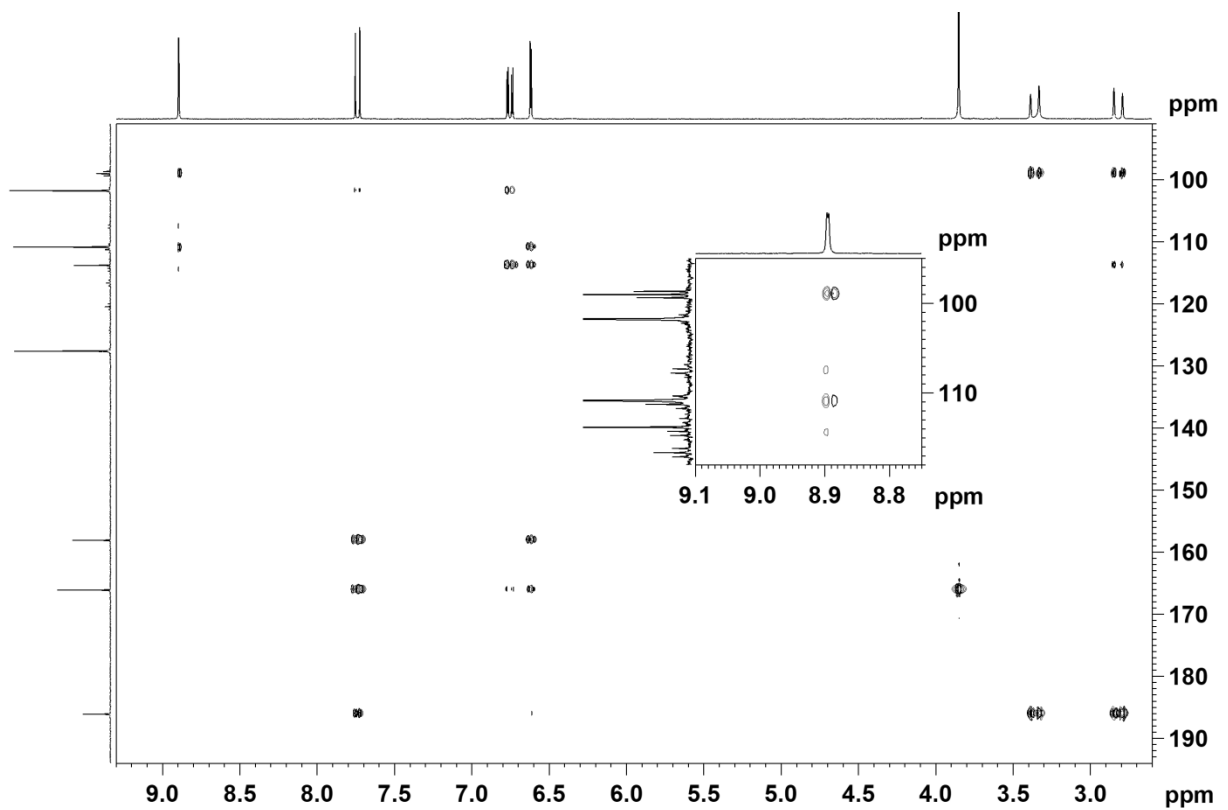


Abbildung 5.5:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum von MMV007839, 18.

Tabelle 5.1: Kopplungen der Kohlenstoffatome von MMV007839, **18** im  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum.

Kohlenstoffatom	$\delta/\text{ppm}$	$^2J$ -Kopplung	$^3J$ -Kopplung	$^4J$ -Kopplung
C-4	186.1	H-3a; H-3b	H-5	H-8
C-7	166.1	H-6; H-8	H-5; OCH <sub>3</sub> -7	
C-8a	158.1	H-8	H-5	H-6
C-5	127.6			H-3b
C-2'	118.6			
C-4a	113.8		H-3b; H-6; H-8	
C-1'	111.0		OH-2; H-3a	
C-6	110.8	H-5	H-8	
C-8	101.8		H-6	H-5
C-2	99.0	OH-2; H-3a; H-3b		
OCH <sub>3</sub> -7	56.0			
C-3	41.2		OH-2	

#### 5.1.1.5 $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie

Das bei einer Feldstärke von 282 MHz und einer Temperatur von 25 °C in [D<sub>6</sub>]-DMSO aufgenommene  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum der Verbindung MMV007839 **18** ist in Abbildung 5.6 dargestellt. Es lassen sich zwei Signale finden, bei deren Integration die aufgrund des Pentafluorethylrestes zu erwartende Verteilung des Fluors im Verhältnis von zwei zu drei beobachtet wird. Dabei zeigen die Fluoratome der CF<sub>2</sub>-Gruppe ein scheinbares Dublett, in der Vergrößerung wird jedoch deutlich, dass es sich, vergleichbar den beiden Protonen der Methylenfunktion an Position 3 (siehe Abschnitt 5.1.1.2), um ein AB-System handelt ( $\delta(\text{F-1}'\text{a}) = -125.7$  ppm (rot markiert),  $\delta(\text{F-1}'\text{b}) = -125.4$  ppm (blau markiert)), da eine magnetische Äquivalenz der beiden Fluorkerne aufgrund des benachbarten Stereozentrums in Position 2 nicht gegeben ist. Da die Differenz der chemischen Verschiebungen beider Signale wesentlich geringer ist als die Kopplungskonstante ( $^2J(\text{F-1}'\text{a}/\text{F-1}'\text{b}) = 276$  Hz), resultiert ein Spinsystem höherer Ordnung mit sehr stark ausgeprägtem Dacheffekt.

Im Gegensatz zur  $^2J$ -Kopplungskonstanten ist die  $^3J$ -Kopplungskonstante zwischen den Fluoratomen der CF<sub>3</sub>- und der CF<sub>2</sub>-Gruppe sehr klein ( $^3J(\text{F-2}'/\text{F-1}') < 1$  Hz), so dass die drei Fluorkerne des Trifluormethylrestes bei einer chemischen Verschiebung von  $-77.7$  ppm nicht aufspalten und als Singulett erkennbar sind.

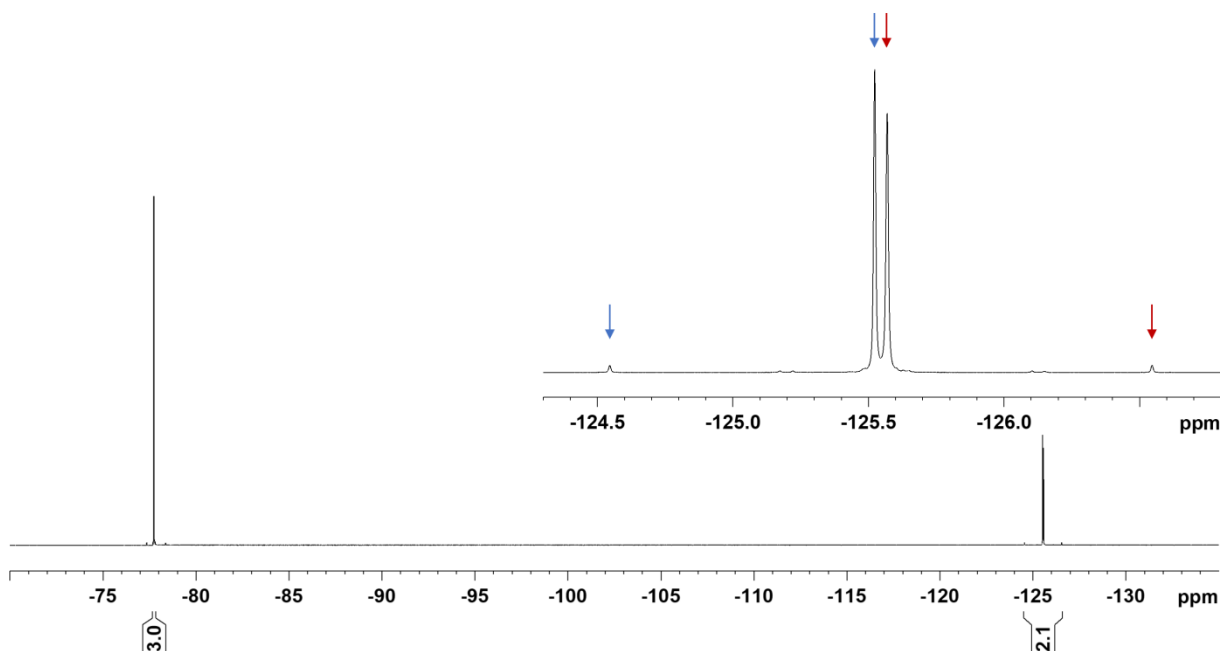
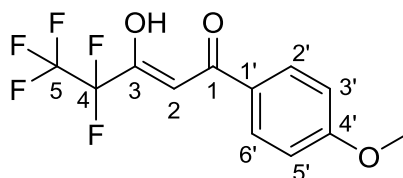


Abbildung 5.6:  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum von MMV007839, **18**.

## 5.1.2 BH-296, **37**

### 5.1.2.1 Einleitung

Wählt man für die Synthese von MMV007839 **18** anstelle von 1-(2-Hydroxy-4-methoxyphenyl)ethan-1-on das nicht-hydroxylierte Derivat als CH-acides Edukt, so wird Verbindung BH-296 **37** erhalten (Abbildung 5.7). Diese unterscheidet sich in ihrer Summenformel von MMV007839 **18** lediglich in einem Sauerstoff, kann jedoch aufgrund der fehlenden aromatischen Hydroxygruppe nicht mehr in die ringgeschlossene Hemiketalform tautomerisieren (siehe Abschnitte 4.7.1 und 4.7.2). BH-296 **37** zeigte eine ebenso potente *Pf*FNT-Hemmung wie MMV007839 **18** (Abschnitt 4.7.2), jedoch zusätzlich eine höhere Affinität zum MMV007839-resistenten *Pf*FNT G107S (Abschnitt 4.9.1), wodurch diese Verbindung als Leitstruktur für die Synthese weiterer offenkettiger *Pf*FNT-Inhibitoren diene. Stellvertretend für diese offenkettigen, vinylogenen Fluoralkylcarbonsäuren soll daher im Folgenden auf die NMR-spektroskopische Charakterisierung dieser Verbindung, besonders im Hinblick auf Unterschiede in Bezug auf MMV007839 **18**, eingegangen werden.



BH-296, **37**

Abbildung 5.7: 4,4,5,5,5-Pentafluor-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)pent-2-en-1-on (BH-296, **37**) mit Bezifferung der Atompositionen.

### 5.1.2.2 Keto-Enol-Tautomerie

BH-296 **37** ist in Abbildung 5.7 in einer Enolform gezeigt, neben diesem Tautomer sind jedoch zusätzliche tautomere Formen denkbar: das Diketon **37a** und eine weitere Enolform **37b**, bei der das aromatische System in Konjugation zur enolischen Doppelbindung steht (Abbildung 5.8). Bekannt ist, dass  $\beta$ -Diketone dazu neigen in die *cis*-Enolform zu tautomerisieren. Zum einen resultiert in dieser Form eine stabilisierende, intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen Hydroxy- und Carbonylfunktion, welche die Bildung eines sechsgliedrigen Ringes zur Folge hat, zum anderen kann ein stabiles System konjugierter Doppelbindungen zwischen den Sauerstoffen resultieren.<sup>107</sup> Folglich wurde das Diketon im Rahmen dieser Arbeit in den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren der offenkettigen MMV007839-Analoga nur selten beobachtet; war dies der Fall, so dominierte die Enolform dabei stets deutlich (siehe Abschnitt 5.2.2).

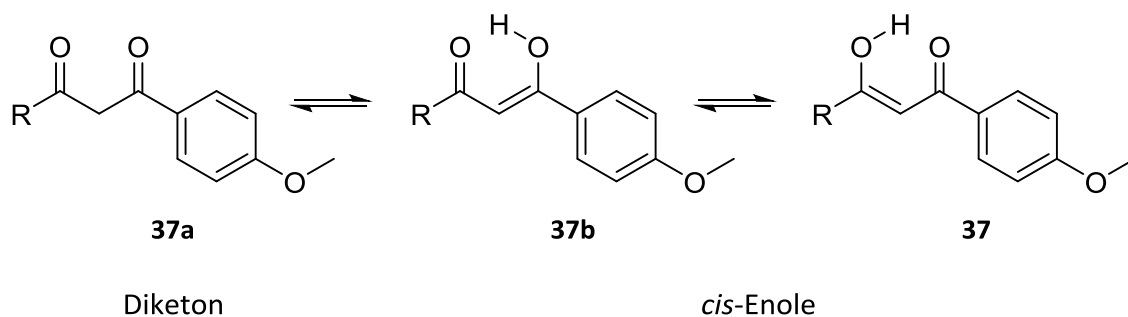


Abbildung 5.8: Keto-Enol- und Enol-Enol-Tautomerie in BH-296, **37** ( $\text{R} = -\text{C}_2\text{F}_5$ ).

Wesentlich schwieriger als die Frage, ob die Diketo- oder die Enolform vorliegt, lässt sich jedoch klären, welche der beiden Enolformen unter den für die NMR-Spektroskopie verwendeten Bedingungen bevorzugt ist. Das Proton der enolischen Hydroxyfunktion liefert ein sehr stark verbreitertes Singulett (siehe Abschnitt 5.1.2.3), welches im  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum keine Fernkopplungen zu Kohlenstoffkernen zeigt. Damit ist mittels NMR-spektroskopischer Untersuchungen ein direkter Nachweis über die Position der Hydroxyfunktion nicht ohne weiteres möglich. Während Sosnovskikh *et al.*<sup>109</sup> für eine ähnliche Verbindung die nicht-konjugierte Enolform annehmen, zeigen Sloop *et al.*<sup>123,124</sup> ein differenzierteres Bild: die Anwendung verschiedener analytischer Methoden, wie NMR-Spektroskopie, Infrarotspektroskopie und UV/Vis-Spektroskopie, legt nahe, dass in BH-296-analogen Verbindungen in den meisten Fällen das konjugierte Enol bevorzugt ist. Dennoch existieren auch hier Ausnahmen; so bildet das Trifluormethylanalogon von Verbindung **49** überwiegend das nicht-konjugierte Enol aus.<sup>124</sup>

Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die in dieser Arbeit untersuchten offenkettigen Verbindungen aufgrund des negativen induktiven Effektes der benachbarten Fluoralkylfunktion vinyloge Carbonsäuren darstellen. Diese liegen unter den Bedingungen des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Aufnahmeassays mit  $^{14}\text{C}$ -radiomarkierten Substraten (wässriger Puffer, pH 6,8) und in der *P. falciparum* Kultur zu einem großen Teil deprotoniert vor, so dass letztendlich die negativ geladene Spezies mit einem zwischen den beiden Sauerstoffen des

Ketonenols delokalisiertem Elektronenpaar für die Hemmung des *Pf*FNTs verantwortlich gemacht werden kann. Daher, und weil für die innerhalb dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen eine klare Aussage zur Lage des Enol-Enol-Gleichgewichtes mit den vorhandenen analytischen Möglichkeiten nicht ohne weiteres möglich ist, wurde die Frage nach dem bevorzugten Enol hier nicht weiter adressiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden deshalb die Strukturformeln der offenkettigen MMV007839-Analoga in der gesamten Arbeit in derjenigen Enolform dargestellt, in der die Doppelbindung nicht in Konjugation mit dem aromatischen System steht.

### 5.1.2.3 $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie

In Abbildung 5.9 ist das bei einer Feldstärke von 300 MHz und einer Temperatur von 25 °C in  $[\text{D}_6]$ -DMSO aufgenommene  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von BH-296 **37** gezeigt. Auffällig ist das stark verbreiterte Singulett bei einer chemischen Verschiebung von 12.58 ppm, welches durch das acide Proton der Hydroxyfunktion an Position 3 verursacht wird. Dieses ist als Proton der vinylogenen Säurefunktion nicht nur leicht austauschbar, sondern kann innerhalb dieser auch eine Wasserstoffbrückenbindung zum  $\beta$ -ständigen Carbonylsauerstoff ausbilden, wodurch die starke Signalverbreiterung resultiert. Der *para*-substituierte Aromat liefert zwei Signale höherer Ordnung mit einem Integral von zwei: bei 8.14 ppm den AA'-Teil und bei 7.11 ppm den XX'-Teil des AA'XX'-Systems. Durch Auswertung der  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC- und HMBC-Spektren lassen sich dem AA'-Teil die Protonen der Positionen 2' und 6' zuordnen, den XX'-Teil bilden H-3' und H-5'. Ebenfalls bei tiefem Feld (6.99 ppm) lässt sich ein Singulett mit einem Integral von eins beobachten, welches H-2 zuzuordnen ist. Diese Position entspricht der bei MMV007839 **18** durch den Ringschluss zum Hemiketal entstehenden Position 3, die dort eine Methylenfunktion darstellt (siehe Abschnitt 4.7.1). Wie diese ist auch H-2 in BH-296 **37** CH-acide, kann also nach Zusatz von  $\text{D}_2\text{O}$  aufgrund des H-/D-Austauschs nicht mehr beobachtet werden. Die Methoxygruppe an Position 4' liefert analog zu MMV007839 **18** ein Singulett bei 3.88 ppm.

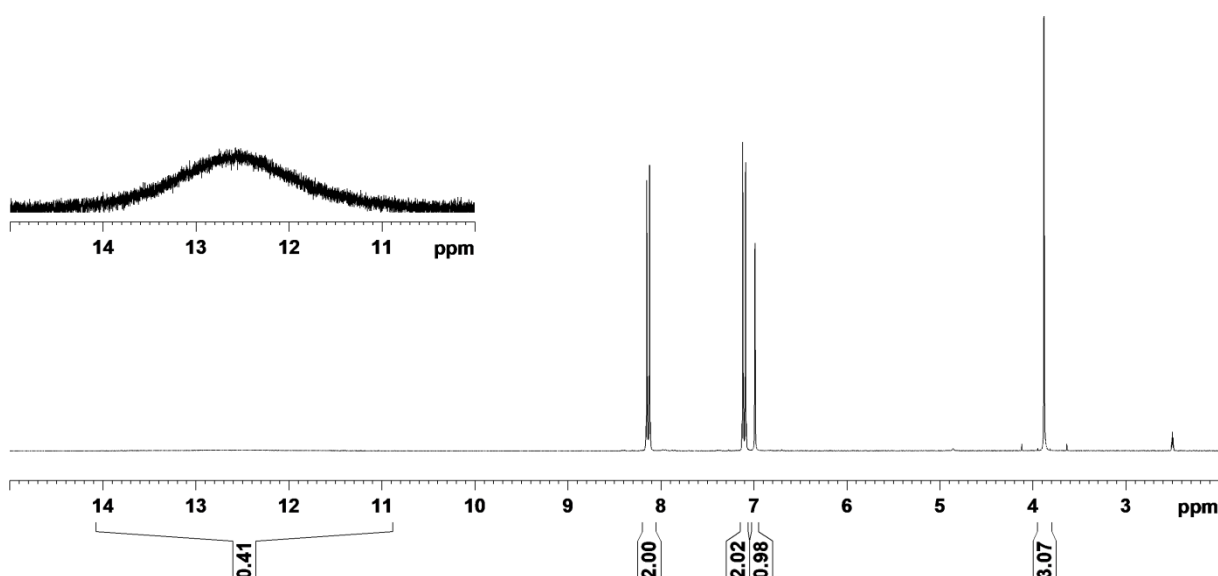


Abbildung 5.9:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von BH-296, **37**.

#### 5.1.2.4 $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie

Das protonenentkoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von BH-296 **37**, welches bei einer Feldstärke von 75 MHz und einer Temperatur von 25 °C in  $[\text{D}_6]$ -DMSO unter Anwendung des UDEFT-Pulsprogramms aufgenommen wurde, ist in Abbildung 5.10 dargestellt. Verglichen mit dem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von MMV007839 **18**, lassen sich zwei Signale weniger finden. Ursache ist die chemische Äquivalenz der protonen tragenden Kohlenstoffkerne des *para*-substituierten Aromaten. So zeigen die chemisch äquivalenten Kerne C-2' und C-6', sowie C-3' und C-5' sehr intensive Singulettts bei 130.8 ppm bzw. 114.7 ppm, analog den chemischen Verschiebungen der entsprechenden Kohlenstoffkerne C-5 und C-6 in MMV007839 **18**. Mit MMV007839 **18** vergleichbar in ihrer chemischen Verschiebung sind die Signale der beiden aromatischen Kohlenstoffatome C-4' und C-1' (diese entsprechen C-7 bzw. C-4a in MMV007839 **18**) mit 164.7 ppm bzw. 124.5 ppm, das Signal der Carbonylfunktion an Position 1 bei einer chemischen Verschiebung von 185.9 ppm und  $\text{OCH}_3$ -4' bei einer chemischen Verschiebung von 55.8 ppm. Auch die Multipllettstrukturen und die chemischen Verschiebungen der  $\text{CF}_3$ -Gruppe (Quartett von Triplettts bei 118.0 ppm; blau markiert) und der  $\text{CF}_2$ -Gruppe (Triplett von Quartetts bei 107.6 ppm; rot markiert) sind analog zur Verbindung MMV007839 **18**. Eine im Vergleich zum ringgeschlossenen Hemiketal MMV007839 **18** sehr starke Tieffeldverschiebung zeigt hingegen das Signal des Kohlenstoffkerns an Position 3. So lässt sich das charakteristische Triplett, welches aus der  $^2J$ -Kopplung von 26 Hz zu den Fluoratomen der  $\text{CF}_2$ -Gruppe resultiert, bei 174.7 ppm beobachten, verglichen mit der chemischen Verschiebung von 99.0 ppm für den dieser Position entsprechenden Kern C-2 in MMV007839 **18** ist dies ein deutlicher Tieffeldshift. Ursache hierfür ist die im Vergleich zu C-2 in MMV007839 **18** noch einmal verstärkte Entschirmung durch die enolische Doppelbindung und den Wegfall des aliphatischen Methylenrestes. Einen weiteren Unterschied in der chemischen Verschiebung zeigt das Signal des Kerns C-2 der Verbindung BH-296 **37**: auch dieses ist, verglichen mit dem Signal des entsprechenden Kohlenstoffatoms der Position 3 in MMV007839 **18**, weiter zu tiefem Feld verschoben (93.4 ppm). Zusätzlich zeigt sich im DEPT135-Spektrum nun ein positives Signal, da dieser Kohlenstoff nur ein Proton trägt. Dies ist somit ein direkter Beweis dafür, dass BH-296 **37** in  $[\text{D}_6]$ -DMSO nahezu vollständig in der Enolform vorliegt; ein negatives DEPT135-Signal, und damit ein Hinweis auf eine vorhandene Diketon-Struktur konnte nicht beobachtet werden.

## Analytischer Teil

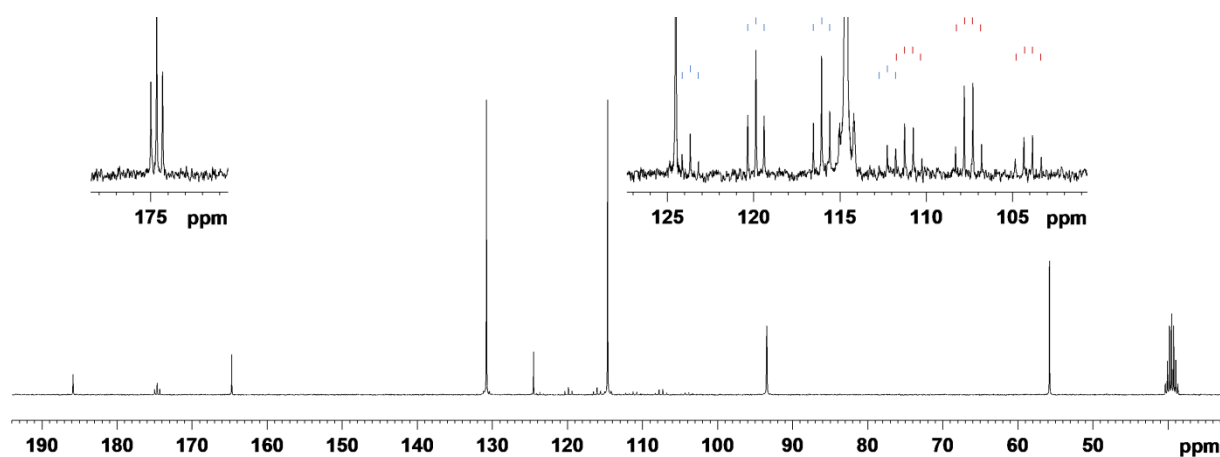


Abbildung 5.10:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von BH-296, 37.

### 5.1.2.5 $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie

Im  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum, welches bei einer Feldstärke von 282 MHz und einer Temperatur von 25 °C in  $[\text{D}_6]$ -DMSO aufgenommen wurde (Abbildung 5.11), zeigen die Fluorkerne der  $\text{CF}_2$ -Gruppe der Verbindung BH-296 **37** ein Signal erster Ordnung, da sie im Gegensatz zu den Fluoratomen der  $\text{CF}_2$ -Gruppe in MMV007839 **18** kein benachbartes Stereozentrum aufweisen und damit magnetisch äquivalent sind. Jedoch ist hier die  $^3J$ -Kopplungskonstante zwischen den Fluoratomen an Position 4 und denen an Position 5 mit 2 Hz größer. Daher kann für die beiden Fluoratome an Position 4 der Multiplizitätsregel entsprechend ein Quartett bei einer chemischen Verschiebung von  $-122.2$  ppm und für die drei Fluoratome an Position 5 ein Triplet bei einer chemischen Verschiebung von  $-81.7$  ppm beobachtet werden.

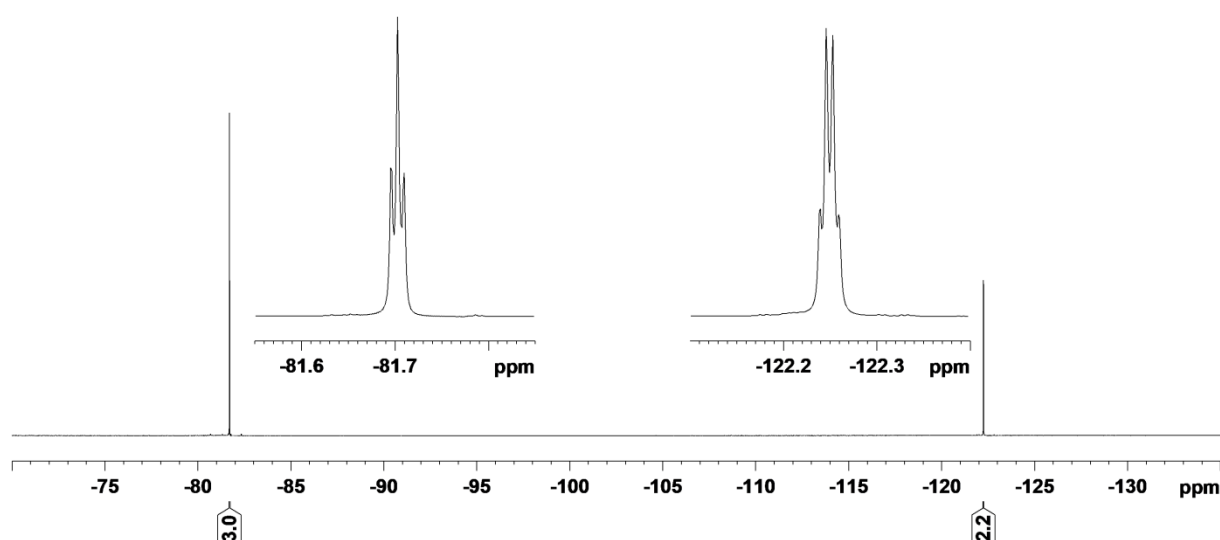


Abbildung 5.11:  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum von BH-296, 37.

### 5.1.3 Zusammenfassung

Unter Anwendung verschiedener ein- und zweidimensionaler NMR-spektroskopischer Messtechniken konnten alle Protonen, sowie die Kohlenstoff- und Fluorkerne der Verbindungen MMV007839 **18** und BH-296 **37** den entsprechenden Signalen in den Spektren zugeordnet werden. Darauf basierend konnten alle im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten analogen Verbindungen hinsichtlich ihrer Struktur zweifelsfrei charakterisiert werden. Weiterhin ermöglichte die Identifizierung charakteristischer NMR-spektroskopischer Signale den Nachweis, dass die Hemiketale abhängig vom Lösungsmittel gleichzeitig in der offenkettigen und der ringgeschlossenen Form nebeneinander vorliegen können (siehe Abschnitt 4.7.1). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die  $\beta$ -Dicarbonyl-Seitenkette der BH-296-Analoga in den im Rahmen der NMR-spektroskopischen Experimente verwendeten Lösungsmitteln überwiegend die Enolform ausbildet und damit OH-acide Verbindungen resultieren (siehe Abschnitt 5.1.2.4).

Eine zusammengefasste Zuordnung der  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{19}\text{F}$ -NMR-Signale ist nachfolgend für MMV007839 **18** (Tabelle 5.2) und BH-296 **37** (Tabelle 5.3) angegeben.



Analytischer Teil

Tabelle 5.2: Übersicht der vollständigen Zuordnung der  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{19}\text{F}$ -NMR-Signale von MMV007839, 18.

Atom- position	$^1\text{H}$ -NMR	$^{13}\text{C}$ -NMR	$^{19}\text{F}$ -NMR
	$\delta$ /ppm (Intensität), Multipllett; Kopplung	$\delta$ /ppm (Intensität), Multipllett; Kopplung	$\delta$ /ppm (Intensität), Multipllett; Kopplung
<b>1</b>	-	-	-
<b>2</b>	-	99.0 (1C), t; $^2J(\text{C-2}/\text{F-1}') = 27 \text{ Hz}$	-
<b>OH-2</b>	8.89 (1H), d; $^4J(\text{OH-2}/\text{H-3a}) = 0.8 \text{ Hz}$	-	-
<b>3</b>	3.36 (1H), dd; $^2J(\text{H-3a}/\text{H-3b}) = 16.6 \text{ Hz}$ , $^4J(\text{H-3a}/\text{OH-2}) = 0.8 \text{ Hz}$ 2.82 (1H), d; $^2J(\text{H-3b}/\text{H-3a}) = 16.6 \text{ Hz}$	41.2 (1C), s	-
<b>4</b>	-	186.1 (1C), s	-
<b>4a</b>	-	113.8 (1C), s	-
<b>5</b>	7.74 (1H), d; $^3J(\text{H-5}/\text{H-6}) = 8.8 \text{ Hz}$	127.6 (1C), s	-
<b>6</b>	6.75 (1H), dd; $^3J(\text{H-6}/\text{H-5}) = 8.8 \text{ Hz}$ , $^4J(\text{H-6}/\text{H-8}) = 2.4 \text{ Hz}$	110.8 (1C), s	-
<b>7</b>	-	166.1 (1C), s	-
<b>OCH<sub>3</sub>-7</b>	3.85 (3H), s	56.0 (1C), s	-
<b>8</b>	6.62 (1H), d; $^4J(\text{H-8}/\text{H-6}) = 2.4 \text{ Hz}$	101.8 (1C), s	-
<b>8a</b>	-	158.1 (1C), s	-
<b>1'</b>	-	111.0 (1C), tq; $^1J(\text{C-1}'/\text{F-1}') = 262 \text{ Hz}$ , $^2J(\text{C-1}'/\text{F-2}') = 35 \text{ Hz}$	-125.7 (1F), AB-System; $^2J(\text{F-1}'\text{a}/\text{F-1}'\text{b}) = 276 \text{ Hz}$ -125.4 (1F), AB-System; $^2J(\text{F-1}'\text{b}/\text{F-1}'\text{a}) = 276 \text{ Hz}$
<b>2'</b>	-	118.6 (1C), qt; $^1J(\text{C-2}'/\text{F-2}') = 288 \text{ Hz}$ , $^2J(\text{C-2}'/\text{F-1}') = 35 \text{ Hz}$	-77.7 (3F), s

## Analytischer Teil

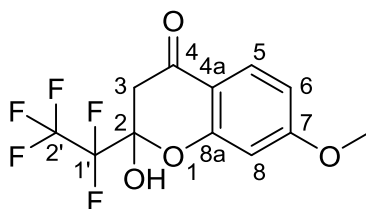
 Tabelle 5.3: Übersicht der vollständigen Zuordnung der  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{19}\text{F}$ -NMR-Signale der Verbindung BH-296, 37.

Atom- position	$^1\text{H}$ -NMR	$^{13}\text{C}$ -NMR	$^{19}\text{F}$ -NMR
	$\delta/\text{ppm}$ (Intensität), Multipllett; Kopplung	$\delta/\text{ppm}$ (Intensität), Multipllett; Kopplung	$\delta/\text{ppm}$ (Intensität), Multipllett; Kopplung
<b>1</b>	-	185.9 (1C), s	-
<b>2</b>	6.99 (1H), s	93.4 (1C), s	-
<b>3</b>	-	174.7 (1C), t; $^2J(\text{C-3/F-4}) = 26 \text{ Hz}$	-
<b>OH-3</b>	12.58 (1H), br s	-	-
<b>4</b>	-	107.6 (1C), tq; $^1J(\text{C-4/F-4}) = 261 \text{ Hz}$ , $^2J(\text{C-4/F-5}) = 38 \text{ Hz}$	-122.2 (2F), q; $^3J(\text{F-4/F-5}) = 2 \text{ Hz}$
<b>5</b>	-	118.0 (1C), qt; $^1J(\text{C-5/F-5}) = 287 \text{ Hz}$ , $^2J(\text{C-5/F-4}) = 36 \text{ Hz}$	-81.7 (3F), t; $^3J(\text{F-5/F-4}) = 2 \text{ Hz}$
<b>1'</b>	-	124.5 (1C), s	-
<b>2', 6'</b>	8.14 (2H), <b>AA'</b> XX'-System	130.8 (2C), s	-
<b>3', 5'</b>	7.11 (2H), <b>AA'</b> XX'-System	114.7 (2C), s	-
<b>4'</b>	-	164.7 (1C), s	-
<b>OCH<sub>3</sub>-4'</b>	3.88 (3H), s	55.8 (1C), s	-

## 5.2 Synthetisierte Verbindungen

### 5.2.1 Hemiketale

#### 2-Pentafluorethyl-2-hydroxy-7-methoxychroman-4-on (MMV007839, 18)



Die Synthese erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 2,88 g (15,0 mmol) Ethylpentafluorpropanoat und 2,08 g (12,5 mmol) 1-(2-Hydroxy-4-methoxyphenyl)ethan-1-on.

**C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>F<sub>5</sub>O<sub>4</sub> (312,19 g/mol)**

Ausbeute: 1,20 g (3,8 mmol), 31 %

Schmelzpunkt: 96 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,08$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 8.89 (d, <sup>4</sup>J(OH-2/H-3a) = 0.8 Hz, 1H; OH-2), 7.74 (d, <sup>3</sup>J(H-5/H-6) = 8.8 Hz, 1H; H-5), 6.75 (dd, <sup>3</sup>J(H-6/H-5) = 8.8 Hz, <sup>4</sup>J(H-6/H-8) = 2.4 Hz, 1H; H-6), 6.62 (d, <sup>4</sup>J(H-8/H-6) = 2.4 Hz, 1H; H-8), 3.85 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>-7), 3.36 (dd, <sup>2</sup>J(H-3a/H-3b) = 16.6 Hz, <sup>4</sup>J(H-3a/OH-2) = 0.8 Hz, 1H; H-3a), 2.82 (d, <sup>2</sup>J(H-3b/H-3a) = 16.6 Hz, 1H; H-3b).

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

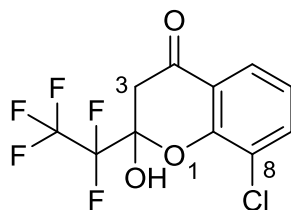
$\delta$ /ppm = 186.1 (1C; C-4), 166.1 (1C; C-7), 158.1 (1C; C-8a), 127.6 (1C; C-5), 118.6 (qt, <sup>1</sup>J(C-2'/F-2') = 288 Hz, <sup>2</sup>J(C-2'/F-1') = 35 Hz, 1C; C-2'), 113.8 (1C; C-4a), 111.0 (tq, <sup>1</sup>J(C-1'/F-1') = 262 Hz, <sup>2</sup>J(C-1'/F-2') = 35 Hz, 1C; C-1'), 110.8 (1C; C-6), 101.8 (1C; C-8), 99.0 (t, <sup>2</sup>J(C-2/F-1') = 27 Hz, 1C; C-2), 56.0 (1C; OCH<sub>3</sub>-7), 41.2 (1C; C-3).

**<sup>19</sup>F-NMR (282 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO (CFCl<sub>3</sub> in [D<sub>6</sub>]-DMSO als externer Standard):**

$\delta$ /ppm = -125.7 (A-Teil des AB-Systems, <sup>2</sup>J(F-1'a/F-1'b) = 276 Hz, <sup>3</sup>J(F-1'a/F-2') < 1 Hz, 1F; F-1'a), -125.4 (B-Teil des AB-Systems, <sup>2</sup>J(F-1'b/F-1'a) = 276 Hz, <sup>3</sup>J(F-1'b/F-2') < 1 Hz, 1F; F-1'b), -77.7 (s, <sup>3</sup>J(F-2'/F-1') < 1 Hz, 3F; F-2').

**MS (ESI negativ):**

m/z (%): 311 (100) [M-H]<sup>-</sup>, 645 (28) [2M-2H+Na]<sup>-</sup>.

**8-Chlor-2-pentafluorethyl-2-hydroxychroman-4-on (24)**

Die Synthese erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 1,34 g (7,0 mmol) Ethylpentafluorpropanoat und 1,00 g (5,9 mmol) 1-(3-Chlor-2-hydroxyphenyl)ethan-1-on.

**C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>ClF<sub>5</sub>O<sub>3</sub> (316,61 g/mol)**

Ausbeute: 0,74 g (2,3 mmol), 40 %

Schmelzpunkt: 98 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,09$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 9.21 (s, 1H; OH-2), 7.84 (dd, 1H; Ar-H), 7.78 (dd, 1H; Ar-H), 7.21 (t, 1H; Ar-H), 3.58 (d, 1H; H-3a), 2.96 (d, 1H; H-3b).

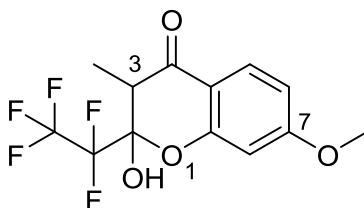
**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 187.3 (1C), 151.6 (1C), 136.5 (1C), 124.7 (1C), 123.2 (1C), 122.2 (1C), 121.8 (1C), 118.5 (1C), 110.8 (1C), 99.5 (1C), 41.4 (1C).

**MS (ESI negativ):**

$m/z$  (%): 653 (100) [2M-2H+Na]<sup>-</sup> (<sup>35</sup>Cl, <sup>35</sup>Cl), 655 (65) [2M-2H+Na]<sup>-</sup> (<sup>35</sup>Cl, <sup>37</sup>Cl), 657 (14) [2M-2H+Na]<sup>-</sup> (<sup>37</sup>Cl, <sup>37</sup>Cl), 315 (13) [M-H]<sup>-</sup> (<sup>35</sup>Cl), 669 (12) [2M-2H+K]<sup>-</sup> (<sup>35</sup>Cl, <sup>35</sup>Cl), 671 (10) [2M-2H+K]<sup>-</sup> (<sup>35</sup>Cl, <sup>37</sup>Cl).

**2-Pentafluorethyl-2-hydroxy-7-methoxy-3-methylchroman-4-on (26)**



Die Synthese erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 2,88 g (15,0 mmol) Ethylpentafluorpropanoat und 2,25 g (12,5 mmol) 1-(2-Hydroxy-4-methoxyphenyl)propan-1-on.

**C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>F<sub>5</sub>O<sub>4</sub> (326,22 g/mol)**

Ausbeute: 1,15 g (3,5 mmol), 28 %

Schmelzpunkt: 104 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,12$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 8.74 (s, 1H; OH-2), 7.72 (d, 1H; Ar-H), 6.74 (dd, 1H; Ar-H), 6.55 (d, 1H; Ar-H), 3.84 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>-7), 3.34 (m, 1H; H-3), 1.25 (m, 3H; CH<sub>3</sub>-3).

Die Angaben entsprechen dem in [D<sub>6</sub>]-DMSO mit 70 % hauptsächlich vorliegenden Diastereomer.

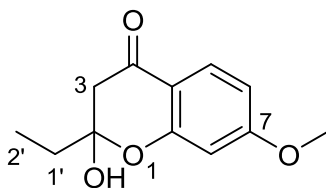
**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 188.8 (1C), 165.8 (1C), 157.4 (1C), 127.8 (1C), 118.6 (1C), 113.4 (1C), 111.8 (1C), 110.7 (1C), 101.5 (1C), 101.2 (1C), 56.0 (1C), 44.9 (1C), 8.1 (1C).

Die Angaben entsprechen dem in [D<sub>6</sub>]-DMSO mit 70 % hauptsächlich vorliegenden Diastereomer.

**MS (ESI positiv):**

$m/z$  (%): 327 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**2-Ethyl-2-hydroxy-7-methoxychroman-4-on (27)**

Die Synthese erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 1,53 g (15,0 mmol) Ethylpropanoat und 2,08 g (12,5 mmol) 1-(2-Hydroxy-4-methoxyphenyl)ethan-1-on.

**C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub> (222,24 g/mol)**

Ausbeute: 0,05 g (0,2 mmol), 2 %

Schmelzpunkt: 83 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,12$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 7.65 (d, 1H; Ar-H), 6.76 (d, 1H; OH-2), 6.60 (dd, 1H; Ar-H), 6.49 (d, 1H; Ar-H), 3.80 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>-7), 2.91 (dd, 1H; H-3a), 2.56 (d, 1H; H-3b), 1.88 (m, 2H; H-1'), 0.97 (t, 3H; H-2').

Die Angaben entsprechen der in [D<sub>6</sub>]-DMSO mit ca. 90 % überwiegend vorliegenden Hemiketalform, Signale offenkettiger Tautomere konnten ebenfalls beobachtet werden.

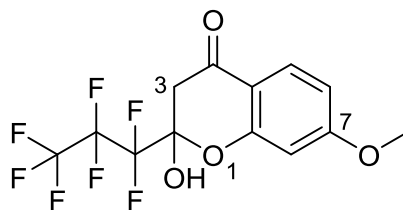
**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 190.2 (1C), 165.5 (1C), 160.6 (1C), 127.2 (1C), 114.4 (1C), 108.8 (1C), 103.8 (1C), 101.5 (1C), 55.7 (1C), 45.3 (1C), 33.1 (1C), 8.1 (1C).

Die Angaben entsprechen der in [D<sub>6</sub>]-DMSO überwiegend vorliegenden Hemiketalform.

**MS (ESI positiv):**

$m/z$  (%): 223 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 205 (46) [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 151 (33) [M+H-OC(CH<sub>3</sub>)(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)]<sup>+</sup>, 445 (26) [2M+H]<sup>+</sup>, 467 (14) [2M+Na]<sup>+</sup>.

**2-Heptafluorpropyl-2-hydroxy-7-methoxychroman-4-on (31)**

Die Synthese erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 3,63 g (15,0 mmol) Ethylheptafluorbutanoat und 2,08 g (12,5 mmol) 1-(2-Hydroxy-4-methoxyphenyl)ethan-1-on.

**C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>F<sub>7</sub>O<sub>4</sub> (362,20 g/mol)**

Ausbeute: 1,93 g (5,3 mmol), 43 %

Schmelzpunkt: 104 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,07$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 8.97 (s, 1H; OH-2), 7.74 (d, 1H; Ar-H), 6.76 (dd, 1H; Ar-H), 6.59 (d, 1H; Ar-H), 3.85 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>-7), 3.37 (d, 1H; H-3a), 2.84 (d, 1H; H-3b).

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

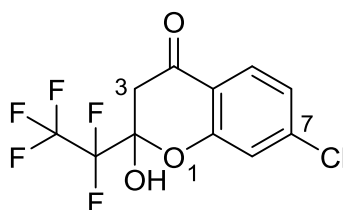
$\delta$ /ppm = 186.0 (1C), 166.1 (1C), 158.0 (1C), 127.6 (1C), 117.5 (1C), 113.8 (1C), 112.5 (1C), 110.8 (1C), 101.7 (1C), 99.7 (1C), 56.0 (1C), 41.3 (1C).

Aufgrund der starken Aufspaltung durch die Fluorkopplung wurde CF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>-2 nicht beobachtet.

**MS (ESI negativ):**

$m/z$  (%): 361 (100) [M-H]<sup>-</sup>, 745 (11) [2M-2H+Na]<sup>-</sup>.

**7-Chlor-2-pentafluorethyl-2-hydroxychroman-4-on (33)**



Die Synthese erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 2,88 g (15,0 mmol) Ethylpentafluorpropanoat und 2,13 g (12,5 mmol) 1-(4-Chlor-2-hydroxyphenyl)ethan-1-on.

**C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>ClF<sub>5</sub>O<sub>3</sub> (316,61 g/mol)**

Ausbeute: 2,50 g (7,9 mmol), 63 %

Schmelzpunkt: 130 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,18$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 9.09 (s, 1H; OH-2), 7.82 (dd, 1H; Ar-H), 7.30 (dd, 1H; Ar-H), 7.27 (dd, 1H; Ar-H), 3.50 (d, 1H; H-3a), 2.92 (d, 1H; H-3b).

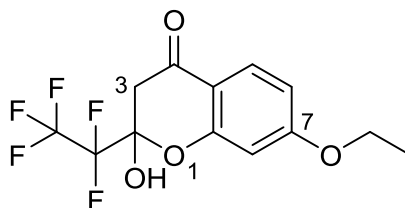
**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 186.9 (1C), 156.5 (1C), 140.9 (1C), 127.6 (1C), 123.3 (1C), 119.2 (1C), 118.5 (1C), 118.4 (1C), 110.9 (1C), 99.3 (1C), 41.6 (1C).

**MS (ESI negativ):**

$m/z$  (%): 315 (100) [M-H]<sup>-</sup> (<sup>35</sup>Cl), 653 (52) [2M-2H+Na]<sup>-</sup> (<sup>35</sup>Cl, <sup>35</sup>Cl), 317 (36) [M-H]<sup>-</sup> (<sup>37</sup>Cl), 655 (36) [2M-2H+Na]<sup>-</sup> (<sup>35</sup>Cl, <sup>37</sup>Cl).



**7-Ethoxy-2-pentafluorethyl-2-hydroxychroman-4-on (34)**

Die Synthese erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 2,88 g (15,0 mmol) Ethylpentafluorpropanoat und 2,25 g (12,5 mmol) 1-(4-Ethoxy-2-hydroxyphenyl)ethan-1-on.

**C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>F<sub>5</sub>O<sub>4</sub> (326,22 g/mol)**

Ausbeute: 1,3 g (4,0 mmol), 32 %

Schmelzpunkt: 97 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,10$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

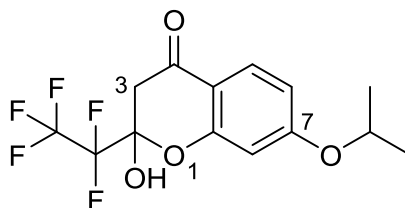
$\delta$ /ppm = 8.88 (s, 1H; OH-2), 7.72 (d, 1H; Ar-H), 6.73 (dd, 1H; Ar-H), 6.59 (d, 1H; Ar-H), 4.13 (q, 2H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-7), 3.35 (d, 1H; H-3a), 2.81 (d, 1H; H-3b), 1.33 (t, 3H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-7).

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 186.1 (1C), 165.4 (1C), 158.1 (1C), 127.6 (1C), 118.5 (1C), 113.7 (1C), 111.1 (1C), 111.0 (1C), 102.1 (1C), 99.0 (1C), 64.2 (1C), 41.2 (1C), 14.4 (1C).

**MS (ESI negativ):**

$m/z$  (%): 325 (100) [M-H]<sup>-</sup>, 673 (11) [2M-2H+Na]<sup>-</sup>.

**2-Pentafluorethyl-2-hydroxy-7-isopropoxychroman-4-on (35)**

Die zur Synthese von **35** benötigte Ausgangsverbindung 1-(2-Hydroxy-4-isopropoxyphenyl)ethan-1-on wurde im Sinne einer Williamson-Ethersynthese dargestellt: 5,00 g (32,9 mmol) 1-(2,4-Dihydroxyphenyl)ethan-1-on und 9,08 g (65,7 mmol)  $K_2CO_3$  wurden in 20,0 ml *N,N*-Dimethylformamid (DMF) (abs.) suspendiert und anschließend 8,08 g (65,7 mmol) 2-Brompropan, gelöst in 20,0 ml DMF (abs.), langsam zugetropft. Nach Zusatz einer Spatelspitze KI wurde das Reaktionsgemisch auf eine Temperatur von 80-90 °C erhitzt und so lange gerührt, bis die Umsetzung abgeschlossen war (kontrolliert mittels DC). Anschließend wurde das Reaktionsgemisch filtriert, vom Lösungsmittel befreit und das Rohprodukt säulenchromatographisch (MPLC) an Kieselgel mit einem Fließmittelgemisch aus Cyclohexan und Essigsäureethylester (97:3) aufgereinigt.

Die anschließende Synthese von **35** erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 2,88 g (15,0 mmol) Ethylpentafluorpropanoat und 2,43 g (12,5 mmol) 1-(2-Hydroxy-4-isopropoxyphenyl)ethan-1-on.

 **$C_{14}H_{13}F_5O_4$  (340,25 g/mol)**

Ausbeute: 2,90 g (8,5 mmol), 68 %

Schmelzpunkt: 102 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,12$

 **$^1H$ -NMR (300 MHz, 25 °C,  $[D_6]$ -DMSO):**

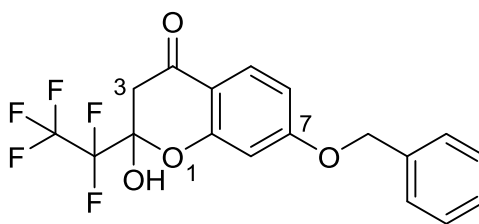
$\delta$ /ppm = 8.85 (s, 1H; OH-2), 7.72 (d, 1H; Ar-H), 6.72 (dd, 1H; Ar-H), 6.57 (d, 1H; Ar-H), 4.78 (m, 1H; OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-7), 3.33 (d, 1H; H-3a), 2.81 (d, 1H; H-3b), 1.29 (d, 3H; OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-7a), 1.28 (d, 3H; OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-7b).

 **$^{13}C$ -NMR (75 MHz, 25 °C,  $[D_6]$ -DMSO):**

$\delta$ /ppm = 186.0 (1C), 164.4 (1C), 158.1 (1C), 127.7 (1C), 118.6 (1C), 113.5 (1C), 111.6 (1C), 111.1 (1C), 102.9 (1C), 99.0 (1C), 70.4 (1C), 41.2 (1C), 21.62 (1C), 21.58 (1C).

**MS (ESI negativ):**

$m/z$  (%): 339 (100)  $[M-H]^-$ , 701 (10)  $[2M-2H+Na]^-$ .

**7-Benzyloxy-2-pentafluorethyl-2-hydroxychroman-4-on (36)**

Die zur Synthese von **36** benötigte Ausgangsverbindung 1-(4-Benzyloxy-2-hydroxyphenyl)ethan-1-on wurde im Sinne einer Williamson-Ethersynthese dargestellt: 5,00 g (32,9 mmol) 1-(2,4-Dihydroxyphenyl)ethan-1-on und 9,08 g (65,7 mmol)  $K_2CO_3$  wurden in 20,0 ml DMF (abs.) suspendiert und anschließend 6,18 g (36,1 mmol) Benzylbromid, gelöst in 20,0 ml DMF (abs.), langsam zugetropft. Nach Zusatz einer Spatelspitze KI wurde das Reaktionsgemisch auf eine Temperatur von 80-90 °C erhitzt und so lange gerührt, bis die Umsetzung abgeschlossen war (kontrolliert mittels DC). Anschließend wurde das Reaktionsgemisch filtriert, vom Lösungsmittel befreit und das Rohprodukt säulenchromatographisch (MPLC) an Kieselgel mit einem Fließmittelgemisch aus Cyclohexan und Essigsäureethylester (97:3) aufgereinigt.

Die anschließende Synthese von **36** erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 2,88 g (15,0 mmol) Ethylpentafluorpropanoat und 3,03 g (12,5 mmol) 1-(4-Benzyloxy-2-hydroxyphenyl)ethan-1-on.

 **$C_{18}H_{13}F_5O_4$  (388,29 g/mol)**

Ausbeute: 0,87 g (2,2 mmol), 18 %

Schmelzpunkt: 133 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,07$

 **$^1H$ -NMR (300 MHz, 25 °C,  $[D_6]$ -DMSO):**

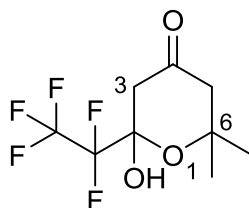
$\delta$ /ppm = 8.92 (s, 1H; OH-2), 7.75 (d, 1H; Ar-H), 7.40 (m, 5H;  $OCH_2C_6H_5$ -7), 6.83 (dd, 1H; Ar-H), 6.72 (d, 1H; Ar-H), 5.23 (s, 2H;  $OCH_2C_6H_5$ -7), 3.37 (d, 1H; H-3a), 2.83 (d, 1H; H-3b).

 **$^{13}C$ -NMR (75 MHz, 25 °C,  $[D_6]$ -DMSO):**

$\delta$ /ppm = 186.1 (1C), 165.1 (1C), 158.0 (1C), 136.2 (1C), 128.5 (2C), 128.1 (1C), 127.7 (2C), 127.6 (1C), 118.5 (1C), 113.9 (1C), 111.4 (1C), 111.0 (1C), 102.7 (1C), 99.0 (1C), 69.9 (1C), 41.2 (1C).

**MS (ESI positiv):**

$m/z$  (%): 389 (100)  $[M+H]^+$ .

**2-Pentafluorethyl-2-hydroxy-6,6-dimethyltetrahydro-4H-pyran-4-on (51)**

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an BÜTTNER *et al.*:<sup>125</sup> 0,25 g (11,0 mmol) Natrium wurden bei einer Temperatur von 0 °C in einem Gemisch aus 0,53 ml (13,0 mmol) Methanol (abs.) und 1,04 ml (10,0 mmol) Diethylether (abs.) gelöst und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 1,92 g (10,0 mmol) Ethylpentafluorpropanoat zugesetzt und weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 1,16 g (10,0 mmol) 4-Hydroxy-4-methylpentan-2-on wurde das Reaktionsgemisch 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Beendigung der Reaktion wurden 3,5 ml einer 10%igen wässrigen Schwefelsäurelösung zugegeben und anschließend die wässrige Phase zweimal mit jeweils 30 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch (MPLC) an Kieselgel mit einem Fließmittelgemisch aus Cyclohexan und Essigsäureethylester (9:1) aufgereinigt.

**C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>F<sub>5</sub>O<sub>3</sub> (262,18 g/mol)**

Ausbeute: 0,19 g (0,7 mmol), 7 %

Schmelzpunkt: 77 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,07$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 7.45 (s, 1H; OH-2), 2.90 (d, 1H; H-3a), 2.62 (A-Teil des AB-Systems, 1H; H-5a), 2.55 (B-Teil des AB-Systems, 1H; H-5b), 2.51 (d, 1H; H-3b), 1.34 (s, 3H; CH<sub>3</sub>-6a), 1.26 (s, 3H; CH<sub>3</sub>-6b).

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

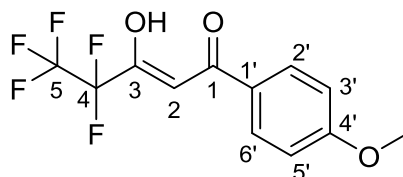
$\delta$ /ppm = 203.2 (1C), 118.8 (1C), 111.4 (1C), 96.8 (1C), 76.7 (1C), 50.1 (1C), 43.1 (1C), 30.0 (1C), 29.5 (1C).

**MS (ESI negativ):**

$m/z$  (%): 261 (100) [M-H]<sup>-</sup>, 203 (13) [M-OC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-H]<sup>-</sup>.

## 5.2.2 Vinyloge Fluoralkylcarbonsäuren

### 4,4,5,5,5-Pentafluor-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)pent-2-en-1-on (BH-296, 37)



Die Synthese erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 2,88 g (15,0 mmol) Ethylpentafluorpropanoat und 1,88 g (12,5 mmol) 1-(4-Methoxyphenyl)ethan-1-on.

**C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>F<sub>5</sub>O<sub>3</sub> (296,19 g/mol)**

Ausbeute: 2,45 g (8,3 mmol), 66 %

Schmelzpunkt: 41 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,27$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 12.58 (br s, 1H; OH-3), 8.14 (AA'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; H-2' und H-6'), 7.11 (XX'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; H-3' und H-5'), 6.99 (s, 1H; H-2), 3.88 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>-4').

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

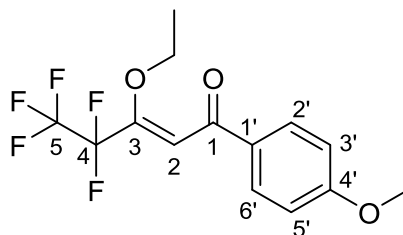
$\delta$ /ppm = 185.9 (1C; C-1), 174.7 (t, <sup>2</sup>J(C-3/F-4) = 26 Hz, 1C; C-3), 164.7 (1C; C-4'), 130.8 (2C; C-2' und C-6'), 124.5 (1C; C-1'), 118.0 (qt, <sup>1</sup>J(C-5/F-5) = 287 Hz, <sup>2</sup>J(C-5/F-4) = 36 Hz, 1C; C-5), 114.7 (2C; C-3' und C-5'), 107.6 (tq, <sup>1</sup>J(C-4/F-4) = 261 Hz, <sup>2</sup>J(C-4/F-5) = 38 Hz, 1C; C-4), 93.4 (1C; C-2), 55.8 (1C; OCH<sub>3</sub>-4').

**<sup>19</sup>F-NMR (282 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO (CFCl<sub>3</sub> in [D<sub>6</sub>]-DMSO als externer Standard):**

$\delta$ /ppm = -122.2 (q, <sup>3</sup>J(F-4/F-5) = 2 Hz, 2F; F-4), -81.7 (t, <sup>3</sup>J(F-5/F-4) = 2 Hz, 3F; F-5).

**MS (ESI negativ):**

m/z (%): 613 (100) [2M-2H+Na]<sup>-</sup>, 295 (94) [M-H]<sup>-</sup>.

**3-Ethoxy-4,4,5,5,5-pentafluor-1-(4-methoxyphenyl)pent-2-en-1-on (BH-296-Ethylester-Prodrug, 38)**

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an KURTS *et al.*:<sup>126</sup> In 5,0 ml DMF (abs.) wurden 0,59 g (2,0 mmol) BH-296 **37** und 0,65 g (2,0 mmol) Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> vorgelegt und eine Stunde bei 70 °C gerührt. Anschließend wurden 0,44 g (2,2 mmol) 4-Methylbenzolsulfonsäureethylester gelöst in 5,0 ml DMF (abs.) langsam tropfenweise zugegeben und für weitere 6 h bei 70 °C gerührt. Zur Beendigung der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch auf Wasser gegeben und die wässrige Phase zweimal mit jeweils 30 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Das so erhaltene Öl wurde anschließend an Kieselgel säulenchromatographisch (MPLC) mit einem Fließmittelgemisch aus Cyclohexan, Essigsäureethylester und Diethylamin (94:5:1) aufgereinigt.

**C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>F<sub>5</sub>O<sub>3</sub> (324,25 g/mol)**

Ausbeute: 0,12 g (0,4 mmol), 19 %

Schmelzpunkt: &lt; 20 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)): R<sub>f</sub> = 0,23**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

δ/ppm = 7.92 (AA'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; H-2' und H-6'), 7.10 (XX'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; H-3' und H-5'), 6.82 (s, 1H; H-2), 3.95 (q, <sup>3</sup>J(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-3/OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-3) = 7.0 Hz, 2H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-3), 3.86 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>-4'), 1.15 (t, <sup>3</sup>J(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-3/OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-3) = 7.0 Hz, 3H; OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-3).

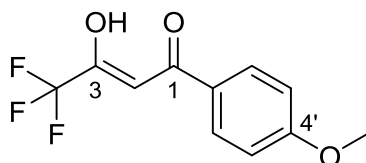
**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

δ/ppm = 188.0 (1C; C-1), 163.9 (1C; C-4'), 148.7 (t, <sup>2</sup>J(C-3/F-4) = 24 Hz, 1C; C-3), 131.2 (2C; C-2' und C-6'), 129.5 (1C; C-1'), 118.3 (qt, <sup>1</sup>J(C-5/F-5) = 287 Hz, <sup>2</sup>J(C-5/F-4) = 38 Hz, 1C; C-5), 114.3 (2C; C-3' und C-5'), 109.5 (tq, <sup>1</sup>J(C-4/F-4) = 257 Hz, <sup>2</sup>J(C-4/F-5) = 38 Hz, 1C; C-4), 108.3 (t, <sup>3</sup>J(C-2/F-4) = 4 Hz, 1C; C-2), 70.9 (1C; OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-3), 55.7 (1C; OCH<sub>3</sub>-4'), 14.6 (1C; OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-3).

**<sup>19</sup>F-NMR (282 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO (CFCl<sub>3</sub> in [D<sub>6</sub>]-DMSO als externer Standard):**

δ/ppm = -118.0 (q, <sup>3</sup>J(F-4/F-5) = 2 Hz, 2F; F-4), -81.7 (t, <sup>3</sup>J(F-5/F-4) = 2 Hz, 3F; F-5).

**MS (ESI positiv):**m/z (%): 325 (100) [M+H]<sup>+</sup>.

**4,4,4-Trifluor-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)but-2-en-1-on (BH-246, 39)**

Die Synthese erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 2,13 g (15,0 mmol) Ethyltrifluoracetat und 1,88 g (12,5 mmol) 1-(4-Methoxyphenyl)ethan-1-on.

**C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>F<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (246,19 g/mol)**

Ausbeute: 0,37 g (1,5 mmol), 12 %

Schmelzpunkt: 57 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,24$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 8.13 (AA'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; Ar-H), 7.11 (XX'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; Ar-H), 6.96 (s, 1H; H-2), 3.88 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>-4')

OH-3 wurde nicht beobachtet.

Die Angaben entsprechen der in [D<sub>6</sub>]-DMSO mit ca. 94 % überwiegend vorliegenden Enolform, die Signale des Diketons, welches zu ca. 6 % vorlag, konnten ebenfalls beobachtet werden.

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

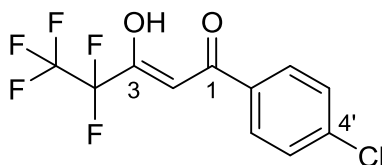
$\delta$ /ppm = 186.1 (1C), 173.1 (1C), 164.6 (1C), 130.7 (2C), 124.8 (1C), 117.4 (1C), 114.6 (2C), 92.3 (1C), 55.8 (1C).

Die Angaben entsprechen der in [D<sub>6</sub>]-DMSO überwiegend vorliegenden Enolform.

**MS (ESI negativ):**

$m/z$  (%): 245 (100) [M-H]<sup>-</sup>.

**1-(4-Chlorphenyl)-4,4,5,5,5-pentafluor-3-hydroxypent-2-en-1-on (40)**



Die Synthese erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 2,88 g (15,0 mmol) Ethylpentafluorpropanoat und 1,93 g (12,5 mmol) 1-(4-Chlorphenyl)ethan-1-on.

**C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>ClF<sub>5</sub>O<sub>2</sub> (300,61 g/mol)**

Ausbeute: 2,79 g (9,3 mmol), 74 %

Schmelzpunkt: 76 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,50$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 12.47 (br s, 1H; OH-3), 8.13 (AA'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; Ar-H), 7.63 (XX'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; Ar-H), 7.02 (s, 1H; H-2).

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

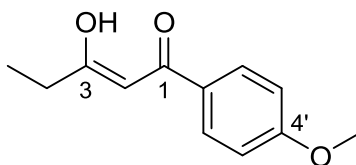
$\delta$ /ppm = 184.3 (1C), 175.3 (1C), 139.4 (1C), 131.5 (1C), 129.9 (2C), 129.2 (2C), 117.9 (1C), 107.5 (1C), 94.4 (1C).

**MS (ESI negativ):**

$m/z$  (%): 621 (100) [2M-2H+Na]<sup>-</sup> (<sup>35</sup>Cl, <sup>35</sup>Cl), 623 (62) [2M-2H+Na]<sup>-</sup> (<sup>35</sup>Cl, <sup>37</sup>Cl), 625 (13) [2M-2H+Na]<sup>-</sup> (<sup>37</sup>Cl, <sup>37</sup>Cl).



**3-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)pent-2-en-1-on (42)**



Die Synthese erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 1,53 g (15,0 mmol) Ethylpropanoat und 1,88 g (12,5 mmol) 1-(4-Methoxyphenyl)ethan-1-on.

**C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub> (206,24 g/mol)**

Ausbeute: 0,75 g (3,6 mmol), 29 %

Schmelzpunkt: < 20 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,21$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 16.47 (br s, 1H; OH-3), 7.94 (AA'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; Ar-H), 7.05 (XX'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; Ar-H), 6.45 (s, 1H; H-2), 3.84 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>-4'), 2.44 (q, 2H; H-4), 1.12 (t, 3H; H-5).

Die Angaben entsprechen der in [D<sub>6</sub>]-DMSO mit ca. 68 % überwiegend vorliegenden Enolform, die Signale des Diketons, welches zu ca. 32 % vorlag, konnten ebenfalls beobachtet werden.

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

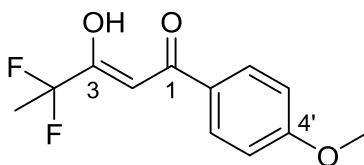
$\delta$ /ppm = 196.1 (1C), 183.1 (1C), 162.9 (1C), 129.1 (2C), 126.7 (1C), 114.2 (2C), 94.6 (1C), 55.5 (1C), 31.1 (1C), 9.7 (1C).

Die Angaben entsprechen der in [D<sub>6</sub>]-DMSO überwiegend vorliegenden Enolform.

**MS (ESI negativ):**

m/z (%): 655 (100) [3M-2H+K]<sup>-</sup>, 433 (48) [2M-2H+Na]<sup>-</sup>, 205 (40) [M-H]<sup>-</sup>, 639 (11) [3M-2H+Na]<sup>-</sup>.

**4,4-Difluor-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)pent-2-en-1-on (43)**



Die Synthese erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 2,07 g (15,0 mmol) Ethyl-2,2-difluorpropanoat und 1,88 g (12,5 mmol) 1-(4-Methoxyphenyl)ethan-1-on.

**C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>F<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (242,22 g/mol)**

Ausbeute: 2,25 g (9,3 mmol), 74 %

Schmelzpunkt: 48 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,28$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 8.07 (AA'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; Ar-H), 7.09 (XX'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; Ar-H), 6.76 (s, 1H; H-2), 3.87 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>-4'), 1.86 (t, 3H; H-5)

OH-3 wurde nicht beobachtet.

Die Angaben entsprechen der in [D<sub>6</sub>]-DMSO mit ca. 92 % überwiegend vorliegenden Enolform, die Signale des Diketons, welches zu ca. 8 % vorlag, konnten ebenfalls beobachtet werden.

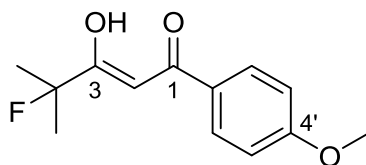
**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 185.6 (1C), 183.2 (1C), 164.0 (1C), 130.1 (2C), 125.4 (1C), 117.9 (1C), 114.5 (2C), 91.2 (1C), 55.7 (1C), 21.0 (1C).

Die Angaben entsprechen der in [D<sub>6</sub>]-DMSO überwiegend vorliegenden Enolform.

**MS (ESI negativ):**

$m/z$  (%): 763 (100) [3M-2H+K]<sup>-</sup>, 505 (49) [2M-2H+Na]<sup>-</sup>, 241 (25) [M-H]<sup>-</sup>.

**4-Fluor-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-4-methylpent-2-en-1-on (44)**

Die Synthese erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 1,00 g (7,5 mmol) Ethyl-2-fluor-2-methylpropanoat und 0,94 g (6,3 mmol) 1-(4-Methoxyphenyl)ethan-1-on.

**C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>FO<sub>3</sub> (238,26 g/mol)**

Ausbeute: 0,87 g (3,7 mmol), 58 %

Schmelzpunkt: 46 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,33$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 16.37 (br s, 1H; OH-3), 7.99 (AA'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; Ar-H), 7.07 (XX'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; Ar-H), 6.62 (d, 1H; H-2), 3.85 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>-4'), 1.55 (d, 6H; CH<sub>3</sub>-4 und H-5).

Die Angaben entsprechen der in [D<sub>6</sub>]-DMSO mit ca. 80 % überwiegend vorliegenden Enolform, die Signale des Diketons, welches zu ca. 20 % vorlag, konnten ebenfalls beobachtet werden.

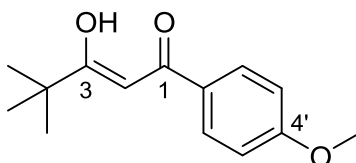
**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 196.3 (1C), 183.3 (1C), 163.4 (1C), 129.4 (2C), 125.7 (1C), 114.4 (2C), 95.2 (1C), 89.9 (1C), 55.6 (1C), 24.8 (2C).

Die Angaben entsprechen der in [D<sub>6</sub>]-DMSO überwiegend vorliegenden Enolform.

**MS (ESI negativ):**

$m/z$  (%): 497 (100) [2M-2H+Na]<sup>-</sup>, 751 (54) [3M-2H+K]<sup>-</sup>, 237 (33) [M-H]<sup>-</sup>, 735 (15) [3M-2H+Na]<sup>-</sup>.

**3-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-4,4-dimethylpent-2-en-1-on (45)**

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an KELLER *et al.*:<sup>127</sup> 2,24 g (20,0 mmol) Kalium-*tert*-butanolat wurde unter Argonatmosphäre in 5,0 ml DMF (abs.) suspendiert und unter Rühren auf eine Temperatur von 50 °C erhitzt. Im Anschluss wurden tropfenweise 1,74 g (15,0 mmol) Methylpivalat zugesetzt, gefolgt von einer Lösung aus 1,50 g (10,0 mmol) 1-(4-Methoxyphenyl)ethan-1-on in 5,0 ml DMF (abs.). Nach Beendigung der Reaktion (kontrolliert mittels DC) wurde das Gemisch im Eisbad gekühlt und langsam mit 20%iger wässriger Schwefelsäurelösung neutralisiert. Nach Zusatz von 60 ml Wasser wurde dreimal mit je 20 ml Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Reaktionsprodukt säulenchromatographisch (MPLC) an Kieselgel mit einem Fließmittelgemisch aus Cyclohexan und Essigsäureethylester (9:1) aufgereinigt.

**C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub> (234,30 g/mol)**

Ausbeute: 0,71 g (3,0 mmol), 30 %

Schmelzpunkt: 56 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)): R<sub>f</sub> = 0,33

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

δ/ppm = 7.99 (AA'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; Ar-H), 7.05 (XX'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; Ar-H), 6.51 (s, 1H; H-2), 3.84 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>-4'), 1.20 (s, 9H; CH<sub>3</sub>-4 und H-5)

OH-3 wurde nicht beobachtet.

Die Angaben entsprechen der in [D<sub>6</sub>]-DMSO mit ca. 84 % überwiegend vorliegenden Enolform, die Signale des Diketons, welches zu ca. 16 % vorlag, konnten ebenfalls beobachtet werden.

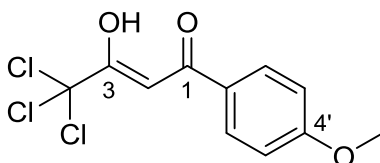
**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

δ/ppm = 201.7 (1C), 184.0 (1C), 162.9 (1C), 129.3 (2C), 126.9 (1C), 114.1 (2C), 91.3 (1C), 55.5 (1C), 39.3 (1C), 27.1 (3C).

Die Angaben entsprechen der in [D<sub>6</sub>]-DMSO überwiegend vorliegenden Enolform.

**MS (ESI positiv):**

m/z (%): 235 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 525 (25) [2M+H+(H<sub>2</sub>C)C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>.

**4,4,4-Trichlor-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)but-2-en-1-on (46)**

Das zur Synthese von **46** als Edukt benötigte 1-(1,1-Dimethoxyethyl)-4-methoxybenzen wurde in Anlehnung an RICHARD und WILLIAMS synthetisiert.<sup>128</sup> 15,0 g (100 mmol) 4-Methoxyacetophenon, 10,6 g (100 mmol) Trimethylorthoformiat, 20,0 ml Methanol und 0,40 g (2,3 mmol) 4-Methylbenzolsulfonsäure wurden suspendiert und bei Raumtemperatur für 65 h gerührt. Nach Neutralisation mit wasserfreiem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> wurde für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch filtriert, das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt bei einer Temperatur von 70 °C im Vakuum destilliert.

Die Synthese von **46** erfolgte in Anlehnung an FLORES *et al.*:<sup>129</sup> 3,64 g (20,0 mmol) Trichloracetylchlorid in 6,70 ml Chloroform wurden unter Rühren tropfenweise zu einer Lösung aus 3,93 g (20,0 mmol) 1-(1,1-Dimethoxyethyl)-4-methoxybenzen in 1,70 ml Pyridin gegeben, die Temperatur wurde dabei bei 0 °C gehalten. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch für 8 h bei 0-25 °C gerührt. Nach Zusatz von 10 ml einer 20%igen wässrigen Schwefelsäurelösung wurde auf 40 °C erhitzt und für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt aus *n*-Hexan umkristallisiert.

**C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (295,54 g/mol)**

Ausbeute: 0,14 g (0,5 mmol), 2 %

Schmelzpunkt: 52 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)): R<sub>f</sub> = 0,34

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl<sub>3</sub>):**

δ/ppm = 14.62 (br s, 1H; OH-3), 7.92 (AA'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; Ar-H), 6.99 (XX'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; Ar-H), 6.75 (s, 1H; H-2), 3.90 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>-4').

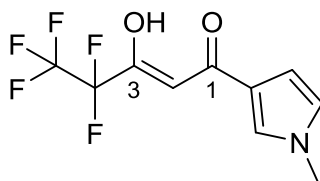
**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl<sub>3</sub>):**

δ/ppm = 185.7 (1C), 181.4 (1C), 164.2 (1C), 129.6 (2C), 125.0 (1C), 114.5 (2C), 95.3 (1C), 88.5 (1C), 55.7 (1C).

**MS (ESI negativ):**

m/z (%): 611 (100) [2M-2H+Na]<sup>-</sup> (5 <sup>35</sup>Cl, 1 <sup>37</sup>Cl), 613 (73) [2M-2H+Na]<sup>-</sup> (4 <sup>35</sup>Cl, 2 <sup>37</sup>Cl), 609 (42) [2M-2H+Na]<sup>-</sup> (6 <sup>35</sup>Cl), 615 (38) [2M-2H+Na]<sup>-</sup> (3 <sup>35</sup>Cl, 3 <sup>37</sup>Cl), 617 (11) [2M-2H+Na]<sup>-</sup> (2 <sup>35</sup>Cl, 4 <sup>37</sup>Cl).

**4,4,5,5-Pentafluor-3-hydroxy-1-(1-methyl-1*H*-pyrrol-3-yl)pent-2-en-1-on (47)**



Die Synthese erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 2,88 g (15,0 mmol) Ethylpentafluorpropanoat und 1,54 g (12,5 mmol) 1-(1-Methyl-1*H*-pyrrol-3-yl)ethan-1-on.

**C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>F<sub>5</sub>NO<sub>2</sub> (269,17 g/mol)**

Ausbeute: 1,84 g (6,8 mmol), 55 %

Schmelzpunkt: 43 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)): *R<sub>f</sub>* = 0,08

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 12.96 (br s, 1H; OH-3), 7.98 (t, 1H; Ar-H), 6.94 (dd, 1H; Ar-H), 6.70 (dd, 1H; Ar-H), 6.59 (s, 1H; H-2), 3.71 (s, 3H; N-CH<sub>3</sub>).

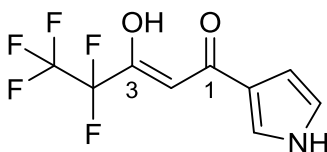
**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 183.6 (1C), 173.0 (1C), 130.0 (1C), 125.8 (1C), 118.8 (1C), 118.1 (1C), 108.8 (1C), 107.6 (1C), 93.2 (1C), 36.5 (1C).

**MS (ESI negativ):**

*m/z* (%): 268 (100) [M-H]<sup>-</sup>, 559 (53) [2M-2H+Na]<sup>-</sup>.

**4,4,5,5,5-Pentafluor-3-hydroxy-1-(1*H*-pyrrol-3-yl)pent-2-en-1-on (48)**



Die Synthese erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 2,11 g (11,0 mmol) Ethylpentafluorpropanoat und 1,00 g (9,2 mmol) 1-(1*H*-Pyrrol-3-yl)ethan-1-on.

**C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>F<sub>5</sub>NO<sub>2</sub> (255,14 g/mol)**

Ausbeute: 0,78 g (3,1 mmol), 33 %

Schmelzpunkt: 102 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,04$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 11.98 (br s, 1H; N-H), 8.03 (dt, 1H; Ar-H), 6.97 (ddd, 1H; Ar-H), 6.71 (ddd, 1H; Ar-H), 6.67 (s, 1H; H-2)

OH-3 wurde nicht beobachtet.

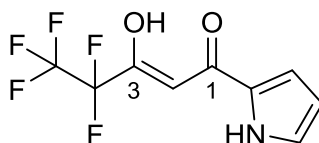
**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 184.3 (1C), 172.8 (1C), 127.1 (1C), 121.8 (1C), 119.2 (1C), 118.1 (1C), 108.0 (1C), 107.7 (1C), 93.5 (1C).

**MS (ESI negativ):**

$m/z$  (%): 254 (100) [M-H]<sup>-</sup>, 509 (12) [2M-H]<sup>-</sup>.

**4,4,5,5-Pentafluor-3-hydroxy-1-(1*H*-pyrrol-2-yl)pent-2-en-1-on (49)**



Die Synthese erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 2,88 g (15,0 mmol) Ethylpentafluorpropanoat und 1,36 g (12,5 mmol) 1-(1*H*-Pyrrol-2-yl)ethan-1-on.

**C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>F<sub>5</sub>NO<sub>2</sub> (255,14 g/mol)**

Ausbeute: 0,61 g (2,4 mmol), 19 %

Schmelzpunkt: 86 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,17$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 12.44 (br s, 1H; N-H), 7.43 (ddd, 1H; Ar-H), 7.39 (ddd, 1H; Ar-H), 6.79 (d, 1H; H-2), 6.37 (dt, 1H; Ar-H)

OH-3 wurde nicht beobachtet.

Die Angaben entsprechen der in [D<sub>6</sub>]-DMSO mit ca. 83 % überwiegend vorliegenden Enolform, die Signale des Diketons, welches zu ca. 17 % vorlag, konnten ebenfalls beobachtet werden.

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 178.8 (1C), 168.6 (1C), 129.8 (1C), 127.4 (1C), 120.0 (1C), 118.1 (1C), 112.2 (1C), 107.9 (1C), 94.5 (1C).

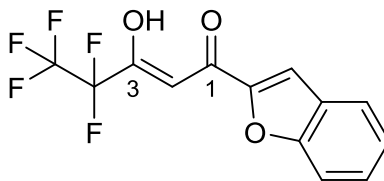
Die Angaben entsprechen der in [D<sub>6</sub>]-DMSO überwiegend vorliegenden Enolform.

**MS (ESI negativ):**

$m/z$  (%): 531 (100) [2M-2H+Na]<sup>-</sup>, 802 (82) [3M-2H+K]<sup>-</sup>, 254 (81) [M-H]<sup>-</sup>, 808 (11) [3M-3H+2Na]<sup>-</sup>, 786 (10) [3M-2H+Na]<sup>-</sup>.



**1-(Benzofuran-2-yl)-4,4,5,5,5-pentafluor-3-hydroxypent-2-en-1-on (50)**



Die Synthese erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 2,88 g (15,0 mmol) Ethylpentafluorpropanoat und 2,00 g (12,5 mmol) 1-(Benzofuran-2-yl)ethan-1-on.

**C<sub>13</sub>H<sub>7</sub>F<sub>5</sub>O<sub>3</sub> (306,19 g/mol)**

Ausbeute: 0,11 g (0,4 mmol), 3 %

Schmelzpunkt: 37 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,36$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

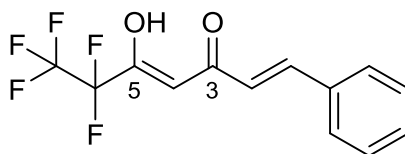
$\delta$ /ppm = 9.45 (br s, 1H; OH-3), 8.14 (s, 1H; Ar-H), 7.84 (d, 1H; Ar-H), 7.74 (d, 1H; Ar-H), 7.57 (t, 1H; Ar-H), 7.39 (t, 1H; Ar-H), 6.81 (s, 1H; H-2).

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-DMSO):**

$\delta$ /ppm = 174.0 (1C), 171.9 (1C), 155.7 (1C), 149.4 (1C), 129.0 (1C), 127.1 (1C), 124.4 (1C), 123.6 (1C), 117.9 (1C), 115.4 (1C), 112.2 (1C), 107.6 (1C), 94.8 (1C).

**MS (ESI negativ):**

$m/z$  (%): 305 (100) [M-H]<sup>-</sup>.

**(1E)-6,6,7,7,7-Pentafluor-5-hydroxy-1-phenylhepta-1,4-dien-3-on (52)**

Die Synthese erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 2,88 g (15,0 mmol) Ethylpentafluorpropanoat und 1,83 g (12,5 mmol) (*E*)-4-Phenylbut-3-en-2-on.

**C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>F<sub>5</sub>O<sub>2</sub> (292,21 g/mol)**

Ausbeute: 0,35 g (1,2 mmol), 10 %

Schmelzpunkt: 45 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,41$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl<sub>3</sub>):**

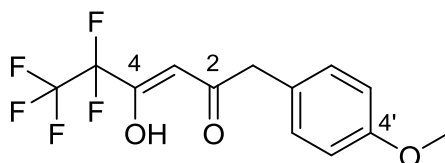
$\delta$ /ppm = 14.31 (br s, 1H; OH-5), 7.79 (d, 1H; H-1), 7.58 (m, 2H; Ar-H), 7.44 (m, 3H; Ar-H), 6.59 (d, 1H; H-2), 6.10 (s, 1H; H-4).

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$ /ppm = 182.2 (1C), 181.0 (1C), 144.2 (1C), 134.3 (1C), 131.3 (1C), 129.3 (2C), 128.7 (2C), 121.2 (1C), 118.3 (1C), 107.6 (1C), 97.0 (1C).

**MS (ESI negativ):**

$m/z$  (%): 605 (100) [2M-2H+Na]<sup>-</sup>, 919 (12) [3M-3H+2Na]<sup>-</sup>, 913 (10) [3M-2H+K]<sup>-</sup>.

**5,5,6,6-Pentafluor-4-hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)hex-3-en-2-on (53)**

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die in Abschnitt 3.5 beschriebene Synthesemethode: 2,24 g (20,0 mmol) Kalium-*tert*-butanolat wurden bei einer Temperatur von 0 °C unter Rühren in 10,0 ml Tetrahydrofuran (abs.) gelöst. Nach 15 min bei 0 °C wurden 2,88 g (15,0 mmol) Ethylpentafluorpropanoat und 1,64 g (10,0 mmol) 1-(4-Methoxyphenyl)propan-2-on hinzugegeben und der Reaktionsansatz drei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Die anschließende Aufarbeitung erfolgte wie unter Abschnitt 3.5 beschrieben.

**C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>F<sub>5</sub>O<sub>3</sub> (310,22 g/mol)**

Ausbeute: 1,10 g (3,5 mmol), 35 %

Schmelzpunkt: < 20 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,37$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl<sub>3</sub>):**

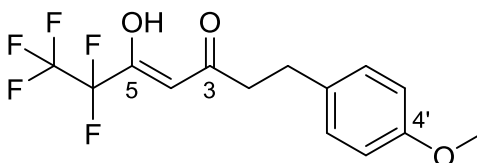
$\delta$ /ppm = 14.34 (br s, 1H; OH-4), 7.16 (AA'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; Ar-H), 6.90 (XX'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; Ar-H), 5.94 (s, 1H; H-3), 3.82 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>-4'), 3.68 (s, 2H; H-1).

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$ /ppm = 195.7 (1C), 176.8 (1C), 159.3 (1C), 130.6 (2C), 125.4 (1C), 118.2 (1C), 114.6 (2C), 107.7 (1C), 97.4 (1C), 55.4 (1C), 44.3 (1C).

**MS (ESI negativ):**

$m/z$  (%): 309 (100) [M-H]<sup>-</sup>, 641 (86) [2M-2H+Na]<sup>-</sup>.

**6,6,7,7,7-Pentafluor-5-hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)hept-4-en-3-on (54)**

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die in Abschnitt 3.5 beschriebene Synthesemethode: 2,24 g (20,0 mmol) Kalium-*tert*-butanolat wurden bei einer Temperatur von 0 °C unter Rühren in 10,0 ml Tetrahydrofuran (abs.) gelöst. Nach 15 min bei 0 °C wurden 2,88 g (15,0 mmol) Ethylpentafluorpropanoat und 1,78 g (10,0 mmol) 4-(4-Methoxyphenyl)butan-2-on hinzugegeben und der Reaktionsansatz drei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Die anschließende Aufarbeitung erfolgte wie unter Abschnitt 3.5 beschrieben.

**C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>F<sub>5</sub>O<sub>3</sub> (324,25 g/mol)**

Ausbeute: 2,20 g (6,8 mmol), 68 %

Schmelzpunkt: < 20 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,38$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl<sub>3</sub>):**

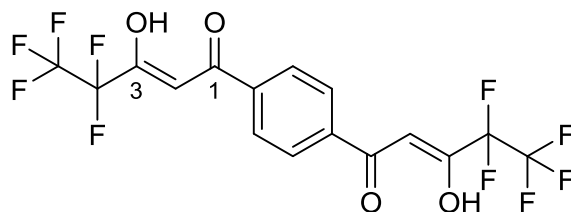
$\delta$ /ppm = 14.44 (br s, 1H; OH-5), 7.11 (AA'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; Ar-H), 6.85 (XX'-Teil des AA'XX'-Systems, 2H; Ar-H), 5.94 (s, 1H; H-4), 3.79 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>-4'), 2.93 (AA'-Teil des AA'BB'-Systems, 2H; H-1), 2.74 (BB'-Teil des AA'BB'-Systems, 2H; H-2).

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl<sub>3</sub>):**

$\delta$ /ppm = 196.5 (1C), 176.6 (1C), 158.5 (1C), 131.7 (1C), 129.3 (2C), 118.2 (1C), 114.2 (2C), 107.7 (1C), 97.7 (1C), 55.4 (1C), 40.7 (1C), 30.6 (1C).

**MS (ESI negativ):**

$m/z$  (%): 323 (100) [M-H]<sup>-</sup>, 669 (15) [2M-2H+Na]<sup>-</sup>.

**1,1'-(1,4-phenylen)bis(4,4,5,5-pentafluor-3-hydroxypent-2-en-1-on) (72)**

Die Synthese erfolgte nach der unter Abschnitt 3.5 beschriebenen Synthesemethode, ausgehend von 5,76 g (30,0 mmol) Ethylpentafluorpropanoat und 2,03 g (12,5 mmol) 1,1'-(1,4-phenylen)bis(ethan-1-on).

**C<sub>16</sub>H<sub>8</sub>F<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (454,22 g/mol)**

Ausbeute: 1,84 g (4,1 mmol), 32 %

Schmelzpunkt: 137 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)):  $R_f = 0,15$

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-Aceton):**

$\delta$ /ppm = 8.34 (s, 4H; Ar-H), 7.12 (s, 2H; H-2)

OH-3 wurde nicht beobachtet.

**<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D<sub>6</sub>]-Aceton):**

$\delta$ /ppm = 185.1 (2C), 180.0 (2C), 138.2 (2C), 129.4 (4C), 119.2 (2C), 108.6 (2C), 95.8 (2C).

**MS (ESI negativ):**

$m/z$  (%): 929 (100) [2M-2H+Na]<sup>-</sup>, 453 (49) [M-H]<sup>-</sup>.

## 6 Diskussion und Ausblick

### 6.1 Eignung des Hefe-basierten Aufnahmeassays für die Untersuchung von FNT-Inhibitoren

Die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte der in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen an den unterschiedlichen Transportproteinen erfolgte unter Verwendung des Hefe-basierten Aufnahmeassays mit  $^{14}C$ -radiomarkierten Substraten. Diese Methode führte in der Regel zu reproduzierbaren Ergebnissen mit geringen Fehlerbereichen. Der Vorteil dieses Systems besteht in der Möglichkeit der direkten Betrachtung des Einflusses eines Inhibitors auf die Substrat-Leitfähigkeit eines Transporters, wodurch präzise Aussagen über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen getroffen werden können. Die Diffusion der untersuchten Inhibitoren über die Hefemembran zum *Target* oder der Einfluss des Hefemetabolismus auf die Verbindungen spielt hingegen nur eine untergeordnete Rolle. Besonders deutlich wird dies an den  $IC_{50}$ -Werten, die für MMV007839 **18** und BH-296 **37** ermittelt wurden: In der Hefe zeigten beide Verbindungen eine nahezu identische Potenz (170 nM bzw. 140 nM), in der *P. falciparum* Kultur wies BH-296 **37** jedoch eine signifikant verringerte inhibitorische Wirksamkeit auf (140 nM bzw. 3,4  $\mu$ M). Dennoch stieß die Untersuchung des Substrat-Transportes in der Hefe unter bestimmten Bedingungen an Grenzen – der Einfluss der verschiedenen Parameter des Aufnahmeassays auf die Qualität der Messergebnisse soll daher im Folgenden genauer betrachtet werden.

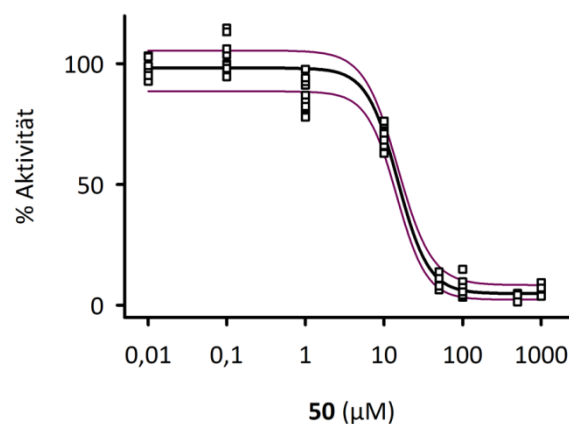
#### 6.1.1 PfFNT

Als eukaryotischer Vertreter der FNT-Familie ist der plasmodiale Lactat-Transporter in der Lage, eine Vielzahl unterschiedlicher Substrate mit vergleichsweise hohen Transportraten über die Zellmembran zu leiten.<sup>85,90</sup> In dieser Arbeit wurde die Bindung eines Inhibitors an PfFNT zumeist über das Ausmaß der Hemmung der L-Lactat-Aufnahme in PfFNT-herstellende Hefezellen bestimmt, einzig beim *Screening* der Malaria-Box wurde die Aufnahme von Formiat betrachtet. L-Lactat, das physiologische Substrat des plasmodialen Lactat-Transporters, erwies sich als besonders geeignet für die Inhibitionsversuche, da es eine deutlich geringere Membrandiffusion aufweist als die kleineren Monocarboxylate Formiat und Acetat.<sup>105</sup> Dadurch war es möglich, auch die sehr geringen PfFNT-Aktivitäten, die bei entsprechend hohen Inhibitorkonzentrationen resultierten, zuverlässig zu beobachten. Insbesondere die Aktivitäten, die in den sigmoidalen  $IC_{50}$ -Kurven den Bereich des Plateaus der vollständigen PfFNT-Hemmung anzeigen, wiesen dabei nur geringe Schwankungen auf, die sich daraus ergebenden Fehlerbereiche waren üblicherweise klein (Abbildung 6.1, 50–1000  $\mu$ M). So war letztlich vor allem die Beobachtung der durch einen Inhibitor verursachten vollständigen Hemmung des L-Lactat-Transportes sehr sicher möglich.

Bei geringeren Inhibitorkonzentrationen, bei denen der Substrat-Transport über PfFNT zum größten Teil ungehindert ablief, fiel die Streuung der prozentualen Aktivitäten des Transporters dagegen größer aus (Abbildung 6.1, 0,01–1  $\mu$ M). Generiert man ausgehend von den jeweils höchsten und niedrigsten Aktivitätswerten jeder verwendeten Inhibitorkonzentration

zwei  $IC_{50}$ -Kurven, so fächern diese üblicherweise im Bereich des 100-%-Plateaus, welches den Konzentrationsbereich markiert, bei der der Transport in *PfFNT*-herstellende Hefe nicht mehr gehemmt wird, deutlich auf (Abbildung 6.1, violette Kurven). Der  $IC_{50}$ -Wert, der als Grundlage zur Aufstellung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen diene, ist jedoch auch in diesen beiden Kurven kaum verändert und umfasst in etwa den gleichen Bereich, der auch im Rahmen der Fehlerbestimmung unter Verwendung der SEM-Grenzkurven ermittelt wurde (siehe Abschnitt 3.6.1). Als wahrscheinlichste Ursache für die Zunahme der Streuung der prozentualen Aktivitäten bei höheren Aufnahmeraten können hierbei kleine Unterschiede in der Handhabung des Aufnahmeassays (beispielsweise für das pipettierte Volumen der Hefezellsuspension, Start und Stopp der Substrataufnahme, Positionierung der mit dem Substrat inkubierten Hefezellsuspension auf den Filtern der Vakuum-Filtrationseinheit) angenommen werden – Hefe, die ein nicht-gehemmtes Transportprotein besitzt, ist hierfür deutlich anfälliger. Eine nur wenig verlängerte Substratinkubationszeit hat hier zum Beispiel die Aufnahme einer der Transportrate der Kontrollhefe entsprechenden Menge an Substrat zur Folge. Dagegen nimmt vollständig gehemmte Hefe, die keinen Transport zeigt, auch in diesem Fall kein Substrat auf. Zudem kann für die Substrataufnahme kein negativer Wert resultieren, für Hefe mit einem vollständig gehemmten FNT ist daher die Beobachtung von Ausreißern in diesem Bereich („nach unten“) nicht möglich.

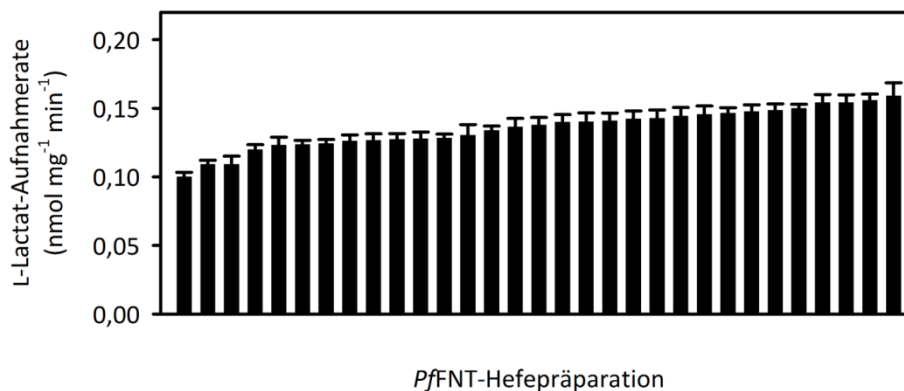
Für das im Zuge des Malaria-Box-Screenings als Substrat verwendete Formiat wurde ein ähnliches Verhalten beobachtet: Während für diejenigen Verbindungen der Sammlung, die keine vollständige *PfFNT*-Hemmung zeigten, vergleichsweise große Rauschsignale resultierten (auch aufgrund der Verwendung von lediglich zwei Replikaten je getestetem Inhibitor), konnte die völlige Inhibition der *PfFNT*-vermittelten Formiat-Aufnahme durch MMV007839 **18** und MMV000972 **19** sehr sicher nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.3 unter Abschnitt 4.2).



**Abbildung 6.1:** Beispielhafte Darstellung der einzelnen Aktivitätswerte *PfFNT* G107S-herstellender Hefe in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen der Verbindung 50. Die schwarze Linie zeigt die resultierende  $IC_{50}$ -Kurve, in violett sind die Grenzkurven der jeweils höchsten bzw. niedrigsten Aktivitätswerte dargestellt – die entsprechenden  $IC_{50}$ -Werte weichen nur wenig vom Mittelwert ab. Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04 µCi [ $1-^{14}C$ ]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 120 s. pH 6,8.

Während für Hefe, die keinen Transporter produziert, generell eine sehr geringe Aufnahme von L-Lactat über die Membran beobachtet wurde, zeigte *PfFNT*-herstellende Hefe in Anwesenheit von 1,25 % DMSO zwischen den einzelnen Experimenten relativ große Unterschiede im L-Lactat-Transport. Die resultierenden Raten bewegten sich in einem Bereich von 0,10 bis 0,16 nmol an aufgenommenem L-Lactat je Milligramm Hefe und Minute (Abbildung 6.2). Dies entsprach im Durchschnitt etwa dem 16-Fachen der Aufnahmerate von Hefe, die kein Transportprotein produziert. Dabei wurde im Rahmen dieser Arbeit immer dann eine besonders hohe Aufnahmerate beobachtet, wenn die *PfFNT*-herstellende Hefe einer frischen Transformation entstammte (Abschnitt 3.1.6), die benötigten Vorkulturen ebenfalls frisch angesetzt wurden und die Hefen vor Beginn eines Experimentes nicht länger als unter Abschnitt 3.3.3 beschrieben auf Eis gelagert wurden.

Da die L-Lactat-Aufnahmerate von ungehemmter Hefe zur Definition der 100%igen Aktivität eines entsprechenden Transporters verwendet wurde, erfolgte für jede Hefepräparation eine erneute Bestimmung der Rate in Gegenwart von 1,25 % DMSO. Dies hatte den Vorteil, dass die absoluten Werte der Aufnahmeraten unterschiedlicher Hefepräparationen für die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte nicht zu berücksichtigen waren. So konnte auch *PfFNT*-herstellende Hefe, die eine vergleichsweise geringe Aufnahmerate zeigte, zur Bestimmung der  $IC_{50}$ -Kurve eines Inhibitors herangezogen werden. Eine Abhängigkeit der prozentualen Aktivität, die für eine bestimmte Inhibitorkonzentration ermittelt wurde, von der absoluten Aufnahmerate einer Hefezellsuspension wurde in dieser Arbeit nicht beobachtet. Ein Nachteil der jeweils erneuten Bestimmung der ungehemmten Aufnahmeraten einer Hefepräparation war jedoch, dass bei gleichem Zeitaufwand eine wesentlich geringere Anzahl an Datenpunkten für die Hemmung des jeweiligen Transporters in Gegenwart der kleinen Moleküle verwendet werden konnte.



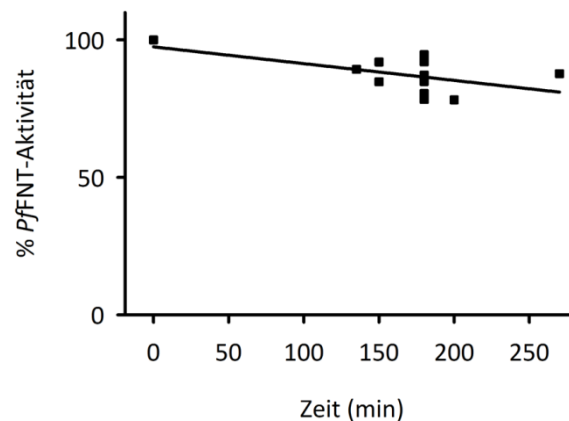
**Abbildung 6.2:** L-Lactat-Aufnahmeraten verschiedener *PfFNT*-Hefepräparationen in Gegenwart von 1,25 % DMSO. Aufgrund der unterschiedlichen Aufnahmeraten, die die einzelnen Hefeansätze zeigen, muss für jedes Experiment die 100%ige Aktivität neu bestimmt werden.

Inkubationszeit 1,25 % DMSO: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04  $\mu$ Ci [ $1-^{14}$ C]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 30 s. pH 6,8. Die Diffusion von L-Lactat über die Membran von Hefe, die kein Protein herstellt, wurde abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

Auch die Lagerung der für die Verwendung im Aufnahmeassay entsprechend präparierten Hefezellsuspension zeigte einen zeitabhängigen Einfluss auf die *PfFNT*-Aktivität. So resul-



tierte für Hefe, welche über einen Zeitraum von drei Stunden auf Eis aufbewahrt wurde, im Durchschnitt eine nur noch 85%ige L-Lactat-Aufnahmerate bezogen auf die Rate, die zu Beginn eines Experimentes beobachtet wurde (Abbildung 6.3). Aufgrund der Verwendung der Rate der nicht-gehemmten *PfFNT*-herstellenden Hefe zur Definition der 100%igen *PfFNT*-Aktivität, resultierte für das 100%ige Aktivitätsplateau der  $IC_{50}$ -Kurve eines untersuchten Inhibitors im Verlaufe eines Experimentes eine signifikante Verschiebung zu niedrigeren Aktivitätswerten. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Aktivität der *PfFNT*-herstellenden Hefe sowohl zu Beginn als auch am Ende eines Versuches ermittelt und der Mittelwert als 100 % Aktivität definiert.



**Abbildung 6.3:** Zeitabhängiger Aktivitätsverlust von *PfFNT*-herstellender Hefe in Puffer pH 6,8 während der Lagerung auf Eis. Nach einer dreistündigen Aufbewahrung resultiert für die DMSO-Kontrollen eine durchschnittliche *PfFNT*-Restaktivität von 85 %.

Inkubationszeit 1,25 % DMSO: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04  $\mu\text{Ci}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 30 s. pH 6,8. Dargestellt sind ausschließlich Hefepreparationen, deren Aktivität zu Beginn und am Ende eines Versuches über jeweils sechs Replikate bestimmt wurde.

### 6.1.2 *EcNirC*

Im Gegensatz zu *PfFNT* vermochte der prokaryotische Nitrit-Transporter *NirC* aus *E. coli* ausschließlich das kleinste der untersuchten Substrate, Formiat, zu transportieren (Abschnitt 4.10.1). Formiat zeigte an Hefe, die keinen Transporter herstellt, bereits eine etwas höhere Membrandiffusion, welche zudem weniger leicht reproduzierbar war als für L-Lactat. Weiterhin lag die Formiat-Aufnahme über *EcNirC* im Durchschnitt nur etwa 4,5-fach über der Hintergrundaufnahme der Hefe ohne Transporter (Abbildung 6.4).

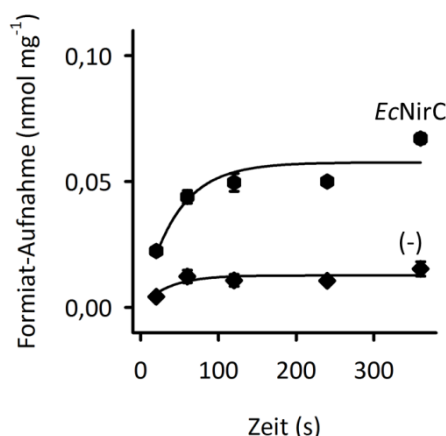
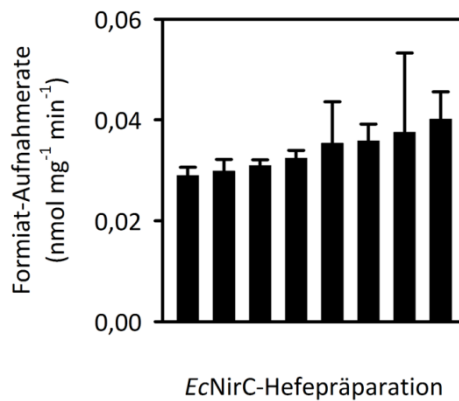


Abbildung 6.4: Zeitabhängige Formiat-Aufnahme über *EcNirC* (Sechsecke) und über die Zellmembran von Hefezellen, die kein Transportprotein herstellen (Rauten).

Substrat: 1 mM Formiat + 0,04  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Formiat. pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

Ähnlich wie *PffNT* für L-Lactat zeigte auch *EcNirC* in Abhängigkeit vom Zustand der jeweils verwendeten Hefe unterschiedliche Aufnahmeraten für Formiat. Diese lagen jedoch mit 0,03–0,04 nmol an aufgenommenem Formiat je Milligramm Hefe und Minute deutlich niedriger. Zusätzlich waren die Unterschiede zwischen den Raten auch innerhalb eines Experimentes etwas größer (Abbildung 6.5). Beides, die stärker ausgeprägte Membrandiffusion des verwendeten Formiates und die geringen Aufnahmeraten des Substrates über *EcNirC*, führte dazu, dass Inhibitionsversuche am Nitrit-Transporter wesentlich schwieriger durchzuführen waren, als am plasmodialen Lactat-Transporter. So würde beispielsweise für den zu 50 % gehemmten Nitrit-Transporter theoretisch eine Aufnahmerate von dem nur maximal 2,5-Fachen der Membrandiffusion resultieren – eine Aktivität, die aufgrund der Größe des entsprechenden Fehlerbereiches letztlich im Hefe-basierten Aufnahmeassay nicht mehr zuverlässig bestimmbar ist. Hinzu kommt, dass aufgrund der Unterschiede in den Aufnahmeraten insbesondere die Aktivität der bei geringen Inhibitorkonzentrationen ungehemmten *EcNirC*-herstellenden Hefe teilweise deutlich vom 100%igen Aktivitätsplateau der  $\text{IC}_{50}$ -Kurve abwich. Zusammen mit der ohnehin geringen Formiat-Aufnahme konnten daher bereits in diesem Konzentrationsbereich wesentlich niedrigere bzw. höhere Aktivitäten beobachtet werden (siehe Aktivitäten der Verbindung **56** und von Diclofenac-Natrium **57** in Abbildung 4.50 unter Abschnitt 4.10.3). Eine Erhöhung der Konzentration an radioaktiv markiertem Formiat in der Substratlösung konnte diese Aktivitätsschwankungen nicht positiv beeinflussen. Nichtsdestotrotz war auch für *EcNirC* zumindest die Bestimmung der vollständigen Hemmung zuverlässig möglich – sie konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals mittels hoher mikromolarer Konzentrationen von Flufenaminsäure **55** erzielt werden.



**Abbildung 6.5: Formiat-Aufnahmeraten verschiedener *EcNirC*-Hefepräparationen in Gegenwart von 1,25 % DMSO.**

Inkubationszeit 1,25 % DMSO: 15–20 min. Substrat: 1 mM Formiat + 0,08  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Formiat, Substratinkubationszeit: 60 s. pH 6,8. Die Diffusion von Formiat über die Membran von Hefe, die kein Protein herstellt, wurde abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

### 6.1.3 Fazit zur Eignung des Assays

Ausgehend von den an *PfFNT*- und *EcNirC*-herstellender Hefe gemachten Beobachtungen konnten für den Aufnahmeassay mit  $^{14}\text{C}$ -radiomarkierten Substraten einige Voraussetzungen bestimmt werden, die für die Generierung von  $\text{IC}_{50}$ -Werten von Hemmstoffen erfüllt sein müssen: Entscheidend ist zunächst, dass das zu untersuchende Transportprotein eine ausreichend hohe Substrat-Leitfähigkeit über die Membran der verwendeten Hefezellen zeigt. Der Substrat-Transport kann durch die Verwendung von Hefekulturen aus einer frischen Transformation zusätzlich günstig beeinflusst werden. Auch der Einsatz von Hefe, die sich in einem fortlaufenden Wachstum befindet, zeigte etwas höhere Aufnahmeraten. Über die Anwendung einer ausreichend langen Inkubationszeit der Hefe mit dem Substrat können sowohl die aufgenommene Menge an Substrat als auch das Rauschen positiv beeinflusst werden. Weiterhin ist die Verwendung von polaren Substraten wie L-Lactat von Vorteil, da diese eine geringere Hintergrunddiffusion über die Hefemembran zeigen.<sup>105</sup> Dies führt zu einem verminderten Rauschen in den Transportraten, so dass auch eine wenig ausgeprägte Hemmung zuverlässig detektiert werden kann.

Da Hefe, die das zu untersuchende Transportprotein herstellt, von Versuch zu Versuch stets leicht abweichende Aufnahmeraten zeigt, ist zudem für jedes Experiment die erneute Bestimmung der nicht-gehemmten Aufnahmeraten in Gegenwart von Inhibitor-freiem DMSO notwendig. Aufgrund der Bedeutung dieser Raten für die Generierung der  $\text{IC}_{50}$ -Kurven ist hier die Bestimmung von jeweils sechs Replikaten zu Beginn und am Ende eines jeden Versuches vorteilhaft. Um einen zu starken Aktivitätsverlust der verwendeten Hefe zu vermeiden, sollte die Dauer des Experimentes drei Stunden nicht überschreiten. Auch eine fortwährend exakt gleichbleibende Handhabung des Aufnahmeassays wirkt sich positiv auf die Qualität der Messergebnisse aus.

Hierbei wird deutlich, dass die Möglichkeiten für die Untersuchung der Hemmung des Nitrit-Transporters im Hefesystem begrenzt sind. Mit Formiat wurde bereits das Anion der kleinsten existierenden Carbonsäure als Substrat verwendet. Das physiologische Substrat Nitrit, welches möglicherweise eine höhere Transportrate zeigt, ist in radiomarkierter Form für den

Aufnahmeassay nicht zugänglich, da von Stickstoff und Sauerstoff keine geeigneten Isotope verfügbar sind.<sup>130</sup> Insbesondere die deutliche Verlängerung der Inkubationszeit mit dem Formiat von bisher maximal zwei Minuten auf vier oder sechs Minuten könnte daher den vielversprechendsten Ansatz zur Generierung genauerer IC<sub>50</sub>-Kurven darstellen – zwar führt dies nicht zu einer höheren Substrataufnahme, das Ausmaß des Rauschens könnte jedoch etwas verringert werden, so dass auch eine nicht vollständige Hemmung des Nitrit-Transporters detektierbar würde. Daneben könnte derjenige Anteil an *EcNirC*, welcher tatsächlich an die Zelloberfläche der Hefe gelangt, untersucht werden.<sup>131</sup> So zeigt der Western-Blot zwar eine große Menge des erfolgreich durch die Hefe hergestellten Proteins (Abbildung 4.45), ein ineffizienter Einbau in die Hefemembran kann jedoch als Ursache für die beobachteten geringen Aufnahmeleistungen nicht ausgeschlossen werden – ist dies der Fall, könnte über eine Optimierung der *EcNirC*-Herstellung in der Hefe die Schaffung geeigneter Testbedingungen erfolgen.

## 6.2 *PfFNT* – ein valides *Drug-Target*

Mit der Entdeckung des plasmodialen Lactat-Transporters wurde für diesen ein ähnliches Transportverhalten für L-Lactat beschrieben, wie es bereits zuvor in den lebenden Parasiten beobachtet wurde. In diesem Zusammenhang wurde bereits in Erwägung gezogen, dass *PfFNT* für *P. falciparum* die einzige Möglichkeit darstellen könnte, die Endprodukte des Energiemetabolismus, Lactat und Protonen, aus der Zelle zu befördern – in diesem Fall sollte der Lactat-Transporter ein vielversprechendes *Target* antiplasmodialer Wirkstoffe sein. Ein  $\Delta fnt$ -Knockout Stamm von *P. falciparum*, der die Bedeutung von *PfFNT* für die Viabilität der Parasiten hätte aufzeigen können, konnte jedoch bisher nicht generiert werden.<sup>85,86</sup>

In der Malaria-Box sind 400 Verbindungen zusammengefasst, die in phänotypischen *Screenings* von etwa sechs Millionen Substanzen eine ausgeprägte antiplasmodiale Wirksamkeit zeigten. Für jede dieser in der Box enthaltenen Verbindungen wurde an *P. falciparum* 3D7 eine halbmaximale effektive Konzentration (EC<sub>50</sub>) von 4  $\mu$ M und kleiner bestimmt, zudem wurde für die Zytotoxizität der Substanzen an einer humanen Zelllinie (HEK-293) ein Sicherheitsfaktor von größer zehn berücksichtigt – damit stellen diese Verbindungen bereits aufgrund ihrer Potenz aussichtsreiche Leitstrukturen für die Entwicklung neuer antiplasmodialer Wirkstoffe dar.<sup>56</sup> Insbesondere die vorangehend bestätigte Aktivität am lebenden Parasiten ist dabei von hohem Wert, denn nicht jedes Protein in *P. falciparum*, das sich mit kleinen Molekülen adressieren ließe, muss auch von essentieller Bedeutung für die Plasmodien sein. Im Gegensatz dazu ist für diejenigen *Targets*, für die eine direkte Beeinflussung durch die in der Malaria-Box enthaltenen Verbindungen gefunden werden kann, eine große Bedeutung für das Wachstum und die Vermehrung der Parasiten sehr wahrscheinlich. Daraus resultiert ein weiterer großer Vorteil des phänotypischen *Screenings* von Substanzbibliotheken: Durch die Entdeckung von aktiven Verbindungen mit bisher unbekanntem Wirkmechanismus können auch neue, durch Wirkstoffe bislang nicht adressierte *Targets* gefunden werden. Für diese können nachfolgend, in einer auf das Wirkstoffziel ausgerichteten Optimierung der Leitstrukturen, wirksame Arzneistoffe hervorgebracht werden.<sup>132</sup> Dabei ist gerade im Falle von *P. falciparum* die Identifizierung eines möglichst diver-

sen Spektrums an validen Wirkstoffzielen die Voraussetzung, um mit entsprechenden Arzneistoffen die zunehmend multiresistenten Parasiten zuverlässig bekämpfen zu können.

Um in die Plasmodien zu gelangen, muss ein Arzneistoff in der Parasitenkultur bereits mehrere Membranen überwinden: die der Wirtszellen (Erythrozytenmembran), die Membran der parasitophoren Vakuole und die Zellmembran von *P. falciparum* (siehe Abbildung 1.9 in Abschnitt 1.2.4). Verbindungen, deren *Targets* wie bei Chloroquin **3** im Inneren von Zellorganellen der Plasmodien lokalisiert sind, müssen eine zusätzliche Membran passieren.<sup>133</sup> Auch hier zeigt sich ein Vorteil des phänotypischen *Screenings*: Die in der Malaria-Box enthaltenen Substanzen haben dort ihre Fähigkeit zum jeweiligen *Target* zu gelangen bereits bewiesen.

Die Tatsache, dass mit MMV007839 **18** und MMV000972 **19** zwei Verbindungen in der Malaria-Box enthalten waren, deren Wirkung auf einer Inhibition des Substrat-Transportes über den plasmodialen Lactat-Transporter beruht, gibt somit einen Hinweis auf die große Bedeutung von *PfFNT* für die Plasmodien. Durch die Generierung von resistenten Parasiten, deren Lactat-Transporter die G107S-Mutation trug und die auch im Hefesystem zu einem deutlichen Verlust der inhibitorischen Wirksamkeit von MMV007839 **18** führte, konnte letztlich *PfFNT* im Rahmen dieser Arbeit als neues antiplasmodiales Wirkstoffziel validiert werden. Der Inhibitor greift demnach durch eine Hemmung des Co-Transportes von Lactat und Protonen in den Energiemetabolismus von *P. falciparum* ein – der durch die Anhäufung dieser Stoffwechselprodukte bedingte Zusammenbruch der glykolytischen Energiegewinnung der Parasiten sowie eine intrazelluläre Übersäuerung sind die Konsequenz. So konnten HAPUARACHCHI *et al.* (die zeitgleich zu dieser Arbeit ebenfalls infolge eines *Screenings* der Malaria-Box die Verbindungen MMV007839 **18** und MMV000972 **19** als *PfFNT*-Inhibitoren identifizierten) neben einer Verringerung des zytosolischen pH-Wertes in *P. falciparum* in Gegenwart von MMV007839 **18** und MMV000972 **19** auch eine Akkumulation von Lactat, Pyruvat sowie weiteren Metaboliten der Glykolyse beobachten.<sup>134</sup>

### 6.3 Bindemodus von MMV007839, **18** an *PfFNT*

Die, verglichen mit MMV007839 **18**, nahezu identische Affinität von BH-296 **37** zu *PfFNT* verdeutlicht, dass die offenkettige Form der *Hit*-Verbindung aus der Malaria-Box die aktive Form des Inhibitors darstellt. Dort tautomerisiert das infolge der Ringöffnung resultierende Diketon der Fluoralkylseitenkette bevorzugt in eine Enolform, eine vinyloge Carbonsäure. Vergleichbar der Bildung der offenkettigen D-Glucose aus der ringgeschlossenen Pyranoseform in wässriger Lösung, ist die Ringöffnung von MMV007839 **18** jedoch reversibel, so dass eine fortwährende Umwandlung zwischen der polaren offenkettigen Form des gelösten Inhibitors und der lipophilen Hemiketalform stattfindet.<sup>108</sup> Die Tatsache, dass BH-296 **37**, trotz gleicher Affinität zum *Target*, in der Parasitenkultur eine 24-fach verminderte Potenz gegenüber dem Inhibitor aus der Malaria-Box zeigte, deutet darauf hin, dass die Fähigkeit zur Ausbildung des Hemiketals für den Inhibitor eine Voraussetzung dafür ist, *PfFNT* zu erreichen – demnach könnte MMV007839 **18** in Form des ringgeschlossenen, unpolaren 2-Hydroxychromanons die aufeinanderfolgenden lipophilen Membranen überwinden und als offenkettige vinyloge Carbonsäure schließlich mit dem plasmodialen Lactat-Transporter interagieren. Dabei wird infolge der Bindung des aktiven Inhibitors an den plasmodialen Lactat-

Transporter die offenkettige vinyloge Carbonsäure aus dem Gleichgewicht entfernt und fortwährend aus der Hemiketalform neu gebildet, die Reaktion wird also in Richtung der Hemmung von *PfFNT* vorangetrieben. In diesem Sinne fungiert das Hemiketal letztlich als ein Prodrug, welches selbst nicht in der Lage ist, den Lactat-Transport zu hemmen, durch die Ringöffnung jedoch den aktiven Inhibitor hervorbringt.<sup>135</sup> Ein großer Vorteil liegt dabei in der Reversibilität dieses „internen Prodrug-Prinzips“: So kann MMV007839 **18** stets im Sinne der Ausbildung des Gleichgewichtes aus Hemiketal und vinyloger Carbonsäure aus der aktiven Form zurück in die lipophile Transportform tautomerisieren, die Aktivierung zum wirksamen Inhibitor ist nicht endgültig mit einem Verlust des Prodrugs verbunden. Dadurch ist MMV007839 **18** in der Lage, die durch die vielen aufeinanderfolgenden Membranen geschützten Plasmodien zuverlässig zu erreichen – eine Übertragung dieses neuen „internen Prodrug-Prinzips“ auf weitere Wirkstoffe, bei denen die Absorption einen kritischen Punkt darstellt, erscheint hierbei denkbar, vorausgesetzt, im Molekül ist ein Keton enthalten und das Einfügen einer Alkoholfunktion im entsprechenden Abstand wird toleriert.

Basierend auf den Ergebnissen der unter Abschnitt 4.6 untersuchten quantitativen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von MMV007839 **18**, kann abschließend ein Bindemodus für diesen Inhibitor postuliert werden (Abbildung 6.6 A und B): Als Pharmakophor von MMV007839 **18** wurde die in der ringoffenen Form des Inhibitors vorliegende Fluoralkylcarbonsäure-Seitenkette identifiziert (siehe Abschnitt 4.7.3). Da neben *PfFNT* auch der Lactat-Transporter aus *B. bovis* sowie der strukturell nicht verwandte Monocarboxylat-Transporter mit jeweils vergleichsweise geringen Konzentrationen von MMV007839 **18** hemmbar waren, erscheint eine Substrat-analoge Interaktion des Inhibitors mit dem jeweiligen *Target* als sehr wahrscheinlich. In diesem Zusammenhang lässt sich hinsichtlich des Volumens und der physikochemischen Eigenschaften eine Ähnlichkeit der Fluoralkylcarbonsäure-Seitenkette von MMV007839 **18** zu zwei aufeinanderfolgenden Molekülen des physiologischen Substrates der untersuchten Transporter, L-Lactat, erkennen. So repräsentiert der lipophile Fluoralkylrest das Substrat in der protonierten Milchsäureform, wohingegen die vinyloge Carbonsäurefunktion einem deprotonierten L-Lactat-Anion entspricht. Damit die Seitenkette des ringoffenen Inhibitors Substrat-analog mit *PfFNT* interagieren kann, muss dieser Teil des Moleküls tief in den Transportpfad des Transporters ragen, während das aromatische System in der Nähe des Poreneinganges positioniert wird. Dem entspricht die Beobachtung, dass der lipophile Pentafluorethylrest von MMV007839 **18** in begrenztem Ausmaße sowohl eine Verlängerung als auch eine Verkürzung der Kettenlänge toleriert (Abschnitt 4.6.5) – so steckt der Fluoralkylrest gewissermaßen in der lipophilen intrazellulären Engstelle des Proteins. Da die Engstellen im *PfFNT*-Strukturmodell bereits zu schmal erscheinen, um das protonierte L-Lactat hindurch leiten zu können, muss in diesem Bereich auch während der Bindung von MMV007839 **18** eine deutliche Aufweitung der Pore des Proteins stattfinden, abhängig von der Länge des Fluoralkylrestes reicht dieser dann bis weit in den zentralen Hohlraum des Lactat-Transporters. Besonders deutlich wird die Flexibilität der intrazellulären Engstelle in *PfFNT* anhand der Verbindung **46**, die, obwohl ausgehend von BH-246 **39** sämtliche Fluoratome des Trifluormethylrestes gegen größere Chloratome substituiert sind, eine nahezu identische Affinität zu *PfFNT* zeigte (Abschnitt 4.7.4).

Die sich im offenkettigen MMV007839-Molekül an den Fluoralkylrest anschließende vinyloge Carbonsäurefunktion bindet folglich im eher polaren Teil des Transportpfades, näher an der

zytoplasmatischen Porenöffnung – also dem Bereich im Protein, der mit den Substrat-Anionen interagiert. Dabei ist aufgrund der für MMV007839 **18** beobachteten hohen Affinität insbesondere die Ausbildung einer ionischen Wechselwirkung zu positiv geladenen Aminosäuren wahrscheinlich.<sup>136</sup> So konnten WIECHERT und BEITZ im extrazellulären Poreneingang des Formiat-Transporters FocA ein konserviertes Lysin identifizieren, dessen positiv geladene Seitenkette für die Anziehung der Substrat-Anionen verantwortlich ist.<sup>74</sup> Ein ähnliches Transportprinzip ist hierbei auch für den zytoplasmatischen Poreneingang von *Pf*FNT zu erwarten, dessen physiologische Funktion der Export von L-Lactat aus dem Parasiten darstellt. Denkbar wäre beispielsweise, dass die Seitenketten im *N*-Terminus lokalisierter Lysine (Lys33–35), ähnlich wie es bereits durch CZYZEWSKI und WANG für Lys16 im Hydrogensulfid-Transporter HSC beobachtet wurde, in das Innere des plasmodialen Lactat-Transporters ragen und diese Funktion übernehmen.<sup>67</sup>

In der aktiven, ringoffenen Form von MMV007839 **18** befindet sich der Methoxy-Substituent des Aromaten relativ zur Fluoralkylseitenkette in der *para*-Position und ragt damit linear von dieser weg. Da auch die Transportpore von *Pf*FNT einen annähernd linearen Verlauf durch die Zellmembran aufweist, zeigt dieser Teil des Inhibitors im Falle der beschriebenen Substrat-analogen Bindung von MMV007839 **18** aus dem Lactat-Transporter hinaus in den intrazellulären Raum. Damit konsistent war die in dieser Arbeit beobachtete Möglichkeit, den aromatischen Substituenten hinsichtlich seiner Größe zu variieren, ohne dass dies einen ausgeprägten Affinitätsverlust zur Folge hatte – so zeigte beispielsweise Verbindung **36**, welche an dieser Position einen deutlich voluminöseren Benzyloxy-Rest trägt, nach wie vor einen nanomolaren IC<sub>50</sub>-Wert in der Hemmung der *Pf*FNT-vermittelten L-Lactat-Aufnahme. Ebenso hatte auch der Verlust des Substituenten oder dessen Austausch zu einem Chloratom keinen ausgeprägten Einfluss auf die Affinität des Inhibitors zum Protein (Abschnitt 4.6.6). Dagegen wurde das Einfügen eines Methylsubstituenten an Position 3 (diese ist im offenkettigen Inhibitor in der Fluoralkylseitenkette lokalisiert) oder eines Chloratoms an Position 6 (eine der beiden *meta*-Positionen relativ zur Fluoralkylseitenkette in der ringoffenen Form des Inhibitors) in MMV007839 **18** nicht toleriert (siehe Abschnitte 4.6.4 und 4.6.2) – dieses sind Positionen, die im Falle des postulierten Bindemodus in Richtung der inneren Oberfläche des Transportpfades von *Pf*FNT ragen. Einzig das Einfügen eines Chloratoms an Position 8 (die andere der beiden *meta*-Positionen relativ zur Fluoralkylseitenkette in der ringoffenen Form von MMV007839 **18**) wurde toleriert, ein Substituent an dieser Position ragt demnach möglicherweise bereits aus dem Transporter ins Zytoplasma (Abschnitt 4.6.2). So beträgt der Abstand in der offenkettigen Form von MMV007839 **18** zwischen dem endständigen (in die Engstelle des Transporters ragenden) Kohlenstoffatom der Fluoralkylseitenkette und dem Kohlenstoffatom des Aromaten, welches den *para*-ständigen Methoxyrest trägt, in etwa 8 Å – dies entspricht im *Pf*FNT-Strukturmodell der Entfernung zwischen den Aminosäuren der intrazellulären Engstelle und dem Bereich des Proteins, in dem sich die zytoplasmatische Porenöffnung deutlich zu öffnen beginnt.

Daneben wurde jedoch für das Entfernen des gesamten aromatischen Systems eine nur vergleichsweise moderate Affinitätsabnahme um das ca. 11-Fache beobachtet (siehe Pharmakophor **41** unter Abschnitt 4.7.3), so dass für diesen Teil des Moleküls eine direkte Interaktion mit *Pf*FNT unwahrscheinlich erscheint. Für den Aromaten ist daher vielmehr eine

Abschirmung der Bindestelle des MMV007839-Pharmakophors im Transportpfad von *PfFNT* gegen das Lösungsmittel anzunehmen.

Die Mutation von Gly107 zu Serin führt zu einer deutlichen Abnahme der Affinität von MMV007839 **18** zu *PfFNT*. Da Gly107 auf der Innenseite der zytoplasmatischen Transportpore lokalisiert ist, führt die zusätzliche Hydroxymethyl-Seitenkette dort zu einer Verringerung des Durchmessers des Transportpfades. Bezogen auf den postulierten Bindemodus des Inhibitors an *PfFNT* bedeutet dies eine sterische Kollision des Serins mit MMV007839 **18**, insbesondere mit der phenolischen Hydroxyfunktion des Inhibitors (Abbildung 6.6 C). In entsprechender Weise resultierte für Verbindung BH-296 **37**, welche diese Funktion anders als MMV007839 **18** nicht aufweist, eine um eine Größenordnung erhöhte Potenz an *PfFNT* G107S. Da das Pharmakophor **41**, zumindest bei einer relativen Betrachtung, eine nochmals geringere Affinitätsabnahme vom Wildtyp-*PfFNT* zu *PfFNT* G107S zeigte, scheint zusätzlich auch das aromatische System von der Kollision mit der in den Transportpfad ragenden Seitenkette des Serins betroffen zu sein.



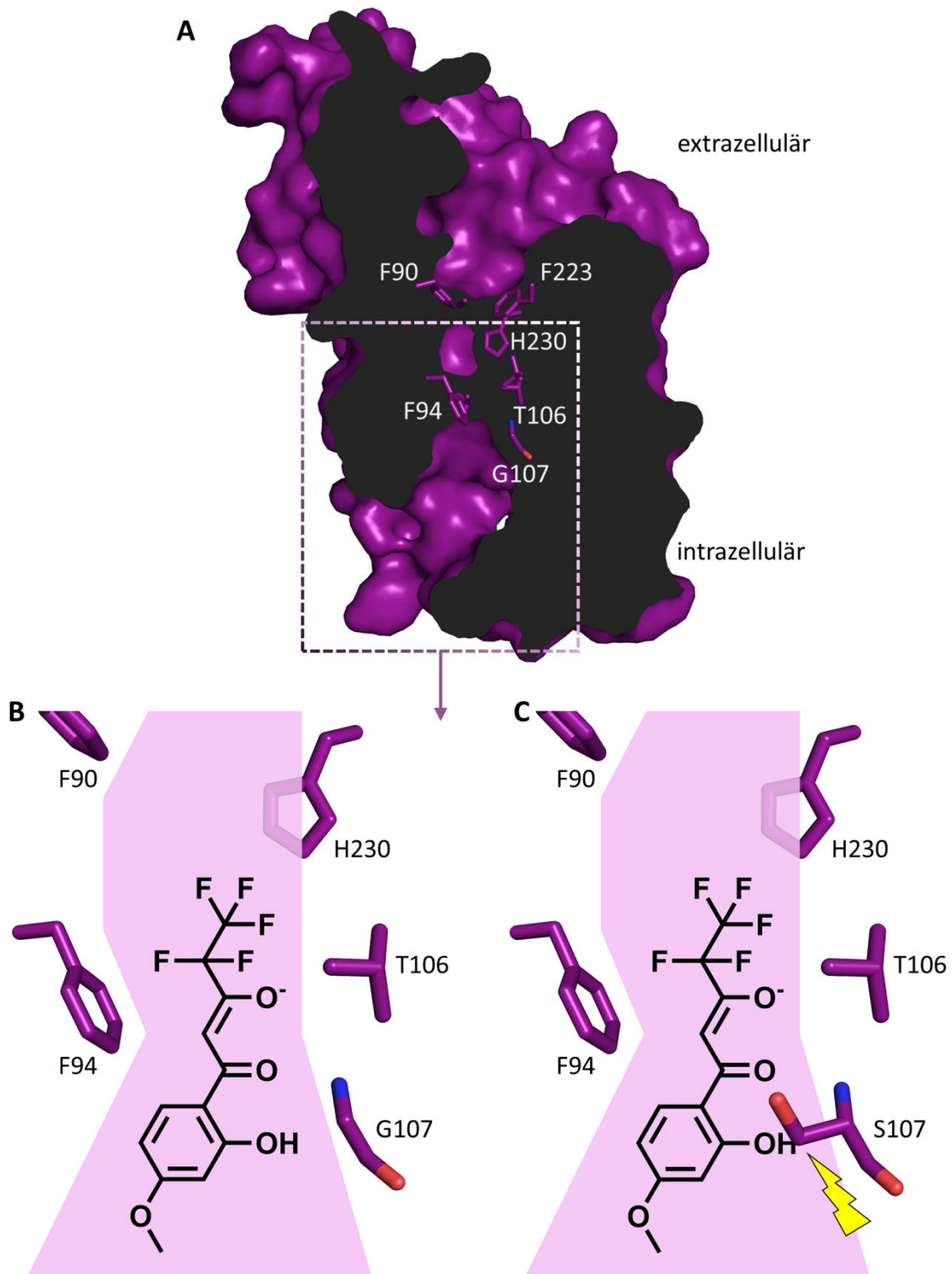


Abbildung 6.6: Postulierter Bindemodus von MMV007839, 18 an PffNT: (A) Strukturmodell des Lactat-Transporters PffNT aus *P. falciparum* basierend auf dem Hydrogensulfid-Transporter HSC (PDB ID 3TDO).<sup>67</sup> Hervorgehoben sind die lipophilen Seitenketten der Aminosäuren, die die Engstellen bilden, sowie Gly107.<sup>90</sup> Der intrazelluläre Bereich der Transportpore, in dem MMV007839, 18 bindet, ist umrandet dargestellt. (B) Schematische Darstellung des möglichen Bindemodus von MMV007839, 18. Der Fluoralkylrest ragt über die zyttoplasmatische Engstelle in den zentralen Hohlraum des Proteins. (C) In der PffNT-Resistenzmutante kommt es zur Kollision der Hydroxymethyl-Seitenkette des Serins an Position 107 mit der phenolischen Hydroxyfunktion des Inhibitors.

Auffällig ist, dass die aktive, offenkettige Form von MMV007839 **18** trotz grundsätzlich verschiedener Molekülgerüste einige strukturelle Gemeinsamkeiten zu Nifluminsäure **16**, dem Inhibitor mit der bisher höchsten Affinität zu *Pf*FNT, aufweist (Abbildung 6.7).<sup>86</sup> So beinhalten beide Moleküle eine acide Funktion: Nifluminsäure **16** eine Carboxylgruppe, MMV007839 **18** eine vinyloge Carbonsäure. Auch der Fluoralkylrest ist beiden Verbindungen gemeinsam – Nifluminsäure **16** trägt einen Trifluormethylrest, der Inhibitor aus der Malaria-Box dagegen die etwas längere Pentafluorethylfunktion. Diese Strukturmerkmale, die sich im Fall von MMV007839 **18** als essentiell für eine effektive Hemmung von *Pf*FNT erwiesen, lassen für beide Moleküle ein ähnliches Prinzip der Interaktion mit dem intrazellulären Transportpfad des Lactat-Transporters als wahrscheinlich erscheinen. So wurde für Nifluminsäure **16** bereits die Inhibition eines Monocarboxylat-Transporters beschrieben, zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit die Hemmung des *Ec*NirC-vermittelten Formiat-Transportes beobachtet – analog zum Inhibitor aus der Malaria-Box deutet dies auf eine Substratanaloge Interaktion mit den untersuchten Transportproteinen hin.<sup>137</sup> Die, verglichen mit MMV007839 **18**, deutlich geringere Affinität von Nifluminsäure **16** zu *Pf*FNT könnte demnach im sterischen Anspruch der beiden Aromaten im Molekül begründet liegen – der Hemmstoff gelangt nicht tief genug in die intrazelluläre Transportpore. Hierauf deutet auch die unveränderte Affinität von Nifluminsäure **16** zum MMV007839-resistenten *Pf*FNT hin. Aufgrund der Fähigkeit des plasmodialen Lactat-Transporters, Substrate in beide Richtungen transportieren zu können, ist jedoch auch eine Bindung im extrazellulären Poreneingang nicht auszuschließen.<sup>85</sup>

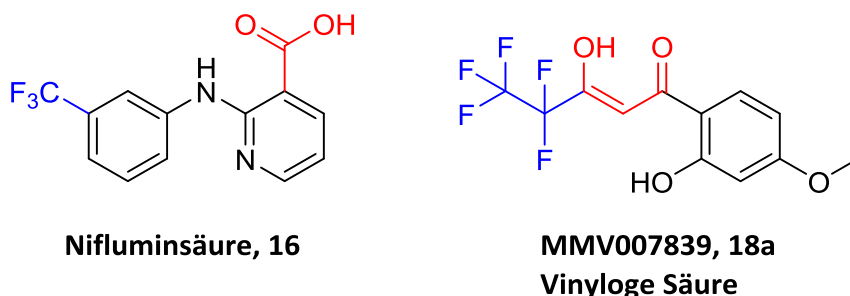


Abbildung 6.7: Vergleich der beiden FNT-Inhibitoren Nifluminsäure, **16** und MMV007839, **18** in Form der vinylogen Säure **18a**. Beide Verbindungen tragen einen Fluoralkylrest (blau) und eine acide Funktion (rot).

Die hohe Affinität von MMV007839 **18** zu *Pf*FNT geht zusätzlich mit einer langen Verweildauer des Inhibitors am Protein einher, ein Wiedererlangen der L-Lactat-Transportfähigkeit durch den Transporter war in dieser Arbeit auch zwei Stunden nach dem Entfernen von MMV007839 **18** nicht zu beobachten (Abschnitt 4.5.2). Jedoch gilt heute im Allgemeinen auch nicht ausschließlich die Bindungsaffinität eines Wirkstoffes für eine pharmakologische Aktivität als entscheidend, sondern ebenso die Lebensdauer des resultierenden Komplexes aus Ligand und Protein – die Potenz und die Selektivität sowie das Ausmaß an toxischen Effekten, die nicht direkt mit der Adressierung des *Targets* durch den Wirkstoff im Zusammenhang stehen, können hierdurch maßgeblich beeinflusst werden.<sup>138,139</sup> Für eine potente Wirkung eines *Pf*FNT-Inhibitors gegen die sich intraerythrozytär vermehrenden Parasiten erscheint daher eine lange Bindungsdauer des kleinen Moleküls am Protein als sehr vorteilhaft,

da der Energiemetabolismus der Plasmodien über einen längeren Zeitraum möglichst vollständig gehemmt werden muss, damit diese dauerhaft geschädigt werden.

Zusätzlich zur langen Verweildauer von MMV007839 **18** an *PfFNT* wurde eine vergleichsweise rasche Bindung beobachtet (Abschnitt 4.5.1). Der daraus für den Inhibitor bestimmte scheinbare  $K_i$ -Wert von 1,4  $\mu\text{M}$  kann jedoch nur einen ungefähren Hinweis auf die Affinität zum Lactat-Transporter geben, da aufgrund des hierfür verwendeten Hefesystems zusätzlich die Diffusion oder der Transport von MMV007839 **18** über die Membran der Hefezellen zum intrazellulären Poreneingang von *PfFNT* berücksichtigt werden muss. Dies führt letztlich zu einer verlangsamten Bindungskinetik, für den wahren  $K_i$ -Wert ist daher eher eine Inhibitor-konzentration im nanomolaren Bereich zu erwarten. So könnte im Gegensatz zu den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, bei denen die zeitabhängige Bindung von MMV007839 **18** stets indirekt über die Hemmung der *PfFNT*-vermittelten L-Lactat-Aufnahme in Hefezellen verfolgt wurde, eine direkte Betrachtung der Bindung und der Dissoziation am isolierten Protein wesentlich genauere Ergebnisse liefern. Hierfür eignen sich Oberflächenplasmonresonanz-Techniken oder die Biolayer-Interferometrie. Diese könnten zusätzlich aufgrund eines deutlich höheren Durchsatzes auch eine Struktur-abhängige Untersuchung der Bindungskinetik ermöglichen.<sup>140,141</sup> Die hierfür benötigten Mengen an funktionellem *PfFNT* konnten im Arbeitskreis bereits im Zellfrei-System hergestellt werden.<sup>142</sup> Jedoch müsste für die erwähnten Techniken zunächst eine Immobilisierung einer ausreichenden Menge des Proteins auf den jeweils verwendeten Sensor-Oberflächen erfolgen, was für Membranproteine eine Herausforderung darstellt. Zudem stellen die *PfFNT*-Inhibitoren Liganden mit vergleichsweise kleinen Molekulargewichten dar, wodurch eine besonders hohe Sensitivität der Methoden erforderlich wird.<sup>141</sup>

## 6.4 Umgehen der Resistenz

Wurden Plasmodien *in vitro* der dreifachen  $\text{IC}_{50}$ -Konzentration von MMV007839 **18** ausgesetzt, dauerte es nur kurze Zeit, bis diese eine ausgeprägte Resistenz gegen den Inhibitor zeigten. Die G107S-Mutation in *PfFNT*, die dieser Resistenz zugrunde lag, hatte einen deutlichen Einfluss auf die Affinität des Inhibitors zum Lactat-Transporter, der  $\text{IC}_{50}$ -Wert der L-Lactat-Aufnahmehemmung durch MMV007839 **18** stieg um zwei Größenordnungen von 170 nM auf 22  $\mu\text{M}$  (Abschnitt 4.8.2). Mit Verbindung BH-296 **37** wurde in dieser Arbeit bereits ein Inhibitor synthetisiert, der eine zur Verbindung aus der Malaria-Box vergleichbare Affinität zum Wildtyp-*PfFNT* zeigte, von der G107S-Mutation jedoch deutlich weniger betroffen war (Abschnitt 4.9.1). Auch das Pharmakophor **41** wies eine vergleichsweise hohe Potenz der *PfFNT* G107S-Inhibition auf: Hier war, auch aufgrund der Reduktion des Moleküls auf den Substrat-analogen Teil von MMV007839 **18**, insbesondere das Verhältnis zwischen der Affinität zum Wildtyp-*PfFNT* und mutiertem *PfFNT* günstig (Abschnitt 4.9.5). Beide Verbindungen, BH-296 **37** und das Pharmakophor **41**, stellen daher vielversprechende Leitstrukturen für die Entwicklung potenter Inhibitoren dar, die Substrat-analog an *PfFNT* G107S binden und in der Lage sind, die Mutation zu umgehen. Vor allem im Hinblick auf die begrenzte Möglichkeit des Lactat-Transporters für die Ausbildung weiterer Mutationen an Position 107 ist dies ein sinnvoller Ansatz – so war das Einfügen voluminöserer Aminosäuren als Serin stets mit einem deutlichen Verlust der für das Wachstum und die Vermehrung der Parasiten

essentiellen L-Lactat-Leitfähigkeit von *PfFNT* verbunden. Ein Inhibitor, der mit hoher Affinität im intrazellulären Poreneingang der *PfFNT* G107S-Mutante bindet, sollte demnach weniger rezistenzunfällig sein (Abschnitt 4.8.4). Gleichzeitig ist für solch eine Verbindung eine verringerte Wahrscheinlichkeit für die Entstehung der G107S-Mutation in *PfFNT* zu erwarten. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang beispielsweise die Synthese einer umfassenden Substanzbibliothek, in der die enthaltenen Verbindungen als gemeinsames Strukturmerkmal die vinyloge Fluoralkylcarbonsäure-Seitenkette aufweisen.<sup>143</sup> Eine direkte Untersuchung der potentiellen *PfFNT* G107S-Inhibitoren könnte anschließend analog zu dem in dieser Arbeit durchgeführten *Screening* der Malaria-Box bei einer festgelegten Konzentration im Hefesystem unter Verwendung von <sup>14</sup>C-radiomarkiertem L-Lactat erfolgen. Gelingt es, den plasmodialen Lactat-Transporter der Untersuchung mittels Biolayer-Interferometrie zugänglich zu machen, wäre auch über diese Technik ein *Screening* der Verbindungen direkt am Protein durchführbar – der Vorteil hierbei wäre der höhere Durchsatz und die damit verbundene Möglichkeit, eine Verbindung in diversen Konzentrationen testen zu können.<sup>140</sup> Dadurch könnten zusätzlich auch Struktur-Aktivitäts-Beziehungen aufgestellt werden, welche wiederum eine gezielte Optimierung der Inhibitoren ermöglichen würden. Alternativ ist auch eine Untersuchung der Verbindungen an lebenden Parasiten oder wachsender Hefe möglich. So wurde durch Wu *et al.* gezeigt, dass der Einbau von *PfFNT* in den Hefestamm W303-1A  $\Delta$ *jen1*  $\Delta$ *ady2* diesen befähigt auf Medium zu wachsen, welches L-Lactat als alleinige Kohlenstoffquelle beinhaltet.<sup>85</sup> Bei einer Inhibition des Lactat-Transporters ist für diese Hefezellen daher ein verringertes Wachstum zu erwarten. Der Nachteil bei einer Untersuchung von Verbindungen an proliferierenden Zellen ist jedoch, dass zusätzliche Faktoren, wie beispielsweise die Diffusion über die Zellmembran oder der Metabolismus der Wirkstoff-Moleküle, einen entscheidenden Einfluss haben können. So könnte ein potenter *PfFNT* G107S-Inhibitor lediglich deshalb nicht erkannt werden, weil er ungünstige pharmakokinetische Eigenschaften aufweist, die jedoch über weitere Anpassungen des Moleküls möglicherweise positiv zu beeinflussen wären.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits erste Versuche unternommen, durch Veränderungen in BH-296 **37** potentere *PfFNT* G107S-Inhibitoren zu generieren. Ein Austausch des aromatischen Systems gegen kleinere, fünfgliedrige aromatische Heterozyklen führte dabei jedoch nicht zu Verbindungen mit einer höheren Affinität zum MMV007839-resistenten Lactat-Transporter (siehe Abschnitt 4.9.3). Dabei wurden in Form der Inhibitoren **48** und **49** sowohl Moleküle untersucht, bei denen im aromatischen System ein potentieller Wasserstoffbrückendonator enthalten ist, als auch mit Verbindung **50** ein Inhibitor, bei dem der Sauerstoff des Benzofuranyl-Substituenten als Wasserstoffbrückenakzeptor wirken kann – neben der grundsätzlichen Verkleinerung des Aromaten war die zusätzliche Adressierung der Hydroxyfunktion des Serins an Position 107 über die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung ein Ziel. Da jedoch bisher nur wenige Heterozyklen untersucht wurden, könnte in weiterführenden Arbeiten über eine größere Anzahl entsprechend modifizierter Verbindungen dennoch eine potente Hemmung von *PfFNT* G107S erfolgen. In Abbildung 6.8 sind weitere Strukturen dargestellt, die hinsichtlich ihrer Affinität zum MMV007839-resistenten Lactat-Transporter im Rahmen nachfolgender Arbeiten untersucht werden sollten. Dabei sind mit den Verbindungen **63** und **64** erstmals auch Moleküle enthalten, die ein elektronenarmes aromatisches System aufweisen; diese sind damit zusätzlich für das Aufstellen wei-

terer Struktur-Aktivitäts-Beziehungen im Wildtyp-*Pf*FNT von Interesse. In Verbindung **66** ist das Pharmakophor über einen Linker vom aromatischen System getrennt, jedoch ist hier, ausgehend von dem an *Pf*FNT G107S vergleichsweise potenten Inhibitor **54**, eine Methylenfunktion durch ein sekundäres Amin ersetzt, welches potentiell in der Lage ist, eine Wasserstoffbrückenbindung auszubilden.

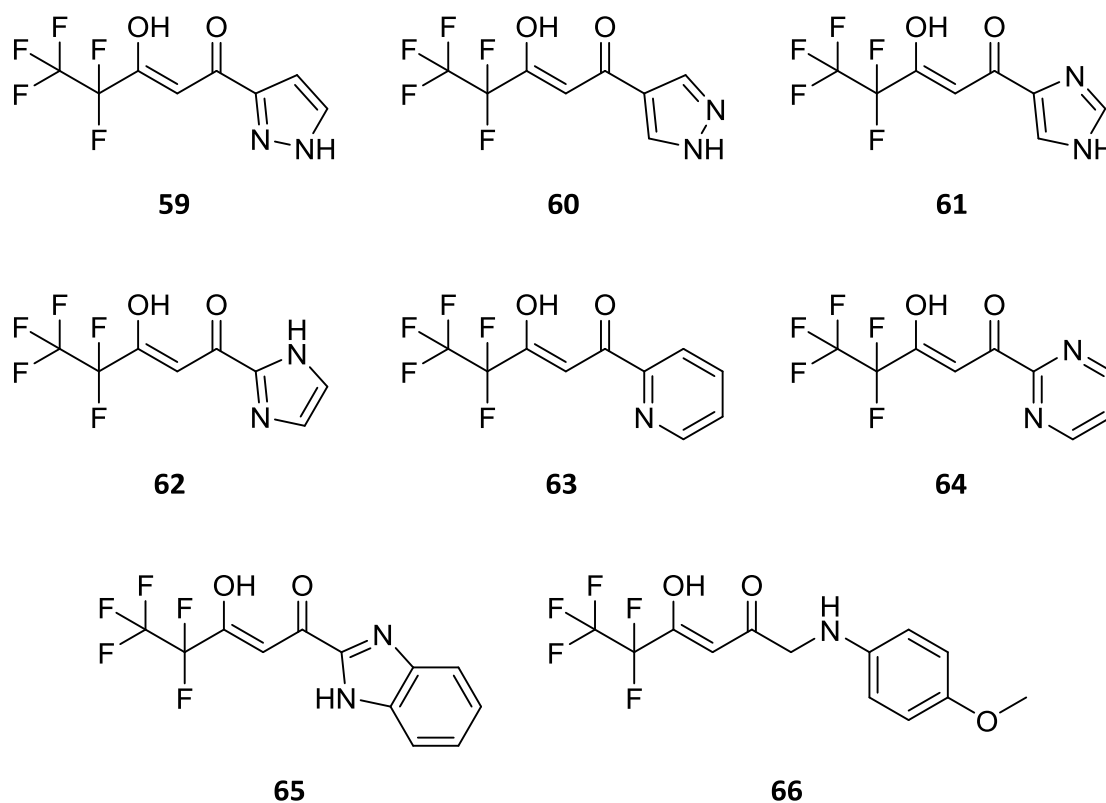


Abbildung 6.8: Verbindungen mit möglicherweise höherer Affinität zum MMV007839-resistenten *Pf*FNT G107S als BH-296, 37. Ein günstig positioniertes Stickstoffatom könnte in der Lage sein, über eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Hydroxyfunktion des Serins an Position 107 zu interagieren.

Besonders wertvoll für das rationale Design eines potenten *Pf*FNT G107S-Inhibitors wäre jedoch die hochaufgelöste Kristallstruktur des plasmodialen Lactat-Transporters inklusive des daran gebundenen Inhibitors. Beispiele für eine bereits erfolgreich durchgeführte Co-Kristallisation von Membranprotein und Inhibitor sind das humane 5-Lipoxygenase-aktivierende Protein oder der humane Glucose-Transporter GLUT1. Dort ermöglichten die resultierenden Strukturen das Aufstellen eines Bindemodus der jeweiligen Inhibitoren aufgrund der beobachteten Interaktionen mit dem Protein.<sup>144,145</sup>

Während bisher ausschließlich prokaryotische FNTs zur Kristallisation gebracht werden konnten, zeigt die in einigen Abbildungen dieser Arbeit dargestellte Struktur des eukaryotischen Lactat-Transportes ausschließlich ein Modell, welches auf den bekannten Strukturdaten basiert.<sup>59,64,67-69</sup> Im Arbeitskreis wurden bereits seit einiger Zeit Bemühungen vorgenommen, *Pf*FNT-Kristalle zu erzeugen, diese zeigten jedoch bislang keinen Erfolg.<sup>146,147</sup> Hier könnte jedoch der im Rahmen dieser Arbeit entdeckte *Pf*FNT-Hemmstoff MMV007839 **18** einen wertvollen Beitrag leisten: So ist bekannt, dass Inhibitoren die Kristallisation von

Proteinen begünstigen können, indem sie eine bestimmte Konformation im Makromolekül stabilisieren, was eine geordnete Assoziation der Proteine zur Folge hat.<sup>136,148–150</sup> Aufgrund der hohen Affinität des Inhibitors aus der Malaria-Box zu *PfFNT* sowie seiner langsamen Dissoziation vom *Target* erscheint ein Versuch der gemeinsamen Kristallisation mit dem plasmodialen Lactat-Transporter vielversprechend. So ließe sich einerseits der postulierte Bindemodus überprüfen, andererseits könnte durch die Kenntnis über die genaue Position von Gly107 eine gezielte strukturelle Anpassung des Inhibitors hinsichtlich einer Umgehung der Resistenz erfolgen. Im Anschluss an eine erfolgreiche Kristallisation von Wildtyp-*PfFNT* ist unter den dafür verwendeten Bedingungen auch der Versuch der Generierung von Kristallen des mutierten Lactat-Transporters denkbar. Dort könnte die Kollision der phenolischen Hydroxyfunktion von MMV007839 **18** mit der Seitenkette des Serins an Position 107 direkt nachvollzogen werden. Dabei ist jedoch die deutlich geringere Affinität des Inhibitors zu *PfFNT* G107S zu berücksichtigen, welche die Verwendung einer wesentlich höheren Inhibitor-Konzentration erfordert.

Eine *PfFNT*-Kristallstruktur, die den Substrat-analog gebundenen Inhibitor enthält, könnte neben der möglichen Optimierung des MMV007839-Moleküls zusätzlich dazu dienen, den postulierten Transportmechanismus zu verifizieren. So sollten beispielsweise die Seitenketten der lipophilen Aminosäuren, welche die intrazelluläre Engstelle ausbilden, durch die Fluoralkylkette des Inhibitors zur Seite gedrängt sein, so dass entsprechend den bereits angestellten Vermutungen eine Aufweitung des Transportpfades zu beobachten sein müsste.<sup>64,69</sup> Weiterhin könnte über die Beobachtung einer Interaktion der vinylogenen Säurefunktion von MMV007839 **18** mit einer positiv geladenen Aminosäure im intrazellulären Poreneingang die für die Substratanziehung verantwortliche Position auf dieser Seite des Proteins gefunden werden. Eine Substratanziehung von der intrazellulären Seite ist dabei insbesondere im Hinblick auf die physiologisch relevante Transportrichtung des plasmodialen Lactat-Transporters von Interesse.<sup>74</sup>

## 6.5 *EcNirC*

In vorangehenden Arbeiten an *NirC* wurde gezeigt, dass Nitrit das bevorzugte Substrat dieses FNTs darstellt, bereits für das dazu bioisostere Substrat Formiat wurde eine geringere Permeabilität beobachtet.<sup>64,151</sup> Auch im Rahmen dieser Arbeit zeigte *EcNirC* gegenüber den eukaryotischen Transportern *PfFNT* und *BbFNT* eine deutlich geringe Aufnahme von Formiat. Hierfür kann auch der wenig effiziente Einbau des prokaryotischen FNTs in die Plasmamembran der Hefezellen verantwortlich sein, wahrscheinlicher ist jedoch, dass die geringe Aufnahmerate direkt mit den Transporteigenschaften des Proteins zusammenhängt. So transportiert *EcNirC*, anders als die eukaryotischen FNTs, die größeren Monocarboxylate Acetat und L-Lactat überhaupt nicht, der Nitrit-Transporter zeigt damit innerhalb der FNT-Familie eine vergleichsweise hohe Substratselektivität.<sup>90</sup>

Auch hinsichtlich des pH-abhängigen Substrat-Transportes unterscheidet sich *EcNirC* deutlich von den bisher untersuchten FNTs: Während *FocA* und *PfFNT* einen ausgeprägten Anstieg der Transportraten im Säuren zeigen, bleibt die Formiat-Leitfähigkeit von *EcNirC* bei steigenden Protonenkonzentrationen nahezu unbeeinflusst. Dies ist insbesondere deshalb bemerkenswert, da der Transportmechanismus der FNTs, der von WIECHERT und BEITZ aufgrund der

an FocA und PffNT gemachten Beobachtungen postuliert wurde, den Co-Transport von Substrat und Protonen beinhaltet, welcher bei einer Erhöhung des Protonengradienten erleichtert abläuft.<sup>74</sup> Denkbar wäre daher, dass dem Substrattransport von EcNirC ein anderer Mechanismus zugrunde liegt. So konnten RYCOVSKA *et al.* in Membranvesikeln, die StNirC enthielten, in Gegenwart eines Fluoreszenzfarbstoffes einen Antiport von Nitrit und Protonen beobachten.<sup>151</sup> In der Aminosäuresequenz zeigt EcNirC für die Positionen, die bisher mit dem Transportmechanismus in Zusammenhang gebracht wurden, jedoch keine offensichtlichen Unterschiede zu anderen FNTs. Das im extrazellulären Poreneingang lokalisierte Lysin, welchem die Anziehung des Substrat-Anions zugeschrieben wurde, ist ebenso vorhanden wie das zentrale Histidin und weitere für FNTs typische Aminosäuren, welche die lipophilen Engstellen und den Selektivitätsfilter ausbilden.<sup>90</sup> In zukünftigen Arbeiten könnte diese Problematik, wie bereits für FocA durchgeführt, über Mutationsanalysen untersucht werden. Aufgrund der geringen Transportraten ist das Hefesystem hierfür jedoch nur bedingt geeignet, so dass eine Untersuchung der Leitfähigkeit von EcNirC mittels anderer Methoden (beispielsweise nach Rekonstitution zellfrei hergestellten Proteins in Liposomen) in Erwägung gezogen werden sollte.

Auch eine Inhibition des EcNirC-vermittelten Formiat-Transportes über kleine Moleküle war aufgrund der geringen Aufnahmeraten in der Hefe nur schwer nachvollziehbar. Gelänge es, wie unter Abschnitt 6.1.3 beschrieben, über die Anpassung einiger Parameter des Testsystems, die Qualität der Messergebnisse zu erhöhen, könnte in Zukunft eine Bestätigung des in dieser Arbeit für Flufenaminsäure **55** nur annäherungsweise ermittelten IC<sub>50</sub>-Wertes von 160 µM im Hefe-basierten Aufnahmeassay erfolgen. Mit diesem Inhibitor erfolgte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig die vollständige Inhibition von EcNirC – da die Affinität zum Nitrit-Transporter jedoch zu gering ist, um *in vitro* an *S. typhimurium* hinsichtlich einer Hemmung der Zellproliferation untersucht werden zu können, sollte ausgehend von dieser Verbindung über eine Optimierung der Molekülstruktur versucht werden, einen potenteren Inhibitor zu generieren. Basierend auf den Beobachtungen, die für die PffNT-Inhibitoren gemacht wurden, erscheinen dabei folgende Maßnahmen am vielversprechendsten (Abbildung 6.9): Der Fluoralkylrest und die Carbonsäurefunktion sollten beibehalten werden. Über die Veränderung der Kettenlänge der Carboxylseitenkette sollte versucht werden, die negativ geladene Funktion im Molekül günstiger zu positiv geladenen Aminosäuren im Poreneingang zu positionieren (Verbindungen **67** und **68**). Die Bedeutung der Fluoratome kann über Verbindung **69** untersucht werden. Dort ist das Molekül weniger stark verändert als in Verbindung **58**, bei der der Verlust des gesamten Trifluormethylrestes eine signifikante Verschiebung des IC<sub>50</sub>-Wertes zu höheren Konzentrationen zur Folge hatte, was bereits auf einen Einfluss der Fluoratome auf die Affinität zum Transporter hindeutete (Abschnitt 4.10.3). Diese Verschiebung sollte die Methyl-substituierte Verbindung **69** ebenso zeigen, vorausgesetzt, Flufenaminsäure **55** interagiert in ähnlicher Weise mit NirC wie MMV007839 **18** mit PffNT. Dabei ist jedoch für die Flufenaminsäure-Analoga zu berücksichtigen, dass die Substitution der elektronegativen Fluoratome gegen Wasserstoffatome nicht mit einem Verlust der aciden Funktion im Molekül einhergeht. Um eine Affinitätssteigerung zu erzielen, sollte weiterhin versucht werden, zusätzlich die Kettenlänge des Fluoralkylrestes zu variieren (Verbindung **70**). In Verbindung **71** ist schließlich eines der beiden aromatischen Systeme vollständig entfernt, so dass ein Molekül resultiert, welches eine wesentlich flexiblere Fluoralkylseiten-

kette aufweist – denkbar ist hier eine Interaktion mit tiefer im Poreneingang lokalisierten Aminosäuren des Nitrit-Transporters.

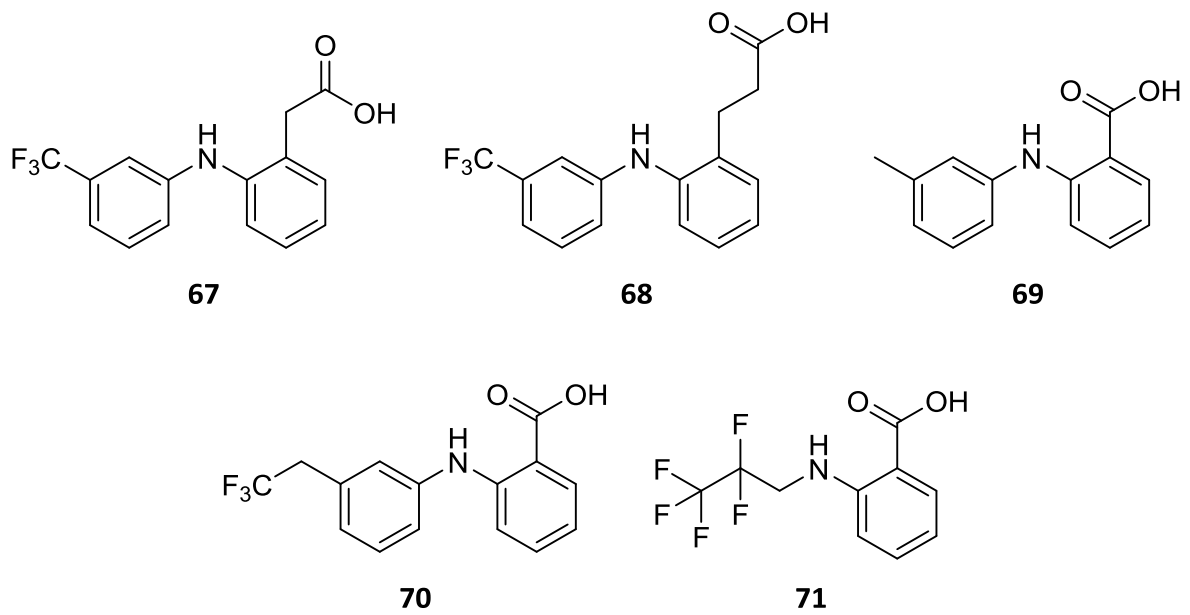


Abbildung 6.9: Verbindungen, die für das Aufstellen weiterer Struktur-Aktivitäts-Beziehungen an *EcNirC* geeignet wären.



## 7 Kurzfassung

Malaria zählt in den tropischen Regionen der Erde zu den gefährlichsten, durch Parasiten verursachten Erkrankungen des Menschen. Die meisten Todesfälle sind dabei auf Infektionen mit dem Malaria-Erreger *P. falciparum* zurückzuführen. Gegen alle verfügbaren Arzneistoffe gegen Malaria wurden bereits Resistenzen beobachtet, so dass die Entwicklung neuer Wirkstoffe, die sich gegen bisher nicht adressierte Wirkstoffziele richten, unabdingbar ist. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Entdeckung erster potenter Inhibitoren des erst seit Kurzem bekannten Lactat-Transporters aus *P. falciparum*, PfFNT, welcher für die Aufrechterhaltung des plasmodialen Energieflusses von großer Bedeutung ist.

Ausgehend von der *Malaria-Box*, einer Sammlung von 400 antiplasmodial wirksamen Verbindungen mit bisher unbekanntem Wirkmechanismus, wurden in dieser Arbeit mittels eines Hefe-basierten Aufnahmeassays unter Verwendung  $^{14}\text{C}$ -radiomarkierter Substrate mit MMV007839 und MMV000972 zwei strukturell ähnliche Verbindungen identifiziert, die den Substrat-Transport über PfFNT erstmals mit hoher Potenz inhibierten. Zusätzlich wurde am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg insbesondere für MMV007839 *in vitro* eine hohe Wirksamkeit gegen proliferierende Parasiten gezeigt. Ausgehend von der Untersuchung neuer MMV007839-analoger Verbindungen wurden quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen aufgestellt und die für die Inhibition relevante Molekülstruktur, eine vinyloge Fluoralkylcarbonsäure, identifiziert. Dieses Pharmakophor von MMV007839 bindet ähnlich wie das physiologische Substrat L-Lactat im intrazellulären Poreneingang des plasmodialen Lactat-Transporters und blockiert diesen. Dabei wurde im Rahmen dieser Arbeit für das MMV007839-Molekül ein bisher für Wirkstoffe einzigartiges „internes Prodrug-Prinzip“ entdeckt, welchem die reversible Umwandlung zwischen einer zyklischen, unpolaren Transport-Form und der offenkettigen, polaren Wirkform der Fluoralkylcarbonsäure zugrunde liegt. Zusätzlich konnte mit einigen der MMV007839-Analoga gegenüber der Verbindung aus der *Malaria-Box* eine Steigerung der antiplasmodialen Aktivität *in vitro* erzielt werden.

Trotz der Substrat-analogen Interaktion mit dem *Target* zeigte MMV007839 eine hohe Selektivität für PfFNT, die Affinität zum Monocarboxylat-Transporter 1, dem Lactat-Transporter der Wirtszelle der Parasiten, fiel deutlich geringer aus. Zudem konnte für den Inhibitor eine sehr starke, möglicherweise irreversible Bindung an PfFNT beobachtet werden, was die Selektivität zum plasmodialen Lactat-Transporter zusätzlich positiv beeinflusst. Die Inkubation von *P. falciparum* mit nicht-letalen MMV007839-Konzentrationen *in vitro* führte zur Selektion resistenter Parasiten, die einen einzelnen Nukleotidaustausch im PfFNT-Gen trugen. Dies und die deutlich geringere Affinität des Inhibitors aus der *Malaria-Box* zum resultierenden PfFNT G107S validieren den Lactat-Transporter als neues, durch ein kleines Molekül hemmbares Wirkstoffziel. Ausgehend vom Pharmakophor wurden in dieser Arbeit erste Verbindungen identifiziert, die in der Lage sind, die Resistenz-Mutation zu umgehen. Diese könnten in Zukunft als Leitstrukturen für weitere potente Inhibitoren dienen, die den plasmodialen Co-Transport von Lactat und Protonen zum Ziel haben, dabei jedoch weniger anfällig für die Entwicklung von Resistenzen als MMV007839 sind. Weiterhin könnten die in dieser Arbeit entdeckten Inhibitoren aufgrund ihrer hohen Affinität zu PfFNT einen entscheidenden Beitrag zur erfolgreichen Kristallisation des ersten eukaryotischen FNTs leisten.

## 8 Abstract

In tropical regions, malaria is one of the most dangerous parasitic diseases in human beings. The majority of deaths are caused by infections with *P. falciparum*. Since all available anti-malarial drugs are increasingly threatened by resistances in the parasites the development of compounds addressing novel targets is indispensable. The recently described *P. falciparum* lactate/proton symporter, *PfFNT*, is responsible for the maintenance of the parasite's energy flow. In this thesis, the discovery of the first potent inhibitors of *PfFNT* with high activity against cultured parasites is described.

Starting from the *malaria box* containing 400 antiplasmodial substances with hitherto unknown mechanism of action, two compounds with structural similarity were identified to inhibit  $^{14}\text{C}$ -monocarboxylate transport in *PfFNT*-expressing yeast with high potency: MMV007839 and MMV000972. *In vitro* studies on proliferating *P. falciparum* parasites performed at the Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine in Hamburg revealed a high antimalarial potency, particularly for the inhibitor MMV007839. Quantitative structure activity relationships were established investigating MMV007839-analogous compounds using the direct transport assay in yeast. In these studies, a fluoroalkyl vinylogous acid was identified as the pharmacophore – the crucial molecular structure responsible for *PfFNT* inhibition. Similar to the physiological substrate L-lactate, the pharmacophore of MMV007839 binds to the intracellular entrance of the *PfFNT* pore and blocks the passage of the substrate. The MMV007839 molecule contains a hitherto unknown and unique “internal prodrug principle” comprising a reversible switch between the lipophilic transport form and the polar vinylogous acid form. Additionally, some of the MMV007839-analogous structures showed an increased antiplasmodial activity on cultured parasites compared to the *malaria box* compound MMV007839.

Despite substrate-analogous interaction with the target, MMV007839 showed a high selectivity for *PfFNT*. The affinity to MCT1, the lactate transporter of the parasite's host cells, was distinctly reduced for that compound. Further an extraordinary strong, potentially irreversible, binding to *PfFNT* was observed for MMV007839, additionally positively affecting selectivity. Incubation of *P. falciparum* with non-lethal concentrations of MMV007839 *in vitro* facilitated selection of resistant parasites with a single nucleotide exchange in the *PfFNT* gene. Together with a markedly reduced affinity of MMV007839 to the resulting *PfFNT* G107S mutant, the development of resistance validates the lactate transporter from *P. falciparum* as a novel drug target accessible for small molecules. Based on the inhibitor's pharmacophore, first compounds circumventing the resistance mutation were identified. These substances may serve as lead structures for inhibitors targeting the plasmodial co-transport of lactate and protons potentially being less prone to the rise of resistances in the parasites than MMV007839. Further, *PfFNT*-inhibitors described within this thesis may contribute to the first successful crystallization of an eukaryotic formate-nitrite transporter.

## 9 Literaturverzeichnis

1. *World Health Organization*, Genf.  
World Malaria Report 2016.  
<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>  
(entnommen am 16.08.2017)
2. SACHS J; MALANEY P.  
The Economic and Social Burden of Malaria.  
*Nature*, **2002**, *415*, 680–685, und darin enthaltene Literatur.
3. *World Health Organization*, Genf.  
Climate Change and Infectious Diseases.  
<http://www.who.int/globalchange/summary/en/index5.html>  
(entnommen am 16.08.2017)
4. SEEBER F; STEINFELDER S.  
Recent Advances in Understanding Apicomplexan Parasites.  
*F1000Research*, **2016**, *5*, 1369, und darin enthaltene Literatur.
5. KANTELE A; JOKIRANTA TS.  
Review of Cases with the Emerging Fifth Human Malaria Parasite, *Plasmodium knowlesi*.  
*Clin. Infect. Dis.*, **2011**, *52*, 1356–1362, und darin enthaltene Literatur.
6. COWMAN AF, HEALER J, MARAPANA D, MARSH K.  
Malaria: Biology and Disease.  
*Cell*, **2016**, *167*, 610–624, und darin enthaltene Literatur.
7. PHILLIPS MA, BURROWS JN, MANYANDO C, VAN HUIJSDUIJNEN RH, VAN VOORHIS WC, WELLS TNC.  
Malaria.  
*Nat. Rev. Dis. Primers*, **2017**, *3*, 17050, und darin enthaltene Literatur.
8. TUTEJA R.  
Malaria – An Overview.  
*FEBS J.*, **2007**, *274*, 4670–4679, und darin enthaltene Literatur.
9. WHITE NJ, PUKRITTAYAKAMEE S, HIEN TT, FAIZ MA, MOKUOLU OA, DONDORP AM.  
Malaria.  
*Lancet*, **2014**, *383*, 723–735, und darin enthaltene Literatur.
10. CUI L, MHARAKURWA S, NDIAYE D, RATHOD PK, ROSENTHAL PJ.  
Antimalarial Drug Resistance: Literature Review and Activities and Findings of the ICEMR Network.  
*Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2015**, *93*, 57–68, und darin enthaltene Literatur.
11. LENGELER C.  
Insecticide-Treated Bed Nets and Curtains for Preventing Malaria.  
*Cochrane Database Syst. Rev.*, **2004**, *2004*

## Literaturverzeichnis

12. BHATT S, WEISS DJ, CAMERON E, BISANZIO D, MAPPIN B, DALRYMPLE U, BATTLE KE, MOYES CL, HENRY A, ECKHOFF PA, WENGER EA, BRIÉT O *et al.*  
The Effect of Malaria Control on *Plasmodium falciparum* in Africa Between 2000 and 2015.  
*Nature*, **2015**, 526, 207–211.
13. TOÉ KH, JONES CM, N'FALE S, ISMAIL HM, DABIRÉ RK, RANSON H.  
Increased Pyrethroid Resistance in Malaria Vectors and Decreased Bed Net Effectiveness, Burkina Faso.  
*Emerging Infect. Dis.*, **2014**, 20, 1691–1696.
14. OLIVA CF, VREYSEN MJB, DUPÉ S, LEES RS, GILLES JRL, GOUAGNA L-C, CHHEM R.  
Current Status and Future Challenges for Controlling Malaria with the Sterile Insect Technique: Technical and Social Perspectives.  
*Acta Trop.*, **2014**, 132, S130-S139.
15. TOMORI O.  
From Smallpox Eradication to the Future of Global Health: Innovations, Application and Lessons for Future Eradication and Control Initiatives.  
*Vaccine*, **2011**, 29 - Supplement 4, D145-D148.
16. LYKE KE.  
Steady Progress Toward a Malaria Vaccine.  
*Curr. Opin. Infect. Dis.*, **2017**, 30, 463–470.
17. *RTS,S Clinical Trials Partnership.*  
Efficacy and Safety of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine with or without a Booster Dose in Infants and Children in Africa: Final Results of a Phase 3, Individually Randomised, Controlled Trial.  
*Lancet*, **2015**, 386, 31–45.
18. *World Health Organization.*  
Malaria Vaccine: WHO Position Paper, January 2016 – Recommendations.  
*Vaccine*, **2017**.
19. *European Medicines Agency*, London.  
First Malaria Vaccine Receives Positive Scientific Opinion from EMA (Press Release).  
[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news\\_and\\_events/news/2015/07/news\\_detail\\_002376.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2015/07/news_detail_002376.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1)  
(entnommen am 18.08.2017)
20. *World Health Organization*, Genf.  
Guidelines for the Treatment of Malaria. Third Edition.  
<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>  
(entnommen am 19.08.2017)
21. MUTSCHLER E, GEISSLINGER G, KROEMER HK, RUTH P, SCHÄFER-KORTING M.  
Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*, Stuttgart, **2008**.
22. NOSTEN F, TER KUILE F, CHONGSUPHAJAISIDDHI T, WHITE NJ, LUXEMBURGER C, WEBSTER HK, EDSTEIN M, PHAIPUN L, LAY THEW K.  
Mefloquine-Resistant Falciparum Malaria on the Thai-Burmese Border.  
*Lancet*, **1991**, 337, 1140–1143.

## Literaturverzeichnis

23. BROCKMAN A, PRICE RN, VAN VUGT M, HEPPNER DG, WALSH D, SOOKTO P, WIMONWATTRAWATEE T, LOOAREESUWAN S, WHITE NJ, NOSTEN F.  
*Plasmodium falciparum* Antimalarial Drug Susceptibility on the North-Western Border of Thailand During Five Years of Extensive Use of Artesunate-Mefloquine.  
*Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **2000**, *94*, 537–544.
24. BAIRD JK.  
Resistance to Chloroquine Unhinges Vivax Malaria Therapeutics.  
*Antimicrob. Agents Chemother.*, **2011**, *55*, 1827–1830.
25. MITA T; TANABE K.  
Evolution of *Plasmodium falciparum* Drug Resistance: Implications for the Development and Containment of Artemisinin Resistance.  
*Jpn. J. Infect. Dis.*, **2012**, *65*, 465–475, und darin enthaltene Literatur.
26. FAIRHURST RM; DONDORP AM.  
Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* Malaria.  
*Microbiol. Spectr.*, **2016**, *4*
27. WANG J, ZHANG C-J, CHIA WN, LOH CCY, LI Z, LEE YM, HE Y, YUAN L-X, LIM TK, LIU M, LIEW CX, LEE YQ *et al.*  
Haem-Activated Promiscuous Targeting of Artemisinin in *Plasmodium falciparum*.  
*Nat. Commun.*, **2015**, *6*, 10111.
28. MESHNICK SR, YANG YZ, LIMA V, KUYPERS F, KAMCHONWONGPAISAN S, YUTHAVONG Y.  
Iron-Dependent Free Radical Generation from the Antimalarial Agent Artemisinin (Qinghaosu).  
*Antimicrob. Agents Chemother.*, **1993**, *37*, 1108–1114.
29. NOSTEN F; WHITE NJ.  
Artemisinin-Based Combination Treatment of Falciparum Malaria.  
*Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2007**, *77*, 181–192.
30. DONDORP AM, NOSTEN F, YI P, DAS D, PHYO AP, TARNING J, LWIN KM, ARIEY F, HANPITHAKPONG W, LEE SJ, RINGWALD P, SILAMUT K *et al.*  
Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria.  
*N. Engl. J. Med.*, **2009**, *361*, 455–467.
31. ACHAN J, TALISUNA AO, ERHART A, YEKA A, TIBENDERANA JK, BALIRAINÉ FN, ROSENTHAL PJ, D'ALESSANDRO U.  
Quinine, an Old Anti-Malarial Drug in a Modern World: Role in the Treatment of Malaria.  
*Malar. J.*, **2011**, *10*, 144.
32. ROEPE PD.  
The Molecular and Physiologic Basis of Quinoline Drug Resistance in *P. falciparum* Malaria.  
*Future Microbiol.*, **2009**, *4*, 441–455.
33. SLATER AFG.  
Chloroquine: Mechanism of Drug Action and Resistance in *Plasmodium falciparum*.  
*Pharmacol. Ther.*, **1993**, *57*, 203–235.

## Literaturverzeichnis

34. ECKER A, LEHANE AM, CLAIN J, FIDOCK DA.  
PfCRT and Its Role in Antimalarial Drug Resistance.  
*Trends Parasitol.*, **2012**, *28*, 504–514, und darin enthaltene Literatur.
35. SANCHEZ CP, DAVE A, STEIN WD, LANZER M.  
Transporters as Mediators of Drug Resistance in *Plasmodium falciparum*.  
*Int. J. Parasitol.*, **2010**, *40*, 1109–1118, und darin enthaltene Literatur.
36. FOOTE SJ, KYLE DE, MARTIN RK, ODUOLA AM, FORSYTH K, KEMP DJ, COWMAN AF.  
Several Alleles of the Multidrug-Resistance Gene Are Closely Linked to Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum*.  
*Nature*, **1990**, *345*, 255–258.
37. HILL DR, BAIRD JK, PARISE ME, LEWIS LS, RYAN ET, MAGILL AJ.  
Primaquine: Report from CDC Expert Meeting on Malaria Chemoprophylaxis I.  
*Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **2006**, *75*, 402–415.
38. KORSINCZKY M, CHEN N, KOTECKA B, SAUL A, RIECKMANN K, CHENG Q.  
Mutations in *Plasmodium falciparum* Cytochrome *b* That Are Associated with Atovaquone Resistance Are Located at a Putative Drug-Binding Site.  
*Antimicrob. Agents Chemother.*, **2000**, *44*, 2100–2108.
39. LIM L; MCFADDEN GI.  
The Evolution, Metabolism and Functions of the Apicoplast.  
*Phil. Trans. R. Soc. B*, **2010**, *365*, 749–763.
40. DAHL EL, SHOCK JL, SHENAI BR, GUT J, DERISI JL, ROSENTHAL PJ.  
Tetracyclines Specifically Target the Apicoplast of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*.  
*Antimicrob. Agents Chemother.*, **2006**, *50*, 3124–3131.
41. WELLS TNC, VAN HUIJSDUIJNEN RH, VAN VOORHIS WC.  
Malaria Medicines: A Glass Half Full?  
*Nat. Rev. Drug Discov.*, **2015**, *14*, 424–442.
42. *malERA Consultative Group on Drugs*.  
A Research Agenda for Malaria Eradication: Drugs.  
*PLoS Med.*, **2011**, *8*, e1000402.
43. BURROWS JN, VAN HUIJSDUIJNEN RH, MÖHRLE JJ, OEUVRAY C, WELLS TNC.  
Designing the Next Generation of Medicines for Malaria Control and Eradication.  
*Malar. J.*, **2013**, *12*, 187.
44. LEVEN M, KNAAB TC, HELD J, DUFFY S, MEISTER S, FISCHLI C, MEITZNER D, LEHMANN U, LUNGERICH B, KUNA K, STAHLKE P, DELVES MJ *et al.*  
3-Hydroxy-*N'*-arylidenepropanehydrazonamides with Halo-Substituted Phenanthrene Scaffolds Cure *P. berghei* Infected Mice When Administered Perorally.  
*J. Med. Chem.*, **2017**, *60*, 6036–6044.
45. KATO N, COMER E, SAKATA-KATO T, SHARMA A, SHARMA M, MAETANI M, BASTIEN J, BRANCUCCI NM, BITTKER JA, COREY V, CLARKE D, DERBYSHIRE ER *et al.*  
Diversity-Oriented Synthesis Yields Novel Multistage Antimalarial Inhibitors.  
*Nature*, **2016**, *538*, 344–349.

46. TURNER H.  
Spiroindolone NITD609 is a Novel Antimalarial Drug That Targets the P-Type ATPase PfATP4.  
*Future Med. Chem.*, **2016**, *8*, 227–238.
47. GAMO F-J, SANZ LM, VIDAL J, DE COZAR C, ALVAREZ E, LAVANDERA J-L, VANDERWALL DE, GREEN DVS, KUMAR V, HASAN S, BROWN JR, PEISHOFF CE *et al.*  
Thousands of Chemical Starting Points for Antimalarial Lead Identification.  
*Nature*, **2010**, *465*, 305–310.
48. GUIGUEMDE WA, SHELAT AA, BOUCK D, DUFFY S, CROWTHER GJ, DAVIS PH, SMITHSON DC, CONNELLY M, CLARK J, ZHU F, JIMÉNEZ-DÍAZ MB, MARTINEZ MS *et al.*  
Chemical Genetics of *Plasmodium falciparum*.  
*Nature*, **2010**, *465*, 311–315.
49. *Medicines for Malaria Venture*, Genf.  
<https://www.mmv.org/>  
(entnommen am 25.08.2017)
50. PHYO AP, JITTAMALA P, NOSTEN FH, PUKRITTAYAKAMEE S, IMWONG M, WHITE NJ, DUPARC S, MACINTYRE F, BAKER M, MÖHRLE JJ.  
Antimalarial Activity of Artefenomel (OZ439), a Novel Synthetic Antimalarial Endoperoxide, in Patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Malaria: An Open-Label Phase 2 Trial.  
*Lancet Infect. Dis.*, **2016**, *16*, 61–69.
51. WANI WA, JAMEEL E, BAIG U, MUMTAZUDDIN S, HUN LT.  
Ferroquine and Its Derivatives: New Generation of Antimalarial Agents.  
*Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, *101*, 534–551.
52. PHILLIPS MA; RATHOD PK.  
Plasmodium Dihydroorotate Dehydrogenase: A Promising Target for Novel Anti-Malarial Chemotherapy.  
*Infect. Disord.: Drug Targets*, **2010**, *10*, 226–239, und darin enthaltene Literatur.
53. PHILLIPS MA, LOTHARIUS J, MARSH K, WHITE J, DAYAN A, WHITE KL, NJOROGUE JW, EL MAZOUNI F, LAO Y, KOKKONDA S, TOMCHICK DR, DENG X *et al.*  
A Long-Duration Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitor (DSM265) for Prevention and Treatment of Malaria.  
*Sci. Transl. Med.*, **2015**, *7*, 296ra111.
54. JIMÉNEZ-DÍAZ MB, EBERT D, SALINAS Y, PRADHAN A, LEHANE AM, MYRAND-LAPIERRE M-E, O'LOUGHLIN KG, SHACKLEFORD DM, JUSTINO DE ALMEIDA M, CARRILLO AK, CLARK JA, DENNIS ASM *et al.*  
(+)-SJ733, a Clinical Candidate for Malaria That Acts Through ATP4 to Induce Rapid Host-Mediated Clearance of *Plasmodium*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2014**, *111*, E5455-E5462.
55. VAN VOORHIS WC, ADAMS JH, ADELFO R, AHYONG V, AKABAS MH, ALANO P, ALDAY A, ALEMÁN RESTO Y, ALSIBAE A, ALZUALDE A, ANDREWS KT, AVERY SV *et al.*  
Open Source Drug Discovery with the Malaria Box Compound Collection for Neglected Diseases and Beyond.  
*PLoS Pathog.*, **2016**, *12*, e1005763.

## Literaturverzeichnis

56. SPANGENBERG T, BURROWS JN, KOWALCZYK P, McDONALD S, WELLS TNC, WILLIS P.  
The Open Access Malaria Box: A Drug Discovery Catalyst for Neglected Diseases.  
*PLoS One*, **2013**, *8*, e62906.
57. LEHANE AM, RIDGWAY MC, BAKER E, KIRK K.  
Diverse Chemotypes Disrupt Ion Homeostasis in the Malaria Parasite.  
*Mol. Microbiol.*, **2014**, *94*, 327–339.
58. LÜ W, DU J, SCHWARZER NJ, WACKER T, ANDRADE SLA, EINSLE O.  
The Formate/Nitrite Transporter Family of Anion Channels.  
*Biol. Chem.*, **2013**, *394*, 715–727, und darin enthaltene Literatur.
59. WANG Y, HUANG Y, WANG J, CHENG C, HUANG W, LU P, XU Y-N, WANG P, YAN N, SHI Y.  
Structure of the Formate Transporter FocA Reveals a Pentameric Aquaporin-Like Channel.  
*Nature*, **2009**, *462*, 467–472.
60. HALESTRAP AP; MEREDITH D.  
The *SLC16* Gene Family – From Monocarboxylate Transporters (MCTs) to Aromatic Amino Acid Transporters and Beyond.  
*Pflügers Arch.*, **2004**, *447*, 619–628.
61. HALESTRAP AP.  
The Monocarboxylate Transporter Family – Structure and Functional Characterization.  
*IUBMB Life*, **2012**, *64*, 1–9.
62. LEONHARTSBERGER S, KORSA I, BÖCK A.  
The Molecular Biology of Formate Metabolism in Enterobacteria.  
*J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **2002**, *4*, 269–276.
63. SUPPMANN B; SAWERS G.  
Isolation and Characterization of Hypophosphite-Resistant Mutants of *Escherichia coli*: Identification of the FocA Protein, Encoded by the *pfl* Operon, as a Putative Formate Transporter.  
*Mol. Microbiol.*, **1994**, *11*, 965–982.
64. LÜ W, SCHWARZER NJ, DU J, GERBIG-SMENTEK E, ANDRADE SLA, EINSLE O.  
Structural and Functional Characterization of the Nitrite Channel NirC from *Salmonella typhimurium*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2012**, *109*, 18395–18400.
65. EINSLE O; KRONECK PMH.  
Structural Basis of Denitrification.  
*Biol. Chem.*, **2004**, *385*, 875–883.
66. DAS P, LAHIRI A, LAHIRI A, CHAKRAVORTTY D.  
Novel Role of the Nitrite Transporter NirC in *Salmonella* Pathogenesis: SPI2-Dependent Suppression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Activated Macrophages.  
*Microbiology*, **2009**, *155*, 2476–2489.
67. CZYZEWSKI BK; WANG D-N.  
Identification and Characterization of a Bacterial Hydrosulphide Ion Channel.  
*Nature*, **2012**, *483*, 494–497.



68. LÜ W, DU J, WACKER T, GERBIG-SMENTEK E, ANDRADE SLA, EINSLE O.  
pH-Dependent Gating in a FocA Formate Channel.  
*Science*, **2011**, *332*, 352–354.
69. WAIGHT AB, LOVE J, WANG D-N.  
Structure and Mechanism of a Pentameric Formate Channel.  
*Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2010**, *17*, 31–37.
70. AGRE P, KING LS, YASUI M, GUGGINO WB, OTTERSEN OP, FUJIYOSHI Y, ENGEL A, NIELSEN S.  
Aquaporin Water Channels – From Atomic Structure to Clinical Medicine.  
*J. Physiol.*, **2002**, *542*, 3–16.
71. FU D, LIBSON A, MIERCKE LJ, WEITZMAN C, NOLLERT P, KRUCINSKI J, STROUD RM.  
Structure of a Glycerol-Conducting Channel and the Basis for Its Selectivity.  
*Science*, **2000**, *290*, 481–486.
72. LÜ W, DU J, SCHWARZER NJ, GERBIG-SMENTEK E, EINSLE O, ANDRADE SLA.  
The Formate Channel FocA Exports the Products of Mixed-Acid Fermentation.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2012**, *109*, 13254–13259.
73. HUNGER D, DOBERENZ C, SAWERS RG.  
Identification of Key Residues in the Formate Channel FocA That Control Import and Export of Formate.  
*Biol. Chem.*, **2014**, *395*, 813–825.
74. WIECHERT M; BEITZ E.  
Mechanism of Formate-Nitrite Transporters by Dielectric Shift of Substrate Acidity.  
*EMBO J.*, **2017**, *36*, 949–958.
75. WIECHERT M; BEITZ E.  
Formate-Nitrite Transporters: Monoacids Ride the Dielectric Slide.  
*Channels*, **2017**, *11*, 365–367.
76. ELLIOTT JL, SALIBA KJ, KIRK K.  
Transport of Lactate and Pyruvate in the Intraerythrocytic Malaria Parasite,  
*Plasmodium falciparum*.  
*Biochem. J.*, **2001**, *355*, 733–739.
77. CRANMER SL, CONANT AR, GUTTERIDGE WE, HALESTRAP AP.  
Characterization of the Enhanced Transport of L- and D-Lactate into Human Red Blood Cells Infected with *Plasmodium falciparum* Suggests the Presence of a Novel Saturable Lactate Proton Cotransporter.  
*J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 15045–15052.
78. KANAANI J; GINSBURG H.  
Transport of Lactate in *Plasmodium falciparum*-Infected Human Erythrocytes.  
*J. Cell. Physiol.*, **1991**, *149*, 469–476.
79. SHERMAN IW.  
Biochemistry of *Plasmodium* (Malarial Parasites).  
*Microbiol. Rev.*, **1979**, *43*, 453–495.
80. MCKEE RW, ORMSBEE RA, ANFINSEN CB, GEIMAN QM, BALL EG.  
Studies on Malarial Parasites: VI. The Chemistry and Metabolism of Normal and Parasitized (*P. knowlesi*) Monkey Blood.  
*J. Exp. Med.*, **1946**, *84*, 569–582.

## Literaturverzeichnis

81. MUECKLER M, CARUSO C, BALDWIN SA, PANICO M, BLENCH I, MORRIS HR, ALLARD WJ, LIENHARD GE, LODISH HF.  
Sequence and Structure of a Human Glucose Transporter.  
*Science*, **1985**, 229, 941–945.
82. LINGELBACH K; JOINER KA.  
The Parasitophorous Vacuole Membrane Surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*:  
An Unusual Compartment in Infected Cells.  
*J. Cell Sci.*, **1998**, 111, 1467–1475.
83. WOODROW CJ, PENNY JI, KRISHNA S.  
Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* Expresses a High Affinity Facilitative Hexose  
Transporter.  
*J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 7272–7277.
84. BERG JM, TYMOCZKO JL, STRYER L.  
Stryer Biochemie.  
6. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, **2011**.
85. WU B, RAMBOW J, BOCK S, HOLM-BERTELSEN J, WIECHERT M, BLANCKE SOARES A, SPIELMANN T,  
BEITZ E.  
Identity of a *Plasmodium* Lactate/H<sup>+</sup> Symporter Structurally Unrelated to Human  
Transporters.  
*Nat. Commun.*, **2015**, 6, 6284.
86. MARCHETTI RV, LEHANE AM, SHAFIK SH, WINTERBERG M, MARTIN RE, KIRK K.  
A Lactate and Formate Transporter in the Intraerythrocytic Malaria Parasite,  
*Plasmodium falciparum*.  
*Nat. Commun.*, **2015**, 6, 6721.
87. GARCIA CK, GOLDSTEIN JL, PATHAK RK, ANDERSON RG, BROWN MS.  
Molecular Characterization of a Membrane Transporter for Lactate, Pyruvate, and  
Other Monocarboxylates: Implications for the Cori Cycle.  
*Cell*, **1994**, 76, 865–873.
88. ORTIZ D, GUIGUEMDE WA, JOHNSON A, ELYA C, ANDERSON J, CLARK J, CONNELLY M, YANG L, MIN J,  
SATO Y, GUY RK, LANDFEAR SM.  
Identification of Selective Inhibitors of the *Plasmodium falciparum* Hexose Transporter  
PfHT by Screening Focused Libraries of Anti-Malarial Compounds.  
*PLoS One*, **2015**, 10, e0123598.
89. JOËT T, ECKSTEIN-LUDWIG U, MORIN C, KRISHNA S.  
Validation of the Hexose Transporter of *Plasmodium falciparum* as a Novel Drug  
Target.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2003**, 100, 7476–7479.
90. WIECHERT M, ERLER H, GOLLDACK A, BEITZ E.  
A Widened Substrate Selectivity Filter of Eukaryotic Formate-Nitrite Transporters  
Enables High-Level Lactate Conductance.  
*FEBS J.*, **2017**, 284, 2663–2673.

91. KANAANI J; GINSBURG H.  
Effects of Cinnamic Acid Derivatives on In Vitro Growth of *Plasmodium falciparum* and on the Permeability of the Membrane of Malaria-Infected Erythrocytes.  
*Antimicrob. Agents Chemother.*, **1992**, *36*, 1102–1108.
92. SOARES-SILVA I, PAIVA S, DIALLINAS G, CASAL M.  
The Conserved Sequence NXX[S/T]HX[S/T]QDXXXT of the Lactate/Pyruvate:H<sup>+</sup> Symporter Subfamily Defines the Function of the Substrate Translocation Pathway.  
*Mol. Membr. Biol.*, **2007**, *24*, 464–474.
93. GOTTLIEB HE, KOTLYAR V, NUDELMAN A.  
NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities.  
*J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 7512–7515.
94. COHEN SN, CHANG ACY, HSU L.  
Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1972**, *69*, 2110–2114.
95. GIETZ RD; SCHIESTL RH.  
High-Efficiency Yeast Transformation Using the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method.  
*Nat. Protoc.*, **2007**, *2*, 31–34.
96. GODWIN H.  
Half-Life of Radiocarbon.  
*Nature*, **1962**, *195*, 984.
97. DAMON PE, LERMAN JC, LONG A.  
Temporal Fluctuations of Atmospheric <sup>14</sup>C: Causal Factors and Implications.  
*Annu. Rev. Earth Planet. Sci.*, **1978**, *6*, 457–494, und darin enthaltene Literatur.
98. UREY HC.  
The Thermodynamic Properties of Isotopic Substances.  
*J. Chem. Soc.*, **1947**, 562–581.
99. *National Diagnostics Laboratory Staff*.  
Principles and Applications of Liquid Scintillation Counting: A Primer for Orientation.  
*National Diagnostics*, **2004**.
100. TRAGER W; JENSEN JB.  
Human Malaria Parasites in Continuous Culture.  
*Science*, **1976**, *193*, 673–675.
101. SOSNOVSKIKH VY; USACHEV BI.  
2-Polyfluoroalkylchromones: 6. Synthesis of Substituted 2-Morpholino-2-trifluoromethylchroman-4-ones.  
*Russ. Chem. Bull., Int. Ed.*, **2001**, *50*, 453–455.
102. CASAL M, PAIVA S, QUEIRÓS O, SOARES-SILVA I.  
Transport of Carboxylic Acids in Yeasts.  
*FEMS Microbiol. Rev.*, **2008**, *32*, 974–994.
103. PAIVA S, DEVAUX F, BARBOSA S, JACQ C, CASAL M.  
Ady2p is Essential for the Acetate Permease Activity in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Yeast*, **2004**, *21*, 201–210.

104. ANDRADE RP; CASAL M.  
Expression of the Lactate Permease Gene *JEN1* from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Fungal Genet. Biol.*, **2001**, *32*, 105–111.
105. WIECHERT MI.  
Transportmechanismus und Selektivität der Formiat-Nitrit-Transporter.  
*Dissertation*, Kiel, **2017**.
106. SINGH J, PETTER RC, BAILLIE TA, WHITTY A.  
The Resurgence of Covalent Drugs.  
*Nat. Rev. Drug Discov.*, **2011**, *10*, 307–317, und darin enthaltene Literatur.
107. BRÜCKNER R.  
Reaktionsmechanismen: Organische Reaktionen, Stereochemie, Moderne Synthesemethoden.  
3. Auflage, 2. korrigierter Nachdruck. *Spektrum Akademischer Verlag*, Berlin, **2009**.
108. LINDHORST TK.  
Essential of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.  
3. Auflage. *Wiley-VCH*, Weinheim, **2008**.
109. SOSNOVSKIKH VY, SIZOV AY, USACHEV BI.  
2-Polyfluoroalkylchromones: 10. Synthesis of Regioisomeric 3-(2-Hydroxyaryl)-5-polyfluoroalkyl- and 5-(2-Hydroxyaryl)-3-polyfluoroalkylisoxazoles and Determination of Their Structures by  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ , and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy.  
*Russ. Chem. Bull., Int. Ed.*, **2002**, *51*, 1270–1279.
110. SIRIMULLA S, BAILEY JB, VEGESNA R, NARAYAN M.  
Halogen Interactions in Protein-Ligand Complexes: Implications of Halogen Bonding for Rational Drug Design.  
*J. Chem. Inf. Model.*, **2013**, *53*, 2781–2791.
111. ZHOU P, ZOU J, TIAN F, SHANG Z.  
Fluorine Bonding – How Does It Work in Protein-Ligand Interactions?  
*J. Chem. Inf. Model.*, **2009**, *49*, 2344–2355.
112. MÜLLER K, FAEH C, DIEDERICH F.  
Fluorine in Pharmaceuticals: Looking Beyond Intuition.  
*Science*, **2007**, *317*, 1881–1886.
113. PATANI GA; LAVOIE EJ.  
Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design.  
*Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 3147–3176, und darin enthaltene Literatur.
114. BOTT G, FIELD LD, STERNHELL S.  
Steric Effects. A Study of a Rationally Designed System.  
*J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 5618–5626.
115. SLAVÍK J.  
Intracellular pH of Yeast Cells Measured with Fluorescent Probes.  
*FEBS Lett.*, **1982**, *140*, 22–26.
116. KOTYK A.  
Intracellular pH of Baker's Yeast.  
*Folia Microbiol.*, **1963**, *8*, 27–31.

117. BISSANTZ C, KUHN B, STAHL M.  
A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions.  
*J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 5061–5084.
118. VANNIER EG, DIUK-WASSER MA, BEN MAMOUN C, KRAUSE PJ.  
Babesiosis.  
*Infect. Dis. Clin. N. Am.*, **2015**, *29*, 357–370.
119. BRAYTON KA, LAU AOT, HERNDON DR, HANNICK L, KAPPMAYER LS, BERENS SJ, BIDWELL SL, BROWN WC, CRABTREE J, FADROSH D, FELDBLUM T, FORBERGER HA *et al.*  
Genome Sequence of *Babesia bovis* and Comparative Analysis of Apicomplexan Hemoprotozoa.  
*PLoS Pathog.*, **2007**, *3*, 1401–1413.
120. MCCLELLAND M, SANDERSON KE, SPIETH J, CLIFTON SW, LATREILLE P, COURTNEY L, PORWOLLIK S, ALI J, DANTE M, DU F, HOU S, LAYMAN D *et al.*  
Complete Genome Sequence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2.  
*Nature*, **2001**, *413*, 852–856.
121. BLATTNER FR, PLUNKETT III G, BLOCH CA, PERNA NT, BURLAND V, RILEY M, COLLADO-VIDES J, GLASNER JD, RODE CK, MAYHEW GF, GREGOR J, DAVIS NW *et al.*  
The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12.  
*Science*, **1997**, *277*, 1453–1462.
122. PIOTTO M, BOURDONNEAU M, ELBAYED K, WIERUSZESKI J-M, LIPPENS G.  
New DEFT Sequences for the Acquisition of One-Dimensional Carbon NMR Spectra of Small Unlabelled Molecules.  
*Magn. Reson. Chem.*, **2006**, *44*, 943–947.
123. SLOOP JC, BOYLE PD, FOUNTAIN AW, PEARMAN WF, SWANN JA.  
Electron-Deficient Aryl  $\beta$ -Diketones: Synthesis and Novel Tautomeric Preferences.  
*Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, *2011*, 936–941.
124. SLOOP JC, BUMGARDNER CL, WASHINGTON G, LOEHLE WD, SANKAR SS, LEWIS AB.  
Keto-Enol and Enol-Enol Tautomerism in Trifluoromethyl- $\beta$ -Diketones.  
*J. Fluorine Chem.*, **2006**, *127*, 780–786.
125. BÜTTNER S, LUBBE M, REINKE H, FISCHER C, LANGER P.  
Regioselective Synthesis of 4-Alkyl- and 4-Aryl-6-(perfluoroalkyl)salicylic Acid Derivatives by Formal [3+3] Cyclocondensation of 1,3-Bis(silyloxy)-1,3-butadienes with 3-Silyloxy-1-(perfluoroalkyl)prop-2-en-1-ones.  
*Tetrahedron*, **2008**, *64*, 7968–7976.
126. KURTS AL, DEM'YANOV PI, MACIAS A, BELETSKAYA IP, REUTOV OA.  
Reactivity of Ambident Anions–II: Kinetics of Alkylation of  $\beta$ -Ketoester Alkaline Enolates by Ethyl Tosylate in Hexamethylphosphotriamide.  
*Tetrahedron*, **1971**, *27*, 4769–4776.
127. KELLER M, IANCHUK M, LADEIRA S, TAILLEFER M, CAMINADE A-M, MAJORAL J-P, OUALI A.  
Synthesis of Dendritic  $\beta$ -Diketones and Their Application in Copper-Catalyzed Diaryl Ether Formation.  
*Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, *2012*, 1056–1062.

128. RICHARD JP; WILLIAMS KB.  
A Marcus Treatment of Rate Constants for Protonation of Ring-Substituted  $\alpha$ -Methoxystyrenes: Intrinsic Reaction Barriers and the Shape of the Reaction Coordinate.  
*J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 6952–6961.
129. FLORES AFC, MARTINS MJ, FRIGO LM, MACHADO P, CAMPOS PT, MALAVOLTA JL.  
Synthesis and Structure of Novel 1-Aryl-4,4,4-trichloro-1,3-butanediones.  
*Synth. Commun.*, **2012**, *42*, 727–737.
130. AUDI G, BERSILLON O, BLACHOT J, WAPSTRA AH.  
The NUBASE Evaluation of Nuclear and Decay Properties.  
*Nucl. Phys. A*, **2003**, *729*, 3–128.
131. ELIA G.  
Biotinylation Reagents for the Study of Cell Surface Proteins.  
*Proteomics*, **2008**, *8*, 4012–4024.
132. WAGNER BK; SCHREIBER SL.  
The Power of Sophisticated Phenotypic Screening and Modern Mechanism-of-Action Methods.  
*Cell Chem. Biol.*, **2016**, *23*, 3–9.
133. BASORE K, CHENG Y, KUSHWAHA AK, NGUYEN ST, DESAI SA.  
How Do Antimalarial Drugs Reach Their Intracellular Targets?  
*Front. Pharmacol.*, **2015**, *6*, 91.
134. HAPUARACHCHI SV, COBBOLD SA, SHAFIK SH, DENNIS ASM, MCCONVILLE MJ, MARTIN RE, KIRK K, LEHANE AM.  
The Malaria Parasite's Lactate Transporter PfFNT is the Target of Antiplasmodial Compounds Identified in Whole Cell Phenotypic Screens.  
*PLoS Pathog.*, **2017**, *13*, e1006180.
135. RAUTIO J, KUMPULAINEN H, HEIMBACH T, OLIYAI R, OH D, JÄRVINEN T, SAVOLAINEN J.  
Prodrugs: Design and Clinical Applications.  
*Nat. Rev. Drug Discov.*, **2008**, *7*, 255–270.
136. KLEBE G.  
Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen.  
2. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, **2009**.
137. JACKSON VN; HALESTRAP AP.  
The Kinetics, Substrate, and Inhibitor Specificity of the Monocarboxylate (Lactate) Transporter of Rat Liver Cells Determined Using the Fluorescent Intracellular pH Indicator, 2',7'-Bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein.  
*J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 861–868.
138. COPELAND RA.  
The Drug-Target Residence Time Model: A 10-Year Retrospective.  
*Nat. Rev. Drug Discov.*, **2016**, *15*, 87–95.
139. COPELAND RA, POMPLIANO DL, MEEK TD.  
Drug-Target Residence Time and Its Implications for Lead Optimization.  
*Nat. Rev. Drug Discov.*, **2006**, *5*, 730–739.

140. CONCEPCION J, WITTE K, WARTCHOW C, CHOO S, YAO D, PERSSON H, WEI J, LI P, HEIDECKER B, MA W, VARMA R, ZHAO L-S *et al.*  
Label-Free Detection of Biomolecular Interactions Using BioLayer Interferometry for Kinetic Characterization.  
*Comb. Chem. High Throughput Screening*, **2009**, *12*, 791–800.
141. DANIELSON UH.  
Fragment Library Screening and Lead Characterization Using SPR Biosensors.  
*Curr. Top. Med. Chem.*, **2009**, *9*, 1725–1735.
142. HOLM-BERTELSEN J, BOCK S, HELMSTETTER F, BEITZ E.  
High-Level Cell-Free Production of the Malarial Lactate Transporter PffNT as a Basis for Crystallization Trials and Directional Transport Studies.  
*Protein Expr. Purif.*, **2016**, *126*, 109–114.
143. BALKENHOHL F, VON DEM BUSSCHE-HÜNNEFELD C, LANSKY A, ZECHEL C.  
Kombinatorische Synthese Niedermolekularer Organischer Verbindungen.  
*Angew. Chem.*, **1996**, *108*, 2436–2488.
144. KAPOOR K, FINER-MOORE JS, PEDERSEN BP, CABONI L, WAIGHT A, HILLIG RC, BRINGMANN P, HEISLER I, MÜLLER T, SIEBENEICHER H, STROUD RM.  
Mechanism of Inhibition of Human Glucose Transporter GLUT1 is Conserved Between Cytochalasin B and Phenylalanine Amides.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2016**, *113*, 4711–4716.
145. FERGUSON AD, MCKEEVER BM, XU S, WISNIEWSKI D, MILLER DK, YAMIN T-T, SPENCER RH, CHU L, UJJAINWALLA F, CUNNINGHAM BR, EVANS JF, BECKER JW.  
Crystal Structure of Inhibitor-Bound Human 5-Lipoxygenase-Activating Protein.  
*Science*, **2007**, *317*, 510–512.
146. HOLM-BERTELSEN J.  
Expressionssysteme zur Gewinnung von Rekombinantem PffNT zur Reinigung, Funktionsuntersuchung & Kristallisation.  
*Dissertation*, Kiel, **2016**.
147. BOCK S.  
Zellfreie Synthese von Schwer Herstellbaren Proteinen.  
*Dissertation*, Kiel, **2014**.
148. MCPHERSON A.  
Introduction to Protein Crystallization.  
*Methods*, **2004**, *34*, 254–265.
149. DURBIN SD; FEHER G.  
Protein Crystallization.  
*Annu. Rev. Phys. Chem.*, **1996**, *47*, 171–204.
150. D'ARCY A.  
Crystallizing Proteins – A Rational Approach?  
*Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **1994**, *50*, 469–471.
151. RYCOVSKA A, HATAHET L, FENDLER K, MICHEL H.  
The Nitrite Transport Protein NirC from *Salmonella typhimurium* is a Nitrite/Proton Antiporter.  
*Biochim. Biophys. Acta*, **2012**, *1818*, 1342–1350.

# Anhang

Für diejenigen Verbindungen, für die im Text lediglich die Angabe eines  $IC_{50}$ -Wertes erfolgte, sind nachstehend die zugrunde liegenden  $IC_{50}$ -Kurven dargestellt.

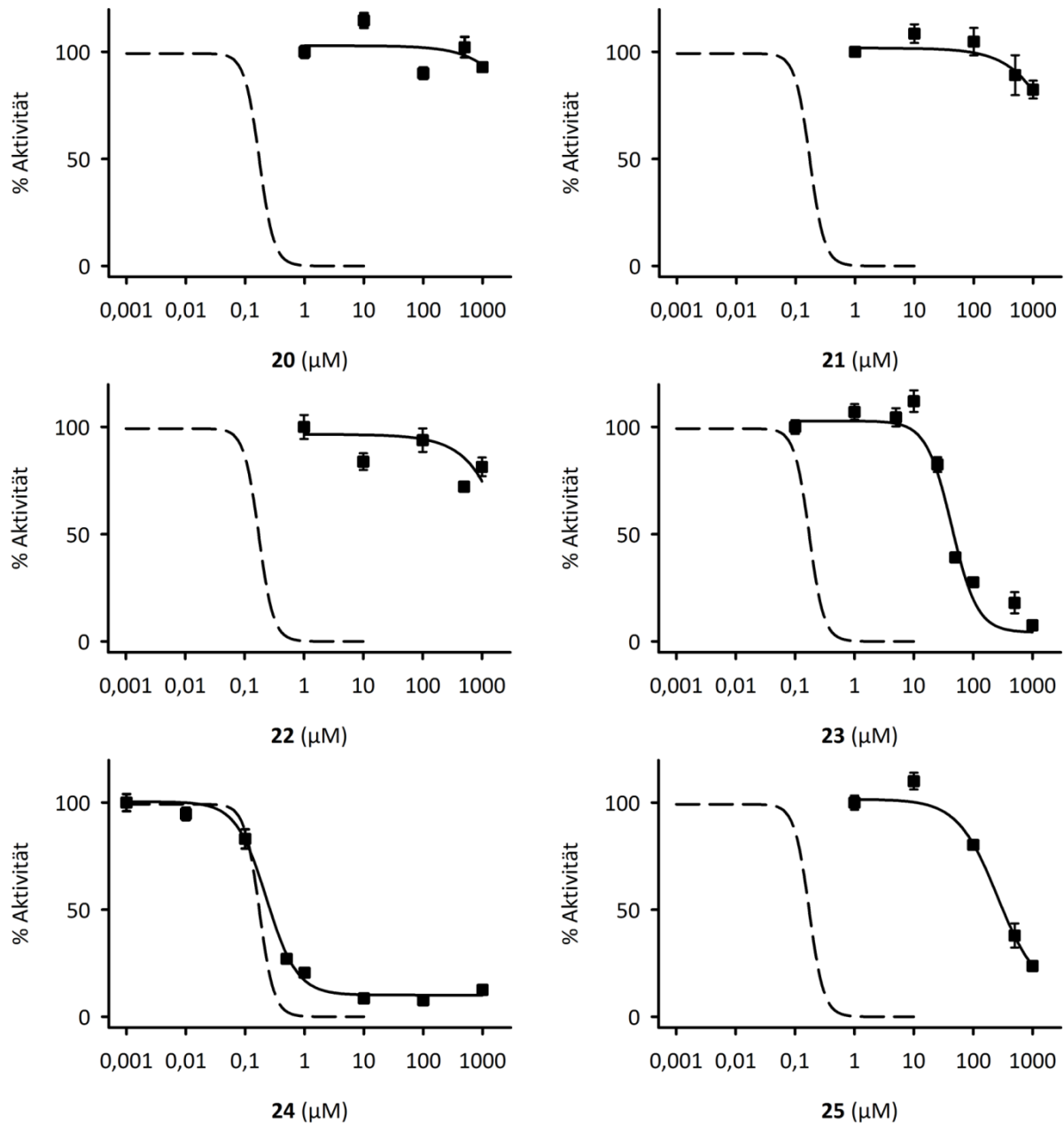


Abbildung A.1: Wird auf der nachfolgenden Seite fortgesetzt.



# Anhang

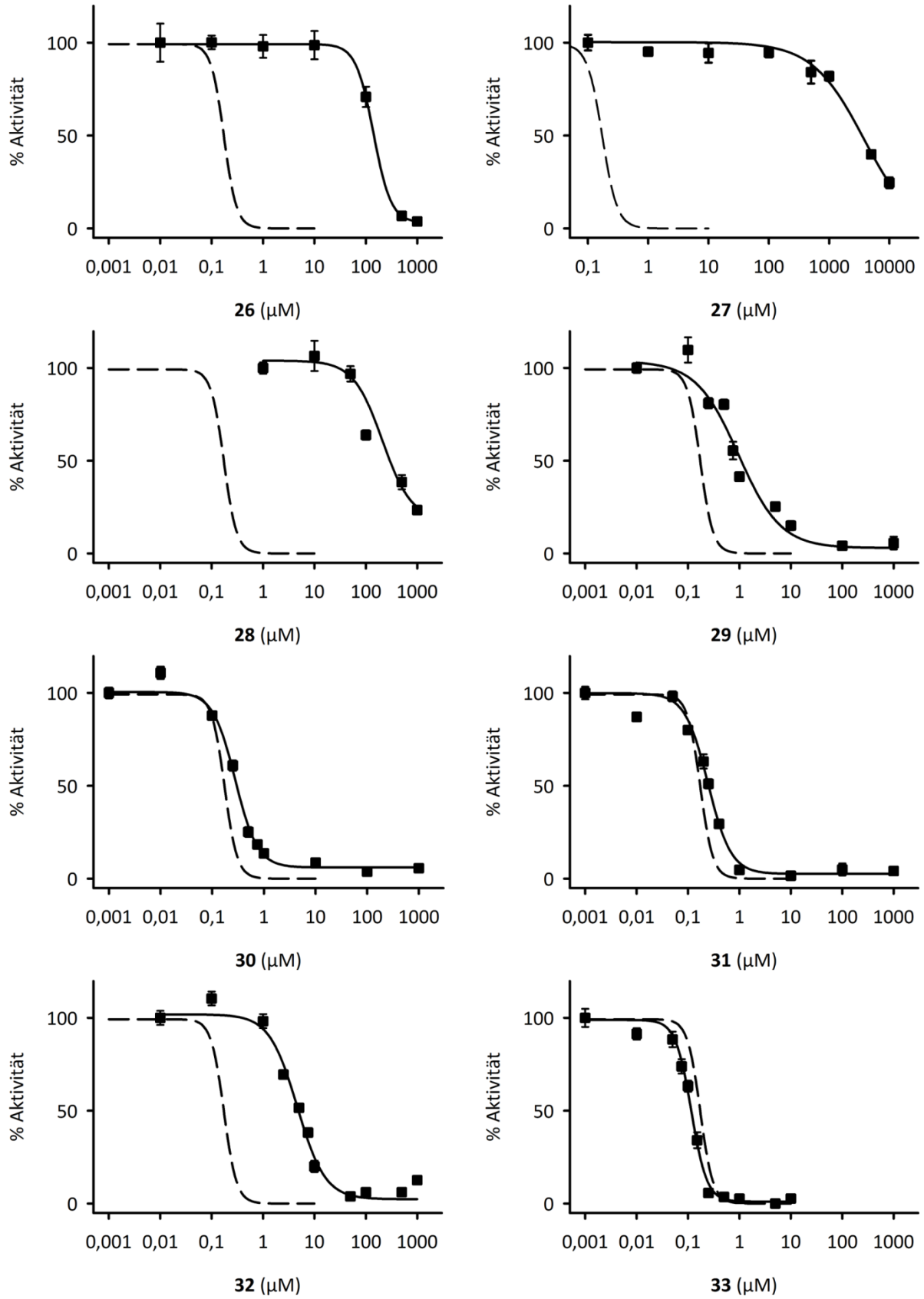


Abbildung A.1: Wird auf der nachfolgenden Seite fortgesetzt.

Anhang

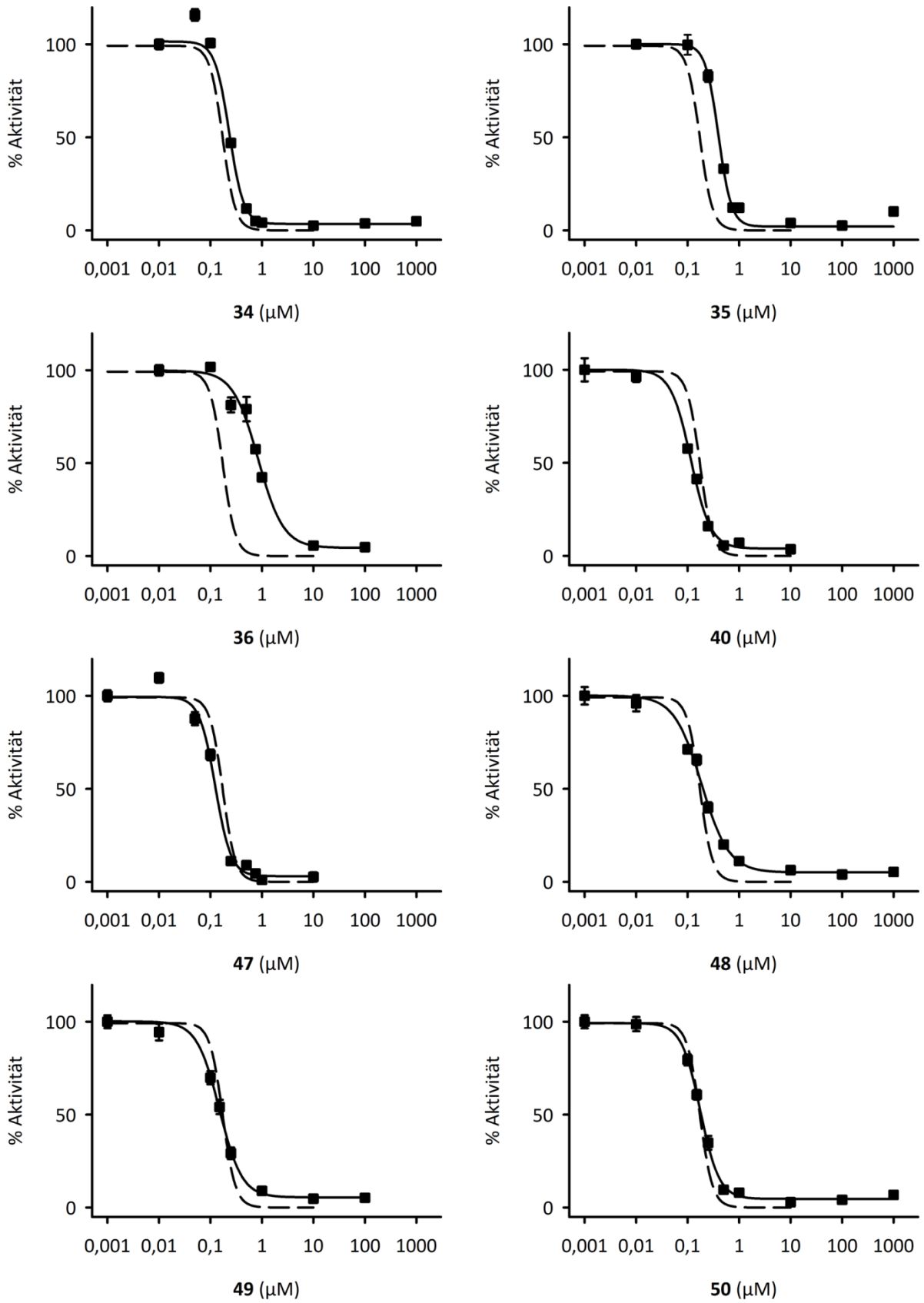


Abbildung A.1: Wird auf der nachfolgenden Seite fortgesetzt.

## Anhang

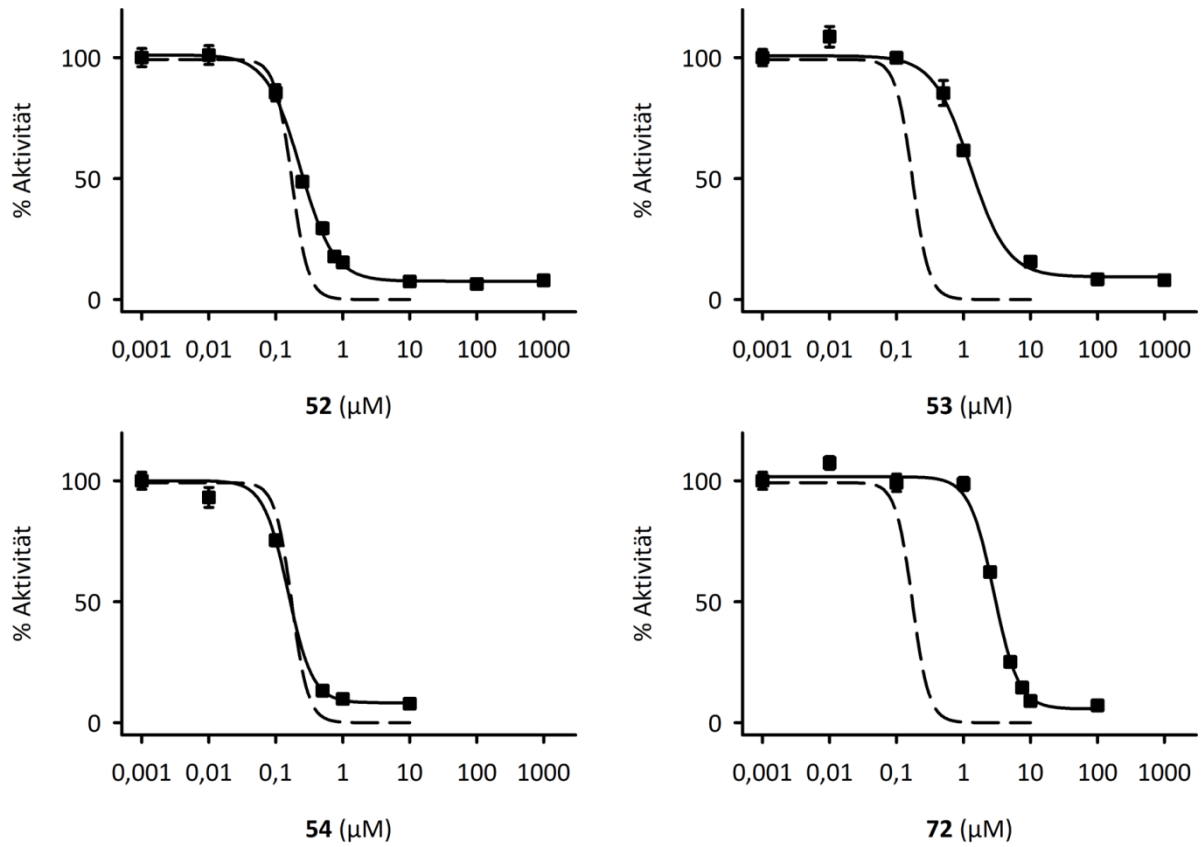


Abbildung A.1: Wildtyp-PfFNT: Bestimmung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte der Verbindungen 20–36, 40, 47–50, 52–54 und 72 für die PfFNT-Hemmung in Hefe. Die gestrichelte Linie zeigt zum Vergleich die  $\text{IC}_{50}$ -Kurve von MMV007839, 18 an PfFNT.

Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04  $\mu\text{Ci}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 30 s. pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

# Anhang

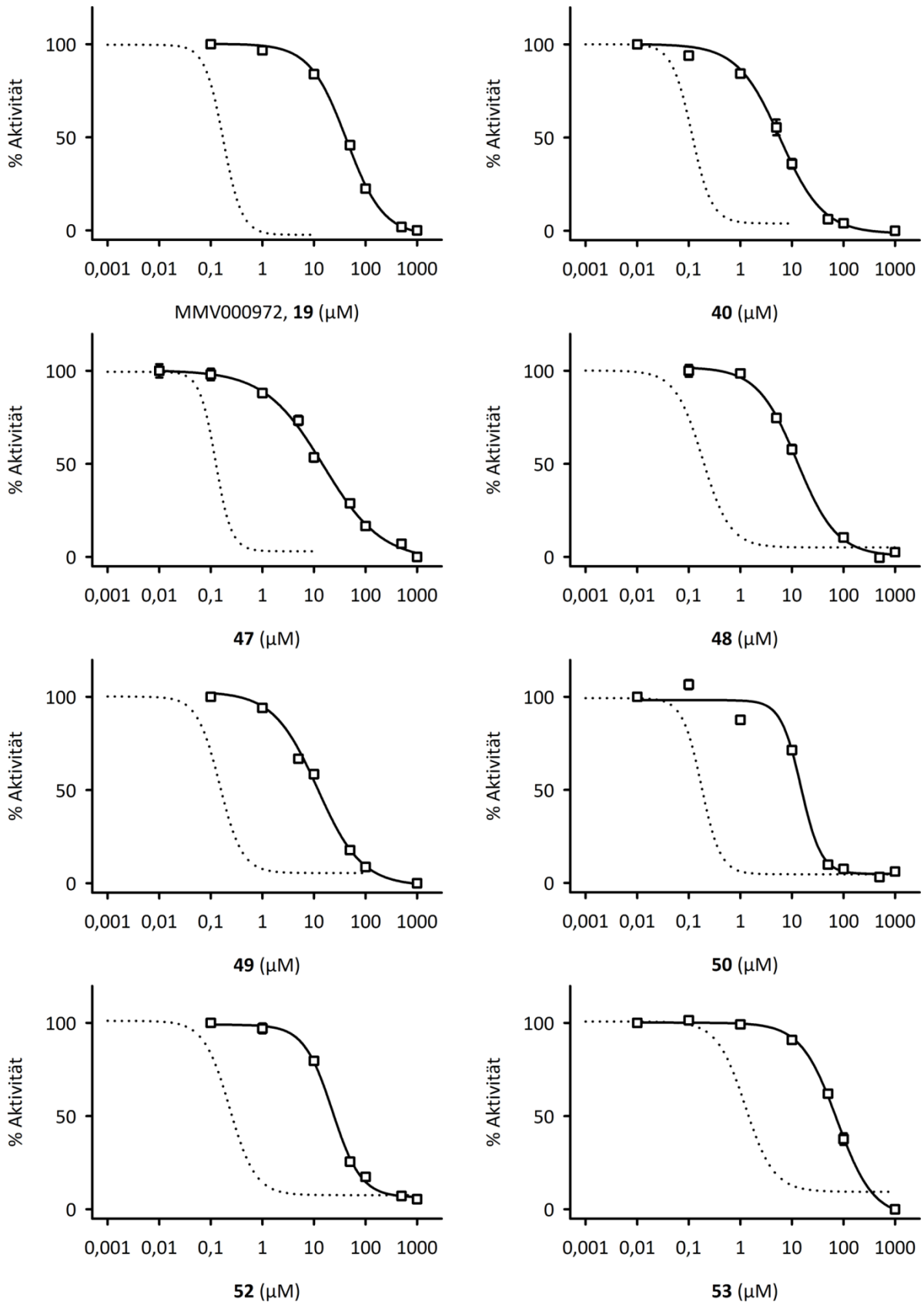
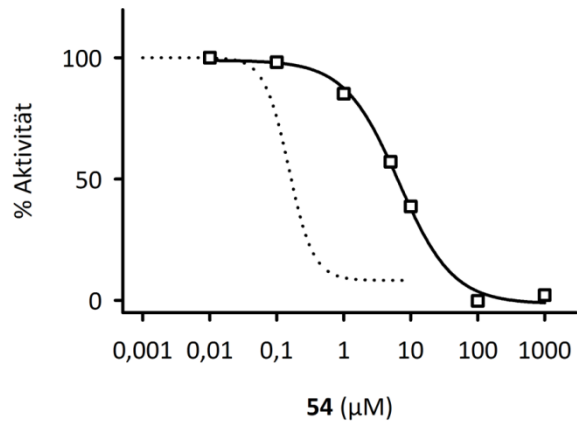


Abbildung A.2: Wird auf der nachfolgenden Seite fortgesetzt.

## Anhang



**Abbildung A.2:** *PfFNT*-Mutante: Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte der Verbindung MMV000972, 19 sowie der Verbindungen 40, 47–50 und 52–54 für die *PfFNT* G107S-Hemmung in Hefe. Die gepunkteten Linien zeigen jeweils zum Vergleich die  $IC_{50}$ -Kurven der entsprechenden Inhibitoren an Wildtyp-*PfFNT*. Inkubationszeit Inhibitor: 15–20 min. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04  $\mu$ Ci [ $1-^{14}C$ ]-L-Lactat, Substratinkubationszeit: 120 s (*PfFNT* G107S). pH 6,8. Die Fehlerbalken zeigen den SEM.

Nr.	Interne Bezeichnung	Struktur	Summenformel	M <sub>R</sub>	pK <sub>s</sub>	IC <sub>50</sub> PfFNT (μM)	IC <sub>50</sub> P. falc. 3D7 (μM)	IC <sub>50</sub> PfFNT G107S (μM)	IC <sub>50</sub> P. falc. res. (μM)
16	Nifluminsäure		C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	282,22	(1,9)	72±5		69±3	
18	MMV007839 BH-312		C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> F <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	312,19	5,0	0,17±0,01	0,14±0,01	22±2	35±4
19	MMV000972		C <sub>11</sub> H <sub>7</sub> F <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	282,17	5,0	0,17±0,02	1,6±0,1	41±2	
20	9.)		C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> F <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	294,18	-	> 1000			
21	2.)		C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	206,24	-	> 1000			

Tabelle A.1: Wird auf der folgenden Seite fortgesetzt.

Nr.	Interne Bezeichnung	Struktur	Summenformel	M <sub>R</sub>	pK <sub>s</sub>	IC <sub>50</sub> PfFNT (μM)	IC <sub>50</sub> P. falc. 3D7 (μM)	IC <sub>50</sub> PfFNT G107S (μM)	IC <sub>50</sub> P. falc. res. (μM)
22	10.)		C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> F <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	244,19	6,2	> 1000			
23	5.)		C <sub>11</sub> H <sub>7</sub> ClF <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	298,62	5,1	47±2			
24	BH-317.2 37.)		C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> ClF <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	316,61	4,7	0,26±0,02			
25	12.)		C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>	281,62	-	320±60			
26	BH-326.2 14.)		C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> F <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	326,22	5,1	150±10			

Tabelle A.1: Wird auf der folgenden Seite fortgesetzt.

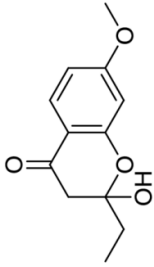
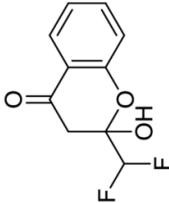
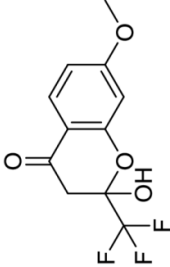
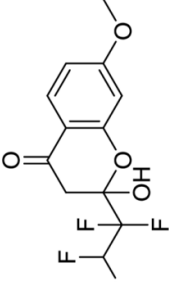
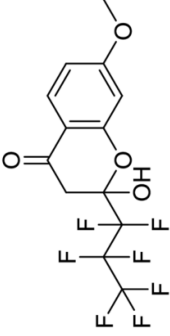
Nr.	Interne Bezeichnung	Struktur	Summenformel	M <sub>R</sub>	pK <sub>s</sub>	IC <sub>50</sub> PfFNT (μM)	IC <sub>50</sub> P. falc. 3D7 (μM)	IC <sub>50</sub> PfFNT G107S (μM)	IC <sub>50</sub> P. falc. res. (μM)
27	BH-222 26.)		C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	222,24	9,3	3500±300			
28	6.)		C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> F <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	214,17	6,2	290±30			
29	1.)		C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> F <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	262,18	4,8	1,1±0,1			
30	3.)		C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> F <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	294,20	5,5	0,30±0,02			
31	BH-362 15.)		C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> F <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	362,20	5,0	0,25±0,02	0,57±0,10		

Tabelle A.1: Wird auf der folgenden Seite fortgesetzt.



Anhang

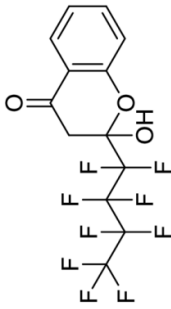
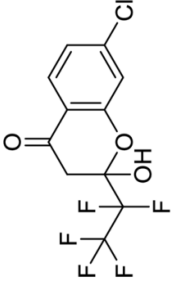
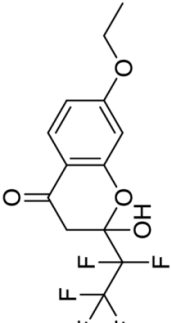
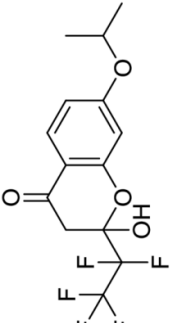
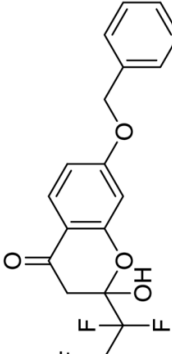
Nr.	Interne Bezeichnung	Struktur	Summenformel	M <sub>R</sub>	pK <sub>s</sub>	IC <sub>50</sub> PfFNT (μM)	IC <sub>50</sub> P. falc. 3D7 (μM)	IC <sub>50</sub> PfFNT G107S (μM)	IC <sub>50</sub> P. falc. res. (μM)
32	8.)		C <sub>13</sub> H <sub>7</sub> F <sub>9</sub> O <sub>3</sub>	382,18	4,9	4,9±0,2			
33	BH-317 16.)		C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> ClF <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	316,61	4,7	0,12±0,01	0,37±0,05		
34	BH-326 13.)		C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> F <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	326,22	5,0	0,24±0,01	0,05±0,01		
35	BH-340 17.)		C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> F <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	340,25	5,0	0,40±0,01	0,10±0,01		
36	BH-388 19.)		C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> F <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	388,29	5,0	0,89±0,03			

Tabelle A.1: Wird auf der folgenden Seite fortgesetzt.

# Anhang

Nr.	Interne Bezeichnung	Struktur	Summenformel	M <sub>R</sub>	pK <sub>s</sub>	IC <sub>50</sub> PfFNT (μM)	IC <sub>50</sub> P. falc. 3D7 (μM)	IC <sub>50</sub> PfFNT G107S (μM)	IC <sub>50</sub> P. falc. res. (μM)
37	BH-296 (18.)		C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> F <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	296,19	5,1	0,14±0,01	3,4±0,2	2,7±0,2	8,9±0,5
38	BH-296-Ethylester- Prodrug BH-324		C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> F <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	324,25	-		9,5±1,4		16 (n = 2)
39	BH-246 (36.)		C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> F <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	246,19	4,9	1,1±0,1			
40	BH-301 (22.)		C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> ClF <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	300,61	4,8	0,12±0,01		5,8±0,7	
41	Pharmako- phor (23.)		C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> F <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	204,10	4,9	1,9±0,3		8,1±0,4	
42	BH-206 (27.)		C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	206,24	9,2	6800±500			

Tabelle A.1: Wird auf der folgenden Seite fortgesetzt.

# Anhang

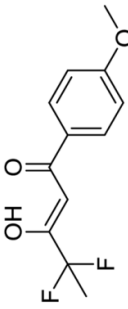
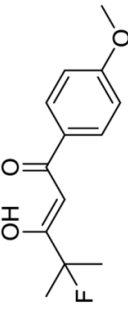
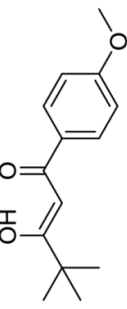
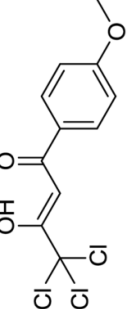
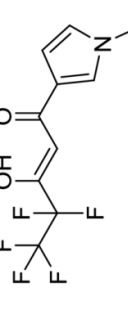
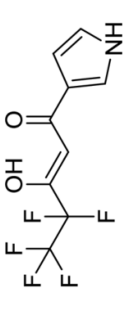
Nr.	Interne Bezeichnung	Struktur	Summenformel	M <sub>R</sub>	pK <sub>s</sub>	IC <sub>50</sub> PfFNT (μM)	IC <sub>50</sub> P. falc. 3D7 (μM)	IC <sub>50</sub> PfFNT G107S (μM)	IC <sub>50</sub> P. falc. res. (μM)
43	BH-242 35.)		C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> F <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	242,22	6,4	6,8±0,5			
44	BH-238 34.)		C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> FO <sub>3</sub>	238,26	7,8	210±20			
45	BH-234 33.)		C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	234,30	9,2	> 1000			
46	BH-296.2 40.)		C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	295,54	6,3	1,0±0,1			
47	BH-269 20.)		C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> F <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	269,17	5,2	0,13±0,01		15±1	
48	BH-255/3 25.)		C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> F <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	255,14	5,1	0,20±0,01		13±1	

Tabelle A.1: Wird auf der folgenden Seite fortgesetzt.

# Anhang

Nr.	Interne Bezeichnung	Struktur	Summenformel	M <sub>R</sub>	pK <sub>s</sub>	IC <sub>50</sub> PfFNT (μM)	IC <sub>50</sub> P. falc. 3D7 (μM)	IC <sub>50</sub> PfFNT G107S (μM)	IC <sub>50</sub> P. falc. res. (μM)
49	BH-255/2 30.)		C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> F <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	255,14	5,1	0,16±0,01		12±1	
50	BH-306 28.)		C <sub>13</sub> H <sub>7</sub> F <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	306,19	5,1	0,18±0,01		15±1	
51	BH-262 24.)		C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> F <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	262,18	5,3	1,1±0,1	10 (n = 2)	490±20	70 (n = 2)
52	BH-292 31.)		C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> F <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	292,21	5,4	0,26±0,01		25±1	
53	BH-310 39.)		C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> F <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	310,22	5,2	1,5±0,1		70±5	

Tabelle A.1: Wird auf der folgenden Seite fortgesetzt.

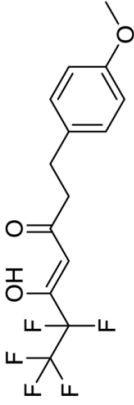
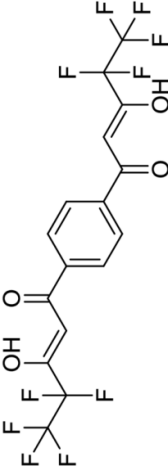
Nr.	Interne Bezeichnung	Struktur	Summenformel	M <sub>R</sub>	pK <sub>s</sub>	IC <sub>50</sub> PfFNT (μM)	IC <sub>50</sub> P. falc. 3D7 (μM)	IC <sub>50</sub> PfFNT G107S (μM)	IC <sub>50</sub> P. falc. res. (μM)
54	BH-324,2 (38.)		C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> F <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	324,25	5,3	0,16±0,01		6,3±0,4	
72	BH-454 (29.)		C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> F <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	454,22	4,8	3,0±0,1			

Tabelle A.1: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen. Die im Hefe-basierten Aufnahmeassay mit <sup>14</sup>C-radiomarkiertem L-Lactat an PfFNT bestimmten IC<sub>50</sub>-Werte sind grau hinterlegt. M<sub>R</sub> = relative Molekülmasse, P. falc. = *P. falciparum*, P. falc. res. = *P. falciparum* mit MIMV007839-Resistenz. Der pK<sub>s</sub>-Wert wurde mit Ausnahme der Nifluminsäure jeweils für die vinyloge Säure berechnet (Abschnitt 2.3). Leere Felder zeigen nicht erhobene Daten an.

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die Abhandlung – abgesehen von der Beratung durch den Betreuer – nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist. Die Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

André Golldeck

Kiel, Dezember 2017

# Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Eric Beitz für die Aufnahme in den Arbeitskreis, die Überlassung des spannenden Promotionsthemas, die Freiheiten in der Forschung sowie die anregenden Diskussionen und Gespräche bedanken.

Björn Henke danke ich für seine große Hilfsbereitschaft im Labor im Allgemeinen und für die engagierte Durchführung der Synthesen der PffNT-Inhibitoren im Speziellen.

Großer Dank gebührt Dr. Tobias Spielmann und allen beteiligten Mitarbeitern des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin in Hamburg für die Testung der Inhibitoren in den Parasitenkulturen.

Prof. Dr. Andreas Tholey vom Institut für Experimentelle Medizin der CAU Kiel und seinem Arbeitskreis danke ich für die Beteiligung bei der Suche nach einer möglichen kovalenten Bindung des Inhibitors.

Dr. Ulrich Girreser danke ich für die stete Hilfsbereitschaft bei analytischen Fragestellungen sowie für das kritische Korrekturlesen des analytischen Teils dieser Arbeit.

Für die Unterstützung im Laboralltag möchte ich mich bei Anna Fuchs, Björn Henke und Manuela Kramp bedanken. Daneben gilt mein Dank auch Dr. Ulrich Girreser, Susan Häuer, Martin Schütt, Sven Wichman und Melissa Zietz für die zuverlässige Durchführung der spektroskopischen Messungen.

Dr. Julia von Bülow danke ich sehr herzlich für die großartige Betreuung und Unterstützung im praktischen Jahr, in dessen Verlauf ich sehr viel lernen konnte und welches mich zusätzlich motivierte, im Arbeitskreis zu promovieren.

Jennifer Schneider danke ich für die Gesprächsbereitschaft vor allem in der Schreibphase und insbesondere für ihre große Hilfsbereitschaft am Tage der Disputation.

Für die schöne und lustige Zeit bei der gemeinsamen Betreuung des zweiten Semesters danke ich Björn J., Britta, Chris, Dorian, Eugen, Lydia, Martin, Rebecca und Tamara.

Bei Ahmad, Anna M., Folknand, Holger, Julia H-B., Julia v. B., Malte, Marie, Monja, Philipp und Tine möchte ich mich für eine tolle Zeit – innerhalb und außerhalb des Instituts – bedanken. Weiterhin gilt mein Dank auch den hier namentlich nicht genannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des gesamten Instituts, die während meiner Promotionszeit für eine tolle Arbeitsatmosphäre sorgten.

Christian, Joscha, Linda, Mats und Till danke ich für die an vielen Abenden gewährte Ablenkung von der Arbeit. Daneben gebührt auch Björn H. und Lukas Dank für die Beteiligung an vielen Aktivitäten abseits des Instituts – nicht selten entstanden auch hier neue Ideen.

Tamara danke ich für das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit und für viele Diskussionen und Anregungen. Viel mehr danke ich Ihr aber für die schöne gemeinsame Zeit und die große und verständnisvolle Unterstützung in der Schreibphase und darüber hinaus.

## Danksagung

Bei meinen Eltern und Großeltern möchte ich mich besonders für die bedingungslose Unterstützung und den Rückhalt und dafür, dass sie mir diesen Weg ermöglicht haben, bedanken. Zudem möchte ich meinen Eltern für das gewissenhafte Korrekturlesen meiner Arbeit danken.

**Vielen Dank!**



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

Name	André Golldack
Geburtsdatum	26. Juni 1989
Geburtsort	Eberswalde-Finow
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Schule und Studium

---

Juni 2008	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife am Gymnasium „Alexander-von-Humboldt“, Eberswalde
Oktober 2008 bis November 2012	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Januar 2013 bis Juni 2013	Pharmaziepraktikum in der Wiking-Apotheke, Laboe
Juli 2013 bis Dezember 2013	Pharmaziepraktikum am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Arbeitskreis von Prof. Dr. E. Beitz
Februar 2014	Erteilung der Approbation als Apotheker

## Promotion

---

Seit Oktober 2014	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. E. Beitz
-------------------	--