

**Charakterisierung und Inhibition humaner und
plasmodialer Lactat-Transporter unter
besonderer Berücksichtigung der
Pentafluoro-3-hydroxy-pent-2-en-1-one**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel

vorgelegt von

Philipp Walloch

Kiel 2021

| | |
|-----------------------------|--------------------------------|
| Erster Gutachter: | Professor Dr. Eric Beitz |
| Zweiter Gutachter: | Professor Dr. Christian Peifer |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 15.09.2021 |

The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries,
is not “Eureka” but “That’s funny...”.

—*Isaac Asimov (1920–1992)*

Vorbemerkung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Professor Dr. Eric Beitz an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Pharmazeutisches Institut, Abteilung Pharmazeutische/Medizinische Chemie, im Zeitraum April 2018 bis Juli 2021 angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits an folgenden Stellen veröffentlicht:

Fachzeitschriften:

Walloch, P., Hansen, C., Priegann, T., Schade, D., Beitz, E. (2021) Pentafluoro-3-hydroxypent-2-en-1-ones potently inhibit FNT-type lactate transporters from all five human-pathogenic *Plasmodium* species. **ChemMedChem** 16: 1283-1289.

Walloch, P., Henke, B., Häuer, S., Bergmann, B., Spielmann, T., Beitz, E. (2020) Introduction of scaffold nitrogen atoms renders inhibitors of the malarial L-lactate transporter, PfFNT, effective against the Gly107Ser resistance mutation. **J. Med. Chem.** 63: 9731-9741.

Schmidt, J.D.R., Walloch, P., Höger, B., Beitz, E. (2021) Aquaporins with lactate/lactic acid permeability at physiological pH conditions. **Biochimie** (Epub ahead of print).

Posterbeiträge:

Cell-free synthesis of human monocarboxylate transporters for studies on substrate spectra and transport properties

Biomedical Transporters Conference 2019, Luzern, Schweiz

Vorträge:

A novel class of antimalarials targeting lactate transport is active *in vitro* and *in vivo*

DPhG-Doktorandentagung 2021

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Inhaltsverzeichnis..... | I |
| Abkürzungsverzeichnis | VII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Lactat und seine physiologische Bedeutung | 1 |
| 1.2 Monocarboxylat-Transporter | 3 |
| 1.2.1 Humaner Monocarboxylat-Transporter 1..... | 4 |
| 1.2.2 <i>Humaner</i> Monocarboxylat-Transporter 11..... | 5 |
| 1.3 Formiat-Nitrit-Transporter | 7 |
| 1.3.1 Malaria..... | 8 |
| 1.3.2 Pharmazeutische Interventionen und Resistenzlage der Malaria | 10 |
| 1.3.3 PfFNT als valides <i>drug target</i> | 12 |
| 1.3.4 Transportmechanismus von PfFNT | 14 |
| 1.3.5 Entwicklung eines PfFNT Inhibitors..... | 16 |
| 1.4 Zielsetzung der Arbeit..... | 18 |
| 2 Geräte und Material..... | 21 |
| 2.1 Chemikalien, Kits, Materialien..... | 21 |
| 2.2 Geräte | 23 |
| 2.3 Plasmide und codierende DNA-Sequenzen..... | 25 |
| 2.4 Verwendete Mikroorganismen | 26 |
| 2.5 Antikörper..... | 26 |
| 2.6 Oligonukleotide | 27 |
| 2.6.1 Mutations-Primer | 27 |
| 2.6.2 Sequenzier-Primer..... | 27 |
| 2.6.3 Klonierungs-Primer..... | 27 |
| 2.7 Puffer, Medien und Lösungen | 27 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.7.1 | Molekularbiologie | 28 |
| 2.7.2 | Proteinchemie | 29 |
| 2.7.3 | ¹⁴ C-Substrataufnahmeassay | 30 |
| 2.8 | Zellfreie Proteinsynthese | 30 |
| 2.9 | S30-Extrakt und T7-RNA-Polymerase | 31 |
| 2.10 | Stabilitätsuntersuchung | 32 |
| 2.11 | Synthese und Analytik | 32 |
| 2.11.1 | Chemikalien | 32 |
| 2.11.2 | Mitteldruckflüssigchromatographie | 32 |
| 2.11.3 | NMR-Spektroskopie | 33 |
| 2.11.4 | Massenspektroskopie | 33 |
| 2.11.5 | Dünnschichtchromatographie | 34 |
| 2.12 | Software | 34 |
| 3 | Methoden | 35 |
| 3.1 | Molekularbiologische Methoden | 35 |
| 3.1.1 | Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen | 35 |
| 3.1.2 | Schnelltransformation von <i>E. coli</i> | 35 |
| 3.1.3 | Dauerkulturen von <i>E. coli</i> | 35 |
| 3.1.4 | DNA-Isolierung | 35 |
| 3.1.5 | Agarosegel-Elektrophorese | 36 |
| 3.1.6 | DNA-Isolierung aus Agarosegelen | 36 |
| 3.1.7 | DNA-Konzentrationsbestimmung | 36 |
| 3.1.8 | Restriktionsverdau | 36 |
| 3.1.9 | Ligation | 36 |
| 3.1.10 | Polymerasekettenreaktion | 37 |
| 3.1.11 | <i>In vitro</i> Mutagenese | 37 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.1.12 | Transformation von <i>S. cerevisiae</i> | 38 |
| 3.2 | Proteinchemische Methoden | 38 |
| 3.2.1 | Aufschluss von <i>S. cerevisiae</i> | 38 |
| 3.2.2 | Proteinquantifizierung | 39 |
| 3.2.3 | SDS-PAGE..... | 39 |
| 3.2.4 | Coomassiefärbung..... | 40 |
| 3.2.5 | Western Blot..... | 40 |
| 3.3 | Zellfreie Proteinsynthese..... | 40 |
| 3.3.1 | Gewinnung eines S30-Extraktes..... | 41 |
| 3.3.2 | Gewinnung von T7-RNA-Polymerase | 41 |
| 3.3.3 | Analytische zellfreie Proteinsynthese | 42 |
| 3.3.4 | Magnesium-Screening und Qualitätskontrolle des S30-Extraktes..... | 44 |
| 3.3.5 | Detergenzien-Screening zur Herstellung von Membranproteinen | 44 |
| 3.3.6 | Präparative Proteinsynthese..... | 44 |
| 3.3.7 | Nickel-Affinitätschromatographie..... | 46 |
| 3.3.8 | Proteinkonzentrierung | 46 |
| 3.4 | Proteoliposome | 46 |
| 3.4.1 | Präparation von Proteo- und Leerliposome..... | 47 |
| 3.4.2 | Vermessung von Liposomen | 47 |
| 3.5 | Aufnahme-Assay mit ¹⁴ C-markierten Substraten | 48 |
| 3.5.1 | Prinzip..... | 48 |
| 3.5.2 | Zeitabhängige Substrataufnahme | 49 |
| 3.5.3 | IC ₅₀ -Bestimmung in <i>S. cerevisiae</i> | 49 |
| 3.6 | Kultur von <i>P. falciparum</i> | 50 |
| 3.6.1 | IC ₅₀ -Bestimmung in <i>P. falciparum</i> | 50 |
| 3.6.2 | Generierung von Resistenzen | 50 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.7 | Inhibitor-Synthese | 50 |
| 3.8 | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie..... | 51 |
| 3.8.1 | logP-Bestimmung | 51 |
| 3.8.2 | Stabilitätsmessung | 52 |
| 3.9 | Statistische Auswertung | 53 |
| 4 | Ergebnisse | 55 |
| 4.1 | Untersuchung von hMCT11 in <i>S. cerevisiae</i> | 55 |
| 4.1.1 | Expression von hMCT11 in <i>S. cerevisiae</i> | 55 |
| 4.1.2 | Funktionsdaten von hMCT11 in <i>S. cerevisiae</i> | 56 |
| 4.2 | Zellfreie Synthese von hMCT11 | 62 |
| 4.2.1 | Detergenzienscreening zur zellfreien Proteinsynthese | 62 |
| 4.2.2 | Präparative Proteinsynthese von zellfreien hMCT11 | 63 |
| 4.2.3 | Detergenzien zur optimalen Reinigung..... | 65 |
| 4.2.4 | Liposomen-Tests mit hMCT11..... | 67 |
| 4.3 | Untersuchung von Formiat-Nitrit-Transportern | 69 |
| 4.3.1 | Herstellung von FNTs in <i>S. cerevisiae</i> | 69 |
| 4.3.2 | Ermittlung der Substratinkubationszeiten für Inhibitorexperimente..... | 70 |
| 4.4 | Inhibition von Formiat-Nitrit-Transportern..... | 73 |
| 4.4.1 | Umgehung der G107S-Resistenzmutation | 74 |
| 4.4.2 | Aromaten mit zwei Stickstoffen | 77 |
| 4.4.3 | Zweite Generation von PffNT Inhibitoren | 78 |
| 4.4.4 | Modifikation an der Fluoralkylkette..... | 81 |
| 4.4.5 | Modifikation des Pharmakophors..... | 83 |
| 4.4.6 | Hemmung von <i>Plasmodium falciparum</i> | 84 |
| 4.5 | Hemmung von FNTs weiterer <i>Plasmodium</i> -Spezies..... | 85 |
| 4.5.1 | Hemmbarkeit von FNT aus humanpathogenen Plasmodien | 86 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.5.2 | Hemmung des <i>Plasmodium berghei</i> FNT | 87 |
| 4.6 | Bestimmung physikochemischer Parameter der Inhibitoren | 89 |
| 4.7 | Stabilitätsuntersuchungen..... | 91 |
| 4.7.1 | Zersetzung von BH267.meta | 91 |
| 4.7.2 | Einfluss der Temperatur auf die Zersetzung von BH267.meta | 92 |
| 4.7.3 | Einfluss des pH-Wertes auf die Zersetzung von BH267.meta..... | 93 |
| 4.7.4 | Einfluss des Lösemittels | 94 |
| 4.7.5 | Einfluss von Stickstoffatomen auf die Stabilität der FNT-Inhibitoren..... | 95 |
| 4.7.6 | Einfluss von Substituenten an der aromatischen Komponente auf die Stabilität der FNT-Inhibitoren..... | 96 |
| 4.8 | Neue PfFNT-Resistenzmutanten | 97 |
| 4.9 | Toxikologisches Profil der FNT-Inhibitoren | 100 |
| 4.9.1 | Wirkung auf humane Zelllinien und hERG Aktivität..... | 100 |
| 4.9.2 | <i>Off-Target</i> -Effekte der FNT-Inhibitoren auf hMCT1..... | 102 |
| 4.10 | BH267.meta-Aktivität im <i>in vivo</i> Maus-Modell | 103 |
| 5 | Diskussion | 105 |
| 5.1 | Ist hMCT11 ein Monocarboxylat-Transporter?..... | 105 |
| 5.1.1 | Eignung der Methoden zur Untersuchung von Monocarboxylat-Transporter | 105 |
| 5.1.2 | Rekombinante Herstellung von hMCT11 | 106 |
| 5.2 | Inhibitor-Entwicklung gegen PfFNT | 107 |
| 5.2.1 | Eignung des Hefe-basierten Aufnahmeassays | 108 |
| 5.2.2 | Umgehung der PfFNT G107S-Resistenz | 108 |
| 5.2.3 | Pharmakokinetik von BH267.meta | 111 |
| 5.3 | Erkenntnisse über die PfFNT-Struktur..... | 112 |
| 5.4 | Stabilität von PfFNT-Inhibitoren | 114 |
| 5.4.1 | Lagerstabilität von BH267.meta..... | 115 |

| | | |
|-------|---|---|
| 5.4.2 | Einfluss der Inhibitor-Struktur auf die Stabilität | 115 |
| 5.4.3 | Lage der Keto-Enol-Tautomerie | 116 |
| 5.5 | Strukturelle Unterschiede von FNT in <i>Plasmodium</i> -Spezies | 117 |
| 5.6 | Wahrscheinlichkeit der Resistenzbildung gegen PfFNT-Inhibitoren | 119 |
| 5.7 | Eignung von BH267.meta für das Maus-Modell..... | 120 |
| 5.8 | BH267.meta <i>In vivo</i> Daten im <i>P. berghei</i> Maus-Model | 121 |
| 5.9 | Ausblick..... | 122 |
| 6 | Analytischer Teil..... | 125 |
| 7 | Kurzfassung | 143 |
| 8 | Abstract..... | 144 |
| 9 | Literaturverzeichnis | 145 |
| | Anhang..... | 165 |
| | Eidesstattliche Erklärung..... | 169 |
| | Lebenslauf | Fehler! Textmarke nicht definiert. |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|---|
| ACT | <i>Artemisinin-based Combination Therapy</i> |
| Amp | Ampicillin |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AQP | Aquaporin |
| as | <i>antisense</i> |
| BbFNT | Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>Babesia bovis</i> |
| bs | <i>broad singulett</i> (NMR-Spektroskopie) |
| CECF | Kontinuierliche zellfreie Proteinherstellung (<i>Continuous Exchange Cell-Free</i>) |
| Ci | Curie |
| d | Dublett (NMR-Spektroskopie) |
| D | Deuterium |
| σ | chemische Verschiebung in ppm (NMR-Spektroskopie) |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| dd | Dublett eines Dubletts (NMR-Spektroskopie) |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| ddd | Dublett eines Dubletts eines Dubletts (NMR-Spektroskopie) |
| [D ₆]-DMSO | deutertes Dimethylsulfoxid |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>) |
| dNTP | Deoxyribonukleosidtriphosphat |
| dt | Dublett eines Tripletts (NMR-Spektroskopie) |

| | |
|------------------|---|
| DTT | Dithiothreitol |
| ECL | Elektrochemilumineszenz |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ESI | Elektrospray-Ionisation |
| FNT | Formiat-Nitrit-Transporters |
| EcFocA | <i>Formate Channel A</i> aus <i>E. coli</i> |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea victoria</i> |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| HA | Hämagglutinin |
| HEPES | 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| IC ₅₀ | halbmaximale inhibitorische Konzentration |
| J | Kopplungskonstante in Hertz (NMR-Spektroskopie) |
| kDa | Kilodalton |
| LB | <i>Lysogeny Broth</i> (reichhaltiges <i>E. coli</i> Medium) |
| m | Multipllett (NMR-Spektroskopie) |
| MCT | Monocarboxylat-Transporter |
| MES | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure |
| MFS | <i>Major Facilitator Superfamily</i> |
| MHz | Megahertz |
| MMV | <i>Medicines for Malaria Venture</i> |
| MPLC | <i>Medium pressure Liquid Chromatography</i> |
| MS | Massenspektrometrie |

| | |
|----------------------|---|
| M-TBST | TBST-Puffer mit Milchpulver |
| Ni-NTA | Nickel-Nitrilotriessigsäure |
| NMR | Kernspinresonanz (Nuclear Magnetic Resonance) |
| NPP | <i>New permeability pathway</i> |
| OD ₆₀₀ | Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm |
| PbFNT | Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>Plasmodium berghei</i> |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PkFNT | Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>Plasmodium knowlesi</i> |
| <i>P. falciparum</i> | <i>Plasmodium falciparum</i> |
| PfCRT | <i>Chloroquine Resistance Transporter</i> aus <i>Plasmodium falciparum</i> |
| PfFNT | Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>Plasmodium falciparum</i> |
| PfMDR1 | <i>Multi-Drug Resistance Transporter 1</i> aus <i>Plasmodium falciparum</i> |
| PfMRP | <i>Multi-Drug Resistance-associated Protein</i> aus <i>Plasmodium falciparum</i> |
| PmFNT | Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>Plasmodium malariae</i> |
| ppm | <i>Parts per Million</i> |
| PSAC | <i>Plasmodial surface anion channel</i> |
| PvFNT | Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>Plasmodium vivax</i> |
| RWCMDE | Aminosäure-Mix aus Arginin, Tryptophan, Cystein, Methionin, Aspartat und Glutamat |
| q | Quartett (NMR-Spektroskopie) |
| qt | Quartett eines Triplets (NMR-Spektroskopie) |
| R _f | Retentionsfaktor |
| s | Singulett (NMR-Spektroskopie) |
| IX | |

| | |
|----------------------|--|
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bäckerhefe) |
| SD-Medium | Synthetic Defined Medium (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>) |
| T2D | Typ 2 Diabetes |
| t | Triplett (NMR-Spektroskopie) |
| TE | TRIS-EDTA |
| TEMED | Tetramethylethan-1,2-diamin |
| TBS | TRIS-gepufferte Kochsalzlösung (<i>TRIS Buffered Saline</i>) |
| TBST | TBS mit Tween 20 |
| TM | Transmembrandomäne |
| 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>) |
| WT | Wildtyp |
| YPD | <i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i> (reichhaltiges Medium für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>) |

1 Einleitung

Ein fundamentaler Vorgang in jeder lebenden Zelle ist der Transport von Soluten über Zellmembranen. Diese Lipiddoppelschichten stellt eine lipophile Barriere dar, die kaum von polaren und geladenen Molekülen durchdrungen werden kann. In die Zellmembran eingebaute Proteine ermöglichen diesen Stoffen den Übergang in oder aus der Zelle. Zahlreiche biologische Vorgänge, wie die Versorgung mit Nährstoffen, die pH-Homöostase und Signaltransduktion, sind abhängig von diesem erleichterten Membranübergang. Diese Membranproteine sind Transporter und Kanäle. Transporter sind dabei in der Lage entsprechende Substrate aktiv gegen einen Gradienten zu transportieren. Dafür benötigen primär aktive Transporter Energie in Form von ATP.¹ Sekundär aktive Transporter nutzen das elektrochemische Potential eines mittransportierten Ions oder Co-Substrats. Dabei funktionieren diese häufig nach einem *alternativ access* Mechanismus.² Dieser erlaubt es dem Transporter zwischen einer intra- und einer extrazellulär geöffneten Konformation zu wechseln. Das Substrat bindet dementsprechend an den Transporter, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt und sich das Substrat anschließend wieder löst. Die Klasse der Uniporter sind dagegen passiv und transportieren Substrate entlang eines Gradienten. Außerdem haben Transporter häufig eine hohe Affinität im mikromolaren Bereich zu ihren Substraten.^{3,4} Dem entgegen stehen Kanäle, die mit einer niedrigen Substrataffinität dem Substrat den Übergang über die Zellmembran erleichtern.^{5,6} Kanäle besitzen eine zentrale, substratleitende Pore und haben häufig einen rigiden Aufbau, dessen Konformation sich nicht ändert.^{7,8}

Ebenso essenziell wie diese Kanäle und Transporter selbst, ist deren Regulierung. Eine Störung der Funktion von Membranproteinen führt zu einer Vielzahl an Erkrankungen, aber ebenso bietet die kontrollierte Regulation massive Chancen für Therapien, Heilungen und Präventionen.⁹⁻¹¹

1.1 Lactat und seine physiologische Bedeutung

Die Milchsäure wurde 1780 entdeckt und aus saurer Milch isoliert.¹² Mit einem pKs-Wert von 3,90 handelt es sich um eine schwache Säure, die im physiologischen Kontext nahezu vollständig deprotoniert vorliegt. Im menschlichen Körper wurde Lactat im Muskel entdeckt

und galt lange Zeit als ein Stoff, der aufgrund eines Sauerstoffdefizites bei erhöhter Belastung gebildet wird.¹³ Dabei ging man davon aus, dass Lactat lediglich für schädliche Effekte wie Azidosen verantwortlich ist.¹⁴ Inzwischen ist bekannt, dass vor allem das Enantiomer L-Lactat eine wichtige Rolle im gesamten menschlichen Metabolismus spielt. D-Lactat kommt dagegen seltener im menschlichen Körper vor, wird nicht bei enzymatischen Vorgängen gebildet und ist daher physiologisch weniger relevant.¹⁵ Hauptsächlich wird L-Lactat bei der glykolytischen Spaltung von Glukose gebildet. Bei der Glykolyse wird 1 Mol Glukose, unter Bildung von ATP, zu 2 Mol Pyruvat. Das Pyruvat wird im Anschluss bei Abwesenheit von Sauerstoff durch die Lactat-Dehydrogenase zu L-Lactat reduziert. Das schnell anfallende L-Lactat und korrespondierenden Protonen, müssen ebenso schnell wieder ausgeglichen werden, um die pH-Homöostase aufrecht zu erhalten und Azidosen zu verhindern.¹⁶ Viele Mikroorganismen schleusen L-Lactat aufgrund dessen aus der Zelle. Allerdings wird das energiereiche L-Lactat von Säugetieren nicht ausgeschieden. Das einzige kohlenstoffhaltige Ausscheidungsprodukt, welches bei Säugetieren in großer Menge anfällt, ist CO₂.¹⁷ Folglich wird L-Lactat komplett oxidiert. Versuche mit ¹³C-markiertem, exogen zugeführtem L-Lactat zeigten, dass es als primäre Kohlenstoffquelle in den Citrat-Zyklus eingeführt werden kann.¹⁸ Dabei zeigte sich, dass in nahezu allen menschlichen Zellen ¹³C-markierte Intermediate des Citrat-Zyklus vorlagen. Die Energiegewinnung durch L-Lactat übersteigt während dauerhaftem Muskelstimulus die durch Glukose gewonnene Energie um ein Vielfaches.¹⁵ Neben der direkten Energieversorgung ist L-Lactat wichtig für ein Redox-Gleichgewicht von NAD⁺ und NADH. Dies ist ein wichtiger Mechanismus, um den Citrat Zyklus und die Glykolyse auf zellulärer Ebene zu entkoppeln.¹⁷ Weiterhin ist L-Lactat ein wichtiges Signalmolekül mit Hormon-ähnlicher Wirkung auf die Gen-Expression.^{19,20} Ebenso bei epigenetischen Veränderungen, wie der Histon-Lactylierung,^{21,22} spielt L-Lactat eine wichtige Rolle. Dementsprechend ist auch der Transport von L-Lactat über die Zellmembranen wichtig. Der Transport von L-Lactat wird im Menschen überwiegend von der Monocarboxylat-Transporter-Familie (MCT-Familie) übernommen, Mikroorganismen haben eine größere Bandbreite an Transportern, um Lactat aus den Zellen zu transportieren.

1.2 Monocarboxylat-Transporter

Viele der Monocarboxylat-Transporter sind für den Lactattransport in diversen Säugetier-Zellen verantwortlich. Die insgesamt 14 Vertreter dieser Transporter Klasse gehören zu der *Solute Carrier* (SLC) Transporterfamilie, im Speziellen handelt es sich um die SLC16A Transporter. Nach dem Klassifikationssystem von Milton Saier werden sie der *Major-Facilitator-Superfamilie* (MFS) zugeordnet.²³⁻²⁵ Die typischen Charakteristika für diese Superfamilie, wie z.B. die in zwei pseudosymmetrische Bündel aufgeteilten 12 Transmembranhelices und intrazelluläre Termini, sind auch bei der MCT-Familie vertreten. Dies konnte durch die Aufklärung verwandter Transportproteine und letztlich des humanen Monocarboxylat-Transporter 1 gezeigt werden.²⁶⁻²⁸ Trotz der phylogenetischen Verwandtschaft der MCT-Familie und konservierten Motiven, sind die MCTs hinsichtlich ihrer Expression und ihrer Transporteigenschaften eine sehr heterogene Transporterfamilie.²⁹ Neben L-Lactat transportieren die unterschiedlichen Mitglieder der MCT-Familie zusammengenommen eine große Bandbreite an Substraten. So transportieren die Vertreter MCT1-4 protonenabhängig kurzkettige Monocarboxylate, wie L-Lactat, Acetat und Pyruvat, wobei besonders das Substratspektrum von hMCT1 sehr breit ist (vgl. Kap. 1.2.1).³⁰ MCT7 hingegen transportiert Ketonkörper.³¹ Großvolumige Substrate, wie Thyroidhormone transportiert MCT8.³² Ähnlich wie MCT10, welcher aromatische Aminosäuren transportiert.³³⁻³⁵ MCT9 und MCT12 transportieren beide Kreatin,^{36,37} zusätzlich ist MCT9 in der Lage Carnitin zu transportieren.³⁸ Der MCT6, dessen physiologisches Substrat zwar noch nicht entdeckt wurde, ist in der Lage diverse Xenobiotika zu transportieren.³⁹⁻⁴¹ Die restlichen MCT sind *orphan* Transporter ohne ein bekanntes Substrat.²⁹

Die Transportfähigkeit vieler MCT ist abhängig von *chaperon*-Proteinen, wie Basigin oder in selteneren Fällen Embigin. Die Interaktion der Hilfsproteine kann sich für das gleiche MCT in verschiedenen Spezies unterscheiden. Diese Hilfsproteine bestehen aus einer C-terminalen Transmembranhelix und einer N-terminalen Immunglobulin-ähnlichen Domäne. Es existieren verschiedene *splice*-Varianten von Basigin, welche sich in ihrer Länge der extrazellulären und stark glykosylierten Domäne unterscheiden. Ohne die Hilfsproteine, die über die Transmembrandomäne mit dem MCT interagieren, verbleiben die Transporter in Golgi-Apparat und endoplasmatischem Retikulum und gelangen nicht an die Zellmembran.^{42,43}

Von den 14 Mitgliedern wird der Fokus im Folgenden auf die beiden in dieser Arbeit relevanten Vertreter MCT1 und MCT11 gelegt.

1.2.1 Humaner Monocarboxylat-Transporter 1

Der humane Monocarboxylat-Transporter 1 ist der bisher am meisten untersuchte und zudem in menschlichen Zellen am häufigsten vertretene Monocarboxylat-Transporter. Nahezu alle Zellen, mit Ausnahme der β -Zellen des Pankreas exprimieren hMCT1. Die primäre Aufgabe des Transporters ist der Export von Lactat. Lediglich in Zellen, die Gluconeogenese (Leber und Niere) oder Liponeogenese (Leber und Fettgewebe) betreiben, wird der hMCT1 für den Lactat-Import genutzt.⁴⁴ Das Substrat-Spektrum von MCT1 umfasst viele unterschiedliche Substanzen, wie z.B. Pyruvat, Acetoacetat und β -Hydroxybutyrat. Diese Substrate dienen, neben L-Lactat, zur Redox-Kommunikation zwischen den Zellen.^{44,45} Eine weitere Aufgabe von hMCT1 ist die Regulation des intrazellulären pH-Wertes. Normalerweise kontrollieren Zellen ihren pH-Wert sehr engmaschig über Na^+/H^+ - oder Carbonat-Transporter,^{16,46} bei glykolytischen Zellen wird der pH-Wert jedoch größtenteils durch den Lactat-Export kontrolliert.⁴⁴

Die bereits angenommenen Strukturmerkmale der Monocarboxylat-Transporter bestätigten sich mit der veröffentlichten Struktur von hMCT1.²⁸ Dabei zeigte sich, dass hMCT1 in zwei Konformationen vorliegen kann. Diese Konformationsänderung wird durch den Aufbau des Transporters in zwei pseudosymmetrische Bündel mit jeweils sechs Transmembran-Helices ermöglicht. Diese Bündel können sich durch die flexible *loop*-Region gegeneinander verschieben. Es wird derzeit postuliert, dass die Protonierung einer von außen zugänglichen Aminosäure dazu führt, dass die entstehende positive Ladung das Substrat-Anion anzieht und einen Protonen-Co-Transport erlaubt. Dabei kommt es zu einem Wechsel der Konformation und die Bindetasche des Transporters zeigt in das Zellinnere, das Substrat und korrespondierende Proton werden in die Zelle entlassen und der Transporter geht in die ursprüngliche, dem Zelläußeren zugängliche, Form über, was gleichzeitig den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dieses Transportes darstellt.⁴⁷⁻⁴⁹

Reguliert wird hMCT1 durch diverse zelluläre Vorgänge. Prominent ist dabei die Hochregulation im Muskel durch einen dauerhaften Muskelstimulus oder körperliches Training und entsprechende Herunterregulierung bei Nervenschäden. Hier ist postuliert, dass eine Schwankung im Calcium- und Adenosinmonophosphat-Haushalt letztlich zu einer Regulierung von hMCT1 führt.^{50,51} Die Inhibition von hMCT1 hat weitreichende Folgen, wie etwa eine Immunsuppression.⁵² In dieser Richtung ist es damit sowohl ein potenzielles *Target* für entsprechende Therapien, aber auch ein *Off-Target*, dessen ungewollte Hemmung starke

Nebenwirkungen nach sich ziehen kann. Ein weiteres Therapiefeld ist die extreme Hochregulierung in Krebszellen im Rahmen des Warburg-Effektes.⁵³ Dieser beschreibt den vermehrten Export von Lactat aufgrund des erhöhten Glykolyse-Aufkommens während des Tumorwachstums. Um dieses Wachstum gewährleisten zu können, werden zusätzliche Lactat-Transporter in Form von hMCT1 benötigt. Aufgrund der unphysiologischen Menge an Transportern kann eine Tumorzelle gezielt angegriffen werden, während gesunde Zellen weniger stark belastet werden. Inhibitoren haben demnach das Potential, als Chemotherapeutika oder Immunomodulatoren eingesetzt zu werden. Zwei solcher potenzieller Kandidaten stellen AZD3965⁵⁴ und AR-C155858⁵⁵ dar. Diese Inhibitoren gelangen zunächst in die Zelle. Nach bisherigem Kenntnisstand gelangt AZD2865 über passive Diffusion und AR-C155858 durch einen hMCT1 vermittelten Transport in die Zelle und bindet anschließend an eben diesen Transporter. Beide Inhibitoren sind hochselektiv, hemmen hMCT1 im nanomolaren Bereich und zeigten Potenzial für die Tumorthherapie.

Die Funktion von hMCT1 steht im Zusammenhang mit der Anwesenheit von Basigin. Es wird angenommen, dass Basigin als Chaperon die Konformation von hMCT1 dahingehend verändert, dass die Translokation an die Zellmembran erfolgen kann.⁵⁶ Allerdings gibt es auch Hinweise, die darauf hindeuten, dass Basigin als eine Antenne wirkt, welche lokal die Protonen und Substrat-Anionen Konzentration erhöht, was den Transport erleichtert.⁵⁷

1.2.2 Humaner Monocarboxylat-Transporter 11

Um die Rolle von hMCT11 in einen Kontext stellen zu können, muss zunächst die genetische Prädisposition für Diabetes mellitus Typ 2 dargestellt werden. Es existieren über 100 *Genloci*, deren Veränderung das Risiko für Typ 2 Diabetes erhöhen können und aufgrund derer die Vererbbarkeit von Diabetes auf 30-70 % geschätzt werden kann.⁵⁸ Diese chromosomalen Veränderungen umfassen meist mehrere Gene, deren Pathophysiologie oftmals unklar ist, da die meisten Gene nicht mit dem zu erwartenden Insulinstoffwechsel, also der primären Pathophysiologie von Typ 2 Diabetes zusammenhängen.⁵⁹ Mit Hilfe eines besseren Verständnisses derartiger Prädispositionen und der genetischen Zusammenhänge, kann es möglich werden, diese gezielt zu adressieren und somit personalisierte, besser verträgliche und wirksamere Therapien zu schaffen.

Ein Zusammenhang zwischen hMCT11 und Diabetes mellitus Typ 2 wurde zunächst bei Untersuchungen von Diabetikern innerhalb der amerikanischen Bevölkerung festgestellt. Dabei fiel eine signifikante Erhöhung der Diabetes mellitus Typ 2 Fälle bei Mexikanern und

Lateinamerikanern auf.⁶⁰ Eine mögliche Erklärung wurde bei Genomuntersuchungen der betroffenen Bevölkerungsgruppen gefunden. Die erhöhte Prävalenz korrelierte mit fünf Mutationen, welche hMCT11 betrafen. Diese 5 *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) erhöhten zusammen das Risiko im jüngeren Alter und bei weniger Cofaktoren an Typ 2 Diabetes zu erkranken. Liegen alle fünf SNPs im hMCT11 vor, wurde hMCT11 T2D als Bezeichnung gewählt.⁶¹

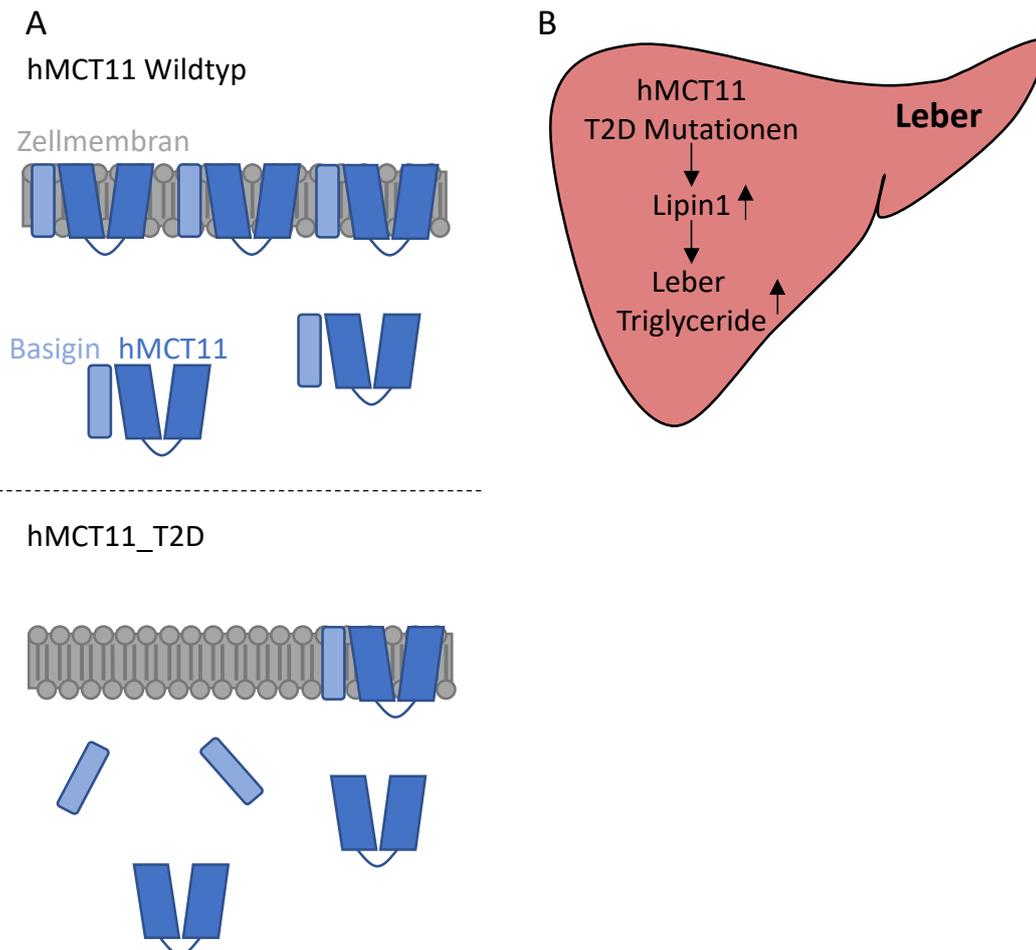


Abb. 1.1: Derzeitig postulierte Mechanismen für das erhöhte Diabetes-Risiko bei den hMCT11 T2D SNPs. A) RUSU *et al* sind der Ansicht, dass die SNPs, aufgrund einer verminderten Expression und Basigin-Interaktion, zu einer *Loss-Of-Function* Mutante führen.⁶¹ B) ZHAO *et al.* führten hingegen an, dass weder Mäuse mit dem hMCT11 Wildtyp noch hMCT11 *knock-out* Mäuse eine Veränderung der hepatischen Triglyceride zeigen, die Mäuse mit hMCT11 T2D hingegen haben einen erhöhten Lipin1 Spiegel und resultierend daraus erhöhte Triglycerid-Werte.⁶²

Der Mechanismus, mit dem hMCT11 T2D das Diabetes Typ 2 Risiko erhöht, ist bisher nicht vollständig geklärt, in Abb. 1.1 sind die postulierten Mechanismen schematisch dargestellt. Die erste Hypothese bezüglich des Pathomechanismus stellten RUSU *et al.* auf.⁶¹ Die Arbeitsgruppe postulierte, dass es sich bei hMCT11 um einen Transporter handelt, welcher Pyruvat protonenabhängig transportiert. Somit würde hMCT11 hinsichtlich des

Substratspektrums starke Ähnlichkeiten zu MCT1-4 aufweisen. Weiterhin sollen die fünf bekannten SNPs dazu führen, dass die Pyruvat-Leitfähigkeit vermindert wird. Als Grund für diesen Funktionsverlust führte die Arbeitsgruppe an, dass zum einen durch einen *expression quantitative trait locus* (cis-eQTL) die Expression von hMCT11 in der Leber reduziert wird. Zum anderen wiesen Proteomstudien daraufhin, dass die Interaktion mit Basigin vermindert wird (vgl. Abb. 1.1 A). Die verminderte Interaktion mit dem Hilfsprotein führe dazu, dass die Translokation von hMCT11 T2D an die Zellmembran der entsprechenden Zellen gestört wird. Dass Basigin einen starken Einfluss auf die Translokation von einigen MCTs haben kann, wurde bereits am Beispiel von MCT1 umfangreich untersucht. Bisher konnten jedoch weder der Pyruvat-Transport durch weitere Experimente bestätigt werden noch konnte geklärt werden, wie eine verringerte hMCT11 Aktivität zu einer Veränderung des Leberstoffwechsels führt. Dies wurde bereits früh kritisiert.⁶³

Dieser Hypothese widersprachen schließlich ZHAO *et al.*⁶², welche durch den Einsatz von hMCT11-*knock out*-Mäusen nachweisen konnten, dass es keine Abweichungen im Stoffwechsel der Tiere gibt. Daraus schlussfolgerten sie, dass eine *loss-of-function* nicht der Grund für die Veränderung des Leberstoffwechsels sein kann. Auch eine Rekonstitution des hMCT11-Wildtyps in den Mäusen führte zu keiner Stoffwechseländerung. Erst die Rekonstitution von hMCT11 T2D führte schließlich zu einer Akkumulation von Triglyceriden (Abb. 1.1 B). Daraus wiederum postulierte die Arbeitsgruppe, dass es sich bei hMCT11 T2D um eine *gain-of-function* Mutation handelt, welche dazu führt, dass der Lipin1-Spiegel in der Leber erhöht wird, was wiederum zur Steigerung des Triglyceridspiegels führt.

1.3 Formiat-Nitrit-Transporter

Die zweite Familie der Transportproteine, welche in dieser Arbeit behandelt werden, sind die Formiat-Nitrit-Transporter (FNT).

Das Substratspektrum von Formiat-Nitrit-Transportern umfasst schwache monovalente Säuren wie Formiat, Acetat, Lactat und Pyruvat. Weiterhin werden Anionen wie Hydrogensulfid, Hypophosphit und Nitrit die Passage der Zellmembran erleichtert.⁶⁴ FNT sind in Mikroorganismen wie Bakterien, Algen, Pilzen sowie einzelligen, eukaryotischen Parasiten verbreitet.⁶⁵

Ein inzwischen gut beschriebener Vertreter dieser Familie ist der lange gesuchte L-Lactat-Transporter PffNT.^{4,66} Dieses Membranprotein ermöglicht es *P. falciparum* große Mengen L-Lactat/H⁺, welches während der Glykolyse beim schnellen Wachstum anfällt, aus der Zelle heraus zu leiten und so die pH-Homöostase und die osmotischen Verhältnisse aufrecht zu erhalten.

Die Vertreter der FNT-Familie bilden Pentamere mit einer zentralen, Lipid gefüllten Pore. Der Transport findet jedoch durch die Transportpfad der einzelnen Protomere statt. Ein FNT-Protomer besteht aus 6 Transmembranhelices (TM), von denen TM2 und TM5 wiederum in zwei Halb-TM-Helices unterbrochen werden, welche mit einer konservierten *loop*-Region verbunden sind. Im Transportpfad der Protomere befinden sich Engstellen, welche weder Substrate noch Inhibitoren, die größer als ein Wassermolekül sind, passieren lassen würden. Dementsprechend muss dort eine Flexibilität in den Seitenketten des Proteins gegeben sein, welche sich größere Substrate oder Inhibitoren zu Nutze machen.^{3,64,67}

Formiat-Nitrit-Transporter haben hinsichtlich ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur Ähnlichkeiten zu den Aquaporinen, wie etwa die Unterbrechung von TM2 und TM5 durch konservierten Schleifen und intrazelluläre Termini.⁶⁸ Jedoch weisen die beiden Membranproteine auch signifikante Unterschiede auf, wie das Substratspektrum (Aquaporine leiten, mit wenigen Ausnahmen, polare Neutralteilchen,^{69,70} FNT hingegen schwache, einfache Säuren). AQP bilden zudem Tetramere, die *loop*-Regionen zeigen mit der Carbonyl Funktion in den Transportpfad, was die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen ermöglicht. Bei FNT ragen die Seitenketten in den Transportpfad. Während AQP in allen Lebewesen zu finden sind, kommen FNT nur in Mikroorganismen vor.^{3,64}

1.3.1 Malaria

Die Malaria war, laut Angaben der WHO, im Jahr 2019 für 229 Millionen Infektionen und 409 000 Todesfälle verantwortlich, was sie zu einer der gefährlichsten Infektionskrankheiten macht.⁷¹ Etwa die Hälfte der Weltbevölkerung lebt in Malaria-Risikogebieten. Die Hauptbelastung tragen hierbei Subsahara-Afrika und Südostasien.

Die Krankheit wird durch Plasmodien, eukaryotische Parasiten aus der Familie der Apicomplexa, ausgelöst.⁷² Es existieren fünf humanpathogene Plasmodien: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium*

knowlesi.⁷³⁻⁷⁵ Die tödlichste Spezies, die für 85 % der Gesamtkontaminationen und 90 % der Todesfälle verantwortlich ist, ist das hauptsächlich in Subsahara-Afrika vorkommende, *P. falciparum*.⁷⁶ Diesem folgt *P. vivax*, welches für die meisten Infektionen außerhalb Afrikas verantwortlich ist.^{77,78} Die weiteren drei Spezies haben global gesehen weniger Relevanz, können jedoch auf lokaler Ebene erheblich für Infektionen verantwortlich sein.^{79,80}

Die Übertragung der Plasmodien von Mensch zu Mensch erfolgt durch die *Anopheles*-Mücke. Die weibliche Stechmücke nimmt den Parasiten bei einer Blutmahlzeit auf und gibt diesen bei einem erneuten Stich über den Speichel in der infektiösen Form der Sporozoiten weiter. Die Sporozoiten gelangen im Menschen über den Blutkreislauf in die Leber, wo sich die Parasiten ungeschlechtlich vermehren und unter optimalen Bedingungen bis zu 30 000 Merozoiten bilden.⁸¹ In den Blutkreislauf freigegeben, infizieren sie die Erythrozyten und vermehrt sich dort wiederum ungeschlechtlich, was die Zahl der Merozoiten schubweise erhöht. Der Eintritt der Parasiten in die Erythrozyten kann über diverse Interaktionen vermittelt werden. Für *P. falciparum* ist einer dieser Wege die Interaktion mit Basigin, welches als Oberflächenligand für das parasitäre Protein PfRh5 dient.⁸²

Während dieser intensiven erythrozytären Wachstumsphase haben die Parasiten einen erhöhten Energiebedarf, der ausschließlich durch die Glykolyse gedeckt wird.⁸³⁻⁸⁵ Es kommt anschließend zur Lyse der Erythrozyten, wodurch die Merozoiten freigesetzt werden und weitere Erythrozyten infizieren, worauf die infizierte Person mit einem für die Malaria charakteristischen Fieberschub reagiert. Dieser Vorgang wiederholt sich bei Betroffenen, was sich unbehandelt über Monate oder sogar Jahre, im Falle von *P. malariae* sogar Dekaden, erstrecken kann.⁸¹ Ein geringer Anteil an Merozoiten differenziert sich zusätzlich zu männlichen und weiblichen Gametozyten, welche bei einem erneuten Stich einer Anopheles Mücke in das Insekt aufgenommen werden und sich geschlechtlich vermehren können. Darauf folgt die Vermehrung der neuer Sporozoiten in der Mücke und der Kreislauf ist geschlossen.

Eine zusätzliche Herausforderung stellt sich bei *P. ovale* und *P. vivax* heraus, welche in der Lage sind auf der Ebene des Leberstadiums Hypnozoite auszubilden. Diese können in einem Ruhezustand im Patienten persistieren können und zu unregelmäßigen Zeitpunkten, oft nach Jahren, erneut zu einer Erkrankung führen können.⁸⁶⁻⁸⁸

Die Infektion mit Plasmodien kann asymptomatisch oder unkompliziert mit schwachen Symptomen ablaufen und lässt sich nur schlecht durch mikroskopische Blutuntersuchungen

oder PCR-Test nachweisen. Allerdings besteht ebenso die Gefahr eines schweren Verlaufes, welcher ohne eine Intervention häufig letal verläuft. Vor allem Kinder unter fünf Jahren, Schwangere und ältere Menschen sind hierbei gefährdet. Besonders fatal ist die zerebrale Malaria, welche sich durch schwere Anämien und Koma äußert und oft tödlich ist.^{89–91}

1.3.2 Pharmazeutische Interventionen und Resistenzlage der Malaria

Malaria ist eine Krankheit, welche seit Jahrtausenden existiert und sich im konstanten Wettstreit mit dem Menschen befindet.^{92,93} Strategien zur Ausrottung der Malaria, wie etwa die Vektorkontrolle über Insektizide, werden aufgrund resistenter Insekten zunehmend schwieriger. Obwohl zusätzliche Strategien, wie der Schutz mit Insektennetzen, maßgebliche und wichtige Ansätze zur Bekämpfung der Malaria darstellen, sind diese alleine nicht ausreichend, um die Ausbreitung der Krankheit zu beherrschen.^{94,95} Die Suche nach einem adäquaten Impfstoff ist ein wichtiges Unterfangen, das bereits viele potenzielle Kandidaten hervorbrachte, bislang jedoch erfolglos war.^{96–98} Allerdings hat der vielversprechende Kandidat R21/Matrix-M die Phase 2 Studie erfolgreich beendet.⁹⁹ Jedoch wäre die logistische Herausforderung einer flächendeckenden Impfung eine Hürde, die enorme Mengen an Ressourcen und Zeit beanspruchen würde. Weiterhin wären Resistenzen auf lange Sicht auch bei einem Impfstoff denkbar. Aufgrund dieser Tatsachen ist und bleibt eine pharmazeutische Intervention in vorhersehbarer Zukunft von essenzieller Bedeutung. Um eine Arzneistoffversorgung für die Zukunft sicher zu stellen, wird ein breites Portfolio an Substanzen benötigt, die eine Vielzahl verschiedener Ziele angreifen und so die Resistenzbildung langfristig verlangsamen. Die bisherigen Standardtherapeutika wurden in Abb. 1.2 aufgeführt.

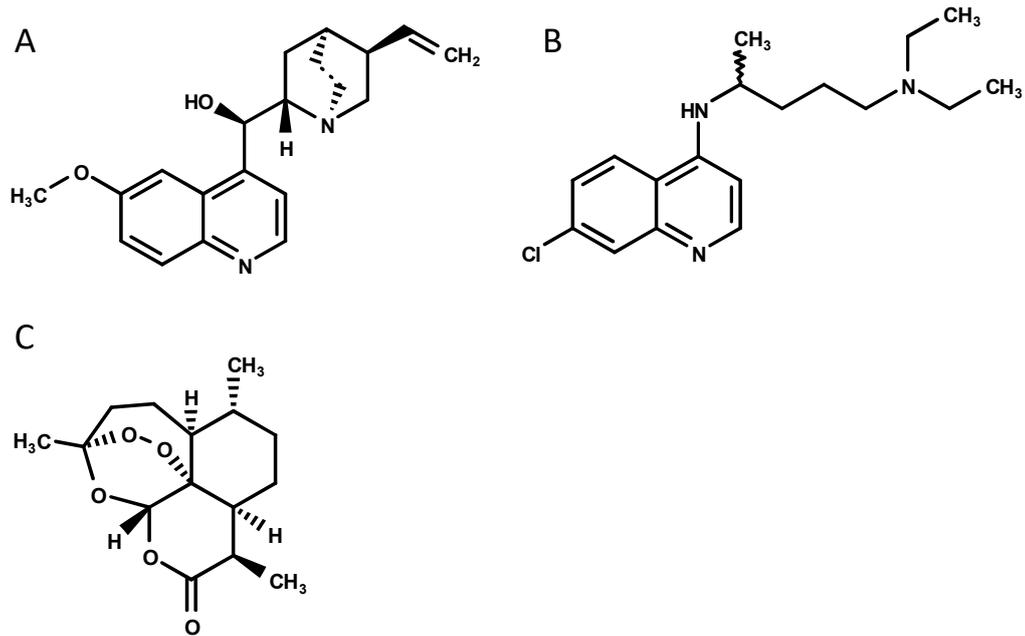


Abb. 1.2: Pharmazeutische Intervention gegen Malaria. Die prominentesten Arzneistoffmoleküle in der Malariatherapie. A) Chinin ist der älteste Wirkstoff, wird jedoch aufgrund starker Nebenwirkungen nur noch selten eingesetzt. B) Chloroquin war der langjährige Standard in der Therapie der Malaria. Die wachsende Resistenzlage in weiten Teilen der Welt lässt den Einsatz jedoch meist nur noch in Kombination mit anderen Arzneistoffen zu. C) Die Derivate von Artemisinin, wie z.B. Artemether oder Artesunat sind die letzte große Innovation in der Malaria Therapie und sind als Kombinationstherapie der derzeitige Goldstandard.

Bereits im 17. Jahrhundert wurde Chinarinde gegen Malaria verwendet. Aus dieser wurde später der Wirkstoff Chinin isoliert. Es handelt sich dabei um einen Arylaminoalkohol, welcher immer noch zur Malaria-Therapie eingesetzt wird.¹⁰⁰ Chinin wirkt, indem es die Häm-Entgiftung hemmt. Häm ist ein toxisches Abbauprodukt von Hämoglobin, welches in der Nahrungsvakuole des Parasiten in das unreaktive Pigment Hämazoin polymerisiert wird. Aufgrund des ungünstigen Nebenwirkungsprofils wird Chinin jedoch nur noch als Reserve eingesetzt.¹⁰¹

Der Arylaminoalkohol Chloroquin war lange Zeit Mittel der Wahl bei Malaria und wirkt analog zum Mechanismus von Chinin. Aufgrund der weitverbreiteten Anwendung ist Chloroquin nun von weit verbreiteten Resistenzen betroffen, welche vor allem von *P. falciparum* ausgebildet werden. Die Resistenz der Parasiten beruht hauptsächlich auf Mutationen des *chloroquine resistance transporter* (PfCRT), welcher aufgrund dessen in der Lage ist, Chloroquin vermehrt aus der Nahrungsvakuole heraus zu transportieren.^{102,103} Weiterhin wird die Konzentration von Chloroquin und anderer Antimalaria-Wirkstoffe am Wirkort durch Mutationen des *multi-drug resistance transporters 1* (PfMDR1)¹⁰⁴ und des *multi-drug resistance-associated protein*

(PfMRP)¹⁰⁵ verringert. Aufgrund dieser Resistenzlage wird Chloroquin nur noch in Gebieten eingesetzt, in denen bisher keine Resistenzen aufgetreten sind.

Die letzte Wirkstoffklasse mit vollkommen neuem Wirkstoffziel in der Therapie gegen Malaria war das Artemisinin. Dieses Sesquiterpenlacton, ursprünglich aus *Artemisia annua*¹⁰⁶ gewonnen, weist eine Endoperoxidbrücke auf, welche durch Spaltung eine radikalische Spezies bildet, die diverse Zellfunktionen stört. Inzwischen werden Derivate von Artemisinin eingesetzt, darunter Artesunat, Artemether und Dihydroartemisinin. Artemisinin-Derivate werden durch Häm aktiviert, welches vor allem in infizierten Erythrozyten vorliegt, sodass eine hohe Wirksamkeit während der Vermehrung der Parasiten erreicht wird. Die Wirkung auf gesunde Zellen und damit das Nebenwirkungsprofil wird dadurch gering gehalten.^{107,108} Oft werden Artemisinin-Derivate in einer Kombination mit anderen Wirkstoffen genutzt und die *artemisinin-based combination therapy* (ACT) stellt den derzeitigen Goldstandard der Malaria-Therapie dar. Allerdings wurden auch für Artemisinin bereits Resistenzen gefunden, welche auf eine Mutation des KELCH-13 Gens zurückzuführen sind.^{109,110}

Aufgrund dieser wachsenden Resistenzlage, welche bereits alle verfügbaren Arzneistoffe betrifft, ist es nötig Substanzklassen zu finden, die neue Ziele angreifen und neue Wirkmechanismen verwenden.

1.3.3 PfFNT als valides drug target

Wie bereits in Kapitel 1.3.1 beschrieben, benötigt der Parasit *P. falciparum* in seiner erythrozytären Wachstumsphase große Mengen Glukose. So setzen infizierte Erythrozyten zwei Größenordnungen mehr Glukose um als nicht-infizierte.⁸⁵ Der schematische Energiefluss eines infizierten Erythrozyten ist in Abb. 1.3 dargestellt.

Die Glukose wird durch den Glukose-Transporter 1 (GLUT1) in den Erythrozyten transportiert,¹¹¹ diffundiert weiter durch die leicht permeable parasitophore Vakuolenmembran¹¹² und wird anschließend vom plasmodialen Hexose-Transporter PfHT von dem Parasiten aufgenommen.¹¹³ Die Glukose wird im Rahmen der Glykolyse, unter Gewinnung von Adenosintriphosphat (ATP), zu Pyruvat oxidiert. Anschließend wird, durch die Lactat-Dehydrogenase (LDH) katalysiert, das Pyruvat zu Lactat reduziert. Bei der Glykolyse entstehen aus 1 Mol Glukose 2 Mol L-Lactat und Protonen. Diese große Menge L-Lactat muss aufgrund des zunehmenden osmotischen Stresses und des sinkenden pH-Wertes aus dem Parasiten geschleust werden. Es war lange Zeit unbekannt, wie Plasmodien diese Menge L-Lactat aus der Zelle exportieren.^{114,115} Für diesen Vorgang nutzt der Parasit, hier im

speziellen *Plasmodium falciparum*, PFFNT.^{4,66} Dieser Lactat-Transporter ist in der Lage, große Mengen L-Lactat aus dem Parasiten in den Erythrozyten abzugeben. Der Erythrozyt, welcher seinen Energie Bedarf ebenso über die Glykolyse deckt, ist gut in der Lage das zusätzliche Lactat über hMCT1 in den Blutstrom abzugeben. Alternativ werden aber auch die plasmodialen Transportproteine des *new permeability pathway* (NPP) und *plasmodial surface anion channel* (PSAC) genutzt.¹¹⁶

Der von PFFNT vermittelte Export von Lactat aus der Zelle der Parasiten stellt einen Schlüsselschritt im Energiestoffwechsel von Plasmodien dar. Ohne diesen Schritt würden die zellulären Vorgänge des Erregers einbrechen und der Parasit absterben. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens der in der Glykolyse beteiligten Enzyme, wäre eine pharmazeutische Intervention, wenn überhaupt, nur mit massiven Nebenwirkungen möglich. Der Export von L-Lactat aus dem Erythrozyten ist ebenso schwer angreifbar. Die Hemmung von hMCT1 zeigte keine Wirkung auf *P.falciparum*. Ein möglicher Grund könnte eine ausreichende Pufferwirkung im Inneren des Erythrozyten sein. Oder aufgrund alternativer Export-Möglichkeiten von L Lactat, wie dem Plasmodial Surface Anion Channel (PSAC) (vgl. Abb. 1.1).¹¹⁷ Dies bedeutet, dass der vitale Energiestoffwechsel nur von zwei Punkten aus adressierbar ist: Durch Hemmung der Glukoseversorgung von PfHT und der Hemmung des Lactat-Exportes durch PFFNT.

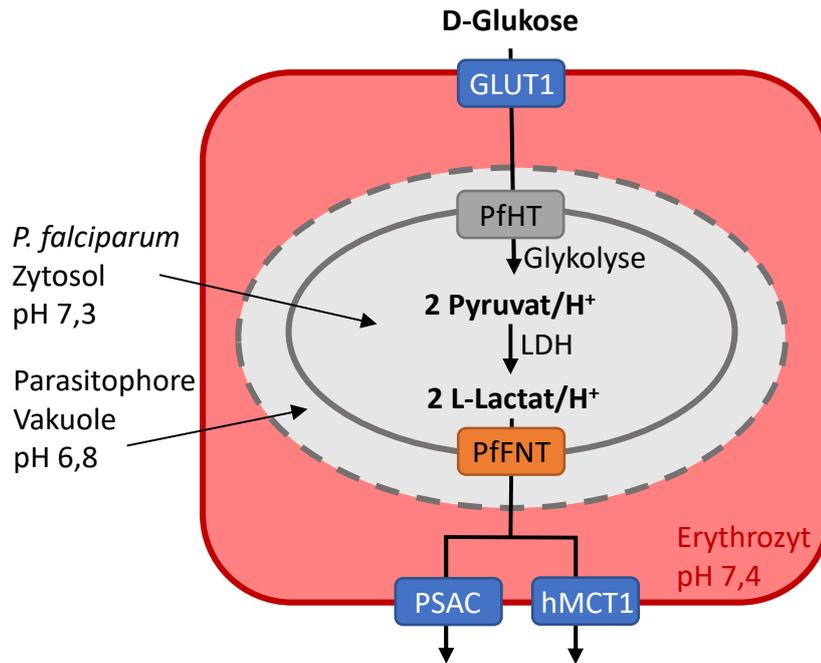


Abb. 1.3: Energiefluss eines mit Plasmodien infizierten Erythrozyten. Glukose wird über den GLUT1 in den Erythrozyten aufgenommen und nach der Diffusion durch die Membran der parasitophoren Vakuole über den PfHT in den Parasiten transportiert. Im *Plasmodium* wird die Glukose anaerob über die Glykolyse zu Pyruvat oxidiert, welches wiederum durch die LDH zu L-Lactat reduziert wird, wodurch die für die Glykolyse benötigten Reduktionsäquivalente wiederhergestellt werden.

Die Hemmung von PffNT führt zu einer Akkumulation von L-Lactat/H⁺ und daraus resultierend zu einer Ansäuerung des plasmodialen Zytosols, was letztlich zum Tod des Erregers führt.^{66,118}

Ein spezifischer Inhibitor, welcher dieses Ziel erreichte, ist MMV007839 [1].¹¹⁹ Diese Substanz wird weiter in Kapitel 1.3.5 beschrieben.

1.3.4 Transportmechanismus von PffNT

Erste Untersuchungen des Transportmechanismus von Formiat-Nitrit-Transportern erfolgten durch elektrophysiologische Experimenten am EcFocA. Dabei fiel zunächst auf, dass ab einem pH-Wert unter 5,1 kein Formiat mehr transportiert wird. In Kombination mit verschiedenen Strukturdaten führte dies zu der Annahme, dass die Transportpore von EcFocA durch einen *Gating*-Mechanismus des N-Terminus blockiert wird.¹²⁰ Die Untersuchung der Struktur führte anschließend zu der Annahme, dass das zentrale Histidin eine entscheidende Rolle beim Transport spielt. Dieses soll das Anion protonieren, wodurch das korrespondierenden Neutralteilchen gebildet wird, welches dann die lipophile Engstelle passieren kann.^{64,121,122} Später wurde das Transportverhalten allerdings mit ¹⁴C-markiertem Substrat untersucht, wodurch im Gegensatz zu elektrochemischen Tests auch ungeladene Teilchen detektiert

werden konnten. Diese Versuche zeigten bei sinkendem pH-Wert sogar eine Zunahme des Transports, wodurch ein Protonen-Co-Transport festgestellt werden konnte. Auch bei diesen Untersuchungen stellte sich das zentrale Histidin als essenzieller Bestandteil des Transportmechanismus heraus, ein Protonierungsschritt konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.^{123,124} Zusätzlich wurde ein konserviertes Lysin am Poreneingang aller FNTs identifiziert, welches eine elektrostatische Anziehung auf die Substrat-Anionen ausübt. Während das Substrat-Anion weiter in die Pore des Transportpfades gelangt, sinkt dabei die Azidität des Substrates und eine Protonierung durch das Bulkwasser erfolgt. Das dabei entstehende Neutralteilchen kann nun die lipophile Engstelle passieren.^{123,125} Dieser Transportmechanismus wird schematisch in Abb. 1.4 dargestellt. Da die Anionen-Leitfähigkeit bei neutralen pH-Werten in den elektrophysiologischen Studien gezeigt werden konnte, liegt die Annahme nahe, dass eine gewisse Restaktivität für geladene Teilchen möglich ist. Die physiologische Relevanz dessen ist jedoch fragwürdig.¹²⁶

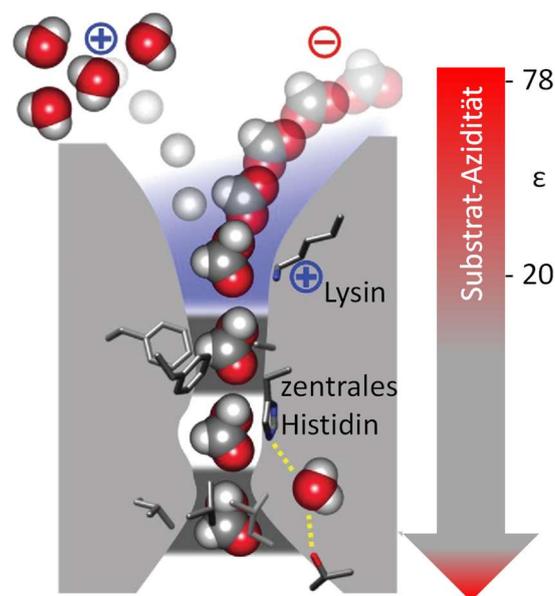


Abb. 1.4: Transportmechanismus von Formiat-Nitrit-Transportern. Das dissoziierte Substrat wird durch die positive Ladung des konservierten Lysins angezogen. Durch die sinkende Azidität des Substrates im Inneren der Substratpore, wird das Anion vom Bulkwasser protoniert. Das so entstehende Neutralteilchen kann nun durch die lipophile Engstelle gelangen. Abbildung nach WIECHERT UND BEITZ.¹²⁷

Der beschriebene Mechanismus lässt sich weder eindeutig den Transportern noch den Kanälen zuordnen. Der den Aquaporinen ähnliche Aufbau und die geringe Substrataffinität deuten auf einen Kanal hin.^{3,126,128} Der für den Substrattransport genutzte Protonengradient

spricht allerdings eher für einen sekundären Transporter. Ein ähnliches Bild zeigt sich zum Beispiel bei den Ammonium-Transportern.¹²⁹ Dieses Phänomen tritt häufiger beim Transport sogenannter *Shapeshifter* Substrate auf, also schwache Säuren und Basen, welche in unterschiedlichen Formn vorliegen können.¹³⁰

1.3.5 Entwicklung eines PfFNT Inhibitors

Die Substanz MMV007839 [1], welche bereits in Kapitel 1.3.3 erwähnt wurde, wurde in einem *Screening* der Malariabox für PfFNT-Inhibitoren entdeckt.¹¹⁹ Die Malariabox ist eine Sammlung verschiedener Substanzen mit nachgewiesener Wirkung gegen *P. falciparum*, für die jedoch noch kein *target* bekannt ist.¹³¹

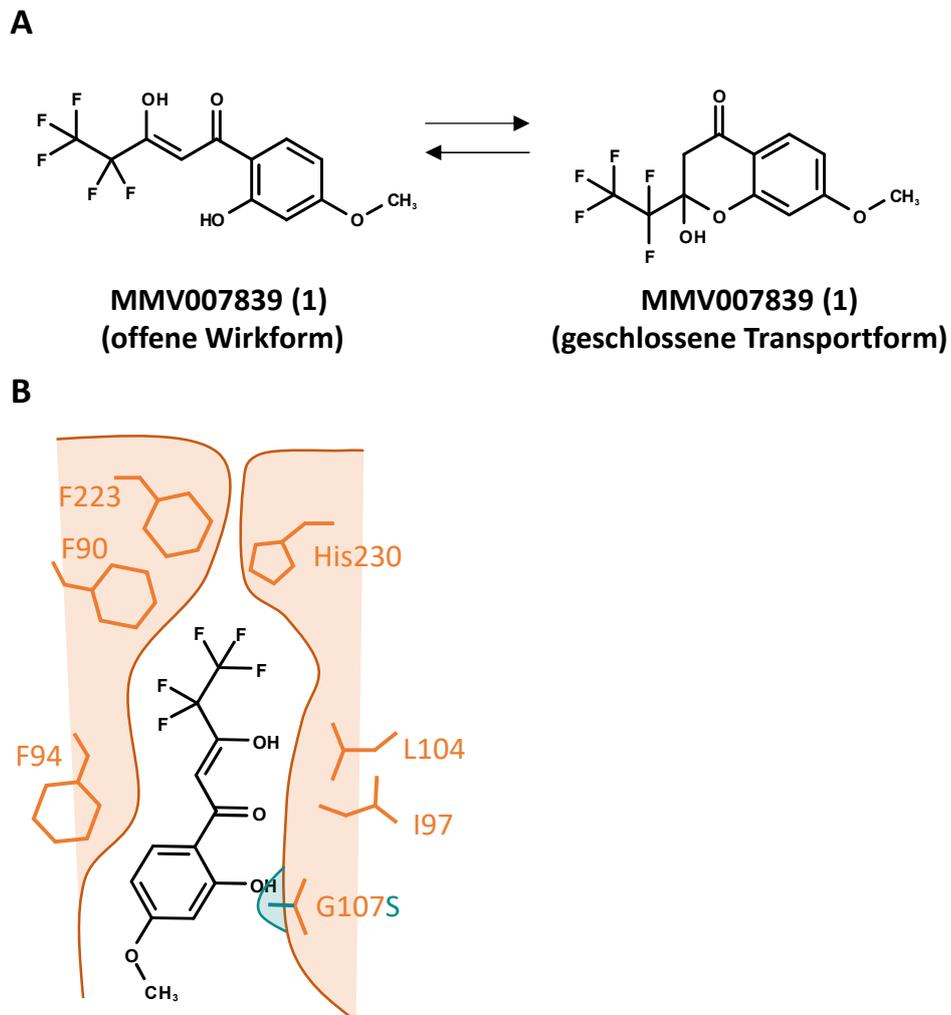


Abb. 1.5: MMV007839 [1] – Prodrug-Prinzip und postulierter Bindemodus. A) MMV007839 [1] vollzieht einen internen Ringschluss durch die Reaktion der vinylogenen Carbonsäure mit der phenolischen Hydroxygruppe. Dieses entstehende Chroman-Derivat stellt eine ungeladene Transportform dar. B) Der postulierte Bindemodus erinnert an zwei Lactat-Moleküle, welche ungeladen (Fluoralkyl) nahe der lipophilen Engstelle und geladen (vinyloge

Carbonsäure) vorliegen. Die Hydroxygruppe führt allerdings bei forcierten Bedingungen zu der G107S-Mutation, welche den Inhibitor sterisch behindert.

Die Substanz [1] besteht aus einer vinylogenen Carbonsäure mit einer Pentafluoralkylkette und einer aromatischen Komponente, welche eine Methoxygruppe in Position 4 und eine Hydroxygruppe in Position 2 trägt.

Diverse Modifikationen an der vinylogenen Carbonsäure bestätigten, dass es sich bei diesem Strukturmerkmal um das Pharmakophor handelt. Die Methoxygruppe ist für die Aufnahme in den Parasiten relevant. Beim Vergleich der IC_{50} -Werte an rekombinant exprimiertem PffNT in *S. cerevisiae* mit den EC_{50} Werten aus dem *in vitro* Test gegen Malaria-Parasiten, waren die IC_{50} Werte mit Derivaten ohne Methoxygruppe vergleichbar mit MMV007839 [1], die EC_{50} Werte jedoch höher.

Die Fluoralkylkette ist in einem gewissen Rahmen modifizierbar. So ist es möglich die Fluoratome ohne größere Wirkungsverluste gegen Chlor auszutauschen. Die Verkürzung führt hingegen zu einer Verschlechterung der Wirkung.

Die Hydroxygruppe in 2-Position am Aromaten reagiert intramolekular mit der vinylogenen Carbonsäure, dabei kommt es zu einem Ringschluss und ein Chroman-Derivat entsteht. Diese Form des Inhibitors ist ungeladen und es ist anzunehmen, dass dies eine Transportform darstellt, die in den Parasiten gelangen kann. Die Wirkung entsteht allerdings durch die offenkettige Form, welche in den schmalen Transportpfad von PffNT eindringt und diesen für L-Lactat blockiert. Dies zeigten Versuche mit Inhibitoren ohne die Hydroxygruppe, welche konstant in der offenkettigen Form vorliegen. Diese Substanzen zeigten keine Verschlechterung des IC_{50} -Wertes auf der Proteinebene.

Die dauerhafte Behandlung der Parasiten mit dem dreifachen der EC_{50} von MMV007839 [1], führte allerdings zur Selektion einer Punktmutation, die durch einen Aminosäureaustausch zur Resistenz gegenüber dem Inhibitor führt. In der Mutation G107S führt das Serin zu einem Zusammenstoß mit der Hydroxygruppe von MMV007839 [1].

Diverse andere FNTs von Spezies wie *Entamoeba histolytica*¹²⁴ oder *Toxoplasma gondii*¹³² weisen an der Stelle 107 ein Glycin auf, lediglich das FNT von *Babesia bovis* hat an der entsprechenden Stelle ein Serin.¹¹⁹ Weiterhin lässt sich feststellen, dass diese Resistenzmutation unflexibel ist, da der Einbau einer anderen Aminosäure den Lactat-Transport stoppen würde.¹¹⁹

Die Verwendung der bereits erwähnten offenkettigen Inhibitoren zeigte den postulierten Zusammenstoß deutlich. Das Entfernen der Hydroxygruppe verbesserte den IC_{50} -Wert gegen

PfFNT G107S um den Faktor 10. Diese Verbesserung war jedoch nicht stark genug, um einen Inhibitor zu erhalten, der potent genug war, um die Resistenzmutante effizient zu hemmen. Zusätzlich trat das Problem auf, dass die Hydroxygruppe für das interne *Prodrug* fehlte, was sich deutlich durch die Verschlechterung der EC₅₀-Werte gegen die Parasiten in Blutmedium zeigte.

Dieser Aminosäure-Austausch sprach jedoch auch für den postulierten Bindemodus (vgl. Abb. 1.5), welcher im späten Verlauf dieser Arbeit durch die Strukturaufklärung mittels Kryoelektronenmikroskopie bestätigt wurde.¹³³ Dies ermöglicht in Zukunft weitere gezielte Wirkstoffentwicklungen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, pharmazeutisch relevante, lactatleitende Membranproteine besser zu charakterisieren und neue Modulatoren zu finden.

Zunächst sollte dabei das zu Beginn dieser Arbeit noch wenig untersuchte hMCT11 rekombinant exprimiert werden. Bei Gelingen dieser Aufgabe, sollte das Substratspektrum und allen voran die Lactat-Leitfähigkeit untersucht werden. Letztlich sollten die T2D Mutationen auf der Proteinebene *in vitro* untersucht werden, um Einflüsse durch komplexe physiologische Systeme zu vermeiden. Auf diese Weise sollte festgestellt werden, ob die bekannten Mutationen zu einer direkten Veränderung in der Funktionsweise des Proteins führen, oder ob sie Teil eines multifaktoriellen Mechanismus in einem größeren physiologischen Kontext sind.

Weiterhin sollte das plasmodiale Lactat-Transportprotein PfFNT untersucht werden. Von diesem existiert die Mutante PfFNT G107S, die gegenüber dem potenten Inhibitor MMV007839 [1] resistent ist. Hierbei sollte zunächst ein Inhibitor gefunden werden, der in der Lage ist, die Resistenzmutante in *S. cerevisiae* exprimiert zu hemmen.

Dabei sollten zusätzliche Modifikationen an der Inhibitor-Struktur durchgeführt werden, um das Verständnis der Substanzklasse weiter zu erhöhen und weitere Modifikationen zu ermöglichen.

Entstehende Inhibitoren sollten zudem auch auf die FNT anderer *Plasmodium*-Spezies angewendet werden, um zu testen, ob die Klasse der Inhibitoren das Potenzial hat, ein weites Wirkungsspektrum unter Plasmodien zu erreichen.

Letztlich sollte das Problem des fehlenden *Prodrug* Prinzips gelöst werden, sodass ein neuer potenter PfFNT Inhibitor entsteht, welcher in der Lage ist *in vitro* die Malaria Parasiten abzutöten.

2 Geräte und Material

2.1 Chemikalien, Kits, Materialien

Anatrace, Maumee, USA

n-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid (DDM)

AppliChem, Darmstadt

Natrium-L-Lactat, Polyoxyethylen (23)-laurylether (Brij[®] 35), Polyoxyethylen(20)-cethylether (Brij[®] 58Xa), Calciumacetat, Magnesiumchlorid, Zinkacetat, Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat (Tween[®] 20), Natriumlaurylsulfat, Phosphoenolpyruvat

Avanti Polar lipids, Alabaster, USA

E. Coli Polar Lipid Extract powder

Becton, Dickinson and Company, Heidelberg

Bacto[™] Yeast Extract, Bacto[™] Trypton

Bibby Sterilin, Stone, Großbritannien

Polygram SIL G/UV254-Polyester-Fertigfolien mit 0,20 mm Kieselgel 60

Bio-Rad, München

Clarity Western ECL Blotting Substrate, Bio-Rad QuickStart[™] Bradford Protein Assay

Fluka, Buchs

Ammoniumformiat

GE Healthcare, Freiburg

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

Ampicillin, Tetramethylethyldiamin (TEMED), Agarose LE

Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig

¹⁴C-Natriumformiat, ¹⁴C-Natrium-L-lactat, ¹⁴C-Natriumacetat, ¹⁴C-Natriummalonat

J.T. Baker, München

Ethanol, Methanol, Isopropanol, Essigsäure, Salzsäure

Macherey-Nagel, Düren

NucleoBond PC 500

Merck Chemicals, Darmstadt

Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-100 kDa cut-off membrane

MP Biomedical, Illkirch, Frankreich

Ethidiumbromid

New England BioLabs GmbH, Frankfurt

OneTaq® DNA Polymerase

Oxoid, Basingstoke, USA

Agar bacteriological

Peqlab, Erlangen

peqGold prestained protein marker III

Promega, Mannheim

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

Qiagen, Hilden

Ni-NTA-Agarose, Faktor Xa Protease 400 U

Roche Diagnostics, Mannheim

cOmplete™, EDTA-free Proteaseinhibitor, Pyruvatkinase, *E. coli*-tRNA, Restriktionsprotease
Faktor Xa

Roth, Karlsruhe

LB-Medium, LB-Agar, Milchpulver blotting grade, Rotiphorese® Blau R, EDTA, MES, HEPES,
TRIS-Acetat, Glycerol, Glukose, 2-Mercaptoethanol, Dialyseschlauch Visking (14 kDa cut-off),
Natriumazid, Natriumacetat, Sterilfilter Filtropur S 0.2, alle weiteren nicht aufgeführten
Chemikalien.

Sigma Aldrich, München

Natriumformiat, Lithiumacetat, Magnesiumacetat, Polyoxyethylenglycol 8000, Coomassie
G250, glass beads (säuregewaschen), Polyoxyethylen(20)-stearylether (Brij® 78),
Polyoxyethylen(20)-oleylether (Brij® 98), L-Arginin, L-Asparagin, L-Cystein, L-Glutamin, L-

Lysin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Aspartat, L-Thyrosin, L-Tryptophan, L-Threonin, L-Alanin, L-Glutamat, L-Prolin, L-Serin, Adenin, Uracil, Antifoam Y30

Süd-Laborbedarf, Gauting

Hi Yield® Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit

Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Slide-A-Lyzer dialysis cassette MWCO 10 kDa 3 ml, Restriktionsendonukleasen, RiboLock RNase Inhibitor, dNTPs, T4-DNA-Ligase, Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)

VWR International GmbH, Hannover

Szintillationsgefäße Snaptwist®

Zinsser Analytics, Frankfurt

Szintillation Cocktail Mix Quicksafe A

2.2 Geräte

Agilent Technologies

ZORBAX Eclipse XDB-C8 (4,6 x 150 mm, 5 mm)

Avestin, Mannheim

Liposomen-Extruder LiposoFast

B. Braun, Melsungen

Certomat MO Laborschüttler

Beckman Coulter, Krefeld

Optima™ XL-80 K Ultrazentrifuge, Rotor 50.2 Ti, Rotor SW 60 T

Bio-Rad, München

Power Pac 200, Trans-Blot SD semi-dry transfer cell

Eppendorf AG, Hamburg

BioPhotometer®

Heraeus holding, Hanau

Multifuge™ 1S-R, Kelvitron® T (Brutschrank), Biofuge™ Pico

IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen

Ikmag® Ret-GS (Magnetrührer/Heizplatte)

Infors HAT, Bottmingen, Schweiz

Brutschrank Minitron

Jasco, Gross-Umstadt

BioLogic stopped-flow Anlage:

Spannungsquelle ALX 250, Photomultiplier PMS 250, MPS 70/2 microcompressor unit, FC-15/7.5 Küvette, SFM-2000 Mischeinheit, MOS-200 UV/Vis und Fluoreszenzspektrometer, BH-10-61 UV-Monochromator, PCI connector block 6221, Biokine Software Version 4.70

Kern, Balingen-Frommern

Analysenwaage Typ ABS 120-4

Mettler-Toledo, Gießen

Balance MS205DU Präzisionswaage, PB3002-S DeltaRange Präzisionswaage

New Brunswick Scientific, Edison, USA

Innova U535 Ultratiefkühlschrank

Packard Instrument Company, Downers Grove, USA

Tri-Carb 2900TR Flüssigszintillationszähler

Peglab, Erlangen

PerfectSpin 24R gekühlte Mikrozentrifuge, SDS-Gelgießstand und Laufkammer

Sartorius AG, Göttingen

BIOSTAT® APlus (Fermenter)

Schott Instruments, Mainz

Lab 850 pH-Meter

Scientific Industries, Bohemia, USA

Vortex-Genie 2

SI Analytics, Mainz

pH-Elektrode BlueLine 12 pH

Thermo Electron Corporation, Osterode

Heraeus Multifuge 1S-R Kühlzentrifuge

Thermo Scientific, Schwerte

Hochdruck-Homogenisator French Press cell disrupter FA-078

VWR, Darmstadt

Puranity TU 6 UV/UF Wasseraufbereitungssystem

Waters

Waters 717 HPLC-Anlage plus Autosampler, 486 tunable absorbance detector, 1525 Binary HPLC Pump

2.3 Plasmide und codierende DNA-Sequenzen

pDRTXa

für Messungen mit *S. cerevisiae*, mit N-terminalem Hämagglutinin-Tag (HA-Tag) und C-terminalem H₁₀-Tag⁴

pIVEX2.3w GFPΔM1

für die zellfreie Produktion von GFP-Fusionsproteinen, mit N-terminalem Hämagglutinin-Tag (HA-Tag) und C-terminalem H₁₀-Tag

pET-3a

für die zellfreie Proteinsynthese.

PfFNT

Formiat-Nitrit-Transporter von *P. falciparum*, codonoptimiert, NCBI Gen-ID: 814480

PvFNT

Formiat-Nitrit-Transporter von *P. vivax*, codonoptimiert, NCBI Gen-ID: 5473836

PoFNT

Formiat-Nitrit-Transporter von *P. ovale*, codonoptimiert.

PmFNT

Formiat-Nitrit-Transporter von *P. malariae*, codonoptimiert, NCBI Gen-ID: 39868377

PkFNT

Formiat-Nitrit-Transporter von *P. knowlesi*, codonoptimiert, NCBI Gen-ID: 7320429

PbFNT

Formiat-Nitrit-Transporter von *P. berghei*, codonoptimiert, von Genscript synthetisiert

hMCT1

humaner Monocarboxylat-Transporter 1, NCBI Gen-ID: 6566

2.4 Verwendete Mikroorganismen

E. coli Stamm

DH5 α (F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -).

S. cerevisiae Stamm

W303-1A Δ jen1 Δ ady2, zur Verfügung gestellt von M. Casal ¹³⁴

(MATa, can1-100, ade2-1oc, his3-11-15, leu2-3,-112, trp1-1-1, ura3-1, jen1::kanMX4, ady2::hphMX4).

2.5 Antikörper

Anti-Hämagglutinin

Primärantikörper (monoklonal, Maus) gegen das Hämagglutinin-Epitop YPYDVPDYA
Roche

Anti-Histidin

Primärantikörper (monoklonal, Maus) gegen das HHHHH-Epitop.
Qiagen

Goat-Anti-Mouse

Sekundärantikörper (polyklonal, Ziege) gegen Maus-IgG, konjugiert mit
Meerrettich-Peroxidase
Jackson ImmunoResearch

2.6 Oligonukleotide

Sofern nicht anders angegeben, wurden Oligonukleotide von Invitrogen bezogen. Großbuchstaben zeigen die Zugehörigkeit zur Originalsequenz. Kleinbuchstaben signalisieren Modifikationen.

2.6.1 Mutations-Primer

hMCT11 P2D fw

ggatccctgcagATGgatGCTCCCCAGCGG

hMCT11 P2D rv

CATctgcagggatccactagtGTCCGCgT

2.6.2 Sequenzier-Primer

PMA5

CTCTCTTTTATACACACATTC

ADH3

CATAAATCATAAGAAATTCGC

hMCT11 fw

TCGCCAGCGATCTGCTGCATCTCTACCTCG

hMCT11 rv

TCATCAGCATCATCACCAGCCCTGTGG

2.6.3 Klonierungs-Primer

hMCT11 SpeBamHPst

ttactagtgatccctgcagATGCCAGCTCCCCAGCGG

hMCT11 Xho

agctcgagACAAGTGGTGTCCAGAGTGG

2.7 Puffer, Medien und Lösungen

Alle angegebenen Medien wurden autoklaviert. Puffer wurden sterilfiltriert. Sofern nicht anders angegeben wurden alle Lösungen mit gereinigtem Wasser hergestellt.

2.7.1 Molekularbiologie

LB-Agarplatten

35 g LB-Agar (Lennox), 1000 ml gereinigtes Wasser, ggf. Zusatz von 0,01 % Ampicillin

LB-Flüssigmedium

20 g LB-Medium (Lennox), 1000 ml gereinigtes Wasser, ggf. Zusatz von 0,01 % Ampicillin

YPD-Agarplatten

20 g Pepton, 10 g *Yeast Extract*, 20 g Glukose, 0,1 g NaOH, 20 g Agar, 1000 ml gereinigtes Wasser

YPD-Flüssigmedium

20 g Pepton, 10 g *Yeast Extract*, 20 g Glukose, 1000 ml gereinigtes Wasser

SD-AHLW-Agarplatten

1,7 g Yeast Nitrogen Base, 20 g Glukose, 1000ml gereinigtes Wasser, pH-Wert auf 5,6 einstellen und 20 g Agar hinzugeben. Autoklavieren, abkühlen lassen und 5 ml Adenin (5 mg/ml), 1ml L-Histidin (20 mg/ml), 5 ml L-Leucin (20mg/ml) und 2 ml Tryptophan (5 mg/ml) zusetzen.

SD-AHLW-Flüssigmedium

1,7 g *Yeast Nitrogen Base*, 20 g Glukose, 1000 ml gereinigtes Wasser und pH-Wert auf 5,6 einstellen. Autoklavieren, abkühlen lassen und 5 ml Adenin (5 mg/ml), 1 ml L-Histidin (20 mg/ml), 5 ml L-Leucin (20 mg/ml) und 2 ml Tryptophan (5 mg/ml) zusetzen.

TAE-Puffer

40 mM Tris-Acetat (pH 8,0), 1 mM EDTA

10x OrangeG Ladepuffer

0,4 % Orange G, 30 % Glycerol, 100mM EDTA

Ethidiumbromid (10mg/ml)

1 Tablette Ethidiumbromid, 10 ml gereinigtes Wasser

2.7.2 Proteinchemie

Puffer B

25 mM Tris, 5 mM EDTA; pH 7,5.

Puffer M

100 mM Natriumphosphat, 50 mM NaCl.

4x SDS-Ladepuffer

0,25 M Tris, 40 % Glycerol, 0,02 % Bromphenolblau, 8 % SDS, 400 mM DTT; pH 8,0.

4x Trenngelpuffer

1,5 M Tris, 0,4 % SDS; pH 8,8.

4x Sammelgelpuffer

0,5 M Tris, 0,4 % SDS; pH 6,8.

10x Kathodenpuffer

1,92 M Glycin, 0,25 M Tris-HCl, 1 % SDS; pH 8,2-8,6.

5x Transferpuffer

5 mM TRIS, 38,4 mM Glycin, 0,0075 % SDS, 20 % Methanol; pH 8,3.

Coomassie-Färbelösung

600 ml Rotiphorese®-Blau R, 397,5 ml gereinigtes Wasser.

Entfärbelösung

10 % Eisessig, 30 % Ethanol.

10x TBS-Puffer

0,2 M TRIS-HCl, 1,35 M Natriumchlorid; pH 7,6.

TBST-Puffer

100 ml 10x TBS-Puffer, 900 ml gereinigtes Wasser, 1 ml Tween 20.

MTBST-Puffer

1,2 g Milchpulver blotting grade, 40 ml TBST-Puffer.

2.7.3 ¹⁴C-Substrataufnahmeassay

Messpuffer (pH 6,8)

50 mM HEPES, 50 mM Tris, mit gereinigtem Wasser auf das gewünschte Volumen auffüllen und den benötigten pH-Wert mit 25 % Salzsäure bzw. 1 M NaOH-Lösung einstellen.

Messpuffer (pH 4,8)

50 mM Tris, 50 mM Citronensäure, mit gereinigtem Wasser auf das gewünschte Volumen auffüllen und den benötigten pH-Wert mit 25 % Salzsäure bzw. 1 M NaOH-Lösung einstellen.

Substrat-Puffer

5 mM des zu untersuchenden Substrats mit dem jeweiligen Messpuffer

2.8 Zellfreie Proteinsynthese

Reinigungspuffer

20 mM Tris-HCl, 150 mM Natriumchlorid, entsprechendes Detergens, pH 8,0.

Aminosäuremix

4 mM jeder proteinogenen Aminosäure.

RWCMDE

16,7 mM von jeweils Arginin, Tryptophan, Cystein, Methionin, Asparaginsäure und Glutaminsäure.

HEPES-EDTA-Puffer

2,5 M HEPES, 0,5 M EDTA, pH 8,0.

NTP-Mix

360 mM ATP und je 240 mM CTP, GTP und UTP.

Liposomenpuffer

5 mM HEPES, 5 mM MES, 200 mM Saccharose, 100 mM Kaliumchlorid; pH 6,8.

Gradientenlösung

5 mM HEPES, 5 mM MES, 200 mM Saccharose, 100 mM Kaliumchlorid, 400 mM L-Lactat oder Pyruvat; pH 6,8.

2.9 S30-Extrakt und T7-RNA-Polymerase

S30 Puffer

10 mM Tris-Acetat, 14 mM Magnesiumacetat, 0,6 mM Kaliumacetat, pH 8,2.

S30-Puffer A

10 mM Tris-Acetat, 14 mM Magnesiumacetat, 0,6 mM Kaliumacetat, 6 mM β -Mercaptoethanol; pH 8,2.

S30-Puffer B

10 mM Tris-Acetat, 14 mM Magnesiumacetat, 0,6 mM Kaliumacetat, 1 mM DTT; pH 8,2.

S30-Puffer C

10 mM Tris-Acetat, 14 mM Magnesiumacetat, 0,6 mM Kaliumacetat, 0,5 mM DTT; pH 8,2.

2x YTPG-Medium

50 g Hefeextrakt, 80 g Bactotrypton, 25 g Natriumchlorid, ad 4,5 l gereinigtes Wasser.

S30-Phosphatpuffer

14,95 g KH_2PO_4 , 45,65 g K_2HPO_4 , 250 ml gereinigtes Wasser, autoklaviert.

S30-Glukose-Lsg.

99 g D-Glukose, 500 ml gereinigtes Wasser, sterilfiltriert.

T7-Puffer

30 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 % Glycerol, 10 mM β -Mercaptoethanol, auf pH 8,0 eingestellt.

T7-Puffer II

30 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 20 mM NaCl, 5 % Glycerol, 10 mM β -Mercaptoethanol, auf pH 8,0 eingestellt.

T7-Dialysepuffer

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1 mM DTT, auf pH 8,0 eingestellt.

2.10 Stabilitätsuntersuchung

Puffer pH 1,1

4,8 ml Citrat-Lsg. (0,1 M) und 95,2 ml Salzsäure-Lsg. (0,1 M).

Puffer pH 3,0

40,3 ml Citrat-Lsg. (0,1 M) und 59,7 ml Salzsäure-Lsg. (0,1 M).

Puffer pH 5,0

0,95 ml Natriumhydrogenphosphat-Lsg. (1/15 M) und 99,05 ml Dihydrogenphosphat-Lsg. (1/15 mol/l).

Puffer pH 7,0

61,2 ml Natriumhydrogenphosphat-Lsg. (1/15 M) und 38,8 ml Dihydrogenphosphat-Lsg. (1/15 mol/l).

Puffer pH 9,0

87,6 ml Glycin-Lsg. (0,1 M) und 12,4 ml Natriumhydroxid-Lsg. (0,1 M).

PBS-Puffer pH 7,4

80 g NaCl, 2 g KCl, 14,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 2 g KH_2PO_4 , ad 1000 ml mit ddH₂O, auf pH 7,4 mit NaOH und HCl eingestellt, autoklaviert.

2.11 Synthese und Analytik

2.11.1 Chemikalien

Verwendete Chemikalien wurden von ABCR, Acros, Alfs-Aesar, Fluka, Merck, Roth und TCI bezogen und ohne weitere Verarbeitung eingesetzt.

2.11.2 Mitteldruckflüssigchromatographie

Zur Aufreinigung der Syntheseansätze wurde eine Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC) der Firma Roth bei einem Druck von 4-5 bar an Kieselgel 60 (40-63 μm) durchgeführt. Für die Elution wurde ein Fließmittelgemisch aus Cyclohexan und Essigsäureethylester (9:1) genutzt, die Detektion erfolgte bei 254 nm.

Folgende Instrumente wurden verwendet:

| | |
|-----------------------|---|
| 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-Spektrometer |
| Schreiber: | Flachbrettschreiber BD 40 04 (Kipp & Zonen (Holland)) |
| Säule: | Labochrom MPGC-Chromatographiesäule 205 ml |

2.11.3 NMR-Spektroskopie

Es wurde ein Kernresonanzspektrometer Bruker Avance III 300 verwendet, die Auswertung erfolgte mit Bruker Topspin 2.1 Software.

^1H -NMR:

Messfrequenz = 300,13 MHz

Die chemische Verschiebung wurden auf folgende Signale der eingesetzten Lösemittel bezogen: $[\text{D}_5]$ -DMSO in $[\text{D}_6]$ -DMSO 39,52 ppm und CHCl_3 in CDCl_3 7,26 ppm.

^{13}C -NMR:

Messfrequenz = 75,47 MHz

Die chemische Verschiebung wurden auf folgende Signale der eingesetzten Lösemittel bezogen: $[\text{D}_6]$ -DMSO 39,52 ppm und CDCl_3 77,16 ppm.

2.11.4 Massenspektroskopie

Bruker Amazon SL Ionenfallen-Massenspektrometer

Vorgeschaltete HPLC-Anlage: Agilent 1260 HPLC-System (Säule: Waters Xterra MS C8, 4,6 x 50 mm, 3,5 μm , mit Phenomenex Security Guard C18-Vorsäule 3 x 4 mm), Elektronenspray-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).

2.11.5 Dünnschichtchromatographie

Polygram SIL G/UV254-Polyester-Fertigfolien mit 0,20 mm Kieselgel 60 und Fluoreszenz-Indikator (Macherey-Nagel, Düren)

Detektion: Fluoreszenzlöschung bei 254 nm

2.12 Software

Die Darstellung von chemischen Strukturen, sowie die Berechnung der physikochemischen Eigenschaften erfolgte durch MarvinSketch (ChemAxon).

Das Fitting sämtlicher Kurven, sowie deren graphische Darstellung erfolgte durch GraphPad Prism Version 9.1.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Die Durchführung erfolgte durch Anna Fuchs.

Die kompetenten *E. coli* Zellen wurden nach COHEN *et al.* mittels der Calciumchlorid-Methode¹³⁵ hergestellt: Eine einzelne Kolonie des beschriebenen DH5 α -Stammes wurde in 5 ml LB-Medium gegeben und etwa 9 h bei 37 °C und 200 U/min inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 100 ml Hauptkultur, ebenfalls LB-Flüssigmedium, angeimpft und bei 20 °C und 200 U/min bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 heranwachsen gelassen. Die Zellen kühlten auf Eis 10 min ab und wurden bei 2000 *g* und 4 °C 10 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 30 ml kalter Calciumchlorid-Lösung (0,1 M) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zentrifugation (2000 *g*, 4 °C, 10 min), das Resuspendieren (20 ml kalte Calciumchlorid-Lösung) und die Inkubation auf Eis (20 min) erneut durchgeführt. Nach weiterem Zentrifugieren (2000 *g*, 4 °C, 10 min) wurde das Zellpellet mit 10 ml Lösung (20 % Glycerol und 0,1 M Calciumchlorid) resuspendiert und mindestens 4 h auf Eis gelagert. Die Zellsuspension wurde letztlich aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Verwendet wurden lediglich kompetente *E. coli* Zellen, welche bei einer Transformation mit 1 ng Plasmid-DNA mindestens 10⁶ koloniebildende Einheiten je Mikrogramm DNA hervorbrachten.

3.1.2 Schnelltransformation von *E. coli*

Für die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen (siehe 3.1.1) wurden diese zunächst 5 min auf Eis angetaut, 1 μ l präparierter Plasmid-DNA (3.1.4) hinzugegeben und die Zellen 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 20 μ l der Zellsuspension auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin ausgestrichen.

3.1.3 Dauerkulturen von *E. coli*

Es wurden 500 μ l 80 % sterilen Glycerols mit 1000 μ l frischer *E. coli* Übernachtskultur vermischt und bei -80 °C gelagert.

3.1.4 DNA-Isolierung

Plasmid-DNA wurde mit dem Minipräparation Kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System isoliert. Eine einzelner *E. coli* Klon wurde in 5 ml Ampicillin-haltigem LB-Flüssigmedium über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach

Herstellervorgabe, mit der einzigen Abweichung, dass für die Elution 50 µl steriles, gereinigtes Wasser verwendet wurde.

3.1.5 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt. Es wurde 1 % Agarose in 50 ml TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose gelöst hat. In die Lösung wurde 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) gegeben. Nachdem das Agarosegel ausgehärtet war, wurde es in TAE-Puffer überführt. Die Proben wurden 1:10 mit Ladepuffer gemischt und in die Taschen des Agarosegels gegeben. Die DNA-Fragmente wurden 20 min bei 120 V getrennt. Bei einer Wellenlänge von 366 nm wurde das DNA interkalierte Ethidiumbromid detektiert. Die Größe wurde mittels des λ-Pst I-Größenmarkers abgeschätzt.

3.1.6 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden zunächst aus dem Agarosegel geschnitten. Anschließend wurde das Hi Yield Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit verwendet, um die DNA aufzureinigen. Die DNA wurde in etwa 50 µl gereinigtem und autoklaviertem Wasser gelöst.

3.1.7 DNA-Konzentrationsbestimmung

Um die Konzentration und Reinheit von DNA-Lösung zu bestimmen, wurde die Lösung in einem BioPhotometer vermessen. Die Konzentration der Probe wurde durch das Gerät direkt ermittelt und ausgegeben. Es wurde durch entsprechende Verdünnung die benötigte Absorption bei 260 nm im Lambert-Beer'schen Bereich eingestellt. Die Reinheit wurde durch das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt, um Proteinverunreinigungen zu ermitteln. Dieser Faktor sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.1.8 Restriktionsverdau

Es wurden 1 µg DNA in 20 µl des entsprechenden Inkubationspuffer mit den entsprechenden Restriktionsenzymen 1 h inkubiert. Die Wahl des Inkubationspuffers erfolgte nach Angaben des Herstellers für die gewählten Restriktionsenzyme.

3.1.9 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten und Plasmid-Vektor erfolgte in einem Verhältnis von etwa 3:1. Die DNA wurde dabei mit der T4-DNA-Ligase und dem entsprechenden Ligationpuffer in einem Volumen von 10 µl für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

3.1.10 Polymerasekettenreaktion

Für die Polymerasekettenreaktion wurden etwa 30 ng der Plasmid-DNA mit 20 pmol Oligonukleotiden, 10 pmol dNTP-Mix, 10 µl 5x PCR-Puffer und 1 U Taq-Polymerase versetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf 50 µl mit ddH₂O aufgefüllt und folgendem Temperaturprogramm ausgesetzt:

Tab. 3.1: PCR-Temperaturprogramm.

| Temperatur / °C | Dauer / s |
|-------------------|-----------|
| 94 | 60 |
| 28 Zyklen | |
| 94 | 15 |
| Schmelztemperatur | 20 |
| 68 | 70 |
| 68 | 30 |
| 8 | |

Die Schmelztemperatur wurde anhand dieser Formel abgeschätzt:

$$T_m = 64,9 + 41 \times GC (\%) - 600 N^{-1}$$

GC (%): GC-Gehalt des Primers

N: Anzahl der Basenpaare

3.1.11 *In vitro* Mutagenese

Um eine Punktmutation in eine DNA-Sequenz einzufügen, wurde das Quikchange Site-Directed Mutagenesis Protokoll von Stratagene verwendet. Die zu mutierende DNA wurde im entsprechenden Vektor als *template* genutzt. Die Mutagenese-Primer in 5'-Richtung enthielten den Basenaustausch für die Mutation. Die 3'-Primer begann direkt hinter der Mutationsstelle. Die Primer umfassten eine Länge von etwa 30 Basenpaaren. Diese konnte je nach AT-Gehalt und Schmelztemperaturen jedoch variieren. Die Mutation wurde über eine PCR mit der Pfu-Turbo DNA-Polymerase eingebracht (Tab. 3.2). Dabei wurden 0,5 µl der template-DNA, jeweils 1,5 µl der Primer (25 µM), 4 µl dNTPs (2,5 mM), 5 µl Pfu-Puffer (10x), 0,8 µl Pfu-Turbo Polymerase und 36,7 µl ddH₂O verwendet. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit 1 U DpnI bei 37 °C über Nacht inkubiert. Von diesem Ansatz wurden 10 µl für die Transformation von *E. coli* verwendet (3.1.2).

Tab. 3.2: PCR-Temperaturprogramm

| Temperatur / °C | Dauer / min |
|-----------------|-------------|
| 95 | 0,5 |
| 16 Zyklen | |
| 95 | 0,5 |
| 55 | 1 |
| 68 | 2 / kb |
| 68 | 20 |
| 8 | |

3.1.12 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation wurde in Anlehnung an die Methode von GIETZ UND SCHIESTL¹³⁶ durchgeführt: Eine einzelne Kolonie des entsprechenden Hefestammes wurde über Nacht in 5 ml YPD-Flüssigmedium bei 29 °C und 220 U/min inkubiert. Mit Hilfe dieser Kultur wurde eine 40 ml Hauptkultur in YPD-Flüssigmedium angesetzt und auf eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt. Diese wurde bei 29 °C und 220 U/min so lange inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,6 ± 0,1 erreicht war. Diese Hefekultur wurde zentrifugiert (4000 g, 5 min, 4 °C), mit 25 ml kaltem, sterilem Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert (4000 g, 5 min, 4 °C). Schließlich wurden die Zellen mit 1 ml sterilem Wasser suspendiert. Von dieser Suspension wurden jeweils 100 µl für eine Transformation benötigt. Es wurde eine frisch hergestellte Lösung aus 240 µl 50 % (m/V) PEG 3500, 36 µl 1 M Lithiumacetatlösung, 50 µl *single-stranded* DNA (2 mg/ml in TE-Puffer, einmalig für 5 min bei 100 °C erhitzt) und 33 µl sterilen Wassers zu den Zellen gegeben. Im Anschluss wurde 1 µl Plasmid-DNA zu der Suspension gegeben und diese höchstens 60 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 30 s bei 17 200 g zentrifugiert und das Pellet in 1 ml sterilem Wasser suspendiert. Diese Suspension wurde um den Faktor 100 verdünnt und davon 100 µl auf einer SD-AHLW-Agarplatte ausgestrichen. Die Inkubation der Platte erfolgte bei 29 °C über 3 bis 5 Tage.

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Aufschluss von *S. cerevisiae*

Zunächst wurde eine einzelner Klon über Nacht in 5 ml SD-AHLW-Flüssigmedium bei 29 °C und 220 U/min inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 100 ml SD-AHLW-Flüssigmedium angeimpft, diese Hauptkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 ± 0,1 wachsen gelassen und anschließend zentrifugiert (4000 g, 5 min). Das Zellpellet wurde anschließend jeweils mit

50 ml kaltem Wasser und 10 ml kaltem Puffer B gewaschen und bei -80 °C eingefroren. Die Zellen wurden daraufhin langsam auf Eis aufgetaut und mit 500 µl Puffer B und 500 µM säuregewaschenen Glaskügelchen versetzt. Dieses Gemisch wurde etwa 15-mal für 30 s gevortext. Zwischen diesen Intervallen wurden die Zellen für mindestens 1 Minute auf Eis gekühlt. Durch Zentrifugation bei 1000 g für 5 min bei 4 °C wurden die Glaskügelchen entfernt. Der Überstand wurde erneut 5 min bei 10 000 g und 4 °C zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde 45 min bei 100 000 g und 4 °C zentrifugiert, sodass die mikrosomale Fraktion pelletierte. Dieses Pellet wurde mit 100 µl Puffer M resuspendiert und gegebenenfalls bei -20 °C gelagert.

3.2.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung wurde nach der Bradford-Methode¹³⁷ durchgeführt, hierbei wurde das Bio-Rad Quickstart® benutzt. Die Proteinlösung wurde mit gereinigtem Wasser verdünnt, sodass in Summe 800 µl resultierten und eine spätere Absorption von 0,2 bis 0,8 vorlag und mit 200 µl Bradford-Reagenz gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch bei 595 nm vermessen. Der Blank wurde gleichbehandelt, lediglich die Proteinlösung wurde gegen gereinigtes Wasser ersetzt.

3.2.3 SDS-PAGE

Die Proteinproben wurden über ein 5 % Polyacrylamid-Sammelgel und 12,5 % Polyacrylamid-Trenngel aufgetrennt.¹³⁸

Tab. 3.3 Zusammensetzung von zwei Polyacrylamidgelen.

| Komponente | Sammelgel / ml | Trenngel / ml |
|--|----------------|---------------|
| Gereinigtes Wasser | 2,40 | 5,25 |
| 4x Sammelgel-/Trenngel- Puffer | 1,00 | 3,00 |
| Acrylamid-Lsg. (Rotiphorese Gel 40 (29:1)) | 0,60 | 3,75 |
| TEMED | 0,006 | 0,01 |
| Ammoniumperoxidsulfat-Lsg. | 0,025 | 0,08 |

Die Proteinproben wurden mit SDS-Ladepuffer 30 min bei 37 °C inkubiert und ggf. bei -20 °C gelagert. Als Größenmarker wurde PeqGold prestained Protein Marker III verwendet. Zunächst wurden die Proteine bei 160 V in der Grenze von Sammelgel und Trenngel

konzentriert und anschließend bei 200 V aufgetrennt. Die Trenngele wurden anschließend mittels Western Blot, Coomassie-Färbung oder fluorimetrisch untersucht.

3.2.4 Coomassiefärbung

Für diese Proteinfärbemethode wurde das Gel mindestens 15 min mit etwa 20 ml Färbelösung (Rotiphoresetextsuperscript® Blau R) geschüttelt. Anschließend wurde das Gel bis zur Entfärbung des Hintergrunds mit Entfärbelösung oder Wasser behandelt.

3.2.5 Western Blot

Für Western Blots wurde die *semi-dry*-Methode¹³⁹ verwendet, um die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran zu übertragen. Die Membran wurde für 30 s in Methanol geschwenkt und anschließend mit Whatman® *chromatography paper* für 5 min in Transferpuffer gegeben. Das SDS-Gel wurde auf der Membran platziert, von Ober- und Unterseite mit drei Whatman®-Papieren flankiert und zwischen die beiden Elektroden der *blotting*-Apparatur gelegt. Der Proteintransfer erfolgte bei 17 V über 60 min. Die Membran wurde daraufhin für mind. 1 h bei Raumtemperatur in MTBST geblockt. Anschließend wurde die Membran in Primärantikörper (Verdünnung 1:5000 enthalten in 15 ml MTBST-Puffer) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Letztlich wurde die Membran dreimal für etwa 15 min mit TBST-Puffer gewaschen, 1,5 h in Sekundärantikörper (Verdünnung 1:5000 in 15 ml MTBST-Puffer) bei Raumtemperatur inkubiert und noch weitere drei Male unter beschriebenen Bedingungen gewaschen. Mittels des Amersham™ ECL Plus Reagenzkits wurde der Sekundärantikörper nachgewiesen und am Lumi-Imager™ ausgewertet.

3.3 Zellfreie Proteinsynthese

Für die zellfreie Synthese von Membranproteinen wurde das *Continuous-Exchange-Cell-Free*-System (CECF-System) verwendet.¹⁴⁰ Weiterhin wurden im Labor etablierte Systeme^{141,142} auf die gewünschten Proteine übertragen.

Das CECF-System besteht aus zwei, von einer Dialysemembran getrennten, Bereichen, dem *reaction mix* (RM) und dem *feeding mix* (FM). Der RM stellt den Ort der eigentlichen Proteinsynthese dar, wohingegen der FM ein Reservoir wichtiger Bausteine ist. Bei der Proteinsynthese entstehende niedermolekulare Nebenprodukte, welche den Ablauf verlangsamen würden. Diese diffundieren durch die Membran und werden somit im

großvolumigen FM verdünnt. Genauere Angaben zur Durchführung befinden sich in den Kapiteln. 3.3.3 und 3.3.6.

3.3.1 Gewinnung eines S30-Extraktes

Für die zellfreie Proteinsynthese wird ein Zellextrakt (hier S30-Extrakt genannt) benötigt, der die Transkriptions- und Translationsfaktoren liefert. Im Folgenden ist beispielhaft die Produktion des Zellextrakts von *E. coli* (BL21(DE3)) in einem 5 l Fermenter dargestellt:

Die benötigten Zellen wurden auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eine einzelne Kolonie in 50 ml LB-Flüssigmedium überführt und erneut über Nacht bei 39 °C und 220 U/min inkubiert. Es wurden die S30-Glukose-Lsg. und der S30-Phosphatpuffer zu dem im Fermenter autoklavierten 2x YTPG-Medium gegeben und im Anschluss die 50 ml Vorkultur zusammen mit 500 µl Antifoam Y-30 hinzugefügt. Bei 37 °C und 100 % Sauerstoffsättigung wurde die Kultur zu einer OD₆₀₀ von 2,5 bis 3,0 kultiviert. Nach Erreichen der gewünschten Wachstumsdichte wurde die Kultur rasch heruntergekühlt, um das Zellwachstum zu stoppen. Die Ernte der Zellen erfolgte bei 4500 g für 15 min bei 4 °C, gewaschen wurde drei Mal mit jeweils 150 ml kaltem S30-Puffer A und schließlich wurden die Zellen bei -80 °C eingefroren. Nach langsamem Auftauen der Zellen auf Eis wurde kalter S30-Puffer B hinzugegeben, das Volumen sollte 110 % des Zellgewichtes betragen. Die suspendierten Zellen wurden bei 20 000 psi mit einem Hochdruck-Homogenisator *french press cell disruptor* aufgeschlossen. Die aufgeschlossene Zellmasse wurde im Anschluss 30 min bei 30 000 g und 4 °C zentrifugiert, es resultierten drei erkennbare Phasen, das Zellpellet, der Zellextrakt und ein Lipidüberstand. Dieser noch nicht aufgearbeitete Zellextrakt wurde abpipettiert und ausreichend 4 M Natriumchlorid-Lsg. zugesetzt, sodass eine Konzentration von 400 mM NaCl entstand. Anschließend wurde der Extrakt 45 min bei 42 °C im Wasserbad geschwenkt und über Nacht zwei Mal mit jeweils 2,5 l S30-Puffer C bei 4 °C mit einem 14 kDa *cut-off* dialysiert. Der dialysierte Extrakt wurde erneut bei 30 000 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert, es wurde erneut die mittlere Extraktfraktion entnommen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.3.2 Gewinnung von T7-RNA-Polymerase

Die Herstellung der T7-RNA-Polymerase erfolgte durch Dr. Folkhard Helmstetter. Die für die zellfreie Proteinbiosynthese benötigte T7-RNA-Polymerase wurde von BL21(DE3) pAR1219 *E. coli* Zellen gewonnen. Die Zellen wurden von einer LB-Amp-Agarplatte in 20 ml LB-Amp-Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit dieser Vorkultur

wurden 2 l LB-Amp-Flüssigmedium angeimpft. Diese Hauptkultur wurde bei 37 °C inkubiert, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,6-0,8 erreichte. Die Expression der T7-RNA-Polymerase wurde durch die Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert und die Zellen wurden anschließend weitere 5 h inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 4500 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert, das entstandene Zellpellet mit 60 ml T7-Puffer gewaschen und bei -80 °C gelagert.

Die aufgetauten Zellen wurden mit 30 ml T7-Puffer II resuspendiert und dreimal bei 20 000 psi im Hochdruck-Homogenisator *french press cell disruptor* aufgeschlossen. Die aufgeschlossenen Zellen wurden bei 20 000 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Zelltrümmerpellet wurde verworfen, der Überstand abgetrennt und mit Streptomycinsulfat-Lösung versetzt (Endkonzentration 2 %). Die dabei präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation bei 30 000 g für 30 min bei 4 °C entfernt. Mit einer Sepharose Q-Säule wurde die T7-RNA-Polymerase mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Dafür wurde die Probe, nach Äquilibration mit zwei Säulenvolumen T7-Puffer II auf die Säule gegeben und mit dem 21-fachen Säulenvolumen an T7-Puffer, mit steigender NaCl-Konzentration von 20-500 mM, bei 3 ml/min eluiert. Anschließend wurde die Säule mit 2 Säulenvolumen 1M NaCl-haltigem T7-Puffer und 3 Säulenvolumen 20 % ethanolhaltigem T7-Puffer nachgespült.

Die resultierenden Elutionsfraktionen und je 15 ml wurden bei 280 nm vermessen, um den Proteingehalt zu ermitteln und anschließend durch einen Western Blot mit spezifischen anti-T7-RNA-Polymerase-Antikörpern auf den T7-RNA-Polymerase Gehalt untersucht. Die T7-RNA-Polymerase haltigen Fraktionen wurden vereint und mit einem *Amicon Filter Device* (30 kDa *cut-off*) auf 8 mg/ml Gesamtprotein konzentriert. Die Lösung wurde anschließend über Nacht bei 4 °C gegen 1 l T7-Dialyse Puffer bei 14 kDa *cut-off* dialysiert. Zuletzt wurde die Lösung mit Glycerol auf einen Proteingehalt von 4 mg/ml eingestellt und bei -80 °C gelagert.

3.3.3 Analytische zellfreie Proteinsynthese

Um schnell viele verschiedene Bedingungen für eine optimale Proteinsynthese zu testen, wurde zunächst ein analytischer Ansatz mit kleinen Volumina in entsprechenden Reaktionskammern durchgeführt. Kleine Reaktionskammern wurden dabei mit einer Dialysemembran bespannt.

Tab. 3.4 Pipettierschema der verschiedenen Stocks für einen analytischen Ansatz bei der zellfreien Proteinsynthese.

| Komponente | Stockkonz. | Mastermix | | FM | RM |
|-----------------------|---------------|------------------|--|--------|-------|
| | | Volumen/ μ l | | | |
| S30-Puffer | 1x | | | 3308,0 | |
| RWCMDE | 16,67 | 609,9 | | | |
| Aminosäuren | 4 mM | 1270,6 | | 1299,0 | |
| Acetylphosphat | 1000 mM | 203,3 | | | |
| Phosphoenolpyruvat | 1000 mM | 203,3 | | | |
| NTP | 75 x | 135,5 | | | |
| DTT | 500 mM | 40,7 | | | |
| Folsäure | 10 mg/ml | 101,7 | | | |
| C0mplete [®] | 50 x | 203,3 | | | |
| HEPES-EDTA | 24x | 372,7 | | | |
| Magnesiumacetat | 1000 mM | 92 | | | |
| Kaliumacetat | 4000 mM | 330,4 | | | |
| PEG8000 | 40 % | 508,3 | | | |
| Natriumazid | 10 % | 50,8 | | | |
| S30-Extrakt | 1 x | | | | 250 |
| Plasmid-DNA | 0,35 mg/ml | | | | 35,6 |
| RiboLock [®] | 40 U/ μ l | | | | 5,4 |
| T7-RNA-Polymerase | 4 mg/ml | | | | 30,6 |
| <i>E. coli</i> -tRNA | 40 mg/ml | | | | 12,5 |
| Pyruvatkinase | 10 mg/ml | | | | 5,7 |
| Mastermix | | | | 3833,0 | 290,0 |

Die im 12-well-plates befindlichen Reaktionskammern wurden mit RM befüllt und etwa 24 h im Wasserbad bei 30 °C geschüttelt. Anschließend wurde der Inhalt der Reaktionskammern entnommen, in 1,5-ml Reaktionsgefäßen 1 h lang auf Eis inkubiert und mit einer Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt.

3.3.4 Magnesium-Screening und Qualitätskontrolle des S30-Extraktes

Es wurde ein analytischer Ansatz durchgeführt und GFP zellfrei hergestellt. Dabei wurden verschiedene Magnesium-Konzentrationen getestet und die Fluoreszenzintensität, welche mit höherer Syntheseeffizienz zunimmt, ermittelt. Diese Messgröße diente zum einen zur Kontrolle der Qualität des S30-Extraktes und zum anderen zur Bestimmung einer optimalen Magnesiumkonzentration für die Herstellungen weiterer Proteine. Die Durchführung erfolgte durch Dr. Lea Petersen oder Bastian Höger.

3.3.5 Detergenzien-Screening zur Herstellung von Membranproteinen

Für die Auswahl eines möglichst optimal stabilisierenden Detergens wurden verschiedene Substanzen im analytischen Maßstab getestet. Um die Qualität des hergestellten Proteins abschätzen zu können, wurde eine C-terminale GFP-Chimäre eingesetzt. Diese Chimäre zeigt ihre Fluoreszenz lediglich dann, wenn das Protein zum einen vollständig translatiert wurde und zum anderen vom Detergens ausreichend lange stabilisiert wird, sodass sich das Fluorophor des GFP ausbilden kann. Die Intensität der Fluoreszenz wurde in einem SDS-Gel bestimmt, welches am Lumi-Imager F1TM bei einer Anregungswellenlänge von 475 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm untersucht wurde.

Die eingesetzten Detergenzien mit den entsprechenden kritischen Mizellenbildungskonzentrationen (CMC) und die im Screening tatsächlich eingesetzten Konzentrationen sind in Tab. 3.5 dargestellt.

Tab. 3.5: Untersuchte Detergenzien zur zellfreien Herstellung von Membranproteinen.

| Detergens | CMC/% | Eingesetzte Konz. / % |
|-----------|--------|-----------------------|
| Brij® 35 | 0,011 | 0,2 |
| Brij® 58 | 0,0086 | 1,5 |
| Brij® 78 | 0,005 | 1,0 |
| Brij® 98 | 0,0029 | 0,2 |
| DDM | 0,0087 | 0,05 |

3.3.6 Präparative Proteinsynthese

Sofern geeignete Bedingungen für die zellfreie Proteinsynthese gefunden wurden, wurde der Maßstab der Produktion auf 1 ml Reaktionsvolumen vergrößert. Die dafür nötigen Lösungen

wurden dafür entsprechend hergestellt. Der *reaction-mix* wurde in eine Slide-A-Lyzer-Dialysekassette und der *feeding-mix* in eine, nach SCHNEIDER, *et al.* ¹⁴³ gebauten, Kammer (FM) überführt. Diese verschlossene Kammer wurde etwa 24 h bei 30 °C in einem Wasserbad inkubiert. Das erhaltene Protein wurde mittels Nickel-Affinitätschromatographie (3.3.7) gereinigt.

Tab. 3.6: Pipettierschema für einen Ansatz in der präparativen Proteinsynthese.

| | | Mastermix | FM | RM |
|----------------------|---------------|------------------|--------|-------|
| Komponente | Stockkonz. | Volumen/ μ l | | |
| S30-Puffer | 1x | | 5950,0 | |
| Brij® 78 | 15 % | 1200 | | |
| RWCMDE | 16,67 | 1080 | | |
| Aminosäuren | 4 mM | 2250 | 2338,0 | |
| Acetylphosphat | 1000 mM | 360 | | |
| Phosphoenolpyruvat | 1000 mM | 360 | | |
| NTP | 75 x | 240 | | |
| DTT | 500 mM | 72,0 | | |
| Folsäure | 10 mg/ml | 180 | | |
| C0mplete® | 50 x | 360 | | |
| HEPES-EDTA | 24x | 660 | | |
| Magnesiumacetat | 1000 mM | 163,8 | | |
| Kaliumacetat | 4000 mM | 585 | | |
| PEG8000 | 40 % | 900 | | |
| Natriumazid | 10 % | 90,0 | | |
| S30-Extrakt | 1 x | | 684,0 | 26,9 |
| Plasmid-DNA | 0,35 mg/ml | | | 350,0 |
| RiboLock® | 40 U/ μ l | | | 75,0 |
| T7-RNA-Polymerase | 4 mg/ml | | | 7,5 |
| <i>E. coli</i> -tRNA | 40 mg/ml | | | 42,9 |
| Pyruvatkinase | 10 mg/ml | | | 8,0 |
| Mastermix | | | 8028,0 | 472,3 |

3.3.7 Nickel-Affinitätschromatographie

Das Protein wurde über den 10x Histidin-*tag* mit Hilfe von Nickel-Nitrilotriessigsäure (NTA)-*beads* gereinigt^{144,145}. Für die Reinigung des analytischen und präparativen Ansatzes wurde eine entsprechende Menge von jeweils 15 µl und 300 µl Nickel-NTA-*beads* verwendet.

Für den analytischen Ansatz wurden zunächst die *beads* drei Mal mit 1 ml Reinigungspuffer gewaschen, dem entsprechenden Protein-Ansatz hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C rotiert. Das Gemisch wurde anschließend auf eine PCR-DNA-Reinigungssäule gegeben, mit dem fünffachen Säulenvolumen an Reinigungspuffer (unter Zusatz von 20 mM Imidazol) gewaschen, anschließend mit dem zehnfachen Säulenvolumen Reinigungspuffer (unter Zusatz von 300 mM Imidazol) 15 min inkubiert und dann eluiert.

Für den präparativen Ansatz wurden die Nickel-NTA-*beads* nahezu gleichbehandelt, lediglich mit einem größeren Volumen von 1 ml Reinigungspuffer gewaschen. Die Elution erfolgte beim präparativen Maßstab schrittweise mit steigender Imidazolkonzentration. Dabei wurden, neben dem Waschschrift die Fraktionen 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM und 500 mM Imidazol in Reinigungspuffer gewonnen. Die Inkubation, während der Elution umfasste bei jedem Schritt etwa 5 min.

Um die Membranproteine weiterhin stabil zu halten, mussten weiterhin Detergenzien eingesetzt werden. Da es potenziell möglich war an diesem Zeitpunkt das Detergens zu wechseln, wurde dementsprechend getestet, welches Detergens sich am besten eignet das Protein während der Reinigung zu solubilisieren.

3.3.8 Proteinkonzentrierung

Um die Proteinlösung auf eine verwendbare Konzentration zu bringen, musste diese meist aufkonzentriert werden. Dies erfolgte durch Zentrifugation bei 7500 *g* bei 4 °C in Amicon Ultra-4 *Centrifugal Filter Devices*, solange bis die benötigte Konzentration erreicht wurde. Sofern nicht anders vermerkt wurde für diese Ultrafiltration ein 100 kDa *cut-off* verwendet.

3.4 Proteoliposome

Um die Funktion der zellfrei hergestellten Proteine zu untersuchen, wurden diese in Proteoliposome eingebracht und über einen Schwellungsassay getestet. Als Negativkontrolle wurden Leerliposomen ohne integriertes Protein verwendet.

3.4.1 Präparation von Proteo- und Leerliposome

Die Herstellung von Proteoliposomen erfolgte nach RINAUD *et al.*¹⁴⁶

Zunächst wurde eine Lipid-Lösung (25 mg polare *E. coli*-Lipidextrakt/1 ml Chloroform) in einem ständigen Stickstoffstrom eingetrocknet. Der entstandene Lipidfilm wurde anschließend etwa 2 h im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde der Film mit 500-1000 µl Liposomenpuffer (mit 2 mM β-Mercaptoethanol) etwa 1 h bei Raumtemperatur rehydratisiert, suspendiert, aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Lipidsuspension wurde langsam auf Eis aufgetaut und 90 min bei Raumtemperatur Ultraschall sonifiziert. Anschließend wurden die Liposomen mit 100 µg Protein versetzt, die Negativkontrolle mit der entsprechenden gleichbehandelten Menge Liposomen-Puffer, auf ein Volumen von 1 ml mit Reinigungspuffer ergänzt und 30 min auf Eis inkubiert. Um verbliebenes Detergens zu eliminieren, wurden die Liposomen in 20 ml Liposomenpuffer verdünnt und nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur bei 140 000 *g* für 45 min bei 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 1 ml Liposomen-Puffer aufgenommen und durch eine Membran mit 200 nm Porengröße extrudiert.

3.4.2 Vermessung von Liposomen

Um indirekt die Substrataufnahme in die Liposomen zu untersuchen, wurde der osmotisch bedingte Wassereinstrom durch eine 90°-Streulichtänderung gemessen.⁶⁸

Um dies zu erreichen, wurden die Proteo- und Leerliposomen, bei 20 °C, mit dem gleichen Volumen von 75 µl Gradientenlösung mit dem zu untersuchenden Substrat bei einer Flussrate von 14 ml/s gemischt. Der Mischprozess war nach 1,6 ms abgeschlossen und wurde über die nachfolgenden 80 s bei einer Wellenlänge von 524 nm (100 W Xe/Hg-Lampe) über einen 400x Verstärker beobachtet.

Eine resultierende Kurve entstand durch die Mittelung und Normierung von bis zu 9 Kurven. Die Normierung erfolgte durch eine Verschiebung der initialen Streulichtintensität zu Beginn der Messung auf 0 Volt und einer Streckung der Kurve für das Maximum auf 1,0 Volt. Eine Transportfähigkeit wurde durch ein Absinken der Kurve angezeigt. Liegt kein Transport des Substrats vor, sinkt die Kurve nicht und bleibt auf 1,0 Volt.

3.5 Aufnahme-Assay mit ^{14}C -markierten Substraten

3.5.1 Prinzip

Eine direkte Vermessung der Aufnahme von Monocarboxylaten durch *S. cerevisiae* wird durch ^{14}C -markierte Substrate ermöglicht. Der β -Strahler ^{14}C ist durch seine lange Halbwertszeit von 5730 Jahren und seine geringe Strahlungsaktivität von 0,157 MeV^{147,148} ein leicht zu handhabendes Isotop, welches die Eigenschaften der markierten Substrate nicht nennenswert verändert.¹⁴⁹ Für die Experimente wird eine Substratlösung verwendet, welche ein Gemisch aus nicht-markierten und radioaktiv markiertem Substrat enthält. Wenn nun ein Transporter für das entsprechende Monocarboxylat vorhanden ist, nimmt *S. cerevisiae* gleichermaßen nicht-markiertes und ^{14}C -markiertes Substrat auf. Nachdem die Aufnahme gestoppt wird, wird die Hefe in einen Szintillationscocktail gegeben. Die emittierte β -Strahlung regt nun Szintillationsmoleküle (eine Mischung aus p-Ethoxynonylphenol und Diisopropyl-naphthalin) an, welche daraufhin Licht emittieren, was nach Verstärkung in einem *Photomultiplier* detektiert wird. Dies stellt die ursprünglichen Aktivität der Transportproteine in den Hefen dar. Ist nun ein Inhibitor anwesend, wird der Transporter blockiert und *S. cerevisiae* kann kein bzw. nur noch eingeschränkt Substrat aufnehmen, wodurch analog weniger Strahlung detektiert werden kann. Durch die Untersuchung verschiedener Inhibitorkonzentrationen kann anhand der entsprechenden Restaktivität eine sigmoidale Hemmkurve erstellt und ein IC_{50} -Wert bestimmt werden. Das Prinzip wird graphisch in Abb. 3.1 gezeigt.

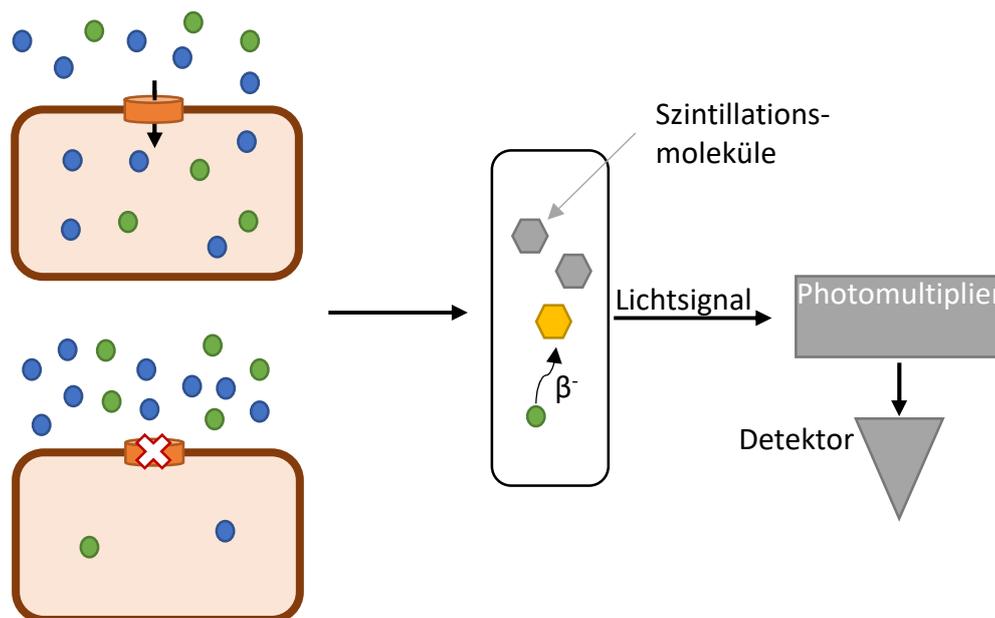


Abb. 3.1: Schematisches Prinzip der gemessenen Substrataufnahme in *S. cerevisiae*. Die Hefe wird einem Gradienten von 1 mM radioaktiv markiertem Substrat ausgesetzt. Das von *S. cerevisiae* exprimierte

Transmembranprotein ist in der Lage das Substrat aufzunehmen oder wird durch einen Inhibitor daran gehindert. Die Hefe wird in eine Szintillationsflüssigkeit gegeben und darin über 24 h aufgelöst. Anschließend werden die von den angeregten Szintillationsmolekülen ausgehenden Lichtblitze detektiert und als Signal ausgegeben.

3.5.2 Zeitabhängige Substrataufnahme

Die Durchführung erfolgte nach Wu *et al.* ⁴:

Es wurde zunächst eine einzelne *S. cerevisiae* Kolonie von einer SD-AHLW-Selektionsplatte in 5 ml SD-AHLW-Flüssigmedium überführt und über etwa 24 h bei 29 °C und 220 U/min inkubiert. Daraufhin wurden mit 100 µl der ersten Vorkultur eine zweite 5 ml-Vorkultur angesetzt. Mit Hilfe dieser zweiten Vorkultur wurde eine Hauptkultur, mit ausreichend großem Volumen, angeimpft. Dabei wurde ein Erlenmeyerkolben verwendet, der mindestens das 5-fache des Kulturvolumens fasst. Diese Hauptkultur inkubierte bei 29 °C und 220 U/min bis zu einer OD₆₀₀ von $1 \pm 0,1$. Die gewachsene Kultur wurde bei 4000 g 5 min zentrifugiert und mit 50 ml Wasser gewaschen. Das Zellpellet wurde bis zur weiteren Verwendung maximal 5 h auf Eis gelagert. Kurz vor der Messung wurden die Zellen mit einem Messpuffer (wenn nicht anders angegeben bei pH 6,8) suspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 50 ± 5 eingestellt.

Von dieser Suspension wurden pro Zeitpunkt jeweils 3 mal 80 µl in ein 1,5 ml Reagiergefäß gegeben und etwa 10-15 min bei Raumtemperatur aufgewärmt. Die Hefesuspension wurde mit 20 µl Substratlösung bis zum zu testenden Zeitpunkt inkubiert und der Transport anschließend mit 1 ml kaltem Wasser abgestoppt. Dieser Ansatz wurde auf einen in einem Vakuumtrichter befindlichen Glasmikrofaser-Filter gegeben und mit 7 ml kaltem Wasser gewaschen. Anschließend wurde der Filter in ein Szintillationsvial mit 3 ml Szintillationscocktail gegeben, über Nacht inkubiert und anschließend vermessen.

3.5.3 IC₅₀-Bestimmung in *S. cerevisiae*

In ein 1,5 ml Reagiergefäß wurde mittels einer Präzisionswaage eine entsprechende Menge des Inhibitors eingewogen und mit dem nötigen Volumen DMSO versetzt, sodass die benötigte Konzentration resultierte (meist 80 mM oder 8 mM bei geringerer Löslichkeit). Von dieser Ausgangslösung wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, die entsprechende Konzentrationen zur Abbildung einer sigmoidalen Kurve enthielt. Hierbei wurden aufgrund der späteren Verdünnung die 80-fachen Konzentrationen eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Von den Inhibitorlösungen wurden je Konzentration dreimal 1 µl in ein 1,5 ml Reagiergefäß vorgelegt. Kontrollen mit 1 µl DMSO wurden zu Beginn und zum Ende einer Testreihe platziert. Die Reagiergefäße wurden mit 80 µl Hefesuspension versetzt, sodass die zu testende

Inhibitorkonzentration und ein DMSO-Gehalt von 1,25 % entstand. Nach einer Inkubation von 10-15 min wurden 20 µl Substratlösung zur Hefesuspension gegeben und die Aufnahme nach einer entsprechenden transporterabhängigen Zeit mit 1 ml kaltem Wasser gestoppt. Anschließend wurde die Probe analog zur Methode 3.5.2 behandelt.

3.6 Kultur von *P. falciparum*

Alle Experimente mit Plasmodien wurden am Bernhard-Nocht-Institut von Bärbel Bergmann unter der Leitung von Dr. Tobias Spielmann durchgeführt.

3.6.1 IC₅₀-Bestimmung in *P. falciparum*

Die *P. falciparum* Parasiten (Stamm 3D7) wurden nach Trager und Jensen¹⁵⁰ in 5 % Erythrozyten (0+) in RPMI 1640 Medium und 0,5 % Albumax kultiviert. Zu jeweils 2 ml der Parasitenkultur wurde die entsprechende Inhibitorkonzentration oder DMSO-Kontrolle hinzugegeben und nach 24 h Inkubationszeit frisches Medium mit Inhibitor zugesetzt. Nach Ablauf weiterer 24 h wurde die Parasitämie in den Kulturen mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie bestimmt. Anhand dessen wurde die Viabilität in Referenz zur DMSO-Kontrolle berechnet und in Abhängigkeit zur entsprechenden Inhibitorkonzentration gesetzt.

3.6.2 Generierung von Resistenzen

Zunächst wurden 50 ml-Kulturen der *P. falciparum* Parasiten (Stamm 3D7) einer dreifachen EC₅₀-Konzentration des zu untersuchenden Inhibitors ausgesetzt. Täglich wurde frisches Medium mit entsprechendem Inhibitor zugesetzt. Nachdem keine Parasiten mehr nachweisbar waren, wurde das Medium alle 48 h gewechselt. Nach bis zu zwei Wochen wachsen erneut Parasiten, die resistent gegen den verwendeten Inhibitor waren. Gemäß dem Fall, dass keine Parasiten erneut nachweisbar wurden, konnte darauf geschlossen werden, dass die G107S-Resistenzmutante erfolgreich umgangen wurde.

3.7 Inhibitor-Synthese

Alle Synthesen wurden von Björn Henke am Pharmazeutischen Institut in Kiel durchgeführt. Sofern unter Abschnitt 6 nicht anders angegeben, erfolgte die Synthese nach einer Claisen-Kondenstation¹⁵¹:

Es wurden 42,8 mmol Lithiumhydrid in 7,5 ml Tetrahydrofuran (abs.) vorgelegt und unter Rühren zum Sieden erhitzt. Dieser Suspension wurden 15,0 mmol des Carbonsäureesters und 12,5 mmol der CH-aziden Komponente in 5,0 ml Tetrahydrofuran (abs.) zugetropft und das entstandene Gemisch 3 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösemittel wurde vom Reaktionsansatz getrennt, der Rückstand mit 60 ml kaltem Eisessig und Wasser (7:50) versetzt und zweimal mit jeweils 100 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösemittel befreit. Das so erhaltene Produkt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Fließmittelgemisch aus Cyclohexan und Essigsäureethylester (9:1) gereinigt. Zusätzlich wurde das Produkt durch eine Sublimation weiter aufgereinigt.

3.8 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Alle Untersuchungen wurden mit einer Waters 717 plus Autosampler durchgeführt, die Detektion erfolgte mit einem *486 tunable absorbance detector* und die Auswertung über die Breeze-Software. Die Aufnahme erfolgte in Zusammenarbeit mit Susan Häuer.

3.8.1 logP-Bestimmung

Diese Methode wurde nach der OECD-Guideline OPPTS 830.75.70 durchgeführt. Zunächst wurde eine Stammlösung verschiedener Standards mit bekanntem logP-Wert in Methanol hergestellt. Die Konzentration dieser Standardsubstanzen sollte etwa 2 mg/ml darstellen. Aus jeder Stammlösung wurden jeweils 15 µl mit 300 µl Methanol und 95 µl methanolischer Probenlösung gemischt und in die HPLC injiziert. Die Retentionszeiten der Standardreihe wurden gegen die entsprechenden logP-Werte aufgetragen. Über ein polynomisches Fitting und die Retentionszeit der Probe konnte ein logP-Wert ermittelt werden.

Tab. 3.7: Verwendete Standardreihe für die logP Bestimmung nach OECD.

| Standardsubstanz | logP-Wert |
|-------------------------|-----------|
| 4-Acetylpyridin | 0,5 |
| Acetanilid | 1 |
| Acetophenon | 1,7 |
| Benzoessäuremethylester | 2,1 |
| Ethylbenzoat | 2,6 |
| Benzophenon | 3,2 |
| Benzoessäurephenylester | 3,6 |

Folgende Parameter wurden bei der HPLC verwendet:

| | |
|------------------------|---|
| Stationäre Phase: | Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8 (4,6x150 mm, 5 µm) |
| Mobile Phase: | Eluent A: 20 mM Ammoniumformiat-Puffer (aq.) pH 8,5 Eluent B: Methanol |
| Injektionsvolumen: | 20 µl |
| Detektionswellenlänge: | 220 nm |

Folgender Gradient wurde bei einer Flussrate von 0,8 ml/min verwendet:

| Zeit / min | A% | B% |
|------------|-----|-----|
| 0 | 100 | 0 |
| 30 | 0 | 100 |
| 32 | 100 | 0 |
| 40 | 100 | 0 |

3.8.2 Stabilitätsmessung

Um eine zu untersuchende Probenlösung herzustellen, wurde zunächst eine Stammlösung angesetzt. Die jeweilige Einwaage wurde zunächst mit 500 µl Methanol angerieben und mit 9,5 ml PBS-Puffer versetzt. Aus diesen Stammlösungen wurden drei Untersuchungslösungen

mit einer Konzentration von je 50 μ M hergestellt. Wenige Tage zeitversetzt wurde ein zweiter Ansatz analog hergestellt und täglich vermessen.

Für jede Probensubstanz wurde vor Beginn der Zerfallsmessung eine Kalibriergerade erstellt, welche fünf Konzentrationen über den zu erwartenden Bereich abdeckt. Zur Ermittlung der optimalen Wellenlänge wurde ein UV-Vis-Spektrum aufgenommen und die maximale Absorption gewählt. Die drei bis sechs Untersuchungslösungen wurden pro Tag jeweils zweimal vermessen. Dabei wurde folgender Gradient bei einer Flussrate von 1,3 ml/min verwendet:

| Zeit / min | A% | B% |
|------------|----|-----|
| 0 | 48 | 52 |
| 1 | 48 | 52 |
| 7 | 0 | 100 |
| 9 | 48 | 52 |
| 17 | 48 | 52 |

3.9 Statistische Auswertung

Sofern nicht anders angegeben resultieren alle IC₅₀-Kurven dieser Arbeit aus dem Hefesystem. Die Datenpunkte eines Experimentes wurden mit einer Dreifachbestimmung ermittelt. Dabei wurde der IC₅₀-Wert in drei unabhängigen Versuchen bestätigt, sodass um diesen Wert herum mindestens 6-9 technische Replikate vermessen wurden. Die DMSO-Kontrollen wurden aufgrund der vielen Einflussfaktoren und der Rolle als Bezugspunkt bei jedem Versuch durchgeführt. Hierfür wurden jeweils drei Proben zu Beginn und gegebenenfalls zum Ende einer Messreihe verwendet. Der Hintergrund wurde aufgrund geringer Schwankungen lediglich bei drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Die Inhibitorkonzentrationen wurden so gewählt, dass sowohl die vollständige als auch ausbleibende Inhibition umfasst wurden. Die Aktivität der Proben wurde prozentual auf die DMSO-Kontrolle bezogen und normalisiert, sodass eine komplette Inhibition 0 % Aktivität darstellen und die geringste Inhibitorkonzentration 100 %. Eventuell negative Werte wurden ebenso als 0 % angenommen. Zur Auswertung wurde GraphPad Prism 9.1. verwendet. Die sigmoidalen Kurven wurden mittels der Hill-Gleichung mit variabler Steigung gefittet und die IC₅₀-Werte und deren

Standardabweichung anhand dessen berechnet. Die Fehlerbalken der Graphen geben den Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) an.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung von hMCT11 in *S. cerevisiae*

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Expression von hMCT11 in *S. cerevisiae* dargestellt. Zunächst sollte die Expression von hMCT11 durch einen Western Blot direkt nachgewiesen werden. Anschließend wurden Transportstudien mit ¹⁴C-markiertem L-Lactat durchgeführt, die die Grundlage weiterer Versuche darstellen sollten. Der verwendete Hefestamm W303-1A ist aufgrund von Gen-*knockouts* für die endogenen Transporter *jen1* und *ady2* nicht in der Lage kurzkettenige Monocarboxylate aufzunehmen.^{4,152–154} Wird in der Hefe jedoch heterolog ein Transportprotein exprimiert, erhält sie die Fähigkeit zurück und der Transport kann über ¹⁴C-markierte Substrate nachgewiesen werden.

Die in den Experimenten getesteten Konstrukte waren der hMCT11-Wildtyp, codonoptimiertes hMCT11, eine hMCT11 P2D-Mutante und verschiedene Basigin-Chimären. Für die Chimären wurde hMCT11 am N-Terminus mit Basigin verknüpft. Dabei wurde zum einen eine Variante mit komplettem Basigin verwendet. Zusätzlich wurden folgende zwei Verkürzungen untersucht: hMCT11 BsgΔ220, was eine Immunglobulin-Domäne weniger aufwies (eine splice Variante, die physiologisch relevant ist) und hMCT11 BsgΔ301, welches nur die Transmembrandomäne von Basigin hatte.⁵⁷ Der Vorteil der Verwendung von Basigin-Chimären gegenüber einer Coexpression ist das korrekte stöchiometrische Verhältnis zwischen hMCT11 und Chaperon. Und die räumliche Nähe der beiden Proteine ist zu jeder Zeit sichergestellt. Zum Vergleich wurde auch hMCT1 exprimiert, das bereits funktional in der Hefe untersucht wurde.^{57,155}

4.1.1 Expression von hMCT11 in *S. cerevisiae*

Zunächst sollten die verschiedenen hMCT11-Konstrukte in *S. cerevisiae* exprimiert werden. Die transformierten Hefen wurde aufgeschlossen (3.2.1) und die Expression der Proteine durch einen Western Blot nachgewiesen.

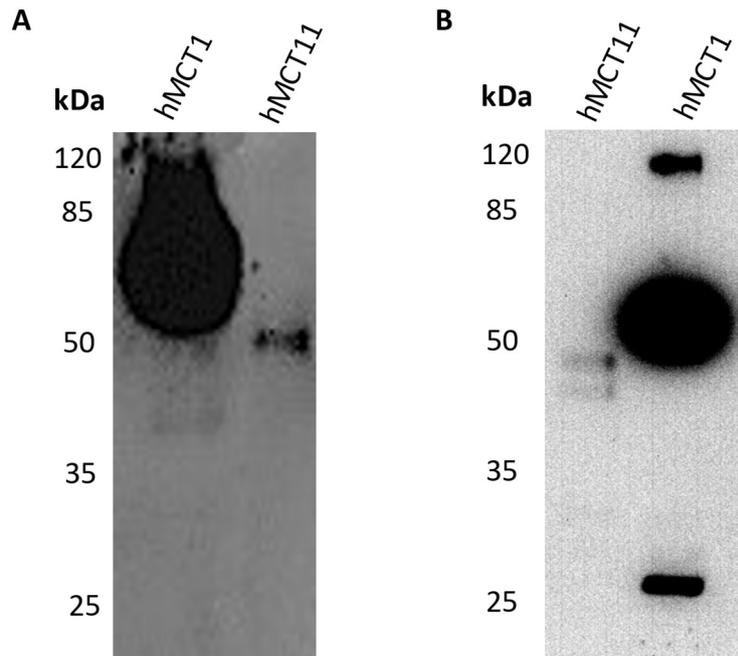


Abb. 4.1: Expressionsanalyse von hMCT11 und hMCT1 mittels Western Blot. A) Western Blot von hMCT11 und hMCT1. Die Expression von hMCT11 konnte durch eine Bande bei 50 kDa nachgewiesen werden. Im Vergleich zur funktionalen Referenz hMCT1 wurde jedoch deutlich weniger Protein exprimiert. Verwendet wurde ein Anti-HA-Antikörper. B) Western Blot von codonoptimiertem hMCT11 und hMCT1. Die Expression von codonoptimiertem hMCT11 konnte ebenfalls nachgewiesen werden, eine Steigerung der Expression konnte jedoch nicht gezeigt werden. Als Primärantikörper wurde ein Anti-His₆-Antikörper verwendet.

In Abb. 4.1 ist zu erkennen, dass sowohl der hMCT11-Wildtyp als auch der codonoptimierte hMCT11 in *S. cerevisiae* exprimiert wurden. Im Vergleich zu hMCT1 war die Expression jedoch deutlich geringer. Aufgrund der sehr geringen Expression von hMCT11 konnten Unterschiede zwischen den verschiedenen Konstrukten nicht dargestellt werden.

4.1.2 Funktionsdaten von hMCT11 in *S. cerevisiae*

Trotz der geringen Expression wurde die Transportaktivität von hMCT11 untersucht. Zunächst wurde hierfür eine Auswahl fünf verschiedener Monocarboxylate getestet. Dies war zum einen L-Lactat, welches im Rahmen dieser Arbeit eine zentrale Rolle einnahm, sowie Pyruvat, welches bereits als Substrat für hMCT11 postuliert wurde. Des Weiteren wurden Acetat, Formiat und Malonat getestet. Die verschiedenen Substrate wurden jeweils mit einer Konzentration von 1 mM bei einem pH-Wert von 6,8 für 10 min mit der Hefe inkubiert. Wie in Abb. 4.2.A erkennbar, war die Aufnahme der Hefe für alle Substrate auf dem Niveau des Hintergrunds. Bei Acetat muss die erhöhte Membrangängigkeit bei pH 6,8 beachtet werden. So lag die Aufnahme durch die Hefe zwar bei 0,09 nmol/mg, der Hintergrund jedoch bei 0,10 nmol/mg. Die beiden Substrate L-Lactat und Pyruvat lagen im Fokus und wurden daher

mit drei biologischen Replikaten mehrfach vermessen. Aufgrund der bereits vorliegenden negativen Ergebnisse und zur Verminderung des Verbrauches von Radionukleotiden, wurden Formiat, Acetat und Malonat lediglich einmal getestet. Aufgrund der negativen Ergebnisse für die verschiedenen Substrate, wurde sich im weiteren Verlauf der Arbeit auf L-Lactat konzentriert.

Wie bereits in Kap. 1.2.2 beschrieben, gibt es Anzeichen, dass die Transportaktivität von hMCT11 durch Basigin vermittelt wird. Um den möglichen Einfluss fehlenden Basigins auf die vorangegangenen Experimente zu untersuchen, wurde Basigin als Hilfsprotein hinzugefügt. Da Basigin nicht von *S.cerevisiae* exprimiert wird,¹⁵⁶ wurden verschiedene Basigin-Chimären verwendet. Diese wurden von Dr. Anna-Lena Köpnick bereits für hMCT1 hergestellt und waren im Hefesystem aktiv.⁵⁷ Für hMCT11 zeigte die vollständige Basigin-Chimäre eine Aufnahme von 0,012 nmol/mg bei einem pH-Wert von 6,8 und 10 min Substratinkubation. Die gleichen Bedingungen führten bei hMCT11 BsgΔ220 und hMCT_BsgΔ301 zu einer Aufnahme von 0,013 nmol/mg, bei einem Hintergrund von 0,013 nmol/mg (Abb. 4.2 B). Die Fusionsproteine konnten somit weder im Western Blot nachgewiesen werden, noch war eine Funktion feststellbar.

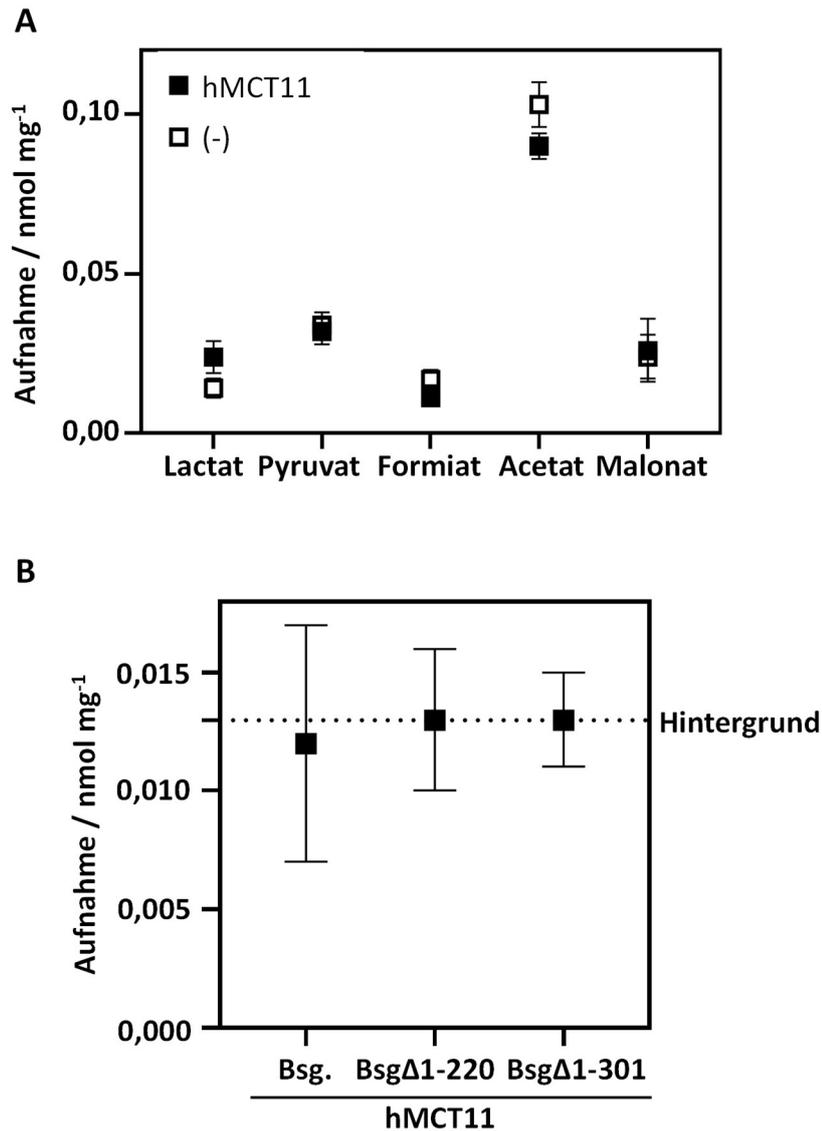


Abb. 4.2: Aufnahme ¹⁴C-markierter Substrate durch hMCT11. A) hMCT11 wurde in *S. cerevisiae* exprimiert und mit verschiedenen ¹⁴C-markierten Substraten (Lactat und Pyruvat N = 3; Formiat, Acetat und Malonat N = 1) 10 min bei einem pH von 6,8 inkubiert. Für keines der getesteten Substrate konnte eine Aufnahme in die Hefe nachgewiesen werden. B) Die hMCT11-Basigin-Chimären wurden für 10 min bei einem pH-Wert von 6,8 mit ¹⁴C-markiertem-L-Lactat inkubiert (N = 2). Für keine der Chimären konnte eine Aufnahme des Lactats gezeigt werden. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar.

Aufgrund der näheren Verwandtschaft der MCT-Familie mit natriumabhängigen Transportern,⁴⁴ wurden die Transportuntersuchungen ebenso mit einem natriumhaltigen Puffer durchgeführt. Weiterhin soll hMCT11 Substrate protonenabhängig transportieren, sodass eine Zunahme der Aktivität bei sinkendem pH-Wert zu erwarten wäre. Die Hefe wurde dabei in einem entsprechenden Substratpuffer mit einem pH-Wert von 4,8 jeweils 4 und 10 min inkubiert. In Abb. 4.3.A wird gezeigt, dass hMCT11 bei pH 4,8 während 4 min 0,019 nmol/mg aufgenommen hat und bei 10 min 0,021 nmol/min erreicht wurden. Somit

liegen die Aufnahmen auf Hintergrund-Niveau mit 0,013 nmol/mg bei 4 min und 0,025 nmol/mg bei 10 min.

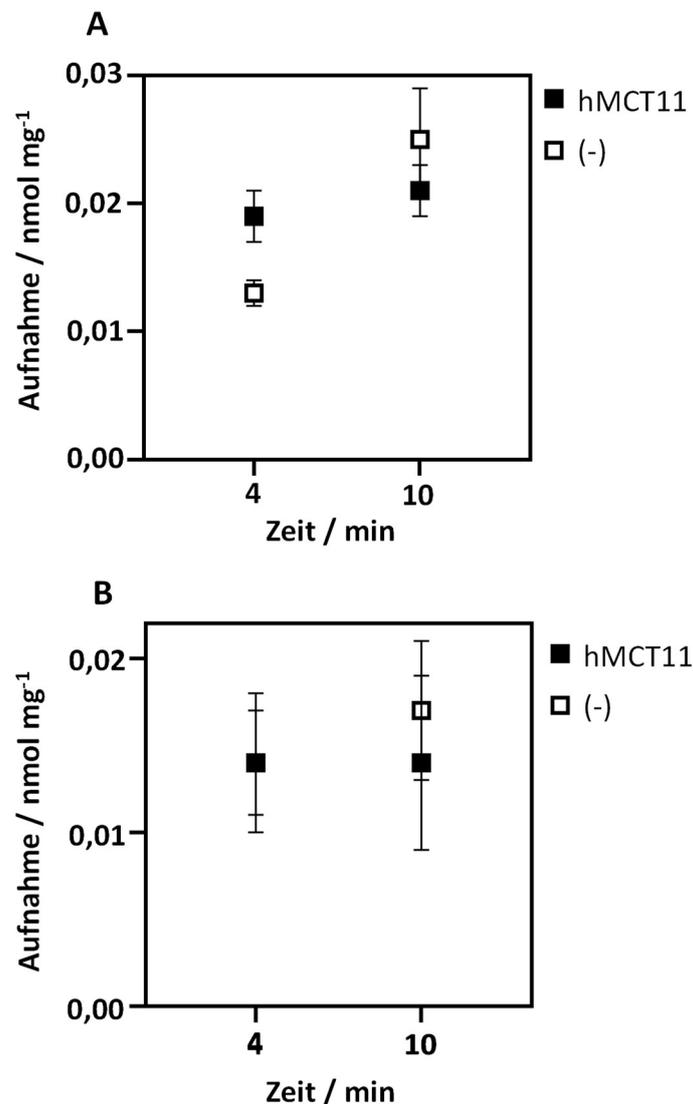


Abb. 4.3: Untersuchung der Lactataufnahme unter veränderten Aufnahmebedingungen. A) *S. cerevisiae* wurde 4 und 10 min bei einem pH-Wert von 4,8 mit ¹⁴C-markiertem L-Lactat inkubiert (N = 2). Dabei konnte keine Veränderung der Transportfähigkeit gegenüber des Hintergrunds gezeigt werden. B) Die Natriumabhängigkeit wurde durch die Zugabe von 1 mM Natriumchlorid untersucht (N = 2). Hierbei wurde keine Veränderung des Transports gegenüber des Hintergrunds festgestellt. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar.

Eine erhöhte Natriumkonzentration wurde durch Zugabe von 1 mM Natriumchlorid erreicht. In Abb. 4.3.B wird gezeigt, dass die Aufnahme von L-Lactat bei 4 min 0,014 nmol/mg betrug, was dem Hintergrund entsprach. Nach 10 min hat hMCT11 0,017 nmol/mg Lactat aufgenommen, bei gleichbleibendem Hintergrund von 0,014 nmol/mg. Somit ließen sich bei den veränderten Bedingungen keine Transportaktivität über Hintergrund-Niveau feststellen.

Menschliche Proteine haben häufig ein für Hefen ungünstiges Codonmuster. Wenn eine größere Anzahl an Codonsequenzen selten im Hefegenom zu finden sind, kann es zum Abbruch der Proteinsynthese kommen. Die codonoptimierte Variante zeigte eine sehr geringe Expression (Abb. 4.1). Die L-Lactat-Aufnahme (Abb. 4.4.A) betrug während einer Substratinkubation von 4 min, bei einem pH-Wert von 6,8 0,011 nmol/mg, während die Hintergrundaufnahme bei 0,016 mg/min lag. Ebenso wenig konnte ein erhöhter Transport bei 10 min festgestellt werden. Für hMCT11 wurden 0,014 nmol/mg und der Hintergrund lag bei 0,012 nmol/mg.

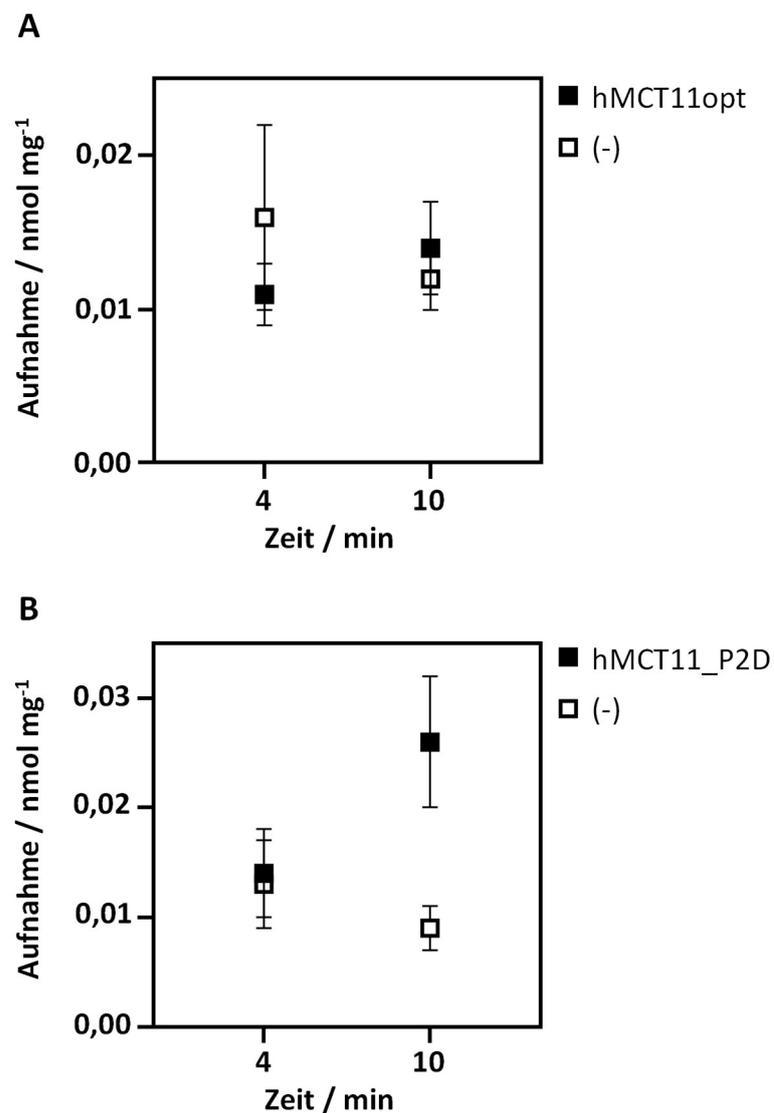


Abb. 4.4: Untersuchung der Transportaktivität von hMCT11 mit optimierten Strukturen. A) Eine codonoptimierte Variante des hMCT11 wurde für 4 und 10 min bei pH 6,8 mit ¹⁴C-markiertem L-Lactat inkubiert, diese zeigte dabei keine Aufnahme des Substrates. N = 3. B) Die Messung von hMCT11 P2D, welche nach Idee von Rusu et al.⁶¹, die Degradierung von hMCT11 verhindern sollte, zeigte bei pH 6,8 keine erhöhte Transportfähigkeit von ¹⁴C-markiertem L-Lactat. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar. N = 3.

Die bioinformatischen Untersuchung von Rusu *et al.*⁶¹ zeigten, dass hMCT11 stark vom Proteasom menschlicher Zellen kontrolliert und abgebaut wird. Dieser Abbau wird vom zweiten Prolin der Sequenz kontrolliert und eine Mutation zu einer Asparaginsäure führte zu einer massiven Erhöhung des Proteingehaltes. Dies wurde auf die Hefe übertragen, um auszuschließen, dass diese Sequenz auch bei der Hefe zu einer Ubiquitylierung und damit zu einem Abbau des Proteins führt. Für diese Modifikation wurde bei pH 6,8 nach 4 min eine L-Lactat-Aufnahme von 0,014 nmol/mg ermittelt, bei einem Hintergrund von 0,013 nmol/mg. Und nach 10-minütiger Inkubationszeit zu 0,026 nmol/mg, bei einem Hintergrund von 0,009 nmol/mg (Abb. 4.4.B). Folglich zeigten auch die strukturellen Modifikationen von hMCT11 keine Aufnahme, die über den Hintergrund steigt.

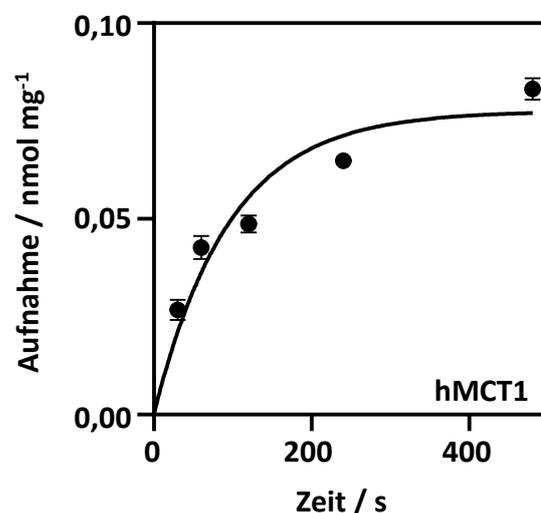


Abb. 4.5: Aufnahmekurve von hMCT1 in *S. cerevisiae*. Die abgebildete Aufnahmekurve zeigt die ¹⁴C-markierte L-Lactat Aufnahme bei pH 6,8 durch hMCT1. Das Plateau lag bei 0,08 nmol/mg Hefe und die Rate 0,049 nmol/mg min. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar. N = 3

Um zu zeigen, dass die Vermessung von Monocarboxylat-Transportern mit diesem Aufnahme-Assay möglich ist und, um eine Grundlage für spätere Tests an hMCT1 zu schaffen, wurde eine Aufnahmekurve von hMCT1 bei pH 6,8 für ¹⁴C-markiertes L-Lactat aufgenommen (Abb. 4.5). Das verwendete Konstrukt lag bereits von Dr. Anna-Lena Köpnick vor.⁵⁷ Die Aufnahmekurve von hMCT1 erreichte ein Plateau bei 0,08 nmol/mg Hefe. Dieses Plateau wurde mit einer Rate von 0,049 nmol/mg min erreicht.

4.2 Zellfreie Synthese von hMCT11

Um zelluläre Einflüsse der Hefe auszuschließen, die zu einem Abbau von hMCT11 führen oder die korrekte Lokalisation in der Zellmembran verhindern, wurde hMCT11 zellfrei hergestellt und untersucht.

4.2.1 Detergenzscreening zur zellfreien Proteinsynthese

Membranproteine müssen aufgrund ihrer Struktur in wässrigen Lösungen zusätzlich mit Detergenzien stabilisiert werden. Um geeignete Detergenzien zu finden, wurde zunächst ein Fusionsprotein von hMCT11 und GFP konstruiert. Dieses wurde in einem analytischen Ansatz (vgl. Kap. 3.3.3) für ein Screening potenziell verwendbarer Detergenzien verwendet. Zunächst wurden empirisch vielversprechende Detergenzien getestet, wie Polyalkylenglykolether verschiedener Größe (Brij® 35, 58, 78, 98) und Dodecyl- β -D-maltosid (DDM). Der Erfolg der Proteinsynthese wurde mittels Fluoreszenzuntersuchungen und Western Blot überprüft (Abb. 4.6). Bei Brij® 35 waren im Western Blot diverse Banden unterschiedlicher Höhe und ein starkes Hintergrundsignal erkennbar. Bei Brij® 78 zeigt sich eine deutliche Doppelbande auf der Höhe von 75 kDa, bei schwächerem Hintergrund-Signal. Brij® 98 wies eine leichte Bande bei 75 kDa auf. Brij® 58 und DDM zeigten hingegen keine Banden. Somit konnte hMCT11 lediglich mit Brij® 35 und 78 im Western Blot nachgewiesen werden. Weiterhin war die Fluoreszenz des GFP, welche nur bei ausreichend langer Stabilisierung erkennbar wird, lediglich bei Brij® 78 feststellbar. Zusätzlich zeigte sich im Western Blot eine klare Doppelbande. Die untere Bande entsprach der fluoreszierenden Bande im SDS-Gel und somit einer stabilisierten Konformation. Die obere Bande hingegen hat eine andere Faltung - erkennbar an der unterschiedlichen Laufhöhe- welche dem GFP nicht erlaubt, das Fluorophor auszubilden und damit wahrscheinlich nicht ausreichend vom Detergens stabilisiert wurde. Bei der Proteinsynthese mit Brij® 35 zeigten sich zum einen deutlich mehr Fragmente und zum anderen war im SDS-Gel keine Fluoreszenz detektierbar. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde im weiteren Verlauf hMCT11 ausschließlich mit Brij® 78 synthetisiert.

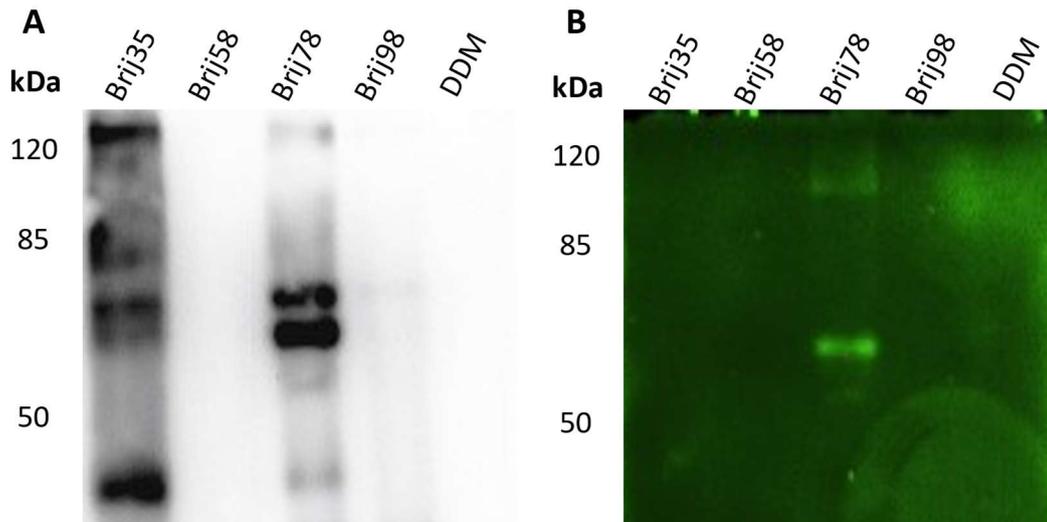


Abb. 4.6: Detergenzienscreening mit hMCT11-GFP-Chimäre. A) Ein Western Blot von zellfrei hergestelltem hMCT11 mit unterschiedlichen Detergenzien. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-His₆-Antikörper (Verdünnung: 1:5000 in MTBST). B) Ein Polyacrylamidgel wurde bei 475 nm angeregt und mit der Emissionswellenlänge 530 nm auf die Präsenz von GFP untersucht.

4.2.2 Präparative Proteinsynthese von zellfreien hMCT11

Aufgrund der benötigten Menge an Protein für weiterführende Experimente, sollte die Produktion von hMCT11 erhöht werden. Mit dem stabilisierenden Detergens Brij[®] 78 wurde dementsprechend ein präparativer Ansatz, also eine zellfreie Proteinsynthese mit 1 ml Reaktionsvolumen, durchgeführt. Hiermit sollte zum einen nachgewiesen werden, dass die Synthese von hMCT11 auch im großen Maßstab funktioniert, zum anderen konnte dabei auch die Effizienz der Synthese überprüft werden. Die Proteinsynthese und Reinigung erfolgten wie in Kap. 3.3.6 beschrieben. In Abb. 4.7 ist eine deutliche Bande bei 50 kDa im Western Blot in den 80 und 100 mM Imidazol-Fractionen erkennbar. Anhand der Bandenintensität und dem passenden Molekulargewicht, konnte davon ausgegangen werden, dass hMCT11 vollständig und in ausreichender Menge produziert wurde. Für den Durchfluss der Reinigung war keine Bande im Western Blot erkennbar. Im SDS-PAGE-Gel hingegen waren diverse Banden mit unterschiedlichen Laufhöhen vorhanden, die stärkste Intensität zeigten dabei Banden auf 50 kDa und 85 kDa. Ebenso wurde ersichtlich, dass die erste Reinigungsfraktion mit 20 mM Imidazol, welche dazu diente schwach und unspezifisch gebundene Proteinaggregate zu entfernen, nur eine sehr schwache Bande bei 50 kDa im Western Blot zeigte. Die größte Proteinmenge zeigt sich in der 80 mM Imidazol Fraktion, welche allerdings im Coomassie gefärbten Gel viele zusätzliche Banden oberhalb von 50 kDa aufwies. Nachfolgende Imidazol-

Fraktionen zeigten, wie zu erwarten schwächer werdende Western Blot Banden. Jedoch sank auch die Anzahl und Intensität der zusätzlichen Banden im Coomassie Gel. Letztlich ist noch feststellbar, dass keine Banden in der Nickel-NTA-*beads* Fraktion vorhanden waren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hMCT11 mit Brij® 78 vollständig produziert und während der Nickelaffinitätschromatographie gut eluiert wurde, aber ausreichend stark an den Nickel-NTA-*beads* gebunden wurde, um eine adäquate Reinigung durchführen zu können.

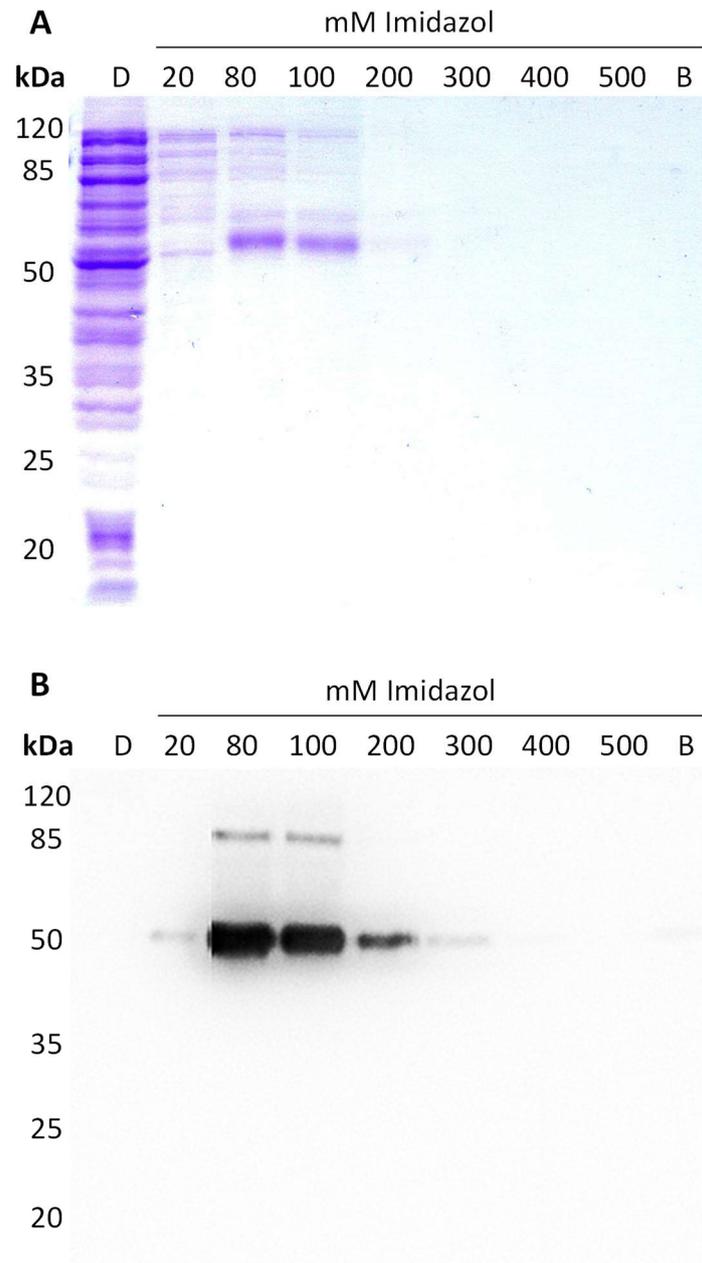


Abb. 4.7: Präparativer Ansatz von zellfrei hergestelltem hMCT11. A) SDS-Polyacrylamidgel mit Coomassie Färbung. B) Western Blot mit 20 µl der entsprechenden Reinigungsfraction. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-His₆-Antikörper (Verdünnung: 1:5000 in MTBST). D: Durchfluss; B: Ni-NTA-beads; Reinigung mit Brij[®] 78.

4.2.3 Detergenzien zur optimalen Reinigung

Da während der Proteinreinigung ein Detergenzien Wechsel möglich ist, wurde an dieser Stelle untersucht, ob sich weitere Detergenzien zur Reinigung von hMCT11 eignen. Je nach Art des durchgeführten Experiments eignen sich bestimmte Detergenzien besser als andere. Die Durchführung erfolgte wie in Kap. 3.3.7 beschrieben. Für eine effiziente Affinitätsreinigung muss das gewünschte Protein zunächst an den Nickel-NTA-*beads* binden, sodass es nicht

vollständig im Durchfluss verloren geht. Weiterhin sollte das Protein erst bei höheren Imidazol Konzentrationen eluieren, sodass unspezifische und schwach gebundene Verunreinigungen leichter entfernbar sind. Letztlich darf das Protein nicht an den Nickel-NTA-*beads* gebunden bleiben, denn für eine weitere Verarbeitung wird das ungebundene Protein benötigt.

In Abb. 4.8 sind die Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gele der unterschiedlichen Reinigungen abgebildet. Bei einer Proteinreinigung mit 0,05 % DDM und 150 mM Natriumchlorid (Abb. 4.8.A) befanden sich die übliche Menge an Banden im Durchfluss. Bei den Fraktionen mit 20 mM und 80 mM Imidazol waren schwache Banden bei 50 kDa und größer zu erkennen. In der Reinigungs-Fraktion mit 200 mM Imidazol befand sich die Bande mit der höchsten Intensität bei 50 kDa. In der 400 mM Imidazol- und der *beads*-Fraktion waren keine Banden erkennbar. Die Reinigung mit 0,2 % DM und 150 mM (Abb. 4.8.B) zeigte im Durchfluss viele Banden mit teilweise hoher Intensität. Dem entsprechend waren die Banden bei 20 mM nur sehr schwach. In den Fraktionen mit 80 mM und 200 mM waren die Banden mit der stärksten Intensität bei 50 kDa und schwächere zusätzliche Banden auf unterschiedlichen Höhen. In der 400 mM Fraktion war keine Bande sichtbar. In der *beads*-Fraktion hingegen befanden sich zwei schwache Banden auf den Höhen von 50 kDa und 120 kDa. Bei der Reinigung mit 0,005 % LMNG und 150 mM Natriumchlorid (Abb. 4.8.C) zeigt sich eine große Anzahl intensiver Banden bei Molekulargewichten oberhalb von 50 kDa. In der Reinigungsfraktion mit 20 mM waren diese Banden ebenso vorhanden, jedoch deutlich schwächer. Bei 80 mM Imidazol war lediglich eine deutliche Bande bei 80 mM vorhanden. Die weiteren Fraktionen wiesen keine Banden auf. Die Reinigung mit 1,2 % β -OG (Abb. 4.8.D) zeigte ebenso deutliche Banden auf jeder Höhe des Durchflusses. Allerdings waren in den Reinigungsfraktionen lediglich bei 20 mM und 80 mM sehr schwache und diffuse Banden erkennbar. In der *beads*-Fraktion wiederum waren vier sehr klare und intensive Banden bei 50 kDa, 85 kDa und 120 kDa erkennbar. Somit ließ sich hMCT11 mit Brij[®] 78 und DDM reinigen. Für weitere Experimente wurde weiterhin Brij[®] 78 verwendet, um einen Detergenswechsel zu vermeiden. Sofern Brij[®] 78 gut für die Versuche geeignet war.

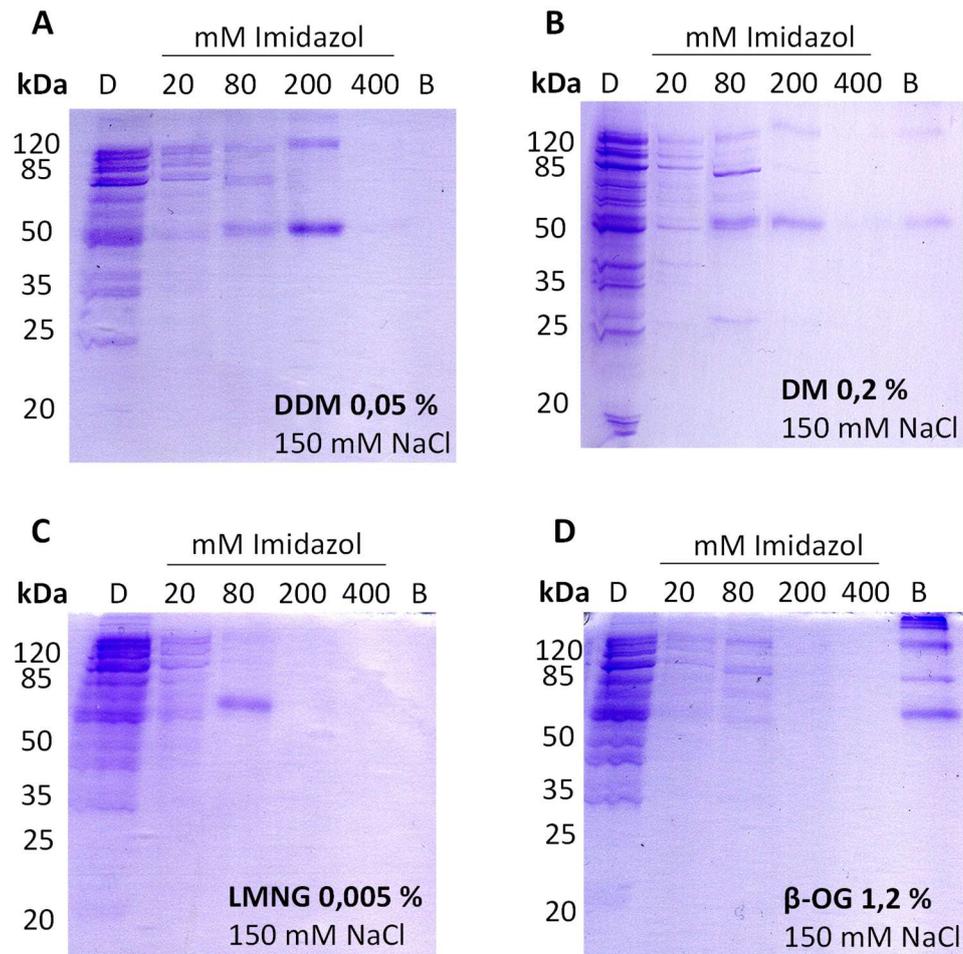


Abb. 4.8: Reinigung von zellfrei hergestelltem hMCT11. A) DDM 0,05 % mit 150 mM NaCl zeigte ein sehr gutes Elutionsprofil. Die Bindung an die Ni-NTA *beads* wurde erst bei hohen (400 mM) Imidazol Konzentrationen gelöst, dies geschieht jedoch dann vollständig. B) DM 0,2 % mit 150 mM NaCl eluierte bereits bei geringen Imidazol Konzentrationen, jedoch nicht vollständig. C) LMNG 0,005 % mit 150 mM hatte ein gutes Elutionsprofil, eluierte allerdings schon bei geringen Konzentrationen vollständig. D) β -OG 1,2 % mit 150 mM NaCl eignete sich nicht zur Elution von den Ni-NTA-*beads*. D: Durchfluss, B: Ni-NTA-*beads*

4.2.4 Liposomen-Tests mit hMCT11

Um die Funktion des zellfrei hergestellten Proteins untersuchen zu können, musste das hMCT11 zunächst in Liposome rekonstituiert werden. Dafür wurde das Protein wie beschrieben in Brji 78 hergestellt und gereinigt. Die Rekonstitution der Proteine in die Liposome erfolgte nach der in Abschnitt 3.4.1 beschriebenen Methode. Diese entstandenen Proteoliposome wurden dann mittels der *Stopped Flow* einem plötzlichen Substratgradienten ausgesetzt. Die Liposome reagieren dabei aufgrund des osmotischen Stresses mit einem schlagartigen Wasser-Efflux, was zu einem Zusammenziehen der Liposome führt. Anschließend kann funktionales Protein Lactat in die Liposome transportieren. Dieser

Transport führt dazu, dass Wasser dem Substrat folgt, um das osmotische Gleichgewicht zu erhalten. Dies wiederum lässt die Liposome anschwellen. Diese Messung wurde mit hMCT11-haltigen Liposomen durchgeführt, was in Abb. 4.9 gezeigt ist. In den ersten Sekundenbruchteilen stieg das Signal aufgrund des Wasser-Efflux auf 1,0 V an. Bei einem pH von 6,8 wurden die Liposome einem inwärts gerichteten Gradienten von 200 mM ausgesetzt. Sowohl bei Lactat als auch bei Pyruvat blieben die Signale über mindestens 40 s lang auf 1,0 V. Der Verlauf der Leerliposomen erfolgte dabei analog. Bei einer Aufnahme des Substrates würde das Signal sinken und unter 1,0 V fallen.

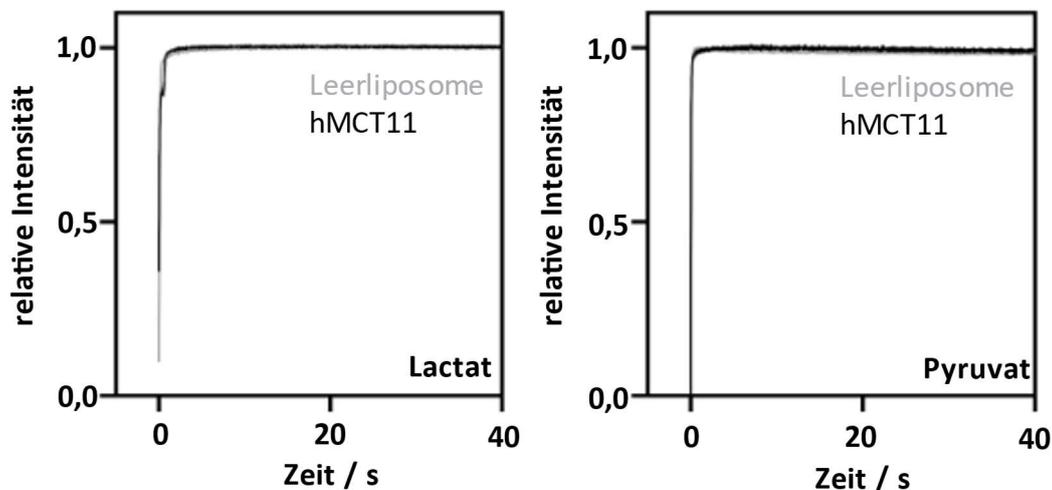


Abb. 4.9: Funktionsmessung von hMCT11-haltigen Proteoliposomen in der *Stopped-Flow*. Die Kurven zeigen einen klassischen Verlauf für Liposome, einen steilen Anstieg des Signals gefolgt von einem gleichbleibenden Signal. Leerliposome und Proteoliposome verhielten sich bei Pyruvat und L-Lactat nahezu identisch. Würde das Substrat in die Liposome transportiert werden, so würde das Signal nach dem initialen Anstieg langsam abfallen. Die Messung erfolgte bei pH 6,8 und einem inwärts gerichteten Gradienten von 200 mM. Diese Kurven entstanden aus einer Messung, welche noch zwei weitere Male bestätigt wurde.

Die Messungen mit der *Stopped-Flow* zeigten demnach keine Aktivität bei Proteoliposomen mit rekonstituiertem hMCT11, weder bei L-Lactat noch bei Pyruvat, bei einem pH von 6,8 und einem inwärts gerichteten Gradienten von 200 mM des entsprechenden Substrates.

Aufgrund des ausbleibenden Nachweises auf die Transportaktivität von hMCT11, wurden keine weiteren Tests mit diesem Protein durchgeführt.

4.3 Untersuchung von Formiat-Nitrit-Transportern

Im Folgenden wird sich der Fokus dieser Arbeit auf die Hemmung der Formiat-Nitrit-Transporter befinden. Für die Untersuchung der FNTs wurde, wie zuvor der *S. cerevisiae*-Stamm W301A Δ jen1 Δ ady2 verwendet. Die Expression der FNT-Proteine verleiht der Hefe erneut die Fähigkeit zum Lactat-Transport. Um die Transportproteine im späteren Verlauf hinsichtlich der Hemmbarkeit mit Inhibitoren zu untersuchen, musste zunächst sichergestellt werden, dass die Proteine von der Hefe exprimiert werden und dass die Funktionalität gegeben ist.

Die Funktionalität und Hemmbarkeit der FNT wurden mit ^{14}C -markiertem L-Lactat untersucht, was in diesem Arbeitskreis bereits etabliert wurde ^{4,119}

4.3.1 Herstellung von FNTs in *S. cerevisiae*

Die verwendeten DNA-Plasmide für PfFNT und G107S lagen bereits vor¹¹⁹, ebenso die Konstrukte für die weiteren humanpathogenen Plasmodien. Die DNA von PbFNT wurde codonoptimiert synthetisiert und über die Schnittstellen SpeI und XhoI in den Vektor pDRTXa eingefügt. Die Hefen wurde aufgeschlossen (3.2.1), die erhaltenen Proteine in definierter Menge (3.2.2) über ein SDS-Gel aufgetrennt (3.2.3) und schließlich mittels Western Blot (3.2.5) analysiert.

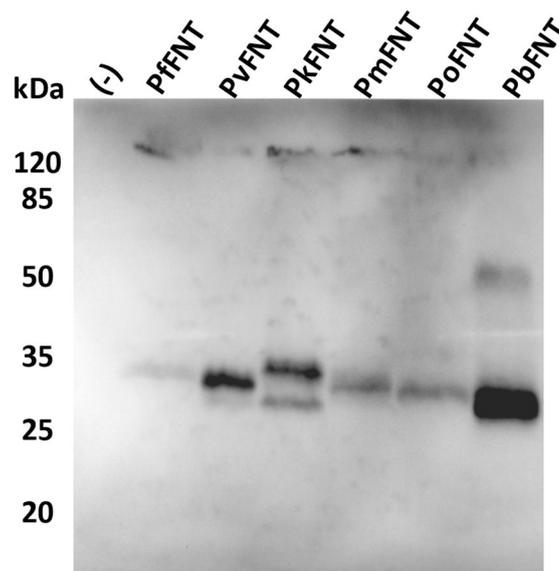


Abb. 4.10: FNTs der untersuchten plasmodialen Spezies. Western Blot der in *S. cerevisiae* exprimierten plasmodialen Formiat-Nitrit-Transporter. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-HA-Antikörper. Aufgetragene Gesamtproteinmenge: 15 μg . Dieser Western Blot entstand in Zusammenarbeit mit Christian Hansen.

Der in Abb. 4.10 abgebildete Western Blot zeigt die Expression aller FNTs aus humanpathogenen *Plasmodium*-Spezies und *P. berghei*. Die *S. cerevisiae*-Zellen mit dem Leerplasmid zeigten keine unspezifischen Banden. Alle plasmodialen Formiat-Nitrit-Transporter zeigten eine Bande bei der erwarteten Höhe um 35 kDa. Die schwächste Bande zeigte dabei PpFNT. Gefolgt von den etwas deutlicheren Banden bei PmFNT und PoFNT. PkFNT wies eine Doppelbande auf, dessen oberer Teil stärker ausgeprägt war als die untere Hälfte. PvFNT zeigte von den FNTs der humanpathogenen Plasmodien die stärkste Bande. Die höchste Intensität zeigte allerdings PbFNT bei 35 kDa. Alle FNT-Varianten wiesen eine schwache Bande bei 120 kDa auf, die Intensität war jedoch bei allen Konstrukten etwa gleich. Die isolierte Membranfraktion zeigte dementsprechend im Western Blot bei allen FNT-Varianten eine Bande auf der zu erwartenden Höhe für ein vollständiges Protein.

4.3.2 Ermittlung der Substratinkubationszeiten für Inhibitorexperimente

Um die nötige Substratinkubationszeit zu ermitteln, wurde die Lactataufnahme über die Zeit gemessen und ein Zeitpunkt gewählt, bei dem eine ausreichende Menge an L-Lactat aufgenommen wurde und sich die Aufnahme idealerweise im linearen Bereich der Kurve befand. Dafür wurde radioaktiv markiertes L-Lactat mit einem einwärts gerichteten Gradient von 1 mM und ein pH-Wert von 6,8 verwendet (vgl. Kap. 3.5.1). Von den Aufnahmekurven wurde der Hintergrund nicht-exprimierender Hefen abgezogen. Dieser lässt sich auf geringe Diffusion und anhaftendes L-Lactat am Filtermaterial zurückführen.

Die humanpathogenen FNT-Varianten (Pk, Po, Pm und Pv) wurden bereits einmal in der Dissertation von Dr. Anna Meier initial vermessen.

In Abb. 4.11 sind die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Zeitkurven aufgeführt. Zunächst fiel eine unterschiedliche Geschwindigkeit der L-Lactat Aufnahme auf, die schnellste Rate zeigte dabei PkFNT mit 0,30 nmol/mg min, gefolgt von PoFNT mit 0,17 nmol/mg min, PpFNT hatte eine Transportrate von 0,09 nmol/mg min, PvFNT zeigte eine Rate von 0,07 nmol/mg min, die langsamste Transportrate der humanpathogenen FNT-Varianten hatte PmFNT mit 0,02 nmol/mg min. Die Resistenzmutante PpFNT G107S hatte mit 0,06 nmol/mg min eine um 37 % geringere Transportrate als der Wildtyp. Das Plateau der Aufnahmekurven war vergleichbar, PvFNT erreichte 0,16 nmol/mg, gefolgt von PmFNT mit 0,16 nmol/mg. Die Plateaus von PpFNT und PoFNT waren 0,14 nmol/mg, das vergleichsweise niedrigste Plateau zeigte PkFNT mit 0,13 nmol/mg. Das Plateau von PpFNT G107S lag bei

0,10 nmol/mg.

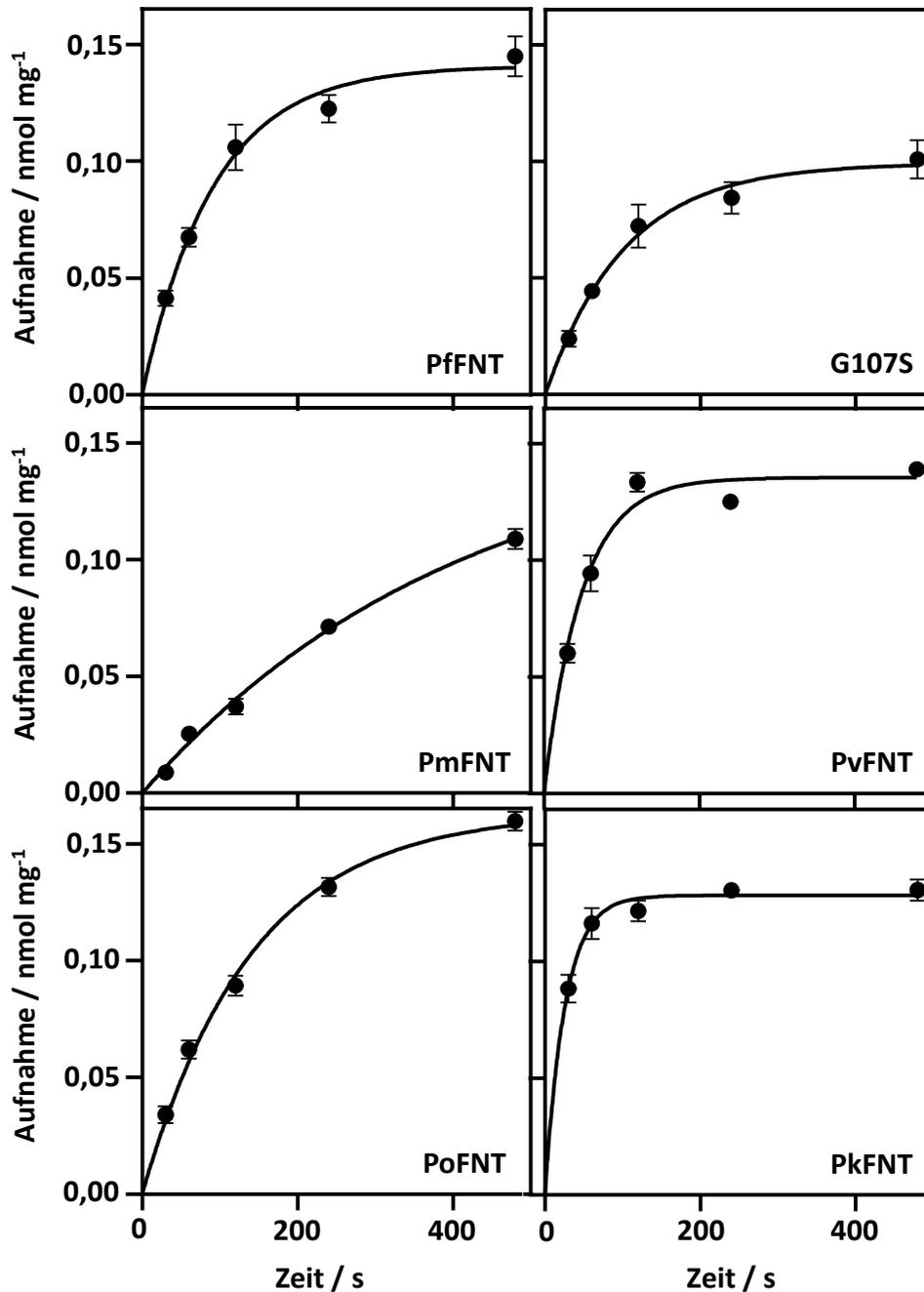


Abb. 4.11: Aufnahmekurven von FNTs der humanpathogenen *Plasmodium*-Spezies in *S. cerevisiae*. Die Aufnahmekurven der Formiat-Nitrit-Transporter von humanpathogenen *Plasmodium*-Spezies inkl. der Resistenzmutante G107S. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04 μ Ci ¹⁴C-markiertem-L-Lactat, pH 6,8. N = 3

Der Formiat-Nitrit-Transporter aus *P. berghei*, PbfFNT (Abb. 4.12), war mit einer Transportrate von 0,09 nmol/mg min sehr ähnlich zum PffFNT, mit einem Plateau von 0,1 nmol/mg war er vergleichbar mit allen anderen FNTs und kam am nächsten an das PffFNT G107S heran.

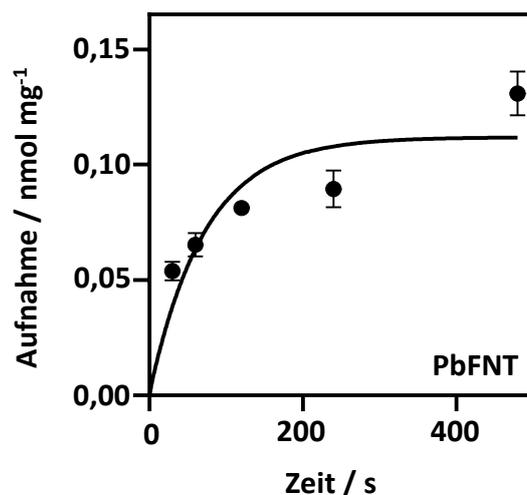


Abb. 4.12: PbFNT Aufnahmekurve. Die Aufnahmekurve von L-Lactat bei pH 6,8 des Formiat-Nitrit-Transporter von *P. berghei*. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04 μCi ^{14}C -markiertem-L-Lactat, pH 6,8. N = 3

Die leichten Unterschiede in den Aufnahmekurven, vor allem bei der Transportrate, führten zu unterschiedlichen Substratinkubationszeiten, die in Tab. 4.1 dargestellt werden. Diese Werte wurden teilweise empirisch angepasst (wie etwa bei PbFNT) und beziehen sich nicht nur ausschließlich auf die Aufnahmekurve. Ein möglicher Grund war beispielsweise eine Schwankung in der Hefeviabilität, welche durch eine Erhöhung der Substratinkubationszeit zu konsistenteren Ergebnissen und ausreichenden Signalen führte.

Tab. 4.1 Substratinkubationszeiten aller untersuchten Transportproteine

| Membranprotein | Substratinkubationszeit / s |
|----------------|-----------------------------|
| PfFNT | 30 |
| PfFNT G107S | 120 |
| PmFNT | 240 |
| PkFNT | 30 |
| PvFNT | 120 |
| PoFNT | 30 |
| PbFNT | 120 |
| hMCT1 | 180 |

4.4 Inhibition von Formiat-Nitrit-Transportern

Formiat-Nitrit-Transporter lassen sich von der Strukturklasse der Pentafluoro-3-hydroxy-pent-2-en-1-one hemmen. Die Nummern zu den entsprechenden Strukturen werden in den folgenden Unterkapiteln an der Abszissenachse der Hemmungskurven und im Anhang (siehe S. 165) angegeben

Die erste Leitsubstanz stellte dabei MMV007839 [1] dar. Aufgrund der G107S Resistenzmutante wurde die Hydroxygruppe entfernt, sodass ein dauerhaft offenkettiger Inhibitor [2] entstand.¹¹⁹ Diese Maßnahme verbesserte die Inhibition um etwa eine Größenordnung, von 21 μM ¹¹⁹ auf die in dieser Arbeit reproduzierten 2,1 μM . Für ein besseres strukturelles Verständnis wurde eine Minimalversion der Inhibitor-Klasse mit Benzen als aromatische Komponente hergestellt. Wie in Abb. 4.13 gezeigt, wurde [2] reproduziert und der neuartige Inhibitor [3] vermessen.

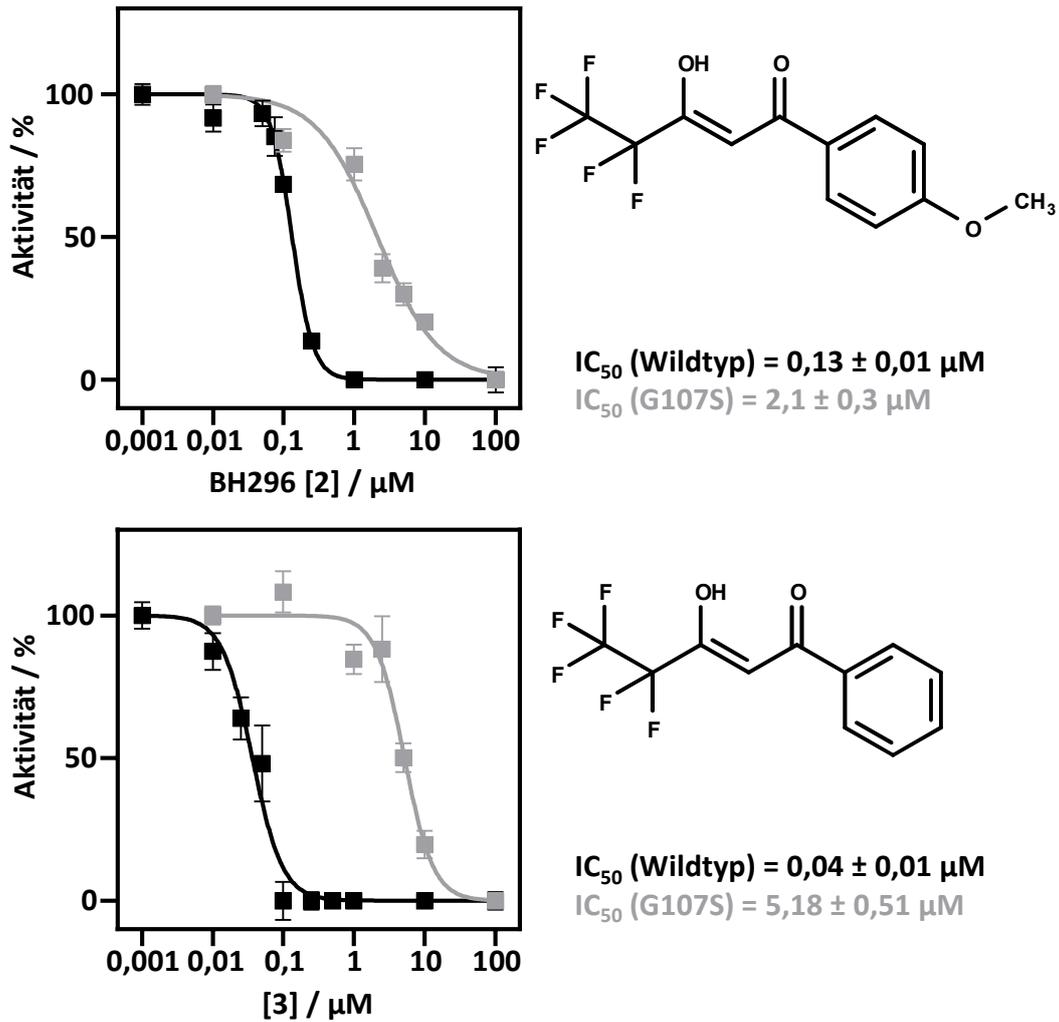


Abb. 4.13: Die erste Generation der PfFNT-Inhibitoren gegen PfFNT und PfFNT G107S. Das Entfernen der Hydroxygruppe von [1] führte zu [2] und reduzierte den IC_{50} -Wert gegen PfFNT G107S auf einen einstelligen mikromolaren Bereich. Das Entfernen der Methoxygruppe führte zu [3], der IC_{50} -Wert erhöhte sich allerdings auf 5,18 µM. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04 µCi ^{14}C -markiertem-L-Lactat, pH 6,8. N = 3

Hier zeigte sich erneut, dass die Substanzen der ersten Generation an Inhibitoren den Wildtyp von PfFNT sehr gut inhibieren konnten. BH296 [2] hemmte PfFNT mit 0,13 µM und der neue Inhibitor [3] hemmte PfFNT sogar mit 0,04 µM. Allerdings konnte auch hier wieder bestätigt werden, dass die Affinität zum PfFNT G107S deutlich schwächer wurde. BH296 [2] konnte PfFNT G107S lediglich mit einem IC_{50} von 2,1 µM hemmen. Wird die Methoxygruppe entfernt, wie bei [3], verschlechterte sich die Inhibition weiter auf 5,2 µM.

4.4.1 Umgehung der G107S-Resistenzmutation

Diverse Strategien die G107S-Resistenz zu umgehen, z.B. durch das Ausweichen mit einem chemischen Linker oder kleineren Aromaten, waren in der Vergangenheit erfolglos. Daher wird nun im folgenden Kapitel beschrieben, wie die Einführung eines Stickstoffatoms in den

aromatischen Ring das Serin der G107S-Mutante direkt angreifen und somit effizient hemmen konnte.

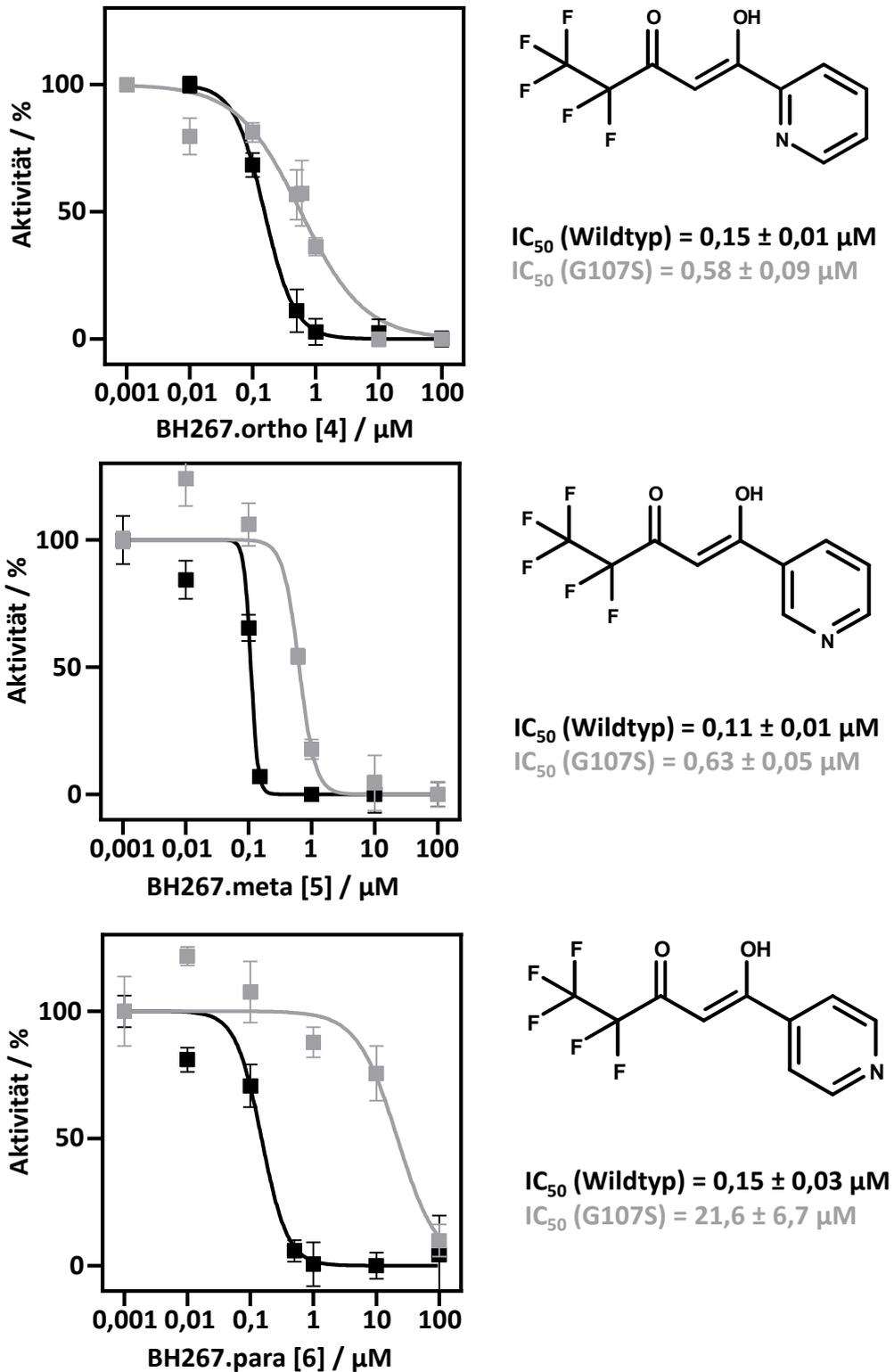


Abb. 4.14: Inhibitoren mit Pyridin als aromatische Komponente. A) BH267.ortho [4] inhibierte PfNT mit 0,15 μM und PfNT G107S mit einem IC₅₀-Wert 0,58 μM. B) BH267.meta [5] inhibierte PfNT ebenso mit einem IC₅₀ von 0,11 μM PfNT und PfNT G107S mit 0,63 μM C) BH267p [6] wies einen IC₅₀ von 0,15 μM gegen PfNT

auf, die Inhibition gegen PffNT G107S wurde mit etwa 22 μM deutlich schwächer. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04 μCi ^{14}C -markiertem-L-Lactat, pH 6,8. N = 3

Um entsprechende Aussagen über den Einfluss der Position des Stickstoffs treffen zu können, wurden drei neuartige Inhibitoren synthetisiert. Diese Inhibitoren hatten den klassischen Aufbau: Eine Fluorethylkette, gefolgt von einer vinylogenen Carbonsäure und abschließend einen Aromaten. Als Aromat wurde Pyridin genutzt, welches den Stickstoff in Relation zum Pharmakophor in *ortho*- [4], *meta*- [5] oder *para*- [6] Position trägt, die Ergebnisse sind in Abb. 4.14 dargestellt.

Vorab lässt sich feststellen, dass die Auswahl der Stickstoff-Position keine Auswirkung auf die Wirksamkeit gegen den PffNT-Wildtyp hatte, BH267.ortho [4] erreichte einen IC_{50} von 0,15 μM , wie auch BH267.para [6]. BH267.meta [5] erreichte einen IC_{50} von 0,11 μM . Unterschiede wurden erst bei Betrachtung der IC_{50} -Werte gegen PffNT G107S deutlich. Hier resultierte aus dem Stickstoff in *para*-Position eine deutlich geringere Hemmung mit 21,6 μM . BH267.ortho [4] schaffte es PffNT G107S mit einem IC_{50} von 0,58 μM zu hemmen, eine nahezu identische Hemmung zeigte BH267.meta [5] mit 0,63 μM .

Es wurde ein weiterer stickstoffhaltiger Inhibitor mit einem Amid-Linker [7] getestet (Abb. 4.15). Mit dieser Struktur wurde untersucht, ob der Stickstoff den gleichen Effekt hat, wenn dieser nicht im aromatischen Ringsystem eingebunden ist, sondern als Linker zwischen der vinylogenen Carbonsäure und einem Benzen-Ring vorliegt. Mit einem IC_{50} gegen den Wildtyp PffNT von 0,46 μM war der Inhibitor zwar schwächer als die bisherigen Strukturen, aber noch im nanomolaren Konzentrationsbereich. Die Hemmung von PffNT G107S blieb mit 18,3 μM allerdings gering.

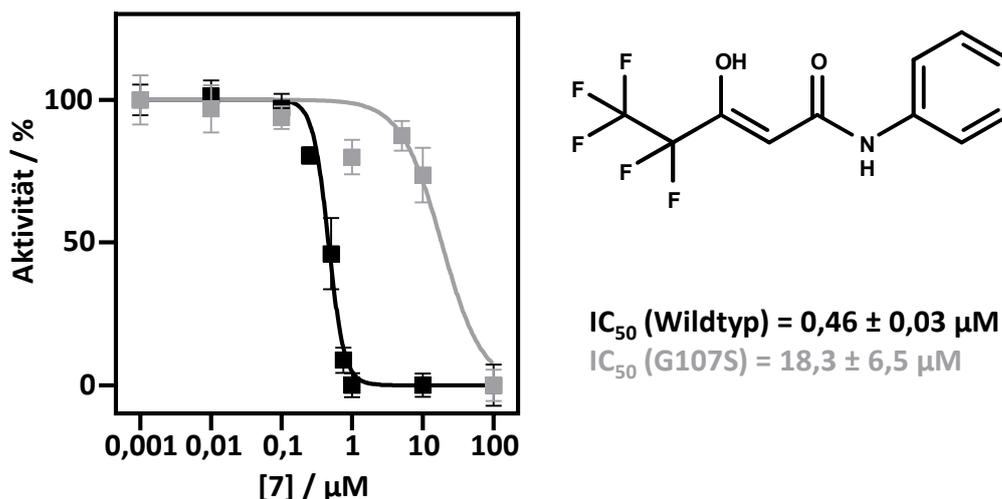
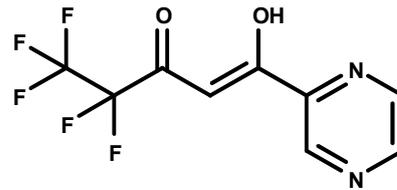
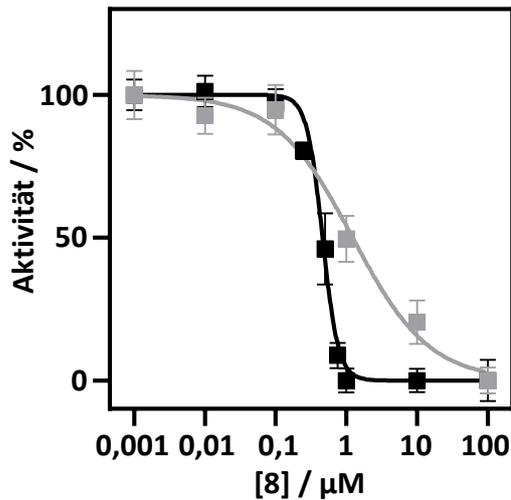


Abb. 4.15: Einfügen eines Amid-Linkers [7]. Die Verwendung eines Amid-Linkers erzeugte einen nanomolaren Inhibitor mit einem IC_{50} -Wert von $0,46 \mu\text{M}$. Die Inhibition verringerte sich allerdings gegen PfFNT G107S mit $18,3 \mu\text{M}$. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar. Substrat: $1 \text{ mM L-Lactat} + 0,04 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C-markiertem-L-Lactat}$, pH 6,8. N = 3

Daraus resultierten mit BH267.meta [5] und BH267.ortho [4] erstmalig Inhibitoren, welche im Stande waren, PfFNT G107S im submikromolaren Bereich zu inhibieren. Diese Substanzen können nun als Leitstrukturen fungieren und als Vorbild einer neuen Generation an PfFNT-Inhibitoren dienen.

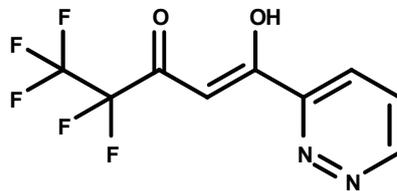
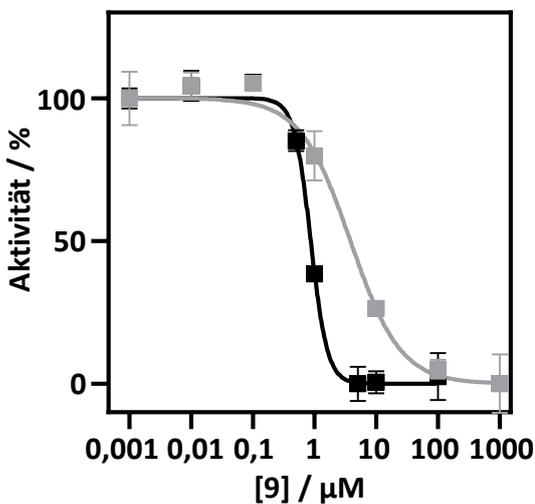
4.4.2 Aromaten mit zwei Stickstoffen

Um die inhibitorische Wirkung gegen die Resistenzmutante zu erhöhen, wurden Kombinationen von [4] und [5] hergestellt. Dies ergab die zwei Inhibitoren [9] und [10] mit einem entsprechenden Pyridazin oder Pyrazin als aromatische Komponente (vgl. Abb. 4.16). Deren Inhibition war jedoch auch hinsichtlich des PfFNT Wildtyps mit IC_{50} -Werten von $0,86 \mu\text{M}$ [10] und $0,46 \mu\text{M}$ [9] vermindert. Allerdings fiel vor allem die starke Erhöhung der IC_{50} -Werte gegen PfFNT G107S auf, welche mit $3,8 \mu\text{M}$ [10] und $1,2 \mu\text{M}$ [9] auf dem Niveau von BH296 [2] ($2,1 \mu\text{M}$) lagen.



IC_{50} (Wildtyp) = $0,46 \pm 0,03 \mu\text{M}$

IC_{50} (G107S) = $1,23 \pm 0,35 \mu\text{M}$



IC_{50} (Wildtyp) = $0,86 \pm 0,03 \mu\text{M}$

IC_{50} (G107S) = $3,80 \pm 0,77 \mu\text{M}$

Abb. 4.16: Inhibitoren mit zwei Stickstoffen im aromatischen Ring. [8] inhibierte PfFNT mit einem IC_{50} -Wert von $0,46 \mu\text{M}$. Die Inhibition wurde gegen PfFNT G107S auf $1,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ reduziert. [9] hatte einen höheren IC_{50} gegen PfFNT mit $0,86 \mu\text{M}$, die Inhibition gegenüber der Resistenzmutante war mit $3,8 \mu\text{M}$ stärker vermindert. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar. Substrat: 1 mM L-Lactat + $0,04 \mu\text{Ci}$ ^{14}C -markiertem-L-Lactat, pH 6,8. N = 3

4.4.3 Zweite Generation von PfFNT Inhibitoren

Die beiden Leitsubstanzen, BH267.ortho [4] und BH267.meta [5], wurden im folgenden Abschnitt weiter modifiziert, um die Hemmwirkung am Transporter PfFNT G107S weiter zu verbessern. Die ersten Modifikationen sind in Abb. 4.17 dargestellt. Größtenteils wurden die Veränderungen an BH267.meta [5] durchgeführt, da diese synthetisch besser zugänglich war. Die Einführung einer Methoxygruppe, analog zu BH296 [2], an BH267.meta [5] führte zu der Substanz BH297 [10]. Die Hemmung von PfFNT blieb mit einem IC_{50} von $0,11 \mu\text{M}$ unverändert. Allerdings hemmte der Inhibitor PfFNT G107S mit $0,26 \mu\text{M}$ und war somit um nahezu eine Größenordnung stärker als das Struktur-Analogon BH296 [2] ($2,1 \mu\text{M}$). Das Einfügen eines Chlorsubstituenten in die para-Position von BH267.ortho [4] führte zu der Substanz [11]. Dies

hatte eine geringfügige Erhöhung des IC₅₀-Wertes auf 0,23 µM zur Folge. Die Hemmung von PfFNT G107S blieb dagegen mit 0,51 µM unverändert. Die Substitution von einer Methylgruppe an der para-Position führte zum Inhibitor [12], welcher mit 0,15 µM einen nahezu unveränderten IC₅₀-Wert gegenüber PfFNT zeigte. Die Hemmung gegen PfFNT G107S sank jedoch auf 1,74 µM, also fast um das Dreifache im Vergleich zu BH267.meta [5] (0,63 µM).

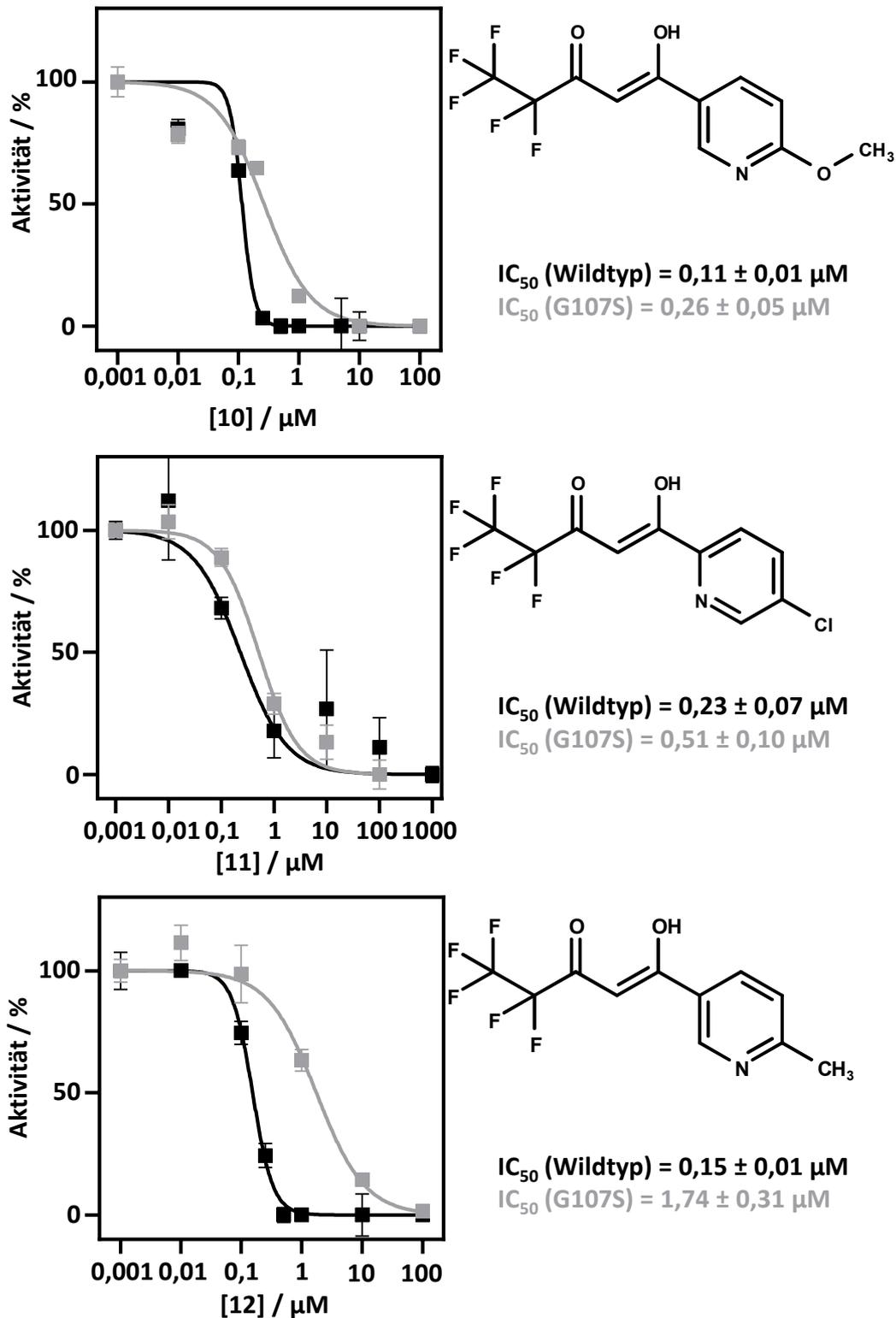


Abb. 4.17: Unterschiedliche Substitutionen Pyridin-haltiger Inhibitoren. Es wurde versucht die Eigenschaften der Pyridin-haltigen Inhibitoren durch Substituenten weiter zu verändern. Dies führte bei BH297 [10] zu einer Verbesserung in der Inhibition von PfFNT G107S auf 0,26 μM , was der bisher niedrigste Wert war. Das Einfügen eines Chlorsubstituenten zeigte keine Änderung im Vergleich zum nicht substituierten BH267.ortho [4]. Die Verwendung einer Methylgruppe verschlechterte die Inhibition auf 1,74 μM . Die Fehlerbalken stellen den SEM dar. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04 μCi ^{14}C -markiertem-L-Lactat, pH 6,8. N = 3

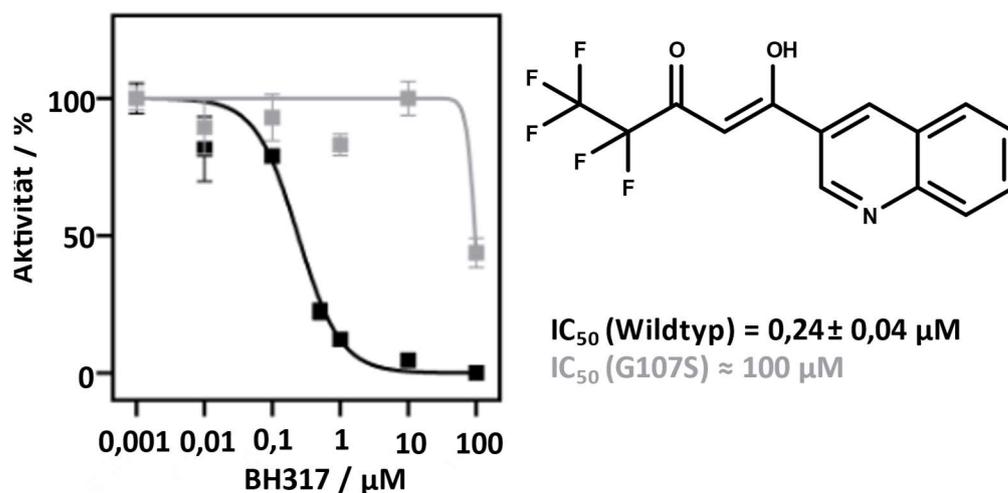


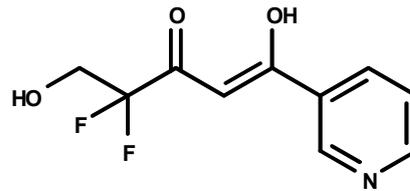
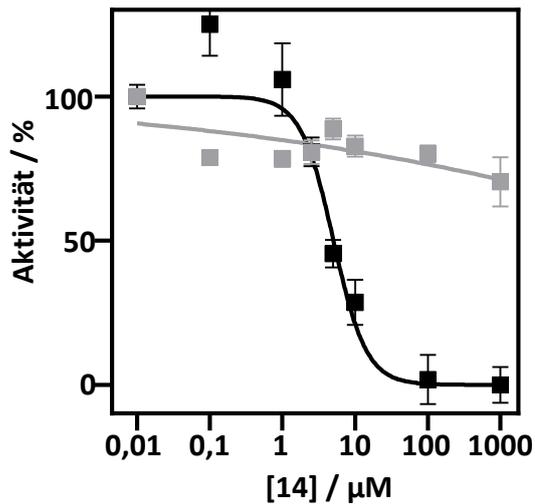
Abb. 4.18: Verwendung einer großvolumigen aromatischen Komponente mit [13]. Die Verwendung von einem großvolumigen Chinolin als aromatische Komponente führte zu einer guten Hemmung des Wildtyps mit $0,24 \mu\text{M}$. Allerdings führte dies jedoch zu einem IC_{50} -Wert von etwa $100 \mu\text{M}$ und damit zu einem Inhibitionsverlust gegen PffNT G107S. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar. Substrat: $1 \text{ mM L-Lactat} + 0,04 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C-markiertem-L-Lactat}$, pH 6,8. N = 3

Ein großvolumige Substituent (Abb. 4.18), wie bei [13] mit einem Chinolin, wurde zwar von PffNT ohne Verlust der Inhibition toleriert, jedoch nicht von PffNT G107S. Der IC_{50} -Wert gegen den Wildtyp-PffNT lag bei $0,24 \mu\text{M}$. Dieser stieg allerdings gegen PffNT G107S auf etwa $100 \mu\text{M}$.

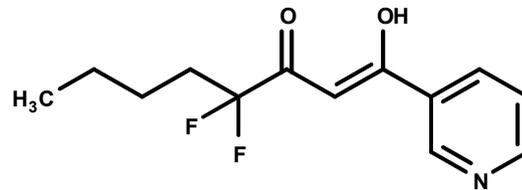
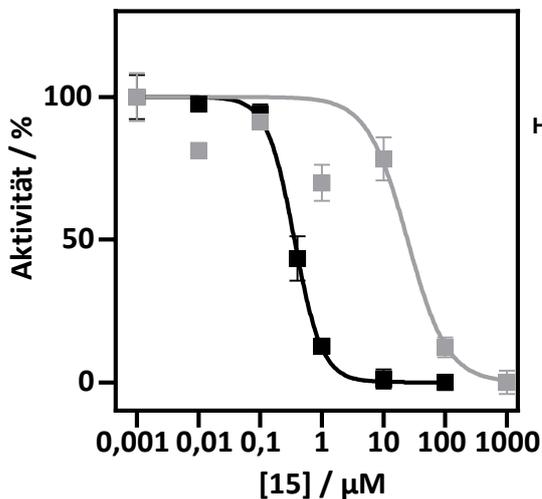
4.4.4 Modifikation an der Fluoralkylkette

Der Einbau von Fluoralkylketten führt bei Untersuchungen der ADME-Eigenschaften aufgrund von gesundheitlichen und umweltbezogenen Bedenken zu regelmäßigen *structural alerts*.¹⁵⁷ Es ist vergleichsweise unwahrscheinlich, dass eine perfluorierte Ethylgruppe ein Problem darstellt, da derartige Bedenken erst ab perfluorierten Butylketten auftreten¹⁵⁸ und die originalen Substanzen der Malariabox^{119,131} keine Toxizität gegenüber diversen humanen Zelllinien aufwiesen.¹⁵⁹ Dennoch wurde sich dieser Problematik angenommen und versucht die Zahl der Fluoratome zu verringern. Es zeigte sich bereits, dass eine Verkürzung der Fluoralkylkette PffNT nicht effizient hemmt. Dabei war auffällig, dass das vollständige Entfernen aller Fluoratome zu einem Funktionsverlust führte. Die Reduktion auf drei Fluoratome verminderte die Inhibition von PffNT, führte hingegen noch zu einem nanomolaren Inhibitor. Somit musste die schwächer werdende Affinität der Inhibitoren mit anderen Strategien ausgeglichen werden. Diese sind in Abb. 4.19 dargestellt. Der erste Ansatz

umfasst eine Hydroxygruppe, welche das hochkonservierte Histidin der Formiat-Nitrit-Transporter¹²⁴ adressieren sollte.¹⁶⁰ Mit einem IC_{50} -Wert von 5,1 μM ließ sich eine gewisse Affinität feststellen. Allerdings war diese um etwa eine Größenordnung schwächer als bei anderen Inhibitoren. Gegen die Resistenzmutante zeigte **[14]** eine kaum feststellbare Hemmung von über 1000 μM . Bei **[15]** waren ebenso zwei Fluoratome im Molekül vorhanden. Weiterhin wurde allerdings eine Alkylkette mit vier Kohlenstoffatomen genutzt, um die lipophile Engstelle im PffNT passieren zu können und die Bindungsenergie zu erhöhen. Der resultierende Inhibitor **[15]** zeigte einen IC_{50} -Wert von 0,36 μM und ist damit der erste nanomolare Inhibitor für PffNT mit einer minimalen Fluormenge von lediglich zwei Atomen. Allerdings fiel ebenso auf, dass die Wirkung gegen G107S überproportional verloren ging. Der IC_{50} -Wert von **[15]** lag bei lediglich 24 μM .



IC_{50} (Wildtyp) = $5,1 \pm 0,6 \mu\text{M}$
 IC_{50} (G107S) > $1000 \mu\text{M}$



IC_{50} (Wildtyp) = $0,36 \pm 0,02 \mu\text{M}$
 IC_{50} (G107S) = $24,3 \pm 6,3 \mu\text{M}$

Abb. 4.19: Modifikationen in der Fluoralkylkette. Der Inhibitor [14] zeigte ein IC_{50} von etwa $5,1 \mu\text{M}$ gegen PfFNT. Der IC_{50} gegen PfFNT G107S konnte mit über $1000 \mu\text{M}$ nicht mehr ermittelt werden. [15] zeigte mit einem IC_{50} von $0,36 \mu\text{M}$ eine starke Inhibition gegen PfFNT, diese wurde gegen PfFNT G107S mit $24 \mu\text{M}$ jedoch wieder verringert. Substrat: $1 \text{ mM L-Lactat} + 0,04 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -markiertem-L-Lactat, pH 6,8. N = 3

4.4.5 Modifikation des Pharmakophors

Die Arbeiten von Dr. Andre Gollmack zeigten bisher, dass Entfernen der vinylogenen Carbonsäure zu einem Verlust der Inhibition führten.¹¹⁹ Im Folgenden sollte die Frage beantwortet werden, ob bei der Verwendung eines Amids die inhibitorische Wirkung erhalten bleibt oder, wie bei vergangenen Modifikationen, verloren geht. Wäre die vinyloge Carbonsäure gegen eine Amidfunktion austauschbar, würde sich eine neue Substanzklasse bilden, mit vielen potenziellen Veränderungen der physikochemischen Parameter.

Die geringste Wirkung auf *P. falciparum* 3D7 zeigte [15] mit einem EC₅₀ von etwa 20 µM. Darauf folgten [11] mit einem EC₅₀-Wert von 14 µM und BH267.ortho [4] mit 13,5 µM. Eine verbesserte Wirkung zeigte BH297 [10] mit einem EC₅₀-Wert von 3,87 µM, welches sich im Vergleich zu [2] nur in der Anwesenheit eines Stickstoffes im aromatischen Ring unterscheidet. Den geringsten EC₅₀-Wert zeigte BH267.meta [5] mit 0,29 µM. Somit war es erstmals möglich *P. falciparum* mit einem Inhibitor, der keine Hemiketale-Transportform aufwies, abzutöten. Weiterhin zeigte sich, dass BH267.meta [5] deutlich weniger anfällig die die Bildung resistenter Parasiten war, was die Behandlung von den Parasiten mit subletalen Dosen zeigte (siehe Kap. 3.6.2). Im späteren Verlauf der Arbeit konnten allerdings, mit mildereren Bedingungen, zwei weitere Mutationen selektiert werden, PffNT V196L und PffNT G21E. Diese Mutationen werden im späteren Verlauf genauer erläutert.

Aufgrund der *in vitro* Wirksamkeit gegen *P. falciparum* wurde BH267.meta [5], trotz der beobachteten Resistenzentwicklung, zur neuen Leitsubstanz für die weitere Entwicklung und stand im Fokus weiterer Tests.

4.5 Hemmung von FNTs weiterer *Plasmodium*-Spezies

Neben *P. falciparum* existieren vier weitere *Plasmodium*-Spezies, welche Menschen infizieren können. Die Formiat-Nitrit-Transporter dieser Spezies wurden bereits in ihrem Transportverhalten untersucht (4.3.2) und wurden im Folgenden mit den Inhibitoren BH267.meta [5], BH297 [10] und MMV007839 [1] behandelt (vgl. Abb. 4.21). Dies diente als Test, ob eine Wirksamkeit von BH267.meta [5] bei den analogen Parasiten zu erwarten wäre und minimale strukturelle Unterschiede die Inhibition stark beeinflussen können.

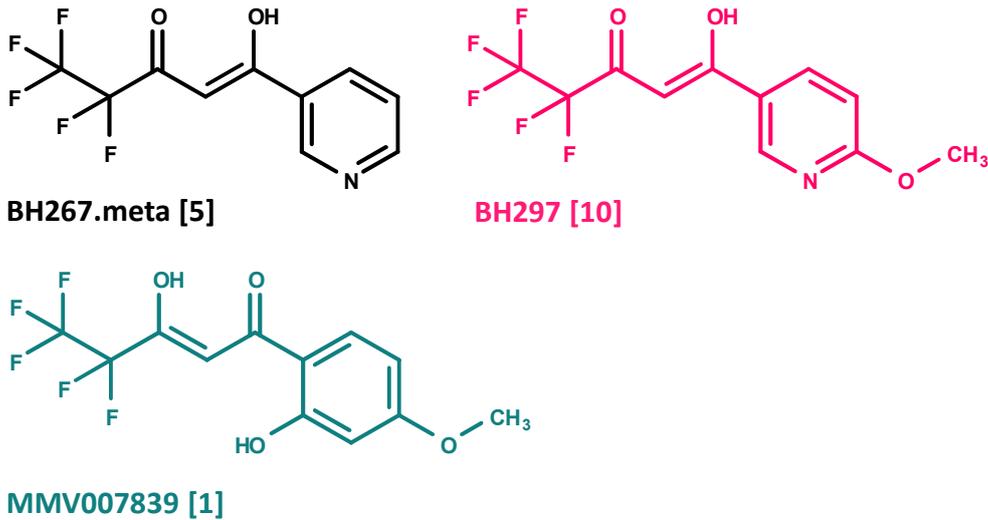


Abb. 4.21 Getestete Substanzen gegen andere *Plasmodium*-Spezies. Die abgebildeten Substanzen wurden gegen weitere Spezies getestet, BH267.meta [5] (schwarz) als neue Leitstruktur, BH297 [10] (Magenta) als Struktur mit der stärksten Inhibition gegen PfFNT G107S und MMV007839 [1] (Dunkel Cyan) als ursprüngliche Malariabox Substanz.

Weiterhin wurde der Formiat-Nitrit-Transporter PbFNT von *P. berghei*, dem Malaria-Parasiten von Mäusen und Nagetieren, untersucht, um Tierversuche vorzubereiten.

4.5.1 Hemmbarkeit von FNT aus humanpathogenen Plasmodien

Die FNT aus humanpathogenen *Plasmodium*-Spezies wurden mit den genannten Inhibitoren behandelt und die IC₅₀-Werte im Hefesystem untersucht. Dabei erreichten alle untersuchten Inhibitoren eine Hemmung gegen alle FNT-Varianten im nanomolaren Bereich. Es waren allerdings leichte Abweichungen innerhalb der Werte erkennbar (vgl. Abb. 4.22). Die Malariabox-Substanz MMV007839 [1] erreichte gegen PmFNT und PvFNT jeweils 0,14 µM und 0,16 µM, was etwa dem gleichen IC₅₀ Wert im Vergleich zur Hemmung von PfFNT (0,11 µM¹¹⁹) entsprach. Gegen PvFNT erreichte [1] eine verbesserte Inhibition mit 0,09 µM, PkFNT hemmte [1] allerdings nur mit einem IC₅₀ von 0,45 µM. Der Inhibitor BH297 [10] erreichte gegen PvFNT einen IC₅₀-Wert von 0,25 µM, knapp gefolgt von 0,38 µM gegen PmFNT. Eine schwächere Inhibition zeigte [10] gegen PoFNT und PkFNT mit jeweils 0,64 µM und 0,99 µM. BH267.meta [5] zeigte im Vergleich zu PfFNT (0,11 µM) etwa die Hälfte der Hemmwirkung gegen PmFNT (0,21 µM), PoFNT (0,21 µM) und PvFNT (0,23 µM). Gegen PkFNT zeigte jedoch auch BH267.meta [5] die schwächste Hemmung mit 0,87 µM.

Dennoch erzielten alle Inhibitoren submikromolare IC₅₀-Werte gegen FNTs aller humanpathogener *Plasmodium*-Spezies.

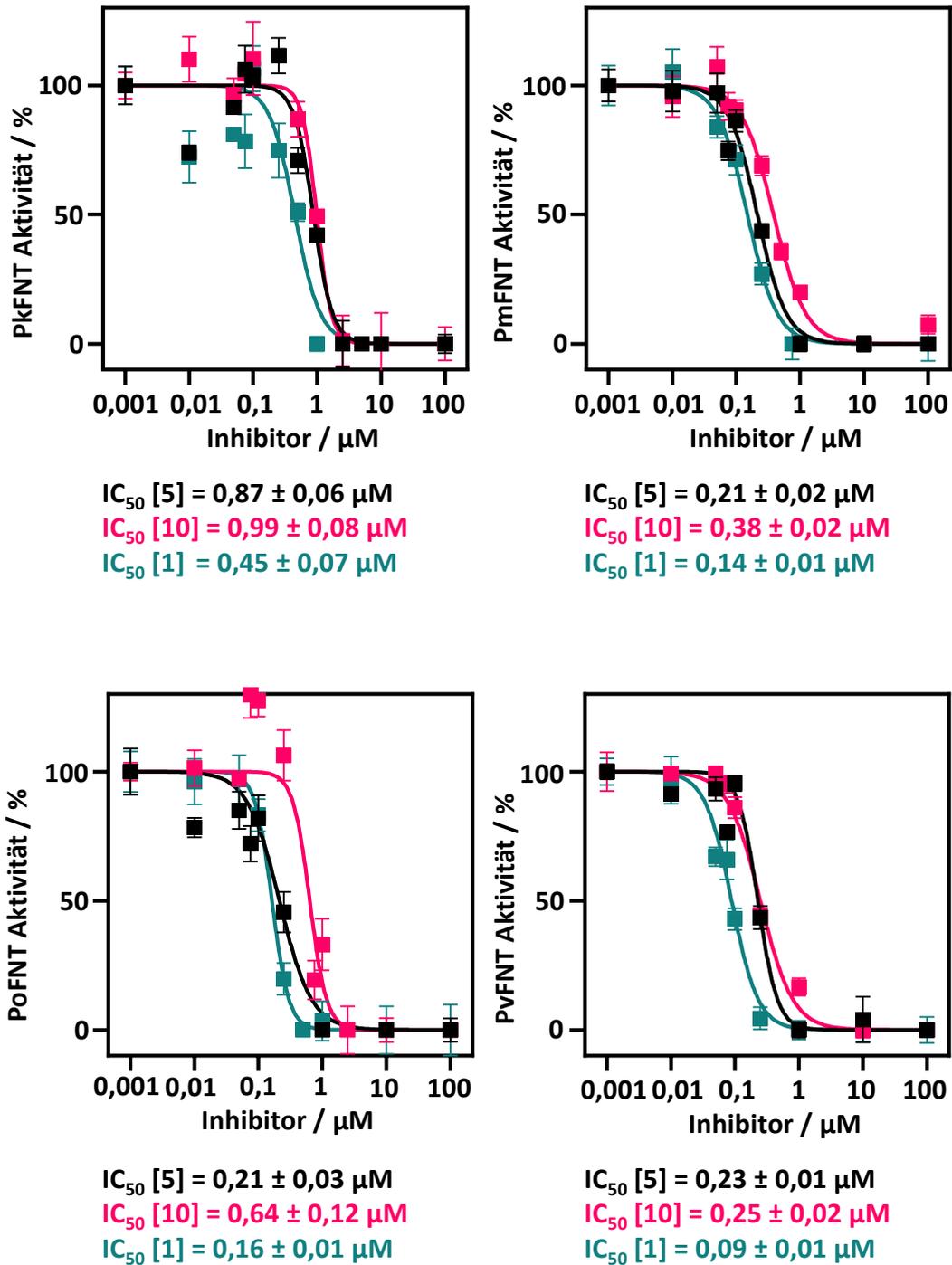


Abb. 4.22: IC_{50} -Werte von humanpathogenen FNT Varianten. Die ausgewählten Substanzen inhibierten die FNTs aller humanpathogenen *Plasmodium*-Spezies im nanomolaren Bereich. Leichte Abweichungen waren bei PkFNT zu beobachten, das von BH267.meta [5] und BH297 [10] vergleichsweise schwach inhibiert wurde. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04 μCi ^{14}C -markiertem-L-Lactat, pH 6,8. N = 3

4.5.2 Hemmung des *Plasmodium berghei* FNT

Eine weitere *Plasmodium*-Spezies ist *P. berghei*, welche infektiös für Mäuse und andere Nagetiere ist. Das entsprechende PbfNT wurde mit den ausgewählten Inhibitoren behandelt und der

daraus resultierende IC_{50} -Wert diente als Abschätzung der Wirksamkeit dieser Substanzen, wie in Abb. 4.23 dargestellt.

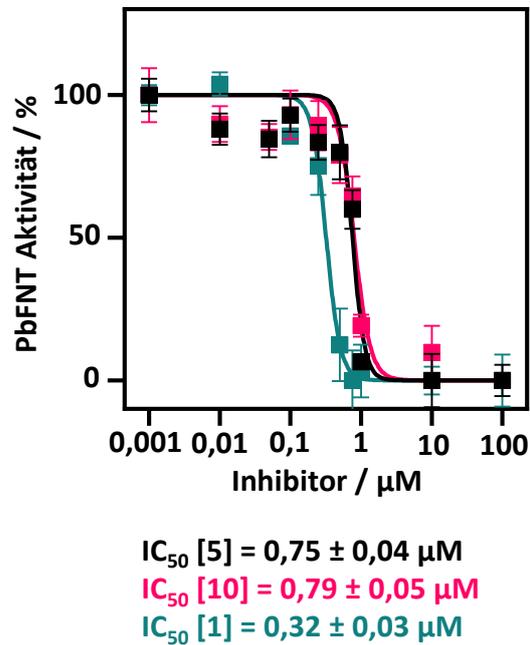


Abb. 4.23: PbFNT IC_{50} Kurve. Die Malariabox Substanz MMV007839 [1] zeigte einen IC_{50} -Wert von 0,32 μM. BH297 [10] und BH267.meta [5] wiesen eine niedrigere Affinität mit 0,79 μM und 0,75 μM auf. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04 μCi ^{14}C -markiertem -L-Lactat, pH 6,8. N = 3

Die Inhibition war bei der ursprünglichen Substanz MMV007839 [1] mit einem IC_{50} -Wert von 0,32 μM am stärksten ausgeprägt, dennoch war [1] damit etwa um den Faktor 3 schwächer gegen PbFNT als gegen PfFNT. Die beiden stickstoffhaltigen Substanzen BH267.meta [5] und BH297 [10] zeigten eine etwa halb so starke Inhibition mit jeweils 0,75 μM und 0,79 μM und waren damit etwa um den Faktor 7 schwächer im Vergleich zur PfFNT-Hemmung. Alle IC_{50} -Werte verblieben somit im nanomolaren Bereich.

Strukturelle Unterschiede innerhalb der Inhibitoren scheinen damit nur schwache Effekte zu haben, auch wenn davon auszugehen ist, dass die Hydroxygruppe von MMV007839 [1] einen positiven Effekt auf die Bindung des Inhibitors hatte.

Im Falle von MMV007839 [1] und BH267.meta [5], kann aufgrund vorangegangener Tests eine Wirkung auf die Parasiten angenommen werden, bei geringerer Wahrscheinlichkeit einer Resistenzbildung von BH267.meta [5].

4.6 Bestimmung physikochemischer Parameter der Inhibitoren

Für ein besseres Verständnis der Lipophilie, ist der logP-Wert ein wichtiger Parameter in der pharmazeutischen Entwicklung. Der Wert wurde mit der in Kap. 3.8.1 beschriebenen Methode ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.24 dargestellt. Zunächst fiel auf, dass sich keiner der gemessenen logP-Werte in extremen hydrophilen oder lipophilen Bereichen bewegt. Die höchste Lipophilie zeigte die Malaria-Box Substanz MMV007839 [1] mit einem logP Wert von 2,90. Darauf folgte [3], ein Inhibitor mit einem homoatomaren Benzen-Ring als aromatischer Komponente, mit einem logP-Wert von 2,59. Der logP-Wert der Pyridin-Derivate bewegte sich im Bereich von 2 wie [15] (2,33), [11] (2,32), BH297 [10] (2,20) und [12] (1,93). Mit einem nicht substituierten Pyridin-Ring als aromatische Komponente, wiesen BH267.ortho [4] und BH267.meta [5] einen logP-Wert von 1,48 und 1,65 auf. Den niedrigsten logP-Wert hatte [8] was einen Pyrazin-Ring aufwies, mit 1,30.

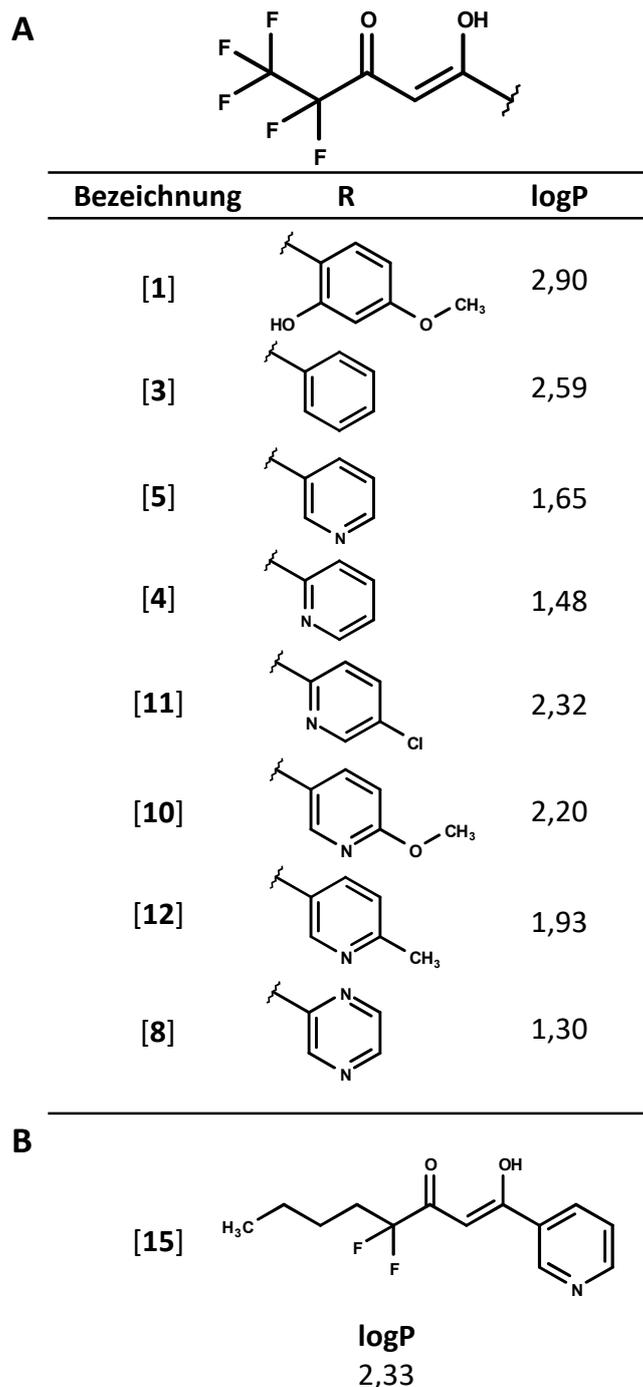


Abb. 4.24: logP Werte von PfFNT Inhibitoren. Abgebildet sind die mit HPLC ermittelten logP-Werte für diverse PfFNT-Inhibitoren. A) Inhibitoren mit der Pentafluoralkyl Kette, darunter befanden sich MMV007839 [1], der minimale aromatische Inhibitor [3] und diverse Pyridin-Derivate, insbesondere BH267.meta [5]. B) Der logP Wert von [15] als einziger Vertreter ohne Pentafluoralkyl Kette und nanomolarer Inhibition vom Wildtyp PfFNT.

Weiterhin wurde die Wasserlöslichkeit von BH267.meta [5] untersucht. Dafür wurde die in Abschnitt 3.8.2 beschriebene HPLC Methode genutzt. Vor der quantitativen Analyse wurde eine gesättigte Lösung von BH267.meta [5] in ddH₂O bzw. einem Puffer mit gewünschtem pH-Wert hergestellt. Diese Suspension wurde 1 h bei Raumtemperatur gelagert und regelmäßig kräftig gemischt. Anschließend wurde das Gemisch mit einem 0,22 µm Filter von festem

BH267.meta [5] befreit. Die entstandene Lösung wurde anschließend verdünnt und mit der HPLC vermessen. Dabei zeigte sich, dass die Löslichkeit in reinem Wasser $0,50 \pm 0,01$ mM betrug und der pH-Wert veränderte sich dabei auf etwa pH 4. Die Löslichkeit von BH267.meta [5] erhöhte sich im sauer und alkalisch gepufferten Milieu. Bei einem pH-Wert von 9,0 betrug die Löslichkeit 13,63 mM, bei pH 7,0 sogar 19,36 mM. Im sauren pH-Bereich stieg die Wasserlöslichkeit schwächer an, bei pH 3,0 befanden sich nur 0,58 mM in Lösung, diese Lücke im Löslichkeitsprofil wurde erst bei einem pH-Wert von 1,1 mit einer Löslichkeit von 8,0 mM verlassen.

4.7 Stabilitätsuntersuchungen

Um die Handhabbarkeit der Inhibitoren, mit besonderem Fokus auf BH267.meta [5], besser verstehen zu können, wurde die Stabilität der Substanzen untersucht. Hierbei wurden verschiedene Parameter genutzt, wie die Temperatur, das Lösemittel oder der pH-Wert. Weiterhin wurde der Einfluss verschiedener struktureller Parameter getestet. Die Analyse einer Probe unter forcierten Bedingungen (mehrere Minuten in wässriger Lösung zum Sieden erhitzt) mittels Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie ergaben, dass sich die Pentafluoro-3-hydroxy-pent-2-one erneut in die Edukte zersetzten. Im Fall von BH267.meta [5] wurde somit 3-Acetylpyridin gebildet, was als Zersetzungsprodukt detektiert werden konnte.

Die Durchführung aller HPLC-Messungen erfolgte in Zusammenarbeit mit Susan Häuer.

4.7.1 Zersetzung von BH267.meta

Eine 25 ml Untersuchungslösung mit 50 μ M BH267.meta [5] in PBF-Puffer wurde bei Raumtemperatur und pH 7,4 gelagert. Dabei wurden tägliche Proben entnommen und untersucht (vgl. Kap. 3.8.2). Anschließend wurde über die HPLC jeweils eine Probe bei 254 nm und 326 nm analysiert. Über eine Kalibriergerade mit bekannten Konzentrationen von BH267.meta [5] und 3-Acetylpyridin wurden die Konzentrationen der Substanzen in der Analysenlösung bestimmt und über die Zeit aufgetragen (vgl. Abb. 4.25).

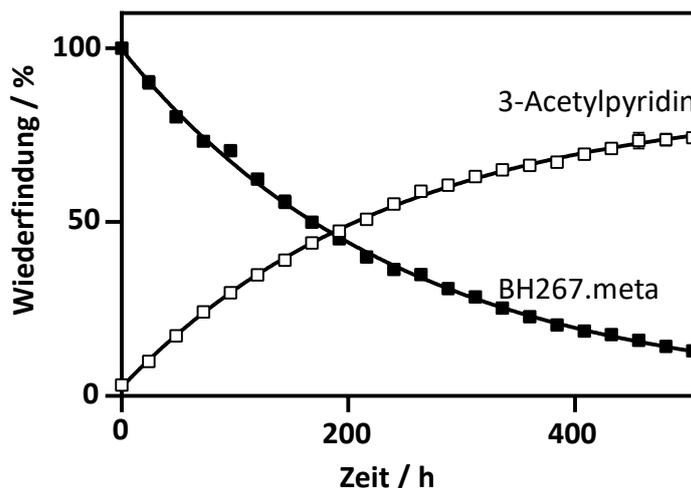


Abb. 4.25: Zersetzung von BH267.meta [5]. Eine Lösung mit 50 μM BH267.meta [5] wurde bei Raumtemperatur in PBS-Puffer pH 7,4 gelagert und täglich bei 326 nm und 254 nm vermessen. Die Substanz BH267.meta [5] (326 nm) zersetzte sich mit einer Halbwertszeit von etwa neun Tagen, die Konzentration des Zersetzungsproduktes 3-Acetylpyridin (254 nm) nahm analog zu. N = 3

Die Abnahme von BH267.meta [5] erfolgte weitestgehend analog zur Bildung des Zerfallsproduktes. Nach 24 h war der Gehalt von BH267.meta [5] auf 90,17 % gefallen, analog dazu nahm die Wiederfindung für 3-Acetylpyridin auf 9,92 % zu. Die Halbwertszeit von BH267.meta [5] wurde nach etwa 168 h, also 7 Tagen erreicht. Zu diesem Zeitpunkt stieg der Gehalt an 3-Acetylpyridin in der Untersuchungslösung auf 43,98 % an. Nach 192 h überstieg der Gehalt von 4-Acetylpyridin mit 47,33 % den von BH267.meta [5] mit 45,19 %. Nach 21 Tagen wurde das Experiment beendet. Zu diesem Zeitpunkt lagen noch 12,98 % von BH267.meta [5] vor und die Konzentration von 3-Acetylpyridin war auf 74,21 % angestiegen. Das 3-Acetylpyridin war in dieser Lösung zwar stabiler als BH267.meta [5], zeigte aber ebenso einen Konzentrationsabfall über die Zeit. Dieser Effekt wurde den flüchtigen Eigenschaften und nicht näher untersuchten weiteren Reaktionen zugeschrieben.

Diese Zersetzung zeigte sich jedoch nicht beim Feststoff von BH267.meta [5]. Es wurde eine Probe mit Feststoff bei 37 °C gelagert und monatlich vermessen. Dabei zeigte sich über 6 Monate keine nennenswerter Zersetzung über 5 %.

4.7.2 Einfluss der Temperatur auf die Zersetzung von BH267.meta

Die Temperatur hat einen erheblichen Einfluss auf viele Zersetzungsreaktionen. Um diese Effekte zu quantifizieren, wurde BH267.meta [5] in PBS-Puffer pH 7,4 bei jeweils bei 37 °C, etwa 8 °C und bei -20 °C gelagert (Abb. 4.26). Je nach Zerfallsgeschwindigkeit wurden die Intervalle des Probenzuges dabei variiert. Die Geschwindigkeit der Zerfallsreaktion verhielt

sich dabei erwartungsgemäß. Bei 37 °C wurde die Halbwertszeit auf etwa 24 h reduziert. Die Lagerung bei 8 °C verlängerte hingegen die Halbwertszeit auf 28 Tage. Aber auch hier wurde festgestellt, dass sich 5 % der Substanz innerhalb der ersten 48 h zersetzen. Bei -20 °C konnte keine Halbwertszeit bestimmt werden, da kein nennenswerter Zerfall festgestellt wurde. Auch nach 28 Tagen waren noch 95 % der Substanz vorhanden. Ebenso konnten mehrere Zyklen von Auftauen und Einfrieren die Stabilität in keinem nennenswerten Maße beeinflussen.

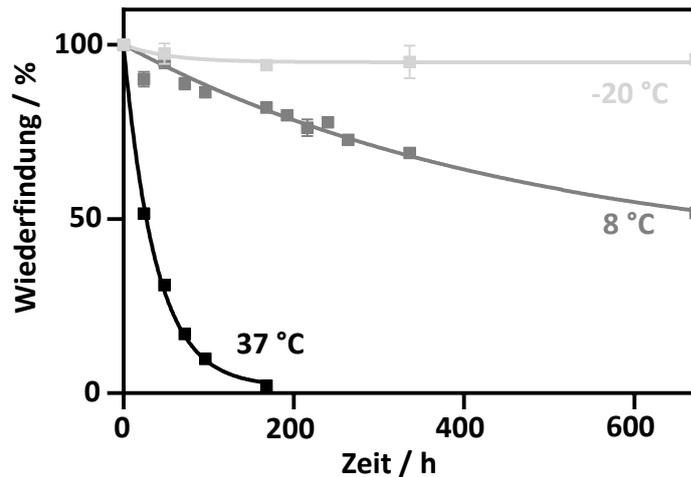


Abb. 4.26: Stabilität von BH267.meta [5] bei unterschiedlichen Temperaturen. BH267.meta [5] zeigte wie erwartend eine starke Zersetzung bei höheren Temperaturen. Während die Halbwertszeit bei Raumtemperatur etwa 9 Tagen entsprach, wurde diese bei 37 °C, also simulierter Körpertemperatur auf nur 24 h reduziert. Dem entgegen stand eine Verlängerung der Halbwertszeit bei der Lagerung im Kühlschrank auf 28 Tage. Im gefrorenen Zustand konnte der Zerfall nahezu gestoppt werden. N = 3

4.7.3 Einfluss des pH-Wertes auf die Zersetzung von BH267.meta

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität der Substanz untersuchen zu können, wurde eine Reaktionskinetik mittels eines UV/Vis-Spektrometers aufgenommen, da die Variation des pH-Wertes die verwendete HPLC-Methode maßgeblich veränderte. Die in Abb. 4.27 gezeigten Werte stammen aus einer Einfachbestimmung, dessen Endpunkt jedoch mit weiteren, analog behandelten Lösungen, abgesichert wurde.

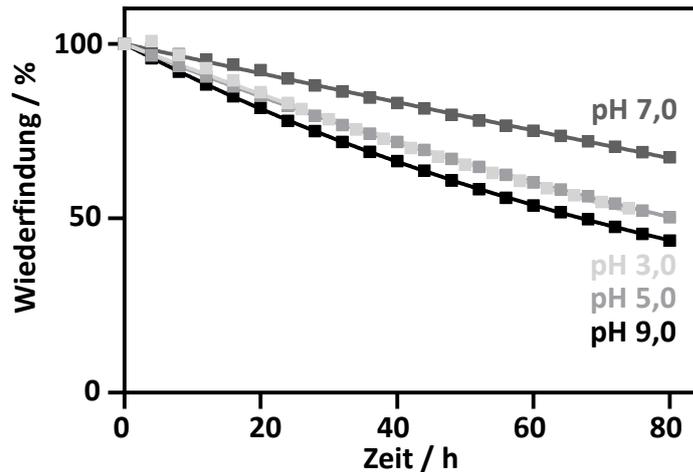


Abb. 4.27: Stabilität von BH267.meta [5] bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Stabilität von BH267.meta [5] war im neutralen pH-Milieu am höchsten, nimmt dann aber im sauren und basischen pH-Bereich ab. Im sauren pH-Bereich waren dabei zwei pH-Einheiten ausreichend, wie an der identischen Stabilität bei pH 5 und pH 3 erkennbar war. Die Stabilität wurde über eine UV/Vis-Kinetik bei einer Wellenlänge von 326 nm ermittelt. N = 3

Zunächst war erkennbar, dass die höchste Stabilität bei einem pH-Wert von 7,0 vorlag. Eine deutliche Verminderung der Stabilität war bei den sauren pH-Werten von 5,0 und 3,0 erkennbar, welche im direkten Vergleich jedoch keinen Unterschied aufwiesen. Bei alkalischen Bedingungen mit pH 9,0 lag die geringste Stabilität vor. Nach 80 h war die Konzentration von BH267.meta [5] bei pH 7,0 auf 67,4 % der ursprünglichen Konzentration gesunken, was den HPLC-Ergebnissen entsprach. Bei pH 3,0 und 5,0 fielen die Konzentrationen nach 80 h auf etwa 50 % der Ausgangskonzentration. Der stärkste Zerfall war bei pH 9,0 zu beobachten. Hier zersetzte sich BH267.meta [5] nach 80 h auf 43,6 % der Ausgangskonzentration.

4.7.4 Einfluss des Lösemittels

Für eine gute Handhabbarkeit im Labormaßstab ist die Stabilität von BH267.meta [5] in verschiedenen Lösemitteln wichtig. Um diese zu prüfen, wurde die Substanz in dem zu prüfenden Lösemittel bei Raumtemperatur gelagert und an mehreren Zeitpunkten untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.28 dargestellt.

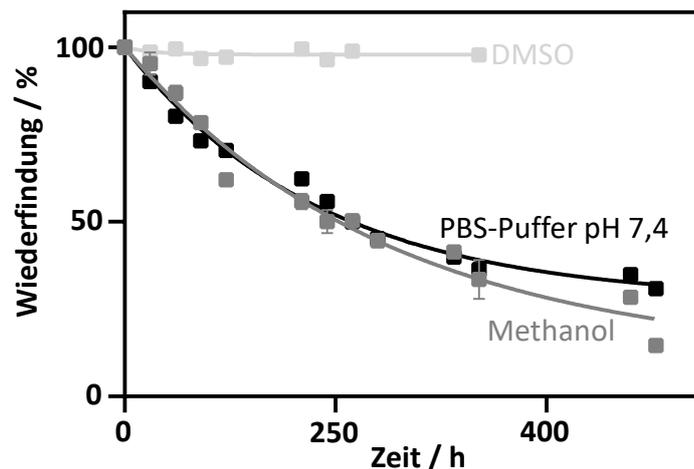


Abb. 4.28: Stabilität von BH267.meta [5] bei verschiedenen Lösemitteln. BH267.meta [5] zeigte im Vergleich zu PBS-Puffer pH 7,4 keine veränderte Stabilität in Methanol. Die Substanz war allerdings stabil in DMSO, sodass nach 14 Tagen keine Zersetzung detektierbar war.

Es ergab sich dabei, dass Methanol lediglich einen sehr geringen Einfluss auf die Stabilität im Vergleich zu PBS-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 aufwies. In den ersten Tagen verhielten sich die Proben in Methanol und PBS-Puffer nahezu identisch. Die Halbwertszeit lag bei beiden Lösemitteln bei etwa 9 Tagen. Eine deutliche Erhöhung der Stabilität zeigte hingegen DMSO, bei diesem Lösemittel zeigte sich auch nach 14 Tagen kein Zerfall über 5 %.

4.7.5 Einfluss von Stickstoffatomen auf die Stabilität der FNT-Inhibitoren

Um eventuelle Stabilitäts-beeinflussende Faktoren der Inhibitoren-Struktur zu untersuchen, wurden verschiedene FNT-Inhibitoren bei Raumtemperatur in PBS-Puffer mit physiologischem pH-Wert untersucht. Dabei wurde zunächst der Einfluss des neu eingefügten Stickstoffatoms in die aromatische Komponente der Inhibitoren betrachtet. Zum Vergleich wurden [3] ohne ein Stickstoffatom, BH267.meta [5] mit einem Stickstoffatom (vgl. Kap. 4.7.1) und [8] mit zwei Stickstoffen untersucht.

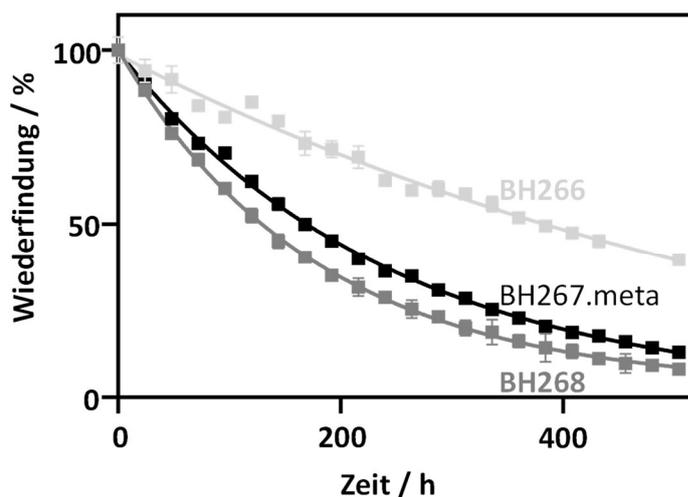


Abb. 4.29: Stabilität verschiedener Inhibitoren mit unterschiedlicher Anzahl von Stickstoffatomen. Die Stabilität der Inhibitoren nimmt mit der Anzahl an Stickstoffen in der aromatischen Komponente ab.

In Abb. 4.29 ist erkennbar, dass sich die Einführung eines Stickstoffes negativ auf die Stabilität des Inhibitors auswirkte. Nach 24 h lagen noch 94 % von [3] vor, von BH267.meta [5] hingegen nur 90,17 % und von [8] 88,45 %. Die Halbwertszeit von [3] lag bei 384 h (etwa 16 Tagen), was einer Verbesserung um mehr als den Faktor 2 im Vergleich zu BH267.meta [5] mit einer Halbwertszeit von 168 h (etwa 7 Tage) entsprach. Die Einführung eines zweiten Stickstoffatoms verringerte die Stabilität weiter, jedoch nicht in dem Ausmaß nur eines eingefügten Stickstoffes. Die Halbwertszeit von [8] verringerte sich auf ungefähr 120 h (5 Tage). Das entsprach einer Reduktion von etwa 28 % im Vergleich zu BH267.meta [5]. Zum Ende der Messungen nach 21 Tagen lagen noch 39,69 % von [3] vor. Der Gehalt von BH267.meta [5] lag bei 12,98 %. Und von [8] waren lediglich 8,09 % der ursprünglichen Konzentration vorhanden.

4.7.6 Einfluss von Substituenten an der aromatischen Komponente auf die Stabilität der FNT-Inhibitoren

Aufgrund einer verringerten Elektronendichte des Pyridin-Ringes im Vergleich zum Benzen-Ring, wurde der Einfluss auf die Stabilität durch Substituenten untersucht, die durch +I- oder +M-Effekte die Elektronendichte erhöhen. Für diese Fragestellung wurden die bereits untersuchten Inhibitoren BH297 [10] und [12] verwendet, welche jeweils eine Methoxygruppe und einen Methylsubstituenten aufwiesen.

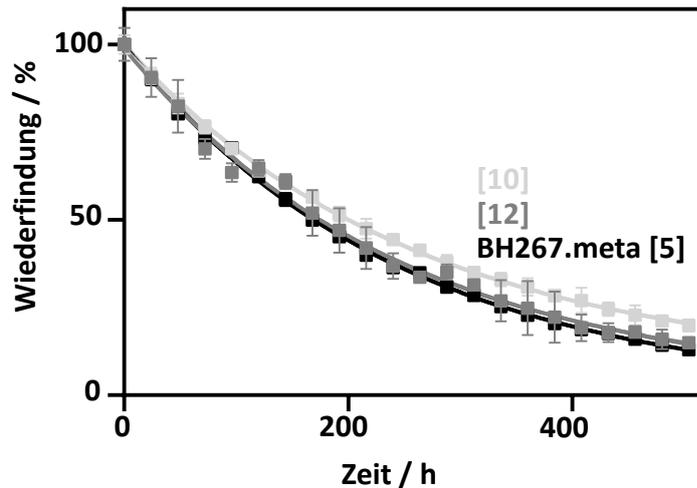


Abb. 4.30: Stabilität unterschiedlicher Pyridin-haltiger Inhibitoren mit unterschiedlichen Substituenten. Die untersuchten Substituenten zeigten nur einen sehr geringen Einfluss auf die Stabilität der Inhibitoren.

Die Abb. 4.30 zeigt, dass der Substituent an der para-Position des Aromaten nur einen geringen Einfluss auf die Stabilität des Inhibitors hat. Zwischen BH267.meta [5] und [12] waren keine nennenswerten Unterschiede erkennbar. Nach 24 h waren noch 90,17 % von BH267.meta [5] und 90,52 % von [12] vorhanden. Von BH297 [10] waren nach 24 h noch 91,01 % vorhanden. Nach 168 h war von BH267.meta [5] die Halbwertszeit erreicht und der Stoff lag mit einer Konzentration von 49,90 % vor. Bei [12] waren zu dieser Zeit noch 51,89 % vorhanden und bei BH297 [10] 56,45 %. Nach 21 Tagen waren noch 12,98 % von BH267.meta [5] vorhanden (vgl. Kap. 4.7.1), von [12] lagen noch 15,01 % vor und der Gehalt von BH297 [10] war auf 19,89 % der ursprünglichen Konzentration gefallen.

4.8 Neue PfFNT-Resistenzmutanten

Der Inhibitor BH267.meta [5] hatte eine verringerte Wahrscheinlichkeit resistente Parasiten im Labormaßstab hervorzubringen. Nach vielen Versuchen gelang es allerdings am Bernhard-Nocht-Institut Parasiten zu generieren, die zwei weitere, bisher unbekannte Mutationen aufwiesen. Diese Mutationen waren PfFNT G21E, eine Mutation am N-Terminus des PfFNT und PfFNT V196L, eine Mutation, welche in der cytoplasmatischen Konstriktionsstelle vorlag. In Zusammenarbeit mit Jana Schmidt wurden diese Resistenzmutanten weiter untersucht (vgl. Abb. 4.31).

Die Expression in *S. cerevisiae* wurde mittels Western Blot überprüft (vgl. Kap. 3.2.5). Die Proteine waren in der mikrosomalen Fraktion der Hefe vorhanden und konnten daher weiter getestet werden.

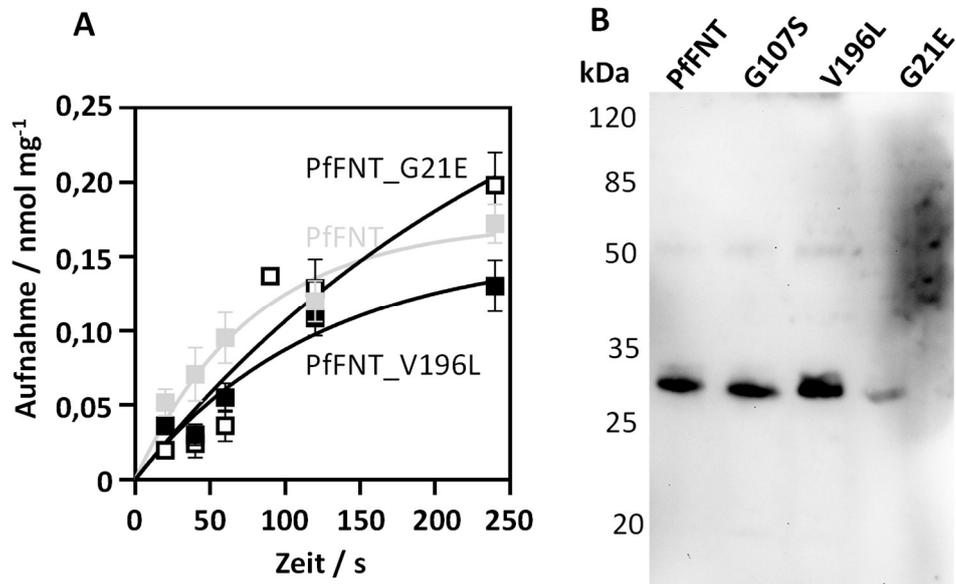


Abb. 4.31: Neue PffNT Resistenzmutanten. Die neuen Resistenzmutanten PffNT G21E und PffNT V196L wurden von Jana Schmidt kloniert und erfolgreich in der Hefe exprimiert. Sie konnte ebenso zeigen, dass die Mutanten eine Leitfähigkeit für Lactat aufwiesen, diese war jedoch langsamer als beim Wildtyp-PffNT. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04 μ Ci ¹⁴C-markiertes-L-Lactat, pH 6,8. N = 3

Des Weiteren wurde die L-Lactat-Aufnahme mit ¹⁴C-markiertem Substrat überprüft, hierbei war auffällig, dass beide Resistenzmutanten L-Lactat langsamer leiten konnten als der Wildtyp. Die Mutationen sollten somit im Vergleich zum Wildtyp-PffNT einen Nachteil für den Parasiten darstellen. Für die Untersuchung der Inhibitoren bedeutete diese langsamere Aufnahme eine Verlängerung der Substratinkubationszeit auf 2 min, um eine ausreichende Aufnahme zu gewährleisten.

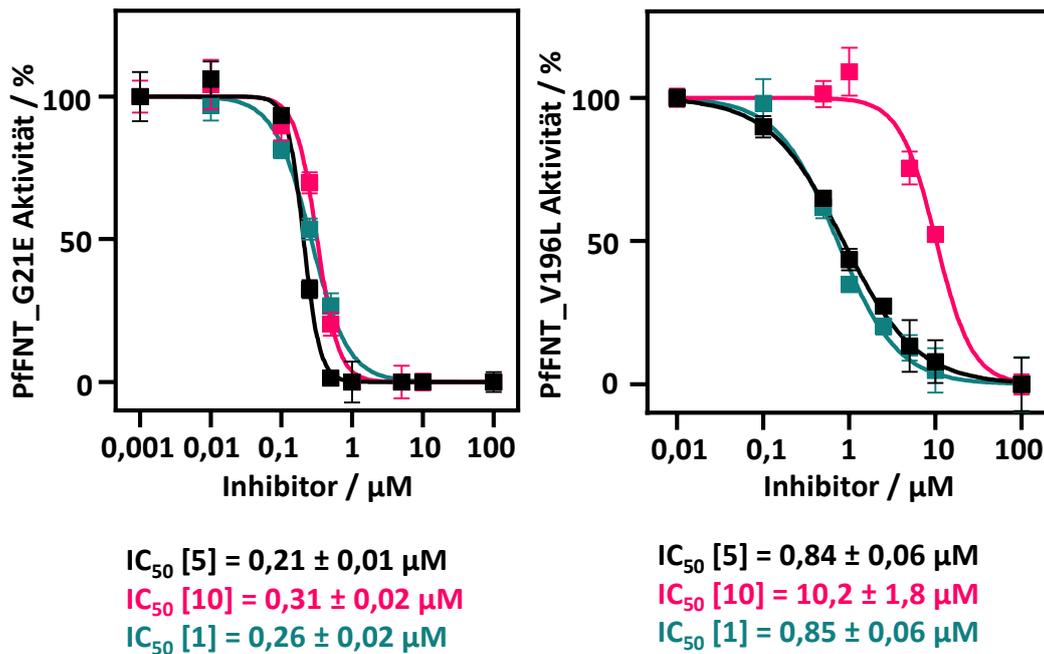


Abb. 4.32: IC_{50} -Werte gegen die neuen Resistenzmutanten PfFNT G21E und PfFNT V196L. Die Inhibition der Substanzen gegen G21E war mit denen von PfFNT vergleichbar. PfFNT V196L zeigte dagegen ein heterogeneres Bild. Während BH267.meta [5] und MMV007839 [1] eine schwächere Inhibition zeigten, sich aber noch im nanomolaren Bereich befanden, zeigte BH297 [10] mit einem IC_{50} -Wert von etwa 10 μM nur noch eine sehr schwache Hemmung. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar. Substrat: 1 mM L-Lactat + 0,04 μCi ^{14}C -markiertes-L-Lactat, pH 6,8. N = 3

Es wurden weiterhin die IC_{50} -Werte der bisher gut untersuchten Inhibitoren BH267.meta [5], BH297 [10] und MMV007839 [1] gegen G21E und V196L getestet (Abb. 4.32). Dabei fiel zunächst auf, dass sich die Substanzen gegen PfFNT G21E mit 0,21 μM (BH267.meta [5]), 0,31 μM (BH297 [10]) und 0,26 μM (MMV007839 [1]) untereinander ähnlich verhalten und die Resistenzmutante um den Faktor 2-3 schlechter hemmten als PfFNT. Anders stellt sich die Lage jedoch bei V196L dar. Der IC_{50} -Wert von BH297 [10] war besonders auffällig. Die Punktmutation verringerte die Inhibition um den Faktor 100 im Vergleich zum Wildtyp PfFNT. Somit erreichte BH297 [10] lediglich einen IC_{50} -Wert von 10,2 μM . Die weiteren Inhibitoren BH267.meta [5] und MMV007839 [1] zeigten ebenso eine schwächere Inhibition mit 0,84 μM und 0,85 μM . Die beiden Inhibitoren wiesen im Vergleich zum PfFNT-Wildtyp eine um den Faktor 7 schwächere Hemmung für PfFNT V196L auf.

Generell führten die neuen Resistenzmutanten G21E und V196L zu einer geringeren Hemmbarkeit durch die getesteten Inhibitoren. Besonders auffällig dabei war BH297 [10] mit einem IC_{50} von 10,2 μM gegen V196L. Allerdings befanden sich die übrigen IC_{50} -Werte noch im submikromolaren Bereich.

4.9 Toxikologisches Profil der FNT-Inhibitoren

4.9.1 Wirkung auf humane Zelllinien und hERG Aktivität

In verschiedenen Kooperationen wurde das toxikologische Profil von BH267.meta [5] sowie einiger Derivate bestimmt. Zunächst wurde von Till Priegann aus der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Dennis Schade am Pharmazeutischen Institut der Uni Kiel der Effekt der Substanzen auf humane Zelllinien untersucht.¹⁶¹ Dabei wurden HEK293 Zellen verwendet, um die allgemeine Toxizität abschätzen zu können, und HepG2 Zellen, welche eine erste Aussage auf die Hepatotoxizität geben können. Es wurden die ATP-Spiegel mittels des CellTiterGlo™-Kits bestimmt und ein reduktives Milieu mit einem Resazurin-Assay untersucht. Weiterhin wurde der proliferative Effekt über das Auszählen der Zellkerne bestimmt. Als Zeitpunkte wurden 8 und 24 h ausgewählt, um eine akute Toxizität untersuchen zu können. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.33 dargestellt.

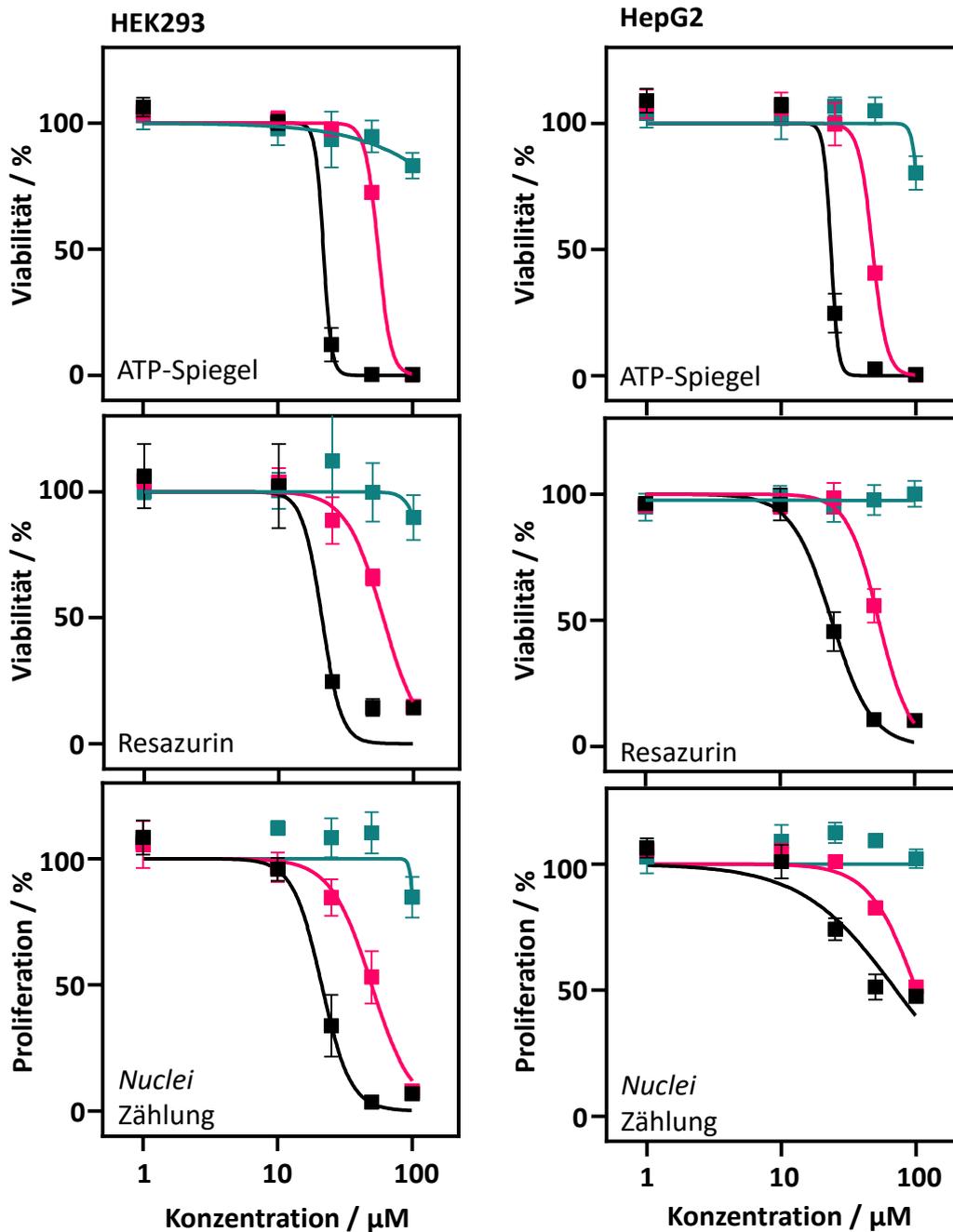


Abb. 4.33: Toxizität gegen die menschliche Zelllinien HEK293 und HepG2. Bei allen untersuchten Parametern, wie dem ATP-Spiegel, reduktiven Metabolismus (Resazurin-Assay) und der Proliferation (Anzahl der Zellkerne) zeigten die Substanzen MMV007839 [1] und BH297 [10] lediglich eine schwache Wirkung von etwa 10 µM. Bei BH267.meta [5] war bei 100 µM nur ein schwacher Effekt erkennbar. Die Messung erfolgte durch Till Priegann.

Es zeigte sich dabei, dass BH297 [10] und MMV007839 [1] in allen Assays einen EC_{50} -Wert von jeweils etwa 10 µM aufwiesen, was einem Sicherheitsfaktor von 100 im Vergleich zur Inhibition von PfFNT entsprach. BH267.meta [5] schien noch besser verträglich für die getesteten Zelllinien zu sein. Die höchste eingesetzte Konzentration von 100 µM zeigte nur eine geringfügige Beeinträchtigung der Zellen.

Ein zweiter wichtiger Punkt, welchen es bereits früh in der Entwicklung eines neuen Arzneistoff-Moleküls zu adressieren gilt, ist die Wirkung am hERG-Kanal. Die arzneistoffinduzierte Hemmung dieses spannungsaktivierten Kaliumkanals in Herzmuskelzellen kann zu einer potenziell tödlichen *torsade-du-pointe* Arrhythmie führen. Es gibt kaum eine zuverlässige Methode, bedingt durch die strukturelle Diversität der hERG-Inhibitoren, um eine solche Hemmwirkung *in silico* auszuschließen.^{162–164} Daher wurde dieser potenzielle Effekt von Dr. Marianne Musinski in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Thomas Baukrowitz über eine TEVC-Messung überprüft. Weder BH267.meta [5], noch ein anderer getesteter Vertreter (MMV007839 [1], BH297 [10] und [8]) der Substanzklasse zeigten eine Hemmung des hERG-Kanals bei 100 µM.

4.9.2 Off-Target-Effekte der FNT-Inhibitoren auf hMCT1

Neben der Inhibition von PfFNT und PfFNT G107S, sowie der Wirksamkeit gegen *P. falciparum* *in vitro*, ist es wichtig, dass keine humanen Transportproteine inhibiert werden. Die Aufgabe des L-Lactat-Transportes, welche PfFNT im Parasiten erfüllt, übernimmt im Menschen der hMCT1. Dieser unterscheidet sich funktionell und strukturell von den FNTs. Dennoch wurde im Hefe-Assay überprüft, ob eine Hemmung dieses Transporters im Menschen zu erwarten wäre.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde hMCT1 analog zu FNT untersucht (vgl. Kap. 3.5.3). Als Inhibitoren wurden wieder BH267.meta [5], BH297 [10] und MMV007839 [1] verwendet.

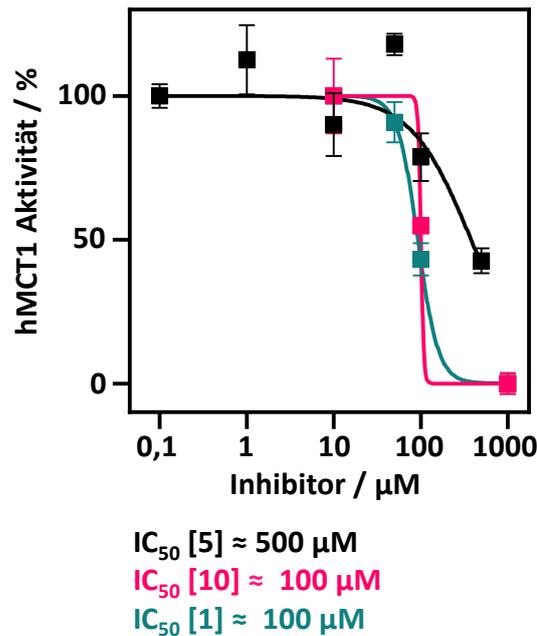


Abb. 4.34: Inhibition von hMCT1 durch Pentafluoro-3-hydroxy-pent-2-one. Keine der getesteten Substanzen zeigte eine physiologisch bedeutsame Hemmung von hMCT1. MMV007839 [1] und BH297 [10] zeigten ein IC_{50} von etwa 100 μM , BH267.meta [5] hemmte hMCT1 lediglich mit etwa 500 μM . Die Fehlerbalken stellen den SEM dar. N=3

Generell ist in Abb. 4.34 erkennbar, dass hMCT1 nur in hohen Konzentrationen von den Substanzen inhibiert wurde. BH297 [10] und MMV007839 [1] hatten ein IC_{50} von etwa 100 μM . Beide Inhibitoren waren in der Lage hMCT1 mit einer Konzentration von 1000 μM vollständig zu hemmen. BH267.meta [5] inhibierte hMCT1 nur mit einem IC_{50} -Wert von etwa 500 μM . Aufgrund der Löslichkeit war dies die höchste getestete Konzentration. Der Transporter hMCT1 zeigte dabei noch eine Restaktivität von 42,7 %. Zusammenfassend waren die Substanzen um den Faktor 1000-5000 weniger affin für hMCT1 als für das eigentlich *target* PfFNT.

4.10 BH267.meta-Aktivität im *in vivo* Maus-Modell

In Kooperation mit dem Schweizer Tropen- und Public Health-Institut wurden die ersten Versuche für die Substanzklasse mit BH267.meta [5] im Maus-Modell durchgeführt. Hierfür wurden Mäuse mit dem Malaria-Parasiten *P. berghei* infiziert. Der Testgruppe (n = 4) wurde eine Suspension mit unterschiedlichen Dosen BH267.meta [5] (3, 10, 30 und 50 mg/kg Körpergewicht) *peroral* verabreicht, die Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Daraufhin wurden

Blutproben entnommen und die Parasitämie bestimmt. Die Kontrollgruppe wies dabei eine hohe Parasitenlast von durchschnittlich 73,7 % auf. Die mit BH267.meta [5] behandelte Testgruppe zeigte dagegen keine nachweisbaren Parasiten im Blut. In der Beobachtungszeit zeigten die Mäuse zusätzlich keine Symptome, die auf eine toxische Wirkung zurückzuführen wären. Das Körpergewicht der Mäuse blieb während der Versuche gleich. Anschließend wurden die Mäuse unbehandelt weiter beobachtet. Treten keine neuen infektionsbedingten Symptome auf, gilt die behandelte Tier als geheilt. Die Kontrollgruppe wurde nach durchschnittlich 4 Tagen euthanasiert. Die Testgruppe mit einer Dosis von 3 mg/kg Körpergewicht überlebte für 8 Tage, bei 10 mg/kg Körpergewicht betrug die Überlebenszeit durchschnittlich 10,6 Tage und bei 30 mg/kg Körpergewicht und 50 mg/kg Körpergewicht 13 bzw. 13,6 Tage.

Somit zeigte BH267.meta [5] eine *in vivo* Wirksamkeit und keine akuten toxischen Effekte.

5 Diskussion

5.1 Ist hMCT11 ein Monocarboxylat-Transporter?

Zunächst soll die Frage diskutiert werden, ob es sich bei dem *humanen* Monocarboxylat-Transporter 11 um einen protonenabhängigen Transporter von kurzkettigen Monocarboxylaten handelt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde das Protein mit verschiedenen Expressionssystemen getestet. Während dieser Versuche zeigte das hMCT11 keine Transportaktivität für die getesteten Monocarboxylate. Im Folgenden soll daher erörtert werden, ob das Protein in ausreichender Menge produziert wurde, ob es sich um funktionales Protein handelt und ob die Methode prinzipiell geeignet ist, um einen derartigen Transporter zu untersuchen.

5.1.1 Eignung der Methoden zur Untersuchung von Monocarboxylat-Transporter

Zunächst stellt sich die Frage, ob die verwendeten Systeme für die Untersuchung von Monocarboxylat-Transportern geeignet sind. Das verwendete Hefe-System mit *S. cerevisiae* bedarf hierbei genauerer Betrachtung. Generell ist die Bäckerhefe einer der am besten untersuchtesten Labororganismen, dessen Genom vollständig sequenziert ist und der leicht gentechnisch manipulierbar ist. Weiterhin ist *S. cerevisiae* in der Lage, weite Temperatur- und pH-Bereiche zu tolerieren.¹⁶⁵ Prinzipiell war es auch möglich einen *humanen* Monocarboxylat-Transporter funktional herzustellen, wie am hMCT1 gezeigt wurde. Sowohl die Expression als auch die Aufnahme und eine Inhibition wurden bereits an diesem Transporter im Hefe-System beschrieben.^{57,155}

Weiterhin wurde ebenso das Zellfrei-System für hMCT11 etabliert. Dieses wurde bereits von Dr. Folkand Helmstetter verwendet, um EhFNT zu produzieren und zu vermessen.¹²⁴ Dieses Protein wurde ebenso im Hefe-System untersucht und konnte in diesem nicht erfolgreich hergestellt werden. Somit stellt die zellfreie Proteinsynthese eine valide Alternative dar, welche bei Nicht-Eignung des Hefe-Systems verwendet werden kann. Die zellfreie Proteinsynthese umgeht viele Einschränkungen, die die Expression in zellulären Systemen betrifft. So lassen sich Proteasen leicht inhibieren und die Bausteine der Synthese können optimiert werden. Es kann weiterhin nicht dazu kommen, dass der eingebaute Transporter zytotoxische Substanzen in die Zelle transportiert oder essenzielle Stoffe herausschleust.

5.1.2 Rekombinante Herstellung von hMCT11

Die rekombinante Herstellung von hMCT11 war erfolgreich. Es wurden zwei Systeme etabliert, welche in der Lage waren, hMCT11 zu produzieren. Jedoch waren die Banden im Western Blot im Hefesystem bei hMCT11 um ein Vielfaches schwächer als beim hMCT1 (vgl. Abb. 4.1). Dies deutet auf ein sehr geringes Expressionslevel von hMCT11 hin. Eine Zelle benötigt nur wenige Transporter an der Oberfläche, um ausreichend Substrat zu transportieren.¹⁶⁶ Allerdings ist unklar, ob hMCT11 überhaupt an die Zellmembran gelang und ob es dann in ausreichender Menge für das verwendete Radioassay vorlag. Es wurden diverse Ansätze zur Erhöhung der Expression getestet. Zum einen wurde hMCT11 als Wildtyp untersucht und unverändert in die Hefe eingebracht. Dieser Ansatz lieferte sehr geringe Mengen Protein, welche nur einen Bruchteil der Bandenintensität vom funktionalen hMCT1 im Western Blot darstellen. Zum anderen wurde eine codonoptimierte Variante des hMCT11 verwendet. Bei dieser Sequenz wurden für *S. cerevisiae* untypische Codons entfernt und gegen solche ausgetauscht, welche zwar für die gleiche Aminosäure codieren, jedoch im Genom der Hefe häufiger auftreten. Beispiele für solche untypischen Sequenzen sind Poly-A- und Poly-T-Bereiche, sowie ungewollte *splice* Regionen.^{167,168} Ein solcher Ansatz sollte die Menge des hergestellten Proteins erhöhen. Der gewünschte Effekt blieb jedoch aus und die Intensität der Western Blot Banden erhöhten sich nicht. Keine nachweisbare Expression im Western Blot zeigten die Fusionsproteine mit dem postulierten hMCT11-Chaperon Basigin, sowie die in menschlichen Zellen gegen den Proteasom-Abbau stabilere hMCT11 P2D-Mutante.

Eine mögliche Erklärung für diese geringe Expression ist das Protease-System von *S. cerevisiae*, welches das fremde Protein erkennt und degradiert. Dieser Abbau wird in den meisten Fällen durch eine fehlerhafte Faltung induziert. Die beschriebene Degradation ist nicht auszuschließen, unterstünde jedoch einem anderen Mechanismus als die Ubiquitylierung in menschlichen Zellen, da diese nicht durch die P2D-Mutante umgangen werden kann.⁶¹ Eine fehlerhafte Faltung kann Grund für eine Degradation sein, diese wäre jedoch losgelöst von der Basigin-induzierten Faltungskontrolle der MCT, da diese bei den getesteten Basigin-Chimären vorhanden ist.⁵⁷ Weiterhin sollte *S. cerevisiae* in der Lage sein, dass codonoptimierte hMCT11 in ausreichender Menge herzustellen, da die für die Hefe untypischen Codons entfernt wurden. Es bleibt jedoch eine Ungewissheit, dass hMCT11 durch einen anderen Mechanismus in der Hefe abgebaut wird, die Fehlfaltung trotz Basigin Chimäre auftreten kann oder unbekannte Gründe für eine unzureichende Menge an Protein vorliegen.

Diese Einschränkungen des Hefe-Systems, wurden jedoch mit der zellfreien Proteinsynthese angegangen. Dieses System basiert zum einen auf dem Expressionssystem von *E. coli* und ist damit von der eukaryotischen Hefe *S. cerevisiae* vollkommen losgelöst. Und da das Translationssystem variabel extern hinzugefügt wird, ist ein Mangel kritischer Substanzen, wie der tRNA, ausgeschlossen. Zum anderen konnte mit einfachen Mitteln die Proteaseaktivität inhibiert werden, sodass in diesem Zellfrei-System das Protein nicht vorzeitig abgebaut wurde. Unter diesen optimierten Bedingungen war es möglich bis zu 1 mg gereinigten hMCT11-Proteins zu produzieren. Diese Menge reicht für Transportstudien und Ansätze der Strukturaufklärung aus. Zusätzlich zeigt sich durch die Expression einer fluoreszierenden GFP-Chimäre, dass das Protein lange genug von den Detergenzien solubilisiert wird, sodass sich das Fluorophor von GFP ausbilden kann.¹⁴² Jedoch konnte auch in Proteoliposomen keine Leitfähigkeit des Proteins gemessen werden. Mögliche Fehler könnten hier z.B. das Ausbleiben der Rekonstitution darstellen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das Testsystem der *Stopped-Flow*, welches eher für Proteine mit einer hohen Transportrate, wie die Aquaporine oder PffNT verwendet wird,¹⁶⁹ nicht für die Messung mit den eher langsamen Monocarboxylat-Transportern geeignet war.

Es wurde bisher allerdings kein Substrat von hMCT11 sicher beschrieben und bestätigt.^{63,170} Daher besteht die Möglichkeit, dass die getesteten Substanzen keine Substrate für hMCT11 darstellen und daher keine Funktion festgestellt wurde. Somit konnten die Ergebnisse von Rusu *et al.*⁶¹ mit den ausgewählten Tests nicht bestätigt werden.

5.2 Inhibitor-Entwicklung gegen PffNT

Wie bereits ausgeführt, ist der Malaria-Parasit *P. falciparum* von dem Lactat-Transport durch PffNT abhängig, um ein letales Absinken des pH-Wertes im Zytosol zu vermeiden. Die Hemmung dieses Transportproteins ist eine Chance, eine neue Wirkstoff-Klasse gegen Malaria zu entwickeln. Die effiziente Hemmung von PffNT wurde mit MMV007839 [1] erreicht. Der Inhibitor zeigte zudem entsprechende *in vitro* Wirksamkeit in *P. falciparum*. Allerdings wurde die Resistenzmutante PffNT G107S gebildet, was ein neues Ziel in der Inhibitorentwicklung gesetzt hat. Ein Inhibitor sollte neben einer Inhibition von PffNT auch PffNT G107S hemmen. In diesem Abschnitt soll erläutert werden, wie diese Resistenzmutation umgangen werden konnte und wie ein solcher Inhibitor sich in dem Malaria Parasiten *P. falciparum* verhalten könnte.

5.2.1 Eignung des Hefe-basierten Aufnahmeassays

Das verwendete Hefe-Assay wurde bereits an vielen Stellen zur Untersuchung von PfFNT verwendet. Die hohen Transportraten von PfFNT ermöglichen es dabei in einer kurzen Messzeit eine ausreichende Menge L-Lactat und damit auch einen entsprechenden Anteil von ^{14}C -markiertem Substrat aufzunehmen. Aufgrund dessen wurden schnell ausreichend hohe Signale erzielt, um bei einer hohen Probenzahl schnell reproduzierbare Ergebnisse zu produzieren. Die Messung von L-Lactat hat dabei gegenüber anderer PfFNT Substraten, wie Formiat oder Acetat, den Vorteil, dass es einen geringen Hintergrund erzeugt.^{4,119,125} Die Methode ist für starke Inhibitoren mit einem IC_{50} -Wert von etwa 100 nM optimiert. Aufgrund größer werdender Schwankungen im höheren Konzentrationsbereich wies die Methode jedoch größere Fehlerbereiche bei schwachen Inhibitoren mit hohen IC_{50} -Werten im mikromolaren Bereich auf. Diese wurden allerdings aufgrund der geringeren Bedeutung schwach hemmender Substanzen toleriert.

Die Übertragbarkeit der IC_{50} -Werte im Hefe-System auf die *in vitro* Wirksamkeit im Parasiten-System ist bei der Generation von PfFNT-Inhibitoren ohne das Vorliegen der Hemiketalen-Transportform deutlich erschwert worden. Eine sehr gute Affinität eines Inhibitors im Hefe-System war nun nicht mehr auf den Parasiten übertragbar, sondern erforderte einzelne aufwendigere *in vitro* Messungen.

5.2.2 Umgehung der PfFNT G107S-Resistenz

Viele Strategien zur Umgehung der Resistenz mittels eines minimalen Inhibitoraufbaus, eines chemischen Linker oder eines kleinen fünfgliedrigen Aromaten anstelle von Benzen führten nicht zu dem gewünschten Resultat eines submikromolaren Inhibitors.¹¹⁷ Daher wurde das resistenzauslösende Serin direkt adressiert. Dieser gezielte Angriff auf die Hydroxygruppe der Serin-Seitenkette, wurde mit dem starken Wasserstoffbrücken-Akzeptor Pyridin durchgeführt. Die Einführung eines Stickstoffes in das Gerüst von Arzneistoffmolekülen hat an vielen Stellen bereits zu einer Verbesserung um etwa drei Größenordnungen geführt.¹⁷¹

Diese Strategie war mit den Substanzen BH267.meta [5] und BH267.ortho [4] erfolgreich und PfFNT G107S konnte erstmalig mit submikromolarer Konzentration gehemmt werden. Die Verwendung von BH267.para [6], war jedoch erfolglos und führte zu einer Verschlechterung der Hemmung von G107S bei gleichbleibender Effektivität gegen PfFNT.

Es besteht daher die Annahme, dass die Verbesserung der Wirkung auf eine Wasserstoffbrückenbindung zurückzuführen ist und keine anderen Eigenschaften von Pyridin eine Rolle spielen. Da sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Inhibitor und Protein am stärksten bei räumlicher Nähe von unter 4 Å und bei einem Winkel von etwa 180 ° (absteigend bis 120 °) ausbilden können,^{172,173} muss das sich Serin in spezifischer Position zu der ortho- und meta-Position befinden. Die para-Position lag demnach außerhalb der Reichweite bzw. im falschen Winkel zum Serin und es kam nicht zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung. Dies bestätigte die Annahme, dass der Aromat des Inhibitors sehr nah an der Position 107 liegt, was dem bereits im Jahr 2017 postulierten Bindemodus der FNT-Inhibitoren entspricht (vgl. Abb. 5.1).¹¹⁹

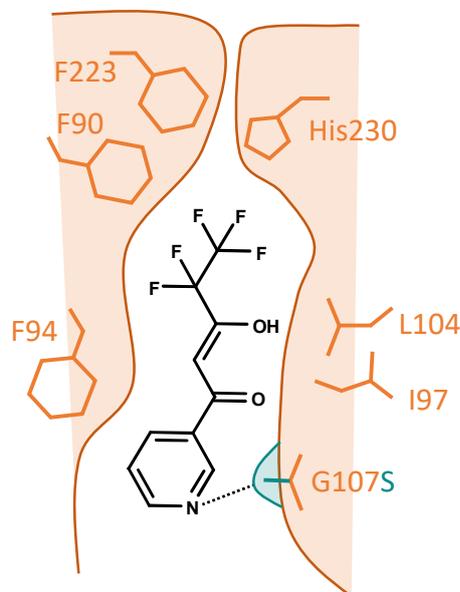


Abb. 5.1: Cartoon zur Visualisierung des postulierten Bindemodus von BH267.meta [5]. Die neuen Stickstoff-haltigen Inhibitoren haben die gleiche Bindetasche, wie MMV007839 [1]. Das rezistenzauslösende Serin bindet mit einer Wasserstoffbrückenbindung an die ortho bzw. meta Position des Pyridin-Rings.

Die Bedeutung der Wasserstoffbrückenbindung der Wasserstoffbrückenbindung für die Affinität des Inhibitors zeigten die Substanzen mit zwei Stickstoffen ([8] und [9]). Es ist bereits ein bekanntes Phänomen, dass Heteroaromaten mit steigender Anzahl an Stickstoffatomen generell schwächere Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden.¹⁷⁴ Dieser Effekt zeigte sich ebenso bei den beiden Inhibitoren [8] und [9]. Hier verschlechterte sich die Inhibition der beiden Strukturen gegenüber PfFNT G107S in den einstelligen mikromolaren Bereich. Daraus lässt sich schließen, dass eine etwas schwächere Wasserstoffbrückenbindung im Vergleich zu Pyridin bereits zu einer deutlichen Verschlechterung der Hemmung führen könnte (vgl. Abb.

5.2). Es ist allerdings zu beachten, dass die beiden Inhibitoren [8] und [9] auch den Wildtyp PfFNT schwächer hemmten, auch wenn die Verringerung des IC_{50} -Werte minimal war und sich diese noch immer im nanomolaren Bereich bewegen.

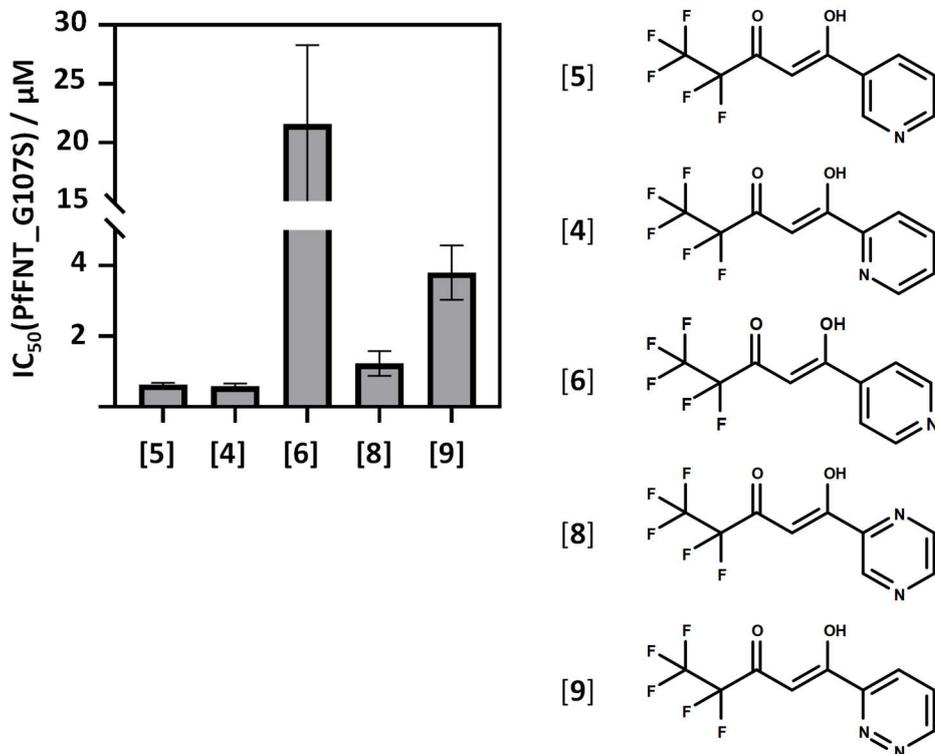


Abb. 5.2: IC_{50} Werte von stickstoffhaltigen Inhibitoren gegen PfFNT G107S. Es zeigte sich eine starke Inhibition von PfFNT G107S durch die Pyridin-Derivate mit einem Stickstoff in *ortho*- oder *meta*-Position. Dies spricht für eine ausgebildete Wasserstoffbrückenbindung, welche allerdings nicht mehr ausgebildet werden kann, wenn sich der Stickstoff in *para*-Position zur vinylogenen Carbonsäure befindet. Weiterhin wurde die Wasserstoffbrücke schwächer mit einer größer werdenden Anzahl an Stickstoffen im aromatischen Ring.

Von den beiden Substanzen BH267.*meta* [5] und BH267.*ortho* [4] ausgehend, gelang ebenso die Synthese weiterer Inhibitoren, welche in der Lage waren, PfFNT und PfFNT G107S in *S. cerevisiae* im nanomolaren Bereich zu inhibieren und somit auf der Proteinebene erfolgreich zu attackieren. Besonders sticht dabei BH297 [10] heraus, welches ein Strukturanalogon zu BH296 [2] darstellt. Der einzige Unterschied bestand dabei in dem Stickstoff-Atom des Pyridins. Dieser Unterschied allein verbesserte die Wirkung hingegen um nahezu den Faktor 10.

Der nächste Schritt in der Inhibitorentwicklung stellte die Übertragung vom Hefe-System auf das *in vitro* System von *P. falciparum* in menschlichen Erythrozyten dar. Diese im Hamburger Bernard-Nocht-Institut durchgeführten Versuche zeigten, dass viele Inhibitoren, welche auf im Hefe-Assay nanomolare Wirkungen zeigten, die Parasiten nicht effizient genug hemmen konnten. In diese Kategorie fiel auch BH297 [10], die Substanz mit der besten Hemmwirkung

im Hefe-System. Ein wahrscheinlicher Grund hierfür war die fehlende Hemiketale-Transportform. Die Aufnahme des Inhibitors in der ungeladenen Transportform scheint der limitierende Faktor für die Hemmung vieler Inhibitoren zu sein, welche nun vergleichbare EC_{50} -Werte zeigten wie BH296 [2].

Allerdings gelang es mit BH267.meta [5] das Wachstum von *P. falciparum* mit einem nanomolaren EC_{50} -Wert zu inhibieren, welcher vergleichbar mit der Malaria-Box Substanz MMV007839 [1] war. Somit wurde der erste Inhibitor entwickelt, welcher ohne das Vorhandensein der neutralen Transportform in den Parasiten gelangt und diesen effizient tötet.

5.2.3 Pharmakokinetik von BH267.meta

Es ist auffällig, dass BH267.meta [5] trotz fehlender neutraler Transportform in den Parasiten gelangen konnte. Zusätzlich war es bemerkenswert, dass bereits kleine Änderungen, wie die Position des Stickstoffes oder Änderungen der Substituenten in para-Position, die Hemmung im Parasiten nahezu gänzlich aufgehoben haben.

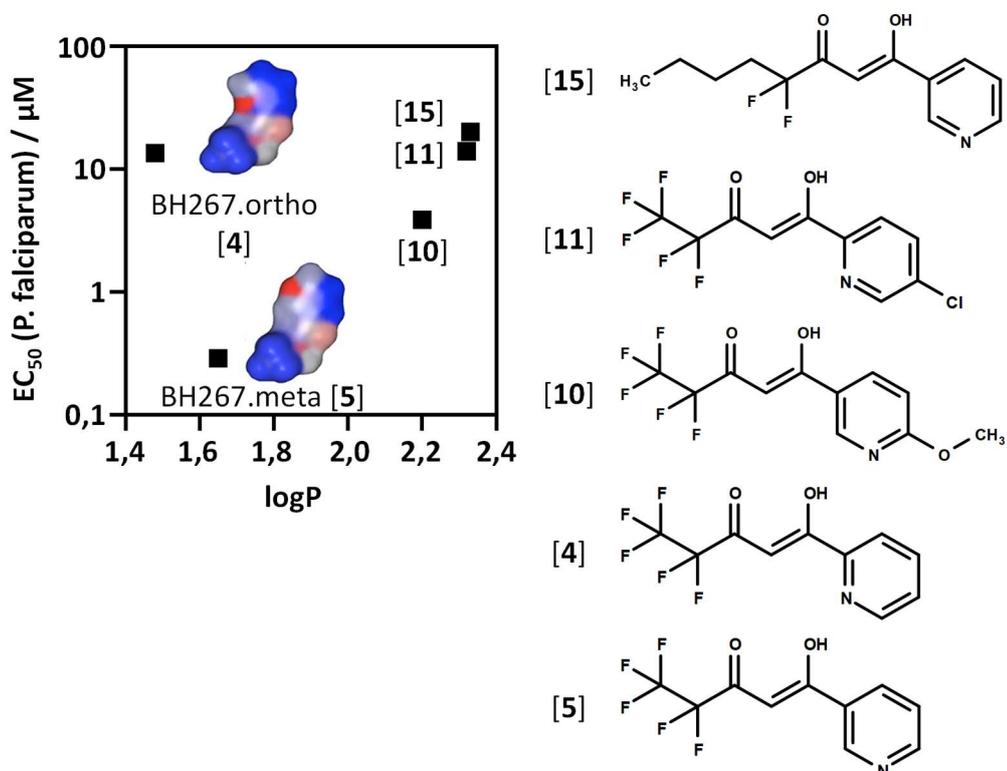


Abb. 5.3: EC_{50} gegen *P. falciparum* gegen den logP. Die gegen *P. falciparum* eingesetzten Inhibitoren wurden gegen den logP-Wert aufgetragen. Zusätzlich ist die elektrostatische Oberfläche von BH267.meta [5] und BH267.ortho [4] angegeben (rot/blau-Skala $\pm 0,5$ kT e).

Dies führt zu der Annahme, dass BH267.meta [5] einen anderen Aufnahmeweg nutzt als die anderen Substanzen. BH267.meta [5] zeigt eine höhere Wasserlöslichkeit und einen niedrigeren logP-Wert im Vergleich zu vielen anderen Inhibitoren. Somit wäre es denkbar, dass BH267.meta [5] einen Nährstofftransporter nutzt und somit in den Parasiten gelangt. Malaria-Parasiten sichern sich Nährstoffe, wie Zucker und Aminosäuren für ihr starkes Wachstum durch den Einbau von Transportern und unselektiver Poren in die Vakuole.^{116,175} Aufgrund der fehlenden Wirkung bei minimalen Modifikationen der Struktur, vor allem bei BH267.ortho [4], das einen ähnlichen logP Wert aufwies, wäre ein diskriminierender Transporter in der Hinsicht wahrscheinlicher. Wird die Elektronenverteilung der Inhibitoren betrachtet (vgl. Abb. 5.3), fallen Unterschiede in der Verteilung der Polarität auf. Während der Stickstoff bei BH267.ortho [4] eher abgeschirmt vorlag, war dieser bei BH267.meta [5] offener zugänglich, was als ein Erkennungsmuster für Aminosäuretransporter denkbar wäre. Diese Transporter erkennen das Substrat häufig durch zwei Wasserstoffbrücken mit der Carbonsäure- und der Stickstoff-Komponente der Aminosäuren.^{176,177} Dies öffnet jedoch eine weitere Möglichkeit für den Parasiten eine Resistenzmutation auszubilden.

5.3 Erkenntnisse über die PffNT-Struktur

Die verschiedenen Inhibitoren geben ebenso Aufschluss über die strukturellen Besonderheiten von PffNT G107S. Um dem nachzugehen wurde das Verhältnis zwischen der Hemmung des Wildtyps und der Resistenzmutante als Faktor in Abb. 5.4 dargestellt.

Die Mutation von Glycin nach Serin scheint nicht nur zu einer lokalen Verengung der Pore zu führen, sondern noch weitere Auswirkungen zu haben. Die Einführung des Serins hat ebenfalls Effekte über längere Distanzen, wie an der Struktur [13] gut erkennbar war. Der eingefügte Chinolin-Ring stellt einen großvolumigen Substituenten dar (vgl. Abb. 4.18). Dieser wurde von dem Wildtyp PffNT toleriert und die Inhibition blieb unverändert. Gegen PffNT G107S zeigte die Verbindung jedoch kaum Wirkung. Eine Erklärung dafür kann die Kanal-ähnliche Struktur der FNTs sein, welche an die Aquaporine erinnert. Diese Proteine weisen einen langen, schmalen Transportweg für das Substrat auf. Ein solcher röhrenähnlicher Kanal ist meist rigide, da bereits leichte Knicke den Transport stark beeinträchtigen können.^{7,8,178–180} Das Serin könnte eine solche Kurve oder Knick induzieren. Dieser wird von Lactat und Inhibitoren mit kleinen Substituenten toleriert, führt allerdings zu einem Verlust der Inhibition bei

großvolumigen Strukturen. Anhand der Struktur **[10]** ist allerdings erkennbar, dass sich ein Substituent, wie in diesem Fall eine Methoxygruppe, positiv auf die Affinität an PffNT G107S auswirken kann. **[10]** zeigt mit einem Faktor von 2,4 den geringsten Verlust an Hemmwirkung aller Inhibitoren. Dies spricht für eine Interaktion dieser Position mit dem FNT.

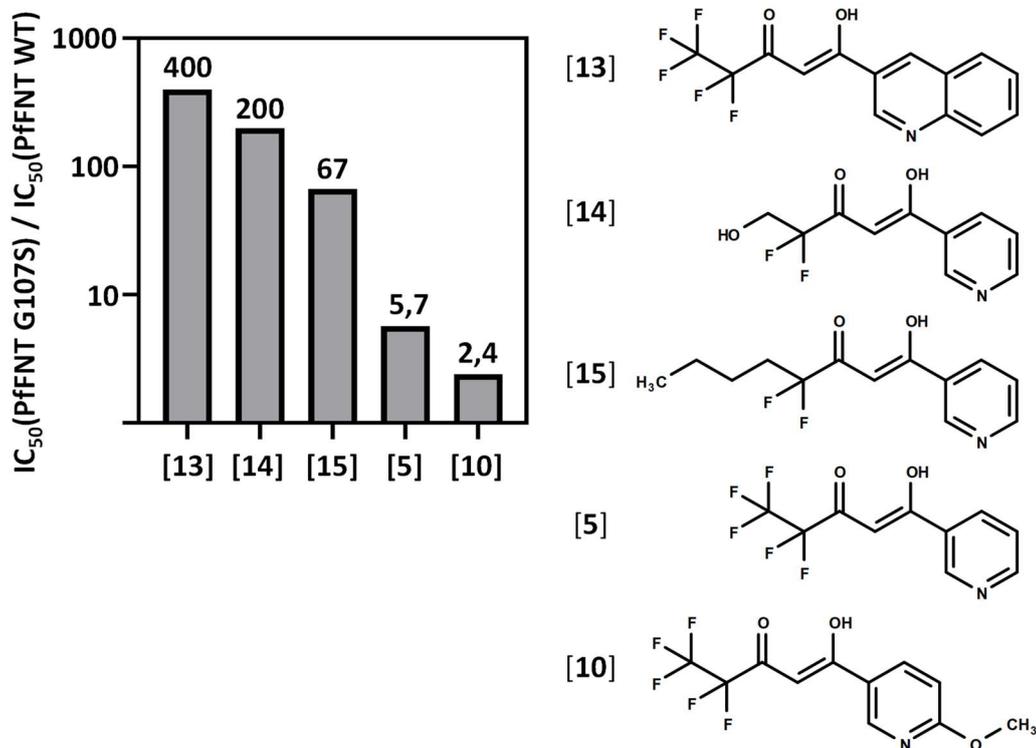


Abb. 5.4: Faktor zwischen dem IC₅₀ gegen PffNT G107S und dem IC₅₀ gegen PffNT. Es zeigt sich bei großvolumigen Inhibitoren wie **[13]** eine massive Verschlechterung des Inhibitors gegenüber PffNT G107S im Vergleich zu PffNT. Ebenso verschlechtern sich Inhibitoren mit einer modifizierten Fluoralkylkette. Kompakte Inhibitoren von BH267.meta **[5]** und BH297 **[10]** können in den rigiden, kanalähnlichen Transportpfad eindringen und diesen blockieren.

Perfluorierte Alkylketten sorgen regelmäßig für Warnmeldungen bei ADME-Berechnungen als potenzielle Schadstoffe für die Umwelt und toxikologisch bedenklich für den Menschen.¹⁵⁷ Diese negativen Eigenschaften und Komplikationen treten allerdings erst ab einer Kettenlänge von vier Kohlenstoffen auf, wie beim Nonafluorobutyl, welches die doppelte Länge der verwendeten Inhibitoren darstellt.^{158,159} Daher waren die beschriebenen Effekte zwar nicht zu erwarten, dennoch sollte dieses Thema adressiert werden. Diese Untersuchungen führten zu neuen Einblicken in die Struktur und den Bindemodus.

Mit den beiden Inhibitoren **[14]** und **[15]** wurde die Zahl der Fluoratome reduziert. Dieses Vorhaben gelang im Hefe-System mit dem Inhibitor **[15]**, welcher einen nanomolaren IC₅₀-Wert aufwies. Damit war es erstmals möglich einen Inhibitor zu generieren, welcher lediglich zwei Halogenatome aufwies. Die Strategie war, einen Halogenanker mit den zwei

Fluoratomen zu schaffen, welcher sich an das Protein binden kann.¹⁸¹ Der längere Alkylteil der Struktur von [15] sollte die fehlende Bindungsfläche der drei entfernten Fluoratome wieder ausgleichen. [14] sollte über die Hydroxygruppe an der Fluoralkylkette eine Wasserstoffbrückenbindung zum zentralen Histidin des PffNT ausbilden und auf diese Weise eine starke Bindung von beiden Seiten des Inhibitors ausbilden.^{124,160}

Betrachtet man jedoch die Hemmwirkung der Substanzen gegen PffNT G107S, fällt ein überproportionaler Wirkverlust auf (vgl. Abb. 5.4). Der aromatische Anteil der Inhibitoren gleicht BH267.meta [5], welcher einen Wirkverlust um den Faktor 5,7 zeigt. [15] zeigt dagegen eine Verschlechterung um den Faktor 67 und [14] eine Verschlechterung der Inhibition über 200.

Der starke Verlust an Bindungsenergie von [15] kann wieder mit der Vorstellung erklärt werden, dass der Transportpfad eines Formiat-Nitrit-Transporter, vergleichbar zu den strukturell ähnlichen Aquaporinen, eine rigide Röhre darstellt. Dieser röhrenförmige Kanal könnte durch die G107S Mutation eine Krümmung erhalten, welche Inhibitoren mit langen bzw. großvolumigen Strukturelementen, wie die Pentylkette von [15], vom Eindringen abhält. Weiterhin bringt die Seitenkette des Serins zwei weitere freie Elektronenpaare in das System ein. Diese scheinen im Proteinumfeld eine Barriere für Hydroxygruppen oder elektronenreiche Strukturen darzustellen. Dies erkläre den Affinitätsverlust von Inhibitoren mit elektronenreichen Heteroaromaten¹¹⁷ und letztlich auch [14]. Dies ließe die Vorstellung zu, dass PffNT G107S einen weitreichenden Effekt hat und durch einen Knick in dem sonst rigiden Transportpfad eine zweite Barriere neben der lipophilen Konstriktion erzeugt.

5.4 Stabilität von PffNT-Inhibitoren

Die Stabilität von neuen Inhibitoren ist aufgrund vieler Faktoren wichtig. Zum einen ist es während der Entwicklungsphase nötig zu wissen, wie lange eine Lösung stabil ist. Eine Substanz, deren wässrige Lösung bereits nach 24 h über 5 % der Stoffmenge verloren hat, muss bei Versuchen frisch angesetzt werden. Ebenso sind die Temperatureinflüsse wichtig, um die Lagerbedingungen abschätzen zu können. Zudem kann die Stabilität bereits als erster Surrogatparameter dienen, um die biologische Halbwertszeit abschätzen zu können. Ein Stoff kann im Blut nicht länger vorhanden sein als die chemische Stabilität in PBS-Puffer bei 37 °C es zulässt. Damit können keine genaueren pharmakokinetischen Studien ersetzt werden, aber es kann als ein günstiger Test während der Entwicklung eingesetzt werden.

5.4.1 Lagerstabilität von BH267.meta

Die Stabilität von BH267.meta [5] Lösungen wurde hauptsächlich in wässrigen Lösungen untersucht. Diese verhalten sich wie erwartet. Die Stabilität steigt bei niedrigeren Temperaturen und neutralem pH-Wert, wie in Tab. 5.1 zusammenfassend dargestellt. Allerdings war die Lösung lediglich bei -20 °C ausreichend stabil und zeigt keinen Zerfall über 5 % in den ersten 24 h. Somit müssen wässrige Lösungen von BH267.meta [5] entweder frisch hergestellt oder eingefroren werden. Die Lagerung des Feststoffes bei Raumtemperatur war allerdings problemlos möglich. Auch bei 37 °C war der Inhibitor über 6 Monate stabil. Diese Toleranz gegenüber hoher Temperaturen war ein wichtiger Faktor für den Einsatz in fester Arzneiform in Subsahara-Afrika.¹⁸²

Tab. 5.1: Übersicht der Halbwertszeit von BH267.meta [5] bei unterschiedlichen Bedingungen.

| Bedingung | Halbwertszeit / Tage |
|---------------------------------|----------------------|
| PBS-Puffer, pH 7,4, Raumtemp. | 9 |
| PBS-Puffer, pH 7,4, 37° | 1 |
| PBS-Puffer, pH 7,4, Kühlschrank | 28 |
| Methanol, Raumtemp. | 8 |
| Phosphat-Puffer pH 5, Raumtemp. | 3,3 |
| Phosphat-Puffer pH 9, Raumtemp. | 2,8 |

Für Labormessungen kann das häufig eingesetzte und selbst sehr stabile Lösemittel DMSO verwendet werden.¹⁸³ Es wurde dabei über 14 Tage kein Zerfall festgestellt. Damit ist davon auszugehen, dass die Lagerung einer DMSO-Lösung bei niedrigen Temperaturen problemlos möglich ist.

5.4.2 Einfluss der Inhibitor-Struktur auf die Stabilität

Wie in Kap. 4.7.5 beschrieben, sinkt die Stabilität der Inhibitoren mit steigender Anzahl an Stickstoffatomen. Aufgrund diverser Analysemethoden wie UV/Vis-Spektroskopie und Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass die Inhibitoren wieder in die korrespondierenden Edukte zerfallen. Dies wurde durch den analogen Anstieg von 4-Acetylpyridin beim Zerfall von BH267.meta [5] bestätigt. Aufgrund dessen lässt sich der in Abb. 5.5 schematisch dargestellte Zerfall annehmen. Diese Zerfallsreaktion beginnt mit dem

nukleophilen Angriff von Wasser am doppelt gebundenen Kohlenstoffatom der vinylogenen Carbonsäure.

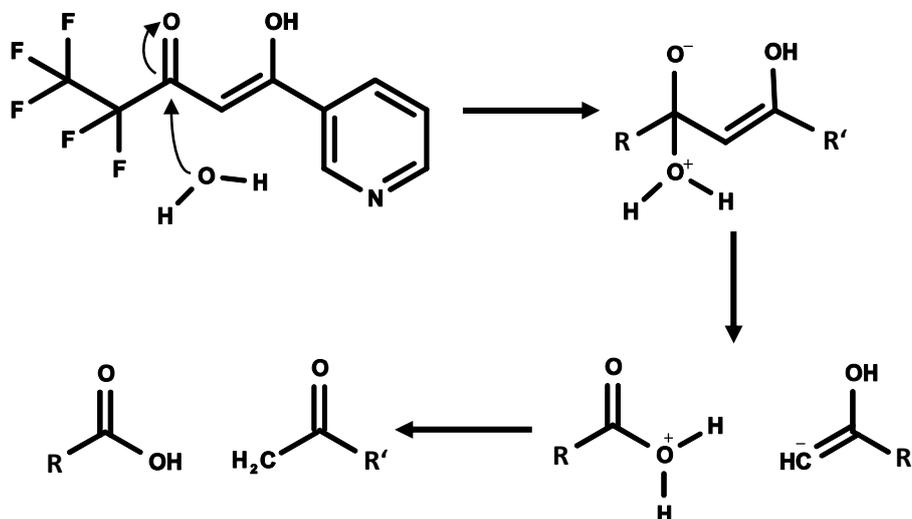


Abb. 5.5: Beispielhafter Zerfall von BH267.meta [5]. Die Zersetzung erfolgt wahrscheinlich nach einer reversen Claisen-Kondensation, was eine klassische und lange bekannte Zerfallsreaktion bei vinylogenen Carbonsäuren ist.¹⁸⁴

Ein möglicher Grund für die sinkende Stabilität der stickstoffhaltigen Verbindungen ist eine Präferenz für die vinyloge Form des Inhibitors. Elektronenarme Heteroaromaten schienen die konjugierte Form (siehe Kap. 5.4.3) zu stabilisieren. Diese könnte den Angriff des Nucleophils erleichtern und so die Zerfallsreaktion begünstigen. Die Schwachstelle des Inhibitors stellt demnach die vinyloge Carbonsäure, also das Pharmakophor dar. Dabei ist zu beachten, dass es bisher nicht gelungen ist das Pharmakophor zu verändern.¹¹⁹ Eine Alternative, um die chemische Stabilität zu erhöhen, wäre es die Elektronendichte des Aromaten zu erhöhen. Dies gelang mit den getesteten Substituenten, einer Methyl- und Methoxy-Gruppe, allerdings bisher nicht.

5.4.3 Lage der Keto-Enol-Tautomerie

Die Lage der Keto-Enol-Tautomerie kann so vorliegen, dass der Aromat und die vinyloge Carbonsäure in einer vollständig konjugierten Form und in einer nicht-konjugierten Form vorliegen. Für analoge Verbindungen wurden bereits beide Formen veröffentlicht. So veröffentlichten SLOOP *et al.* für Trifluor-Analoga die nicht-konjugierte Form,¹⁸⁵ Sosnovskikh *et al.* postulierten dagegen die konjugierte Form analoger Verbindungen.¹⁸⁶

Die stickstoffhaltigen Verbindungen stellten gelbe Feststoffe dar, während die entsprechenden Derivate ohne Stickstoff farblos waren. Dies spricht dafür, dass das Einfügen eines Stickstoffes in die Struktur das Gleichgewicht zur konjugierten Form verschiebt. Die vinyloge Carbonsäure lag in einem Winkel von etwa 110° und einer Entfernung von 4 \AA zum Pyridinstickstoff (Berechnung mit der Software Avogadro¹⁸⁷). Dies könnte zur Ausbildung einer schwachen intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung führen.^{188,189} Ein weiterer potentieller Faktor könnte die geringere Elektronendichte des Pyridins im Vergleich zum Benzen sein, diese könnte die Ausbildung der konjugierten Form begünstigen. Dafür spräche die verminderte Stabilität des elektronenärmeren Pyrazin-Derivates [8].

Die Schmelzsynthese der Strukturen [16] und [17] fixiert die Lage des Gleichgewichts von BH267.meta [5] ohne einen Lösemiteleinfluss (vgl. Abb. 4.20). Dies zeigte eine gleichmäßige Verteilung beider tautomerer Formen von BH267.meta [5], sodass davon auszugehen ist, dass die tautomeren Formen immer in einem gewissen Gleichgewicht vorliegen. Dieses Gleichgewicht scheint sich jedoch zwischen den Inhibitoren zu unterscheiden.

5.5 Strukturelle Unterschiede von FNT in *Plasmodium*-Spezies

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei ausgewählte Inhibitoren an den FNTs aller humanpathogenen *Plasmodium*-Spezies getestet. Die Auswahl der Inhibitoren erfolgte so, dass MMV007839 [1] als ursprüngliche Malariabox-Substanz und sehr gut untersuchte Struktur Informationen über die Beschaffenheit der Bindestelle geben kann. BH297 [10] wurde als potentester Inhibitor gegen PffNT G107S im Hefe-System ausgewählt. BH267.meta [5] wurde als neue Leitsubstanz untersucht. Aufgrund der *in vitro* Wirksamkeit wurde geprüft ob dieser Inhibitor nicht nur gegen PffNT wirkt, sondern auch ein breiteres Wirkungsspektrum aufweisen kann. Aufgrund der hohen Anzahl der Proben, welche aus der Kombination von FNTs und Inhibitoren resultiert, musste die Auswahl entsprechend begrenzt werden.

A

| FNT | Pf | Pv | Pm | Po | Pk |
|-----|------|------|------|------|------|
| Pf | | 85,0 | 84,1 | 86,0 | 84,7 |
| Pv | 73,7 | | 86,6 | 78,6 | 95,4 |
| Pm | 72,4 | 78,2 | | 89,6 | 88,6 |
| Po | 74,6 | 79,8 | 82,1 | | 88,6 |
| Pk | 72,8 | 90,5 | 78,9 | 79,8 | |

% Identität

% Ähnlichkeit

B

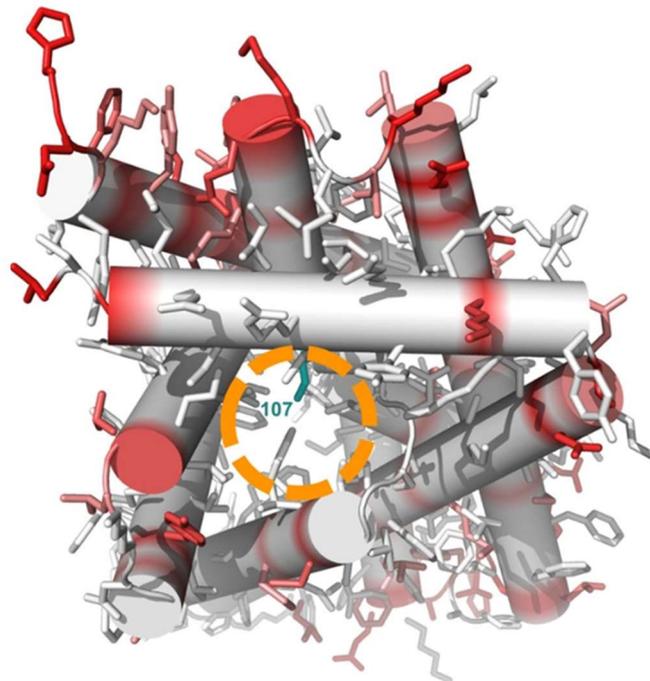


Abb. 5.6: Vergleich der Formiat-Nitrit-Transporter der fünf humanpathogenen Plasmodien. A) Die Ähnlichkeiten und gemeinsame Identität der Aminosäuren in der Sequenz der FNTs. Erstellt mit TeXshade.¹⁹⁰ B) Modell eines PfFNT Protomers, gesehen von der zytoplasmatischen Seite, mit den Abweichungen der Sequenzen auf einer Rot-Weiß-Skala. Rote Bereiche stellen eine hohe, weiße dagegen eine geringe Variabilität dar. Der Eingang der Substratpore ist orange markiert, die G107S Resistenzmutation in Cyan.¹⁶¹

Die fünf FNT der humanpathogenen *Plasmodium*-Spezies sind sich in ihrer Proteinsequenz sehr ähnlich (vgl. Abb. 5.6). Die Sequenzidentität ist sehr hoch und reicht von 72,4 % zwischen PfFNT und PmFNT bis zu 90,5 % zwischen PkFNT und PvFNT. Bezieht man zusätzlich noch physikochemische Ähnlichkeiten der Aminosäuren mit ein, ergeben sich 84,1 % (PfFNT und PmFNT) bis 95,4 % (PvFNT und PkFNT). Wird die Lage der übrigen unterschiedlichen

Aminosäuren visualisiert, fällt auf, dass diese lediglich an den Termini bzw. den äußeren Bereichen des Proteins vorliegen, der Transportpfad und damit die Binderegion der Inhibitoren ist hingegen konserviert. Dies spiegelt sich auch in den Aufnahmekurven (Abb. 4.11) wider. Die Aufnahmekapazitäten bleiben hierbei gleich, lediglich die Transportraten unterscheiden sich. Die unterschiedlichen Transportraten waren Resultat einer unterschiedlichen Anzahl an Transportern, welche durch die Hefe aufgrund verschiedener Faktoren in der Zellmembran lokalisiert werden. Diese determinieren, wie schnell ein Equilibrium und damit ein Aufnahmeplateau erreicht wird. Die Aufnahmekapazität hingegen ist, bei gleichem Substrat- und Protonengradienten, unabhängig von der Anzahl der Transporter an der Oberfläche.¹⁹¹ Folglich war das Transportverhalten aller untersuchten Formiat-Nitrit-Transporter sehr ähnlich zueinander.

Aufgrund dieser Betrachtungen ist nicht davon auszugehen, dass die Wirkung der Inhibitoren stark voneinander abweicht. Die experimentell ermittelten IC_{50} -Werte bestätigten diese Annahme. Lediglich kleine Abweichungen im submikromolaren Bereich waren zu beobachten, vor allem bei PkFNT. Dies ließe sich durch diffuse Effekte über längere Distanzen im Protein erklären und nicht mit einzelnen spezifischen Aminosäuren. Durch den Austausch peripherer Seitenketten, kann sich die Rigidität des gesamten Proteins verändern. Da die Inhibitoren tief in der Substratpore binden, kann eine Änderung der Flexibilität die Inhibitorstärke beeinflussen.^{7,119,178}

5.6 Wahrscheinlichkeit der Resistenzbildung gegen PffNT-

Inhibitoren

Am Bernhardt-Nocht-Institut in Hamburg haben diverse Vergleiche zwischen der Resistenzbildung von MMV007839 [1] und BH267.meta [5] stattgefunden. Dabei konnten für [1] reproduzierbar und verlässlich resistente Parasiten gezüchtet werden. Bei BH267.meta [5] sah es lange so aus, als wäre eine Resistenzbildung unwahrscheinlich. Es gelang allerdings im späteren Verlauf, unter milden Bedingungen zwei neue Resistenzen zu selektieren. Die erste Mutation war G21E. Dabei handelt es sich um eine Mutation, die eher in der Peripherie von PffNT lokalisiert ist und nicht im Transportkanal. Die Mutation hatte zwar den Lactat-Transport erschwert, aber die untersuchten Inhibitoren hemmten diese Mutation mit nanomolaren Konzentrationen. Anschließend entstand V196L, eine Mutation in der lipophilen Engstelle von PffNT. Diese zeigte ebenso eine verschlechterte Lactat-Leitfähigkeit und zudem

hemmten die untersuchten Inhibitoren diese Resistenzmutante schwächer. Die IC_{50} -Werte von MMV007839 [1] und BH267.meta [5] bewegten sich dabei noch im nanomolaren Bereich. BH297 [10] allerdings, welcher bisher im Hefesystem die stärkste Inhibition zeigte, inhibierte V196L um den Faktor 100 schwächer (bei gleicher Affinität zu G21E). Zudem zeigte sich in den resistenten Plasmodien ein anderes Bild, hier waren alle verwendeten Inhibitoren deutlich schwächer als im Hefesystem. Ein möglicher Grund hierfür könnten auch zusätzliche Mutationen im Parasiten sein. Während der Versuche befanden sich die Parasiten unter massivem Mutationsdruck, welcher das gesamte Genom betrifft. Es ist daher nicht auszuschließen, dass es sich bei der schwächeren Wirkung im resistenten Parasiten um ein multifaktorielles Geschehen handelt, bei der mehrere Mutationen zu einer Resistenz führen. Eine potenzielle Stelle für die Bildung einer Resistenz wäre die Aufnahme des Inhibitors in den Parasiten. Da der Mechanismus der BH267.meta [5]-Aufnahme noch nicht aufgeklärt ist, kann die Mutation eines Aufnahme-Transporters ebenso zu einer Resistenz führen. Weiterhin wäre eine Erklärung, dass bereits eine kleine Verschlechterung im Hefesystem zu einer überproportionalen Verschlechterung im Parasiten führt. Da die beiden Systeme nicht direkt vergleichbar sind, ist nicht bekannt ab welchem IC_{50} -Wert im Hefe-System eine Erhöhung des EC_{50} -Wertes im Parasiten-System erfolgt. Ein Inhibitor, der im Hefesystem einen gewissen Schwellenwert überschreitet, könnte entsprechend die *in vitro* Wirksamkeit verlieren.

5.7 Eignung von BH267.meta für das Maus-Modell

Ein zentraler Schritt in der präklinischen Entwicklung eines Malaria-Medikamentes ist ein *in vivo* Test z.B. in einem Maus-Modell. Dafür kann der Malaria-Parasit *P. berghei* verwendet wurde. Um die Eignung der Substanz BH267.meta [5] für diesen Test abschätzen zu können, wurden einige Vortests gemacht. Die Inhibition von PbfNT war dabei wichtig, um eine potenzielle Wirkung auf den Parasiten abschätzen zu können. Mit einem IC_{50} -Wert von $0,75 \mu\text{M}$ war die Potenz des Inhibitors im Vergleich zur Hemmung von PbfNT zwar um den Faktor 7 verschlechtert, allerdings befand sich der Wert noch im submikromolaren Bereich. Gründe dafür wurden bereits im Kontext von PkfNT in Kap 5.5 erläutert. Weiterhin wurden eventuelle *off-target* Effekte getestet. Der Lactat-Transport wird im Menschen von hMCT1 übernommen. Dieser unterscheidet sich zwar sequenziell und mechanistisch grundsätzlich von den FNTs, dennoch wurde geprüft, ob die lactatähnliche Inhibitor-Klasse hMCT1 hemmen

und somit zu starken Nebenwirkungen führen könnte. Allerdings zeigte BH267.meta [5] gegen hMCT1 erst bei 500 μM eine Hemmung von 50 %, dies entspricht einem Sicherheitsfaktor von fast 5000. Somit ist ein *off target* Effekt nahezu ausgeschlossen.

Ein Kritikpunkt der Substanzklasse ist das Vorliegen eines potenziellen Michael-Akzeptors in Form der vinylogenen Carbonsäure. Da dieses Strukturelement essenziell für die Wirkung des Inhibitors ist und zum bisherigen Zeitpunkt noch nicht ersetzt werden konnte, muss dies adressiert werden. Die potenziell toxische Wirkung auf menschliche Zellen wurde von Till Priegann unter Leitung von Professor Dr. Dennis Schade geprüft. In diesem Kontext wurde gezeigt, dass BH267.meta [5] selbst bei hohen Konzentrationen von 100 μM nur sehr geringe Wirkung auf sowohl HepG2 als auch auf HEK293 Zellen aufwies. Weiterhin zeigten sich *in vivo* ebenso keine Anzeichen einer akuten toxischen Wirkung. Dies spricht dafür, dass keine Überforderung des Glutathion-Systems auftrat. Um allerdings diese Zweifel komplett auszuräumen, wären weitere Tests notwendig, die die intrazellulären Glutathion-Reserven nach einer Behandlung mit den Inhibitoren messen. Ein weiterer wichtiger Punkt im toxikologischen Profil ist die fehlende Affinität zum hERG-Kanal.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass BH267.meta [5] aufgrund der nanomolaren Inhibition von PfFNT und des positiven toxikologischen Profils, ein gut geeigneter Kandidat für die Untersuchung im Maus-Model ist.

5.8 BH267.meta *In vivo* Daten im *P. berghei* Maus-Model

Die Substanz BH267.meta [5] wurde im Maus-Model getestet. Dies zeigte erstmalig die Wirksamkeit eines PfFNT-Inhibitors *in vivo*. Zudem zeigte sich, dass die Substanz peroral bioverfügbar war. Diese Eigenschaft ist für einen späteren Einsatz als Antimalaria-Medikament unerlässlich. Parenterale Antimalaria-Medikamente können aufgrund der höheren logistischen Herausforderung nicht in der Routine eingesetzt werden. Und kommen daher lediglich bei sehr schweren Malaria-Verläufen zum Einsatz, bei denen Patienten nicht in der Lage sind perorale Arzneiformen einzunehmen.^{192,193} Ebenso positiv war die gute Verträglichkeit der Substanz für die getesteten Mäuse. Diese zeigten weder Symptome, welche auf eine Vergiftung schließen lassen würden, noch einen Gewichtsverlust. Bei einer Behandlung von BH267.meta [5] mit einer Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht war die Überlebensdauer der Mäuse mit 13 Tagen auf dem Stand von Artesunat (9,2 Tage). Artesunat

weist eine geringere Halbwertszeit auf im Vergleich zu anderen Therapeutika, wie Chloroquin oder Artemisinin.¹⁹⁴ Bei Chloroquin vergingen durchschnittlich 21,2 Tage vor dem erneuten Ausbruch von Symptomen. Bei Artemisinin war die Testpopulation nach einmaliger Behandlung geheilt. Somit liegt auch bei BH267.meta [5] die Schlussfolgerung nahe, dass die biologische Halbwertszeit niedrig ist. Ein Großteil der Parasiten stirbt daher durch die initiale Dosis, der Wirkstoff wird dann aber zu schnell abgebaut, sodass die überlebenden Parasiten dann die Möglichkeit haben, sich nach einer gewissen Zeit neu zu vermehren. Dies lässt sich durch die Stabilitätsstudien bereits abschätzen, denn BH267.meta [5] hatte bei 37 °C eine chemische Stabilität von 24 h. Es könnte sein, dass die biologische Halbwertszeit weiter reduziert ist. Im Vergleich dazu hat Chloroquin eine biologische Halbwertszeit von 20 bis 60 Tagen, was zu einer deutlich längeren Wirkung und somit zu weniger Einnahmen führt.^{195,196} Eine kurze Verweildauer im Blut wäre bei Arzneistoff Molekülen für viele Indikationsgebiete problemlos oder sogar vorteilhaft. Der Arzneistoff wäre wirksam und schnell wieder aus dem Körper entfernt. Die kurze Wirkdauer könnte dann durch tägliche Einnahme kompensiert werden. Allerdings sind die Anforderungen für Antimalaria Medikamente anders, aufgrund der Herausforderungen hinsichtlich der Infrastruktur und Arzneimittelversorgung in Malaria-Gebieten ist eine einmalige Einnahme erforderlich. Eine mögliche Lösung dieses Problems wäre allerdings auch die Kombination mit anderen Antimalaria-Arzneistoffen. Analog zu der *artemisinin-based combination therapy* würde ein pharmakokinetisches Ungleichgewicht von einem schnell wirksamen Arzneistoff mit kurzer Halbwertszeit und einem langwirksamen Therapeutikum verwendet werden. Dies würde dazu führen, dass die Menge an Parasiten initial schnell durch den ersten Wirkstoff reduziert werden würde und die verbleibenden Parasiten durch den zweiten Wirkstoff abgetötet werden. Dies wäre eine effiziente Therapie mit wenigen Einnahmen und das Risiko einer Resistenzentwicklung wäre durch unterschiedliche Wirkstoffe reduziert.^{197,198}

5.9 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Resistenzmutante PfFNT G107S erfolgreich gehemmt. Dies führte zu dem neuen Inhibitor BH267.meta [5], welcher in der Lage war *P. falciparum in vitro* und *in vivo* abzutöten.

BH267.meta [5] hatte dabei eine geringere Wahrscheinlichkeit eine Resistenz bei *P. falciparum* auszulösen. Allerdings zeigte das Auftreten der beiden neuen Mutationen PffNT G21E und PffNT V196L, welche zum Ende dieser Arbeit im Bernhard-Nocht-Institut forciert werden konnten, dass eine Resistenz doch prinzipiell möglich ist. Ebenso ist unklar, ob BH267.meta [5] nicht durch einen von dem PffNT losgelösten Effekt, wie dem Aufnahmeweg, eine Resistenz bei *P. falciparum* auslösen könnte.

Gegenstand zukünftiger Forschung sollten die neuen Resistenzmutanten, insbesondere PffNT V196L sein. Da sich diese Mutation in der lipophilen Engstelle befindet, welche den Fluoralkyl-Anteil des Inhibitors betrifft, sollte dieser weiter modifiziert werden. Diese Arbeit hat für diesen Zweck bereits Erkenntnisse gewonnen, welche bei der Entwicklung neuer Inhibitoren hilfreich sein können. So ist davon auszugehen, dass zwei Fluoratome als Proteinanker fungieren und daher auch in neuen Strukturen erhalten bleiben sollten. Bei den Tests sollte allerdings PffNT G107S miteinbezogen werden, da sich Modifikationen an der Fluoralkylkette negativ auf die Affinität gegen diese Resistenzmutante auswirken können.

Ein möglicher Ansatzpunkt wäre weiterhin, einen doppelten Inhibitor anzuwenden. Die Pentafluoro-3-hydroxy-pent-2-en-1-one sind sehr kleine Moleküle, folglich könnte man zwei Inhibitoren fusionieren, ohne an eine bedenkliche molekulare Masse zu geraten. Auf diese Weise können Inhibitoren, die jeweils gut auf unterschiedliche Resistenzen ansprechen, kombiniert werden. Hier wäre die größte Herausforderung, dass die Aufnahme in den Parasiten noch gewährleistet ist.

Für die Weiterentwicklung von BH267.meta [5] wäre der Schwerpunkt die Erhöhung der Halbwertszeit *in vivo*. Dafür muss die Metabolisierung der Substanz verstanden werden und die Blutproben aus dem Mausmodell müssen auf mögliche Metabolite untersucht werden. Wenn diese Informationen bekannt sind, können zielgerichtete Modifikationen am Molekül vorgenommen werden. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurde bereits eine Kooperation mit dem *Drug Discovery and Development Centre* (H3D) in Kapstadt unter Leitung von Professor Dr. Kelly Chibale begonnen.

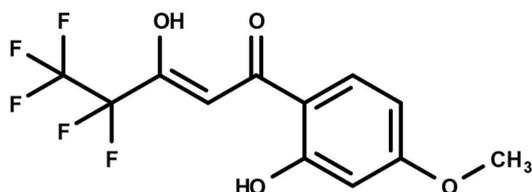
Alternativ müsste die Möglichkeit untersucht werden BH267.meta [5] mit anderen, länger wirksamen Antimalaria-Wirkstoffe zu kombinieren. Auf diese Weise könnte die Einnahmedauer deutlich verkürzt und das Resistenzrisiko weiter verringert werden.

Dabei ist es in Zukunft möglich, ein rationales Strukturdesign durchzuführen. Die erst vor kurzem veröffentlichte Struktur von PfFNT erlaubt es, dass mit BH267.meta [5] als Leitstruktur ein effizienteres rationales *drug design* durchgeführt werden kann und neue Inhibitoren schneller und besser konstruiert werden können.

6 Analytischer Teil

4,4,5,5,5-Pentafluoro-3-hydroxy-1-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)pent-2-en-1-on

MMV007839 [1]



Für die Synthese (vgl. Kap. 3.7) wurden Ethylpentafluorpropanoat (2,88 g, 15,0 mmol) und 1-(2-Hydroxy-4-methoxyphenyl)ethan-1-on (2,08 g, 12,5 mmol) verwendet.

C₁₂H₉F₅O₄ (312,19 g/mol)

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

Schmelzpunkt: 96 °C

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

¹H-NMR (300 MHz, 25 °C, [D₆]-DMSO):

δ/ppm = 8.89 (d, ⁴J = 0.8 Hz, 1H), 7.74 (d, ³J = 8.8 Hz, 1H), 6.75 (dd, ³J = 8.8 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, 1H), 6.62 (d, ⁴J = 2.4 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.36 (dd, ²J = 16.6 Hz, ⁴J = 0.8 Hz, 1H), 2.82 (d, ²J = 16.6 Hz, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, 25 °C, [D₆]-DMSO):

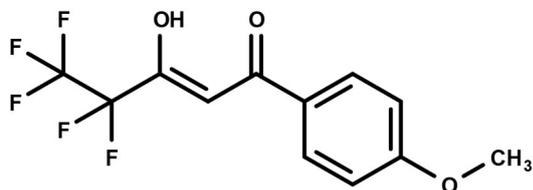
δ/ppm = 186.1 (1C), 166.1 (1C), 158.1 (1C), 127.6 (1C), 118.6 (1C), 113.8 (1C; C-4a), 111.0 (1C), 110.8 (1C), 101.8 (1C), 99.0 (1C), 56.0 (1C), 41.2 (1C).

MS (ESI negativ):

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

4,4,5,5-Pentafluoro-3-hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)pent-2-en-1-on

BH296 [2]



Für die Synthese (vgl. Kap. 3.7) wurden Ethylpentafluoropropanoat (2,88 g, 15 mmol) und 1-(4-Methoxyphenyl)ethan-1-on (1,88 g, 12,5 mmol) verwendet.

C₁₂H₉F₅O₃ (296,19 g mol⁻¹)

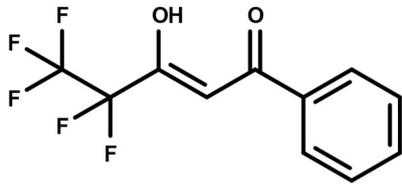
Ausbeute: 2,45 g (8,3 mmol, 66 %)

Schmelzpunkt: 41 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)): R_f = 0,27**¹H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl₃):** σ /ppm = 12.58 (br s, 1H), 8.14 (m, 2H), 7.11 (m, 2H), 6.99 (s, 1H), 3.88 (s, 3H).**¹³C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl₃):** σ /ppm = 185.7 (1C), 176.0 (1C), 135.1 (1C), 132.9 (1C), 129.7 (2C), 128.5 (2C), 119.8 (1C), 116.9 (1C), 108.2 (1C)**MS (ESI positiv):**m/z (%): 613 (100) [2M-2H+Na]⁻, 295 (94) [M-H]⁻

4,4,5,5-Pentafluoro-3-hydroxy-1-phenylpent-2-en-1-on

[3]



Für die Synthese (vgl Kap. 3.7) wurden Ethylpentafluorpropanoat (2,88 g, 15,0 mmol) und Acetophenon (1,50 g 12,5 mmol). Nach erfolgter säulenchromatographischer Reinigung wurde das erhaltene Öl destilliert.

C₁₁H₇F₅O₂ (266,16 g mol⁻¹)

Ausbeute: 2,1 g (7,1 mmol), 63 % ; farbloses Öl

¹H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl₃):

σ /ppm = 8.1 (dtd, ⁵J = 0.9, ⁴J = 1.3, ³J = 8.7, 2H), 7.7 (tt, ⁴J = 1.3, ³J = 7.5, 1 H), 7.6 (ddd, ³J = 7.5, ³J = 8.7, ⁴J = 1.3, ⁵J = 0.9, 2H), 7.0 (s, 1H)

¹³C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl₃):

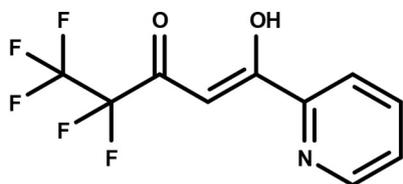
σ /ppm = 185.2 (1C), 150.2 (1C), 149.5 (1C), 137.6 (1C), 128.2 (1C), 127.7 (1C), 123.1 (1C), 119.6 (1C), 116.7 (1C), 95.2 (1C).

MS (ESI negativ):

m/z (%): 264.7 (100)

4,4,5,5-Pentafluoro-3-hydroxy-1-(2-pyridyl)pent-2-en-1-on

BH267.ortho [4]



Für die Synthese (vgl. Kap. 3.7) wurden Ethylpentafluoropropanoat (2,88 g, 15 mmol) und 2-Acetylpyridin (1,51 g, 12,5 mmol) verwendet.

C₁₀H₆F₅NO₂ (267,15 g mol⁻¹)

Ausbeute: 1,2 g (4,5 mmol, 36 %)

Schmelzpunkt: 33 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)): R_f = 0,33**¹H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl₃):**

σ/ppm = 14.3 (br s, 1H), 8.73 (m, 1H), 8.19 (m, 1H), 7.94 (m, 1H), 7.6 (m, 1H), 7.27 (s, 1H).

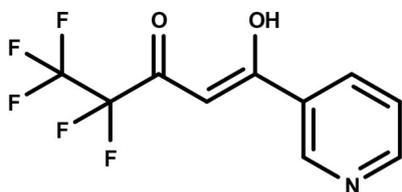
¹³C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl₃):

σ/ppm = 185.2 (1C), 150.2 (1C), 149.5 (1C), 137.6 (1C), 128.2 (1C), 127.7 (1C), 123.1 (1C), 119.6 (1C), 116.7 (1C), 95.2 (1C).

MS (ESI positiv):m/z (%): 555 (100) [2M-2H+Na]⁻, 266 (7) [M-H]⁻

4,4,5,5-Pentafluoro-3-hydroxy-1-(3-pyridyl)pent-2-en-1-on

BH267.meta [5]



Für die Synthese (vgl. Kap. 3.7) wurden Ethylpentafluoropropanoat (2,88 g, 15 mmol) und 3-Acetylpyridin (1,51 g, 12,5 mmol) verwendet.

C₁₀H₆F₅NO₂ (267,15 g mol⁻¹)

Ausbeute: 1,7 g (6,4 mmol, 51 %)

Schmelzpunkt: 120 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)): R_f = 0,23

¹H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl₃):

σ/ppm = 9.17 (dd, ⁵J = 0.8, ⁴J = 2.1, 1H), 8.85 (dd, ⁵J = 1.7, ³J = 4.8, 1H), 8.24 (dt, ⁴J = 1.7, ⁴J = 2.1, ³J = 8.0, 1H), 7.50 (ddd, ⁵J = 0.8, ³J = 4.8, ³J = 8.0, 1H), 6.66 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl₃):

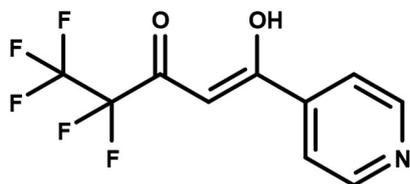
σ/ppm = 183.6 (1C), 179.5 (1C), 154.3 (1C), 148.8 (1C), 128.7 (1C), 123.8 (1C), 119.4 (1C), 116.6 (1C), 107.3 (1C), 94.0 (1C).

MS (ESI positiv):

m/z (%): 555 (100) [2M-2H+Na]⁻, 266 (3) [M-H]⁻

4,4,5,5-Pentafluoro-3-hydroxy-1-(4-pyridyl)pent-2-en-1-on

BH267.para [6]



Für die Synthese (vgl. Kap. 3.7) wurden Ethylpentafluoropropanoat (2,88 g, 15 mmol) und 4-Acetylpyridin (1,51 g, 12,5 mmol) verwendet.

$C_{10}H_6F_5NO_2$ (267,15 g mol⁻¹)

Ausbeute: 1,1 g (4,1 mmol, 33 %)

Schmelzpunkt: 171 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)): $R_f = 0,16$

¹H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl₃):

σ /ppm = 8.85 (dd, ⁴J = 1.6, ³J = 4.5, 2H), 7.75 (dd, ⁴J = 1.6, ³J = 4.5, 2H), 6.67 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl₃):

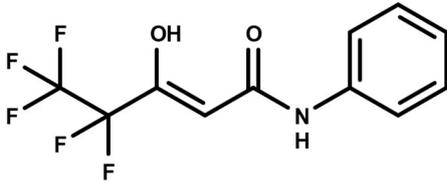
σ /ppm = 182.1 (1C), 151.0 (2C), 139.6 (1C), 120.4 (2C), 114.5 (1C), 94.4 (1C)

MS (ESI positiv):

m/z (%): 555 (100) [2M-2H+Na]⁻, 266 (2) [M-H]⁻

4,4,5,5-Pentafluoro-3-hydroxy-N-phenyl-pent-2-enamid

[7]



Für die Synthese (vgl. Kap. 3.7) wurden Ethylpentafluorpropanoat (2,88 g, 15 mmol) und Acetanilid (1,69 g, 12,5 mmol) verwendet.

C₁₁H₈F₅NO₂ (281,18 g mol⁻¹)

Ausbeute: 0,30 g (1,5 mmol, 8,5 %)

Schmelzpunkt: 76 °C

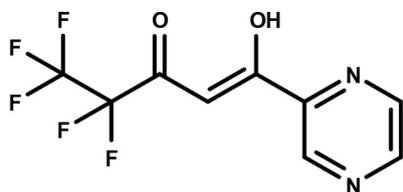
DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)): R_f = 0,48

¹H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl₃):

σ/ppm = 10.70 (s, 1H), 7.59 (dd, ⁴J = 1.2, ³J = 8.8, 2H), 7.38 (t, ³J = 8.5, 2H), 7.16 (m, 1H), 6.02 (s, 1H)

¹³C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl₃):

σ/ppm = 168.3 (1C), 157.6 (1C), 137.6 (1C), 129.4 (2C), 125,3 (1C), 120.7 (2C), 117.7 (1C), 109.5 (1C), 97.2 (1C)

4,4,5,5,5-Pentafluoro-3-hydroxy-1-pyrazin-2-yl-pent-2-en-1-on**[8]**

Für die Synthese (vgl. Kap. 3.7) wurden wurden Ethylpentafluoropropanoat (2,88 g, 15 mmol) und 2-Acetylpyrazin (0,5 g, 3,3 mmol) verwendet.

C₉H₅F₅N₂O₂ (268,14 g mol⁻¹)

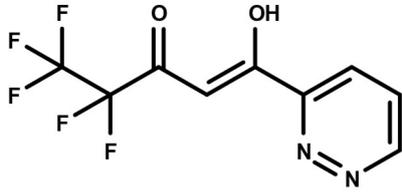
Ausbeute: 0,60 g (2,2 mmol, 18 %)

Schmelzpunkt: 64 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)): R_f = 0,34**¹H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl₃):** σ /ppm = 9.34 (d, ⁵J = 1.5, 1H), 8.81 (d, ³J = 2.4, 1H), 8.71 (dd, ⁵J = 1.5, ³J = 2.4, 1H), 7.32 (s, 1H).**¹³C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl₃):** σ /ppm = 182.7 (1C), 140.2 (1C), 145.2 (1C), 144.2 (1C), 144.1 (1C), 119.4 (1C), 116.6 (1C), 107.4 (1C), 95.4 (1C).**MS (ESI positiv):**m/z (%): 557 (100) [2M-2H+Na]⁻, 267 (4) [M-H]⁻

4,4,5,5-Pentafluoro-3-hydroxy-1-pyridazin-3-yl-pent-2-en-1-on

[9]



Für die Synthese (vgl. Kap. 3.7) wurden Ethylpentafluoropropanoat (0,94 g, 4,9 mmol) und 3-Acetylpyridazin (0,5 g, 4,1 mmol) verwendet.

C₉H₅F₅N₂O₂ (268,14 g mol⁻¹)

Ausbeute: 0,12 g (0,4 mmol, 18 %)

Schmelzpunkt: 84 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)): R_f = 0,32

¹H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl₃):

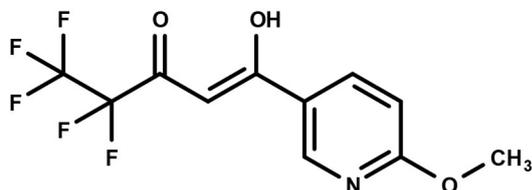
σ/ppm = 9.38 (dd, ⁵J = 1.6, ⁴J = 5.0, 1H), 8.27 (dd, ⁵J = 1.6, ³J = 8.4, 1H), 7.75 (dd, ⁴J = 5.0, ³J = 8.4, 1H), 7.63 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl₃):

σ/ppm = 181.8 (1C), 169.1 (1C), 155.0 (1C), 154.3 (1C), 129.6 (1C), 126.8 (1C), 119.9 (1C), 117.1 (1C), 95.9 (1C).

4,4,5,5,5-Pentafluoro-3-hydroxy-1-(6-methoxy-3-pyridyl)pent-2-en-1-on

BH297, [10]



Für die Synthese (vgl. Kap. 3.7) wurden Ethylpentafluoropropanoat (0,76 g, 4,0 mmol) und 5-Acetyl-2-methoxy-pyridin (0,5 g, 3,3 mmol) verwendet.

C₁₁H₈F₅NO₃ (297,18 g mol⁻¹)

Ausbeute: 0,40 g (1,3 mmol, 41 %)

Schmelzpunkt: 31 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)): R_f = 0,51**¹H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl₃):**

σ/ppm = 8.86 (d, ⁴J = 2.5, 1H), 8.10 (dd, ⁴J = 2.5, ⁵J = 8.9, 1H), 6.85 (d, ⁵J = 8.9, 1H), 6.55 (s, 1H), 4.03 (s, 3H).

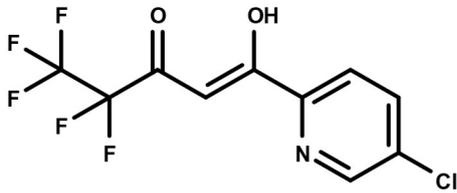
¹³C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl₃):

σ/ppm = 184.8 (1C), 177.2 (1C), 167.6 (1C), 148.8 (1C), 137.4 (1C), 122.4 (1C), 199.5 (1C), 166.7 (1C), 111.6 (1C), 93.1 (1C), 54.3 (1C).

MS (ESI positiv):m/z (%): 615 (100) [2M-2H+Na]⁻, 296 (1) [M-H]⁻

1-(5-Chloropyridin-2-yl)-4,4,5,5,5-pentafluoro-1-hydroxypent-1-en-3-on

[11]



Für die Synthese (vgl. Kap. 3.7) wurden Ethylpentafluoropropanoat (1,48 g, 7,7 mmol) und 2-Acetyl-5-chloropyridine (1 g, 6,4 mmol) verwendet.

C₁₀H₅ClF₅NO₂ (300,9 g mol⁻¹)

¹H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl₃):

σ/ppm = 8.76 (dd, ⁴J=2.0, ⁴J=4.6, 1H), 8.58 (dd, ⁴J=2.0, ³J=7.7, 1H), 7.54 (dd, ⁴J=4.6, ³J=7.7, 1H), 7.24 (s, 1H)

¹³C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl₃):

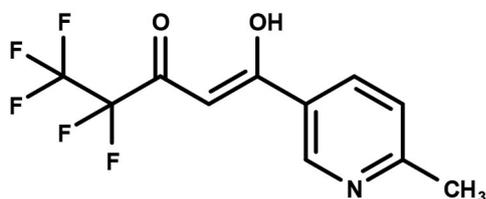
σ/ppm = 177.0 (1C), 160.0 (1C), 154,5 (1C), 153,2 (1C), 136,8 (1C), 123.5 (1C), 119.0 (1C), 116.6 (1C), 113.1 (1C), 108.4 (1C)

MS (ESI negativ):

m/z (%): 300 (100) [M-H]⁻

4,4,5,5-Pentafluoro-3-hydroxy-1-(6-methyl-3-pyridyl)pent-2-en-1-on

[12]



Für die Synthese (vgl. Kap. 3.7) wurden Ethylpentafluoropropanoat (0,85 g, 4,4 mmol) und 5-Acetyl-2-methylpyridin (0,5 g, 3,7 mmol) verwendet.

C₁₁H₈F₅NO₂ (281,18 g mol⁻¹)

Ausbeute: 0,72 g (2,6 mmol, 69 %)

Schmelzpunkt: 110 °C

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

¹H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl₃):

σ/ppm = 9.05 (d, ⁴J = 2.3, 1H), 8.12 (dd, ⁴J = 2.3, ³J = 8.2, 1H), 7.32 (d, ³J = 8.2, 1H), 6.62 (s, 1H), 2.67 (s, 3H).

¹³C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl₃):

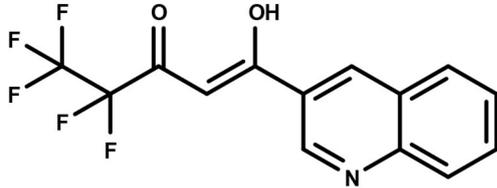
σ/ppm = 184.2 (1C), 178.9 (1C), 164.6 (1C), 148.5 (1C), 135.1 (1C), 126.0 (1C), 123.5 (1C), 119.4 (1C), 116.6 (1C), 93.6 (1C), 24.9 (1C).

MS (ESI positiv):

m/z (%): 583 (100) [2M-2H+Na]⁻, 280 (1) [M-H]⁻

4,4,5,5-Pentafluoro-3-hydroxy-1-(3-quinolyl)pent-2-en-1-on

[13]



Für die Synthese (vgl. Kap. 3.7) wurden Ethylpentafluorpropanoat (1,35 g, 7,0 mmol) und Acetylchinolin (1,00 g, 5,8 mmol) verwendet.

C₁₄H₈F₅NO₂ (317,22 g mol⁻¹)

Ausbeute: 1,20 g (3,8 mmol, 65 %)

Schmelzpunkt: 137 °C

DC (Cyclohexan/Essigsäureethylester (9:1)): R_f = 0,35

¹H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl₃):

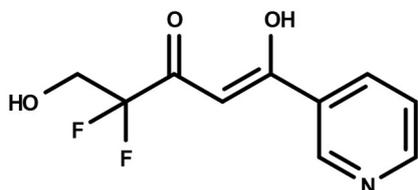
σ/ppm = 9.35 (d, ⁴J = 2.3, 1H), 8.82 (d, ⁴J = 2.3, 1H), 8.24 (d, ³J = 8.4, 1H), 7.99 (dd, ³J = 8.4, 5J = 0.9, 1H), 7.89 (m, 1H), 7.69 (m, 1H), 6.77 (s, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl₃):

σ/ppm = 182.9 (1C), 148.8 (1C), 146.8 (1C), 137.7 (1C), 133.3 (1C), 129.4 (1C), 128.7 (1C), 128.5 (1C), 126.9 (1C), 125.6 (1C), 119.4 (1C), 116.5 (1C), 94.1 (1C).

MS (ESI positiv):

m/z (%): 655 (100) [2M-2H+Na]⁻, 316 (1) [M-H]⁻

4,4-Difluoro-3,5-dihydroxy-1-(pyridin-3-yl)pent-2-en-1-on**[14]**

Für die Synthese (vgl. Kap. 3.7) wurden Ethyl 2,2-difluoro-3-hydroxypropanoat (0,50 g, 3,2 mmol) und 3-Acetylpyridin (0,33 g, 2,7 mmol) verwendet.

C₁₀H₉F₂NO₃ (229,18 g mol⁻¹)

Ausbeute: 0,31 g (1,2 mmol, 44 %)

Schmelzpunkt: 126 °C

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

¹H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl₃):

σ/ppm = 9.22 (dd, ⁵J = 0,8, ⁴J = 1.7, 1H), 8.82 (dd, ⁴J = 1.7, ³J = 4.8, 1H), 8.42 (dt, ⁴J = 1.9, ³J = 8.3, 1H), 7.60 (ddd, ⁵J = 0.8, ³J = 4.8, ³J = 8.3, 1H), 6.94 (s, 1H), 5.82 (bs, 1H), 3.92 (t, ²J = 14.15, 2H).

¹³C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl₃):

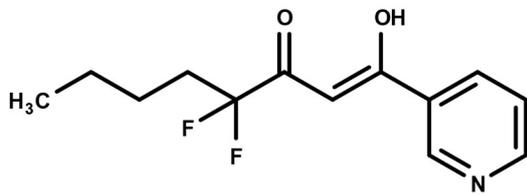
σ/ppm = 185.17 (1C), 154.40 (1C), 150.23 (1C), 149.05 (1C), 135.70 (1C), 129.37 (1C), 124.64 (1C), 119.53 (1C), 94.98 (1C), 39.92 (1C).

MS (ESI positiv):

m/z (%): m/z (%): 479 (100) [2M-2H+Na]⁺, 228 (6) [M-H]⁺

4,4-Difluoro-3-hydroxy-1-(3-pyridyl)oct-2-en-1-on

[15]



Für die Synthese (vgl. Kap. 3.7) wurden Ethyl 2,2-difluorhexanoat (0,50 g, 2,8 mmol) und 3-Acetylpyridin (0,28 g, 2,3 mmol) verwendet.

C₁₃H₁₅F₂NO₂ (255,27 g mol⁻¹)

Ausbeute: 0,37 g (1,5 mmol, 63 %)

Schmelzpunkt: 31 °C

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

¹H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl₃):

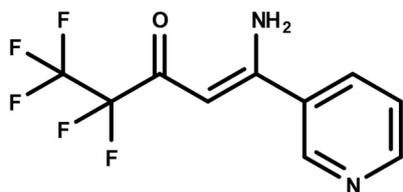
σ/ppm = 9.15 (d, ³J = 1.9, 1H), 8.80 (dd, ³J = 1.9, ⁴J = 4.9, 1H), 8.22 (dt, ³J = 1.9, ⁴J = 8.0, 1H), 7.45 (dd, ⁴J = 4.9, ⁴J = 8.0, 1H), 6.60 (s, 1H), 2.11 (m, 2H), 1.48 (m, 2H), 1.41 (sx, ⁴J = 7.2, 2H), 0.93 (t, ⁴J = 7.2, 3H).

¹³C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl₃):

σ/ppm = 183.1 (1C), 153.6 (1C), 148.6 (1C), 134.7 (1C), 129.5 (1C), 123.6 (1C), 120.9 (1C), 118.4 (1C), 92.8 (1C), 33.7 (1C), 23.6 (1C), 22.3 (1C), 13.7 (1C).

MS (ESI positiv):

m/z (%): 531 (100) [2M-2H+Na]⁻, 254 (2) [M-H]⁻

1-Amino-4,4,5,5,5-Pentafluoro-1-(pyridin-3-yl)pent-1-en-3-on**[16]**

Es wurden 4,4,5,5,5-pentafluoro-3-hydroxy-1-(pyridin-3-yl)pent-2-en-1-on (0,24 g, 0,9 mmol) und Natriumacetat (0,08 g, 1,0 mmol) zusammen in einen 10 ml-Rundkolben eingewogen, gemischt, und bei 160 Grad geschmolzen. Die Schmelze wurde ca. 30 min bei 160 Grad gerührt. Die anschließende Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch (MPLC) mit einem Fließmittelgemisch aus Ethylacetat-Cyclohexan- Triethylamin (20:20:1).

Es wurden zwei Isomere erhalten.

C₁₀H₇F₅N₂O (266,17g/mol)

Ausbeute: 32 mg (0,12 mmol, 13%)

¹H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl₃):

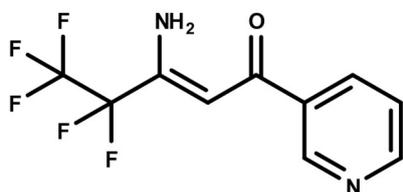
σ/ppm = 9.45 (bs, 1H) 9.1 (m, 1H), 8.7 (m, 2H), 8.3 (m, 1H), 7.5 (m, 1H), 6.2 (s, 1H)

¹³C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl₃):

σ/ppm = 118.7 (1C), 153.1 (1C), 149.5 (1C), 148.9 (1C), 135.3 (1C), 133.9 (1C), 124.3 (1C), 120.0 (1C), 117.1 (1C), 110.5 (1C).

MS (ESI positiv):

m/z (%): 266.8 (100)

3-Amino-4,4,5,5,5-Pentafluoro-1-(pyridin-3-yl)pent-2-en-1-on**[17]**

Es wurden 4,4,5,5,5-pentafluoro-3-hydroxy-1-(pyridin-3-yl)pent-2-en-1-on (0,24 g, 0,9 mmol) und Natriumacetat (0,08 g, 1,0 mmol) zusammen in einen 10 ml-Rundkolben eingewogen, gemischt, und bei 160 Grad geschmolzen. Die Schmelze wurde ca. 30 min bei 160 Grad gerührt. Die anschließende Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch (MPLC) mit einem Fließmittelgemisch aus Ethylacetat-Cyclohexan- Triethylamin (20:20:1).

Es wurden zwei Isomere erhalten.

C₁₀H₇F₅N₂O (266,17g/mol)

Ausbeute: 32 mg (0,12 mmol, 13%)

¹H-NMR (300 MHz, 25 °C, CDCl₃):

σ/ppm = 10.2 (s, 1H), 9.4 (s, 1H), 8.9 (m, 1H), 8.7 (m, 1H), 8.14 (m, 1H), 7.6 (m, 1H), 5.8 (m, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, 25 °C, CDCl₃):

σ/ppm = 176.7 (1C), 166.4 (1C), 153.7 (1C), 148.6 (1C), 136.0 (1C), 130.9 (1C), 124.3 (1C), 120.3 (1C), 117.5 (1C), 108.2 (1C).

MS (ESI positiv):

m/z (%): 266.8 (100)

7 Kurzfassung

Malaria zählt zu den gefährlichsten durch Parasiten ausgelösten Erkrankungen. Der Erreger *Plasmodium falciparum* führt jährlich zu Millionen Toden, v.a. in Sub-Sahara Afrika. Außerdem führen *Plasmodium*-Spezies wie *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* und *P. knowlesi* zu weiteren Krankheits- und Todesfällen weltweit. Die Parasiten haben bereits Resistenzen gegen alle verfügbaren Medikamente gebildet. Ein neues Wirkstoffziel, welches losgelöst von allen anderen bisher adressierten Mechanismen ist, ist der essenzielle Lactat-Transporter PfFNT. Ein potenter Inhibitor, welcher während eines *Screening* der Malaria Box gefunden wurde, ist MMV007839. Dieser bildete jedoch im Labormaßstab die Resistenzmutation PfFNT G107S.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es möglich ist, diese Resistenzmutante mit nanomolarer Effizienz zu hemmen. Durch die Verwendung eines Hefe-basierten Aufnahmeassays konnte mit ¹⁴C-markiertem L-Lactat gezeigt werden, dass das Einfügen eines Stickstoffatoms in die aromatische Komponente der bisherigen Pentafluoro-3-hydroxy-pent-2-en-1-one eine Wasserstoffbrückenbindung zum resistenzauslösenden Serin ausbildet.

Weiterhin ist es dem neuen Inhibitor BH267.meta möglich, *in vitro* in den Parasiten *P. falciparum* zu gelangen und diesen mit einer nanomolaren Wirksamkeit abzutöten. Zusätzlich ist es mit BH267.meta möglich, alle FNTs der humanpathogenen Spezies von *Plasmodium* im Hefe Assay zu inhibieren. Gleiches gilt für PbFNT aus *P. berghei*, welcher infektiös für Mäuse und andere Nagetiere ist und den ersten Schritt im Tierversuch einer Arzneistoffentwicklung darstellt.

Des Weiteren hatte BH267.meta geringe Affinität zum menschlichen Lactat-Transporter hMCT1, was die Gefahr der Off-Target Effekte reduziert. Ebenso wenig wirkt BH267.meta toxisch auf die humanen Zelllinien HEK293 und HepG2 und hatte keine inhibitorische Wirkung auf den hERG-Kanal. Aufgrund dieser Wirksamkeit und des guten toxikologischen Profils wurden erste Tierversuche im Maus-Modell durchgeführt. Diese zeigten eine *in vivo* Wirksamkeit gegen *P. berghei*, vergleichbar mit dem Arzneistoff Artesunat.

Mit neuen Resistenzmutationen, welche erst nach mehreren Versuchen selektiert werden konnten, kamen neue Herausforderungen für die Substanzklasse hinzu. Dennoch bleibt BH267.meta eine Substanz, welche ein hervorragendes toxikologisches Profil aufweist und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wirksam ist. Und stellt somit die neue Leitsubstanz für die Entwicklung weiterer PfFNT-Inhibitoren dar.

8 Abstract

Malaria is one of the most dangerous diseases caused by parasites. The pathogen *Plasmodium falciparum* causes millions of deaths annually with the main burden being in sub-Saharan Africa. In addition, *Plasmodium*-species such as *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. knowlesi* lead to additional cases of disease and death worldwide. The parasites have already developed resistance to all available drugs. A new drug target, which is detached from all other previously addressed mechanisms, is the essential lactate transporter PfFNT. A potent inhibitor found during a screening of the malaria box was MMV007839. However, treatment of the parasite in the laboratory scale caused the formation of the resistance mutation PfFNT G107S.

In this work it was shown that it is possible to inhibit this resistance mutant with nanomolar potency. By using a yeast-based uptake assay with ¹⁴C-labeled L-lactate it was demonstrated that the insertion of a scaffold nitrogen into the aromatic component of previous pentafluoro-3-hydroxy-pent-2-en-1-ones forms a hydrogen bond to the resistance-inducing serine.

Furthermore, the new inhibitor BH267.meta can enter the parasite *P. falciparum in vitro* and kill it with nanomolar efficacy. In addition, BH267.meta can inhibit the FNTs of all human-pathogenic *Plasmodium* species. The same is true for PbFNT from *P. berghei*, which is infectious to mice and other rodents and represents the first step in animal testing.

Furthermore, BH267.meta has low affinity for the human lactate transporter hMCT1, reducing the risk of off-target effects. Similarly, BH267.meta has no toxic effect on the human cell lines HEK293 and HepG2 and has no inhibitory effect on the hERG channel.

Based on the efficacy and the good toxicological profile, initial animal studies were performed in the mouse model. These showed *in vivo* efficacy at the level of artesunate against *P. berghei*.

With new resistance mutations, which could be cultivated after several trials, new challenges for the compound class came up. Nevertheless, BH267.meta remains a compound that has an excellent toxicological profile and is effective both *in vitro* and *in vivo*.

9 Literaturverzeichnis

1. Yan, N. Structural biology of the major facilitator superfamily transporters. *Annu Rev Biophys* 44, 257–283 (2015).
2. Jardetzky, O. Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature* 211, 969–970 (1966).
3. Waight, A. B., Love, J. & Wang, D.-N. Structure and mechanism of a pentameric formate channel. *Nat Struct Mol Biol* 17, 31–37 (2010).
4. Wu, B., Rambow, J., Bock, S., Holm-Bertelsen, J., Wiechert, M., Blancke Soares, A., Spielmann, T. & Beitz, E. Identity of a plasmodium lactate/H⁺ symporter structurally unrelated to human transporters. *Nat Commun* 6, 6284 (2015).
5. Unwin, N. The structure of ion channels in membranes of excitable cells. *Neuron* 3, 665–676 (1989).
6. Rycovska, A., Hatahet, L., Fendler, K. & Michel, H. The nitrite transport protein NirC from *Salmonella typhimurium* is a nitrite/proton antiporter. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1818, 1342–1350 (2012).
7. Sui, H., Han, B.-G., Lee, J. K., Walian, P. & Jap, B. K. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* 414, 872–878 (2001).
8. Ikeda, M., Beitz, E., Kozono, D., Guggino, W.B., Agre, P. & Yasui, M. Characterization of Aquaporin-6 as a nitrate channel in mammalian cells: requirement of pore-lining residue threonine 63. *J Biol Chem* 277, 39873–39879 (2002).
9. Sivaprakasam, S., Bhutia, Y. D., Yang, S. & Ganapathy, V. Short-chain fatty acid transporters: role in colonic homeostasis. *Compr Physiol.* 8, 299–314 (2017).
10. Kuwahara, M. & Marumo, F. Diseases caused by disorders of membrane transport: an overview. *Nihon Rinsho* 54, 581–585 (1996).
11. Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B. & Giacomini, K. M. SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 14, 543–560 (2015).
12. Benninga, H. A history of lactic acid making: a chapter in the history of biotechnology. Kluwer Academic Publishers (1990).

13. Fletcher, W. M. & Hopkins, F. G. Lactic acid in amphibian muscle 1. *J Physiol* 35, 247–309 (1907).
14. Ferguson, B. S. Rogatzki, M. J., Goodwin, M. L., Kane, D. A., Rightmire, Z. & Gladden, L. B. Lactate metabolism: historical context, prior misinterpretations, and current understanding. *Eur J Appl Physiol* 118, 691–728 (2018).
15. Brooks, G. A. The science and translation of lactate shuttle theory. *Cell Metab* 27, 757–785 (2018).
16. Parks, S. K., Chiche, J. & Pouyssegur, J. pH control mechanisms of tumor survival and growth. *J Cell Physiol* 226, 299–308 (2011).
17. Rabinowitz, J. D. & Enerbäck, S. Lactate: the ugly duckling of energy metabolism. *Nat Metab* 2, 566–571 (2020).
18. Hui, S., Ghergurovich, J. M., Morscher, R. J., Jang, C., Teng, X., Lu, W., Esparza, L. A., Reya, T., Zhan, L., Guo, J. Y., White, E. & Rabinowitz J. D. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. *Nature* 551, 115–118 (2017).
19. Hashimoto, T., Hussien, R., Oommen, S., Gohil, K. & Brooks, G. A. Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *FASEB J* 21, 2602–2612 (2007).
20. Brooks, G. A. Cell-cell and intracellular lactate shuttles: lactate: Darth Vader or Jedi Knight of exercise physiology? *J Physiol* 587, 5591–5600 (2009).
21. Izzo, L. T. & Wellen, K. E. Histone lactylation links metabolism and gene regulation. *Nature* 574, 492–493 (2019).
22. Zhang, D., Tang, Z., Huang, H. et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature* 574, 575–580 (2019).
23. Marger, M. D. & Saier, M. H. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* 18, 13–20 (1993).
24. Saier, M. H. TCDB: the transporter classification database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Res* 34, D181–D186 (2006).

25. Halestrap, A. P. The SLC16 gene family - structure, role and regulation in health and disease. *Mol Aspects Med* 34, 337–349 (2013).
26. Bosshart, P. D., Charles, R.-P., Garibhsingh, R.-A. A., Schlessinger, A. & Fotiadis, D. SLC16 family: from atomic structure to human disease. *Trends Biochem Sci* 46, 28–40 (2021).
27. Bosshart, P. D., Kalbermatter, D., Bonetti, S. & Fotiadis, D. Mechanistic basis of L-lactate transport in the SLC16 solute carrier family. *Nat Commun* 10, 2649 (2019).
28. Wang, N. Jiang X, Zhang S, Zhu A, Yuan Y, Xu H, Lei J & Yan C. Structural basis of human monocarboxylate transporter 1 inhibition by anti-cancer drug candidates. *Cell* 184, 370–383.e13 (2021).
29. Felmler, M. A., Jones, R. S., Rodriguez-Cruz, V., Follman, K. E. & Morris, M. E. Monocarboxylate transporters (SLC16): function, regulation, and role in health and disease. *Pharmacol Rev* 72, 466–485 (2020).
30. Halestrap, A. P. The monocarboxylate transporter family - structure and functional characterization. *IUBMB Life* 64, 1–9 (2012).
31. Hugo, S. E., Cruz-Garcia, L., Karanth, S., Anderson, R. M., Stainier, D. Y. & Schlegel, A. A. A monocarboxylate transporter required for hepatocyte secretion of ketone bodies during fasting. *Genes Dev* 26, 282–293 (2012).
32. Friesema, E. C. H., Ganguly, S., Abdalla A., Manning Fox, J.E., Halestrap, A.P. & Visser, T. J. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem* 278, 40128–40135 (2003).
33. Kim, D. K., Kanai, Y., Matsuo, H., Kim, J. Y., Chairoungdua, A., Kobayashi, Y., Enomoto, A., Cha, S. H., Goya, T. & Endou, H. The human T-type amino acid transporter-1: characterization, gene organization, and chromosomal location. *Genomics* 79, 95–103 (2002).
34. Kim, D. K., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Matsuo, H., Cha, S. H. & Endou, H. Expression cloning of a Na⁺-independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H⁺/monocarboxylate transporters. *J Biol Chem* 276, 17221–17228 (2001).
35. Uemura, S. Mochizuki, T., Kurosaka, G., Hashimoto, T., Masukawa, Y. & Abe, F. Functional analysis of human aromatic amino acid transporter MCT10/TAT1 using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Biomebr* 1859, 2076–2085 (2017).

36. Abplanalp, J., Laczko, E., Philp, N. J., Neidhardt, J., Zuercher, J., Braun, P., Schorderet, D. F., Munier, F. L., Verrey, F., Berger, W., Camargo, S. M. & Kloeckener-Gruissem, B. The cataract and glucosuria associated monocarboxylate transporter MCT12 is a new creatine transporter. *Hum Mol Gen* 22, 3218–3226 (2013).
37. Futagi, Y., Narumi, K., Furugen, A., Kobayashi, M. & Iseki, K. Molecular characterization of the orphan transporter SLC16A9, an extracellular pH- and Na⁺-sensitive creatine transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 522, 539–544 (2020).
38. Suhre, K., Shin, S. Y., Petersen, A. K., Mohny, R. P., Meredith, D., Wägele, B., Altmaier, E., CARDIoGRAM, Deloukas, P., Erdmann, J., Grundberg, E., Hammond, C. J., de Angelis, M. H., Kastenmüller, G., Köttgen, A., Kronenberg, F., Mangino, M., Meisinger, C., Meitinger, T., Mewes, H. W., Milburn, M. V., Prehn, C., Raffler, J., Ried, J. S., Römisch-Margl, W., Samani, N. J., Small, K. S., Wichmann, H. E., Zhai, G., Illig, T., Spector, T. D., Adamski, J., Soranzo, N. & Gieger, C. Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. *Nature* 477, 54–60 (2011).
39. Murakami, Y., Kohyama, N., Kobayashi, Y., Ohbayashi, M., Ohtani, H., Sawada, Y. & Yamamoto, T. Functional characterization of human monocarboxylate transporter 6 (SLC16A5). *Drug Metab and Dispos* 12, 1845-51 (2005).
40. Kohyama, N., Shiokawa, H., Ohbayashi, M., Kobayashi, Y. & Yamamoto, T. Characterization of monocarboxylate transporter 6: expression in human intestine and transport of the antidiabetic drug nateglinide. *Drug Metab Dispos* 41, 1883–1887 (2013).
41. Jones, R. S., Parker, M. D. & Morris, M. E. Quercetin, morin, luteolin, and phloretin are dietary flavonoid inhibitors of monocarboxylate transporter 6. *Mol Pharm* 14, 2930–2936 (2017).
42. Nakai, M., Chen, L. & Nowak, R. A. Tissue distribution of basigin and monocarboxylate transporter 1 in the adult male mouse: a study using the wild-type and basigin gene knockout mice. *Anat Rec* 288A, 527–535 (2006).
43. Manoharan, C., Wilson, M. C., Sessions, R. B. & Halestrap, A. P. The role of charged residues in the transmembrane helices of monocarboxylate transporter 1 and its ancillary protein basigin in determining plasma membrane expression and catalytic activity. *Mol Membr Biol* 23, 486–498 (2006).

44. Halestrap, A. P. Monocarboxylic acid transport. *Compr Physiol* 3, 1611–43 (2013).
45. Poole, R. C. & Halestrap, A. P. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol* 264, C761–C782 (1993).
46. Vaughan-Jones, R. D., Spitzer, K. W. & Swietach, P. Intracellular pH regulation in heart. *J Mol Cell Cardiol* 46, 318–331 (2009).
47. De Bruijne, A. W., Vreeburg, H. & Van Steveninck, J. Kinetic analysis of l-lactate transport in human erythrocytes via the monocarboxylate-specific carrier system. *Biochim Biophys Acta* 732, 562–568 (1983).
48. de Bruijne, A. W., Vreeburg, H. & van Steveninck, J. Alternative-substrate inhibition of l-lactate transport via the monocarboxylate-specific carrier system in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 812, 841–844 (1985).
49. Juel, C., Kristiansen, S., Pilegaard, H., Wojtaszewski, J. & Richter, E. A. Kinetics of lactate transport in sarcolemmal giant vesicles obtained from human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 76, 1031–1036 (1994).
50. McCullagh, K. J. & Bonen, A. Reduced lactate transport in denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 268, R884–R888 (1995).
51. Baker, S. K., McCullagh, K. J. A. & Bonen, A. Training intensity-dependent and tissue-specific increases in lactate uptake and MCT-1 in heart and muscle. *J Appl Physiol* 84, 987–994 (1998).
52. Murray, C. M., Hutchinson, R., Bantick, J. R., Belfield, G. P., Benjamin, A. D., Brazma, D., Bundick, R. V., Cook, I. D., Craggs, R. I., Edwards, S., Evans, L. R., Harrison, R., Holness, E., Jackson, A. P., Jackson, C. G., Kingston, L. P., Perry, M. W., Ross, A. R., Rugman, P. A., Sidhu, S. S., Sullivan, M., Taylor-Fishwick, D. A., Walker, P. C., Whitehead, Y. M., Wilkinson, D. J., Wright, A. & Donald, D. K. Monocarboxylate transporter MCT1 is a target for immunosuppression. *Nat Chem Biol* 1, 371–376 (2005).
53. Warburg, O., Wind, F. & Negelein, E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* 8, 519–530 (1927).
54. Polanski, R., Hodgkinson, C. L., Fusi, A., Nonaka, D., Priest, L., Kelly, P., Trapani, F., Bishop, P. W., White, A., Critchlow, S. E., Smith, P. D., Blackhall, F., Dive, C. & Morrow, C. J.

Activity of the Monocarboxylate Transporter 1 Inhibitor AZD3965 in Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 20, 926–937 (2014).

55. Ovens, M. J., Davies, A. J., Wilson, M. C., Murray, C. M. & Halestrap, A. P. AR-C155858 is a potent inhibitor of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT2 that binds to an intracellular site involving transmembrane helices 7–10. *Biochem J* 425, 523–530 (2010).

56. Kirk, P., Wilson, M. C., Heddle, C., Brown, M. H., Barclay, A. N. & Halestrap, A. P. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J* 19, 3896–3904 (2000).

57. Köpnick, A. L., Jansen, A., Geistlinger, K., Epalle, N. H. & Beitz, E. Basigin drives intracellular accumulation of l-lactate by harvesting protons and substrate anions. *PLoS ONE* 16, e0249110 (2021).

58. Almgren, P., Lehtovirta, M., Isomaa, B., Sarelin, L., Taskinen, M. R., Lyssenko, V., Tuomi, T. & Groop, L. Heritability and familiarity of type 2 diabetes and related quantitative traits in the Botnia study. *Diabetologia* 54, 2811–2819 (2011).

59. the DIAbetes Genetics Replication And Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium. Morris, A., Voight, B. *et al.* Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat Genet* 44, 981–990 (2012).

60. Villalpando, S., de la Cruz, V., Rojas, R., Shamah-Levy, T., Avila, M. A., Gaona, B., Rebollar, R. & Hernández, L. Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in mexican adult population: a probabilistic survey. *Salud publica Mex* 52, S19–S26 (2010).

61. Rusu, V., Hoch, E., Mercader, J. M., Tenen, D. E., Gymrek, M., Hartigan, C. R., DeRan, M., von Grotthuss, M., Fontanillas, P., Spooner, A., Guzman, G., Deik, A. A., Pierce, K. A., Dennis, C., Clish, C. B., Carr, S. A., Wagner, B. K., Schenone, M., Ng, M. C. Y., Chen, B. H.; MEDIA Consortium; SIGMA T2D Consortium, Centeno-Cruz, F., Zerrweck, C., Orozco, L., Altshuler, D. M., Schreiber, S. L., Florez, J. C., Jacobs, S. B. R., Lander, E. S. Type 2 diabetes variants disrupt function of SLC16A11 through two distinct mechanisms. *Cell* 170, 199–212.e20 (2017).

62. Zhao, Y., Feng, Z., Zhang, Y., Sun, Y., Chen, Y., Liu, X., Li, S., Zhou, T., Chen, L., Wei, Y., Ma, D., Lui, K. O., Ying, H., Chen, Y., Ding, Q. Gain-of-function mutations of SLC16A11 contribute to the pathogenesis of type 2 diabetes. *Cell Rep* 26, 884–892.e4 (2019).

63. Fisel, P., Schäffeler, E. & Schwab, M. Clinical and functional relevance of the monocarboxylate transporter family in disease pathophysiology and drug therapy: relevance of the monocarboxylate transporter family in disease and therapy. *Clin Transl Sci* 11, 352–364 (2018).
64. Lü, W. Du, J., Schwarzer, N. J., Wacker, T., Andrade, S. L., Einsle, O. The formate/nitrite transporter family of anion channels. *Biol Chem* 394, 715–727 (2013).
65. Meier, A., Eler, H. & Beitz, E. Targeting channels and transporters in protozoan parasite infections. *Front Chem* 6, 88 (2018).
66. Marchetti, R. V., Lehane, A. M., Shafik, S. H., Winterberg, M., Martin, R. E. & Kirk, K. A lactate and formate transporter in the intraerythrocytic malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun* 6, 6721 (2015).
67. Czyzewski, B. K. & Wang, D.-N. Identification and characterization of a bacterial hydrosulphide ion channel. *Nature* 483, 494–497 (2012).
68. 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* 462, 467–472 (2009).
69. Agre, P., King, L. S., Yasui, M., Guggino, W. B., Ottersen, O. P., Fujiyoshi, Y., Engel, A. & Nielsen, S. Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 542, 3–16 (2002).
70. Fu, D., Libson, A., Miercke, L. J., Weitzman, C., Nollert, P., Krucinski, J., Stroud, R. M. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* 290, 481–486 (2000).
71. World Health Organization. (2019). World health statistics 2019: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. World Health Organization.
72. Seeber, F. & Steinfeldt, S. Recent advances in understanding apicomplexan parasites. *Faculty Rev* 5, 1369 (2016).
73. Kantele, A. & Jokiranta, T. S. Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. *Clin Infect Dis* 52, 1356–1362 (2011).

74. Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D. & Marsh, K. Malaria: biology and disease. *Cell* 167, 610–624 (2016).
75. Phillips, M. A., Burrows, J. N., Manyando C., van Huijsduijnen, R. H., Van Voorhis, W. C., Wells, T. N. C. Malaria. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17050 (2017).
76. *World malaria report 2020: 20 Years of global progress and challenges*, World Health Organization, Geneva (2020).
77. Cotter, C., Sturrock, H. J., Hsiang, M. S., Liu, J., Phillips, A. A., Hwang, J., Gueye, C. S., Fullman, N., Gosling, R. D., Feachem, R. G. The changing epidemiology of malaria elimination: new strategies for new challenges. *Lancet* 382, 900–911 (2013).
78. Anstey, N. M., Douglas, N. M., Poespoprodjo, J. R. & Price, R. N. *Plasmodium vivax*: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. *Adv Parasitol* 80 151–201 (2012).
79. Lover, A. A., Dantzer, E., Hocini, S., Estera, R., Rerolle, F., Smith, J. L., Hwang, J., Gosling R., Yukich, J., Greenhouse, B., Jacobson, J., Phetsouvanh, R., Hongvanthong, B. & Bennett, A. Study protocol for a cluster-randomized split-plot design trial to assess the effectiveness of targeted active malaria case detection among high-risk populations in Southern Lao PDR (the AcME-Lao study). *Gates Open Res* 3, 1730 (2019).
80. Hwang, J., Cullen, K. A., Kachur, S. P., Arguin, P. M. & Baird, J. K. Severe morbidity and mortality risk from malaria in the United States, 1985–2011. *Open Forum Infect Dis* 1, ofu034 (2014).
81. White, N. J., Pukrittayakamee, S., Hien, T. T., Faiz, M. A., Mokuolu, O. A. & Dondorp, A. M. Malaria. *Lancet* 383, 723–735 (2014).
82. Crosnier, C., Bustamante, L. Y., Bartholdson, S. J., Bei, A. K., Theron, M., Uchikawa, M., Mboup, S., Ndir, O., Kwiatkowski, D. P., Duraisingh, M. T., Rayner, J. C., Wright, G. J. Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature* 480, 534–537 (2011).
83. van Dooren, G. G., Stimmler, L. M. & McFadden, G. I. Metabolic maps and functions of the *Plasmodium* mitochondrion. *FEMS Microbiol Rev* 30, 596–630 (2006).
84. Malaria: parasite biology, pathogenesis, and protection. ASM Press (1998).

85. McKee, R. W., Ormsbee, R. A., Anfinson, C. B., Geiman, Q. M. & Ball, E. G. Studies on malarial parasites. *J Exp Med* 84, 569–582 (1946).
86. Krotoski, W. A., Krotoski, D. M., Garnham, P. C., Bray, R. S., Killick-Kendrick, R., Draper, C. C., Targett, G. A. & Guy, M.W. Relapses in primate malaria: discovery of two populations of exoerythrocytic stages. Preliminary note. *Br Med J* 280, 153–154 (1980).
87. White, N. J. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J* 10, 297 (2011).
88. Gural, N., Mancio-Silva, L., Miller, A. B., Galstian, A., Butty, V. L., Levine, S. S., Patrapuvich, R., Desai, S.P., Mikolajczak, S. A., Kappe, S. H. I., Fleming, H. E., March, S., Sattabongkot, J. & Bhatia, S. N. *In vitro* culture, drug sensitivity, and transcriptome of *Plasmodium vivax* hypnozoites. *Cell Host Microbe* 23, 395-406.e4 (2018).
89. von Seidlein, L., Olaosebikan R., Hendriksen, I. C., Lee, S. J., Adedoyin, O. T., Agbenyega, T., Nguah, S. B., Bojang, K., Deen, J. L., Evans, J., Fanello, C. I., Gomes, E., Pedro, A. J., Kahabuka, C., Karema, C., Kivaya, E., Maitland, K., Mokuolu, O. A., Mtove, G., Mwanga-Amumpaire, J., Nadjm, B., Nansumba, M., Ngum, W. P., Onyamboko, M. A., Reyburn, H., Sakulthaew, T., Silamut, K., Tshefu, A. K., Umulisa, N., Gesase, S., Day, N. P., White, N. J., Dondorp, A. M. Predicting the clinical outcome of severe *falciparum* malaria in african children: findings from a large randomized trial. *Clin Infect Dis* 54, 1080–1090 (2012).
90. Dondorp, A. M., Lee, S. J., Faiz, M. A., Mishra, S., Price, R., Tjitra, E., Than, M., Htut, Y., Mohanty, S., Yunus, E. B., Rahman, R., Nosten, F., Anstey, N. M., Day, N. P. & White, N. J. The relationship between age and the manifestations of and mortality associated with severe malaria. *Clin Infect Dis* 47, 151–157 (2008).
91. Postels, D. G. & Birbeck, G. L. Cerebral malaria. *Handb Clin Neurol.* 114 91–102 (2013).
92. Kariuki, S. N. & Williams, T. N. Human genetics and malaria resistance. *Hum Genet* 139, 801–811 (2020).
93. Cox, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites Vectors* 3, 5 (2010).
94. van den Berg, H. Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. *Environ Health Perspect* 117, 1656–1663 (2009).

95. Alout, H., Roche, B., Dabiré, R. K. & Cohuet, A. Consequences of insecticide resistance on malaria transmission. *PLoS Pathog* 13, e1006499 (2017).
96. Palacpac, N. M. Q. & Horii, T. Malaria vaccines: facing unknowns. *Faculty Res* 9, 296 (2020).
97. Illingworth, J. J., Alanine, D. G., Brown, R., Marshall, J. M., Bartlett, H.E., Silk, S.E., Labbé, G.M., Quinkert, D., Cho, J. S., Wendler, J. P., Pattinson, D. J., Barfod, L., Douglas, A. D., Shea, M. W., Wright, K. E., de Cassan, S. C., Higgins, M. K. & Draper, S. J. Functional Comparison of blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate antigens. *Front Immunol* 10, 1254 (2019).
98. Olotu, A., Fegan, G., Wambua, J., Nyangweso, G., Leach, A., Lievens, M., Kaslow, D. C., Njuguna, P., Marsh, K. & Bejon, P. Seven-Year Efficacy of RTS,S/AS01 Malaria vaccine among young african children. *N Engl J Med* 374, 2519–2529 (2016).
99. Moorthy, V. & Binka, F. R21/Matrix-M: a second malaria vaccine? *Lancet* 397, 1782–1783 (2021).
100. Shanks, G. D. Historical review: problematic malaria prophylaxis with quinine. *Am J Trop Med Hyg* 95, 269–272 (2016).
101. Achan, J., Talisuna, A. O., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J. K., Baliraine, F. N., Rosenthal, P. J. & D'Alessandro U. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar J* 10, 144 (2011).
102. Fidock, D. A., Nomura, T., Talley, A. K., Cooper, R. A., Dzekunov, S. M., Ferdig, M. T., Ursos, L. M., Sidhu, A. B., Naudé, B., Deitsch, K. W., Su, X. Z., Wootton, J. C., Roepe, P. D. & Wellems, T. E. Mutations in the *P. falciparum* digestive Vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 6, 861–871 (2000).
103. Kim, J., Tan, Y. Z., Wicht, K. J., Erramilli, S. K., Dhingra, S. K., Okombo, J., Vendome, J., Hagenah, L. M., Giacometti, S. I., Warren, A., Nosol, K., Roepe, P. D., Potter, C. S., Carragher, B., Kosiakoff, A. A., Quick, M., Fidock, D. A. & Mancía, F. Structure and drug resistance of the *Plasmodium falciparum* transporter PfCRT. *Nature* 576, 315–320 (2019).
104. Cowman, A. F. The P-glycoprotein homologues of *Plasmodium falciparum*: are they involved in chloroquine resistance? *Parasitol Today* 7, 70–76 (1991).

105. Raj, D. K., Mu, J., Jiang, H., Kabat, J., Singh, S., Sullivan, M., Fay, M. P., McCutchan, T. F., & Su, X. Z. Disruption of a *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-associated Protein (PfMRP) alters its fitness and transport of antimalarial drugs and glutathione. *Journal of Biological Chemistry* 284, 7687–7696 (2009).
106. Faurant, C. From bark to weed: the history of artemisinin. *Parasite* 18, 215–218 (2011).
107. Meshnick, S. R., Yang, Y. Z., Lima, V., Kuypers, F., Kamchonwongpaisan, S. & Yuthavong, Y. Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu). *Antimicrob Agents Chemother* 37, 1108–1114 (1993).
108. Wang, J., Zhang, C. J., Chia, W. N., Loh, C. C., Li, Z., Lee, Y. M., He, Y., Yuan, L. X., Lim, T. K., Liu, M., Liew, C. X., Lee, Y. Q., Zhang, J., Lu, N., Lim, C. T., Hua, Z. C., Liu, B., Shen, H. M., Tan, K. S. & Lin, Q. Haem-activated promiscuous targeting of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun* 6, 10111 (2015).
109. Birnbaum, J. Scharf, S., Schmidt, S., Jonscher, E., Hoeijmakers, W. A. M., Flemming, S., Toenhake, C. G., Schmitt, M., Sabitzki, R., Bergmann, B., Fröhlke, U., Mesén-Ramírez, P., Blancke Soares, A., Herrmann, H., Bártfai, R., Spielmann, T. A Kelch13-defined endocytosis pathway mediates artemisinin resistance in malaria parasites. *Science* 367, 51–59 (2020).
110. Fairhurst, R. M. & Dondorp, A. M. Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Microbiol Spectr* 4, (2016).
111. Deng, D., Xu, C., Sun, P., Wu, J., Yan, C., Hu, M., Yan, N. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature* 510, 121–125 (2014).
112. Lingelbach, K. & Joiner, K. A. The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci* 111 (11), 1467–1475 (1998).
113. Woodrow, C. J., Penny, J. I. & Krishna, S. Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* expresses a high affinity facilitative hexose transporter. *J Biol Chem* 274, 7272–7277 (1999).
114. Cranmer, S. L., Conant, A. R., Gutteridge, W. E. & Halestrap, A. P. 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* 270, 15045–15052 (1995).

115. Ginsburg, H. Abundant proton pumping in *Plasmodium*, but why? Trends Parasitol 18, 483–486 (2002).
116. Alkhalil, A., Cohn, J. V., Wagner, M. A., Cabrera, J. S., Rajapandi, T. & Desai, S.A. Plasmodium falciparum likely encodes the principal anion channel on infected human erythrocytes. Blood 104, 4279–4286 (2004).
117. Walloch, P., Henke, B., Häuer, S., Bergmann, B., Spielmann, T. & Beitz, E. Introduction of scaffold nitrogen atoms renders inhibitors of the malarial L-lactate transporter, PfFNT, effective against the Gly107Ser resistance mutation. J Med Chem 63, 9731–9741 (2020).
118. Elliott, J. L., Saliba, K. J. & Kirk, K. Transport of lactate and pyruvate in the intraerythrocytic malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. Biochem J 355, 733–739 (2001).
119. Gollmack, A., Henke, B., Bergmann, B., Wiechert, M., Erler, H., Blancke Soares, A., Spielmann, T. & Beitz E. Substrate-analogous inhibitors exert antimalarial action by targeting the *Plasmodium* lactate transporter PfFNT at nanomolar scale. PLoS Pathog 13, (2017).
120. Lu, W., Du, J., Wacker, T., Gerbig-Smentek, E., Andrade, S. L. & Einsle, O. pH-dependent gating in a FocA formate channel. Science 332, 352–354 (2011).
121. Lu, W., Du, J., Schwarzer, N. J., Gerbig-Smentek, E., Einsle, O. & Andrade, S. L. The formate channel FocA exports the products of mixed-acid fermentation. Proc Natl Acad Sci 109, 13254–13259 (2012).
122. Hunger, D., Doberenz, C. & Sawers, R. G. Identification of key residues in the formate channel FocA that control import and export of formate. Biol Chem 395, 813–825 (2014).
123. Wiechert, M. & Beitz, E. Mechanism of formate–nitrite transporters by dielectric shift of substrate acidity. EMBO J 36, 949–958 (2017).
124. Helmstetter, F., Arnold, P., Höger, B., Petersen, L. M. & Beitz, E. Formate–nitrite transporters carrying nonprotonatable amide amino acids instead of a central histidine maintain pH-dependent transport. J Biol Chem 294, 623–631 (2019).
125. Wiechert, M., Erler, H., Gollmack, A. & Beitz, E. A widened substrate selectivity filter of eukaryotic formate-nitrite transporters enables high-level lactate conductance. FEBS J 284, 2663–2673 (2017).

126. Wiechert, M. & Beitz, E. Mechanism of formate–nitrite transporters by dielectric shift of substrate acidity. *EMBO J* 36, 949–958 (2017).
127. Wiechert, M. & Beitz, E. Formate-nitrite transporters: monoacids ride the dielectric slide. *Channels* 11, 365–367 (2017).
128. Lu, W., Du, J., Schwarzer, N. J., Gerbig-Smentek, E., Einsle, O. & Andrade, S. L. The formate channel FocA exports the products of mixed-acid fermentation. *Proc Natl Acad Sci* 109, 13254–13259 (2012).
129. Khademi, S., O'Connell, J., Remis, J., Robles-Colmenares, Y., Miercke, L. J., Stroud, R.M. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science* 305, 1587–1594 (2004).
130. Schmidt, J. D. R., Walloch, P., Höger, B. & Beitz, E. Aquaporins with lactate/lactic acid permeability at physiological pH conditions. *Biochimie* (Epub ahead of print).
131. Spangenberg, T., Burrows, J. N., Kowalczyk, P., McDonald, S., Wells, T. N., Willis, P. The open access malaria box: a drug discovery catalyst for neglected diseases. *PLoS ONE* 8, e62906 (2013).
132. Erler, H., Ren, B., Gupta, N. & Beitz, E. The intracellular parasite *Toxoplasma gondii* harbors three druggable FNT-type formate and l-lactate transporters in the plasma membrane. *J Biol Chem* 293, 17622–17630 (2018).
133. Lyu, M., Su, C., Kazura, J. W. & Yu, E. W. Structural basis of transport and inhibition of the Plasmodium falciparum transporter PfFNT. *EMBO Rep* 22, (2021).
134. Soares-Silva, I., Paiva, S., Diallinas, G. & Casal, M. The conserved sequence NXX[S/T]HX[S/T]QDXXXT of the lactate/pyruvate:H⁺ symporter subfamily defines the function of the substrate translocation pathway. *Mol Membr Biol* 24, 464–474 (2007).
135. Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. & Hsu, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 69, 2110–2114 (1972).
136. Gietz, R. D. & Schiestl, R. H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* 2, 31–34 (2007).

137. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254 (1976).
138. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685 (1970).
139. Renart, J., Reiser, J. & Stark, G. R. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 3116–3120 (1979).
140. Schwarz, D., Junge, F., Durst, F., Frölich, N., Schneider, B., Reckel, S., Sobhanifar, S., Dötsch, V. & Bernhard, F. Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nat Protoc* 2, 2945–2957 (2007).
141. 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* 126, 109–114 (2016).
142. Müller-Lucks, A., Gena, P., Frascaria, D., Altamura, N., Svelto, M., Beitz, E. & Calamita, G. Preparative scale production and functional reconstitution of a human aquaglyceroporin (AQP3) using a cell free expression system. *N Biotechnol* 30, 545–551 (2013).
143. Schneider, B., Junge, F., Shirokov, V. A., Durst, F., Schwarz, D., Dötsch, V. & Bernhard, F. Membrane protein expression in cell-free systems. *Methods Mol Biol* 601, 165–186 (2010).
144. Bornhorst, J. A. & Falke, J. J. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol* 326, 245–254 (2000).
145. Crowe, J., Döbeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stüber, D. & Henco, K. 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior Technique in Recombinant Protein Expression/Purification. *Methods Mol Biol* 31, 371–388 (1994).
146. Rigaud, J. L., Paternostre, M. T. & Bluzat, A. Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin. *Biochemistry* 27, 2677–2688 (1988).

147. Damon, P. E., Lerman, J. C. & Long, A. Temporal fluctuations of atmospheric ^{14}C : causal factors and implications. *Annu Rev Earth Planet Sci* 6, 457–494 (1978).
148. Godwin, H. Half-life of Radiocarbon. *Nature* 195, 984–984 (1962).
149. Urey, H. C. The thermodynamic properties of isotopic substances. *J Chem Soc* 562, 562–581 (1947)
150. Trager, W. & Jensen, J. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193, 673–675 (1976).
151. Sosnovskikh, V. Y. & Usachev, B. I. 2-Polyfluoroalkylchromones. 6. Synthesis of substituted 2-morpholino-2-trifluoromethylchroman-4-ones. *Russ Chem Bull* 50, 453–455 (2001).
152. Casal, M., Paiva, S., Queirós, O. & Soares-Silva, I. Transport of carboxylic acids in yeasts. *FEMS Microbiol Rev* 32, 974–994 (2008).
153. Paiva, S., Devaux, F., Barbosa, S., Jacq, C. & Casal, M. Ady2p is essential for the acetate permease activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21, 201–210 (2004).
154. Andrade, R. P. & Casal, M. Expression of the lactate permease gene JEN1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet Biol* 32, 105–111 (2001).
155. Köpnick, A., Geistlinger, K. & Beitz, E. Cysteine 159 delineates a hinge region of the alternating access monocarboxylate transporter 1 and is targeted by cysteine-modifying inhibitors. *FEBS J* (Epub ahead of print)
156. Cherry, J. M., Hong, E. L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E. T., Christie, K. R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Engel, S. R., Fisk, D. G., Hirschman, J. E., Hitz, B. C., Karra, K., Krieger, C. J., Miyasato, S. R., Nash, R. S., Park, J., Skrzypek, M. S., Simison, M., Weng, S. & Wong, E. D. *Saccharomyces* genome database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Res* 40, D700–D705 (2012).
157. Stahl, T., Mattern, D. & Brunn, H. Toxicology of perfluorinated compounds. *Environ Sci Eur* 23, 38 (2011).
158. Sanchez Garcia, D., Sjödin, M., Hellstrandh, M., Norinder, U., Nikiforova, V., Lindberg, J., Wincent, E., Bergman, Å., Cotgreave, I. & Munic Kos, V. Cellular accumulation and lipid

binding of perfluorinated alkylated substances (PFASs) – A comparison with lysosomotropic drugs. *Chem Biol Interact* 281, 1–10 (2018).

159. Van Voorhis, W. C., Adams, J. H., Adelfio, R., Ah Yong, V., Akabas, M. H., Alano, P., Alday, A., Alemán Resto, Y., Alsibae, A., Alzualde, A., Andrews, K. T., Avery, S. V., Avery, V. M., Ayong, L., Baker, M., Baker, S., Ben Mamoun, C., Bhatia, S., Bickle, Q., Bounaadja, L., Bowling, T., Bosch, J., Boucher, L. E., Boyom, F. F., Brea, J., Brennan, M., Burton, A., Caffrey, C. R., Camarda, G., Carrasquilla, M., Carter, D., Belen Cassera, M., Chih-Chien Cheng, K., Chindaoudomsate, W., Chubb, A., Colon, B. L., Colón-López, D. D., Corbett, Y., Crowther, G. J., Cowan, N., D'Alessandro, S., Le Dang, N., Delves, M., DeRisi, J. L., Du, A. Y., Duffy, S., Abd El-Salam El-Sayed, S., Ferdig, M. T., Fernández Robledo, J. A., Fidock, D. A., Florent, I., Fokou, P.V., Galstian, A., Gamo, F. J., Gokool, S., Gold, B., Golub, T., Goldgof, G. M., Guha, R., Guiguemde, W. A., Gural, N., Guy, R. K., Hansen, M. A., Hanson, K. K., Hemphill, A., Hooft van Huijsduijnen, R., Horii, T., Horrocks, P., Hughes, T. B., Huston, C., Igarashi, I., Ingram-Sieber, K., Itoe, M. A., Jadhav, A., Naranuntarat Jensen, A., Jensen, L. T., Jiang, R. H., Kaiser, A., Keiser, J., Ketas, T., Kicka, S., Kim, S., Kirk, K., Kumar, V. P., Kyle, D. E., Lafuente, M. J., Landfear, S., Lee, N., Lee, S., Lehane, A. M., Li, F., Little, D., Liu, L., Llinás, M., Loza, M. I., Lubar, A., Lucantoni, L., Lucet, I., Maes, L., Mancama, D., Mansour, N. R., March, S., McGowan, S., Medina Vera, I., Meister, S., Mercer, L., Mestres, J., Mfopa, A. N., Misra, R. N., Moon, S., Moore, J. P., Morais Rodrigues da Costa, F., Müller, J., Muriana, A., Nakazawa Hewitt, S., Nare, B., Nathan, C., Narraido, N., Nawaratna, S., Ojo, K. K., Ortiz, D., Panic, G., Papadatos, G., Parapini, S., Patra, K., Pham, N., Prats, S., Plouffe, D. M., Poulsen, S. A., Pradhan, A., Quevedo, C., Quinn, R. J., Rice, C. A., Abdo Rizk, M., Ruecker, A., St Onge, R., Salgado Ferreira, R., Samra, J., Robinett, N. G., Schlecht, U., Schmitt, M., Silva Villela, F., Silvestrini, F., Sinden, R., Smith, D. A., Soldati, T., Spitzmüller, A., Stamm, S. M., Sullivan, D. J., Sullivan, W., Suresh, S., Suzuki, B. M., Suzuki, Y., Swamidass, S. J., Taramelli, D., Tchokouaha, L. R., Theron, A., Thomas, D., Tonissen, K.F., Townson, S., Tripathi, A. K., Trofimov, V., Udenze, K. O., Ullah, I., Vallieres, C., Vigil, E., Vinetz, J.M., Voong Vinh, P., Vu, H., Watanabe, N. A., Weatherby, K., White, P.M., Wilks, A. F., Winzeler, E. A., Wojcik, E., Were, M., Wu, W., Yokoyama, N., Zollo, P. H., Abla, N., Blasco, B., Burrows, J., Laleu, B., Leroy, D., Spangenberg, T., Wells, T. & Willis, P.A. Open source drug discovery with the malaria box compound collection for neglected diseases and beyond. *PLoS Pathog* 12, e1005763 (2016).

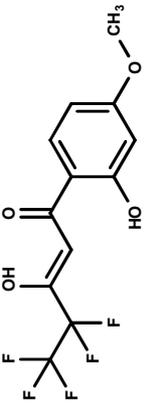
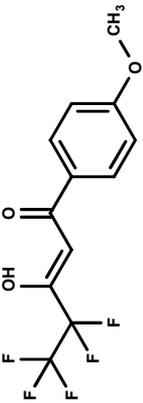
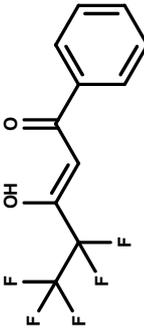
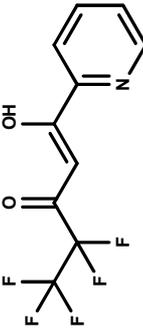
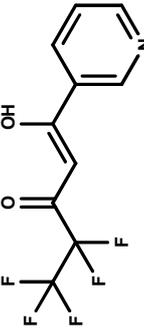
160. Lange, A., Zimmermann, M. O., Wilcken, R., Zahn, S. & Boeckler, F. M. Targeting histidine side chains in molecular design through nitrogen - halogen bonds. *J Chem Inf Model* 53, 3178–3189 (2013).
161. Walloch, P., Hansen, C., Priegann, T., Schade, D. & Beitz, E. Pentafluoro-3-hydroxy-pent-2-en-1-ones potently inhibit FNT-type lactate transporters from all five human-pathogenic *Plasmodium* species. *ChemMedChem* 16, 1283–1289 (2021).
162. Calderone, V., Testai, L., Martinotti, E., Del Tacca, M. & Breschi, M. C. Drug-induced block of cardiac hERG potassium channels and development of torsade de pointes arrhythmias: the case of antipsychotics. *J Pharm Pharmacol* 57, 151–161 (2010).
163. Hancox, J. C., McPate, M. J., El Harchi, A. & Zhang, Y. hong. The hERG potassium channel and hERG screening for drug-induced torsades de pointes. *Pharmacol Ther* 119, 118–132 (2008).
164. Vandenberg, J. I., Perry, M. D., Perrin, M. J., Mann, S. A., Ke, Y., & Hill, A. P. hERG K⁺ channels: structure, function, and clinical significance. *Physiological Reviews* 92, 1393–1478 (2012).
165. Volkov, V. Quantitative description of ion transport via plasma membrane of yeast and small cells. *Front Plant Sci* 6, (2015).
166. Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K. & Weissman, J. S. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737–741 (2003).
167. Brown, C. E. & Sachs, A. B. Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Mol Cell Biol* 18, 6548–6559 (1998).
168. Sharp, P. M., Tuohy, T. M. F. & Mosurski, K. R. Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucl Acids Res* 14, 5125–5143 (1986).
169. Hajek, P., Bader, A., Helmstetter, F., Henke, B., Arnold, P. & Beitz, E. Cell-free and yeast-based production of the malarial lactate transporter, PfFNT, delivers comparable yield and protein quality. *Front Pharmacol* 10, 375 (2019).
170. Zhao, Y., Feng, Z. & Ding, Q. Type 2 diabetes variants in the SLC16A11 coding region are not loss-of-function mutations. *Cell Rep* 29, 781–784 (2019).

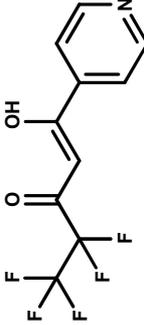
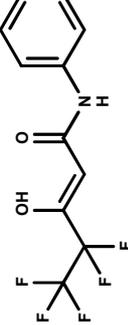
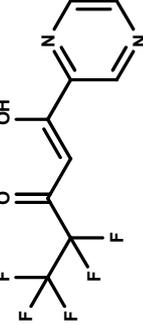
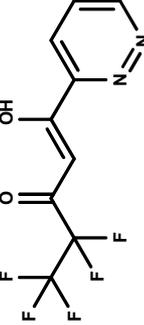
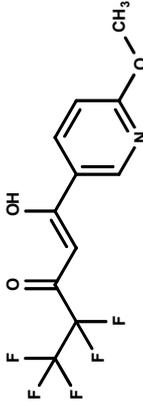
171. Pennington, L. D. & Moustakas, D. T. The necessary nitrogen atom: a versatile high-impact design element for multiparameter optimization. *J Med Chem* 60, 3552–3579 (2017).
172. Sigala, P. A., Ruben, E. A., Liu, C. W., Piccoli, P. M., Hohenstein, E. G., Martínez, T. J., Schultz, A. J. & Herschlag, D. Determination of hydrogen bond structure in water versus aprotic environments to test the relationship between length and stability. *J Am Chem Soc* 137, 5730–5740 (2015).
173. Jeffrey, G. A. *An introduction to hydrogen bonding*. (Oxford University Press, 1997).
174. Chopra, N., Chopra, G. & Kaur, D. Exploring the role of consecutive addition of nitrogen atoms on stability and reactivity of hydrogen-bonded azine–water complexes. *ACS Omega* 4, 8112–8121 (2019).
175. Desai, S. A., Krogstad, D. J. & McCleskey, E. W. A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite. *Nature* 362, 643–646 (1993).
176. Uchino, H., Kanai, Y., Kim, D. K., Wempe, M. F., Chairoungdua, A., Morimoto, E., Anders, M. W. & Endou, H. Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition. *Mol Pharmacol* 61, 729–737 (2002).
177. Errasti-Murugarren, E., Kanai, Y., Kim, D. K., Wempe, M. F., Chairoungdua, A., Morimoto, E., Anders, M. W. & Endou, H. L amino acid transporter structure and molecular bases for the asymmetry of substrate interaction. *Nat Commun* 10, 1807 (2019).
178. Rothert, M., Rönfeldt, D. & Beitz, E. Electrostatic attraction of weak monoacid anions increases probability for protonation and passage through aquaporins. *J Biol Chem* 292, 9358–9364 (2017).
179. Hansen, M., Kun, J. F. J., Schultz, J. E. & Beitz, E. A Single, bi-functional aquaglyceroporin in blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J Biol Chem* 277, 4874–4882 (2002).
180. Wu, B., Steinbronn, C., Alsterfjord, M., Zeuthen, T. & Beitz, E. Concerted action of two cation filters in the aquaporin water channel. *EMBO J* 28, 2188–2194 (2009).
181. Sirimulla, S., Bailey, J. B., Vegesna, R. & Narayan, M. Halogen interactions in protein–ligand complexes: implications of halogen bonding for rational drug design. *J Chem Inf Model* 53, 2781–2791 (2013).

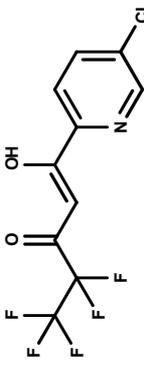
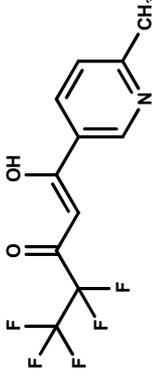
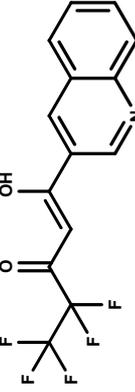
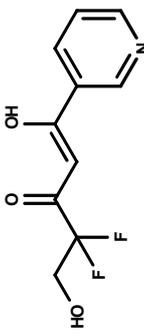
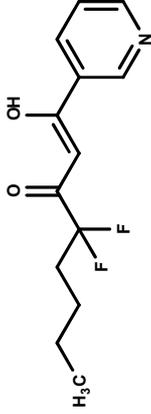
182. Amin, A. A. & Kokwaro, G. O. Antimalarial drug quality in Africa: antimalarial quality in Africa. *J Clin Pharm Ther* 32, 429–440 (2007).
183. Martin, D., Weise, A. & Niclas, H. J. The solvent dimethyl sulfoxide. *Angew Chem Int Ed Engl* 6, 318–334 (1967).
184. Connor, R. & Adkins, H. Alcoholysis and hydrolysis of 1,3-diketones and beta-keto esters. *J Am Chem Soc* 54, 3420–3427 (1932).
185. Sloop, J. C., Boyle, P. D., Fountain, A. W., Pearman, W. F. & Swann, J. A. Electron-deficient aryl β -diketones: synthesis and novel tautomeric preferences. *Eur J Org Chem* 2011, 936–941 (2011).
186. Sosnovskikh, V. Ya., Sizov, A. Yu. & Usachev, B. I. 2-Polyfluoroalkylchromones. 10. Synthesis of regioisomeric 3-(2-hydroxyaryl)-5-polyfluoroalkyl- and 5-(2-hydroxyaryl)-3-polyfluoroalkylisoxazoles and determination of their structures by ^1H , ^{19}F , and ^{13}C NMR spectroscopy. *Russ Chem Bull* 51, 1270–1279 (2002).
187. Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform* 4, 17 (2012).
188. Koeppe, B., Pylaeva, S. A., Allolio, C., Sebastiani, D., Nibbering, E. T., Denisov, G. S., Limbach HH & Tolstoy, P. M. Polar solvent fluctuations drive proton transfer in hydrogen bonded complexes of carboxylic acid with pyridines: NMR, IR and ab initio MD study. *Phys Chem Chem Phys* 19, 1010–1028 (2017).
189. Hanyu, M., Ninomiya, D., Yanagihara, R., Murashima, T., Miyazawa, T. & Yamada, T. Studies on intramolecular hydrogen bonding between the pyridine nitrogen and the amide hydrogen of the peptide: synthesis and conformational analysis of tripeptides containing novel amino acids with a pyridine ring. *J. Peptide Sci* 11, 491–498 (2005).
190. Beitz, E. TeXshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LaTeX2e. *Bioinformatics* 16, 135–139 (2000).
191. Bader, A. & Beitz, E. Transmembrane facilitation of lactate/H⁺ instead of lactic acid is not a question of semantics but of cell viability. *Membranes* 10, 236 (2020).

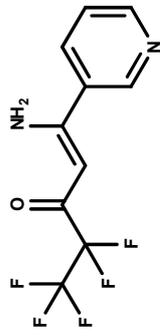
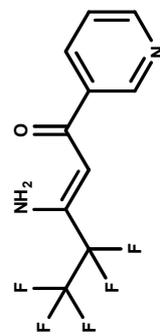
192. Wang, L. T., Bwambale, R., Keeler, C. *et al.* Private sector drug shops frequently dispense parenteral anti-malarials in a rural region of Western Uganda. *Malar J* 17, 305 (2018).
193. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. World Health Organization (2015).
194. Morris, C. A., Duparc, S., Borghini-Fuhrer, I., Jung, D., Shin, C. S. & Fleckenstein, L. Review of the clinical pharmacokinetics of artesunate and its active metabolite dihydroartemisinin following intravenous, intramuscular, oral or rectal administration. *Malar J* 10, 263 (2011).
195. Ducharme, J. & Farinotti, R. Clinical pharmacokinetics and metabolism of chloroquine: focus on recent advancements. *Clin Pharmacokinet* 31, 257–274 (1996).
196. Frisk-Holmberg, M., Bergqvist, Y., Termond, E. & Domeij-Nyberg, B. The single dose kinetics of chloroquine and its major metabolite desethylchloroquine in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 26, 521–530 (1984).
197. Olliaro, P. & Wells, T. The global portfolio of new antimalarial medicines under development. *Clin Pharmacol Ther* 85, 584–595 (2009).
198. White, N. J. & Olliaro, P. L. Strategies for the prevention of antimalarial drug resistance: rationale for combination chemotherapy for malaria. *Parasitol Today* 12, 399–401 (1996).

Anhang

| Nr. | Struktur | logP | IC ₅₀ (PfFNT) μM | IC ₅₀ (G107S) μM | EC ₅₀ (<i>P. falc.</i>) μM |
|-----|---|------|--------------------------------|--------------------------------|--|
| [1] |  | 2,90 | 0,17 ± 0,01 ¹¹⁹ | 21 ± 1 ¹¹⁹ | 0,14 ± 0,01 ¹¹⁹ |
| [2] |  | | 0,13 ± 0,01 | 2,1 ± 0,25 | 8,6 ± 0,5 ¹¹⁹ |
| [3] |  | 2,59 | 0,04 ± 0,01 | 5,2 ± 0,51 | 0,14 ± 0,01 |
| [4] |  | 1,48 | 0,15 ± 0,01 | 0,58 ± 0,09 | 13,50 ± 0,77 |
| [5] |  | 1,65 | 0,11 ± 0,01 | 0,63 ± 0,05 | 0,29 ± 0,01 |

| Nr. | Struktur | logP | IC ₅₀ (PFFNT) μM | IC ₅₀ (G107S) μM | EC ₅₀ (<i>P. falc.</i>) μM |
|------|---|------|--------------------------------|--------------------------------|--|
| [6] |  | | 0,15 ± 0,01 | 22 ± 6,7 | |
| [7] |  | | 0,46 ± 0,03 | 18,2 ± 6,5 | |
| [8] |  | 1,30 | 0,46 ± 0,03 | 1,2 ± 0,35 | |
| [9] |  | | 0,86 ± 0,03 | 3,8 ± 0,77 | |
| [10] |  | 2,20 | 0,11 ± 0,01 | 0,26 ± 0,04 | 3,87 ± 0,25 |

| Nr. | Struktur | logP | IC ₅₀ (PffNT) μM | IC ₅₀ (G107S) μM | EC ₅₀ (P. falc.) μM |
|------|---|------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| [11] |  | 2,32 | 0,23 ± 0,07 | 0,51 ± 0,10 | 14,0 ± 0,77 |
| [12] |  | 2,32 | 0,15 ± 0,01 | 1,7 ± 0,32 | |
| [13] |  | | 0,24 ± 0,04 | ≈ 100 | |
| [14] |  | | 5,1 ± 0,6 | > 1000 | |
| [15] |  | 2,33 | 0,36 ± 0,02 | 24,3 ± 6,2 | 20,09 ± 0,88 |

| Nr. | Struktur | logP | IC ₅₀ (PffNT) μM | IC ₅₀ (G107S) μM | EC ₅₀ (<i>P. falc.</i>) μM |
|------|---|------|--------------------------------|--------------------------------|--|
| [16] |  | | > 100 | | |
| [17] |  | | > 100 | | |

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation abgesehen von der Beratung durch den Betreuer selbstständig verfasst habe und nur mit den hier angegebenen Quellen und Hilfsmitteln gearbeitet habe. Die Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Ich versichere des Weiteren, dass mir noch kein akademischer Grad entzogen wurde.

Philipp Walloch

Kiel, September 2021