

1 Einleitung

1.1 Malaria- Verbreitung und Erreger

Die Malaria ist eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten des Menschen, die nach Angaben der WHO in über 100 Ländern oder Territorien vorkommt, vor allem in Afrika südlich der Sahara, Asien, Ozeanien, Zentral- und Süd-Amerika und in der Karibik. Etwa 40 % der Weltbevölkerung leben in Malariagebieten.

Nach Schätzung der WHO erkranken an ihr weltweit jährlich zwischen 300 und 500 Millionen Menschen, davon etwa 90 % in Afrika südlich der Sahara durch *Plasmodium falciparum*. An der Malaria sterben jährlich 1,2 Millionen Menschen, darunter 1 Million Kinder im tropischen Afrika (Kayser et al. 2005).

Die Gebiete schwerer endemischer Malaria mit hohen Befallsraten der Bevölkerung liegen in den Tropen, wo die Übertragung ganzjährig möglich ist. Hier überwiegt der Erreger der gefährlichen Malaria tropica, *Plasmodium falciparum*, der ein höheres Temperaturoptimum im Überträger hat.

Malaria kann auch in den gemäßigten Zonen auftreten.

In Deutschland gab es noch bis 1920 autochthone Herde (im Wesentlichen bedingt durch *P. vivax*) im Jadegebiet, in Nordfriesland, in der Umgebung um Magdeburg, am Bodensee und vor allem in der oberrheinischen Tiefebene (Dönges, 1980).

Aus 25 europäischen Staaten sind im Jahr 2000 mindestens 14180 importierte Fälle gemeldet worden (WHO, 2004). In der Türkei traten 2002 rund 10000 autochthone Malaria-Fälle auf, vor allem im Südosten des Landes. In ehemals Malaria freien Gebieten der Kaukasus Region ist in den letzten Jahren die autochthone Malaria erneut aufgetreten, in einigen weiter östlich gelegenen Staaten (z. B. Aserbaidshan, Tadschikistan, Turkmenistan) kam es zu Malaria Epidemien mit einigen Zehntausend Fällen (WHO, 2004).

Der Name „*mala aria*“ leitet sich aus dem Italienschen ab und bedeutet übersetzt „schlechte Luft“. Jahrtausendlang führte man die auch als Sumpffieber bezeichnete Erkrankung auf eine krankheitserregende Ausdünstung (Miasma) der Sümpfe zurück (Dönges, 1980).

Malaria wird durch die Infektion mit Protozoen der Gattung *Plasmodium* (Stamm: *Alveolata*, Unterstamm: *Apicomplexa*, Klasse: *Haematozoa*, Ordnung: *Haemosporida*, Familie: *Plasmodiidae*) verursacht. Derzeit sind vier humanpathogene *Plasmodium*-Arten bekannt, die zu jeweils spezifischen Krankheitsbildern führen: *P. falciparum* (Malaria tropica), *P. vivax* (Malaria tertiana), *P. ovale* (Malaria tertiana) und *P. malariae* (Malaria quartana). Gelegentlich treten auch Infektionen durch Affen-Malaria-Parasiten, wie z. B. *P. knowlesi* auf (WHO, 2006).

Die Übertragung der Parasiten erfolgt durch weibliche Gabel- oder Fiebermücken (Moskitos) der Gattung *Anopheles* (*Anopheles-gambiae*-Komplex u. a.) aus der Familie der Culicidae. Von den annähernd 400 Arten dieser Gattung sind ungefähr 60 als Malariaüberträger von Bedeutung (Abbildung 1). Zu diesem *Anopheles gambiae*-Komplex gehören mindestens sieben morphologisch nicht zu unterscheidende Arten. In ihren ökologischen Ansprüchen, ihren physiologischen Anpassungen sowie in ihrem Verhalten und ihrer Gefährlichkeit als Malariaüberträger unterscheiden sie sich allerdings sehr deutlich. Die wichtigsten Arten des Komplexes, die in Schwarzafrika zu den Hauptüberträgern der Malaria gehören, sind *Anopheles gambiae* und *Anopheles arabiensis*. Daneben agiert als dritte wichtige Überträgerin die Art *A. funestes*. Diese drei Mückenarten sind besonders gefährlich, da sie sich stark auf den Menschen fixiert haben (Paganotti et al. 2004).

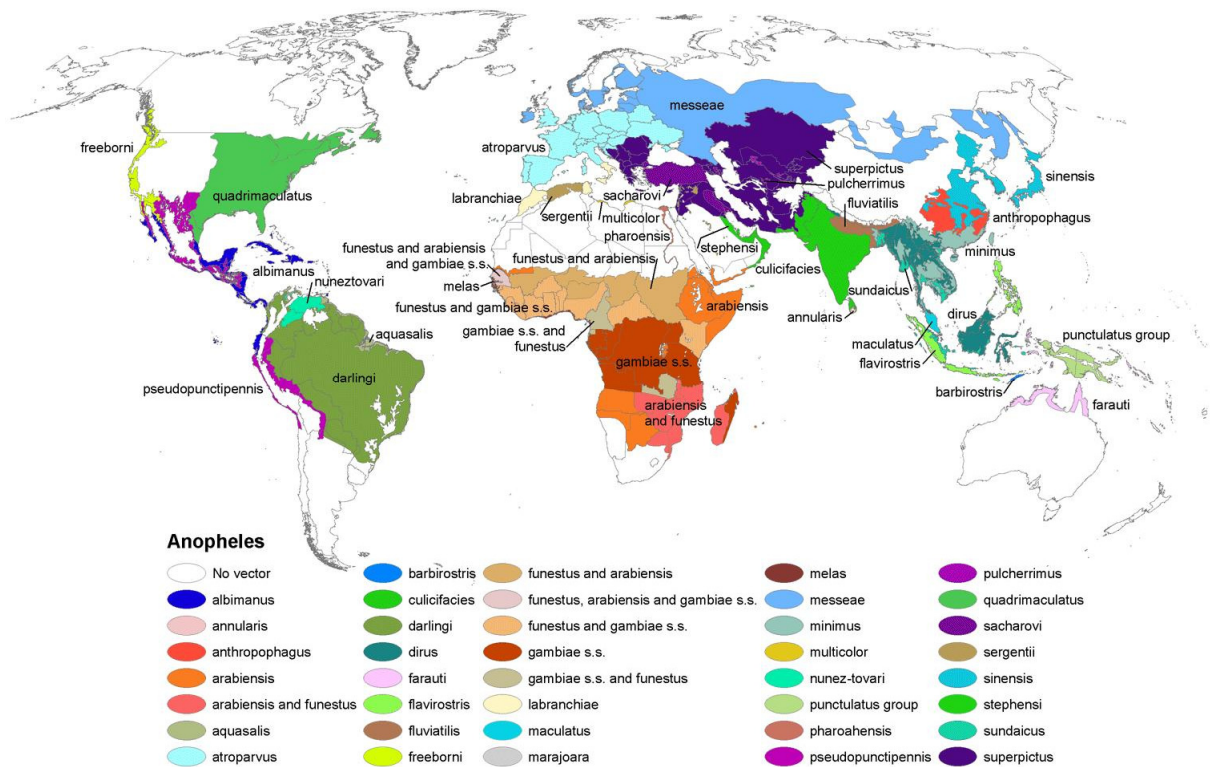


Abbildung 1 Weltweite Verbreitung der *Anopheles*-Arten (Kiszewski et al. 2004)

1.2 Lebenszyklus und Biologie von *Plasmodium falciparum*

Beim Menschen entwickelt sich der Erreger mit asexuellen Fortpflanzungszyklen in der Leber (= hepatozytäre Merogonie = Schizogonie) und in den roten Blutkörperchen (erythrozytenparasitäre Schizogonie).

Nach dem Stich einer infizierten Stechmücke gelangen die spindelförmigen Sporozoiten in die Blutbahn und die Lymphspalten. Für eine Infektion muss die Stechmücke nur wenige Parasiten übertragen, bei *P. falciparum* reichen nur etwa zehn Sporozoiten aus. Nach etwa 15 bis 45 Minuten erreichen die Einzeller auf dem Blutweg die Leber und dringen dort in die Hepatozyten ein und entwickeln sich zu vielkernigen, recht großen (30-70 µm) Schizonten (= Gewebeschizonten, Meronten). Nach 5 bis 7 Tagen bei *P. falciparum* oder 6 bis 8 Tagen bei den anderen Arten entstehen aus einem einzelnen Schizonten 2000 bis 30000 Merozoiten, die die nächste Phase des Parasitenzyklus einleiten (Kayser et al. 2005).

Die Merozoiten befallen dann die Blutkörperchen, die die Parasiten in eine membranbegrenzte parasitophore Vakuole einschließen. Die Merozoiten bilden ein

einkerniges Stadium, den Trophozoiten, der sich vom Inhalt der roten Blutzellen ernährt. Bei *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* ist er amöbenähnlich, bei *P. falciparum* ist er anfangs kreisrund, zentral abgeflacht und ähnelt mit dem randständigen Kern einem Siegelring. Dieses Ringstadium zirkuliert nur etwa 8 Stunden im peripheren Blut. Anschließend setzt es sich als Trophozoit in den Kapillaren der Leber, Milz und auch im Gehirn und der Plazenta fest. Die ersten vier Teilungszyklen verlaufen für das Plasmodium fast ohne Verluste und für den Befallenen völlig symptomlos. Die Parasitämie (Dichte der Trophozoiten im Blut) steigt unbemerkt rapide an (Wenk et al. 2003). Ist der Schizont herangereift, zerfällt er in viele Merozoiten, der Erythrozyt platzt und die Merozoiten suchen neue, nicht-infizierte Erythrozyten auf. Meist läuft dieser Schizogonie-Zyklus nach kurzer Initialphase in regelmäßigen Zeitintervallen ab (Tabelle 1).

Tabelle 1 Übersicht der 4 humanpathogenen Malariaerreger und deren Zyklen

Parasitenart	Erkrankung	Besonderheiten	Verbreitung
<i>Plasmodium falciparum</i>	Malaria tropica	Gefährlichste Form, meist kein periodisch auftretendes Fieber, keine Leberstadien, die später aktiviert werden können	Tropisches Afrika, Asien und Lateinamerika
<i>Plasmodium vivax</i>	Malaria tertiana	Fieber tritt in 48 stündigem Zyklus auf, bildet „schlafende“ Leberstadien (Hypnozoiten), die auch Jahre nach der Infektion wieder aktiv werden können	Weltweit in tropischen und einigen gemäßigten Zonen
<i>Plasmodium ovale</i>	Malaria tertiana	Fieber tritt in 48 stündigem Zyklus auf, bildet „schlafende“ Leberstadien (Hypnozoiten), die auch Jahre nach der Infektion wieder aktiv werden können	Vor allem im tropischen Westafrika
<i>Plasmodium malariae</i>	Malaria quartana	Fieber in 72 stündigen Intervallen, Erkrankung kann bis zu 40 Jahre lang als asymptomatische Infektion persistieren	Weltweit, aber stark regionale Verbreitung

Der gleichzeitige Zerfall der roten Blutkörperchen setzt sowohl Parasiten als auch Zellbestandteile frei, die für die Entstehung des Fiebers verantwortlich sind. Daher war die Malaria lange Zeit unter der Bezeichnung „Wechselfieber“ bekannt (Wagner, 2002).

Die Trophozoiten verstoffwechseln bei der Merogonie und Gamogonie Hämoglobin. Aus dem Proteinanteil gewinnt das Plasmodium mittels verschiedener Proteasen durch Hydrolyse freie Aminosäuren. Das Häm (Fe^{2+}) wird zu toxischem Ferrin-III-protoporphyrin-IX oxidiert. Dieses wird nicht enzymatisch zerstört, sondern durch „Biokristallisation“ sofort zum dimeren Hämozoïn („Malariapigment“) entgiftet (Wenk et al. 2003).

Unter dem Einfluß von Streßfaktoren differenzieren sich einige der erythrozytären Parasiten zu weiblichen Makrogamonten und männlichen Mikrogamonten. Die Gamonten werden bei einem erneuten Mückenstich mit der Blutmahlzeit aufgenommen. Im Mitteldarm der Mücke entwickelt sich der Makrogamont zum Makrogameten und der Mikrogamont bildet mehrere bewegliche Mikrogameten. Nach Verschmelzung der Makro- und Mikrogameten entwickelt sich aus der Zygote der längliche Ookinet. Ookineten verlassen das Darmlumen und dringen in das Mitteldarmepithel ein. Dort beginnt die Sporogonie mit einer Reduktionsteilung. Darauf entwickeln sich große Oozysten an der Darmaußenseite, die bis zu 10000 Sporozoiten enthalten. Bricht die Oozyste auf, so gelangen die Sporozoiten in die Hämolymphe der Mücke. Einige wandern zur Speicheldrüse und befallen diese mit Sporozoiten. Sind die Sporozoiten im Speichelausführgang angelangt, ist die Mücke für den Menschen infektiös geworden. Dies ist frühestens 8 Tage nach der Infektion der Fall (Wenk et al. 2003).

1.3 Behandlung der Malaria

Die Strukturen der 4-Aminochinolin- und Arylaminoalkohol- Anti-Malaria-Wirkstoffe leiten sich vom **Chinin** (Tabelle 2) ab, das aus der Chinarinde erhalten wird. Die Chininrinde wird von Bäumen der Gattung *Cinchona* gewonnen, die zu der Familie der Rubiaceae (= Rötengewächse) gehören. Chinin spielt trotz seiner geringen Effizienz und schlechten Verträglichkeit immer noch eine wichtige Rolle bei der Behandlung der multiresistenten *P. falciparum*-Stämme. Chinin wird wegen seiner guten Löslichkeit vor allem als intravenöse Zubereitung zur Behandlung komplizierter Malariafälle verwendet.

Das synthetische 4-Aminochinolin-Derivat **Chloroquin** (Tabelle 2) ist dank seiner hohen Wirksamkeit, relativ guten Verträglichkeit und kostengünstigen Produktion noch immer der wichtigste Antimalaria-Wirkstoff.

Amodiaquin (Tabelle 2), mit Chloroquin nahe verwandt, wurde wegen der Gefahr einer Agranulozytose seit Mitte der achtziger Jahre nur eingeschränkt verwendet. Da Amodiaquin gute Aktivität gegen Chloroquin-resistente Parasiten zeigt, kommt es wieder zum Einsatz.

Mefloquin und **Halofantrin** (Tabelle 2) zählen zu den Arylaminoalkohol-Derivaten. Mefloquin ist das Standardmedikament bei Chloroquin-resistenter Malaria. Es verursacht allerdings neuropsychiatrische Nebenwirkungen. Dem Halofantrin wird eine hohe Wirksamkeit zugesprochen, jedoch muss die Gefahr von Herzrhythmusstörungen einkalkuliert werden.

Für die 4-Aminochinoline wird als Wirkmechanismus die Störung der Häm polymerisation postuliert (Kapitel 1.4.5.1).

Eine häufig verwendete Malaria-Medikation ist die Antifolat-Kombination aus **Sulfadoxin** und **Pyrimethamin** (Tabelle 2) (Handelsname: Fansidar®). Pyrimethamin inhibiert die Dihydrofolat-Reduktase und das Sulfonamid hemmt die Dihydropteroat-Synthase. Ein vermehrter Einsatz führte rasch zur Resistenzentwicklung. Eine häufige Nebenwirkung des Sulfonamidanteils ist das Auftreten von toxischen epidermalen Nekrosen (Steven-Johnson-Syndrom). Das hatte zur Folge, dass einige Industrienationen die Zulassung zurücknahmen. Ein weiterer Anti-Malaria-Wirkstoff ist das **Proguanil** (Tabelle 2), das über eine Cytochrom-P-450-abhängige Reaktion in **Cycloguanil** (Tabelle 2) umgewandelt wird. Dieser Metabolit inhibiert wie das Pyrimethamin die Dihydrofolat-Reduktase und zeichnet sich durch eine gute Verträglichkeit aus. Es wird allerdings nur in Kombination mit Chloroquin verabreicht, da es allein nicht die nötige Effizienz besitzt (Wiesner et al. 2003).

Neben **Artemisinin** (Tabelle 2) und **Dihydroartemisinin** werden verstärkt auch deren halbsynthetischen Derivate mit Erfolg eingesetzt. Als möglicher Wirkmechanismus wurde vermutet, dass das im Häm gebundene Eisen-II die Spaltung der Peroxid-Partialstruktur katalysiert, was zur Bildung von Kohlenstoffradikalen führt. Diese Kohlenstoffradikale sollten dann relativ wahllos mit Häm und diversen Proteinen innerhalb des Parasiten reagieren, was zum Absterben des Parasiten führt. Diese Wirkungsweise wurde unter dem Begriff „*iron-triggered cluster bomb*“ geprägt (O’Neill et al. 2004). Diese Theorie ist durch eine Vielzahl an experimentellen Befunden nicht mehr haltbar. Demgemäß ist ein Häm-Dihydroartemisinin-Addukt, das

sich *in vitro* erzeugen lässt, nicht plasmodizid. Des Weiteren findet der Hämoglobinabbau in der Nahrungsvakuole statt und gerade dort lassen sich keine Artemisinin-Derivate nachweisen (Ridley, 2003).

Als derzeit gültiger Wirkmechanismus wird angenommen, dass es sich bei der Zielstruktur um eine membranständige Calcium-abhängige ATPase aus *P. falciparum* (*PfATP6*) handelt. *PfATP6* ist ein Analogon einer beim Säuger an der Membran des sarkoplasmatischen/endoplasmatischen Retikulums lokalisierten Calcium-Pumpe (SERCA), die Calcium-Ionen aus dem Cytosol in die endoplasmatischen Speicher pumpt. Die aktuelle Vorstellung des Wirkmechanismus der Artemisinine sieht so aus, dass eine Radikalbildung durch Spaltung der Peroxidstruktur erfolgt, die aber durch cytosolisches Eisen-II (nicht Häm-Eisen-II) katalysiert wird. Das entstehende Radikal hemmt spezifisch die *PfATP6*. Inwieweit die Hemmung der Calcium-Pumpe zum Absterben des Parasiten führt, ist noch nicht aufgeklärt worden (Eckstein-Ludwig et al. 2003).

Atovaquon (Tabelle 2), ein Hydroxynaphthochinon, ist eine malariawirksame Substanz, die den mitochondrialen Elektronentransport über den Cytochrom-c-Reduktase-Komplex inhibiert. Gegen das Monotherapeutikum bilden sich rasch Resistenzen aus. Dem wird durch die Kombination mit Proguanil entgegengewirkt. Das Handelspräparat Malarone® wird zur Prophylaxe und Behandlung der unkomplizierten Malaria eingesetzt.

Eine weitere fixe Kombination ist unter dem Handelsnamen Riamet® auf dem Markt. Dahinter verbirgt sich das **Lumefantrin** (Tabelle 2) und **Artemether**. Lumefantrin ist wie das Halofantrin ein Arylaminoalkohol, das schon vor 20 Jahren durch das chinesische Militär entwickelt wurde. Im Gegensatz zum Halofantrin treten keine kardiotoxischen Nebenwirkungen auf. Die Kombination beider reduziert erheblich die Gefahr von Resistenzen.

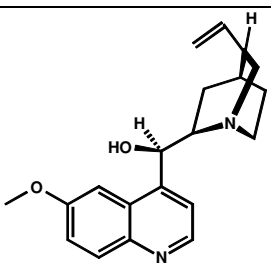
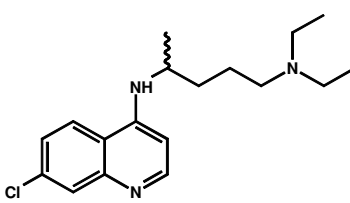
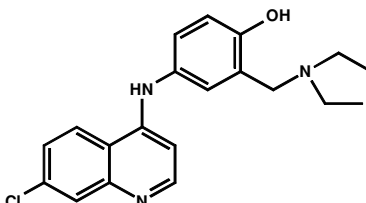
Tafenoquin (Tabelle 2) ist eine Weiterentwicklung des 4-Aminochinolins **Primaquin** (Tabelle 2). Primaquin wurde Ende der vierziger Jahre erfolgreich zur Eliminierung der Leberstadien bei Infektionen mit *P. vivax* eingesetzt. Dank dieser Eigenschaft eignet es sich als prophylaktisches Medikament. Tafenoquin zeichnet sich im Gegensatz zum Primaquin durch eine geringere Toxizität und eine längere Plasma-Halbwertszeit aus (Wiesner et al. 2003).

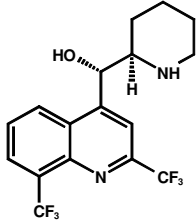
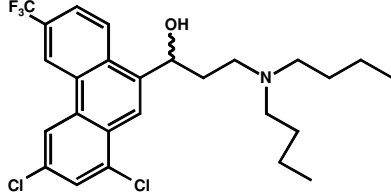
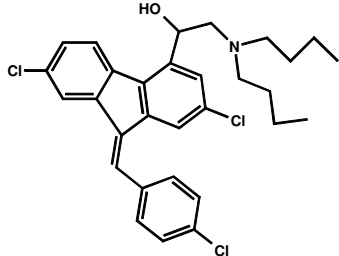
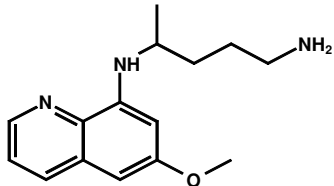
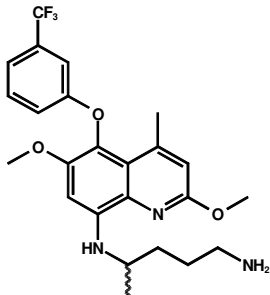
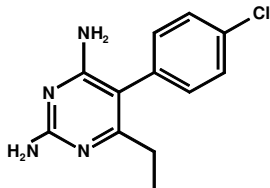
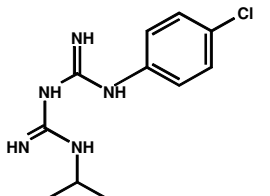
Methylenblau (Tabelle 2) gehört sowohl zu den historischen Anti-Malaria-Wirkstoffen, da es 1891 von Paul Ehrlich und Paul Guttman als erstes synthetisches und therapeutisch genutztes Medikament erfolgreich bei zwei Malariapatienten eingesetzt wurde, als auch zu den aktuellen, da weitere Untersuchungen einen neuen und interessanten Wirkmechanismus aufdeckten.

Plasmodien sind in allen Entwicklungsphasen oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ausgesetzt. Als Schutz dient dem Plasmodium ein Netzwerk antioxidativer Thiol- und Dithiol-Proteine (Krauth-Siegel et al. 2005; Becker et al. 2005). Glutathion-S-Transferasen sind cytosolische Glutathion-abhängige Enzyme, die an Entgiftungsreaktionen beteiligt sind und an der Fixierung des für den Parasiten toxischen Häms. *P. falciparum* verfügt nur über eine Glutathion-S-Transferase, Isoenzyme sind bisher nicht bekannt (Hiller et al. 2006).

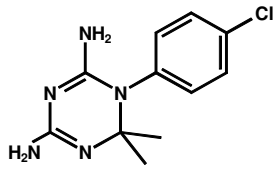
Methylenblau ist ein so genannter H_2O_2 -produzierender Redoxpendler. Das Enzym Glutathion-S-Transferase und andere Disulfidreduktasen des Malariaparasiten katalysieren die Reduktion von Methylenblau zu Leukomethylenblau. Das Leukomethylenblau wird anschließend durch O_2 oxidiert. Das gebildete H_2O_2 ist für den Parasiten toxisch (Becker et al. 2007).

Tabelle 2 Übersicht der historisch bedeutenden und aktuellen Anti-Malariawirkstoffe

Name	Strukturformel	Wirkmechanismus	Nebenwirkungen
Chinin		Inhibition der Häm-polymerisation	Fieber, Verwirrung, Atemnot, Arrhythmien, lethal bei zu schneller intravenöser Applikation
Chloroquin (Resorchin®)		Inhibition der Häm-polymerisation	Hornhaut-trübungen, neurotoxische Reaktionen, Agranulozytose
Amodiaquin		Inhibition der Häm-polymerisation	toxische Hepatitis, Agranulozytose

Mefloquin (Lariam®)		Inhibition der Häm- polymerisation	schwerwiegende psychische und neurologische Störungen möglich, Übelkeit, Hautausschlag arrythmogener Effekt
Halofantrin (Halfan®)		Inhibition der Häm- polymerisation	Verlängerung des QT-Intervalls im EKG
Lumefantrin		Inhibition der Häm- polymerisation	Verlängerung des QT-Intervalls im EKG
Primaquin		Inhibition der Häm- polymerisation, Eliminierung der Leberstadien bei <i>P.</i> <i>vivax</i> -Infektionen;	hämolytische Anämie bei G6PD-Mangel
Tafenoquin		Inhibition der Häm- polymerisation	hämolytische Anämie bei G6PD-Mangel
Pyrimethamin		Inhibition der Dihydrofolat- Reduktase	toxische Epidermolyse (Steven-Johnson- Syndrom)
Proguanil (Paludrine®)		Umwandlung durch Cytochrom P 450 in Cycloguanil	Hautreaktionen und Haarausfall, Blutbild- veränderungen (Leukopenie)

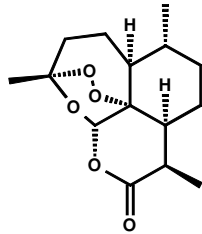
Cycloguanil



Inhibition der Dihydrofolat-Reduktase

Blutbildveränderungen (Leukopenie)

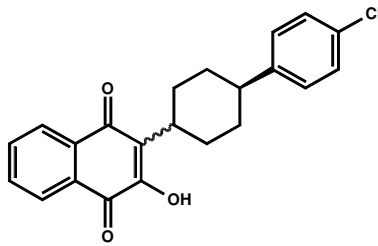
Artemisinin



Hemmung einer membranständigen Calcium-abhängigen ATPase (PfATP6)

gastrointestinale Störungen

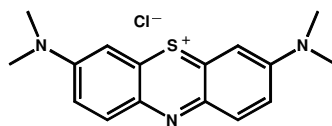
Atovaquon



Inhibition des mitochondrialen Elektronentransportes

Übelkeit, Erbrechen, Leberenzym-erhöhungen, Neutropenie

Methylenblau



Inhibition der *P. falciparum* Glutathion-reduktase

Übelkeit, zentralnervöse Symptome, hämolytische Anämie

1.4 Aktuelle Targets für Malaria-Therapeutika

1.4.1 Apicomplexa

Protozoen sind einzellige eukaryotische Mikroorganismen, die keine Zellwand besitzen. Sie sind im Allgemeinen farblos und beweglich. Ihre Bewegungsmechanismen sind entscheidende Merkmale für ihre Einteilung in taxonomische Untergruppen. Protozoen, die eine amöboide Fortbewegungsweise zeigen, werden als *Sarcodina* bezeichnet; diejenigen, die sich durch Geißelbewegung fortbewegen, heißen *Mastigophora*; diejenigen, die Cilien tragen, heißen *Ciliophora*. Eine vierte Gruppe, die *Apicomplexa*, sind im Allgemeinen nicht beweglich und leben ausnahmslos parasitisch in höheren Tieren. Parasitäre *Apicomplexa* verursachen schwere Erkrankungen wie die Malaria, die Toxoplasmose und die Coccidiose. Die *Apicomplexa* sind durch das Fehlen eines motilen Adultstadiums gekennzeichnet. Sie nehmen ihre Nahrung in gelöster Form durch Absorption durch die Zellmembran auf. Die Zellen der parasitären *Apicomplexa* enthalten einen Plastiden, den Apicoplasten. Es handelt sich hierbei um eine spezielle Organelle, die ein eigenes Plastidgenom enthält und Gene exprimiert (Madigan et al. 2006). Phylogenetische Studien haben ergeben, dass der Apicoplast durch Endosymbiose mit einer Rotalge durch einen gemeinsamen Vorfahren der *Apicomplexa* und der Dinoflagellaten entstanden sein könnte (Marechal et al. 2001). Die Apicoplasten führen die Fettsäure- und Isoprenoid-Biosynthese (Abbildung 3) der Zelle aus und exportieren ihre Syntheseprodukte in das Cytoplasma (Madigan et al. 2006).

1.4.2 Organell-lokalisierte Stoffwechselfunktionen als potentielle Targets

Um neue Wirkstoffe für die Malariatherapie zu finden, müssen Stoffwechselwege oder Enzyme identifiziert werden, die für das Überleben des Parasiten von essentieller Bedeutung sind, um diese dann spezifisch zu inhibieren. Vom besonderen Interesse sind Stoffwechselwege, die in menschlichen und parasitären Zellen existieren, deren Gene oder Enzyme sich aber strukturell unterscheiden. Zu den Stoffwechselwegen, die nur im Parasiten vorkommen, gehören der Fettsäure-Biosynthese II-Weg und der alternative Isoprenoid-Biosynthese-Weg (DOXP-Weg) (Abbildung 3). Weitere für das Überleben des Parasiten notwendige Stoffwechselwege sind die Hämoglobinhydrolyse (bzw. -abbau) und die Hämpolymerisation (Kapitel 1.4.5), die in der Nahrungsvakuole bzw. im

Cytosol lokalisiert sind. Von besonderem Interesse sind die für die Hydrolyse des Hämoglobins notwendigen Cystein-Proteasen, da selektive Inhibitoren nur den Parasiten, nicht aber Enzyme des Menschen schädigen würden.

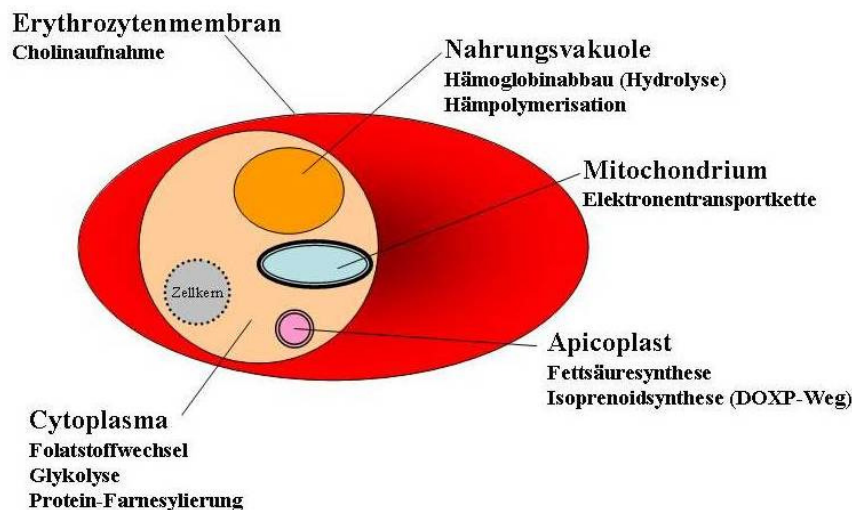


Abbildung 2 Schematische Darstellung eines *P. falciparum* infizierten Erythrozyten mit der intrazellulären Lokalisation verschiedener Wirkstoff-Targets (Wiesner et al. 2003)

1.4.3 Isoprenoid-Biosynthese

Vom Isopren (2-methyl-buta-1,3-dien) lassen sich viele Naturstoffe ableiten, die als isoprenoide Naturstoffe zusammengefasst werden. Zu dieser Gruppe gehören beispielsweise die Steroide, Terpene, Carotinoide und die Gibberelinsäure der Pflanzen. Der Aufbau der Isoprenoide erfolgt aus C₅-Bausteinen, den Isopren-Einheiten. Deren Vorstufen Isopentenylidiphosphat (IPP) und sein Isomer Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) können auf zwei unterschiedlichen Wegen biosynthetisiert werden (Abbildung 3):

- Der klassische Acetat-Mevalonat-Weg
- Der Mevalonat-unabhängige plastideigene IPP-Biosynthese-Weg (DOXP-Weg)

Der Acetat-Mevalonat-Weg ist bereits seit 1957 bekannt. Die Erforschung erfolgte anfänglich an Hefen und er konnte in Menschen, Tieren, Pilzen und Archaeobakterien nachgewiesen werden. Lange Zeit galt dieser Synthese-Weg als einziger zur Biosynthese von Isoprenoiden.

1993 wurden Hinweise gefunden, dass eine alternative Möglichkeit zur IPP-Synthese in einigen Bakterien existieren muss, der so genannte DOXP-Weg (Rohmer et al. 1993).

Pflanzen bedienen sich beider Wege, z.B. werden im Cytosol Sterole, Sesquiterpene und Ubichinone auf dem Acetat-Mevalonat-Weg synthetisiert, während in den Chloroplasten über den DOXP-Weg Isopren, Monoterpene, Diterpene sowie Carotinoide gebildet werden.

Für Menschen könnte der Umstand, dass der DOXP-Weg charakteristisch für Pflanzen und/oder Prokaryonten ist, nützlich sein. So wäre es möglich, Medikamente gegen Malaria zu entwickeln, die eine hohe Selektivität gegen den Malariaerreger aufweisen.

Ein Beispiel hierfür ist das natürliche Antibiotikum Fosmidomycin, das in den siebziger Jahren aus *Streptomyces lavendulae* isoliert wurde (Okuhara et al. 1980). Es inhibiert beispielsweise die 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat (DOXP)-Reduktoisomerase, ein Enzym im DOXP-Synthese-Weg. Die Entwicklung als antibakterieller Wirkstoff wurde nach Abschluss der klinischen Phase II-Studie in den achtziger Jahren von der japanischen Firma Fujisawa Pharmaceuticals nicht weiter verfolgt. Das molekulare Target und die Antimalaria-Aktivität von Fosmidomycin sind erst seit 1998 bekannt (Wiesner et al. 2003).

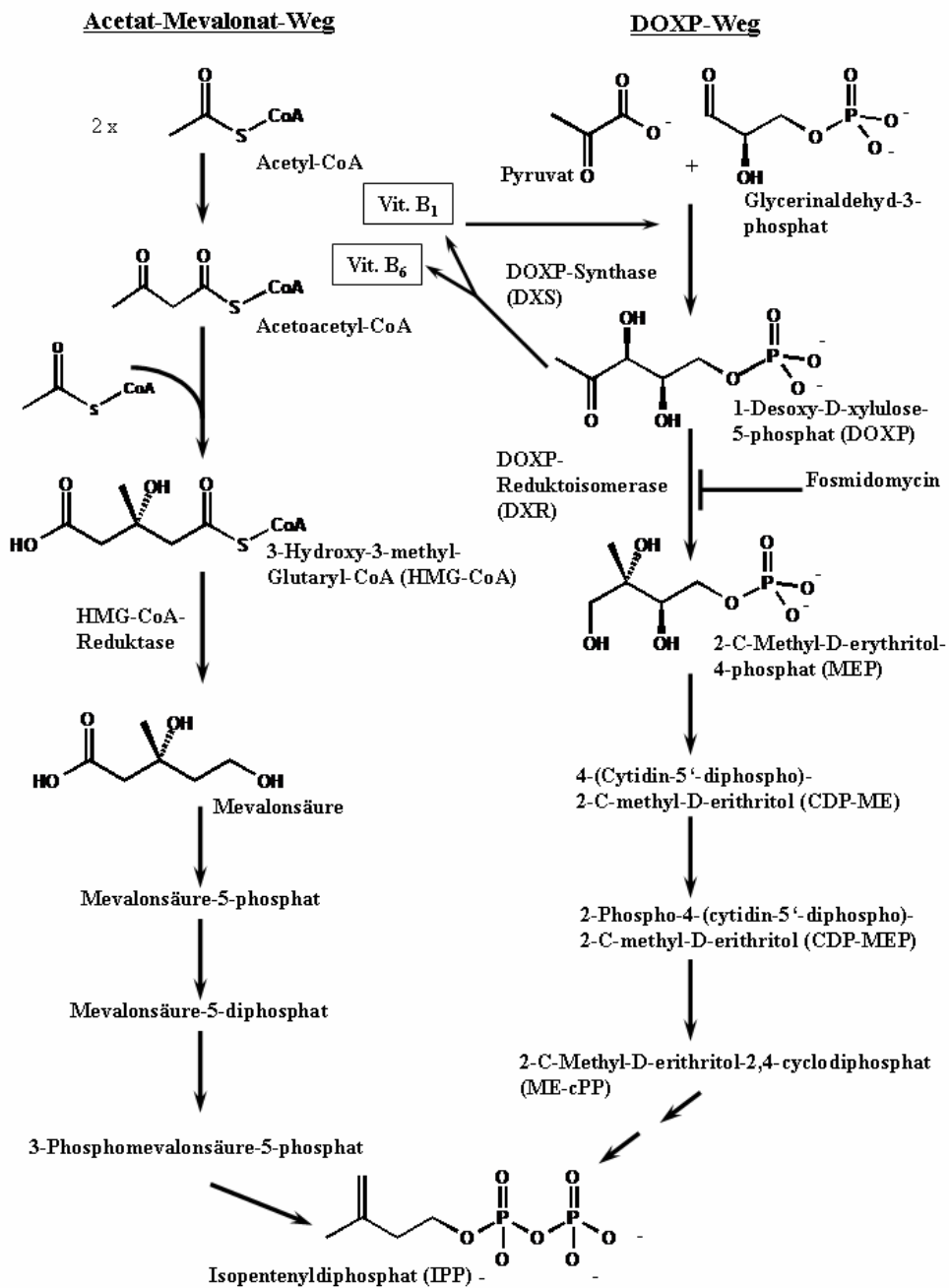


Abbildung 3 Bekannte Biosynthese-Wege für Isoprenoide (Lange et al. 2001; Wiesner et al. 2005)

1.4.4 Fettsäure-Biosynthese

Bei Tieren, Pilzen und einigen Mycobakterien sind die verschiedenen enzymatischen Funktionen der Fettsäuresynthese in einem einzigen großen Polypeptid (Multi-Enzym-Komplex), der Typ-I-Fettsäuresynthase (FAS-I), integriert. Bei Pflanzen und den meisten Bakterien wird die Fettsäuresynthese durch eine Reihe von einzelnen Enzymen,

dem System der Typ-II-Fettsäuresynthase (FAS-II) vorgenommen. Ein Typ-II-Fettsäuresynthase-System konnte auch für Malariaparasiten nachgewiesen werden (Surolia et al. 2001). Diese Enzyme sind, ähnlich derjenigen der Isoprenoidsynthese, im Apicoplasten lokalisiert (Abbildung 2). Es gelang einem indischen Forscherteam die Fettsäure-Biosynthese des Parasiten durch Hemmung der trans-2-Enoyl-ACP-Reduktase (FabI) mittels Triclosan selektiv auszuschalten (Surolia et al. 2001). Da Triclosan keinen inhibierenden Effekt auf den Typ FAS-I ausübt, konnte die Fettsäure-Biosynthese des Parasiten als Typ FAS-II klassifiziert werden.

Triclosan wirkt gegen ein breites Spektrum von Bakterien. Es dient als Konservierungsmittel in Haushaltsprodukten, wie z. B. Seifen, Zahnpasten sowie in dermatologischen und topischen Zubereitungen (Surolia et al. 2002).

1.4.5 Nahrungsvakuole

In der Nahrungsvakuole und im Cytosol des Parasiten existieren zwei für das Überleben notwendige Stoffwechselfvorgänge. Es handelt sich dabei um den Prozess der Hämpolymerisation (= Entgiftung von Häm) und der Hydrolyse des Hämoglobins (= Hämoglobinabbau).

1.4.5.1 Hämpolymerisation

Wenn *Plasmodium falciparum* einen menschlichen Erythrozyten infiziert hat, ernährt es sich vom Abbau des Hämoglobins. Vor allem während des Trophozoiten- und frühen Schizontenstadiums nehmen die Parasiten das Hämoglobin der Wirtszelle durch Pinozytose in eine spezialisierten Organelle, dem Cystosom, auf und transportieren es zur sauren Nahrungsvakuole (pH 4,5-5,2), um es dort abzubauen (Yayon et al. 1984). Das Hämoglobin wird in der sauren Nahrungsvakuole zum Methämoglobin oxidiert und mittels Proteasen (Kapitel 1.4.5.2) in denaturiertes Globin und freies Häm gespalten. Das toxische Nebenprodukt Häm oder auch Ferrin-III-protophorphyrin-IX wird durch Polymerisierung zu dem unlöslichen Hämozoin (= Malaria Pigment) entgiftet. Nicht polymerisiertes Häm verlässt die Nahrungsvakuole und geht ins parasitische Cytosol über, um dort mittels Glutathion in Bruchstücke abgebaut zu werden (Abbildung 4).

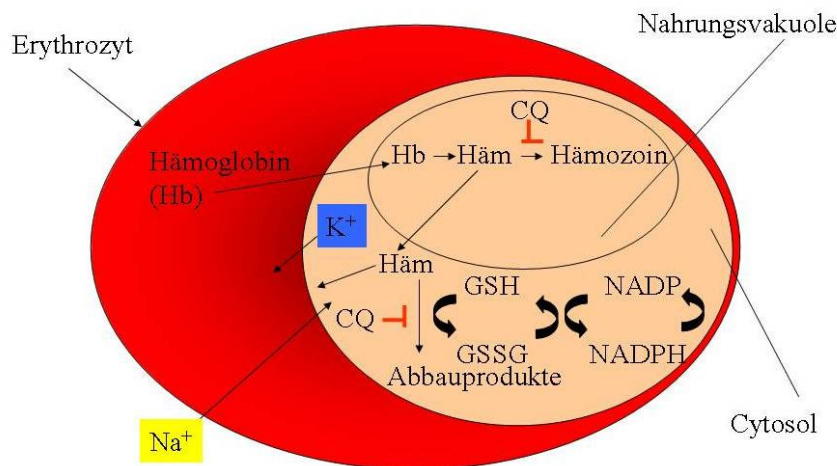


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Entgiftung von Häm (Ginsburg et al. 1998)

Die Chinolin-Alkaloide, wie beispielsweise das Chloroquin, können mit beiden Wegen interferieren. Chloroquin akkumuliert im großen Maße innerhalb der sauren Nahrungsvakuole, wo es das Häm komplexiert und die Polymerisierung verhindert. Restliches freies Häm verlässt die Nahrungsvakuole, wo sein Glutathion-abhängiger Abbau im Cytosol ebenso von Chloroquin inhibiert wird. Das Häm reichert sich in der Membran an, schädigt sie und macht sie durchlässig für Kationen. Diese Permeabilität verursacht den Tod des Parasiten (Steele et al. 2002).

1.4.5.2 Hämoglobinhydrolyse

In der sauren Nahrungsvakuole des Parasiten sind Proteasen lokalisiert, deren Funktion u. a. die Hydrolyse des Hämoglobins ist. An diesem kooperierenden Prozess sind Proteasen unterschiedlicher katalytischer Klassen beteiligt, wie z. B. Aspartat-, Cystein- und Metallo-Proteasen (Rosenthal, 2004). Das in der Nahrungsvakuole lokalisierte Methämoglobin wird in einem ersten Schritt von Aspartat-Proteasen (Plasmepsin I, II, IV und einer Histo-Aspartat-Protease) in denaturiertes Globin hydrolysiert. Denaturiertes Globin wird folgend mittels Cystein-Proteasen (Falcipaine) und einer zinkhaltigen Metalloprotease (Falcilysin) in kleine Peptide erneut hydrolysiert (Eggleston et al. 1999). Von besonderem Interesse sind die parasitischen Cystein-Proteasen, da diese grundverschieden von denen des Menschen sind und sich somit als neuartiges Target für die Malaria-Therapie eignen würden (Sajid et al. 2002).

Zu den Aspartat-Proteasen gehören die Plasmepsine (E.C.3.4.23.X), von denen Plasmepsin I (E.C.3.4.23.38) und Plasmepsin II (E.C.3.4.23.39) für die initiale Spaltung des Hämoglobins verantwortlich sind. Die Plasmepsine gehören zur Pepsin-Familie (Clan AA, Familie A1).

Es sind einige antiplasmodiale Aspartat-Protease-Inhibitoren entwickelt und *in vitro* erfolgreich getestet worden.

Die Hauptproblematik der zukünftigen Aspartat-Protease-Inhibitoren liegt in ihrer Selektivität. Cathepsin D, eine humane Aspartat-Protease, weist eine Sequenzhomologie von 73 % zum Plasmepsin I bzw. 35 % zum Plasmepsin II auf. Die zu entwickelnden Inhibitoren müssten in der Lage sein, zwischen „Wirts“- und „plasmodialen“ Enzymen zu unterscheiden (Go, 2003).

Die Cystein-Proteasen umfassen eine große und mannigfaltige Gruppe von Enzymen, die von Rawlings & Barrett in Clans und Familien klassifiziert wurden. Dabei gehören die Enzyme zu einer Familie, die eine evolutionäre Beziehung untereinander aufweisen. Im Unterschied dazu setzt sich ein Clan aus Gruppen von Familien zusammen, die eine Beziehung aufweisen, ungeachtet dessen, dass signifikante Sequenzähnlichkeiten fehlen könnten. Die größte Familie der Cystein-Proteasen, die aufgrund der Sequenzhomologie identifiziert werden konnte, ist die Papain-Superfamilie, die eine große Enzymbreite von Prokaryoten bis Eukaryoten beinhaltet.

Die am besten charakterisierte Klasse der parasitischen Cystein-Proteasen sind die Falcipaine (E.C.3.4.22.X), von denen bislang 4 identifiziert worden sind. Sie gehören der Papain-Superfamilie Clan CA, Familie C1 an. Cystein-Proteasen des Clans CA sind 2-Domäne-Proteine, die aus einer L- und R-Domäne bestehen und durch eine V-förmige Spalte getrennt sind. Die L-Domäne enthält innerhalb einer α -Helix das für die hydrolytische Spaltung benötigte Cystein, die R-Domäne das Histidin. Bei allen Cystein-Proteasen findet man eine Gemeinsamkeit im katalytischen Zentrum, das aus dem Cystein (Cys25) und dem Histidin (His159) besteht. Des Weiteren ist an diesem Mechanismus indirekt das Glutamin (Gln19) und das Asparagin (Asn175) beteiligt (Papain-Nummerierung). Cystein und Histidin stellen die katalytische Dyade dar, die durch die beiden beschriebenen Aminosäuren stabilisiert werden (Rawlings et al. 2004, URL (<http://www.merops.sanger.ac.uk>)).

Obwohl Falcipain-1 zu derselben Proteasen-Familie gehört, schien es noch im Jahr 2005 eine abweichende Rolle zu seinen Isoenzymen zu spielen. Studien zeigten, dass Falcipain-1 sich hinsichtlich seiner enzymatischen Charakteristik vom Falcipain-2 unterscheidet. Falcipain-1 und Falcipain-2 wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit überprüft, ein fluorogenes Substrat (Z-LR-AMC) zu spalten. Dabei erwies sich das Falcipain-2 als effektiver. Darüber hinaus schien Falcipain-1, im Gegensatz zum Falcipain-2, sein pH-Optimum im neutralen Bereich zu haben. Ein weiterer wesentlicher Unterschied war das Verhalten gegenüber dem Inhibitor E-64. Falcipain-1 wurde, im Gegensatz zu Falcipain-2, nicht inhibiert (Goh et al. 2005). Die Funktion dieses Enzyms ist noch nicht gänzlich geklärt. Anfangs wurde angenommen, es sei am Hämoglobinabbau beteiligt (Salas et al. 1995). Danach wurde eine Rolle bei der erythrozytären Invasion vermutet (Greenbaum et al. 2002). Zwei Jahre später ergaben weitere Untersuchungen am Falcipain-1, dass es keinen Einfluss auf die erythrozytären Stadien hat (Sijwali et al. 2004), dafür jedoch eine Rolle in der Oozysten-Produktion spielen dürfte (Eksi et al. 2004). Diese unterschiedlichen Ergebnisse im funktionellen und biochemischen Verhalten lassen sich möglicherweise durch die abweichende Herstellung der rekombinaten Protease in den einzelnen Arbeitsgruppen erklären.

Die von Kumar et al. 2007 rekombinat hergestellten Falcipain-1-Fragmente konnten die Resultate von Goh (2005) nicht bestätigen. Die Immunisierung von Mäusen und Hasen mit dem Falcipain-1-Fragment (F1.4) hatte eine hohe humorale Immunantwort zur Folge. Die gewonnenen Antikörper zeigten im Experiment eine 30 % ige Inhibition der Merozoiteninvasion (Kumar et al. 2007).

Die bislang bekannten Falcipaine werden seit neuestem in der Bezifferung geringfügig anders gekennzeichnet und lauten wie folgt: Falcipain-1 (FP-1), Falcipain-2 und -2' (FP-2A) bzw. (FP-2B) und Falcipain-3 (FP-3) (Kumar et al. 2007).

Falcipain-2A, Falcipain-2B (99 % Homologie in der katalytischen Domäne zum Falcipain-2A) und das Falcipain-3 haben ihre pH-Optima im sauren Milieu, das im Einklang steht mit ihrer Aktivität in der sauren Nahrungsvakuole. Falcipain-2A und -3 sind an der Hydrolyse des Hämoglobins in der Nahrungsvakuole im Trophozoiten-Stadium beteiligt (Shenai et al. 2000; Sijwali et al. 2001). Sie werden auch als Hämoglobinasen bezeichnet.

Um das Falcipain-2B charakterisieren zu können, wurden Untersuchungen am rekombinanten Falcipain-2B vorgenommen. Im Vergleich zum Falcipain-2A ergaben sich biochemische Übereinstimmungen, wie z.B. gleiche pH-Optima und die Bevorzugung bestimmter Substrate. Weitere Studien konnten belegen, dass beide Enzyme dazu befähigt waren, Hämoglobin zu hydrolysieren. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Falcipain-2B ebenfalls um eine Hämoglobinase handeln könnte.

Dem Falcipain-2A wird eine Doppelrolle zugesprochen, da es in den Prozess der Hämoglobinhydrolyse eingreift, aber auch an der Schizonten-Ruptur beteiligt sein soll, die das Freilassen der Merozoiten ermöglicht (Goh et al. 2005).

Die Falcipaine sind typische Papain-Familie Cystein-Proteasen, jedoch verfügen sie auch über ungewöhnliche Merkmale dieser Familie. So sind die Prodomänen außergewöhnlich lang und innerhalb dieser Prodomänen befinden sich so genannte „membran spanning sequences“, die beispielsweise in der Cystein-Protease Papain fehlen.

Falcipain-2A und Falcipain-3 sind sich bezüglich ihrer Sequenz sehr ähnlich (68 % Identität) und die Länge ihrer Prodomänen ist fast identisch (Rosenthal, 2004). Die Prodomänen sind z. B. für die richtige Faltung des aktiven Zentrums, aber auch für die Inhibition der katalytischen Domäne wichtig. Letzteres verhindert, dass das Enzym schon vor Erreichen der Zielposition aktiviert wird (Rawlings et al. 2004).

Falcipain-1 stellt eine Ausnahme dar. Es verfügt über eine längere Prodomäne und im Gegensatz zu Falcipain-2A und Falcipain-3 enthält Falcipain-1 nicht diese außergewöhnliche aminoterminaler Verlängerung der katalytischen Domäne. Anhand dieser Erkenntnisse lässt sich schlussfolgern, dass es sich um zwei Gruppen von Falcipainen handeln könnte, der Falcipain-1- und der Falcipain-2/3 Unterfamilie (Rosenthal, 2004).