

**Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen
an traditionell gegen Malaria verwendeten Heilpflanzen
als Basis für die Entdeckung neuer Leitstrukturen
gegen *Plasmodium falciparum***

DISSERTATION

**zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

eingereicht im

FACHBEREICH

**BIOLOGIE, CHEMIE, PHARMAZIE
DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN**

vorgelegt von

Apothekerin

Sonja Frölich

aus Dannenberg/Elbe

in Niedersachsen

November, 2007

1. Gutachter: PD Dr. K. Jenett-Siems

2. Gutachter: Prof. Dr. M. F. Melzig

Disputation am: 22.02.2008

Meinen Eltern

danke ich
für ihre umfassende Unterstützung
auf meinem bisherigen Lebensweg
und
ihr Interesse an meiner Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Malaria- Verbreitung und Erreger	1
1.2	Lebenszyklus und Biologie von <i>Plasmodium falciparum</i>	3
1.3	Behandlung der Malaria	5
1.4	Aktuelle Targets für Malaria-Therapeutika	11
1.4.1	Apicomplexa	11
1.4.2	Organell-lokalisierte Stoffwechselfunktionen als potentielle Targets	11
1.4.3	Isoprenoid-Biosynthese	12
1.4.4	Fettsäure-Biosynthese	14
1.4.5	Nahrungsvakuole	15
1.4.5.1	Hämpolymerisation	15
1.4.5.2	Hämoglobinhydrolyse	16
2	<i>Ziel der Arbeit</i>	20
3	<i>Experimenteller Teil</i>	21
3.1	Material	21
3.1.1	Pflanzenmaterial	21
3.1.2	Herkunft	21
3.1.2.1	<i>Exostema mexicanum</i> A. Gray, Rubiaceae	21
3.1.2.2	<i>Stachytarpheta guatemalensis</i> Moldenke, Verbenaceae	22
3.1.2.3	<i>Momordica foetida</i> Schum., Cucurbitaceae	22
3.1.2.4	<i>Aspilia africana</i> (Pers.) C. D. Adams, Asteraceae	22
3.1.2.5	<i>Vernonia amygdalina</i> Delile, Asteraceae	23
3.1.2.6	Hopfeninhaltsstoffe	23
3.1.3	Phytochemisches Labor	24
3.1.3.1	Geräte	24
3.1.3.2	Chemikalien	24
3.1.3.3	Detektionsmittel	26
3.1.3.4	Plattenfluorometrie/ -photometrie	26
3.1.3.5	Massenspektrometrie	26
3.1.3.6	NMR-Spektroskopie	27
3.1.3.7	Chromatographische Trennung	27
3.1.3.7.1	Dünnschichtchromatographie	27
3.1.3.7.2	Säulenchromatographie	27
3.1.3.7.3	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	27

3.1.4	Zellkultur-Labor	28
3.1.4.1	Geräte	28
3.1.4.2	Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	28
3.1.4.3	Zelllinien	29
3.1.4.3.1	ECV-304 (DSMZ: ACC 310)	29
3.1.4.3.2	HepG2 (DSMZ: ACC 180)	30
3.2	Methoden	30
3.2.1	Zellkultur	30
3.2.1.1	Kultivierung der Zellen	30
3.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zelllinien	31
3.2.1.3	Zellfixierung und Färbung für die Mikroskopie	32
3.2.1.4	Herstellung der Extrakte für den Zytotoxizitätstest	33
3.2.1.5	<i>In vitro</i> Bestimmung der Zytotoxizität von Extrakten und Reinsubstanzen	34
3.2.1.6	Bestimmung des Selektivitätsindex	35
3.2.2	Hemmung des glutathionabhängigen Heminabbaus	35
3.2.2.1	Herstellung der Stamm- und Arbeitslösungen	35
3.2.2.2	Durchführung des Hemin-Multiwell-Assays	35
3.2.3	Inhibitorische Aktivität gegenüber Papain im Mikrotiterplattenmaßstab	36
3.2.3.1	Herstellung des Reaktionspuffers	36
3.2.3.2	Enzym-, Substrat-, Inhibitor- und Arbeitslösungen	36
3.2.3.3	Durchführung des Papain-Assays	37
3.2.4	Phytochemische Untersuchungen traditioneller Heilpflanzen	41
3.2.4.1	Extraktion und Untersuchung von <i>Exostema mexicanum</i>	41
3.2.4.1.1	Charakterisierung der 4-Phenylcumaringlykoside (1-4) aus <i>E. mexicanum</i>	46
3.2.4.1.2	Charakterisierung des 4-Phenylcumarins (5) aus <i>E. mexicanum</i>	50
3.2.4.1.3	Charakterisierung der Flavonoidglykoside (6-7) aus <i>E. mexicanum</i>	51
3.2.4.1.4	Charakterisierung von Scopoletin (8) aus <i>E. mexicanum</i>	53
3.2.4.1.5	Charakterisierung von Loliolid (9) aus <i>E. mexicanum</i>	53
3.2.4.1.6	Charakterisierung von 2-Hydroxybenzoesäure (10) aus <i>E. mexicanum</i>	54
3.2.4.2	Extraktion und Untersuchung von <i>Stachytarpheta guatemalensis</i>	54
3.2.4.2.1	Charakterisierung der Phenylethanoidglykoside (11-15) aus <i>S. guatemalensis</i>	58
3.2.4.3	Extraktion und Untersuchung von <i>Momordica foetida</i>	63
3.2.4.3.1	Charakterisierung der Flavonoidglykoside (16-18) aus <i>M. foetida</i>	68
3.2.4.3.2	Charakterisierung des 5,7-Dihydroxychromonglykosid (19) aus <i>M. foetida</i>	71
3.2.4.3.3	Charakterisierung des 5,7-Dihydroxychromon (20) aus <i>M. foetida</i>	72
4	Ergebnisse	73
4.1	Bestimmung der Zytotoxizität am Pflanzenmaterial aus Uganda	73

4.1.1	<i>Aspilia africana</i> (Pers.) C. D. Adams, Asteraceae _____	74
4.1.2	<i>Momordica foetida</i> Schum., Cucurbitaceae _____	75
4.1.3	<i>Vernonia amygdalina</i> Delile, Asteraceae _____	75
4.2	Bestimmung der Selektivitätsindices am Pflanzenmaterial aus Uganda _____	76
4.3	Bestimmung der Zytotoxizität an isolierten Substanzen des Blattmaterials aus <i>Exostema mexicanum</i> _____	78
4.4	Phytochemische Untersuchung von <i>Exostema mexicanum</i> A. Gray _____	79
4.4.1	Strukturaufklärung von 5- <i>O</i> - β -D-Glucopyranosyl-7,3',4'-trihydroxy-4-phenylcumarin (1) _____	81
4.4.2	Strukturaufklärung von 5- <i>O</i> - β -D-Glucopyranosyl-4'-hydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (2) _____	82
4.4.3	Strukturaufklärung von 5- <i>O</i> - β -D-Galactopyranosyl-4'-hydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (3) _____	83
4.4.4	Strukturaufklärung von 5- <i>O</i> - β -D-Galactopyranosyl-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (4) _____	84
4.4.5	Strukturaufklärung von 3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin (5) _____	86
4.4.6	Strukturaufklärung von Kämpferol-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[2,4 diacetyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]-(4-cumaroyl- β -D-galactopyranosyl)-7- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosid (6) _____	87
4.4.7	Strukturaufklärung von Kämpferol-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]-(4-cumaroyl- β -D-galactopyranosyl)-7- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosid (7) _____	90
4.4.8	Strukturaufklärung von Scopoletin (8) _____	91
4.4.9	Strukturaufklärung von Loliolid (9) _____	92
4.4.10	Strukturaufklärung von 2-Hydroxybenzoesäure (Salicylsäure) (10) _____	93
4.5	Phytochemische Untersuchung von <i>Stachytarpheta guatemalensis</i> Moldenke _____	94
4.5.1	Strukturaufklärung von Acteosid (11) _____	96
4.5.2	Strukturaufklärung von Iso-Acteosid (12) _____	97
4.5.3	Strukturaufklärung von Leucosceptosid (13) _____	98
4.5.4	Strukturaufklärung von Martynosid (14) _____	99
4.5.5	Strukturaufklärung von Jionosid D (15) _____	100
4.6	Phytochemische Untersuchung von <i>Momordica foetida</i> Schum. _____	101
4.6.1	Strukturaufklärung von 5,7,4'-Trihydroxyflavanon-7- <i>O</i> - β -D-glucopyranosid (16) _____	104
4.6.2	Strukturaufklärung von 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanon-7- <i>O</i> - β -D-glucopyranosid (17) _____	106
4.6.3	Strukturaufklärung von Kämpferol-7- <i>O</i> - β -D-glucopyranosid (18) _____	108
4.6.4	Strukturaufklärung von 5,7-Dihydroxychromon-7- <i>O</i> - β -D-glucopyranosid (19) _____	110

4.6.5	Strukturaufklärung von 5,7-Dihydroxychromon (20)	111
4.7	Hemmung des glutathionabhängigen Heminabbaus	112
4.7.1	Durchführung an isolierten Hopfeninhaltsstoffen	112
4.7.2	Durchführung an Rohextrakten und isolierten Substanzen aus <i>Momordica foetida</i>	117
4.8	Die inhibitorische Aktivität gegenüber Papain	118
5	<i>Diskussion</i>	121
5.1	Traditionell gegen Malaria verwendete Arzneipflanzen	121
5.1.1	Ethnobotanisches Pflanzenmaterial	121
5.1.2	Rubiaceae	121
5.1.3	Verbenaceae	125
5.1.4	Asteraceae	127
5.1.5	Cucurbitaceae	130
5.1.6	Glutathionabhängiger Heminabbau	131
5.1.7	Einfluss von <i>M. foetida</i> auf den GSH-abhängigen Heminabbau	132
5.1.8	Einfluss der Hopfeninhaltsstoffe auf den GSH-abhängigen Heminabbau	132
5.1.9	Inhibitorische Aktivität gegenüber Papain	134
5.1.10	Ausblick	139
6	<i>Zusammenfassung</i>	141
7	<i>Summary</i>	145
8	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	148
9	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	151
10	<i>Tabellenverzeichnis</i>	154
11	<i>Literaturverzeichnis</i>	155
12	<i>Anhang</i>	169
	Publikationsverzeichnis	169
	Lebenslauf	171
	Danksagung	172
	Eidesstattliche Erklärung	174