

5 Diskussion

5.1 Traditionell gegen Malaria verwendete Arzneipflanzen

5.1.1 Ethnobotanisches Pflanzenmaterial

In ländlichen und tropischen Regionen Afrikas, aber auch im lateinamerikanischen Raum, in denen die Malaria endemisch vorkommt, vertrauen die Einheimischen auf den umfangreichen Erfahrungsschatz der traditionellen Heiler und die Heilkraft der heimischen Kräuter, da die Arzneipflanzen dort verfügbar sind und vor allem bezahlbar. Gegen *P. falciparum*, dem Verursacher der Malaria tropica, die unbehandelt tödlich verlaufen kann, erhöhen sich stetig die Resistenzen gegenüber den Standard-Anti-Malaria-Wirkstoffen. Diese Erkenntnis macht es notwendig, weitere Anstrengungen bei der Suche nach neuen Medikamenten, insbesondere mit neuen Angriffspunkten in der Malaria-Therapie, zu unternehmen. Pflanzen sind fortwährend eine reiche Quelle für neue Medikamente; einige bekannte Anti-Malaria-Substanzen werden auch noch heute entweder aus dem Pflanzenmaterial gewonnen (Chinin und Artemisinin) und therapeutisch eingesetzt oder ihre chemischen Strukturen werden als Schablone für weitere Arzneistoff-Entwicklungen genutzt (Gessler et al. 1994). Studien bezüglich der Wirksamkeit von Pflanzen in der traditionellen Medizin sollten daher nicht nur wegen der Entdeckung neuer Leitstrukturen unternommen werden, sondern auch zum Wohl der dort ansässigen Menschen, die auf diese Medikation mit Pflanzenextrakten angewiesen sind. Bekanntlich können die eingesetzten Heilpflanzen auch schwerwiegende unerwünschte Wirkungen haben, die häufig aus Unkenntnis über die einzelnen Inhaltsstoffe in den unterschiedlichen Pflanzenfamilien nicht immer sofort erkannt werden.

5.1.2 Rubiaceae

Die neotropische Spezies *Exostema mexicanum* A.Gray, Rubiaceae wird u. a. in Mexiko traditionell gegen Malaria eingesetzt. Zubereitungen der Stammrinde werden als Chinin-Ersatz verwendet. Interessanterweise produziert diese zu den Rubiaceen gehörende Spezies keine Alkaloide, sondern stattdessen die selten vorkommenden

4-Phenylcumarine, die auch als Neoflavonoide bezeichnet werden. Aufgrund dieser Erkenntnis galt es, die in Lateinamerika häufig ethnobotanisch eingesetzte und wie *Cinchona pubescens* Vahl zu den Rötengewächsen zählende Spezies *Exostema mexicanum* A.Gray zu untersuchen. In vorhergehenden Untersuchungen konnten aus der Stammrinde drei Cucurbitacinderivate und das 5-O- β -D-Glucopyranosyl-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin isoliert werden (Mata et al. 1990b). In einer anderen Arbeit wurde von der Isolierung von sieben 4-Phenylcumarinaglyka berichtet, die eine *in vitro* Aktivität gegen *Plasmodium falciparum* zeigten (Köhler et al. 2001).

Da in vergangenen Studien die Zweig- und Stammrinde hinreichend analysiert worden war, galt es in dieser Arbeit, das **Blattmaterial** auf Inhaltsstoffe der genannten Stoffklassen zu untersuchen.

Aus den **Blättern** konnten ein **neues** 4-Phenylcumaringlykosid 5-O- β -D-Glucopyranosyl-4'-hydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (**2**) sowie drei bekannte 4-Phenylcumaringlykoside **1**, **3** und **4** isoliert werden. Erstaunlicherweise ist nur ein Aglykon, das 3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin (**5**), dieser Stoffklasse in dem lipophilen Blätter-Extrakt detektierbar, hingegen sind in der Stammrinde eine Vielzahl dieser 4-Phenylcumarinaglykonderivate gefunden worden (Köhler et al. 2001). Interessanterweise sind die gewonnenen **4-Phenylcumaringlykoside** 5-O- β -D-Glucopyranosyl-7,3',4'-trihydroxy-4-phenylcumarin (**1**), 5-O- β -D-Galactopyranosyl-4'-hydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (**3**) und 5-O- β -D-Galactopyranosyl-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (**4**) **erstmalig** aus *Exostema mexicanum* isoliert worden.

Die aus den **Blättern** von *E. mexicanum* gewonnenen 4-Phenylcumaringlykoside **3** und **4** sowie das 4-Phenylcumarinaglykon **5** wurden auf ihre eventuell vorhandene Zytotoxizität gegenüber der Blasenkarzinomzelllinie ECV-304 untersucht.

Das 3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin (**5**) zeigte hierbei eine hohe Toxizität mit einem IC₅₀-Wert von 1 μ g/mL.

Der erhaltene Wert steht in Übereinstimmung mit einer früheren Studie von Ito und Mitarbeitern (2000). Aus den Wurzeln von *E. acuminatum* Urb. konnten 6 bekannte 4-Phenylcumarine isoliert werden, die sich als zytotoxisch gegenüber Zelllinien verschiedener Humankarzinome erwiesen. Zu den untersuchten 4-Phenylcumarine zählten auch das 3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin, das im Rahmen

dieser Arbeit als Substanz **5** isoliert und identifiziert werden konnte (Ito et al. 2000). In der Tat zeigte dort das 3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin (**5**) die stärkste zytotoxische Potenz.

Bezüglich seiner antiplasmodialen Aktivität konnte 3'-Hydroxy-4',5,7-trimethoxy-4-phenylcumarin (**5**) mit IC₅₀-Werten von > 50 µg/mL gegenüber dem chloroquinsensitiven (PoW) und dem chloroquinresistenten (Dd2) *P. falciparum* Stamm als inaktiv bezeichnet werden (Köhler Thesis, 2002). Betrachtet man den Methylierungsgrad der Verbindung (**5**), wäre eine antiplasmodiale Aktivität im Bereich des 4',5,7,8-Tetramethoxy-4-phenylcumarins (IC₅₀-Wert: 3,6 µg/mL (PoW) bzw. 1,6 µg/mL (Dd2) (Köhler Thesis, 2002) erwartet worden.

Das 5-O-β-D-Galactopyranosyl-4'-hydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (**3**) zeigte gegenüber der ECV-304 Zelllinie einen IC₅₀-Wert von 67,8 µg/mL, das 5-O-β-D-Galactopyranosyl-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin (**4**) einen IC₅₀-Wert von 65,2 µg/mL, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass diese glykosidischen Verbindungen aufgrund ihrer Hydrophilie nicht membrangängig sind. Ähnliche Effekte konnten bei den aus der **Rinde** von *E. mexicanum* isolierten Cucurbitacinen und deren Glykosiden beobachtet werden. Das Cucurbitacin-F und Cucurbitacin-F-acetat zeichneten sich durch eine signifikante Toxizität gegenüber humanen Tumorzell-Linien aus, wo hingegen das 2-O-β-D-Glucopyranosylcucurbitacin-F-acetat und das 5-O-β-D-Glucopyranosyl-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin als inaktiv eingestuft wurden (Mata et al. 1990b).

Hinsichtlich einer möglichen antiplasmodialen Aktivität der 4-Phenylcumaringlykoside liefert eine Publikation von Argotte-Ramos und Mitarbeitern aus dem Jahr 2006 interessante Ergebnisse. Aus der Stammrinde von *Hintonia latiflora* (Sesse & Moc. ex. DC.) Bullock, Rubiaceae wurden das neue 5-O-β-D-Glucopyranosyl-3'-hydroxy-4',7-dimethoxy-4-phenylcumarin und das bereits bekannte 5-O-β-D-Glucopyranosyl-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin isoliert und einem *in vitro* Chemosuppressionsverfahren zugeführt, bei dem die Auswirkungen der Substanzen auf Schizontenkulturen von *P. berghei* untersucht werden sollten. Beide Verbindungen waren aktiv gegenüber dem Blutstadium des Parasiten. Für das 5-O-β-D-Glucopyranosyl-3'-hydroxy-4',7-dimethoxy-4-phenylcumarin war ein IC₅₀-Wert von 11,8 µg/mL zu verzeichnen, bei 5-O-β-D-Glucopyranosyl-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-

4-phenylcumarin lag der IC₅₀-Wert bei 11,9 µg/mL. Darüber hinaus wurden die 4-Phenylcumaringlykoside *in vivo* an mit *P. berghei* infizierten Mäusen getestet, bei denen das 5-O-β-D-Glucopyranosyl-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-4-phenylcumarin die Entwicklung der Schizonten bei einer Dosis von 40 mg/kg um 70,8 % unterdrückte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die von Argotte-Ramos und Mitarbeitern (2006) beschriebenen 4-Phenylcumaringlykoside eine antiplasmodiale Aktivität *in vitro* und *in vivo* besitzen und der glykosidische Charakter die Wirkung nicht so gravierend einschränkt wie im eigenen Zytotoxizitätstest bei den isolierten Substanzen **3** und **4**.

Aus den Blättern von *E. mexicanum* konnten noch weitere interessante und neue Verbindungen erhalten werden. Zum ersten Mal wurden aus der Gattung *Exostema* klassische Flavonoide isoliert, ansonsten waren es immer 4-Phenylcumarine. Bei den isolierten Verbindungen (**6**) und (**7**) handelt es sich um acylierte Kämpferoltetraglykoside. Das Grundgerüst dieser Verbindungen besteht aus dem häufig in der Pflanzenwelt vorkommenden Flavonol Kämpferol, das am C-7 O-glykosidisch mit einer L-Rhamnose verknüpft ist und am C-3 eine O-glykosidische Verbindung mit einer D-Galactose eingegangen ist. Die D-Galactose ist an den Positionen 2'' und 6'' mit jeweils einer L-Rhamnose und an 4'' mit einer *p*-Cumarsäure verbunden.

Eine ähnliche Verbindung ist von Yahara und Mitarbeitern (2000) aus *Astragalus shikokianus*, Fabaceae, isoliert worden, es handelte sich um das Kämpferol-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)]-β-D-galactopyranosyl-7-O-α-L-rhamnopyranosid, auch benannt als Astrasikokiosid I, dem aber die Acylierungen der hier isolierten Verbindungen fehlen.

Aus den Blättern von *Astragalus caprinus* Maire, Fabaceae, wurden von Semmar und Mitarbeitern (2002) ebenfalls acylierte Kämpferoltetraglykoside erhalten, die sich jedoch von denen aus *E. mexicanum* isolierten Verbindungen **6** und **7** im Verknüpfungsmuster der Zucker unterscheiden. Es handelt sich um 3-O-Tetraglykoside des Kämpferols.

Flavonolglykoside kommen im Pflanzenreich nahezu ubiquitär vor. Sie sind häufig in den epidermalen Zellen lokalisiert und ihnen wird ein Schutz gegenüber UV-B Strahlung zugeschrieben (Landry et al. 1995). Darüber hinaus haben sie eine Bedeutung in der Interaktion zwischen Pflanze und Insekt und dienen damit der Abwehr von Herbivoren (Nielsen et al. 1998).

5.1.3 Verbenaceae

Zubereitungen aus dem Pflanzenmaterial von *Stachytarpheta guatemalensis* Moldenke, Verbenaceae, werden in lateinamerikanischen Regionen traditionell gegen Malaria eingesetzt. Untersuchungen an der Ganzpflanze auf antiplasmodiale Aktivität gegenüber chloroquin-sensitiven (PoW) und chloroquin-resistenten (Dd2) *P. falciparum* Stämmen führten zu dem Ergebnis, dass mit IC₅₀-Werten von jeweils 50 µg/mL keine hinreichende Wirkung zu verzeichnen war (Jenett-Siems Habil., 2002). Da diese Spezies bisher noch nicht phytochemisch untersucht worden war, sollte sie dennoch im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden. Aus dem Ethylacetat-Extrakt wurden fünf Phenylethanoidglykoside **11-15** isoliert.

Phenylethanoidglykoside sind eine Gruppe von wasserlöslichen Naturprodukten, die im Pflanzenreich weit verbreitet sind (Jiménez et al. 1994). Strukturell gesehen sind sie durch einen Phenylpropensäure- (z. B. Zimt-, *p*-Cumar-, Kaffee- und Ferulasäure) und einen Hydroxyphenylethyl-Rest charakterisiert, die über eine β -D-Glucopyranose miteinander verknüpft sind (Kawada et al. 2002). Häufig ist der Glucoserest zusätzlich mit Zuckern wie z. B. L-Rhamnose, D-Xylose verbunden, die dem Molekül erst die eigentliche Gestalt geben. Phenylethanoidglykoside sind nicht auf ein Pflanzenteil beschränkt, sie werden von der Wurzel über die Rinde bis hin zu den Blättern gefunden. Diese Stoffklasse ist vorrangig in den Familien der Scrophulariaceen, Oleaceaeen, Plantaginaceen, Lamiaceen und Orobanchaceen entdeckt worden (Jiménez et al. 1994). Die beiden ersten Phenylethanoidglykoside, die von mir aus *S. guatemalensis* isoliert wurden, waren das Acteosid (**11**) und sein Isomer, das Iso-Acteosid (**12**), die sich strukturell nur durch die Verknüpfung im Bereich der Glucose unterscheiden. Beim Acteosid (**11**) ist der *trans*-Kaffeensäure-Rest mit der OH-Gruppe am C4' der Glucose verestert, wo hingegen beim Iso-Acteosid (**12**) der Kaffeensäure-Rest mit der Hydroxylgruppe am C-6 der Glucose verknüpft ist.

Das Acteosid (**11**) wurde erstmalig aus den frischen Blättern und Stängeln von *Martynia louisiana* Mill., Pedaliaceae, isoliert und strukturell aufgeklärt (Sasaki et al. 1978), des Weiteren aus den frischen Wurzeln von *Leucosceptrum japonicum* (Miq.) Kitamura & Murata, Lamiaceae (Miyase et al. 1982), und aus den Wurzeln von *Plantago crassifolia* Forssk., Plantaginaceae (Andary et al. 1989).

Das Iso-Acteosid (**12**) konnte unter anderem ebenfalls aus den frischen Wurzeln von *Leucosceptrum japonicum* (Miq.) Kitamura & Murata, Lamiaceae (Miyase et al. 1982), isoliert werden.

Das Leucosceptosid A (**13**) unterscheidet sich vom Acteosid (**11**) durch den Austausch der Kaffesäure durch die Ferulasäure. Diese Substanz wurde 1982 zusammen mit den Verbindungen **11** und **12** aus dem unterirdischen Anteil von *Leucosceptrum japonicum* (Miq.) Kitamura & Murata, Lamiaceae (Miyase et al. 1982), gewonnen und darüber hinaus aus den getrockneten Wurzeln von *Rehmannia glutinosa* Libosch. var. *pupurea* Makino, Scrophulariaceae (Sasaki et al. 1989).

Beim Martynosid (**14**), das im Gemisch mit dem Jionosid D (**15**) aus *S. guatemalensis* isoliert wurde, ist die Hydroxylgruppe am C-4 des Hydroxyphenylethyl-Restes im Gegensatz zum Leucosceptosid A (**13**) methoxyliert. Martynosid (**14**) wurde 1982 von Miyase und Mitarbeitern aus *Leucosceptrum japonicum* (Miq.) Kitamura & Murata, Lamiaceae, und 1989 von Sasaki und Mitarbeitern aus *Rehmannia glutinosa* Libosch. var. *pupurea* Makino, Scrophulariaceae, erhalten. Jionosid D (**15**) wiederum weist strukturelle Ähnlichkeiten zum Acteosid (**11**) auf, da auch in diesem Molekül der Phenylpropensäure-Rest eine *trans*-Kaffeesäure ist und die beiden Zucker (D-Glucose und L-Rhamnose) in der gleichen Verknüpfung vorkommen. Allerdings ist die Hydroxylgruppe am C-4 des Hydroxyphenylethyl-Restes wie bei dem Martynosid (**14**) methoxyliert. Jionosid D (**15**) konnte zuvor aus den getrockneten Wurzeln von *Rehmannia glutinosa* Libosch. var. *pupurea* Makino, Scrophulariaceae, gewonnen werden (Sasaki et al. 1989). Nur zwei der fünf von mir isolierten Phenylethanoidglykoside, darunter das Acteosid (**11**), und sein Isomer das Iso-Acteosid (**12**) wurden zuvor aus *Stachytarpheta cayennensis* (L. C. Rich) Vahl, Verbenaceae, (Schapoval et al. 1998; Adebajo et al. 2007) gewonnen, wohingegen es sich bei den anderen Phenylethanoidglykoside (**13-15**) um eine erstmalige Gewinnung dieser Verbindungen aus der Gattung *Stachytarpheta* handelt.

Die Phenylethanoidglykoside sind in der Natur mannigfaltig vertreten, der Zuckeranteil ist in der Regel nicht auf zwei wie bei den hier isolierten Substanzen **11-15** beschränkt. Es existiert eine Klassifikation, nach der diese Stoffgruppe gemäß der Anzahl und Typen von Zuckern unterteilt wird (Jiménez et al. 1994). Die Phenylethanoidglykoside sind in der Vergangenheit einer Reihe von pharmakologischen Untersuchungen

unterzogen worden, wobei insbesondere antibakterielle Aktivität, Zytotoxizität und antioxidative Eigenschaften untersucht wurden. Die antimikrobielle und antibakterielle Aktivität von einigen der Phenylethanoide wird mit dem Vorhandensein der phenolischen Gruppen assoziiert. Weiterhin wird vermutet, dass die Phenylethanoide eine wichtige Rolle innerhalb der Pflanze spielen, um sich vor Attacken durch Pilzbefall oder Viren zu schützen (Jiménez et al. 1994). In einer aktuellen Studie aus dem Jahr 2007 zeigten Adebajo und Mitarbeiter, dass das aus *S. cayennensis* gewonnene Iso-Verbascosid (= Iso-Acteosid) eine insulinotrope Wirkung hatte.

5.1.4 Asteraceae

Zubereitungen aus *Aspilia africana* (Pers.) C.D.Adams, Asteraceae, werden in Ost- und Zentralafrika traditionell zur Behandlung der Symptome von Malaria eingesetzt. In früheren Studien konnten aus der Ganzpflanze die Flavonglykoside Quercetin-3-O- β -D-galactopyranosid und das bis dato unbekannte 5-Hydroxy-3,6,8,4'-tetramethoxyflavon-7-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-galactopyranosid isoliert werden (Aqil et al. 1997).

Des Weiteren wurde das durch Destillation gewonnene ätherische Öl zweier Varietäten von *A. africana* auf seine Komponenten hin untersucht. Von den 5 untersuchten Proben des ätherischen Öls waren 2 Proben von *A. africana* var. *africana* reich an Sesquiterpenen (88 % und 94 %), insbesondere war das Germacren-D als Hauptkomponente (45 % und 54 %) anzutreffen, bei weiteren 2 Proben dominierten die Monoterpene (63 % und 48 %) mit α -Pinen als Hauptbestandteil (39 % und 27 %). Bei der Varietät *ambigua* überwog der Anteil an Monoterpenen (54 %) mit Limonen (23 %) und α -Pinen (22 %) als vorherrschende Komponenten (Kuiate et al. 1999).

Die im Vorfeld bestimmte antiplasmodiale Aktivität des lipophilen Rohextraktes (EtOAc/PE 1:1) und des hydrophilen Methanol-Rohextrakt der **Blätter** von *A. africana* an einem chloroquin-sensitiven (PoW) *P. falciparum* Stamm ergab bezüglich des lipophilen Extraktes einen IC₅₀-Wert von 30,3 μ g/mL (Jenett-Siems Habil., 2002). Um bewerten zu können, ob diese antiplasmodiale Aktivität auf eine eventuelle Zytotoxizität der enthaltenen Inhaltstoffe des Extraktes zurückzuführen ist, wurden sowohl **Blätter**- als auch **Wurzelextrakte** von *A. africana* an den beiden Zelllinien ECV-304 und HepG2 überprüft (Tabelle 8). Es zeigte sich keine ausgeprägte Toxizität (IC₅₀ Werte > 50 μ g/mL). Obwohl in einigen Varietäten von *A. africana*

Sesquiterpenlactone identifiziert worden sind (Kuiate et al. 1999), scheinen diese nicht die strukturellen Voraussetzungen für zytotoxische Effekte zu besitzen oder sind möglicherweise zu niedrig konzentriert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Blätter- und Wurzel-Extrakte vergleichsweise untoxisch sind, auch wenn die für den **Blätter**-Extrakt von *A. africana* erhaltenen Selektivitätsindices von 2 (ECV-304) und 4 (HepG2) sehr klein sind. Dank der *in vitro* Zytotoxizitätsversuche müsste man nicht davon ausgehen, von einer Behandlung mit diesen Extrakten abzuraten.

In einer Studie aus dem Jahr 2005 wurde von Waako und Mitarbeitern mittels *in vitro* Versuchen eine Interaktion zwischen *A. africana* Extrakten und Artemisinin an chloroquin-sensitiven (D10) sowie chloroquin- und sulfonamid-resistenten (K1) *P. falciparum* Stämmen festgestellt. Diese Studie ist von Interesse, da es über derartige Interaktionen zwischen traditioneller Medizin und Anti-Malariawirkstoffen bisher keine gesicherte Dokumentation gibt. Der von Waako und Mitarbeitern (2005b) verwendete Ethylacetat-Extrakt von *A. africana* erwies sich mit einem IC_{50} -Wert von 9,3 $\mu\text{g/mL}$ gegen den chloroquin-sensitiven D10-Stamm und einem IC_{50} -Wert von 11,5 $\mu\text{g/mL}$ gegen den K1-Stamm von *P. falciparum* als der aktivste. Das Artemisinin war in Konzentrationen von 0,043 $\mu\text{g/mL}$ gegen den D10- und 0,165 $\mu\text{g/mL}$ gegen den K1-Stamm von *P. falciparum* aktiv. Durch eine Kombination des Pflanzenextraktes von *A. africana* mit Artemisinin zeigten sich antagonistische Effekte gegenüber den beiden Stämmen (D10 und K1) von *P. falciparum* (Waako et al. 2005b).

Artemisinin wirkt wahrscheinlich über einen Redox-Mechanismus, der durch Antioxidanzien im Extrakt beeinflusst wird. In Malaria-Gebieten handelt es sich um eine gängige Praxis, chemische Anti-Malaria-Wirkstoffe mit traditionellen Pflanzenextrakten zu kombinieren. Dabei könnte es sich um ein interessantes Feld für weitere Forschungen handeln.

Vernonia amygdalina Delile, eine ebenfalls zu den Korbblütlern zählende Pflanze, wird traditionell gegen Malaria eingesetzt. In Uganda und anderen Gebieten Ost-Afrikas wird vorrangig ein Kaltauszug der Wurzelrinde therapeutisch eingesetzt (persönliche Mitteilung Dr. Onegi), wohingegen in anderen Teilen Afrikas auch die Blätter Verwendung finden, die allerdings zuvor mehrfach mit heißem Wasser gewaschen werden (Watt et al. 1962). Phytochemische Untersuchungen des Blätter-Extraktes

ermöglichten die Identifizierung von Luteolin, Luteolin-7-O- β -glucuronosid und Luteolin-7-O- β -glucosid von Igile und Mitarbeitern (1994). Des Weiteren konnten drei neue Steroidsaponine Vernoniosid D₁, D₂ und E aus einem methanolischen Blätter-Extrakt isoliert und strukturell aufgeklärt werden (Schmittmann et al. 1994).

In einer Arbeit von Ohigashi und Mitarbeitern (1994) wurden aus dem Blätter-Extrakt die Sesquiterpenlactone Vernodalin, Vernodalol und Vernolid isoliert, die plasmodicide Effekte (IC₅₀ Werte: 4,0 μ g/mL, 4,2 μ g/mL und 8,4 μ g/mL) gegenüber einem multiresistenten (K1) *P. falciparum* Stamm zeigten (Ohigashi et al. 1994), die in diesem Fall zweifelsohne durch deren generelle Zytotoxizität verursacht waren. So zeigten Vernodalin und Vernolid an KB Zellkulturen Zytotoxizitätswerte (ED₅₀) von 1,8 μ g/mL bzw. 2,0 μ g/mL (Kupchan et al. 1969), für das Vernodalol wurde ein IC₅₀ Wert 1,3 μ g/mL an der Blasenkarzinomzelllinien ECV-304 erhalten (Kraft Thesis, 2003).

Eigene Untersuchungen an **Blätter**- und **Wurzel**-Extrakten von *Vernonia amygdalina* (Tabelle 8) zeigten, dass insbesondere der lipophile Blätter-Extrakt mit IC₅₀ Werten von 2,3 μ g/mL (ECV-304) und 7,8 μ g/mL (HepG2) im Gegensatz zum lipophilen Wurzel-Extrakt mit IC₅₀ Werten von 51,4 μ g/mL (ECV-304) und 84,9 μ g/mL (HepG2) zweifellos als erheblich toxisch angesehen werden kann. Die ungleichen Zytotoxizitätsresultate von **Blätter**- und **Wurzel**-Extrakten lassen sich vermutlich durch die Abwesenheit des besonders zytotoxischen Sesquiterpenlactons Vernodalin begründen, das laut früheren Studien nicht in den Wurzeln vorkommt (Ohigashi et al. 1994). Von Ohigashi und Mitarbeitern (1994) wurden unterschiedliche Pflanzenteile von *V. amygdalina* auf das Vorhandensein von Sesquiterpenlactonen und Steroidglykosiden untersucht. Dabei fanden sie heraus, dass sich das Vernodalin weder in den Wurzeln noch in den Triebspitzen von frischen Blättern nachweisen ließ. Demnach scheint der Wurzel-Extrakt durchaus therapeutisch einsetzbar zu sein, während man von dem Blätter-Extrakt aufgrund seiner Toxizitäten Abstand nehmen sollte. Allerdings handelt sich bei Malaria um eine ernsthafte Erkrankung, bei der Nebenwirkungen auch in Kauf genommen werden müssen.

Im Jahr 2006 wurden von Erasto und Mitarbeitern die beiden Sesquiterpenlactone Vernodalol und Vernodalid aus luftgetrockneten Blättern von *V. amygdalina* isoliert und deren antimikrobielle Eigenschaften gegen 10 Bakterienstämme und antifungale Effekte gegen 5 Pilzspezies erforscht. Dabei stellte sich heraus, dass beide

Komponenten bakterizid gegenüber grampositiven Bakterien wirkten, allerdings keinen Effekt auf gramnegative Bakterien zeigten. Bezüglich der antifungalen Aktivität schnitt das Vernodalid wesentlich besser ab als das Vernodalol. Die von Erasto et al. (2006) erzielten Ergebnisse sind beachtlich und zudem nützlich, doch stellt sich die Frage, ob die für beide Substanzen bewiesene allgemeine Zytotoxizität (Kupchan et al. 1969) nicht womöglich auch für die antimikrobielle und fungizide Wirkung verantwortlich ist.

5.1.5 Cucurbitaceae

Von den Cucurbitaceae existieren über 120 Gattungen und etwa 850 Arten, die weltweit verbreitet sind (Jeffrey, 1967). Viele dieser Arten werden kommerziell aufgrund ihrer Eigenschaft als Lebensmittel angebaut und genutzt, in einigen wenigen Fällen werden sie für medizinische Zwecke verwendet. In Ost- und Zentralafrika wird *Momordica foetida* Schum. eingesetzt, um eine Vielzahl an Erkrankungen wie z. B. Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Fieber und Symptome der Malaria zu behandeln (Hakizamungu et al. 1992; Rwangabo, 1993).

In vorhergehenden phytochemischen Untersuchungen konnten aus einem Blätterextrakt Cucurbitacine (Mulholland et al. 1997), aus der kompletten Pflanze Alkaloide und deren Glykoside (Olaniyi et al. 1975; Olaniyi, 1975) isoliert sowie Sitosterolglykoside, 5,25-Stigmastadien-3- β -yl-glucosid und 1 β -Hydroxyfriedel-6-en-3-on identifiziert werden (Olaniyi, 1980). *In vivo* Studien mit wässrigen Extrakten von *M. foetida* konnten zeigen, dass die orale Gabe verschiedener Dosen das Überleben von mit *Plasmodium berghei* infizierten Mäusen verlängerte (Waako et al. 2005a).

Momordica foetida, wurde im Rahmen dieser Arbeit einer phytochemischen Untersuchung unterzogen, da die guten antiplasmodialen Aktivitäten des lipophilen Rohextraktes (EtOAc/PE 1:1) von 7,3 $\mu\text{g/mL}$ (PoW) und 13,0 $\mu\text{g/mL}$ (Dd2) an *P. falciparum* (Kraft, Thesis 2003) und die geringe Zytotoxizität des lipophilen Rohextraktes von IC_{50} 85,7 $\mu\text{g/mL}$ an HepG2-Zell-Linien und IC_{50} 106,0 $\mu\text{g/mL}$ an ECV-304-Zell-Linien (Tabelle 8) diese zu den Kürbisgewächsen zählende Pflanze als Untersuchungsmaterial viel versprechend machte.

Aus *M. foetida* konnten eine Reihe von bekannten phenolischen Verbindungen erhalten werden: wie z. B. die bekannten Flavanonderivate 5,7,4'-Trihydroxyflavanon-7-O- β -D-glucopyranosid (= Prunin) (**16**), das zuvor aus der Rinde von *Salix acutifolia* Willd.,

Salicaceae, isoliert wurde und das 5,7,3',4'- Tetrahydroxyflavanon-7-O- β -D-glucopyranosid (Eriodictyol-7-O- β -D-glucopyranosid) (**17**), das aus *Crotalaria sessiliflora* L., Fabaceae, gewonnen wurde. Des Weiteren das Flavonolglykosid Kämpferol-7-O- β -D-glucopyranosid (= Populnin) (**18**) (Harborne, 1994) und das 5,7-Dihydroxychromon-7-O- β -D-glucopyranosid (**19**) und sein Aglykon 5,7-Dihydroxychromon (**20**), die beide zuvor aus *Calluna vulgaris* (L.) Hull, Ericaceae, isoliert worden waren. Alle diese Verbindungen wurden erstmalig aus *M. foetida* gewonnen.

5.1.6 Glutathionabhängiger Heminabbau

Gewöhnlich werden durch den Verdauungsprozess des Hämoglobins in der Nahrungsvakuole der Malaria erzeugenden Parasiten große Mengen an toxischem freiem Häm produziert (Kapitel 1.4.5.1). Die anschließende Häm-Detoxifikation kann in zwei Klassen eingeteilt werden (Kumar et al. 2007). Primär existiert der Entgiftungsmechanismus der Hämozoin-Formation in der Nahrungsvakuole (Slater et al. 1992; Ziegler et al. 2001) und sekundär kommen andere Systeme zum Tragen, die hauptsächlich im Cytosol lokalisiert sind, wie z. B. die Detoxifikation mittels Glutathion, die Häm-bindenden Proteine (Campanale et al. 2003) und der Abbau des Häms durch H₂O₂.

30- 50 % des freien Häms, hervorgehend aus dem Verdauungsprozess des Hämoglobins, werden anschließend zum untoxischen Hämozoin umgewandelt. Das verbleibende freie Häm passiert die Membran der Nahrungsvakuole, um ins Cytosol des Parasiten zu gelangen (Huy et al. 2002). Das dort für die Detoxifikation des restlichen Häms nötige Tripeptid Glutathion ist in millimolaren Konzentrationen im Parasiten gefunden worden (Becker et al. 2004; Müller, 2004). Während der Hämoglobin-Aufnahme versorgt sich der Parasit mittels Pinozytose mit kleinen Mengen an Glutathion aus dem Erythrozyten-Cytosol (Becker et al. 2004).

Anti-Malaria-Wirkstoffe, wie das Chloroquindiphosphat, können in beide Prozesse eingreifen. So erhöht sich die freie Häm-Konzentration, was zum Tod des Parasiten führt (Kumar et al. 2007).

5.1.7 Einfluss von *M. foetida* auf den GSH-abhängigen Heminabbau

M. foetida scheint aufgrund ihrer guten antiplasmodialen Aktivität und geringen Zytotoxizität eine Pflanze mit Anti-Malaria-Potential zu sein. Da der Wirkungsmechanismus nicht bekannt ist, wurde der Micro-Assay von Steele et al. (2002) durchgeführt, um abschätzen zu können, ob die Rohextrakte und isolierten Substanzen einen Einfluss auf den Heminabbau besitzen. Der Ethylacetat-Extrakt zeigte mit Abstand den stärksten Effekt mit 88,4 % Hemmung des Heminabbaus, der den Effekt des Chloroquindiphosphates als Standardsubstanz von 84,1 % sogar übertraf. Dagegen wiesen der Dichlormethan- und der Petrolether-Extrakt nur eine Hemmung von 38,5 % bzw. 44,1 % auf. Das aus dem Ethylacetat-Extrakt isolierte Flavanonglykosid Eriodictyol-7-O- β -D-glucopyranosid (**17**) konnte den Hemin-Abbau um 86,2 % inhibieren. Das zweite Flavanonglykosid Prunin (**16**) erwies sich mit 2,1 % Hemmung als inaktiv. Auch das Flavonglykosid Populnin (**18**) und das 5,7-Dihydroxychromen-7-O- β -D-glucopyranosid (**19**) konnten mit Hemmungen im Bereich von 13,1 % bzw. 4,2 % nicht überzeugen. Anhand der erhaltenen Resultate lassen sich Vermutungen bezüglich der Wirkungsweise anstellen; so könnte die Catechol-Grundstruktur, die das Eriodictyol-7-O- β -D-glucopyranosid (**17**) aufweist, verantwortlich gemacht werden für die Interaktion mit dem Hemin. Ein ähnliches Ergebnis konnte mit Quercetin erzielt werden, dass den Hemin-Abbau um 81,8 % hemmte.

5.1.8 Einfluss der Hopfeninhaltsstoffe auf den GSH-abhängigen Heminabbau

Der Hopfen, *Humulus lupulus* L. aus der Familie der Cannabaceae, ist eine große, zweihäusige, kletternde Pflanze. Sekretorische Drüsen auf der Oberfläche der weiblichen Blüten enthalten das ätherische Öl und ein Harz mit bitter schmeckenden Komponenten, wie die Humulone und die Lupulone. Ferner sind Polyphenole, wie beispielsweise Flavonoide und Chalkone präsent, insbesondere gehört das prenylierte Chalkonderivat Xanthohumol zu den Hauptkomponenten. Therapeutisch werden die Hopfenzapfen als mildes Sedativum in Kombination mit Baldrian (*Valeriana officinalis* L.) eingesetzt. Es sind eine Vielzahl an biologischen Aktivitäten von verschiedenen Hopfeninhaltsstoffen veröffentlicht worden, wie z. B. antimikrobielle, antioxidative und zytotoxische Effekte (Miranda et al. 1999; Miranda et al. 2000). Das 8-Prenylnaringenin

wurde von Milligan und Mitarbeitern (2002) auf östrogene Aktivität *in vitro* und *in vivo* überprüft und als potentes Phytoöstrogen eingestuft.

Da die aus *H. lupulus* isolierten Hopfeninhaltsstoffe **I-VIII** (Hänsel et al. 1988) im Vorfeld auf ihre *in vitro* antiplasmodiale Aktivität an einem chloroquin-sensitiven (PoW) und einem chloroquin-resistenten (Dd2) *P. falciparum* Stamm (Tabelle 10, Frölich et al. 2005) getestet worden waren, galt es, im Hinblick auf einen möglichen Wirkmechanismus etwaige hemin-bindende Eigenschaften zu untersuchen. Das Xanthohumol (**I**) zeigte *in vitro* die höchste antiplasmodiale Aktivität mit IC₅₀-Werten von 8,2 µM (PoW) und 24,0 µM (Dd2) und die beste Aktivität im *in vitro* Modell des glutathionabhängigen Heminabbaus.

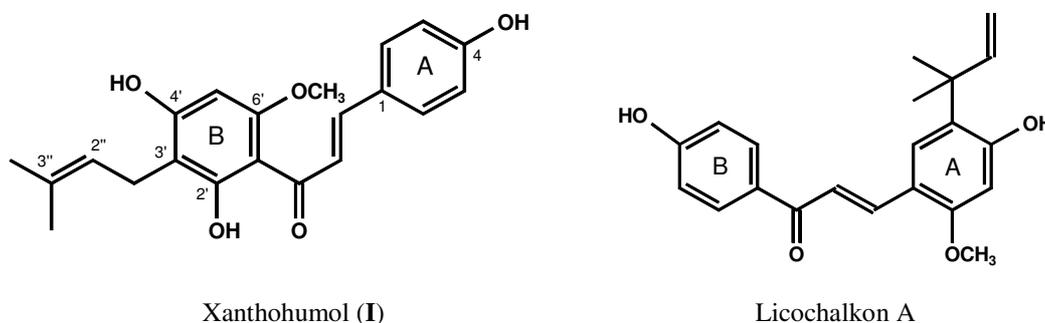


Abbildung 40 Xanthohumol und Licochalcon A

Vergleicht man den strukturellen Aufbau mit dem des antiplasmodial wirksamen Licochalcon A (Chen et al. 1994), dass aus der chinesischen Süßholzwurzel gewonnen wurde, so stellt man fest, dass der Prenyl-Rest des Licochalcon A am A-Ring des Chalkon-Gerüsts lokalisiert ist. Die Tatsache, dass die Verbindungen **I** und **II** vergleichbar potent sind, zeigt allerdings, dass das Vorhandensein der Doppelbindung in der Seitenkette nicht wesentlich für die Bioaktivität ist.

Ebenso zeigten die beiden Pyrano-Derivate (**III**, **IV**), deren Prenyl-Rest zu einem weiteren Ring zyklisiert war, antiplasmodiale Aktivität. Das Desmethylxanthohumol (**VI**), dem im Gegensatz zum Xanthohumol (**I**) nur der Methylrest an der am C-6' positionierten Hydroxylgruppe fehlt, ist im Vergleich zu (**I**) 4 bis 5 fach schwächer aktiv. Die Begründung für die geringere Aktivität könnte in der höheren Hydrophilie liegen, die es schwierig macht, den richtigen Angriffspunkt im Parasiten zu erreichen. Erstaunlicherweise zeigten die halbsynthetischen, methylierten Derivate **V** und **VII** keinerlei Aktivität, obwohl synthetische 2',4'-Dimethoxychalkone in einer umfassenden

Struktur-Aktivitäts-Beziehungs-Studie gute antiplasmodiale Aktivitäten erkennen ließen (Liu et al. 2003). Möglicherweise ist hier die Methylierung in Position 4 von Nachteil.

Der exakte Mechanismus der Chalkone bezüglich ihrer antiplasmodialen Aktivität ist noch nicht vollständig geklärt, dennoch werden sie oft als Cystein-Proteasen-Inhibitoren in Betracht gezogen (Li et al. 1995). Es ist allerdings auch denkbar, dass Chalkon-Derivate mit einer Carbonylgruppe in Position 9 und einer freien Hydroxylgruppe in Position 2' Komplexe mit dem im Parasiten vorkommenden Häm bilden können. Insofern war es von Interesse, inwieweit die auf antiplasmodiale Aktivität getesteten 8 Substanzen einen Effekt auf den glutathionabhängigen Heminabbau haben.

In dem Testsystem des glutathionabhängigen Heminabbaus zeigten die aktiven Substanzen **I**, **II** und **IV** in einer Konzentration von 11 μM eine Hemmung von über 60 % im Vergleich zum Chloroquindiphosphat mit 82 %. Die Substanzen **VI** und **VIII** waren sehr schwach wirksam, in dem sie den glutathionabhängigen Heminabbau um 36 % und 24 % hemmten. Die Substanzen **III**, **V** und **VII** erwiesen sich als inaktiv. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen des antiplasmodialen Assays, so stellt man eine prinzipielle Übereinstimmung fest.

Eine Ausnahme stellte offenbar das Pyrano-Derivat (**III**) dar, da es eine Aktivität gegenüber *P. falciparum* zeigte, jedoch nicht in der Lage war, den Heminabbau zu hemmen. Substanzen, die über eine 2'-Methoxygruppe (**V**, **VII**) oder über einen 2',3'-Pyrano-Ringsystem (**III**) verfügen, anstatt einer freien Hydroxylgruppe, sind offensichtlich nicht in der Lage, mit Hemin zu interagieren. Desmethylxanthohumol (**VI**) und das Flavanon-Derivat (**VIII**) zeigten nur eine schwache Aktivität trotz ihrer freien Hydroxylgruppen. Möglicherweise sind zyklisierte Chalkone, wie z.B. Flavanone und Flavone nicht befähigt aufgrund ihrer strukturellen Merkmale Hemin zu binden, da dem Grundgerüst die nötige Flexibilität fehlt. Das Desmethylxanthohumol (**VI**) wird in wässrigen Lösungen leicht zu analogen Flavanonen isomerisiert (Hänsel et al. 1988), was möglicherweise die schwache Aktivität im glutathionabhängigen Hemin-Abbaustest erklärt.

5.1.9 Inhibitorische Aktivität gegenüber Papain

In vielen pathogenen Parasiten, wie z. B. Protozoen der Gattung *Plasmodium* und *Trypanosoma*, scheinen Papain-ähnliche Cystein-Proteasen eine bedeutsame Rolle bei

Prozessen der Enzymaktivierung, der Hydrolyse von Wirtsproteinen, beim Wachstum und der Entwicklung des Parasiten sowie der Penetration in die Wirtszelle zu spielen (Sajid et al. 2002). Die Inhibierung der parasitären Cystein-Proteasen stellt demnach eine potentielle Strategie zur Bekämpfung dieser Protozoen-Infektionen dar.

Cystein-Proteasen von parasitischen Organismen werden in zwei Hauptgruppen eingeteilt, die als Clans bezeichnet werden. Dabei handelt es sich um den Clan CA und CD (Rawlings et al. 1993; Barrett, 1994). 1879 wurde die erste Cystein-Protease aus der Papaya-Frucht, *Carica papaya* L., Caricaceae, gewonnen und charakterisiert und als Papain betitelt. Seither wurden unzählige weitere Cystein-Proteasen strukturell aufgeklärt und den Papain-ähnlichen-Proteasen (= „Clan CA“-Proteasen) zugeordnet und in Familien gegliedert. Wichtige parasitäre Proteasen werden der Familie C1 (Cathepsin B und Cathepsin L) und der Familie C2 (Calpain-ähnlich) zugeteilt.

Li und Mitarbeiter untersuchten 1995 eine Reihe von Chalkon-Derivaten und testeten sie *in vitro* an chloroquin-sensitiven (D2) und chloroquin-resistenten *P. falciparum* Stämmen. Sie schlussfolgerten anhand ihrer Ergebnisse, dass der Wirkmechanismus der Chalkon-Derivate auf einer kompetitiven Hemmung der parasitären Cystein-Protease Falcipain zu basieren scheint. Als essentiell für eine starke inhibitorische Wirkung wurde die C₂-C₃ Doppelbindung in Betracht gezogen, die nicht nur als konjugierendes Verbindungsstück zwischen den aromatischen A- und B-Ringen fungiert, sondern die ausgedehnte Molekular-Konformation beibehält (Li et al. 1995). Da die Chalkon-Derivate aus dem Hopfen bisher auf antiplasmodiale Aktivität und heminbindende Eigenschaften überprüft worden waren (Frölich et al. 2005), galt es, einen Teil der verbleibenden Hopfeinhaltsstoffe in einem optimierten Papain-Micro-Assay bezüglich ihrer inhibitorischen Aktivität zu überprüfen. Von den insgesamt 8 Hopfensubstanzen, die im Testsystem „glutathionabhängiger Heminabbau“ hinreichend untersucht worden waren, konnten die Substanzen **I**, **II**, **V**, **VI** und **VII** auf ihre Hemmwirkung in Bezug auf Papain geprüft werden. Des Weiteren wurde das Chalkon Phloretin, dessen antiplasmodiale Aktivität bekannt war (persönliche Mitteilung, PD Dr. Jenett-Siems) und Chloroquindiphosphat auf ihre Hemmwirkung gegenüber Papain untersucht.

Als Positivkontrolle wurde der irreversible Inhibitor E-64 verwendet. E-64 wurde 1978 von Hanada und Mitarbeitern aus *Aspergillus japonicus* isoliert (Hanada et al. 1978). Strukturell handelt es sich um ein Epoxysuccinat-Inhibitor, der insbesondere Cystein-

Proteasen des Clans CA, wie Papain, Cruzain und die Cathepsine B, H und L hemmt (Barrett et al. 1982; Roush et al. 2000).

Die für die Hemmung wichtige reaktive Kopfgruppe dieser Substanz ist die *trans*-L-(*S,S*)-Epoxybernsteinsäure. Bei der irreversiblen Hemmung wird die C-2-Position des Epoxids vom katalytischen Zentrum der Protease angegriffen (Abbildung 41).

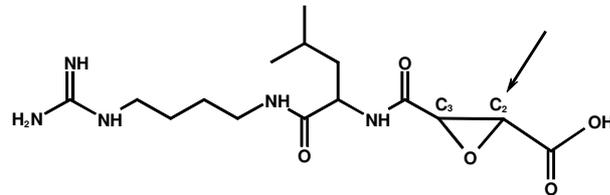


Abbildung 41 E-64 aus *Aspergillus japonicus*

Die Inhibition von Enzymen kann kovalenter und nicht-kovalenter Natur sein. Die reversible Enzyminhibition wiederum kann kompetitiv und nicht-kompetitiv erfolgen. Bei der kompetitiven Inhibition konkurriert der Inhibitor mit dem Substrat um die Bindungsstelle. Nicht-kompetitive Inhibition bedeutet, dass der Inhibitor an einer anderen Stelle des Enzyms bindet und ein unproduktiver ternärer Komplex EIS (= Enzym-Inhibitor-Substrat) gebildet wird. Eine zweite Möglichkeit der Enzyminhibition stellt die irreversible Inhibition dar. Hier bindet der Inhibitor in der aktiven Tasche und bildet dann eine kovalente Bindung mit dem Enzym aus (E-I = Enzym-Inhibitor). Hierdurch wird die aktive Bindungstasche vollständig und irreversibel blockiert.

Als Begründung für die Rolle der Cystein-Proteasen während der Hämoglobinhydrolyse von *P. falciparum* gelten Studien, die sich mit den Effekten von Cystein-Proteasen Inhibitoren auf Parasitenkulturen beschäftigen. Inkubation mit relativ unspezifischen Cystein-Protease-Inhibitoren, wie beispielsweise E-64 und Leupeptin, verursachten ein Anschwellen der Nahrungsvakuole bedingt durch eine Anhäufung von schwärzlichem Material (Bailly et al. 1992; Dluzewski et al. 1986; Rosenthal et al. 1988). An dem kooperierenden Prozess der Hämoglobinhydrolyse (Kapitel 1.4.5.2) sind Proteasen unterschiedlicher katalytischer Klassen beteiligt, wie z. B. Cystein-, Aspartat- und Metallo-Proteasen (Rosenthal, 2004). Der erste Schritt der Hämoglobinhydrolyse wird üblicherweise durch Aspartat-Proteasen initialisiert. Diese Aspartat-Proteasen Plasmepsin I und II sind jedoch auf keinen Fall inhibierbar mit Cystein-Protease-Inhibitoren, wie E-64 und Leupeptin (Francis et al. 1997). Daher ist es bislang unklar,

warum der Einsatz von Cystein-Protease-Inhibitoren offenbar zum völligen Erliegen der Hämoglobinhydrolyse führt.

In frühen Studien wurde der Fokus beim Design von Cystein-Protease-Inhibitoren vorrangig auf irreversible Inhibitoren, wie beispielsweise die Vinylsulfone, gesetzt, die bekannt dafür sind, die Proteasen der Papain-Familie, einschließlich Cruzain (Sajid et al. 2002) und die Falcipaine (Shenai et al. 2003) zu hemmen. Diese Inhibitoren sind in der Lage, kovalente Bindungen mit dem Thiolat des katalytisch aktiven Cysteins einzugehen. Obwohl derartige Inhibitoren über eine bemerkenswerte inhibitorische Potenz verfügen, besteht eine geringe Selektivität zwischen parasitären und humanen Cystein-Proteasen. Demzufolge ist es wünschenswert, reversible selektive Inhibitoren zu finden, um mögliche Toxizitäten zu minimieren (Engel et al. 1998).

Arbeiten aus den Jahren 2002 und 2003 beschäftigten sich mit synthetischen Peptidyl-Aldehyd und α -Ketoamid Cystein-Protease-Inhibitoren, die nachweisbar potent waren und gleichermaßen reversible Inhibitoren von Falcipainen und Cruzain darstellten (Lee et al. 2003; Huang et al. 2002).

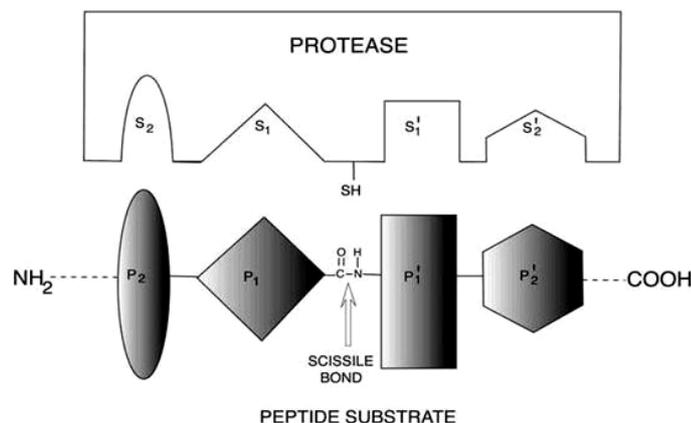


Abbildung 42 Schematische Darstellung der Interaktion zwischen einem Peptid-Substrat mit den Bindungstaschen einer Cystein-Protease (aus Sajid et al. 2002)

Die Nomenklatur der Enzym-Bindungstaschen (so genannte „subsites“) wird nach Schechter und Berger (1967) vorgenommen. Ausgehend von der Spaltstelle im Enzym in Richtung N-Terminus des Substrates/Inhibitors werden diese mit S₁-S_n bezeichnet, in Richtung C-Terminus mit S₁'-S_n'. Die Aminosäuren des Substrates/Inhibitors werden dementsprechend mit P₁-P_n bzw. P₁'-P_n' deklariert (Abbildung 42).

Papain kann insbesondere Peptide mit Arg- und Lys-Resten (P1) spalten. Die Spezifität der S1-Bindungstasche ist weniger gut definiert, als die der S2 „subsite“, die hydrophobe Seitenketten, wie z. B. Phe oder Leu bevorzugt.

Bei den parasitären Cystein-Proteasen Falcipain-2 und Falcipain-3 herrscht eine starke Präferenz für Leucin oder Phenylalanin an der P2-Position vor.

Um Inhibitoren für Cystein-Proteasen zu konstruieren, wurden die meisten von ihnen basierend auf Substrat-Strukturen entwickelt. Als Modell wird ein bekanntes Substrat gewählt, um eine möglichst gute Affinität zum Enzym sicherzustellen. Des Weiteren wird noch eine reaktive, elektrophile Kopfgruppe benötigt, die mit einer Peptidkette verknüpft ist. Die Peptidkette dient als Erkennungssequenz, um die reaktive Kopfgruppe ins katalytische Zentrum des Enzyms zu befördern. Ungünstig ist bei dieser Entwicklung die Tatsache, dass die Peptidbindungen dieser Inhibitoren leicht hydrolytisch spaltbar sind und sie als Arzneistoffe wegen schlechter Bioverfügbarkeit nicht einsetzbar wären. Demzufolge werden Inhibitoren mit peptidomimetischen Eigenschaften konstruiert, bei denen die Peptidkette beispielsweise durch einen Heterozyklus stabilisiert ist oder unnatürliche Aminosäuren eingebaut werden, die einem hydrolytischen Abbau entgegenwirken (Emig et al. 2005). Nicht alle Inhibitoren basieren auf Strukturen von Substraten, was diesen nicht-peptidischen Inhibitoren eine höhere Stabilität gegenüber den Peptidasen verleiht.

Einen inhibitorischen Effekt gegenüber Papain zeigten das 6'-Desmethylxanthohumol (**VI**) mit 70,8 %, und das Xanthohumol (**I**) mit 69,6 %. Gegenüber dem chloroquin-sensitiven (PoW) und chloroquin-resistenten (Dd2) *P. falciparum* Stämmen lagen die die IC₅₀-Werte für (**I**) bei 8,2 µM bzw. 24,0 µM und für (**VI**) bei 42,4 µM bzw. 92,1 µM. Betrachtet man die Struktur beider, so unterscheidet sich das 6'-Desmethylxanthohumol (**VI**) vom Xanthohumol (**I**) nur durch das Fehlen der Methylgruppe, die allen Anschein nach nicht maßgeblich für die Papain-inhibitorische Wirkung ist. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse der Hopfeninhaltsstoffe **I**, **II**, **V**, **VI** und **VII**, die vom Kooperationspartner in San Francisco gegenüber den parasitären Cystein-Proteasen Cruzain und Rhodesain erhalten worden sind. Nur das 6'-Desmethylxanthohumol **VI** war in der Lage, sowohl das Cruzain (89 %) als auch das Rhodesain (84 %) zu hemmen (Tabelle 12). Alle anderen genannten Substanzen hatten keinen nennenswerten Effekt. Für das Phloretin gibt es

keine Erklärung für die gute antiplasmodiale Aktivität an den beiden *P. falciparum* Stämmen (Tabelle 13). In dem Papain-Micro-Assay-Modell zeigte das Phloretin gegenüber der pflanzlichen Cystein-Protease eine Hemmung von 52,7 %. Inwieweit Phloretin gegenüber parasitären Cystein-Proteasen inhibitorisch wirksam ist, müsste an Falcipainen bestätigt werden.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, dass die antiplasmodiale Aktivität der getesteten Hopfenchalkone weder eindeutig mit ihren heminbindenden Eigenschaften, noch mit einer Cystein-Protease-Inhibitorischen zu korrelieren war, auch wenn vor einer abschließenden Beurteilung eine Überprüfung an den Falcipainen erfolgen müsste. Hinsichtlich einer Wirkung als Cystein-Protease-Inhibitor stellten Domínguez und Mitarbeiter im Jahr 2001 fest, dass zumindest für synthetische Chalkone die Möglichkeit als Falcipain-Inhibitor zu fungieren, nicht begründbar ist (Domínguez et al. 2001). Trotzdem ist zu vermuten, dass für den antiplasmodialen Effekt weitere, bisher unbekannte Wirkmechanismen mitverantwortlich sind.

5.1.10 Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Testmodelle, die den GSH-abhängigen Häm-Abbau und die Hämoglobinhydrolyse durch Inhibition einer Cystein-Protease simulieren sollten, konnten keine eindeutigen Resultate bezüglich der Wirkungsweise von Chalkon-Derivaten aus *Humulus lupulus* L., Cannabaceae, erzielen.

Li und Mitarbeitern überprüften 1995 die *in vitro* Aktivität von Chalkonen und ihren Derivaten an einem chloroquin-sensitiven und einem –resistenten *P. falciparum* Stamm, um die aktivsten Verbindungen einem Molecular-Modeling-Programm zu unterziehen, das Auskunft über die Bindungsweise von Chalkonen an Malaria verursachenden Cystein-Proteasen geben sollte. Eine ähnliche Studie wurde von Motta et al. (2006) vorgenommen, mit dem Ziel, die Wirkungsweise der Chalkone als Cystein-Protease-Inhibitoren im *P. falciparum* mittels Molecular-Design zu bestätigen.

Anhand der eigenen Ergebnisse bezüglich der Inhibition der pflanzlichen Cystein-Protease Papain und der an Cruzain und Rhodesain durchgeführten Tests, bleibt es fraglich, ob die antiplasmodiale Aktivität von Chalkonen und deren Derivaten tatsächlich über eine Hemmung von Cystein-Proteasen vermittelt wird.

In diesem Zusammenhang wäre es interessant, Chalkone und deren Derivate an Cystein-Proteasen zu testen und zu versuchen, einen Enzym-Inhibitor-Komplex zu kristallisieren, um die genaue Position des Inhibitors im Enzym und die Wechselwirkungen mit den Substratbindungstaschen der Protease analysieren zu können. Auf dieser Grundlage könnte man effektivere Inhibitoren für parasitäre Cystein-Proteasen entwickeln.

Eine Überprüfung an weiteren organell-lokalisierten Stoffwechselfunktionen im *P. falciparum* (Kapitel 1.4.2) wäre erforderlich, um schließlich beurteilen zu können, wo sich ihr wahrer Wirkungsort befindet.

Dazu wäre es nötig, weitere antiplasmodiale Naturstoffe, deren Wirkungsmechanismus nicht bekannt ist, systematisch hinsichtlich der unterschiedlichen Targets zu überprüfen. Ein weiterer Aspekt ist die Untersuchung von traditionellen Heilpflanzen bezüglich der Interaktionen mit chemisch synthetischen Anti-Malariamittel, wie sie erstmalig von Waako et al. (2005b) mit *Aspilia africana* vorgenommen wurde. Die so ermittelten Interaktionen könnten systematisch in einer Datenbank zusammengefasst werden und sinnvoll die Anti-Malaria-Therapie unterstützen.