

Table of contents

1	Einleitung	1
1.1	Malaria	1
1.1.1	Aktuelle Malaria-Wirkstoffe, Resistenzentwicklungen und neue Forschungsansätze	2
1.1.2	Protozoen der Gattung <i>Plasmodium</i>	3
1.1.3	Der Lebenszyklus von <i>Plasmodium</i>	4
1.1.4	Krankheitsbild (physiologische Folgen)	5
1.1.5	Hämoglobin-Abbau	6
1.2	Plasmepepsine	7
1.2.1	Selektivität	8
1.2.2	Aspartylproteasen	8
1.2.3	Plasmepepsin Inhibitoren	10
1.3	References	12
2	Aufgabenstellung	17
3	Assay, Kristallisation und Strukturbestimmung	19
3.1	Assay	19
3.2	Kristallisation und Strukturbestimmung	21
3.2.1	Kokristallisation von Plm II mit Pepstatin A	21
3.2.2	Kristallisation von Plm II mit Azabicyclo[2.2.1]Heptan-Derivaten	22
3.2.3	Kristallisation von Plm II mit Pyrrolidin-Derivaten	24
3.2.4	Kristallisation von Plm II mit Primaquin-Statin Kombinationsinhibitoren	25
3.2.5	Analyse der Proteinreinheit	26
3.3	References	29
4	Computer-aided Design and Synthesis of non-peptidic Plasmepepsin II and IV inhibitors	31
4.1	Abstract	31
4.2	Introduction	32
4.3	Results and Discussion	34
4.3.1	In silico evaluation of the core structure	34
4.3.2	Docking starting geometry for Plm IV	37
4.3.3	Optimization of the P1 and P2' residues	39
4.3.4	Analysis of the docked ligands	40
4.3.5	Synthesis and biological testing of the first design series	42
4.4	Chemical Synthesis	47

4.5	Summary and Conclusion	49
4.6	Experimental Section	50
4.6.1	Assays and K_i determinations	50
4.6.2	Homology model of Plm IV	50
4.6.3	Molecular Dynamics Simulation	51
4.6.4	Computational Docking.....	51
4.6.5	Comparison of protein subpockets.....	52
4.7	References	53
5	The Potential of P1 site alterations in peptidomimetic protease inhibitors as suggested by virtual screening and explored by the use of C-C-Coupling reagents	57
5.1	Abstract	57
5.2	Introduction.....	58
5.3	Results and Discussion.....	60
5.3.1	Virtual screening of the plasmepsin II S1 site and design of a norstatine library61	
5.3.2	Screening of inhibitors 10a-q against plasmepsin II, cathepsin D and HIV protease	63
5.3.3	Molecular dynamics simulations indicate adaptability of the S1 pocket	63
5.4	Conclusions.....	68
5.5	Experimental Section	69
5.5.1	Determination of inhibition constants toward plasmepsin II.....	69
5.5.2	Determination of inhibition constants toward cathepsin D.....	69
5.5.3	Virtual screening to select optimal occupancy of the S1 pocket of plasmepsin II69	
5.5.4	Molecular dynamics simulation	69
5.6	References	71
6	Pyrrolidine derivatives as Plasmepsin Inhibitors: Binding mode analysis assisted by Molecular Dynamics	75
6.1	Abstract	75
6.2	Introduction.....	76
6.3	Results and Discussion.....	76
6.3.1	Enzyme Inhibition Data	76
6.3.2	Computational binding mode generation.....	80
6.3.3	Molecular Dynamics Simulations.....	84
6.3.4	Putative binding mode generation for pyrrolidinedimethylene diamines.....	93
6.3.5	Relevance and implications for inhibitor design.....	94
6.4	Summary and conclusion	95
6.5	Materials and Methods.....	96

6.5.1	Assays and K_i determinations	96
6.5.2	Molecular Dynamics Simulation	96
6.6	References.....	98
7	Lead identification for the antimalarial target Plm by using Ftrees.....	101
7.1	Abstract	101
7.2	Introduction.....	102
7.3	Selection of the screening strategy.....	102
7.4	Results and discussion	103
7.4.1	Ftree similarity value at level X.....	103
7.4.2	Ftree value at level 0.....	104
7.4.3	Synthesis	106
7.4.4	Biological Evaluation.....	107
7.5	Summary and conclusion.....	110
7.6	Materials and methods	111
7.7	Literature	113
8	Strukturlösung von Prephenat Dehydratase aus <i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	115
8.1	Einleitung.....	115
8.1.1	Shikimat Biosyntheseweg.....	115
8.1.2	Prephenat Dehydratase.....	116
8.2	Aufgabenstellung	118
8.3	Kristallisation und Datensammlung von MjPDT.....	119
8.3.1	Kristallisationsoptimierung.....	119
	Erzeugung erster Kristalle.....	119
	Entstehung einer zweiten Kristallform	120
	Micro-seeding und Macro-seeding	120
	Kokristallisation.....	121
	Optimierung der Cryobedingungen	121
8.3.2	High Throughput Kristallisation.....	122
8.3.3	Gesammelte Datensätze	124
8.4	Strukturlösungsversuche durch Molekularen Ersatz.....	125
8.4.1	Sequenzalignment	125
8.4.2	Modelle für den Molekularen Ersatz	126
8.4.3	Molekularer Ersatz.....	127
8.5	Experimentelle Phasen via SeMet.....	128
8.5.1	Einfügen von Methioninen durch Mutation.....	128
8.5.2	Kristallisationsoptimierung.....	128

8.5.3	Gesammelte Datensätze	129
8.5.4	Strukturlösungsversuche mit HKL2map.....	130
8.6	Experimentelle Phasen via Schweratomderivate	132
8.6.1	Geeignete Schweratomderivate.....	132
8.6.2	Soakingbedingung-Optimierung.....	132
8.6.3	Druckbegasung mit Xenon	133
8.7	Zusammenfassung und Ausblick	134
8.8	Referenzen	135
9	Zusammenfassung.....	137
10	Anhang	147
	Danksagungen	147
	Erklärung.....	148
	Curriculum Vitae	149