

Antiplasmodiale Thioistreptonderivate – Proteasominhibitoren mit einem dualen Wirkmechanismus**

Sebastian Schoof, Gabriele Pradel,* Makoah N. Aminake, Bernhard Ellinger, Sascha Baumann, Marco Potowski, Yousef Najajreh, Marc Kirschner und Hans-Dieter Arndt*

Mit mehr als einer Million Todesfällen im Jahr ist die Tropenkrankheit Malaria weltweit bis heute eine der größten Bedrohungen für die Gesundheit des Menschen. Eine erfolgreiche Behandlung mit Chemotherapeutika wird durch häufige Wirkstoffresistenzen des Malariaparasiten *Plasmodium sp.* immer weiter erschwert.^[1] Um dieser Bedrohung entgegenzuwirken, werden herkömmliche Malariawirkstoffe wie Chinin, Mefloquin oder Artemisinin zunehmend in Kombinationen verabreicht.^[2] Zusätzlich werden kostengünstige Antibiotika wie Doxycyclin, Clindamycin oder Azithromycin eingesetzt.^[2,3] Dass diese Inhibitoren der bakteriellen Proteinbiosynthese auch gegen Malaria wirken, wird generell mit der großen Ähnlichkeit begründet, die bakterielle 70S-Ribosomen mit Ribosomen der Mitochondrien oder der Apicoplasten des eukaryotischen Parasiten aufweisen. In diesen Organellen wird dann die Proteintranslation lokal unterdrückt.^[3,4] Kennzeichnend für diese Aktivität ist ihre spät einsetzende antiplasmodiale Wirkung, die üblicherweise erst vier Tage nach der Infektion der roten Blutkörperchen eintritt.^[4b,5] Dieser so genannte „delayed death effect“ wird auf die Verteilung defekter Apicoplasten in die Tochter-Merogonien während der Replikation des erythrozytären Parasiten zurückgeführt.^[6]

Das leicht zugängliche Thioistrepton (**1**)^[7] wurde schon früh als sehr wirksames Antibiotikum mit starker Aktivität gegen Gram-positive Erreger erkannt.^[8] Es gehört zur großen Familie der Thiopeptidantibiotika,^[9] stark modifizierten makrocyclischen Peptidnaturstoffen, die über ribosomale Peptidbiosynthese erzeugt werden.^[10]

Thioistrepton blockiert die Translation in Bakterien, indem es fest an das GTPase-assoziierte Zentrum des 70S-Ribosoms bindet.^[11] Studien zur Wirkung von **1** in eukaryotischen Zellen zeigten Aktivitäten, die mit Immunmodulation^[12] und der Proliferation von Krebszellen^[13] verknüpft sind, sowie eine Inhibierung des Wachstums von *Plasmodium falciparum*.^[2,14] Es wurde gezeigt, dass **1** die Proteinbiosynthese im Apicoplasten unterdrückt.^[4b,14b,c,15] Anders als bei anderen ribosomalen Inhibitoren trat die Wirkung jedoch durch direktes Abtöten der Parasiten ein.^[4b] Ein „delayed death effect“ wurde für **1** nie beobachtet, die Gründe für die abweichenden Eigenschaften von Thioistrepton blieben jedoch unklar.^[4b] Wir berichten nun über semisynthetische Thioistreptonderivate mit erhöhter Wirksamkeit gegen *P. falciparum*, präsentieren erste Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und zeigen, dass die Aktivität eng mit der Inhibierung des 20S-Proteasoms zusammenhängt.^[16]

Um das Antimalariaprofil von Thioistrepton (**1**) detailliert untersuchen zu können und das Potenzial für mögliche Anwendungen abzuklären, benötigten wir einen Syntheszugang zu entsprechenden Derivaten. In Erweiterung früherer Studien zur Semisynthese von Thioistrepton^[11d] fanden wir, dass der konfiguratив labile Thiazolinring^[17] von **1–3** (Ring C) selektiv zum Thiazol oxidiert werden kann (Schema 1), was die Stabilität der Verbindungen erhöht. Im Anschluss untersuchten wir eine Reihe lipophiler und hydrophiler Derivate im menschlichen Malariaerreger *P. falciparum*. Diese ersten Tests ließen darauf schließen, dass hydrophobe Verlängerungen des Dehydroaminosäure-Terminus die antiplasmodialen Eigenschaften verbessern. Daraufhin wurde eine fokussierte Sammlung von Zielverbindungen synthetisiert, wobei kombinierte Verkürzungen des Terminus, Oxidation und Additionen lipophiler Thiole an Dehydroaminosäuren zum Einsatz kamen (Schema 1, Tabelle 1). Alle Verbindungen wurden in guter Ausbeute erhalten, mithilfe präparativer HPLC gereinigt und mit NMR-Spektroskopie, HPLC und HR-MS charakterisiert (siehe Hintergrundinformationen).

Die Verbindungen **1–14** wurden auf die Wachstumsinhibierung von *P. falciparum* hin untersucht. Dazu wurden synchronisierte Ringstadien bei einer Parasitämie von 1 % getestet, und die Lebensfähigkeit der Parasiten wurde über die Bestimmung der Aktivität der für *Plasmodium* spezifischen Lactatdehydrogenase verfolgt (siehe Hintergrundinforma-

[*] S. Schoof, B. Ellinger, S. Baumann, M. Potowski, Prof. Dr. Y. Najajreh,^[†] Dr. H.-D. Arndt
Technische Universität Dortmund, Fakultät Chemie
Otto-Hahn-Straße 6, 44221 Dortmund (Deutschland)
und
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-133-2498
E-Mail: hans-dieter.arndt@mpi-dortmund.mpg.de

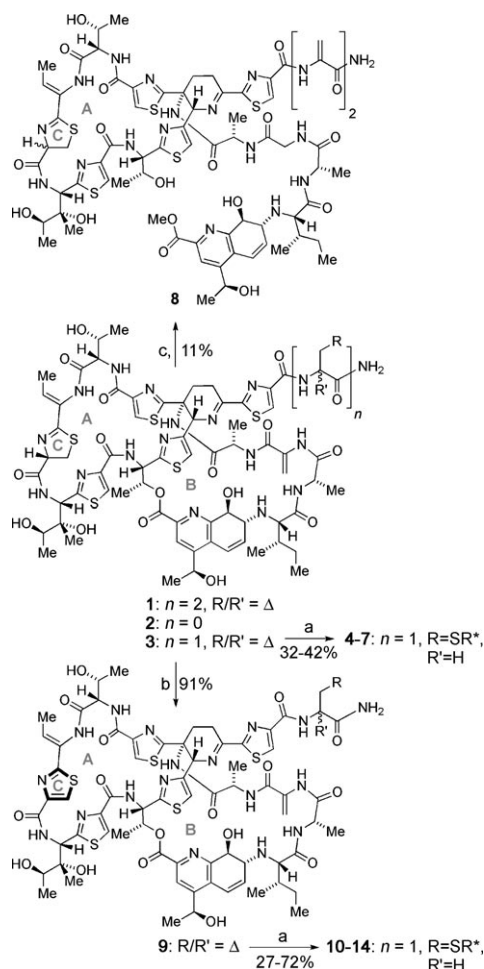
Dr. G. Pradel, M. N. Aminake
Universität Würzburg, Zentrum für Infektionsforschung
Josef-Schneider-Straße 2/D15, 97080 Würzburg (Deutschland)
Fax: (+49) 931-312-578
E-Mail: gabriele.pradel@mail.uni-wuerzburg.de

Dr. M. Kirschner
Universität Würzburg, Institut für Virologie und Immunbiologie
Versbacher Straße 7, 97078 Würzburg (Deutschland)

[†] Permanente Adresse:
Faculty of Pharmacy, Al-Quds University, POB 20002, Jerusalem

[**] Diese Arbeit wurde von der DFG (Emmy-Noether Nachwuchsgruppen an H.-D.A. und G.P.; SFB630 und IRTG1522 an G.P.), dem Fonds der Chemischen Industrie (an H.-D.A.) und dem DAAD (an Y.N.) gefördert. Wir danken L. Sologub für Unterstützung im Labor sowie Dr. M. Kaiser und MSc J. Clerc (CGC Dortmund) für Materialien und Diskussionen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200906988> zu finden.



Schema 1. Thioestrepton (**1**) und Derivate **2–14**. Wichtige Ringe sind markiert. Reagentien und Bedingungen: a) HSR* (1.2 Äquiv.), NEt₃ (5 Äquiv.), Trifluorethanol/H₂O (2:1), pH 9, 2–48 h; b) **3**, CBrCl₃ (2 Äquiv.), DBU (1.1 Äquiv.), THF, 0–20°C, 3 h; c) **1**, NaOMe (0.33 Äquiv.), MeOH/CHCl₃ (2:1), 0–20°C, 6 h. Δ = Methylen, DBU = 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, THF = Tetrahydrofuran.

tionen).^[18] Übereinstimmend mit früheren Berichten^[4b,14a] fanden wir in unseren Tests, dass **1** das Wachstum der Parasiten mit einem IC₅₀-Wert von 10 μM unterband. Es wurde

Tabelle 1: Synthese der Thioestreptonderivate **2–14** und ihre antiplasmodiale Wirkung (IC₅₀ nach Verfolgung über 72 h).

Verb.	R* ^[a]	Ring C	Ausb. [%]	IC ₅₀ [μM]
1	n.v.	Thiazolin	—	10 ± 2.0
2	n.v.	Thiazolin	— ^[11d]	23 ± 1.1
3	n.v.	Thiazolin	— ^[11d]	19 ± 4.1
4	CH ₂ CHNACCO ₂ Me	Thiazolin	— ^[11d]	inaktiv
5	(CH ₂) ₄ H	Thiazolin	42	1.3 ± 0.5
6	(CH ₂) ₁₆ H	Thiazolin	42	34 ± 10
7	(CH ₂) ₈ H	Thiazolin	— ^[11d]	4.3 ± 1.2
8	n.v.	Thiazolin	11	inaktiv
9	n.v.	Thiazol	91	3.1 ± 0.3
10	CHMe ₂	Thiazol	27	3.5 ± 0.4
11	(CH ₂) ₄ OH	Thiazol	54	7.5 ± 1.9
12	(CH ₂) ₄ H	Thiazol	51	2.5 ± 0.4
13	CH ₂ Ph	Thiazol	71	2.6 ± 1.3
14	(CH ₂) ₈ H	Thiazol	35	1.2 ± 0.4

[a] n.v. = nicht vorhanden.

kein „delayed death effect“ beobachtet (Daten nicht gezeigt). Unter den Substituenten R* schien ein Optimum bei mittlerer Kettenlänge zu liegen (**5** und **14**). Längere (**6**), sterisch anspruchsvolle (**10** und **13**) und polare Verlängerungen (**11**) waren weniger effektiv. Die Verbindung **8** mit geöffnetem B-Ring^[17] war inaktiv (Diastereomergemisch im Ring C). Insbesondere waren **5** und **14** zehnfach potenter als die Stammverbindung **1**. Es fiel auf, dass das Aktivitätsmuster vom antibakteriellen Profil abwich.^[11d] Lipophile Seitenketten erhöhten die Wirkung gegen *P. falciparum*, wogegen diese Modifikation die antibakterielle Wirksamkeit verminderte (bis zu 500fach).^[11d] Dagegen setzten Abwandlungen, die Polarität in die Verbindung einführten, die antiplasmodiale Wirksamkeit herab (z. B. **4**), was jedoch das antibakterielle Potenzial nicht beeinflusste. Wäre nur das Ribosom des Apicoplasten in der Wirkmechanismus eingebunden, sollte man wesentlich ähnlichere Wirkprofile erwarten können. Zusammen mit dem fehlenden „delayed death effect“ ließen diese Daten stark darauf schließen, dass außer dem Ribosom noch weitere Zielstrukturen zum Wirkmechanismus von Thiopeptiden in *P. falciparum* beitragen. Diese Annahme sollte dann folgerichtig ebenso für andere eukaryotische Zellen gelten.^[12,13]

Um Hinweise auf zusätzliche Zielstrukturen zu erlangen, führten wir zellmikroskopische Studien mit fluoreszenzmarkiertem Thioestrepton durch.^[11d] Markierte kleine Moleküle waren schon früher genutzt worden, um die Lokalisierung von Zielstrukturen in Zellen zu untersuchen.^[19] Wegen der schlechten Auflösbarkeit von subzellulären Strukturen der *Plasmodium*-Parasiten (Durchmesser der Parasiten 1–4 μm) in den innererythrozytischen Stadien setzten wir für diese orientierende Studie BSC-1-Zellen ein. Die wasserlösliche, fluoreszenzmarkierte Thioestreptonsonde^[11d] erzeugte in fixierten Zellen charakteristische Markierungsmuster, die nach dem Waschen erhalten blieben (Abbildung 1). Die Anfärbung konnte mit **1** kompetitiv unterdrückt werden, was klar eine spezifische Bindung anzeigte. Von den subzellulären Strukturen wurden besonders die Mitochondrien markiert (Abbildung 1a–c), was durch Gegenfärbung mit einem Marker für Mitochondrien gezeigt werden konnte. Damit steuern bicyclische Thiopeptidantibiotika in der eukaryotischen Zelle die Thioestrepton-empfindlichen 55S-Ribosomen der Mitochondrien an,^[20] die Ähnlichkeiten zu den bakteriellen 70S-Ribosomen und den Ribosomen des Apicoplasten in *Plasmodium* aufweisen.^[21] Eine Bindung der Sonde an die 80S-Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums wurde nicht beobachtet.

Darüber hinaus stellten wir eine leicht körnige Anfärbung innerhalb des Zytoplasmas und des Zellkerns (ohne Nucleoli) fest, die nicht zu einer Organellen-assoziierten Verteilung passt. Nach Gegenfärbexperimenten mit Antikörpern für verschiedene Zellbestandteile fanden wir, dass gegen das 20S-Proteasom gerichtete Antikörper ein höchst ähnliches Anfärbeprofil zeigen (Abbildung 1d–f). Die Bindung der markierten Sonde wurde durch Fluoreszenzpolarisationsmessungen mit 20S-Proteasomen aus Hefe bestätigt, die eine scheinbare Dissoziationskonstante von (1.75 ± 0.35) μM ergaben (siehe Hintergrundinformationen).

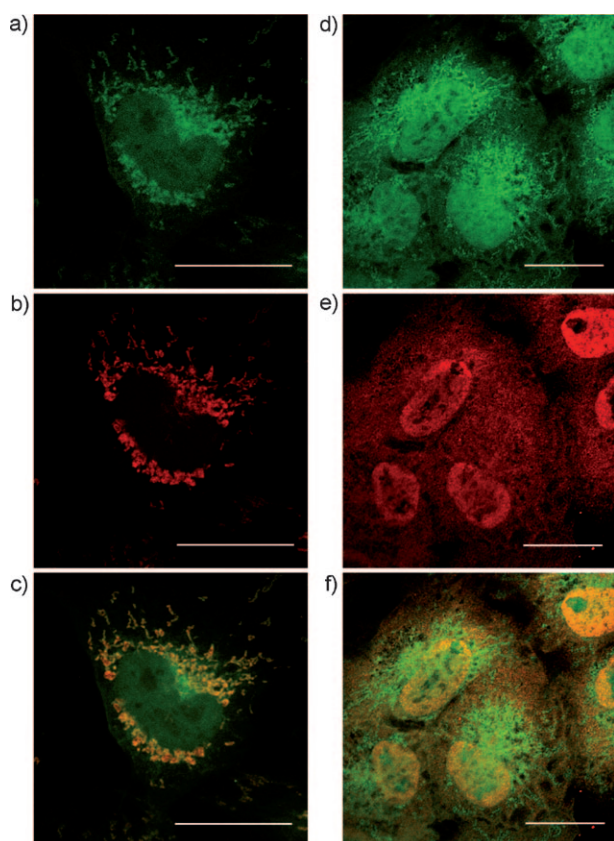


Abbildung 1. Lokalisierung von Thiostrepton in fixierten BSC-1-Zellen durch Immunfluoreszenzmikroskopie. a) Fluoresceinisothiocyanat-(FITC)-Thiostrepton-markierte Zellen (grün). b) Mit MitoTracker-Rot (Invitrogen) markierte Zellen (rot). c) Die Überlagerung von (a) und (b) belegt die Bindung von **1** an die Mitochondrien (gelbe Bereiche). d) FITC-Thiostrepton-markierte Zellen (grün). e) Mit einem Anti-20S-Proteasom-Antikörper immungefärbte Zellen (rot). f) Die Überlagerung von (d) und (e) zeigt starke Kolokalisierung von **1** mit dem 20S-Proteasom (gelbe Bereiche). Maßstab = 10 µm.

20S-Proteasomen sind in Eukaryoten hochkonserviert und weisen drei proteolytisch aktive Zentren mit unterschiedlicher Substratspezifität auf.^[22] Diese Zentren zeigen Chymotrypsin-, Caspase- und Trypsinaktivität, und die meisten nichtpeptidischen Inhibitoren blockieren bevorzugt die erstgenannte Aktivität.^[23] Die Thiostreptonderivate wurden daher in einem fluorogenen Assay mit 20S-Proteasomen aus humanen Erythrocyten und mit Peptidsubstraten, die für die einzelnen Zentren selektiv sind, weiter validiert. Erste Übersichtstests von **1–14** zeigten, dass nur die Caspase- und Chymotrypsinaktivitäten beeinflusst werden (Abbildung 2a). Daher wurde die Trypsinaktivität nicht weiter untersucht.

Anschließend bestimmten wir Inhibitionskonstanten unter optimierten Assaybedingungen (Abbildung 2b, Tabelle 2, Hintergrundinformationen) und fanden IC_{50} -Werte im niederen mikro- bis nanomolaren Bereich. Bemerkenswerterweise waren einige Derivate deutlich aktiver als **1**. Addukte von lipophilen Alkylketten von vier bis acht Methylengruppen erwiesen sich als besonders förderlich für die inhibitorische Aktivität (**5/12**, **7/14**), wobei **5** 40-mal potenter als Thiostrepton ist (0.1 µM Caspase; 0.3 µM Chymotrypsin). Die

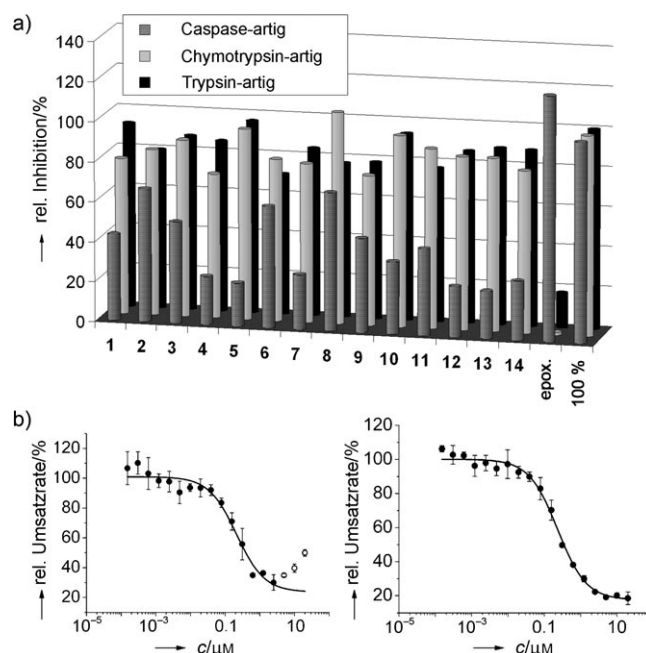


Abbildung 2. Inhibition von 20S-Proteasomen aus humanen Erythrocyten. a) Testierung von **1–14** auf die Chymotrypsin-, Caspase- und Trypsinaktivität bei $c = 1$ µM (epox. = Epoxomycin, 0.1 µM); b) Inhibitionskurven für **14** (links: Chymotrypsin-, rechts: Caspaseaktivität).

Tabelle 2: Inhibition der Chymotrypsin- und Caspaseaktivität.

Verb.	$IC_{50}(\text{Chym.})$ [µM]	$IC_{50}(\text{Casp.})$ [µM]
1	5.2 ± 1.0	3.8 ± 2.4
2	1.9 ± 0.1	inaktiv
3	4.5 ± 1.1	inaktiv
4	1.1 ± 0.1	0.4 ± 0.1
5	0.32 ± 0.05	0.1 ± 0.05
7	0.2 ± 0.05	0.2 ± 0.05
8	15 ± 1.6	48 ± 38
9	3.7 ± 0.9	1.2 ± 0.1
12	1.2 ± 0.3	0.4 ± 0.1
14	0.2 ± 0.05	0.2 ± 0.1
MG132	0.02 ± 0.01	1.3 ± 0.2

ringgeöffnete Verbindung **8** ist nur schwach aktiv, was die Bedeutung eines intakten A/B-Ringsystems für die Aktivität des Wirkstoffs hervorhebt. Überraschenderweise beobachteten wir in vielen Fällen (z. B. **4**, **5**, **9**, **12**) eine stärkere Inhibition der Caspase- als der Chymotrypsinaktivität (Abbildung 2 und Tabelle 2). Solch ein Profil ist unter den bisher bekannten Kleinmolekülinhibitoren selten.^[23] Für die Chymotrypsinaktivität lag die verbleibende Aktivität bei voller Dosis bei 10–20 %, während die Caspaseaktivität nur auf 40–50 % zurückging. Dies lässt auf das Vorliegen eines partiell antagonistischen oder allosterischen Wirkmechanismus schließen.

Die Oxidation des Thiazolinsrings C des Thiostreptongerüsts führt in vitro nur zu geringen Unterschieden in der Wirkung. Die höhere antiplasmodiale Aktivität der oxidierten Derivate in lebenden Zellen (siehe **3/9**, **7/14**) könnte die erhöhte Stabilität der Verbindungen widerspiegeln. Ebenso

bestimmten wir für die hydrophile Verbindung **4** unterschiedliche inhibitorische Aktivität: Diese Verbindung war im enzymatischen Test recht wirksam (Tabelle 2), hatte jedoch keinen Einfluss auf das Plasmodienwachstum. Diese Unterschiede mögen auf nicht ausreichende Aufnahme in die Zellen zurückgehen. Insgesamt folgen die Enzyminhibitionsdaten klar der Aktivität gegen *P. falciparum* in den Zellexperimenten, was auf eine kausale Verknüpfung der Verbindungsaktivität mit der Proteasominhibierung hinweist.

Das Proteasom ist für den regulierten Abbau aller Proteine in eukaryotischen Zellen zuständig und in allen Lebensstadien des Malariaparasiten vorhanden.^[24] Proteasominhibitoren wurden bereits als Antimalariawirkstoffe untersucht,^[25,26] und es wurde gezeigt, dass Epoxomycin und Bortezomib das Wachstum von *P. falciparum* durch direktes Abtöten unterbinden, also bereits während des ersten Replikationszyklus.^[27] In-vitro- und In-vivo-Daten von **1**^[4b,14,15] lassen darauf schließen, dass Thioistreptonderivate in den Parasiten eindringen und direkt auf den wachsenden Erreger einwirken.

Im Menschen wurden Proteasominhibitoren^[16] als anti-inflammatorische^[28] und Antitumorstoffkandidaten^[29] sowie im Zusammenhang mit Schlaganfallbehandlung,^[30] Knochenbildung^[31] und neurotropher Aktivität erforscht.^[32] Zwar ist Bortezomib als Antitumorstoff für den Menschen zugelassen,^[29b,33] allerdings wird für Proteasominhibitoren oft eine recht hohe Toxizität festgestellt. Dagegen zeigten alle von uns untersuchten Verbindungen (**1–14**) keine offensichtliche Zytotoxizität in WST-Tests und beeinflussten auch nicht die Integrität von Erythrozyten (Daten nicht gezeigt).^[14b]

Wir haben hier gezeigt, dass die Oxidation eines Thiazolins und die Verlängerung des Terminus von Thioistrepton (**1**) zu Verbindungen mit hoher Wirksamkeit gegen *P. falciparum* führt. Wir stellten fest, dass die antiplasmodiale Aktivität deutlich mit der Inhibierung des 20S-Proteasoms korreliert. Die neuen Inhibitoren wirken zudem nicht toxisch in humanen Zellen und inhibieren bevorzugt die Caspaseaktivität der $\beta 1$ -Untereinheit des Proteasoms, ein für nicht peptidbasierte Inhibitoren unüblicher Wirkmechanismus.^[22,34] Diese Daten lassen darauf schließen, dass in *P. falciparum* sowohl die Ribosomen des Apicoplasten^[4b,14b,c,15] als auch das Proteasom parallel angesteuert werden, was erklärt, warum kein „delayed death effect“ beobachtet wird. Solch ein dualer Wirkmechanismus sollte Thioistreptonderivate intrinsisch robuster gegen Resistenzentwicklungen machen als Inhibitoren, die nur gegen einzelne Zielstrukturen wirken. Anders als bei menschlichen Zellen oder Hefe ist die Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems in *Plasmodium* zurzeit noch nicht gut beschrieben, was weiterführende Studien notwendig macht. Seine Ähnlichkeit zu dem anderer Eukaryoten^[24–27] legt aber nahe, dass es für die Lebensfähigkeit und Entwicklung der Parasiten essenziell sein muss. Unsere Thiopeptide sind vielversprechende nicht-toxische Gerüste für die Auffindung von Proteasominhibitoren^[35] und weisen damit auch neue Wege zur Entwicklung von Antimalariawirkstoffen.

Eingegangen am 11. Dezember 2009
Online veröffentlicht am 31. März 2010

Stichwörter: Antimalariawirkstoffe · Naturstoffe · Proteasom · Thiopeptide · Wirkstoff-Forschung

- [1] T. N. C. Wells, P. L. Alonso, W. E. Gutteridge, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, 8, 879–891.
- [2] M. Schlitzer, *ChemMedChem* **2007**, 2, 944–986.
- [3] S. Sato, R. J. M. Wilson in *Malaria: Drugs, Disease and Post-Genomic Biology* (Hrsg.: D. J. Sullivan, S. Krishna), Springer, Berlin, **2005**, S. 251–273.
- [4] a) S. A. Ralph, G. G. van Dooren, R. F. Waller, M. J. Crawford, M. J. Fraunholz, B. J. Foth, C. J. Tonkin, D. S. Roos, G. I. McFadden, *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, 2, 203–216; b) C. D. Goodman, V. Su, G. I. McFadden, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2007**, 152, 181–191.
- [5] a) A. A. Divo, T. G. Geary, J. B. Jensen, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, 27, 21–27; b) M. E. Fichera, M. K. Bhopale, D. S. Roos, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, 39, 1530–1537.
- [6] E. L. Dahl, P. J. Rosenthal, *Trends Parasitol.* **2008**, 24, 279–284.
- [7] a) J. F. Pagano, M. J. Weinstein, H. A. Stout, R. Donovan, *Antibiot. Ann.* **1955/1956**, 554; b) J. Vandeputte, J. D. Dutcher, *Antibiot. Ann.* **1955/1956**, 560; c) B. A. Steinberg, W. P. Jambor, L. O. Suydam, A. Soriano, *Antibiot. Ann.* **1955/1956**, 562; d) W. F. Jones, M. Finland, *Antibiot. Chemother.* **1958**, 8, 387; e) A. H. Kutscher, L. Seguin, R. M. Rankow, J. D. Piro, *Antibiot. Chemother.* **1958**, 8, 576; f) B. Anderson, D. C. Hodgkin, M. A. Viswamitra, *Nature* **1970**, 225, 233.
- [8] Siehe z. B.: G. H. Nesbitt, P. R. Fox, *Vet. Med. Small Anim. Clin.* **1981**, 76, 535–538.
- [9] a) M. C. Bagley, J. W. Dale, E. A. Merritt, X. Xiong, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 685–714; b) R. A. Hughes, C. J. Moody, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 8076–8101; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 7930–7954.
- [10] Eine kurze Übersicht: H.-D. Arndt, S. Schoof, J.-Y. Lu, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 6900–6904; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6770–6773.
- [11] a) H. R. A. Jonker, S. Ilin, S. K. Grimm, J. Wöhnert, H. Schwalbe, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 441–454; b) J. M. Harms, D. N. Wilson, F. Schlünzen, S. R. Connell, T. Stachelhaus, Z. Zaborowska, C. M. T. Spahn, P. Fucini, *Mol. Cell* **2008**, 30, 26–38; c) S. Baumann, S. Schoof, S. D. Harkal, H.-D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5664–5666; d) S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, H.-D. Arndt, *ChemBioChem* **2009**, 10, 242–245.
- [12] M. Ueno, S. Furukawa, F. Abe, M. Ushioda, K. Fujine, S. Johki, H. Hatori, J. Ueda, *J. Antibiot.* **2004**, 57, 590–596.
- [13] a) K. Jounghee, WO2002066046, **2002**; b) K. C. Nicolaou, M. Zak, S. Rahimpour, A. A. Estrada, S. H. Lee, A. O’Brate, P. Giannakakou, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15042–15044; c) B. D. Bowling, N. Doudican, P. Manga, S. J. Orlow, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2008**, 63, 37–43; d) U. G. Bhat, P. A. Zipfel, D. S. Tyler, A. L. Gartel, *Cell Cycle* **2008**, 7, 1851–1855.
- [14] a) G. A. McConkey, M. J. Rogers, T. F. McCutchan, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 2046–2049; b) M. Sullivan, J. Li, S. Kumar, M. J. Rogers, T. F. McCutchan, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, 109, 17–23; c) S. Chaubey, A. Kumar, D. Singh, S. Habib, *Mol. Microbiol.* **2005**, 56, 81–89.
- [15] a) B. Clough, M. Strath, P. Preiser, P. Denny, I. R. Wilson, *FEBS Lett.* **1997**, 406, 123–125; b) M. J. Rogers, Y. V. Bukhman, T. F. McCutchan, D. E. Draper, *RNA* **1997**, 3, 815–820.
- [16] Übersichten: a) O. Coux, K. Tanaka, A. L. Goldberg, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 801–847; b) D. Voges, P. Zwickl, W. Baumeister, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 1015–1068; c) L. Borissenko, M. Groll, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 687–717; d) M. Verdoes, B. I. Florea, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 3301–3313; e) A. J. Marques, R. Palanimurugan

- gan, A. C. Matias, P. C. Ramos, R. J. Dohmen, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1509–1536.
- [17] S. Schoof, H.-D. Arndt, *Chem. Commun.* **2009**, 7113–7115.
- [18] a) M. T. Makler, D. J. Hinrichs, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1993**, *48*, 1485–1489; b) M. T. Makler, J. M. Ries, J. A. Williams, J. E. Bancroft, R. C. Piper, B. L. Gibbins, D. J. Hinrichs, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1993**, *48*, 739–741.
- [19] Einige Beispiele: a) E. Wulf, A. Deboben, F. A. Bautz, H. Faulstich, T. Wieland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 4498–4502; b) J. Zhang, R. E. Campbell, A. Y. Ting, R. Y. Tsien, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 906–918; c) M. D. Alexander, M. D. Burkart, M. S. Leonard, P. Portonovo, B. Liang, X. Ding, M. M. Joullie, B. M. Gullledge, J. B. Aggen, A. R. Chamberlin et al., *ChemBioChem.* **2006**, *7*, 409–416; d) Y. Kotake, K. Sagane, T. Owa, Y. Mimori-Kiyosue, H. Shimizu, M. Uesugi, Y. Ishihama, M. Iwata, Y. Mizui, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 570–575.
- [20] L. Zhang, N. C. Ging, T. Komoda, T. Hanada, T. Suzuki, K. Watanabe, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 6423–6427.
- [21] T. W. O'Brien, *IUBMB Life* **2003**, *55*, 505–513.
- [22] A. F. Kisselev, A. Callard, A. L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 8582–8590.
- [23] L. Borissenko, M. Groll, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 687–717.
- [24] B. Mordmüller, R. Fendel, A. Kreidenweiss, C. Gille, R. Hurwitz, W. G. Metzger, J. F. J. Kun, T. Lamkemeyer, A. Nordheim, P. G. Kremsner, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2006**, *148*, 79–85.
- [25] a) S. M. Gantt, J. M. Myung, M. R. S. Briones, W. D. Li, E. J. Corey, S. Omura, V. Nussenzweig, P. Sinnis, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 2731–2738; b) C. Lindenthal, N. Weich, Y.-S. Chia, V. Heussler, M.-Q. Klinkert, *Parasitology* **2005**, *131*, 37–44.
- [26] A. Kreidenweiss, P. G. Kremsner, B. Mordmüller, *Malar. J.* **2008**, *7*, 187.
- [27] a) J. M. Reynolds, K. El Bissati, J. Brandenburg, A. Günzl, C. Ben Mamoun, *BMC Clin. Pharmacol.* **2007**, *7*, 13; b) wir haben diese Aktivität in unseren In-vitro-Tests reproduziert und fanden IC₅₀-Werte von (30 ± 1) und (50 ± 25) nM für Epoxomycin bzw. MG132.
- [28] L. Meng, R. Mohan, B. H. B. Kwok, M. Elofsson, N. Sin, C. M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10403–10408.
- [29] a) L. Meng, B. H. B. Kwok, N. Sin, C. M. Crews, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2798–2801; Übersichten: b) J. Adams, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 349–360; c) R. Z. Orłowski, D. J. Kuhn, *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1649–1657.
- [30] B. J. Phillips, A. J. Williams, J. Adams, P. J. Elliott, F. C. Tortella, *Stroke* **2000**, *31*, 1686–1693.
- [31] I. R. Garrett, D. Chen, G. Gutierrez, M. Zhao, A. Escobedo, G. Rossini, S. E. Harris, W. Gallwitz, K. B. Kim, S. Hu et al., *J. Clin. Invest.* **2003**, *111*, 1771–1782.
- [32] J. Hines, M. Groll, M. Fahnestock, C. M. Crews, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 501–512.
- [33] a) B. S. Moore, A. S. Eustaquio, R. P. McGlinchey, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 434–440; b) M. S. Raab, K. Podar, I. Breitkreutz, P. G. Richardson, K. C. Anderson, *Lancet* **2009**, *374*, 324–339.
- [34] a) J. Myung, K. B. Kim, K. Lindsten, N. P. Dantuma, C. M. Crews, *Mol. Cell* **2001**, *7*, 411–420; b) A. F. Kisselev, M. Garcia-Calvo, H. S. Overkleeft, E. Peterson, M. W. Pennington, H. L. Ploegh, N. A. Thornberry, A. L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35869–35877; c) P. F. van Swieten, E. Samuel, R. O. Hernández, A. M. C. H. van den Nieuwendijk, M. A. Leeuwenburgh, G. A. van der Marel, B. M. Kessler, H. S. Overkleeft, A. F. Kisselev, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3402–3405.
- [35] U. G. Bhat, M. Halasi, A. L. Gartel, *PLoS One* **2009**, *4*, e6593.