

Aus der Abteilung Medizinische Mikrobiologie  
(Prof. Dr. med. U. Groß)  
im Zentrum Hygiene und Humangenetik  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Inhibierung der *Toxoplasma-gondii*-Replikation durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette**

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Britta Naujoks**  
aus  
Strausberg

Göttingen 2008

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Groß

2. Berichterstatter/in:

3. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

## Inhaltsverzeichnis

<b>Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen und Formeln.....</b>	<b>5</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>7</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>10</b>
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	10
1.2 Der Lebenszyklus von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	11
1.3 Medizinische Bedeutung.....	14
1.3.1 Infektion des Immunkompetenten.....	15
1.3.2 Pränatale Infektion.....	15
1.3.3 Infektion bei Immunsuppression.....	17
1.3.4 Aktuelle Therapien.....	17
1.3.5 Angriffspunkte der aktuellen Therapeutika.....	19
1.4 Aufbau und Funktion der Atmungskette.....	22
1.5 Mitochondrien von Parasiten als Angriffspunkte für Chemotherapeutika.....	23
1.6 Mitochondriale Atmungskette und oxidative Phosphorylierung in <i>Toxoplasma gondii</i> .....	27
1.7 Ziele dieser Arbeit.....	29
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>31</b>
2.1 Material.....	31
2.1.1 Geräte.....	31
2.1.2 Medien und Verbrauchsmaterial in der Zellkultur.....	32
2.1.3 Zelllinien.....	33
2.1.4 Chemikalien und Reagenzien.....	34
2.1.5 Filter.....	34
2.1.6 Medikamente.....	34
2.2 Methoden.....	35
2.2.1 Zellkultur.....	35
2.2.2 Wachstumsassays.....	37
2.2.3 Bestimmungen und Berechnungen.....	45
2.2.4 Datenverarbeitung.....	47
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
3.1 HDQ inhibiert die Replikation verschiedener <i>T. gondii</i> -Stämme in Kurzzeitversuchen (24-30 h p.i.): ein Vergleich mit Hilfe der IC 50%.....	48
3.1.1 IC 50%-Ermittlung durch Bestimmung der durchschnittlichen Parasitenzahl pro Vakuole im Zählassay.....	48
3.1.2 Bestimmung der Hemmwirkung von HDQ im lacZ-Assay.....	51
3.1.3 Tabellarische Zusammenstellung der IC 50%-Daten.....	53
3.2 HDQ-Inhibition im Langzeitversuch.....	54
3.2.1 Bestimmung der Parasitenreplikation nach HDQ-Behandlung im Zeitraum von 0-96 h p.i. ....	54
3.2.2 Einfluss von Mediumwechsel unter erneuter HDQ-Zugabe auf die Parasitenreplikation im Langzeitversuch.....	56
3.3 HDQ-Inhibition in UPRT-Defizienzmutanten.....	58

3.4	Die Länge der Alkyl-Seitenkette ist entscheidend für die Hemmung von <i>T. gondii</i> durch die 1-Hydroxy-2-Alkyl-4(1)Quinolon- Derivate C6 und C12 (HDQ) .....	63
3.5	Untersuchungen zum Synergismus von HDQ mit anderen Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette .....	65
3.5.1	HDQ und Atovaquon zeigen in Genotyp-II- <i>T. gondii</i> -Stämmen einen Synergismus .....	65
3.5.2	Inhibition der <i>T. gondii</i> -Replikation unter gleichzeitiger Gabe von HDQ und Antimycin A .....	68
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>70</b>
4.1	HDQ inhibiert das Wachstum verschiedener <i>T. gondii</i> -Genotypen .....	70
4.2	Synergismus zwischen HDQ und anderen Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette .....	73
4.3	UPRT-Defizienz in <i>Toxoplasma gondii</i> führt zu einer HDQ-Hypersensitivität .....	74
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>81</b>

## Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen und Formeln

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Ultrastruktur eines <i>Toxoplasma-gondii</i> -Tachyzoiten .....	11
Abbildung 1.2 Lebenszyklus von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	12
Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette .....	23
Abbildung 1.4 Schematische Darstellung von Atovaquon.....	26
Abbildung 1.5 Schematische Darstellung von HDQ .....	29
Abbildung 2.1 Phasenkontrastmikroskopische Darstellung von <i>T. gondii</i> .....	40
Abbildung 2.2 LacZ-Assay zur Bestimmung der Sensitivität von <i>T. gondii</i> gegenüber HDQ .....	44
Abbildung 2.3 Regressionsanalyse zur Bestimmung der IC 50% für HDQ bei RH- TATi.....	46
Abbildung 3.1 Bestimmung der Sensitivität von HDQ bei RH-TATi und RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ .....	49
Abbildung 3.2 Bestimmung der Sensitivität von HDQ bei ME49 und ME49/Atv <sup>r</sup> ..	50
Abbildung 3.3 Darstellung der IC 50% für HDQ in nM $\pm$ SE verschiedener <i>T. gondii</i> - Stämme.....	51
Abbildung 3.4 LacZ-Assay bei RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ.....	52
Abbildung 3.5 Testung der Sensitivität von HDQ bei RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ im lacZ- Assay .....	53
Abbildung 3.6 Wirkung von HDQ auf die <i>T. gondii</i> -Replikation im Langzeitversuch im Zähl assay.....	55
Abbildung 3.7 Wirkung von HDQ auf die <i>T. gondii</i> -Replikation im Langzeitversuch im lacZ-Assay .....	56
Abbildung 3.8 Wirkung von HDQ auf die <i>T. gondii</i> -Replikation im Langzeitversuch unter erneuter HDQ-Zugabe und Mediumwechsel alle 24 h .....	57
Abbildung 3.9 Vergleich der HDQ-Inhibition bei UPRT-exprimierenden Parasiten und <i>uprt</i> -Deletionsmutanten.....	59
Abbildung 3.10 UPRT-Defizienz führt zu einer HDQ-Hypersensitivität beim Langzeitversuch im Zähl assay .....	60

Abbildung 3.11 UPRT-Defizienz führt zu einer HDQ-Hypersensitivität beim Langzeitversuch im lacZ-Assay .....	61
Abbildung 3.12 Abhängigkeit der Empfindlichkeit von <i>T. gondii</i> für zwei 1- Hydroxy-2-Alkyl-4(1)Quinolon-Derivate im Zählassay .....	64
Abbildung 3.13 Abhängigkeit der Empfindlichkeit von <i>T. gondii</i> für zwei 1- Hydroxy-2-Alkyl-4(1)Quinolon-Derivate im lacZ-Assay .....	64
Abbildung 3.14 Synergismus von HDQ und Atovaquon bei Genotyp-I- und -II- <i>T. gondii</i> -Stämmen .....	67
Abbildung 3.15 Zusammenfassender Vergleich der IC 50% für Atovaquon und HDQ als Einzelbehandlung sowie in Kombination bei <i>T. gondii</i> .....	68
Abbildung 4.1 Darstellung möglicher Angriffspunkte von Inhibitoren in <i>T. gondii</i> .	78

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 Inhibitorische Konzentrationen 50% für HDQ bei <i>T. gondii</i> in Kurzzeitversuchen.....	54
Tabelle 3.2 Numerischer Vergleich der Zählassays von UPRT-exprimierenden RH- Stämmen mit <i>uprt</i> -Deletionsmutanten in Bezug auf die Sensitivität gegenüber HDQ über 96 h .....	62
Tabelle 3.3 Numerischer Vergleich der lacZ-Assays eines UPRT-exprimierenden RH-Stammes mit einer <i>uprt</i> -Deletionsmutante in Bezug auf die Sensitivität gegenüber HDQ über 96 h .....	62
Tabelle 3.4 Vergleich der IC 50% zweier 1-Hydroxy-2-Alkyl-4(1)Quinolon-Derivate mit unterschiedlicher Länge der Alkyl-Seitenkette.....	63
Tabelle 3.5 Inhibition von <i>T. gondii</i> bei gleichzeitiger Gabe von HDQ und Antimycin.....	69

## Formelverzeichnis

Formel 2.1 Von SigmaPlot© verwendete Gleichung zur Berechnung der IC 50% ..	45
Formel 2.2 Berechnung der Summe der fraktionierten inhibitorischen Konzentration zweier Wirkstoffe.....	46
Formel 2.3 Beispiel für die Berechnung eines potenziellen Synergismus nach Formel 2.2.....	47

## Abkürzungsverzeichnis

ANTI A	Antimycin A
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATV	Atovaquon
bidest. bzw.	doppelt destilliert beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	circa
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CMP	Cytidin-Monophosphat
CMV	Zytomegalievirus
CPRG	Chlorphenolrot-β-D-Galaktopyranosid
CPSII	Carbamoyl-Phosphat-Synthetase II
° C	Grad Celsius
d	Tag ( <i>dies</i> )
DBQ	n-Decylubiquinon (ein Ubiquinon-Derivat)
d.h.	das heißt
DHODH	Dihydroorotat-Dehydrogenase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenylen-Iodonium-Chlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere ( <i>et alii</i> )
FAD	Flavinadenindinukleotid
FCS	fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FIC	fraktionierte inhibitorische Konzentration ( <i>fractional inhibitory concentration</i> )
G	Gauge
g	Gramm
h	Stunde ( <i>hora</i> )
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDQ	1-Hydroxy-2-Dodecyl-4(1H)Quinolon
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure
HFF	humane Vorhaut-Fibroblasten ( <i>human foreskin fibroblasts</i> )
HHV	humanes Herpesvirus
HXGPRT	Hypoxanthin-Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase

## Abkürzungsverzeichnis

---

IC 50%	inhibitorische Konzentration 50% ( <i>inhibitory concentration</i> 50%)
IDP	Diphenyl-Iodonium-Chlorid
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IfSG	Infektionsschutzgesetz
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
kda	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
lacZ	$\beta$ -Galaktosidase
LD 100%	Letaldosis 100%
M	molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
nM	nanomolar
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt
OMP	Orotidin-Monophosphat
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	nach der Infektion ( <i>post infectionem</i> )
P/S	Penicillin/Streptomycin
Q	Coenzym Q, Ubiquinon
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAG	Oberflächenantigen ( <i>surface antigene</i> )
SE	Standardfehler ( <i>standard error</i> )
spp.	Spezies (Pl.)

## Abkürzungsverzeichnis

---

TAO	Trypanosomen-spezifische alternative Oxidase
TE	Toxoplasmen-Enzephalitis
TMP	Thymidin-Monophosphat
Tris	Tris (Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Einheit ( <i>unit</i> )
UMP	Uridin-Monophosphat
Upm	Umdrehungen pro Minute
UPRT	Uracil-Phosphoribosyl-Transferase
vgl.	vergleiche
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organization</i> )
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 *Toxoplasma gondii*

Den obligat intrazellulären Erreger *Toxoplasma gondii* beschrieben erstmals Charles Nicolle und Louis Herbert Manceaux 1908 in Südtunesien sowie zur gleichen Zeit Alfonso Splendore<sup>1</sup> in Brasilien. Die Bezeichnung des Parasiten geht zurück auf seine Morphologie (griechisch: *toxon* Bogen, *plasma* Form) und auf den nordafrikanischen Nager *Ctenodactylus gondi*, aus dem der Erreger isoliert wurde, (Nicolle und Manceaux 1909).

*Toxoplasma gondii* zählt als eukaryontischer, einzelliger Parasit zu den Protozoen. Er gehört zur Klasse der Sporozoa und zum Phylum der Apicomplexa, die durch den Apikompalkomplex und den Apikoplasten charakterisiert werden. Der Apikompalkomplex besteht aus einem komplexen Zytoskelett mit Konoid und einer Gruppe spezialisierter sekretorischer Organellen, den Rhoptrien, Mikronemen und dichten Granula (Smith 1995). Der Apikompalkomplex ist für den Invasionsprozess des Parasiten in die Wirtszelle von entscheidender Bedeutung. Aufgrund experimenteller Vorteile ist *T. gondii* gut als Modellorganismus geeignet, um die Biologie von Apicomplexa genauer zu untersuchen (Kim und Weiss 2004). Den Apicomplexa werden auch die human- und tiermedizinisch relevanten Protozoen *Plasmodium spp.*<sup>2</sup>, *Cryptosporidium spp.*, *Isospora*, *Sarcocystis spp.*<sup>3</sup>, *Cyclospora*<sup>4</sup> und *Babesia*<sup>5</sup> zugeordnet (Deplazes und Eckert 2005).

---

<sup>1</sup> Splendore isolierte den Erreger aus dem Kaninchen. Der Erreger war morphologisch identisch mit dem von Nicolle und Manceaux beschriebenen Protozoon (Nicolle und Manceaux 1909).

<sup>2</sup> *Plasmodium spp.* sind Erreger verschiedener Formen der Malaria, die weltweit eine der häufigsten Parasitosen mit 300-500 Millionen Erkrankten jährlich darstellt. Mehr als eine Millionen Menschen sterben pro Jahr an dieser Erkrankung. Besonders bei unter fünfjährigen Kindern zählt die Malaria zu den häufigsten Todesursachen weltweit (WHO 2005).

Die klinische Manifestation ist abhängig von der Erregerart und vom Immunstatus der betroffenen Person. Die Initialsymptome der Malaria sind meist unspezifisch: Kopf- und Gliederschmerzen, Mattigkeit, Fieber, Übelkeit und Durchfall. Das charakteristische plötzlich einsetzende hohe Fieber verbunden mit Schüttelfrost kann jedoch fehlen. Deshalb kann eine Malaria auch als grippaler Infekt fehldiagnostiziert werden (Groß 2006). Eine rechtzeitige Diagnosestellung und Therapie ist von größter Bedeutung, da eine unbehandelte Infektion mit *Plasmodium falciparum* nach kurzer Zeit letal verlaufen kann (Deplazes und Eckert 2005).

<sup>3</sup> *Cryptosporidien*, *Isospora* und *Sarcocystis* können beim Menschen zu gastrointestinalen Beschwerden führen. Vor allem bei AIDS-Patienten können diese Erreger zu schwersten chronischen Diarrhoen führen, die durch einen massiven Gewichtsverlust lebensbedrohlich sein können (Groß

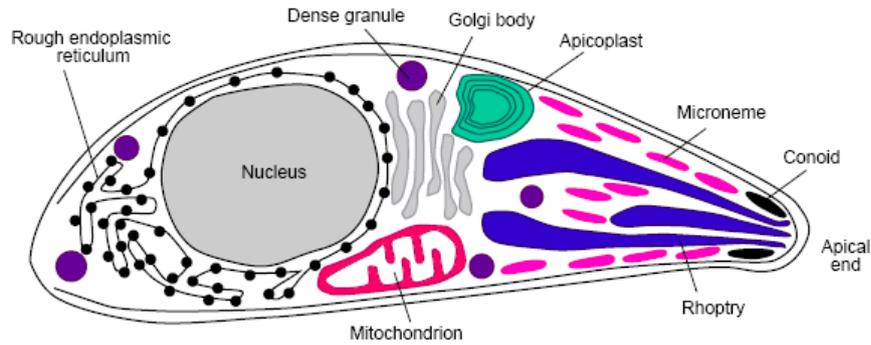


Abbildung 1.1 Ultrastruktur eines *Toxoplasma-gondii*-Tachyzoiten (aus Ajioka et al. 2001, S. 3)

## 1.2 Der Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* ist einer der häufigsten Parasiten weltweit. Um sich als Parasit möglichst weit verbreiten zu können, ist die Anpassung an verschiedene Wirte notwendig. Dieser Parasit ist ubiquitär verbreitet und kann alle kernhaltigen Zellen warmblütiger Lebewesen infizieren (Dubey et al. 1998).

*T. gondii* hat einen komplexen Lebenszyklus, der aus einer sexuellen und einer asexuellen Vermehrungsphase besteht. Letztere kann in allen Wirtsorganismen stattfinden. Der Parasit hat ein breites Wirtsspektrum, zu dem Schweine, Schafe, Ziegen, Rinder, Nager, Vögel sowie Meeressäuger, aber auch der Mensch gezählt werden. In diesen Zwischenwirten findet die ungeschlechtliche Vermehrung des Parasiten durch Endodyogenie<sup>6</sup> statt. Im Gegensatz dazu erfolgt die geschlechtliche Vermehrung typischerweise nur im Endwirt. Die Hauskatze und andere Mitglieder der Familie der *Felidae* sind Endwirte von *Toxoplasma gondii* (Frenkel et al. 1970). Nachdem die Katze sich mit Tachyzoiten, Bradyzoiten oder Sporozoiten infiziert hat, bilden sich in ihrem Dünndarmepithel männliche und weibliche Keimzellen des

---

2006). *Cryptosporidium spp.* enthalten keinen Apikoplasten. Wahrscheinlich ging dieser im Laufe der Evolution durch eine Abspaltung von den anderen Apicomplexa verloren.

<sup>4</sup> *Cyclospora* können bei Immunkompetenten zu einer selbstlimitierenden Diarrhoe führen, bei immundefizienten Patienten kann die gastrointestinale Symptomatik monatelang bestehen bleiben (Deplazes und Eckert 2005).

<sup>5</sup> *Babesien* kommen gelegentlich auch beim Menschen vor. Die Erkrankung verläuft meist selbstlimitierend und kann sich mit grippeähnlichen Symptomen manifestieren. Vereinzelt wurde über Todesfälle bei splenektomierten oder stark immunsupprimierten Patienten berichtet (Groß 2006).

<sup>6</sup> Die Endodyogenie ist eine Form der ungeschlechtlichen Vermehrung, bei der innerhalb einer Mutterzelle zwei Tochterzellen entstehen. Bei Tachyzoiten dauert ein Generationszyklus zwischen 6 und 8 Stunden. Nach 6 bis 7 Teilungen des Parasiten, d.h. wenn die parasitophore Vakuole 64 bis 128 Toxoplasmen enthält, bricht die Vakuole auf. Das führt zur Lyse der Wirtszelle. Die frei werdenden Parasiten können weitere Zellen infizieren (Radke und White 1998).

Parasiten aus. Die reifen Gameten fusionieren zu einer Zygote, die sich zur Oozyste weiterentwickelt und mit den Faeces der Katze ausgeschieden wird. Die Präpatenzzeit<sup>7</sup> hängt davon ab, in welchem Stadium und in welcher Form *T. gondii* von seinem Endwirt aufgenommen wurde. Die Reifung der Oozyste außerhalb der Katze dauert ein bis fünf Tage und ist von der Umgebungstemperatur und der Luftfeuchtigkeit abhängig (Dubey et al. 1998). Die reifen Oozysten bestehen aus zwei Sporozysten, die jeweils vier Sporozoiten enthalten. Von den Wirtstieren aufgenommene Sporozoiten entwickeln sich in den Zwischenwirten und im nicht-darmepithelialen Gewebe der Katze entweder zu sich schnell replizierenden, Gewebe zerstörenden Tachyzoiten (griechisch: *tachys* schnell) oder zu Bradyzoiten (griechisch: *bradys* langsam), die sich in Gewebezysten abkapseln und so den spezifischen Abwehrmechanismen des Wirtes entgehen. Strukturell unterscheiden sich Bradyzoiten kaum von Tachyzoiten. Beide Lebensformen des Parasiten sind etwa 2 x 6 µm groß. Abbildung 1.1 zeigt die Darstellung eines Tachyzoiten.

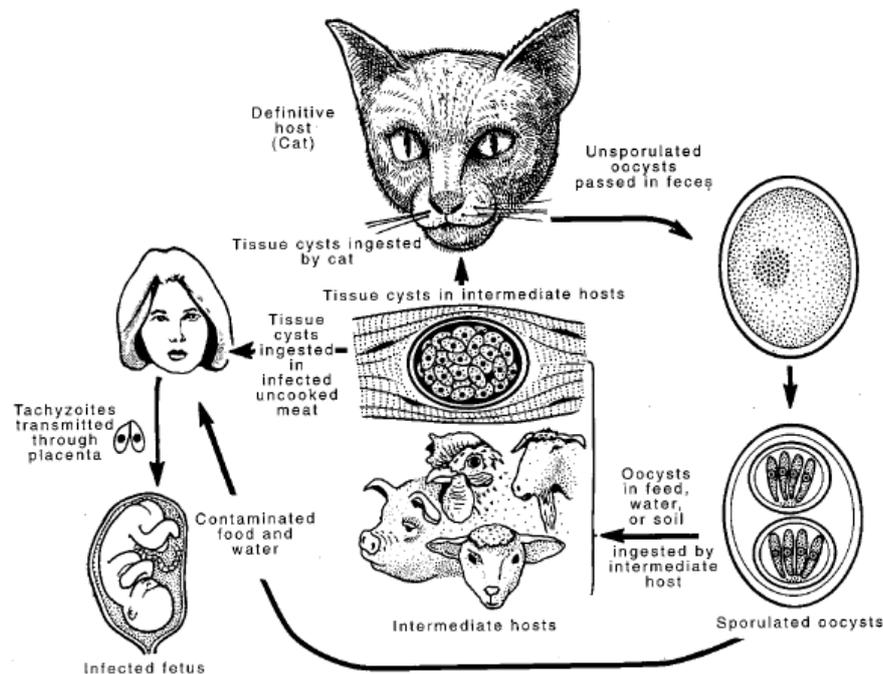


Abbildung 1.2 Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii* (aus Dubey et al. 1998, S. 268)

<sup>7</sup> Unter Präpatenzzeit wird die Zeit von der initialen Infektion des Wirtes mit einem Parasiten bis zum Auftreten von Geschlechtsformen des Erregers (hier: Oozysten von *T. gondii* in den Faeces der Katze) verstanden (Deplazes und Eckert 2005).

*Toxoplasma-gondii*-Isolate aus Menschen und Tieren können durch klassische Genotypisierung und aufgrund biochemischer Analysen vorwiegend den drei Gruppen Typ I, II und III zugeordnet werden (Kim und Weiss 2004). Diese Genotypen unterscheiden sich nicht nennenswert in ihrer Struktur (Dubey et al. 1998). Sie lassen sich aber durch ihre Virulenz im Mausmodell und durch ihre epidemiologische Häufigkeit voneinander abgrenzen (Montoya und Liesenfeld 2004). Die Unterschiede in den DNA-Sequenzen der Isolate betragen weniger als 2%. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass sich *T. gondii* vorwiegend klonal vermehrt. Die Theorie der klonalen Ausbreitung dieses Parasiten ging vorwiegend aus Sequenzierungen klinischer und aus Fleisch produzierenden Einrichtungen gewonnener Isolate aus Europa und Nordamerika hervor. Diese Daten spiegeln möglicherweise jedoch nicht die tatsächlich insgesamt vorkommenden Gensequenzen von *Toxoplasma gondii* wider, da sie entlegene, tropische sowie weniger zivilisierte Gebiete der Welt ausschließen (Ajzenberg et al. 2004). Durch Studien, in denen Isolate aus weniger domestizierten Gebieten mit weniger intensiver Tierzucht (z.B. aus Französisch Guyana, Afrika, den Karibischen Inseln, La Reunion) sequenziert wurden, wird angenommen, dass die Populationsstruktur von *T. gondii* sehr komplex ist: Die Ausbreitung des genetischen Materials des Parasiten findet sowohl durch klonale als auch durch sexuelle Weitergabe statt (Ajzenberg et al. 2004). Neben eindeutig als atypisch sequenzierten *T. gondii*-Stämmen konnte trotzdem die Mehrheit der Isolate den drei klassischen Genotypen zugeordnet werden. Genotyp I ist häufiger bei der konnatalen Toxoplasmose zu finden und zeigt eine hohe Virulenz im Mausmodell mit einer LD 100%<sup>8</sup> von weniger als 10 Parasiten. Im Gegensatz dazu sind die Genotyp-II- und -III-Stämme mit einer LD 100% von mehr als 1000 Parasiten weniger virulent (Kim und Weiss 2004). Unter Laborbedingungen differenzieren sich Genotyp-II-Stämme häufiger von Tachyzoiten zu Bradyzoiten, zeigen mehr Zysten im Gewebe und sind bei der Maus öfter mit einer chronischen Erkrankung assoziiert. Die meisten klinischen Isolate des Menschen können dem Genotyp II zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu findet sich der Genotyp III des Parasiten sehr selten im Menschen wieder und ist vorwiegend aus Tieren isoliert worden (Weiss und Kim 2000). In dieser Arbeit

---

<sup>8</sup> Die LD 100% (*lethal dose*) wird definiert als die Dosis eines Wirkstoffes oder Erregers, bei der innerhalb eines bestimmten Zeitraums bei 100% der Versuchstiere der Tod eintritt.

werden als Genotyp I Parasiten des RH-Stammes<sup>9</sup> und als Genotyp II Parasiten des ME49-Stammes verwendet.

### 1.3 Medizinische Bedeutung

Aus epidemiologischer Sicht ist *T. gondii* weltweit einer der erfolgreichsten Parasiten, die den Menschen befallen. Die Seroprävalenz zeigt beim Menschen eine sehr unterschiedliche Verteilung. So liegt die allgemeine Seroprävalenz in den USA bei 22,5% (Jones et al. 2003), in Kanada bei 38% (Lee 2000) und in Brasilien bei 50-80% (Bahia-Oliveira et al. 2003). Aufgrund der vermehrten Expositionsmöglichkeit steigt die Seroprävalenz mit dem Alter an (Lee 2000). Außerdem ist sie abhängig vom Bildungsniveau sowie von der Zugehörigkeit zu einer bestimmten sozioökonomischen Gruppe (Bahia-Oliveira et al. 2003). In Deutschland nimmt die Durchseuchung mit steigendem Lebensalter zu. Die durchschnittliche Seroprävalenz wird hierzulande mit 45-72% angegeben. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei den  $\geq 50$ -Jährigen etwa 70% mit Toxoplasmen infiziert sind (RKI 2007).

Die weltweite Verbreitung von *T. gondii* in unterschiedlichen Wirtsspezies deutet darauf hin, dass dieser Parasit verschiedene Übertragungsmechanismen entwickelt hat. Der Erreger wird vorwiegend durch den Verzehr zystenhaltigen, ungenügend gegarten Fleisches aufgenommen (Cook et al. 2000). Außerdem erfolgt die Übertragung durch die unabsichtliche Aufnahme von Katzenkot mit Oozysten z.B. an ungewaschenem Obst und Gemüse (Teutsch et al. 1979), durch das Trinken ungefilterten, infizierten Wassers (Bahia-Oliveira et al. 2003) und über den Kontakt mit oozystenhaltiger Erde (Cook et al. 2000). Des Weiteren wird der Parasit auch über den Genuss von nicht pasteurisierter Milch infizierter Tiere übertragen (Skinner et al. 1990, Sacks et al. 1982). Medizinisch relevant ist vor allem die diaplazentare Übertragung des Erregers bei der Erstinfektion einer Schwangeren wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben wird. Wesentlich seltener sind Infektionen bei

---

<sup>9</sup> Der RH-Stamm ist ein *T. gondii*-Stamm, der seit 1938 weltweit in Mäusen und in der Zellkultur vieler Laboratorien passagiert wird. Ursprünglich wurde dieser Stamm von einem Kind, dessen Initialen namensgebend waren, mit erworbener Toxoplasmose isoliert. Durch häufiges Passagieren hat der RH-Stamm die Fähigkeit, Oozysten in der Katze auszubilden, verloren (Dubey 2007).

Organtransplantation (Wulf et al. 2005), bei Gabe von Blutkonserven (Dodd 1998) und bei Laborunfällen.

Die klinische Präsentation einer *Toxoplasma-gondii*-Infektion kann sehr unterschiedlich sein. Sie ist vom Immunstatus des Individuums und von den Begleitumständen abhängig. Aus klinischer Sicht lassen sich drei Verläufe einer Toxoplasmen-Infektion unterscheiden: die Infektion des Immunkompetenten, die pränatale Infektion in der Schwangerschaft und die Toxoplasmose unter Immunsuppression.

### 1.3.1 Infektion des Immunkompetenten

Die *T. gondii*-Infektion verläuft bei mehr als 95% der Immunkompetenten asymptomatisch und somit latent. Nur wenige Infizierte zeigen uncharakteristische Krankheitssymptome wie beispielsweise Abgeschlagenheit, Muskelschmerzen, Fieber und eine Lymphadenopathie der zervikonuchalen Lymphknoten<sup>10</sup>. Die Toxoplasmose des immunkompetenten Erwachsenen heilt in der Regel spontan aus und gewährleistet eine lebenslange Immunität. Es mehren sich allerdings Berichte darüber, dass auch die Erstinfektion immunkompetenter Erwachsener zu einer komplikationsreichen Chorioretinitis<sup>11</sup> führen kann (Dubey 2007).

### 1.3.2 Pränatale Infektion

Klinisch ist die Diagnose der Erstinfektion einer Schwangeren schwierig zu stellen, da die Mehrheit der Infektionen asymptomatisch verläuft. Infiziert sich eine Frau während der Schwangerschaft erstmals mit *Toxoplasma gondii*, können die Parasiten diaplazentar übertragen werden und zu einer Schädigung des Embryos oder Feten führen. Hierbei ist die Übertragungsrate des Parasiten von der Größe der Plazenta

---

<sup>10</sup> Differentialdiagnosen der Toxoplasmose sind Erkrankungen mit Lymphknotenadenopathie anderer Genese (Herold 2007). Hierzu gehören unter anderem die infektiöse Mononukleose und Infektionen mit CMV, HHV-6 und  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken der Gruppe A (Hurt und Tammaro 2007).

<sup>11</sup> Es handelt sich um eine fokale Entzündung der Ader- und Netzhaut mit typischem ophthalmologischen Fundusbefund: Neben einer älteren vernarbten Läsion ist meist ein frischer Entzündungsherd zu finden (Groß 2006).

abhängig (Ambroise-Thomas und Pelloux 1993). Mit der Dauer der Schwangerschaft nimmt dabei die Infektionswahrscheinlichkeit von 14% im ersten Trimester bis 59% im dritten Trimester zu. Im Gegensatz dazu nimmt die Gefahr einer schwerwiegenden fetalen Schädigung durch den Parasiten von 73% am Beginn der Schwangerschaft bis 11% am Schwangerschaftsende ab (Desmots und Couvreur 1984). Eine Infektion im ersten Teil der Schwangerschaft führt meist zum Abort oder zu einem schweren Krankheitsverlauf. Die generalisierte fetale Toxoplasmose geht unter anderem mit Hepatosplenomegalie, Myokarditis, interstitieller Pneumonie und Ikterus einher. Des Weiteren kann eine Enzephalitis mit Hydrozephalus, intrazerebralen Verkalkungen und Chorioretinitis<sup>12</sup> auftreten. Spätere intrauterine Infektionen werden meist weder sonografisch noch nach der Geburt klinisch erfasst, da nur 10-15% der Neugeborenen symptomatisch sind (Speer 2007). Bleiben die anfangs subklinisch verlaufenden Infektionen unbehandelt, kann sich die konnatale Toxoplasmose zum Teil erst nach Jahren durch Manifestation im zentralen Nervensystem beispielsweise mit Krampfanfällen, psychomotorischer Retardierung, Taubheit und Chorioretinitis<sup>13</sup> bemerkbar machen.

In Deutschland gehört die Toxoplasmenserologie nach den gültigen Mutterschaftsrichtlinien nicht zu den Routineuntersuchungen in der Schwangerschaft (Mutterschaftsrichtlinien 2007) - im Gegensatz zu Österreich, wo schon seit Mitte der 1970er Jahre ein Toxoplasmen-Screening durchgeführt wird (Auer et al. 2000). Die durchschnittliche Durchseuchung mit *T. gondii* liegt bei Frauen im gebärfähigen Alter hierzulande bei 26 bis 54% (RKI 2007). Das bedeutet, dass die Hälfte bis drei Viertel aller potenziell Schwangeren eine Erstinfektion während der Schwangerschaft durchmachen könnte. Die konnatale Toxoplasmose ist nach dem Infektionsschutzgesetz nicht namentlich meldepflichtig (IfSG 2007)<sup>14</sup>. Das Robert-Koch-Institut gibt für die Jahre 2006 und 2007 11 bzw. 20 Fälle der konnatalen Infektion an (RKI 2008).

---

<sup>12</sup> Die klassische Trias von Hydrozephalus, intrazerebralen Verkalkungen und Chorioretinitis ist nur selten in Kombination zu finden (Montoya und Liesenfeld 2004).

<sup>13</sup> Bei den betroffenen Kindern zeigt sich oft eine Makulararbe, durch die der Visus erheblich beeinträchtigt ist. Das kann sekundär zu einem Strabismus führen (Lang und Lang 2004).

<sup>14</sup> §7 Absatz 3 IfSG.

### 1.3.3 Infektion bei Immunsuppression

Bei Patienten mit Immunsuppression ist weniger die Erstinfektion als vielmehr eine Reaktivierung der bereits durchgemachten *T. gondii*-Infektion medizinisch relevant. So findet sich bei HIV-Infizierten ab einer  $CD_4^+$ -Zellzahl von weniger als 200/ $\mu$ l ein erhöhtes Risiko für opportunistische AIDS-definierende Infektionen, zu denen auch die zerebrale Toxoplasmose gezählt wird (Herold 2007). Wahrscheinlich kommt es durch die reduzierte Immunabwehr des Wirtes zu einer Stadienkonversion der Bradyzoiten aus den abgekapselten Gewebezysten in Tachyzoiten. Die Zysten befinden sich vorwiegend im zentralen Nervensystem<sup>15</sup> und im Muskelgewebe. Die wieder frei gesetzten Parasiten verursachen das akute schwere Krankheitsbild der Toxoplasmen-Enzephalitis (TE). Durch diese Erkrankung ist das Leben der Betroffenen akut gefährdet (Montoya und Liesenfeld 2004). Die klinische Manifestation hängt von der Lokalisation der Parasitenherde ab. Die TE kann unter anderem mit generalisierten Anfällen, Hemiparesen sowie Sprach- und Sehstörungen einhergehen (Happe et al. 2002). Aufgrund der in den letzten Jahren verbreiteten Anwendung von HAART-Medikationen (hochaktive antiretrovirale Therapie) bei HIV-Infektion tritt die TE heutzutage wesentlich seltener auf (Happe et al. 2002).

Des Weiteren kann auch die Einnahme von Immunsuppressiva aufgrund einer Organtransplantation (Castagnini et al. 2007) oder wegen einer Chemotherapie zur Reaktivierung einer latenten *T. gondii*-Infektion führen.

### 1.3.4 Aktuelle Therapien

Da die Mehrzahl der *T. gondii*-Infektionen beim Immunkompetenten asymptomatisch verläuft und die Lymphknotentoxoplasmose meist spontan ausheilt, bedarf es beim gesunden Menschen meist keiner Therapie. Tritt beim immunkompetenten Erwachsenen eine Toxoplasmen bedingte Chorioretinitis auf, sollte diese mit der klassischen Kombination aus Pyrimethamin plus Sulfadiazin plus

---

<sup>15</sup> Die Bilddiagnostik (CCT, MRT) zeigt bei der zerebralen Toxoplasmose multiple ZNS-Läsionen mit ringförmiger oder gleichmäßiger Kontrastmittelanreicherung mit perifokalem Ödem und ggf. sekundärer Raumforderung. Differentialdiagnostisch sind unter anderem das primäre ZNS-Lymphom, Abszesse, Infarkte und die progressive multifokale Leukenzephalopathie abzugrenzen (Happe et al. 2002).

Folinsäure<sup>16</sup> behandelt werden. Anstelle von Sulfadiazin kann alternativ, z.B. bei allergischen Reaktionen auf Sulfonamide, Clindamycin eingesetzt werden. Kortikosteroide<sup>17</sup> müssen systemisch verabreicht werden, wenn ausgedehnte Entzündungsreaktionen in der Nähe der Fovea oder des Sehnerven vorliegen, die zum Verlust des Augenlichtes führen können (Montoya und Liesenfeld 2004).

Bei der pränatalen Infektion werden die Kinder intrauterin durch eine Therapie der Mutter behandelt. Hierzu wird bis zum Ende der 15. Schwangerschaftswoche Spiramycin<sup>18</sup> empfohlen. Ab der 16. Schwangerschaftswoche wird mit Pyrimethamin plus Sulfadiazin plus Folinsäure<sup>19</sup> therapiert. Es werden vierwöchige Therapiezyklen mit vierwöchigen therapiefreien Intervallen empfohlen. Bei Sulfonamidallergie kann Sulfadiazin durch Spiramycin ersetzt werden (Groß 2006). Pyrimethamin ist teratogen und deshalb im ersten Trimester kontraindiziert (Kravetz und Federman 2005). Neugeborene Kinder mit einer pränatal erworbenen Toxoplasmen-Infektion werden unabhängig vom Auftreten klinischer Symptome therapiert, um das Risiko für Spätschäden zu senken. Hier wird ebenfalls eine klassische Therapie mit Pyrimethamin plus Sulfadiazin plus Folinsäure<sup>20</sup> von der Dauer bis zu einem Jahr empfohlen. Außerdem sollten die Kinder regelmäßig vor allem augenärztlich untersucht werden (Groß 2006).

Die Standardtherapie der akuten Toxoplasmen-Enzephalitis bei AIDS-Patienten besteht aus Pyrimethamin mit Folinsäure und Sulfadiazin oder Clindamycin<sup>21</sup>. Alternativ kann bei der Behandlung der TE Atovaquon in Kombination mit Pyrimethamin oder mit Sulfadiazin angewandt werden (Montoya und Liesenfeld

---

<sup>16</sup> Initial können 200 mg Pyrimethamin als *loading dose* gegeben werden, gefolgt von 50-75 mg Pyrimethamin pro Tag plus 1-1,5 g Sulfadiazin pro Tag plus 5-20 mg Folinsäure dreimal pro Woche. Die Gabe von Folinsäure soll die myelotoxischen Nebenwirkungen von Pyrimethamin wie die Hemmung der Hämatopoese insbesondere die Thrombozytopenie abschwächen. Folinsäure wird deshalb immer in der Kombination mit Pyrimethamin empfohlen (Montoya und Liesenfeld 2004).

<sup>17</sup> Täglich 1 mg/kg KG auf zwei Dosen verteilt (Montoya und Liesenfeld 2004).

<sup>18</sup> Orale Gabe von dreimal 1 g pro Tag (Couvreur et al. 1988).

<sup>19</sup> Am ersten Tag sollten 50 mg Pyrimethamin gegeben werden. Danach täglich 25 mg Pyrimethamin plus 50 mg/kg KG Sulfadiazin (maximal 4 g in vier Einzeldosen) plus 10-15 mg Folinsäure einmal pro Woche (Groß 2006).

<sup>20</sup> Bei Neugeborenen besteht die Kombinationstherapie aus 1 mg/kg KG/d Pyrimethamin plus 50-100 mg/kg KG/d Sulfadiazin plus zweimal pro Woche 5 mg Folinsäure (Groß 2006).

<sup>21</sup> Die Standardtherapie der akuten TE besteht aus initial 200 mg Pyrimethamin (*loading dose*) gefolgt von 50-75 mg Pyrimethamin plus 10-20 mg Folinsäure täglich plus entweder 1-1,5 g Sulfadiazin oder 600 mg Clindamycin alle sechs Stunden (Montoya und Liesenfeld 2004).

2004). Auch bei der Verdachtsdiagnose TE ist ein sofortiger Therapiebeginn von entscheidender Bedeutung, da die Erkrankung ansonsten einen fatalen Verlauf nimmt (Happe et al. 2002).

Nach den amerikanischen Richtlinien zur Prävention opportunistischer Infektionen unter HIV-Infizierten sollte eine Primärprophylaxe der TE bei allen Toxoplasma-IgG-positiven Patienten mit einer  $CD_4^+$ -Lymphozytenzahl  $<100/\mu\text{l}$  durchgeführt werden. Cotrimoxazol<sup>22</sup> ist das Mittel der Wahl zur Primärprophylaxe der TE. Bei Immunrekonstruktion durch das Ansprechen auf die HAART kann die Primärprophylaxe unterbrochen werden, wenn die  $CD_4^+$ -Lymphozyten bei  $>200/\mu\text{l}$  über mindestens 3 Monate liegen. Alle Toxoplasma-IgG-negativen HIV-Infizierten sollten über Maßnahmen der Primärprävention informiert und regelmäßig auf eine Serokonversion getestet werden. (Centers for Disease Control and Prevention 2002). Bei stattgefunder TE, die initial erfolgreich therapiert wurde, sollte sich wegen Rezidivgefahr eine Erhaltungstherapie im Sinne einer Sekundärprophylaxe anschließen. Die Sekundärprophylaxe sollte der Akuttherapie mit Dosisreduktion entsprechen<sup>23</sup>. Bei einer stabilen  $CD_4^+$ -Lymphozytenzahl  $>200/\mu\text{l}$  über mindestens 6 Monate unter HAART kann die Sekundärprophylaxe abgesetzt werden. Ohne diese Immunrekonstruktion ist eine lebenslange Erhaltungstherapie notwendig. Die Unterbrechung der prophylaktischen Therapien ist unter o.g. Umständen sowie aufgrund von Arzneimittelinteraktionen, unerwünschten Nebenwirkungen, der möglichen Resistenzentwicklung von Erregern und nicht zuletzt wegen der reduzierten Patientencompliance bei der Gabe von vielen Medikamenten vertretbar (Centers for Disease Control and Prevention 2002).

### 1.3.5 Angriffspunkte der aktuellen Therapeutika

Sulfadiazin ist ein Sulfonamid und inhibiert die Dihydropteroat-Synthase. Mikroorganismen sind auf die Eigensynthese von Folinsäure angewiesen, da ihnen

---

<sup>22</sup> Cotrimoxazol aus 400 mg Sulfamethoxazol plus 80 mg Trimethoprim (z.B. als Cotrim®) einmal täglich (Karow und Lang-Roth 2007).

<sup>23</sup> Zur Sekundärprophylaxe wird die Kombination aus 25 bis 50 mg Pyrimethamin plus 500 bis 1000 mg Sulfadiazin plus 10-25 mg Folinsäure einmal täglich empfohlen (Karow und Lang-Roth 2007). Alternativ finden auch Clindamycin und Atovaquon Anwendung. Im Mausmodell der reaktivierten Toxoplasmose zeigte sich die alleinige Erhaltungstherapie mit 50 oder 100 mg/kg KG/d Atovaquon effektiver als die derzeitige Standardsekundärprophylaxe (Dunay et al. 2004).

eine Aufnahme von außen nicht möglich ist. Sulfonamide verdrängen im Mikroorganismus kompetitiv Para-Aminobenzoensäure aus dem Syntheseweg zur Tetrahydrofolsäure. Da der Mensch Folsäure mit der Nahrung aufnehmen kann, wird der humane Zellstoffwechsel nicht durch Sulfonamide beeinträchtigt. Der therapeutische Masseneinsatz von Sulfonamiden in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts führte zu einer hohen Resistenzentwicklung vieler Erregerarten gegenüber den Sulfonamiden. Erst durch die Kombination mit Diaminopyrimidinen fanden Sulfonamide wieder therapeutische Anwendung<sup>24</sup>. Ein gebräuchliches Diaminopyrimidin ist Pyrimethamin. Es hemmt die Dihydrofolat-Reduktase. Sulfadiazin und Pyrimethamin tragen somit nacheinander zur Hemmung der Synthese von Tetrahydrofolsäure bei. Tetrahydrofolsäure ist ein Überträger aktivierter C<sub>1</sub>-Verbindungen bei der Synthese von Aminosäuren, Nukleotiden und Nukleinsäuren. Ein Mangel an Tetrahydrofolsäure durch die Kombination von Sulfadiazin mit Pyrimethamin hemmt somit die Bildung von RNA und DNA und wirkt sich dadurch bakteriostatisch auf die Erreger aus.

Unerwünschte Wirkungen der Kombination sind gastrointestinale Unverträglichkeits- und Überempfindlichkeitsreaktionen, Phototoxizität sowie Hämatoepoesestörungen, die durch die gleichzeitige Gabe von Folsäure reduziert werden. Wegen der teratogenen Wirkung ist die Kombination im ersten Drittel der Schwangerschaft kontraindiziert (Stahlmann und Lode 2005).

Wie bereits erwähnt wird auch Clindamycin in Kombination mit Pyrimethamin bei der Therapie der Toxoplasmose eingesetzt. Clindamycin gehört zu den Lincosamiden. Diese binden an die größere (50S-)Untereinheit der bakteriellen Ribosomen und hemmen die Translation bei der Proteinbiosynthese. Durch diese Hemmung wirken Lincosamide ebenfalls bakteriostatisch. Als unerwünschte Wirkungen treten relativ häufig gastrointestinale Störungen und allergische Reaktionen auf (Füssle und Willems 2007, Stahlmann und Lode 2005). Als Wirkort von Clindamycin in *Toxoplasma gondii* wurde der Apikoplast identifiziert (Camps et

---

<sup>24</sup> Die Kombination von Diaminopyrimidinen mit Sulfonamiden findet nicht nur in der Toxoplasmosetherapie Anwendung. Pyrimethamin plus Sulfadoxin wurde als Fansidar® bei der Therapie der Malaria tropica bei Chloroquin-Resistenz verwendet. Das Präparat wird aber wegen schwer verlaufender Hautveränderungen nicht mehr zur Malariaphylaxe benutzt. Trimethoprim plus Sulfamethoxazol werden u.a. als Cotrim® zur Therapie und Prophylaxe der *Pneumocystis jirovecii*-Pneumonie, zur Primärprophylaxe der TE sowie zur Behandlung von Harnwegsinfekten verwendet (Stahlmann und Lode 2005).

al. 2002). Der Apikoplast ist ein nicht photosynthetisches Plastidorganell, das von Cyanobakterien abstammt<sup>25</sup>. Er enthält ein eigenes 35 kb großes Genom (Köhler et al. 1997), in dem rRNA-Gene identifiziert wurden. Camps et al. (2002) zeigten, dass eine Punktmutation in der großen Untereinheit der rRNA des Apikoplasten in zwei unabhängigen Mutanten zu einer Clindamycin-Resistenz führt. Diese Mutanten waren hypersensitiv gegenüber Doxycyclin. Eine dieser Clindamycin-resistenten Mutanten zeigte eine Parallelresistenz (*cross-resistance*) gegenüber den Antibiotika Azithromycin und Chloramphenicol, die ebenfalls die große Untereinheit der bakteriellen Ribosomen inhibieren. Die Hemmung der Parasitenreplikation durch Clindamycin ist *in vitro* erst nach einigen Vermehrungszyklen (>30 h) sichtbar (*delayed onset*) (Fichera et al. 1995, Pfefferkorn und Borotz 1994, Pfefferkorn et al. 1992). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Replikation des Apikoplastengenoms von *T. gondii*-Tachyzoiten durch eine Clindamycin-Behandlung inhibiert wird (Fichera und Roos 1997).

Spiramycin ist ein aus *Streptomyces spp.* gewonnenes Makrolidantibiotikum, das gegenüber den meisten Pathogenen schwächer wirksam ist als andere Makrolide<sup>26</sup> und deshalb praktisch nur bei der Therapie der in der Schwangerschaft erworbenen Toxoplasmose Anwendung findet. Es bindet, ähnlich wie Clindamycin, an die 50S-Untereinheit der bakteriellen 70S-Ribosomen und blockiert so die Elongationsphase der Polypeptidkette am Ribosom während der Proteinbiosynthese. Deshalb ist auch Spiramycin bakteriostatisch wirksam. Makrolide verteilen sich gut im Gewebe und bieten durch ihre intrazelluläre Anreicherung Vorteile bei der Therapie intrazellulär überlebender Erreger. Im Allgemeinen werden Makrolidantibiotika gut vertragen. Unerwünschte Wirkungen sind Störungen des Gastrointestinaltrakts, allergische Reaktionen und, vor allem bei intravenöser Gabe, die Gefahr der Thrombosebildung und der QT-Verlängerung im EKG (Stahlmann und Lode 2005).

Die Kombination von Clindamycin und Spiramycin zeigt einen additiven Effekt<sup>27</sup> auf das Parasitenwachstum. Eine Clindamycin-resistente Mutante kann weder durch

---

<sup>25</sup> Phylogenetische Analysen zeigten eine nahe Verwandtschaft des Apikoplasten zu Algen. Die sekundäre Endosymbiose einer Algenspezies wird als Ursprung des plastidähnlichen Organells in Apicomplexa vermutet (Köhler et al. 1997).

<sup>26</sup> Die Makrolide Clarithromycin, Roxithromycin und Azithromycin sind in der Schwangerschaft kontraindiziert (Füssle und Willems 2007).

<sup>27</sup> Um die Wirkung von mehreren Medikamenten in Kombinationen zu beschreiben, wird von Addition, Synergismus und Antagonismus gesprochen. Medikamente wirken additiv, wenn ihre Kombination nicht mehr, aber auch nicht weniger effektiv ist, als die Wirkung der

Clindamycin noch durch Spiramycin in ihrem Wachstum inhibiert werden (*cross resistance*). Die additive Wirkung der Kombination eines Lincosamids mit einem Makrolid sowie ihre weitgehende Parallelresistenz lassen vermuten, dass diese Inhibitoren einen gemeinsamen Angriffspunkt besitzen (Fichera et al. 1995).

### 1.4 Aufbau und Funktion der Atmungskette

Zur Aufrechterhaltung und Funktion aller Lebensformen ist eine ständige Bereitstellung von Energie notwendig. Aerobe Lebewesen können mit der Glykolyse und dem Citratzyklus relativ wenig Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) regenerieren. Bei diesen Stoffwechselfvorgängen werden vor allem Wasserstoff übertragende Gruppen wie  $\text{NADH}_2$  und  $\text{FADH}_2$  gebildet. Der größte Anteil der Energielieferung in Form von ATP erfolgt bei eukaryonten Aerobiern durch Enzyme der Atmungskette an der inneren Mitochondrienmembran (Abbildung 1.3).

Die Bestandteile der mitochondrialen Atmungskette sind die Enzymkomplexe I bis IV, das Coenzym Q/QH<sub>2</sub> (Ubiquinon/Ubiquinol), das Cytochrom c und die ATP-Synthase (Komplex V).

Durch Einschleusung von NADH über den Komplex I (konventionelle NADH-Dehydrogenase, NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase, Typ-I-NADH-Dehydrogenase) und  $\text{FADH}_2$  über den Komplex II (Succinat-Ubiquinon-Reduktase) werden Elektronen auf Ubiquinon übertragen. Ubiquinon ist ein in biologischen Systemen ubiquitär vorkommendes Coenzym, das schnell innerhalb der inneren Mitochondrienmembran diffundieren kann. Die Aufnahme von Elektronen reduziert Ubiquinon zum Ubiquinol. Als beweglicher Carrier überträgt Ubiquinol die Elektronen auf den Komplex III (Ubiquinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase, bc<sub>1</sub>-Komplex) der Atmungskette. Von diesem Komplex werden die Elektronen zum Cytochrom c weitergegeben. Das Cytochrom c ist ähnlich beweglich wie Ubiquinol und

---

Einzelkomponenten. Die Kombination solcher Medikamente würde somit in ihrer Wirkung keinen Vorteil erzielen. Ein typisches Beispiel hierfür ist die Kombination eines Wirkstoffes mit sich selbst. Im Gegensatz zur Addition wirken Medikamente synergistisch, wenn ihre Kombination effektiver ist als die Wirkung der Einzelkomponenten. Das ist z.B. der Fall, wenn von den Einzelkomponenten in Kombination für einen bestimmten Effekt (z.B. Reduktion des Parasitenwachstums um die Hälfte) weniger Wirkstoff benötigt wird als wenn die Einzelkomponenten alleine benutzt werden. Im Unterschied zum Synergismus wird bei antagonistisch wirkenden Komponenten in Kombination mehr Wirkstoff benötigt, um einen definierten Effekt zu erzielen als wenn die Komponenten einzeln verwendet werden (Berenbaum 1978).



Der Mechanismus zur Energieversorgung unterscheidet sich bei den Parasiten von dem der Säuger. Im Speziellen bietet die mitochondriale Atmungskette des Parasiten einen attraktiven Ausgangspunkt bei der Suche nach möglichen Angriffspunkten für potenziell antiparasitisch wirksame Medikamente, weil sie sich in der Morphologie und in den Enzymkomplexen von der des Säugers unterscheidet.

Bei den Helminthen wurde vor allem der Nematode *Ascaris suum* aufgrund seiner guten Handhabbarkeit und seiner Länge vielfach untersucht. Das mitochondriale NADH-Fumarat-Reduktase-System von *A. suum* ist Teil eines einzigartigen Atmungssystems bei Helminthen. Es stellt den letzten Schritt des Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Succinat-Mechanismus dar, der die wichtigste Rolle im anaeroben Energiemetabolismus des adulten Wurmes spielt. In diesem System sind die NADH-Rhodoquinon-Reduktase (Komplex I) und die Rhodoquinol-Fumarat-Reduktase (Komplex II) interessante Angriffspunkte für Anthelminthika. Bei einem Massenscreening von potenziellen Anthelminthika konnte der Wirkstoff Nafuredin aus *Aspergillus niger* isoliert werden. Nafuredin inhibiert selektiv den Komplex I von *Ascaris suum* und zeigt *in vivo* Aktivität gegen *Haemonchus contortus* in Schafen (Omura et al. 2001).

Parasitenspezifische Metabolismen werden auch bei den Protozoen gefunden. Bei den zu den Protozoen gehörenden Flagellaten wurde *Trypanosoma brucei brucei*<sup>28</sup> intensiv untersucht. Im Blut des Wirtsorganismus nutzt dieser Parasit das Glycerol-3-Phosphat-Oxidase-System zur Energiegewinnung. Dieses System oxidiert Glycerol-3-Phosphat, das in den Glycosomen produziert wird. Die hierbei verwendete Elektronentransportkette befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran und besteht aus der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, Ubiquinon und einer nicht-Cyanid-sensitiven Oxidase, der so genannten Trypanosomen-spezifischen alternativen Oxidase (TAO). Mit Ascofuranon wurde aus dem Mikroorganismus *Ascochyta visiae* ein potenter Metabolit gewonnen, der spezifisch die TAO hemmt (Kita et al. 2001).

---

<sup>28</sup> Der Erreger wird durch die Tsetsefliege übertragen und ist Ursache der afrikanischen Schlafkrankheit.

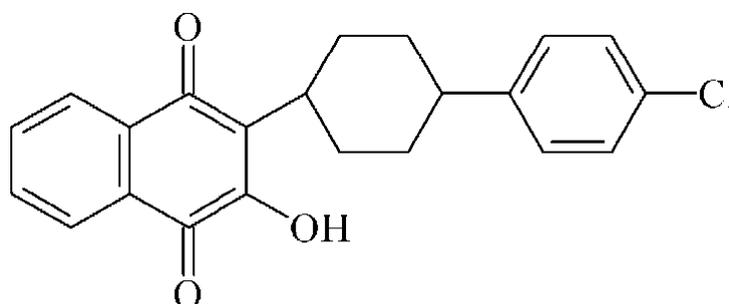
Bei den Apicomplexa sind die *Plasmodium spp.* und *Toxoplasma gondii* aufgrund ihrer humanpathogenen Bedeutung von besonderem Interesse bei der Suche nach neuen Pharmakotherapeutika. Auch bei diesen Protozoen werden die im Unterschied zum Wirt parasitenspezifischen Metabolismen als mögliche Angriffspunkte von Inhibitoren betrachtet.

Chalone sind der Hauptinhaltsstoff von Wurzelextrakten des chinesischen Süßholz *Glycyrrhiza inflata*. Sie besitzen antibakterielle, antitumoröse und antivirale Eigenschaften. Chalone wurden auf ihre Wirkung gegenüber *Plasmodium falciparum* getestet und es zeigte sich, dass Licochalcon A eine viel versprechende Wirkung auf den Malariaerreger hatte. Licochalcon A inhibiert sowohl den Komplex III (Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase, bc<sub>1</sub>-Komplex) als auch den Komplex II (Succinat-Ubiquinon-Reduktase) in Mitochondrien von *Plasmodium falciparum* (Mi-Ichi et al. 2005).

Artemisinine sind gegenwärtig vorhandene sehr potente Wirkstoffe gegen Malaria, die besonders bei Erregerresistenzen gegen andere Medikamente meist in Kombination zur Anwendung kommen (WHO 2006). Diese Substanzen werden schon lange in der traditionellen chinesischen Medizin zur Fiebertherapie eingesetzt (Hsu 2006). Extrahiert werden sie aus dem chinesischen Kraut *Artemisia annua*. Das Hefemodell mit *Saccharomyces cerevisiae* liefert Anhaltspunkte für den Aktionsmechanismus der Artemisinine: Sie interagieren mit der Elektronentransportkette, produzieren lokal reaktive Sauerstoffradikale und bewirken eine Depolarisation des mitochondrialen Membranpotenzials (Li et al. 2005).

Atovaquon wird zur Behandlung der Malaria und der Toxoplasmose eingesetzt. Dieser Wirkstoff ist ein synthetisch hergestelltes Hydroxynaphthoquinon, das strukturell dem Ubiquinon ähnlich ist (Abbildung 1.4). Als Wirkungsmechanismus wird einerseits postuliert, dass Atovaquon den Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Komplex (Komplex III) der mitochondrialen Atmungskette inhibiert und damit die ATP- und Nukleinsäuresynthese reduziert. Dafür spricht, dass Mutationen im Cytochrom-b-Gen von Atovaquon-resistenten Mutanten zu Veränderungen der Ubiquinol-Bindungstasche des Cytochrom b führten. Das lässt vermuten, dass der Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Komplex den Angriffspunkt von Atovaquon in *T. gondii* darstellt (McFadden et al. 2000). Des Weiteren wurden Mutationen von Atovaquon-resistenten *T. gondii*-Mutanten in *Saccharomyces cerevisiae*, deren eigener Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Komplex

ebenfalls von Atovaquon inhibiert wird, eingebracht. Diese *S. cerevisiae*-Mutanten zeigten eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber Atovaquon als die Wildtyp-Hefe<sup>29</sup> (Kessl et al. 2006). Andererseits wird auch vermutet, dass Atovaquon über eine Hemmung der Dihydroorotat-Dehydrogenase die Pyrimidin-*de-novo*-Biosynthese von Protozoen inhibiert (Hudson 1993). Da Protozoen nicht in der Lage sind, vorgefertigte Pyrimidine aufzunehmen, sind sie auf ihre *de-novo*-Synthese und auf die Wiederverwertung von Pyrimidinen über einen *salvage pathway* angewiesen. Atovaquon wirkt nicht nur gegen *Toxoplasma-gondii*-Infektionen, sondern findet auch in Kombination mit Proguanil<sup>30</sup> in der Therapie und Prophylaxe der Malaria Anwendung. Außerdem wird es auch als Monotherapie<sup>31</sup> bei der Akutbehandlung von leichten bis mäßig schweren *Pneumocystis-jiroveci*-Infektionen eingesetzt, wenn Cotrimoxazol nicht vertragen wird. Problematisch ist die nahrungsabhängig variable Resorption des Medikaments (Hudson 1993). Als unerwünschte Wirkungen einer Behandlung mit Atovaquon können u.a. Exantheme, gastrointestinale Störungen und Kopfschmerzen auftreten (Stahlmann und Lode 2005).



**Abbildung 1.4 Schematische Darstellung von Atovaquon**

---

<sup>29</sup> Gemessen an einer bis zu 16-fachen Erhöhung der inhibitorischen Konzentration 50% (IC 50%) bei den Mutanten gegenüber der Wildtyp-Hefe (Kessl et al. 2006).

<sup>30</sup> Beispielsweise als Malarone® kommt die Kombination von Atovaquon und Proguanil gegen *Plasmodium spp.* in folgenden Dosierungen zum Einsatz: Prophylaxe 250/100 mg/d; Therapie 1000/400 mg/d (Füssle und Willems 2007).

<sup>31</sup> Im Monopräparat Wellvone® beispielsweise wird Atovaquon zweimal täglich mit 750 mg gegeben (Füssle und Willems 2007).

## 1.6 Mitochondriale Atmungskette und oxidative Phosphorylierung in *Toxoplasma gondii*

Biochemische Analysen geben Anhaltspunkte dafür, dass die Atmungskette und die oxidative Phosphorylierung in *T. gondii* funktionstüchtig sind (Vercesi et al. 1998). In Mitochondrien von Tachyzoiten<sup>32</sup> demonstrierten Vercesi et al. (1998), dass das elektrische Membranpotenzial der Mitochondrien sowohl durch Antimycin A, einen Komplex-III-Inhibitor, als auch durch Cyanid, einen Komplex-IV-Inhibitor, zerstört werden konnte. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass sowohl der Komplex III, die Ubiquinol-Cytochrome-c-Oxidoreduktase, als auch der Komplex IV der Atmungskette, die Cytochrom-c-Oxidase, in den Mitochondrien von *T. gondii* vorhanden sind. Die Zugabe von ADP führte zu einer Abnahme des Membranpotenzials. Daher kann angenommen werden, dass der elektrochemische Protonengradient zur Phosphorylierung von ADP durch die ATP-Synthase (Komplex V) benutzt wurde. Durch Verabreichung von Oligomycin, einem bekannten Inhibitor der ATP-Synthase, konnte das Membranpotenzial wieder in den Ursprungszustand versetzt werden, so dass bei Inhibition der Phosphorylierungsreaktion der Protonengradient erhalten blieb (Vercesi et al. 1998). Das bestätigt, dass Oligomycin die ATP-Synthase in *T. gondii* inhibiert (Bohne et al. 1994).

Die Empfindlichkeit der Atmung und des Membranpotenzials auf ADP und Oligomycin lässt vermuten, dass die nötigen Mechanismen der oxidativen Phosphorylierung ähnlich denen der Vertebraten sind. Vercesi et al. (1998) zeigten somit, dass ein elektrochemischer Protonengradient in *Toxoplasma gondii* generiert und verwendet wird.

Die konventionelle NADH-Dehydrogenase ist ein großes Enzym (880 kb) mit multiplen Untereinheiten, angefangen von 14 in Bakterien über 30 in Pflanzen bis hin zu 46 Untereinheiten bei Säugern (Gabaldón et al. 2005). Diese Typ-I-NADH-Dehydrogenase kann Protonen pumpen und besitzt Bereiche, die die innere Mitochondrienmembran durchqueren. Inhibiert wird die konventionelle NADH-Dehydrogenase durch Rotenon. In *T. gondii* und *P. falciparum* konnte gezeigt werden, dass anstelle der konventionellen NADH-Dehydrogenase die so genannte

---

<sup>32</sup> Die Plasmamembran von extrazellulären Tachyzoiten wurde mit Digitonin permeabilisiert, so dass Ionen, Nukleotide, Substrate der Atmungskette und Färbemittel eingebracht und getestet werden konnten, ohne die funktionale Integrität der Mitochondrien zu verändern (Vercesi et al. 1998).

alternative NADH-Dehydrogenase (alternative NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase, Typ-II-NADH-Dehydrogenase) vorhanden ist (Biagini et al. 2006, Saleh 2006). Alternative NADH-Dehydrogenasen finden sich auch in Pflanzen (Rasmusson et al. 2004), Bakterien (Nantapong et al. 2005), Pilzen (Kerscher et al. 1999) und Protozoa (Fang und Beattie 2002). Diese Typ-II-NADH-Dehydrogenasen katalysieren dieselbe Redoxreaktion wie die Typ-I-NADH-Dehydrogenasen. Sie sind allerdings nicht in der Lage, Protonen zu pumpen und tragen deshalb nicht zur Entstehung des Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran bei (Kerscher 2000). Die alternativen NADH-Dehydrogenasen besitzen im Gegensatz zu den konventionellen nur eine Untereinheit, die eine ungefähre molekulare Masse von 50 kDa hat (Melo et al. 2004). Die Typ-II-NADH-Dehydrogenasen sind resistent gegenüber spezifischen Komplex-I-Inhibitoren wie Rotenon, Piericidin A und Capsaicin (Melo et al. 2004). *T. gondii* besitzt zwei Isoformen der alternativen NADH-Dehydrogenase, die in den Mitochondrien des Parasiten lokalisiert werden konnten (Saleh 2006). Ihre Aminosäuresequenzen gleichen sich zu 38% (Saleh 2006).

Da alternative NADH-Dehydrogenasen in Säugerzellen und somit auch beim Menschen nicht vorkommen, stellen sie einen viel versprechenden Angriffspunkt der mitochondrialen Atmungskette von *Plasmodium* und *Toxoplasma* dar. Plasmodien zeigten sich sensitiv gegenüber bekannten niedrig affinen Hemmstoffen der alternativen NADH-Dehydrogenase wie den Flavinen Diphenylen-Iodonium-Chlorid (DPI) und Diphenyl-Iodonium-Chlorid (IDP), die zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotenzials führten (Biagini et al. 2006). Als hoch affiner Inhibitor der alternativen NADH-Dehydrogenase des Pilzes *Yarrowia lipolytica* konnte kürzlich die Substanz 1-Hydroxy-2-Dodecyl-4(1)-Quinolon (HDQ) in Enzymassays identifiziert werden (Eschemann et al. 2005). Viel versprechend ist, dass nanomolare Konzentrationen von HDQ das Wachstum von *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium falciparum* in der Zellkultur inhibieren konnten (Saleh et al. 2007). Eine schematische Darstellung von HDQ zeigt Abbildung 1.5.

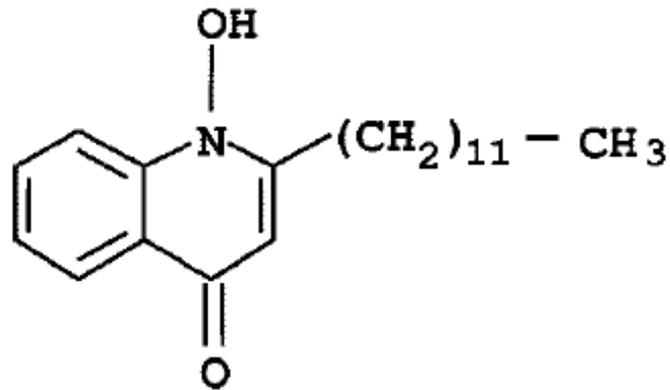


Abbildung 1.5 Schematische Darstellung von HDQ

## 1.7 Ziele dieser Arbeit

Resistenzen gegenüber gängigen Therapeutika stellen bei einer Vielzahl von humanmedizinisch relevanten Erregern ein zunehmendes Problem in der Therapie infektiöser Erkrankungen dar. So ist beispielsweise die Chloroquin-Resistenz der Malariaerreger vor allem in den Ländern Südostasiens und im subsaharischen Afrika ein seit Jahren bekanntes Problem (Ehrhardt et al. 2007, WHO 2006). Über Atovaquon-Resistenz bei der Therapie der Toxoplasmose wird in der Literatur bereits vereinzelt berichtet (Baatz et al. 2006, Megged et al. 2008). Dem Problem von Erregerresistenzen gegenüber aktuellen Therapeutika muss durch die Entwicklung neuer Medikamente entgegengewirkt werden.

Die mitochondriale Atmungskette ist ein gut etablierter Angriffspunkt gegen die Erreger der Malaria und der Toxoplasmose. Atovaquon hemmt die Atmungskette im Komplex III (McFadden et al. 2000). Dieses Medikament wird zur Therapie beider Erkrankungen eingesetzt. Es besteht ein fundamentaler Unterschied im Aufbau der Atmungskette zwischen den Wirtszellen und den Parasiten: Toxoplasmen und Plasmodien besitzen eine alternative NAHD-Dehydrogenase anstelle des konventionellen Komplex I der mitochondrialen Atmungskette. Da die alternative NADH-Dehydrogenase nicht in humanen Zellen vorkommt, stellt sie einen viel versprechenden Angriffspunkt gegen diese Parasiten dar.

Die vorliegende Arbeit will dazu beitragen, weitere Erkenntnisse über die Inhibition der *T. gondii*-Replikation durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette zu erhalten.

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist, dass die Substanz 1-Hydroxy-2-Dodecyl-4(1)-Quinolon (HDQ) in Enzymassays kürzlich als hoch affiner Inhibitor der alternativen NADH-Dehydrogenase identifiziert werden konnte (Eschemann et al. 2005). In der Zellkultur erwies sich HDQ als effektiver Inhibitor des Parasitenwachstums von *Plasmodium falciparum* und *Toxoplasma gondii* (Saleh et al. 2007). Des Weiteren konnte sowohl bei *P. falciparum* als auch beim RH-TATi-Stamm von *T. gondii* ein synergistischer Effekt zwischen HDQ und Atovaquon demonstriert werden (Saleh et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit sollen Genotyp-I- und -II-*T. gondii*-Stämme sowie *knock-out* Mutanten für Gene des Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsels auf ihre Sensitivität gegenüber HDQ verglichen werden. Ein weiterer Schwerpunkt soll darin liegen, den Langzeiteffekt von HDQ genauer zu beleuchten. Außerdem soll neben HDQ ein Derivat mit einer kürzeren Alkyl-Seitenkette auf die Wirkung gegenüber Toxoplasmen getestet werden. Darüber hinaus sollen verschiedene *T. gondii*-Stämme auf einen potenziellen Synergismus von HDQ mit anderen Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette untersucht werden. Hierbei werden Atovaquon und Antimycin A als Komplex-III-Inhibitoren verwendet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Modell und Hersteller</b>
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Fluoreszenzmikroskop	Modell DM R, Leica, Heidelberg
Magnetrührer	RCT basic, IKA Labortechnik, Staufen
pH-Meter	Modell 766 Calimatic, Knick, Berlin
Photometer	Ultrospec 1000, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England
Pipetten	Modell Research, Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Sterilbank	BDK-S 1800, BDK Luft- und Reinraum-Technik GmbH, Sonnenbrühl
Thermomixer	Modell Compact, Eppendorf, Hamburg
Videomikroskop	Axiovert 200 M, Zeiss, Jena
Vortexer	Reax Top, Heidolph, Kelheim
Waagen	CP 224 S, Sartorius, Göttingen LP 6200 S, Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zählkammer	Neubauer SUPERIOR, Marienfeld, Landa-Könighofen
Zellkulturmikroskop	Modell DM IL, Leica, Heidelberg
Zentrifugen	Megafuge 2.0 RS, Heraeus, Hanau Megafuge 2.0, Heraeus, Hanau Mini Centrifuge, C1201, Labnet International, Woodbridge

## 2.1.2 Medien und Verbrauchsmaterial in der Zellkultur

### 2.1.2.1 Medien und ihre Zusätze

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	mit 580 mg/l L-Glutamin; 4,5 g/l D-Glukose; 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> ; 8 mg/l Phenolrot
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	mit L-Glutamin; 4,5 g/l D-Glucose; 25 mM HEPES; ohne Sodium-Pyruvat, ohne Phenolrot
EDTA (Versen) 1%	in PBS ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>
Fetales Kälberserum (FCS)	inaktiviert durch 45 min Inkubation im 56° C warmen Wasserbad
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	in H <sub>2</sub> O bidest., mit CaCl <sub>2</sub> , MgCl <sub>2</sub> , ohne NaHCO <sub>3</sub>
NaHCO <sub>3</sub> 7,5%	in PBS
Phosphate Buffered Saline (PBS)	in H <sub>2</sub> O bidest.
Penicillin/Streptomycin (P/S)	10.000 U /10.000 µg/ml
Trypsin-EDTA 0,05%	in HBSS ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>

Alle Medien und Zusätze wurden von Biochrom, Berlin bezogen.

### 2.1.2.2 Verbrauchsmaterial in der Zellkultur

Von folgenden Unternehmen wurde das Verbrauchsmaterial für die Zellkultur geliefert: Nunc, Roskilde (Dänemark); Falcon, Becton-Dickinson (Heidelberg); Corning/Costar (Bodenheim); Greiner (Frickenhausen) und Braun, Braun-Melsungen (Melsungen).

### 2.1.3 Zelllinien

Zelllinie	Spezifizierung
Parasiten	
<i>T. gondii</i> -Stämme	
Genotyp I	RH-TATi RH/ $\Delta$ <i>uprt</i> RH/ $\Delta$ <i>hxgprt</i> / <i>sag1-lacZ</i> RH/ $\Delta$ <i>hxgprt</i> / $\Delta$ <i>uprt</i> / <i>sag1-lacZ</i>
Genotyp II	ME49 ME49/Atv <sup>r</sup>
Wirtszellen	
Humane Vorhaut-Fibroblasten ( <i>human foreskin fibroblasts</i> , HFF)	

In den Versuchen dieser Arbeit wurden Tachyzoiten von Genotyp-I- und -Genotyp-II-*T. gondii*-Laborstämmen verwendet.

Als Genotyp-I-Parasiten standen Toxoplasmen des RH-TATi-Stamms (Meissner et al. 2002) zur Verfügung. In den RH/ $\Delta$ *uprt*-Parasiten ist die Uracil-Phosphoribosyl-Transferase (UPRT), ein Schlüsselenzym des Pyrimidin-*salvage-pathways*, deletiert (Iltzsch 1993). Die RH/ $\Delta$ *hxgprt*/*sag1-lacZ*-Parasiten weisen Defekte in der Hypoxanthin-Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HXGPRT) auf. Die HXGPRT stellt neben der Adenosin-Kinase ein wichtiges Enzym im Purin-*salvage-pathway* von *T. gondii* dar (Chaudhary et al. 2005). In RH/ $\Delta$ *hxgprt*/ $\Delta$ *uprt*/*sag1-lacZ*-Parasiten liegen die Gendeletionen sowohl im Purin- als auch im Pyrimidin-*salvage-pathway* vor. Die beiden zuletzt beschriebenen Mutanten exprimieren zusätzlich eine *E. coli*- $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*), die für eine Quantifizierung des Parasitenwachstums benutzt werden kann (McFadden et al. 1997).

Als Genotyp-II-Parasiten wurden ME49 und ME49/Atv<sup>r</sup>-Parasiten (Tomavo und Boothroyd 1995) verwendet. Die Mutante ME49/Atv<sup>r</sup> ist resistent gegenüber Atovaquon (McFadden et al. 2000).

### 2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Die eingesetzten Chemikalien und Reagenzien wurden soweit nicht anders im Text erwähnt von den Firmen Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Calbiochem (Bad Soden), Invitrogen (Auckland) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Die verwendeten Lösungen wurden generell mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

### 2.1.5 Filter

Corning Bottle Top Filter, 0,22  $\mu\text{m}$  CA (Cellulose Acetate)

Corning 26 mm Syringe Filter, 0,20  $\mu\text{m}$  Micron Membran, 0,45  $\mu\text{m}$  Micron Membran

### 2.1.6 Medikamente

HDQ (C12, Abbildung 1.5) und ein weiteres 1-Hydroxy-2-Alkyl-4(1)Quinolon-Derivat (C6) wurden von Walter Oettmeier von der Ruhr-Universität Bochum zur Verfügung gestellt. Das Molekulargewicht für HDQ beträgt 419 g/mol. Die Derivate wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und als 2,5-mM-Stammlösung aliquotiert.

Das Molekulargewicht von Atovaquon beträgt 367 g/mol. Atovaquon wurde ebenfalls in DMSO gelöst und als 10-mM-Stammlösung aliquotiert.

Antimycin A aus *Streptomyces spp.* ist ein Mischprodukt aus Antimycin A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> und A<sub>3</sub> von Sigma-Aldrich. Nach telefonischer Rücksprache mit dem Hersteller wurde 532 g/mol als Molekulargewicht für Antimycin A angenommen. Antimycin A wurde als 10-mM-Stammlösung in Ethanol 95% angesetzt.

Die Aliquote der Stammlösungen aller Wirkstoffe wurden bei -20° C aufbewahrt. Die Verdünnungsreihen der verwendeten Inhibitoren wurden für jeden Versuch frisch in vorgewärmtem Zellkulturmedium DMEM mit Phenolrot (1% FCS, 1% P/S) hergestellt. Hierbei wurden die Stammlösungen mindestens 1:2500 (HDQ) bzw.

1:10000 (Atovaquon und Antimycin) verdünnt, so dass der Einfluss des Lösungsmittels auf die Parasiten vernachlässigt werden kann.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Kultur und Passagieren humaner Vorhaut-Fibroblasten

Zur Kultivierung der Parasiten wurden humane Vorhaut-Fibroblasten (*human foreskin fibroblasts*, HFF) als Wirtszellen verwendet. Die Fibroblasten wurden je nach Bedarf in 24er Lochplatten, 25-cm<sup>2</sup>- und 175-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen ausgesät und in DMEM, das mit 10% FCS und 1% P/S versetzt worden war, unter 5% CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank bei 37° C herangezüchtet. Ein konfluenten Zellrasen war, je nach Passagenummer der Wirtszellen, nach sieben bis zehn Tagen erreicht. Nach konfluentem Wachstum konnten die Wirtszellen entweder mit *T. gondii* infiziert oder erneut passagiert werden. Zur weiteren Passage wurde der konfluente Zellrasen mit 1% EDTA gewaschen, um alte Zelltrümmer zu entfernen. Daraufhin wurden die Fibroblasten mit 0,05% Trypsin-EDTA versetzt, um sie von der Zellkulturflasche abzulösen und die Zell-Zell-Verbindungen zu lockern. Diese Suspension wurde mit dem gleichen Volumen DMEM 10% FCS und 1% P/S versetzt, in ein Falcon-Röhrchen gegeben und bei 1380 Umdrehungen pro Minute (Upm) für 5 Minuten (min) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das verbleibende HFF-Pellet wurde mit vorgewärmtem DMEM 10% FCS und 1% P/S resuspendiert und in einer Zellkulturflasche auf das benötigte Volumen aufgefüllt. Die HFF-Suspension wurde auf neue Zellkulturflaschen und Lochplatten verteilt und unter o.g. Bedingungen bis zum konfluenten Wachstum inkubiert.

#### 2.2.1.2 Kultur von *Toxoplasma gondii*

Für diese Arbeit wurden Tachyzoiten verschiedener *T. gondii*-Stämme verwendet (siehe Kapitel 2.1.3). Die obligat intrazellulären Parasiten wurden in mit konfluentem

HFF-Zellrasen beschichteten 25-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen in DMEM 1% FCS und 1% P/S bei 5% CO<sub>2</sub>-Begasung und 37° C kultiviert. Nachdem die Wirtszellschicht durch die Parasiten komplett lysiert worden war, erfolgte eine erneute Passage der Toxoplasmen auf frischen konfluenten HFF-Zellschichten. Die Passagierzeit war vom jeweiligen *T. gondii*-Stamm und der Infektionsmenge abhängig. Die Genotyp-I-Stämme RH-TATi, RH/ $\Delta$ hxgp<sub>rt</sub>/sag1-lacZ, RH/ $\Delta$ up<sub>rt</sub> und RH/ $\Delta$ hxgp<sub>rt</sub>/ $\Delta$ up<sub>rt</sub>/sag1-lacZ wurden alle zwei bis drei Tage passagiert. Im Gegensatz dazu erfolgte die Passage der Genotyp-II-Stämme ME49 und ME49/Atv<sup>f</sup> alle vier bis fünf Tage. Die Wirtszellen mit den Parasiten der Genotyp-II-Stämme wurden bei der Passage mit Zellschabern von der Zellkulturflasche gelöst. Diese Suspension wurde durch eine 20-G- und eine 26-G-Kanüle gezogen, um alle parasitophoren Vakuolen aufzubrechen und die Passage mit möglichst vitalen Toxoplasmen durchzuführen.

Zellkulturmedium	
Inhaltsstoffe	Konzentration, Stoffmenge
DMEMx1	500 ml
FCS	50 ml (für Wirtszellen) 5 ml (für Parasiten)
Penicillin/Streptomycin	5 ml 10000 U/10000 µg/ml

### 2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von *Toxoplasma gondii*

#### 2.2.1.3.1 Einfrieren intrazellulärer Parasiten

Die Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff ermöglicht es, *Toxoplasma gondii* intrazellulär über mehrere Jahre zu lagern.

Eine mit einem konfluenten Zellrasen humaner Vorhaut-Fibroblasten beschichtete 25-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wurde mit 10 ml vorgewärmtem DMEM 1% FCS 1% P/S versetzt und mit frisch lysierten Toxoplasmen infiziert. 24 Stunden (h) nach der Infektion des Monolayers wurde das Medium abgesaugt und 2 ml vorgewärmtes Trypsin-EDTA wurde auf die infizierten Wirtszellen gegeben, um die Zellen untereinander zu lösen. Das Trypsin-EDTA wurde anschließend vorsichtig abgesaugt. Die infizierten Wirtszellen wurden durch kräftiges Schlagen mit der

flachen Hand gegen die Zellkulturflasche von dieser abgelöst und in 2 ml DMEM 10% FCS 1% P/S resuspendiert. Die Zellen wurden dann mit dem gleichen Volumen eines konzentrierten Einfriermediums versetzt. Diese Suspension wurde gut gemischt, in Kryoröhrchen aliquotiert und zunächst für einige Tage auf - 80° C heruntergekühlt. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Aliquote in flüssigen Stickstoff (- 196° C) überführt.

Einfriermedium	
Inhaltsstoffe	Konzentration, Stoffmenge
DMEM	1x
FCS	40%
DMSO	20%

Das Einfriermedium kann bei 4° C über längere Zeit gelagert werden.

### 2.2.1.3.2 Auftauen von *T. gondii*

Um die Parasiten aufzutauen, wurden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff genommen und in ein 37° C Wasserbad gehalten. Die Suspension mit den intrazellulären Toxoplasmen wurde dann in eine konfluente Zellkulturflasche mit vorgewärmtem DMEM 1% FCS 1% P/S überführt und unter 5% CO<sub>2</sub>-Begasung bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um das für die Toxoplasmen und Wirtszellen toxische DMSO des Einfriermediums zu entfernen.

## 2.2.2 Wachstumsassays

### 2.2.2.1 Zählassay

Um die Wachstumsrate von *T. gondii* zu ermitteln, wurde im Zählassay die durchschnittliche Parasitenzahl pro parasitophore Vakuole bestimmt. In Abbildung 2.1 sind mikroskopische Bilder dieses Assays dargestellt.

Für diesen Test wurden HFF-Wirtszellen in 24er Lochplatten ausgesät, welche vorher mit Deckgläschen (Ø 13 mm) ausgelegt wurden. Nach konfluentem

Wachstum der Wirtszellen bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung wurden diese mit dem jeweils zu untersuchenden *T. gondii*-Stamm infiziert.

Zeitgleich zur Infektion der Wirtszellen wurden der zu untersuchende Inhibitor bzw. zwei verschiedene Inhibitoren in der entsprechenden Endkonzentration zugefügt. Eine unbehandelte Kontrolle<sup>33</sup> wurde in allen Versuchen mitgeführt. Die Lochplatten wurden dann unter o.g. Bedingungen weiter inkubiert.

Die Zellen wurden 24 h p.i. bei Testung der Genotyp-I-*T. gondii*-Stämme bzw. 30 h p.i. bei Testung der Genotyp-II-*T. gondii*-Stämme mit PBSx1 (1 ml/Napf) gewaschen, um extrazelluläre Parasiten zu entfernen. Dann wurden sie mit 4% Paraformaldehyd (PFA) (0,5 ml/Napf) für 10 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBSx1 wurden die Zellen mit 0,25% Triton X-100 (0,5 ml/Napf) für 20 min bei RT permeabilisiert, um einen besseren Kontrast unter dem Mikroskop zu erhalten. Es folgte ein nochmaliges Waschen der Zellen mit PBSx1. Anschließend wurden die Deckgläschen vorsichtig mit einer Pinzette aus den Lochplatten gehoben, kurz in entmineralisiertes Wasser getaucht und dann mit Mowiol (10 µl/Deckglas) auf Objektträger aufgebracht. Dabei wurde die mit Zellen beschichtete Seite des Deckgläschens nach unten auf den Objektträger gelegt. Die fertigen Präparate wurden über Nacht im Kühlschrank bei 4° C getrocknet.

Die Präparate wurden im Phasenkontrastmikroskop mit einer 63-fachen Vergrößerung ausgewertet. Bei diesem Versuch wurden mindestens 100 parasitophore Vakuolen pro Deckglas ausgezählt. Die vorliegenden Ergebnisse der Zählassays sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit Duplikaten ±SE.

---

4% PFA in PBS	
Inhaltsstoffe	Konzentration, Stoffmenge
PFA	16 g
PBSx1	ad 400 ml

In einem geschlossenen Gefäß mit Hilfe des Magnetrührers bei 70° C mehrere Stunden gut mischen lassen, bis sich das PFA-Pulver sichtbar gelöst hat.

---

<sup>33</sup> Als unbehandelte Kontrolle werden in der vorliegenden Arbeit mit *T. gondii* infizierte HFF-Wirtszellen bezeichnet, die ohne Inhibitor inkubiert wurden. Methodisch wurde die unbehandelte Kontrolle ansonsten wie alle anderen Ansätze des jeweiligen Versuchs behandelt.

---

### 0,25% Triton X-100 in PBS

---

Inhaltsstoffe	Konzentration, Stoffmenge
Triton X-100	1,25 ml
PBSx1	ad 500 ml

Längeres Durchmischen mit dem Magnetrührer ist für die gleichmäßige Verteilung des zähflüssigen Triton X-100 notwendig.

---

---

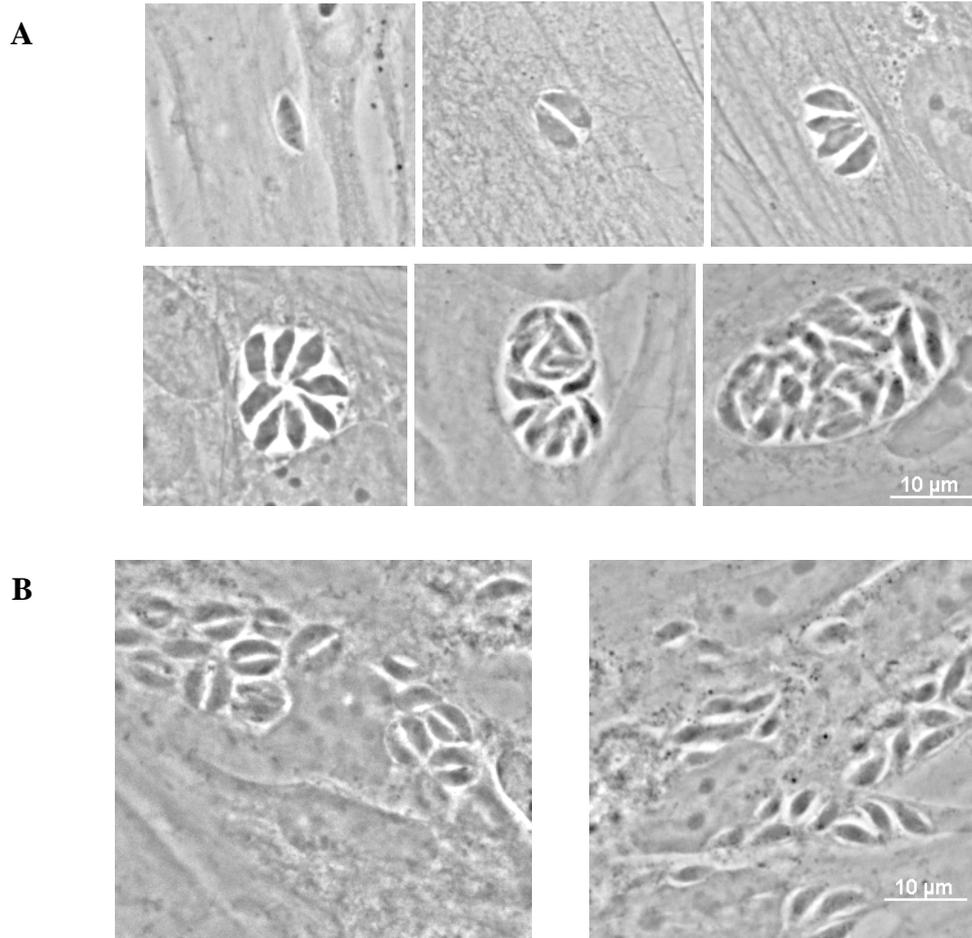
### Mowiol

---

Inhaltsstoffe	Konzentration, Stoffmenge
Mowiol 4-88	2,4 g
Glycerin	6 g
H <sub>2</sub> O bidest.	6 ml
Tris-Puffer	12 ml 0,2 M (pH 8,5)

Die Inhaltsstoffe bei 4° C gut vermischen, bis eine klare Lösung entsteht. Die Lösung wird bei 50° C für 10 min inkubiert und bei 5000 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand kann aliquotiert und bei - 20° C aufbewahrt werden.

---



**Abbildung 2.1** Phasenkontrastmikroskopische Darstellung von *T. gondii*

HFF-Wirtszellen wurden mit dem Genotyp-I-*T. gondii*-Stamm RH-TATi infiziert. Die Auswertung der Zählassays erfolgte mikroskopisch im Phasenkontrast mit einer 63-fachen Vergrößerung. Dargestellt sind Vakuolen mit 1, 2, 4, 8, 16 und 32 Parasiten (A) sowie Beispiele einer partiellen Lyse von Wirtszellen (B). Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm und gilt für alle in dieser Abbildung gezeigten Bilder.

### 2.2.2.2 LacZ-Assay

Ein zweites unabhängiges Wachstumsassay stellt das so genannte CPRG-basierte lacZ-Assay dar, bei dem zur Ermittlung der Wachstumsrate des Parasiten die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität eines mit dem *E. coli*-lacZ-Gen transfizierten *T. gondii*-Stammes bestimmt wird (McFadden et al. 1997).

Für diesen Test wurden HFF-Wirtszellen in 24er Zellkultur-Lochplatten ausgesät. Nach konfluentem Wachstum der Wirtszellen wurden diese einmal mit DMEM ohne Phenolrot 1%FCS 1%P/S gewaschen und mit einer  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität besitzenden *T. gondii*-RH-Stamm (Bohne und Roos 1997) infiziert. In den Versuchen mit dem lacZ-Assay wurden die  $\beta$ -Galaktosidase-exprimierenden *T. gondii*-RH-Stämme RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ und RH/ $\Delta$ hxgprt/ $\Delta$ uprt/sag1-lacZ verwendet. Die Parasiten wurden wie folgt für dieses Assay vorbereitet: 48 h nach der Infektion eines HFF-Monolayers wurde dieser mit einem Zellschaber von der Zellkulturflasche gelöst und die Suspension wurde jeweils einmal durch eine 20-G- und durch eine 26-G-Kanüle gezogen, um die parasitophoren Vakuolen aufzubrechen und möglichst vitale Toxoplasmen zu erhalten. Diese Suspension wurde in ein Falcon-Röhrchen gegeben und bei 400 Upm für 5 min zentrifugiert. Im Pellet sammelten sich Zelltrümmer der humanen Vorhaut-Fibroblasten. Die sich im Überstand befindlichen Parasiten wurden mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt. Bei den Kurzzeitversuchen bis 26 h p.i. wurden  $5 \times 10^4$  Parasiten pro Napf eingesetzt. Da bei den Langzeitversuchen bis 96 h p.i. die Möglichkeit eines vermehrten Parasitenwachstums auch unter Inhibition in Betracht gezogen werden musste, wurde für diese Versuche eine niedrigere Toxoplasmenzahl von  $2,5 \times 10^4$  Parasiten pro Napf gewählt. Die infizierten Wirtszellen wurden für 2 h bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert, so dass die vitalen Parasiten in die Zellen eindringen konnten. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen zweimal mit vorgewärmtem DMEM 1%FCS 1% P/S ohne Phenolrot gewaschen. Die Waschschrte dienen dazu, möglichst viele tote Parasiten zu entfernen, da extrazelluläre Parasiten die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität beeinflussen würden. Anschließend wurde der zu untersuchende Wirkstoff in der jeweiligen Endkonzentration zugefügt. Bei allen Versuchen wurden infizierte Wirtszellen ohne Inhibitor als unbehandelte Kontrolle sowie nicht infizierte Wirtszellen ebenfalls ohne

Wirkstoff als Leerwert mitgeführt. Es folgte eine Inkubation für weitere 21 h bei den Kurzzeitversuchen bzw. für weitere 21, 45, 69 und 93 h bei den Langzeitversuchen unter o.g. Bedingungen. Nach insgesamt 23 h bzw. 23, 47, 71 und 95 h p.i. wurde die Inkubation beendet, indem jedem Napf 350 µl einer Fixierlösung (4% Formaldehyd, 250 mM NaCl in HBSS) zugefügt wurde. Die Zellen wurden damit für 20 min bei RT inkubiert. Das Medium mit der Fixierlösung wurde anschließend vorsichtig abgesaugt. Dann wurden die Zellen einmal mit HBSSx1 (1 ml/well) für 10 bis 20 min gewaschen. In jeden Napf wurden danach also zum Zeitpunkt von 24, 48, 72 bzw. 96 h p.i. 900 µl einer frisch hergestellten CPRG-Substratlösung pipettiert (Abbildung 2.2 A). Die Zellkultur-Lochplatte wurde bis zum sichtbaren Farbumschlag bei 37° C und unter 5% CO<sub>2</sub>-Begasung weiter inkubiert (Abbildung 2.2 B).

Die CPRG-Substratlösung hat eine hellgelbe Farbe. Beim Umsetzen des Substrats Chlorophenol-Rot-β-D-Galaktopyranosid durch die β-Galaktosidase-Aktivität der *E. coli-lacZ*-Gen exprimierenden Parasiten wird Galaktose abgespalten und es tritt eine Rotfärbung durch das frei werdende Chlorophenol-Rot im Medium auf.

Das Parasitenwachstum wurde 26, 50, 74 und 98 h nach der Infektion durch Messen der optischen Dichte bei 570 nm im Photometer bestimmt. Der Ansatz für dieses Wachstumsassay erfolgte in Triplikaten. Die vorliegenden Daten ergeben sich aus den optischen Dichten bei 570 nm in Prozent zum Mittelwert der unbehandelten Kontrollen aus zwei unabhängigen Versuchen ±SE.

---

Fixierlösung	
Inhaltsstoffe	Konzentration, Stoffmenge
Formaldehyd	2,7 ml 37%
NaCl	1,25 ml 5 M
NaOH	200 µl 3 N
HBSSx1	ad 20,85 ml

---

Die Inhaltsstoffe bei RT mischen und die Lösung auf pH 7,4 bis 8 einstellen. Die Fixierlösung kann bei 4° C aufbewahrt werden.

---

---

### CPRG-Substratlösung

---

Inhaltsstoffe	Konzentration, Stoffmenge
CPRG-Stammlösung	10 µl 100 mM
Triton X-100	100 µl 10 %
MgCl <sub>2</sub>	50 µl 1 M
HBSSx1	ad 10 ml

---

---

### 100-mM-CPRG-Stammlösung

---

Inhaltsstoffe	Konzentration, Stoffmenge
Chlorophenol-Rot-β-D-Galaktopyranosid-Pulver	MG 607,4 g/mol
HEPES	100 mM (pH 7,2)

Das CPRG-Pulver mit HEPES für einige min bei 37° C im Thermomixer lösen sowie im Vortexer gut durchmischen lassen. Die Stammlösung kann aliquotiert und bei - 20° C aufbewahrt werden.

---

---

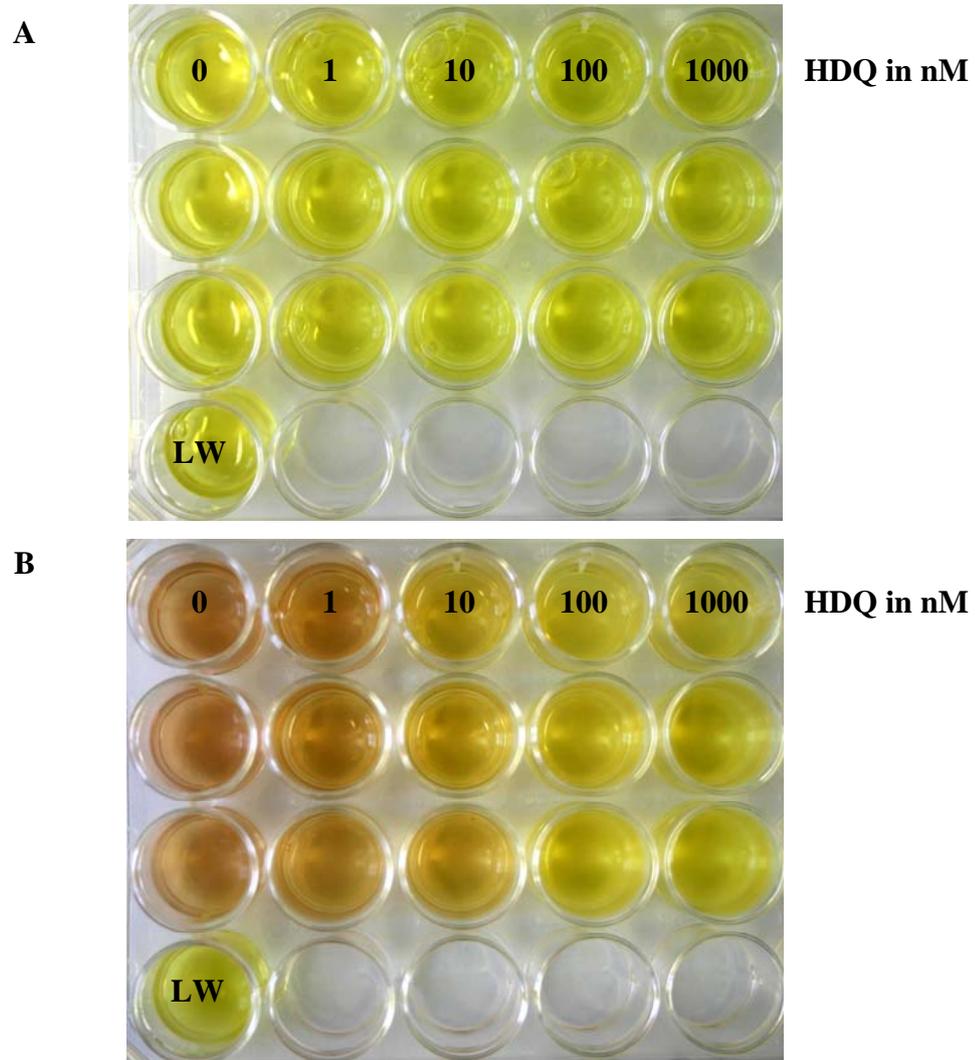
### HBSSx1

---

Inhaltsstoffe	Konzentration, Stoffmenge
HBSSx10 (GIBCO) ohne Phenolrot	100 ml
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 900 ml
NaHCO <sub>3</sub>	4,6 ml 7,5%

HBSSx10 mit H<sub>2</sub>O bidest. mischen und sterilisieren.  
NaHCO<sub>3</sub> über einen Filter dazugeben.

---



**Abbildung 2.2 LacZ-Assay zur Bestimmung der Sensitivität von *T. gondii* gegenüber HDQ**

HFF-Wirtszellen wurden in 24er Zellkultur-Lochplatten zum konfluenten Wachstum gebracht und mit  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität besitzenden RH/*Ahxgprt/sag1-lacZ*-Parasiten ( $5 \times 10^4$  Parasiten pro Napf) (Bohne und Roos 1997) infiziert. 2,5 h p.i. wurden die Zellen mit den angegebenen HDQ-Konzentrationen behandelt. Die Zugabe der CPRG-Substratlösung erfolgte 24 h p.i. (A). Bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung wurden die Zellen bis zum sichtbaren Farbumschlag weiter inkubiert (B). Das Parasitenwachstum wurde 26 h p.i. durch Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität durch Messung der OD [570 nm] im Photometer ermittelt. Der Leerwert (LW) entspricht den nicht infizierten Wirtszellen ohne Gabe eines Inhibitors.

## 2.2.3 Bestimmungen und Berechnungen

### 2.2.3.1 Bestimmung der inhibitorischen Konzentration 50%

Unter der inhibitorischen Konzentration 50% (IC 50%) versteht man die notwendige Konzentration eines Wirkstoffes, die das Wachstum eines Erregers um die Hälfte reduziert.

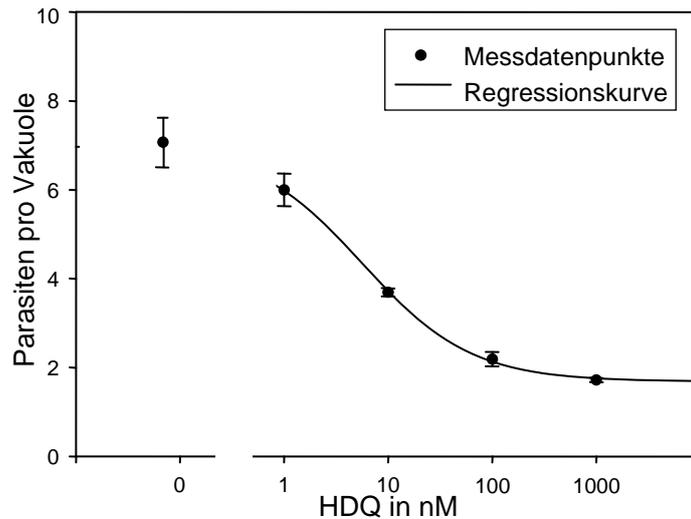
Die Ermittlung der IC 50% erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe des Programms SigmaPlot©. Das Programm besitzt ein *pharmacology tool*, mit dem aus den ermittelten Messdaten eine Wachstumskurve erstellt wird. Hierbei wurden die Vierfach-Bestimmungen des Zählassays bzw. die Sechsfach-Bestimmungen des lacZ-Assays als einzelne Replikate gewertet. Die ermittelte Wachstumskurve wurde anhand einer nicht linearen Regressionsanalyse mit s-förmigem Kurvenverlauf erstellt. Laut Programm entspricht dies einer typischen Dosis-Wirkungskurve. SigmaPlot© berechnet die IC 50% mit folgender Formel:

$$y = \min + \frac{(\max - \min)}{\left(1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)^{\text{Hillslope}}\right)}$$

**Formel 2.1 Von SigmaPlot© verwendete Gleichung zur Berechnung der IC 50%**

<u>mit:</u>	min	niedrigster Wert der Kurve, entspricht einem Plateau der Kurve unter maximaler Inhibition.
	max	höchster Wert der Kurve, entspricht einem Plateau der Kurve ohne Inhibition.
	EC 50	mittlere effektive Konzentration. Es wird erwartet, dass diese Konzentration einen definierten Effekt auf 50% der Organismen unter definierten Bedingungen hat. In dieser Arbeit wird die hier ermittelte EC 50 der IC 50% gleichgesetzt.
	Hillslope	beschreibt die Steigung der Kurve an ihrem Umschlagspunkt.

In Abbildung 2.3 ist beispielhaft die Regressionsanalyse der Dosis-Wirkungskurve von HDQ bei RH-TATi-Parasiten im Zählassay dargestellt.



**Abbildung 2.3 Regressionsanalyse zur Bestimmung der IC 50% für HDQ bei RH-TATi**

Die hier dargestellte s-förmige Dosis-Wirkungskurve wurde mit SigmaPlot© erstellt. Der nicht linearen Regressionskurve liegt die Berechnung von x- und y-Werten mit Hilfe der Formel 2.1 und der durch die Versuche ermittelten Messdaten zugrunde.

### 2.2.3.2 Berechnung des Synergismus von Wirkstoffen

Zur Ermittlung eines potenziellen Synergismus wurde in dieser Arbeit die Methode der Summe der fraktionierten inhibitorischen Konzentration ( $\sum FIC$ ) auf Basis der IC 50% genutzt (Berenbaum 1978). Bei dieser etablierten Methode (Lütgendorf et al. 2006, Marchetti et al. 2000, Murphy und Lang-Unnasch 1999) wird die in Formel 2.2 dargestellte Gleichung verwendet.

$$\sum FIC = \left[ \frac{\text{IC 50\% Wirkstoff A in Kombination}}{\text{IC 50\% Wirkstoff A alleine}} \right] + \left[ \frac{\text{IC 50\% Wirkstoff B in Kombination}}{\text{IC 50\% Wirkstoff B alleine}} \right]$$

**Formel 2.2 Berechnung der Summe der fraktionierten inhibitorischen Konzentration zweier Wirkstoffe**

Eine  $\sum FIC < 1$  ergibt sich bei synergistischer,  $= 1$  bei additiver und  $> 1$  bei antagonistischer Wirkung zweier Inhibitoren (Berenbaum 1978).

Eine  $\sum FIC$  kleiner eins zeigt eine synergistische, gleich eins eine additive und größer eins eine antagonistische Wirkung der verwendeten Inhibitoren an (Berenbaum 1978). Diese Methode ist anwendbar, wenn gezeigt wird, dass die Einzelkomponenten der Kombination identische Dosis-Wirkungskurven haben

(Lambert und Lambert 2003) und wenn nicht lineare Regressionskurven verwendet werden. Dies war bei den verwendeten Inhibitoren der Fall. Einige Autoren verwenden für den potenziellen Synergismus eine striktere Definition der  $\sum FIC = 0,5$  (Uppuluri et al. 2008, Bonapace et al. 2000, White et al. 1996). Eine beispielhafte Darstellung zur Bestimmung der  $\sum FIC$  mit der Frage nach einem potenziellen Synergismus zeigt die Formel 2.3.

$$\begin{aligned}\sum FIC &= \left[ \frac{IC\ 50\% \text{ ATV} + \text{HDQ}}{IC\ 50\% \text{ ATV}} \right] + \left[ \frac{IC\ 50\% \text{ ATV} + \text{HDQ}}{IC\ 50\% \text{ HDQ}} \right] \\ \sum FIC &= \left[ \frac{2,9 \text{ nM}}{28 \text{ nM}} \right] + \left[ \frac{2,9 \text{ nM}}{5,6 \text{ nM}} \right] \\ \underline{\underline{\sum FIC = 0,62}}\end{aligned}$$

**Formel 2.3 Beispiel für die Berechnung eines potenziellen Synergismus nach Formel 2.2**

Dargestellt ist die Berechnung der Summe der fraktionierten inhibitorischen Konzentration ( $\sum FIC$ ) auf Basis der IC 50% bei RH-TATi-Parasiten. Bei diesen Parasiten besteht zwischen HDQ und Atovaquon (ATV) tendenziell ein Synergismus.

### 2.2.4 Datenverarbeitung

Die Daten der vorliegenden Arbeit wurden sowohl mit Microsoft Excel© als auch mit SigmaPlot© verarbeitet. Bei dieser Datenverarbeitung wurden das arithmetische Mittel und der Standardfehler (SE) berechnet.

Alle Grafiken wurden ausschließlich mit SigmaPlot© erstellt. Abbildung 2.1 wurde mit AxioVision©, Abbildung 2.2 mit der Kamera Canon EOS 300 D Digital aufgenommen. Als Textverarbeitungsprogramm diente Microsoft Word©.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 HDQ inhibiert die Replikation verschiedener *T. gondii*-Stämme in Kurzzeitversuchen (24-30 h p.i.): ein Vergleich mit Hilfe der IC 50%

HDQ, ein neuer Inhibitor der alternativen NADH-Dehydrogenase, erwies sich als sehr effektiv in der Hemmung des Wachstums von RH-TAT<sub>i</sub>, einem Genotyp-I-*T. gondii*-Stamm (Saleh et al. 2007). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, inwiefern andere *T. gondii*-Stämme bzw. definierte Gendelektionsmutanten in gleichem Ausmaß durch HDQ gehemmt werden. Verglichen wurden RH-TAT<sub>i</sub>-Parasiten mit der Gendelektionsmutante RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ, die Defekte im Purinstoffwechsel aufweist. Diese Mutante exprimiert zusätzlich eine *E. coli*- $\beta$ -Galaktosidase (lacZ), die für eine Quantifizierung des Parasitenwachstums verwendet werden kann (McFadden et al. 1997). Als Vertreter der Genotyp-II-Isolate wurden der ME49-Stamm sowie eine Atovaquon-resistente Mutante dieses Stammes ME49/Atv<sup>r</sup> verwendet. Die IC 50%<sup>34</sup> von HDQ wurde für die verschiedenen *T. gondii*-Stämme durch zwei unterschiedliche Wachstumsassays bestimmt.

#### 3.1.1 IC 50%-Ermittlung durch Bestimmung der durchschnittlichen Parasitenzahl pro Vakuole im Zähllassay

HFF-Zellen wurden mit frisch lysierten Toxoplasmen des jeweiligen *T. gondii*-Stammes infiziert. Zeitgleich zur Infektion wurde HDQ in folgenden Endkonzentrationen zugefügt: 1, 10, 100 und 1000 nM. Eine unbehandelte Kontrolle<sup>35</sup> wurde in allen Versuchen mitgeführt. Das Parasitenwachstum wurde durch 4% Paraformaldehyd (PFA) nach 24 h bei den Genotyp-I-*T. gondii*-Stämmen und nach 30 h bei den Genotyp-II-*T. gondii*-Stämmen gestoppt. Das Wachstum der

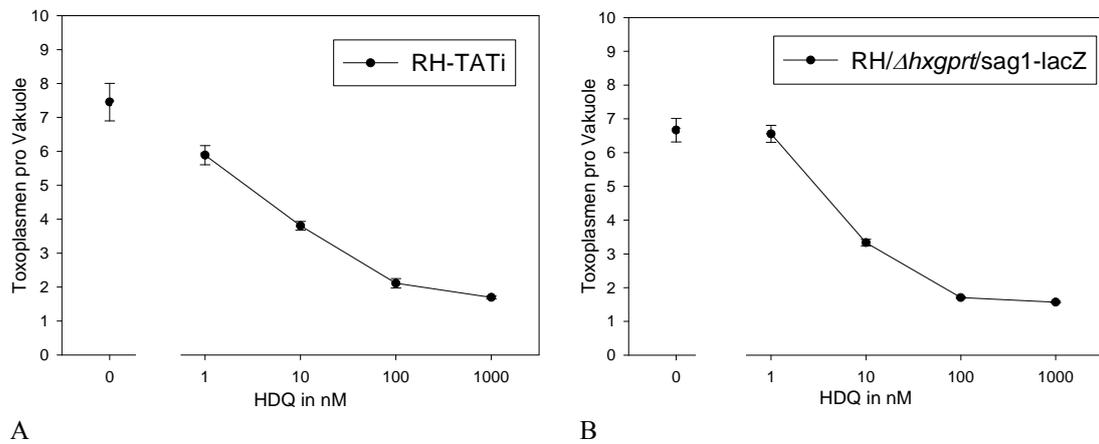
---

<sup>34</sup> Definition und Bestimmung siehe Kapitel 2.2.3.1.

<sup>35</sup> Als unbehandelte Kontrolle werden in der vorliegenden Arbeit mit *T. gondii* infizierte HFF-Wirtszellen bezeichnet, die ohne Inhibitor inkubiert wurden. Methodisch wurde die unbehandelte Kontrolle ansonsten wie alle anderen Ansätze des jeweiligen Versuchs behandelt.

Parasiten wurde durch die mikroskopische Bestimmung der durchschnittlichen Parasitenzahl pro Vakuole im Phasenkontrast ermittelt.

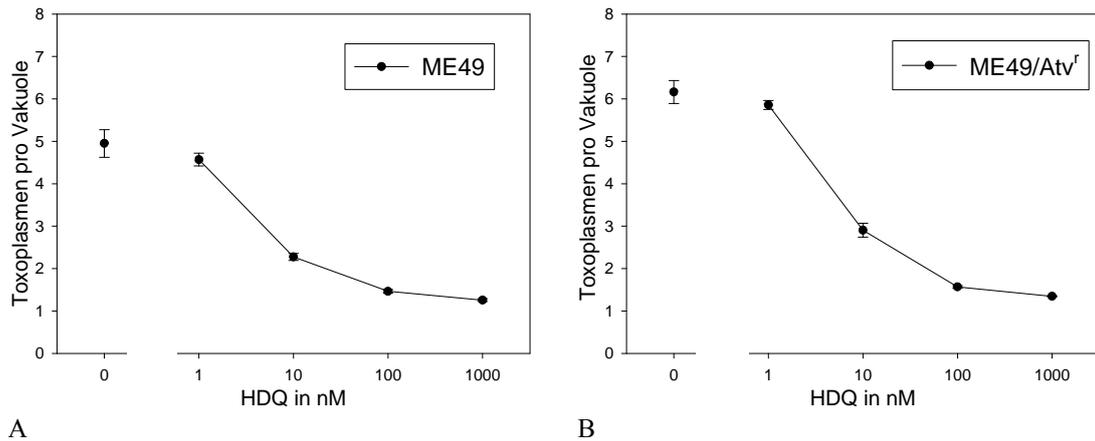
Die Abbildung 3.1 A bestätigt die bereits bekannte Inhibition von RH-TATi durch HDQ (Saleh et al. 2007). Ein Abfall der Wachstumskurve mit zunehmender HDQ-Konzentration zeigt sich ebenfalls bei RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ in Abbildung 3.1 B. Diese Gendeletionsmutante des RH-Stammes zeigt somit eine vergleichbare Sensitivität gegenüber HDQ wie der RH-TATi-Stamm.



**Abbildung 3.1 Bestimmung der Sensitivität von HDQ bei RH-TATi und RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ**  
HFF-Wirtszellen wurden mit RH-TATi, Genotyp I, (A) und der Gendeletionsmutante RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ (B) infiziert. Zeitgleich zur Infektion wurden die Kulturen mit den angegebenen HDQ-Konzentrationen inkubiert. 24 h p.i. wurde die durchschnittliche Parasitenzahl pro Vakuole im Phasenkontrast durch Auszählen von je 100 Vakuolen bestimmt. Die Abbildung zeigt Durchschnittswerte aus Vierfach-Bestimmungen  $\pm$ SE.

In Abbildung 3.2 werden die Wachstumskurven für die untersuchten Genotyp-II-*T. gondii*-Stämme gezeigt. Sowohl ME49 (Abbildung 3.2 A) als auch die Atovaquon-resistente Mutante ME49/Atv<sup>r</sup> (Abbildung 3.2 B) zeigen einen Abfall der Wachstumskurve bei steigender HDQ-Konzentration. Beide Genotyp-II-*T. gondii*-Stämme zeigen einen ähnlichen Verlauf der Wachstumskurven und reagieren somit ebenfalls sensibel auf HDQ.

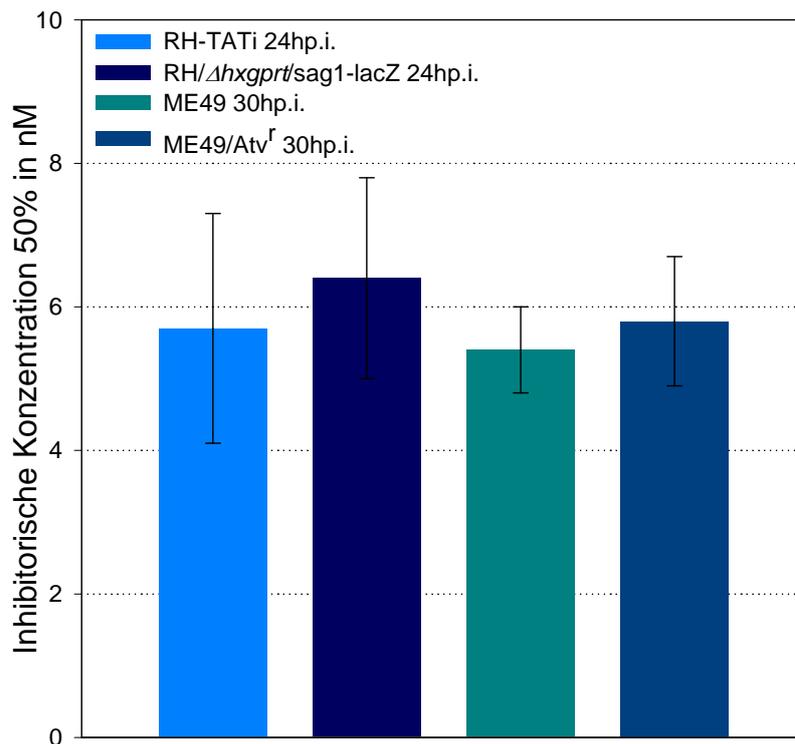
### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.2 Bestimmung der Sensitivität von HDQ bei ME49 und ME49/Atv<sup>r</sup>**

HFF-Zellen wurden mit ME49, Genotyp II, (A) und der Atovaquon-resistenten Mutante ME49/Atv<sup>r</sup> (B) infiziert. Zeitgleich zur Infektion wurden die Kulturen mit den angegebenen HDQ-Konzentrationen inkubiert. 30 h p.i. wurde die durchschnittliche Parasitenzahl pro Vakuole im Phasenkontrast durch Auszählen von je 100 Vakuolen bestimmt. Die Abbildung zeigt Durchschnittswerte aus Vierfach-Bestimmungen ±SE.

Mit Hilfe des Programms SigmaPlot© wurden aus den Daten der Abbildungen 3.1 und 3.2 die inhibitorischen Konzentrationen 50% für die verschiedenen *T. gondii*-Stämme berechnet. Die IC 50%-Werte für HDQ sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Alle getesteten *T. gondii*-Stämme zeigen eine ähnliche IC 50% im Bereich von 5,4 bis 6,4 nM. Somit scheint weder der Genotyp noch die *hxgpri*-Gendeletion sowie die Atovaquon-Resistenz einen Einfluss auf die HDQ-Sensitivität in diesem Kurzzeit-Wachstumsassay zu haben.



**Abbildung 3.3** Darstellung der IC 50% für HDQ in nM  $\pm$ SE verschiedener *T. gondii*-Stämme  
Die Berechnung der IC 50% erfolgte aus den Zählassays (Abbildung 3.1 und 3.2) mit SigmaPlot©.

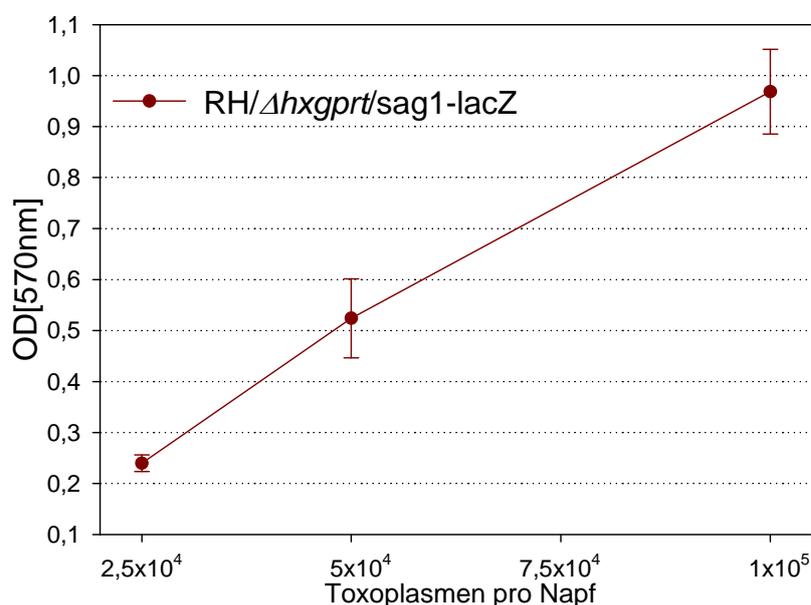
### 3.1.2 Bestimmung der Hemmwirkung von HDQ im lacZ-Assay

Die Ergebnisse des Zählassays sollten durch ein zweites, auf einer anderen Methode beruhendes Wachstumsassay überprüft werden. Für dieses Assay wurden Wirtszellen mit dem  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität besitzenden *T. gondii*-RH-Stamm RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ (Bohne and Roos 1997) infiziert. Um die Linearität des Assays zu gewährleisten, mussten die Versuchsparameter zunächst optimiert werden.

#### 3.1.2.1 Etablierung des lacZ-Assays

Zunächst wurde untersucht, welche Parasitenzahl in den Bereich der Linearität fällt. Die Abbildung 3.4 zeigt, dass im Bereich von  $2,5 \times 10^4$  bis  $5 \times 10^4$  Toxoplasmen pro Napf eine Linearität des Messbereichs vorhanden ist, da eine Verdopplung der Parasitenzahl zu einer Verdopplung der optischen Dichte führt. Diese Verdopplung ist im Bereich von  $5 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^5$  Toxoplasmen pro Napf nicht mehr gegeben. Für

die weiteren Kurzzeitversuche zur Testung von HDQ (Kapitel 3.1.2.2 und 3.4) wurde bei den lacZ-Assays eine Anzahl von  $5 \times 10^4$  Parasiten pro Napf verwendet, um einerseits mit den Messwerten im linearen Bereich zu liegen und um andererseits mit einer optischen Dichte zu arbeiten, die auch noch nach Hemmung der Parasitenreplikation messbar bleibt. Für die Langzeitversuche (Kapitel 3.2 und 3.3) wurde eine niedrigere Anzahl von  $2,5 \times 10^4$  Parasiten pro Napf gewählt, da die Möglichkeit eines vermehrten Parasitenwachstums bis 96 h p.i. auch unter Inhibition in Betracht gezogen werden musste.



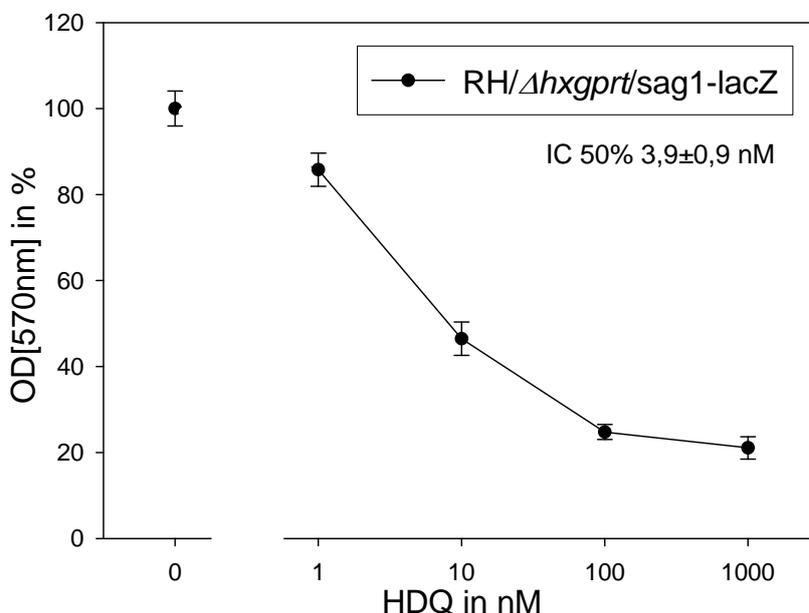
**Abbildung 3.4 LacZ-Assay bei RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ**

Zur Etablierung des lacZ-Assays wurden unterschiedliche Parasitenzahlen ( $2,5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  Toxoplasmen pro Napf) getestet. Dafür wurden HFF-Zellen mit den  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität besitzenden RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ-Parasiten (Bohne und Roos 1997) infiziert. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde 26 h p.i. bei 570 nm im Photometer bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch mit Triplikaten  $\pm$ SE.

### 3.1.2.2 IC 50%-Bestimmung für HDQ im lacZ-Assay

Das optimierte Assay wurde verwendet um die IC 50% von HDQ in RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ-Parasiten zu bestimmen. Das lacZ-Assay bestätigt, dass die RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ-Parasiten durch HDQ effektiv gehemmt werden (Abbildung 3.5). Als IC 50% wurde mit diesem Assay  $3,9 \pm 0,9$  nM HDQ ermittelt.

Verglichen mit den Ergebnissen der IC 50% aus den Zählassays (Abbildung 3.3) ist zu erkennen, dass die IC 50% für HDQ unabhängig von der verwendeten Methode stabil auf einem niedrigen Niveau im nanomolaren Bereich liegt.



**Abbildung 3.5** Testung der Sensitivität von HDQ bei RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ im lacZ-Assay

HFF-Wirtszellen wurden mit  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität besitzenden RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ-Parasiten infiziert. 2,5 h p.i. wurden die Zellen mit den angegebenen HDQ-Konzentrationen inkubiert. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde 26 h p.i. bei 570 nm im Photometer gemessen. Dargestellt sind die optischen Dichten in Prozent des Mittelwertes zur unbehandelten Kontrolle aus zwei unabhängigen Versuchen mit Triplikaten  $\pm$ SE.

### 3.1.3 Tabellarische Zusammenstellung der IC 50%-Daten

Vergleichend zeigt Tabelle 3.1 die Daten aller erhaltenen IC 50% für HDQ der beiden Wachstumsassays in numerischer Darstellung. HDQ hemmt das Wachstum aller getesteten *T. gondii*-Stämme. Dabei ist die inhibitorische Konzentration 50% konstant in einem niedrigen nanomolaren Bereich zu finden, unabhängig vom Genotyp des *T. gondii*-Stammes, unabhängig von einigen Gendelektionen und unabhängig von den getesteten Zeiträumen. Auch bei Atovaquon-resistenten Parasiten wirkt HDQ ähnlich gut wie im unveränderten Ursprungsstamm (Abbildung 3.2). Das lacZ-Assay bestätigt die niedrigen IC 50%-Werte des Zählassays.

**Tabelle 3.1 Inhibitorische Konzentrationen 50% für HDQ bei *T. gondii* in Kurzzeitversuchen**

Darstellung der IC 50% für HDQ verschiedener *T. gondii*-Stämme, ermittelt durch zwei unabhängige Methoden. Die Berechnung der IC 50%  $\pm$ SE erfolgte aus den Daten der vorherigen Abbildungen mit SigmaPlot©.

Genotyp	<i>T. gondii</i> -Stamm	IC 50% von HDQ in nM $\pm$ SE	
		Zähl assay	LacZ-Assay
I	RH-TATi 24 h p.i.	5,7 $\pm$ 1,6	-
	RH/ $\Delta$ hxgp $r$ t/sag1-lacZ 26 h p.i.	6,4 $\pm$ 1,4	3,9 $\pm$ 0,9
II	ME49 30 h p.i.	5,4 $\pm$ 0,6	-
	ME49/Atv <sup>r</sup> 30 h p.i.	5,8 $\pm$ 0,9	-

## 3.2 HDQ-Inhibition im Langzeitversuch

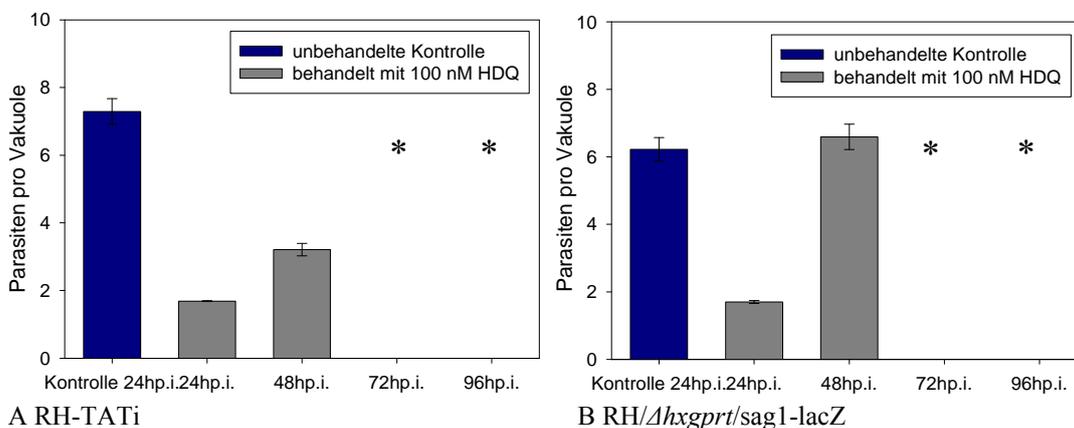
### 3.2.1 Bestimmung der Parasitenreplikation nach HDQ-Behandlung im Zeitraum von 0-96 h p.i.

Wie in Kapitel 3.1 dargestellt, wirkt HDQ stark inhibitorisch im Zeitraum bis 30 h p.i.. Ob sich diese gute inhibitorische Wirkung auch zu späteren Zeitpunkten beobachten lässt, soll im Folgenden betrachtet werden.

Hierzu wurden Wirtszellen mit einer geringen Anzahl Parasiten des RH-Stammes infiziert und zeitgleich zur Infektion einmalig mit HDQ in einer Endkonzentration von 100 nM behandelt. Diese Konzentration wurde gewählt, da die vorherigen Versuche bei 100 nM HDQ eine sehr effektive, fast maximale Hemmung der Parasitenreplikation zeigten. Die Ansätze wurden 24, 48, 72 und 96 h p.i. untersucht. Eine unbehandelte Kontrolle wurde zum Vergleich des Wachstums bis 24 h p.i. mitgeführt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch durch Bestimmung der durchschnittlichen Parasitenzahl pro Vakuole im Phasenkontrast.

Abbildung 3.6 zeigt, dass HDQ auf die beiden verwendeten Mutanten des RH-Stammes wie schon zuvor beschrieben zum Zeitpunkt 24 h p.i. stark inhibitorisch wirkt. Zu späteren Zeitpunkten kommt es allerdings zum verstärkten Parasitenwachstum. Das wieder einsetzende Parasitenwachstum führt in beiden

Stämmen zur partiellen Lyse<sup>36</sup> der Wirtszellen nach 72 h p.i.. Dies deutet darauf hin, dass HDQ in der verwendeten Konzentration die Parasiten nicht abtötet, sondern nur eine parasitostatische Wirkung besitzt.



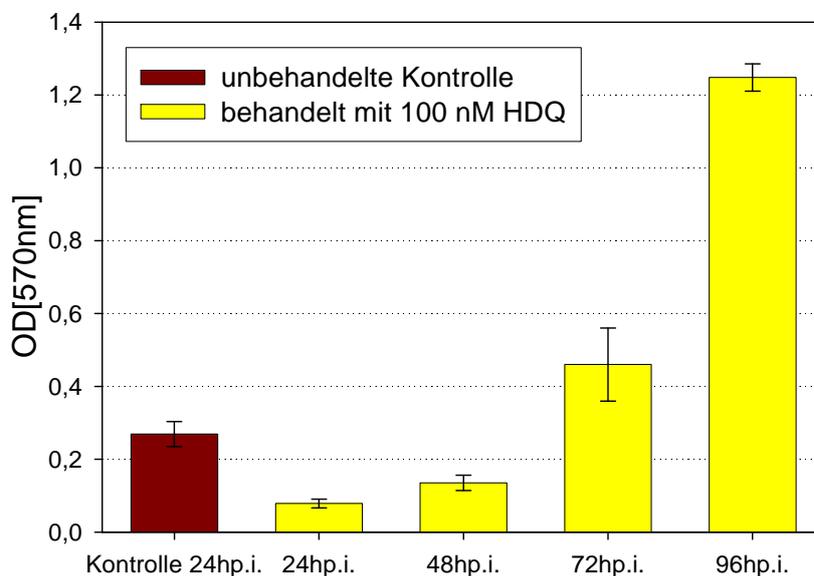
**Abbildung 3.6 Wirkung von HDQ auf die *T. gondii*-Replikation im Langzeitversuch im Zählassay**

HFF-Wirtszellen wurden mit Mutanten des RH-Stammes infiziert und zeitgleich zur Infektion einmalig mit 100 nM HDQ behandelt (graue Säulen und Sterne). Eine unbehandelte Kontrolle (dunkelblaue Säulen) wurde in allen Versuchen mitgeführt. Die Ansätze wurden zu den angegebenen Zeitpunkten untersucht. Die durchschnittliche Toxoplasmenzahl pro Vakuole wurde mikroskopisch durch das Auszählen von je 100 Vakuolen im Phasenkontrast bestimmt. Die Abbildung zeigt Durchschnittswerte aus Vierfach-Bestimmungen  $\pm$ SE. 72 und 96 h p.i. wurde eine partielle Lyse der Wirtszellen beobachtet, so dass zu diesen Zeitpunkten eine quantitative Auswertung nicht mehr möglich war (\*).

Zur Überprüfung der Ergebnisse aus Abbildung 3.6 wurde das lacZ-Assay mit dem  $\beta$ -Galaktosidase-exprimierendem RH-Stamm RH/ $\Delta$ hxgp $r$ t/sag1-lacZ mit vergleichbarem Versuchsaufbau durchgeführt. Dafür wurden Wirtszellen mit  $2,5 \times 10^4$  Parasiten pro Napf infiziert und 2,5 h p.i. mit HDQ in einer Endkonzentration von 100 nM behandelt. Eine unbehandelte Kontrolle wurde zum Vergleich des nicht inhibierten Parasitenwachstums bis 24 h p.i. mitgeführt. Abbildung 3.7 bestätigt die durch Abbildung 3.6 gemachten Aussagen: HDQ inhibiert das Parasitenwachstum am effektivsten innerhalb von 24 h p.i.. Zwischen 24 und 96 h p.i. vermindert sich

<sup>36</sup> Als partielle Lyse wird in der vorliegenden Arbeit die phasenkontrastmikroskopische Beobachtung einer deutlichen Zunahme von Mehrfachinfektionen pro Wirtszelle sowie einer erheblichen Zunahme von parasitophoren Vakuolen pro Gesichtsfeld verstanden, die sich auf eine Lyse der Wirtszellen zurückführen lässt (vgl. Abbildung 2.1 B im Kapitel 2.2.2.1).

die parasitostatische HDQ-Wirkung, so dass ab 48 h p.i. ein vermehrtes Parasitenwachstum sichtbar wird.



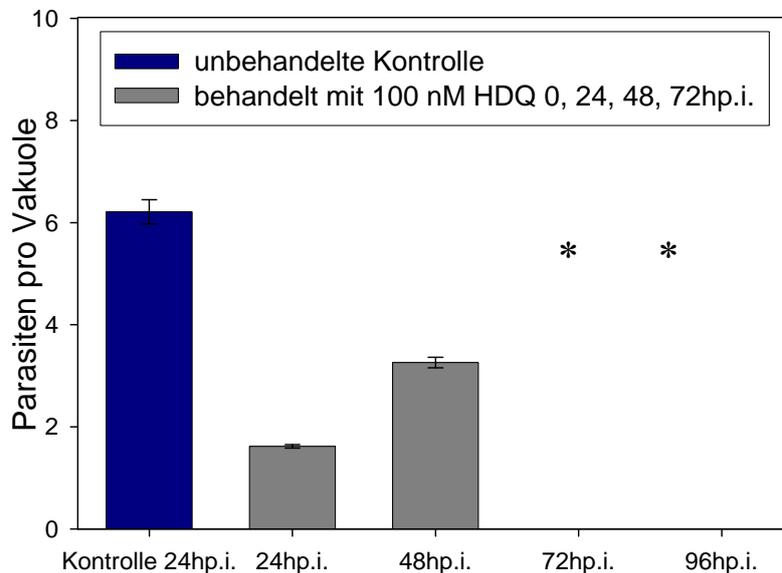
**Abbildung 3.7 Wirkung von HDQ auf die *T. gondii*-Replikation im Langzeitversuch im lacZ-Assay**

HFF-Zellen wurden mit  $2,5 \times 10^4$  RH/ $\Delta$ hxgp $r$ t/sag1-lacZ-Parasiten pro Napf (Bohne und Roos 1997) infiziert und 2,5 h p.i. einmalig mit HDQ 100 nM behandelt. Das Parasitenwachstum wurde zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse in OD [570 nm] eines Versuchs mit Triplikaten  $\pm$ SE. Der Versuch wurde wiederholt und zeigte ähnliche Ergebnisse (siehe Tabelle 3.3).

### 3.2.2 Einfluss von Mediumwechsel unter erneuter HDQ-Zugabe auf die Parasitenreplikation im Langzeitversuch

Da die Hemmwirkung von HDQ nach 24 h p.i. abnimmt, stellt sich die Frage, ob der Hemmstoff in diesem Zeitraum abgebaut wird und ob sich die Parasitenreplikation effektiver durch eine erneute HDQ-Zugabe hemmen lässt. Hierzu wurden HFF-Zellen mit RH-TATi infiziert und zeitgleich zur Infektion mit 100 nM HDQ behandelt. Das Medium dieser Zellen wurde alle 24 h unter erneuter HDQ-Zugabe (100 nM) ausgetauscht. Abbildung 3.8 zeigt ein vergleichbares Ergebnis wie Abbildung 3.6 A. Der Hemmstoff wirkt effektiv bis 24 h p.i.. Ein wieder einsetzendes Parasitenwachstums ist allerdings auch in diesem Versuch ab 48 h p.i. zu beobachten. Ebenso wie im vorangegangenen Versuch tritt auch hier eine partielle

Lyse<sup>37</sup> der Wirtszellen ab 72 h p.i. auf. Die Erholung des Parasitenwachstums ist somit unabhängig davon, ob HDQ nur einmalig unmittelbar nach der Infektion oder täglich erneut verabreicht wird.



**Abbildung 3.8 Wirkung von HDQ auf die *T. gondii*-Replikation im Langzeitversuch unter erneuter HDQ-Zugabe und Mediumwechsel alle 24 h**

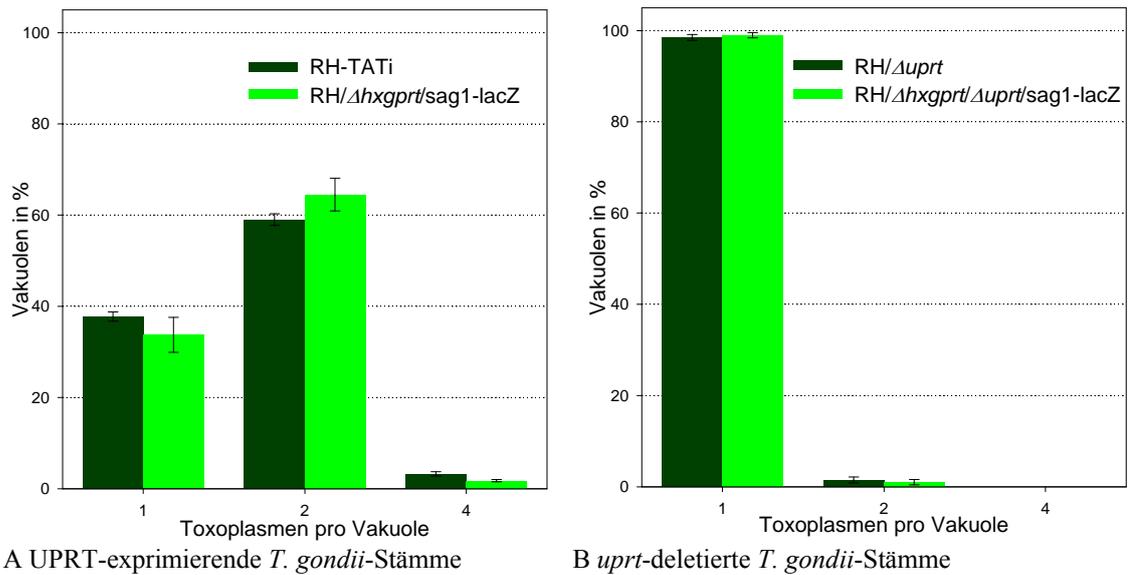
Wirtszellen wurden mit RH-TATi infiziert und zeitgleich zur Infektion mit 100 nM HDQ behandelt (graue Säulen und Sternchen). Zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 h p.i. erfolgte ein Mediumwechsel unter erneuter HDQ-Zugabe. Eine unbehandelte Kontrolle (blaue Säule) wurde bis 24 h p.i. mitgeführt. Die Ansätze wurden zu den angegebenen Zeitpunkten untersucht. Die durchschnittliche Toxoplasmenzahl pro Vakuole wurde mikroskopisch durch das Auszählen von je 100 Vakuolen im Phasenkontrast bestimmt. Die Abbildung zeigt Durchschnittswerte aus Vierfach-Bestimmungen  $\pm$ SE. 72 und 96 h p.i. wurde eine partielle Lyse der Wirtszellen beobachtet, so dass zu diesen Zeitpunkten eine quantitative Auswertung nicht mehr möglich war (\*).

<sup>37</sup> Zur mikroskopischen Darstellung siehe Abbildung 2.1 B im Kapitel 2.2.2.1.

### 3.3 HDQ-Inhibition in UPRT-Defizienzmutanten

Die Uracil-Phosphoribosyl-Transferase (UPRT) ist ein wichtiges Enzym im Pyrimidin-*salvage-pathway*, das die Umwandlung von Uracil zu Uridin-Monophosphat (UMP) katalysiert (Iltzsch 1993). Im Folgenden soll die Hemmbarkeit von *uprt*-Deletionsmutanten durch HDQ untersucht werden.

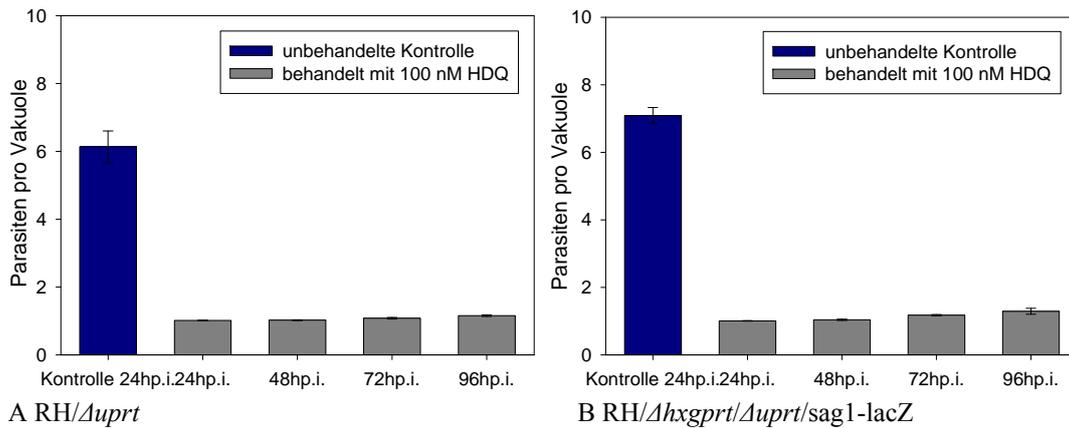
Dafür wurden die UPRT-exprimierenden RH-Stämme RH-TATi und RH/ $\Delta$ *hxgprt*/*sag1-lacZ* mit den *uprt*-Deletionsmutanten RH/ $\Delta$ *uprt* und RH/ $\Delta$ *hxgprt*/ $\Delta$ *uprt*/*sag1-lacZ* auf ihre Sensitivität gegenüber HDQ verglichen. Wirtszellen wurden mit den o.g. RH-Stämmen infiziert und zeitgleich zur Infektion mit 100 nM HDQ behandelt. 24 h p.i. wurde die Toxoplasmenzahl pro Vakuole bestimmt. Abbildung 3.9 stellt die Ergebnisse als Toxoplasmen pro Vakuole in Prozent der insgesamt ausgezählten Vakuolen dar. Bei den UPRT-exprimierenden RH-Stämmen haben sich 35 bis 40% unter HDQ-Hemmung gar nicht vermehrt. Rund 60% der UPRT-exprimierenden Parasiten machen trotz der Behandlung mit 100 nM HDQ innerhalb von 24 h eine Replikation durch. Drei bis vier Prozent dieser Parasiten liegen im Vierzellstadium vor. Im Gegensatz dazu haben sich 98% der *uprt*-Deletionsmutanten innerhalb von 24 h p.i. und unter Einwirkung von HDQ nicht repliziert. Nur ein bis zwei Prozent dieser Parasiten machten eine Vermehrung durch.



**Abbildung 3.9 Vergleich der HDQ-Inhibition bei UPRT-exprimierenden Parasiten und *uprt*-Deletionsmutanten**

HFF-Wirtszellen wurden mit den angegebenen Parasitenstämmen infiziert und zeitgleich mit 100 nM HDQ behandelt. Die Auswertung erfolgte 24 h p.i. durch mikroskopisches Auszählen der Anzahl der Parasiten pro Vakuole im Phasenkontrast. Dargestellt sind die Toxoplasmen pro Vakuole in Prozent aller ausgezählten Vakuolen aus Vierfach-Bestimmungen  $\pm$ SE.

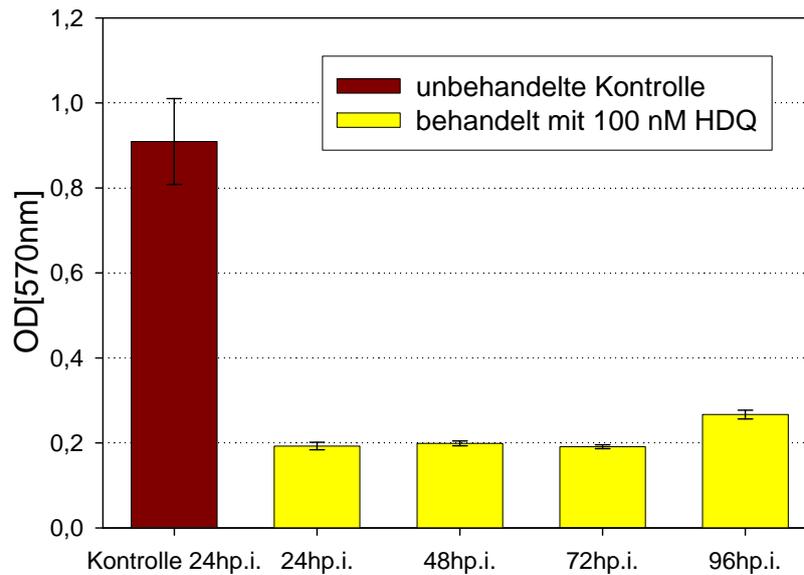
Ebenso wie die UPRT-exprimierenden Parasiten RH-TATi und RH/ $\Delta$ hxppt/sag1-lacZ (Abbildung 3.6) wurden auch die beiden *uprt*-Deletionsmutanten RH/ $\Delta$ uprt und RH/ $\Delta$ hxppt/ $\Delta$ uprt/sag1-lacZ im Langzeitversuch getestet. Wirtszellen wurden mit diesen Parasiten infiziert und über 96 h mit HDQ in einer Endkonzentration von 100 nM behandelt. Das Parasitenwachstum wurde 24, 48, 72 und 96 h p.i. durch Auszählen der durchschnittlichen Parasitenzahl pro Vakuole bestimmt. Abbildung 3.10 zeigt das Wachstumsverhalten der *uprt*-Deletionsmutanten. Bei der Behandlung mit HDQ reduziert sich das Wachstum beider Mutanten auf ein bis zwei Parasiten pro Vakuole. Im Gegensatz zu den UPRT-exprimierenden Parasiten (Abbildung 3.6) bleibt die HDQ-Hemmung in den UPRT-Defizienzmutanten über den gesamten Zeitraum bis 96 h p.i. erhalten. UPRT-Defizienz führt somit zu einer Hypersensitivität der Parasiten gegenüber HDQ.



**Abbildung 3.10 UPRT-Defizienz führt zu einer HDQ-Hypersensitivität beim Langzeitversuch im Zählassay**

Wirtszellen wurden mit den *uprt*-Deletionsmutanten RH/ $\Delta$ uprt (A) und RH/ $\Delta$ hxgprt/ $\Delta$ uprt/sag1-lacZ (B) infiziert. Zeitgleich zur Infektion wurden die Kulturen mit HDQ in einer Endkonzentration von 100 nM behandelt (graue Säulen). Eine unbehandelte Kontrolle wurde bis 24 h p.i. mitgeführt (dunkelblaue Säulen). Zu den angegebenen Zeiten wurde die durchschnittliche Parasitenzahl pro Vakuole im Phasenkontrast durch Auszählen von je 100 Vakuolen bestimmt. Die Abbildung zeigt Durchschnittswerte aus Vierfach-Bestimmungen  $\pm$ SE.

Mit der Frage, ob sich dieses Ergebnis auch mit einer anderen Methodik wiederholen lässt, wurde das lacZ-Assay mit der  $\beta$ -Galaktosidase-exprimierenden *uprt*-Deletionsmutante durchgeführt. Für diesen Versuch wurden Wirtszellen mit RH/ $\Delta$ hxgprt/ $\Delta$ uprt/sag1-lacZ infiziert und einmalig 2,5 h p.i. mit HDQ in einer Endkonzentration von 100 nM behandelt. Die Abbildung 3.11 zeigt die Ergebnisse der Testung von RH/ $\Delta$ hxgprt/ $\Delta$ uprt/sag1-lacZ im lacZ-Assay. Die unbehandelte Kontrolle hat 24 h p.i. eine OD [570 nm] von 0,9. Durch die Behandlung mit HDQ reduziert sich das Parasitenwachstum bei 24, 48 und 72 h p.i. auf eine optische Dichte von unter 0,2. Bei 96 h p.i. bleibt das Wachstum der *uprt*-Deletionsmutante im Gegensatz zu den UPRT-exprimierenden Parasiten (Abbildung 3.7) weiterhin stark inhibiert. Somit bestätigt das lacZ-Assay die Aussage, dass eine UPRT-Defizienz von *T. gondii* zu einer HDQ-Hypersensitivität führt.



**Abbildung 3.11 UPRT-Defizienz führt zu einer HDQ-Hypersensitivität beim Langzeitversuch im lacZ-Assay**

Wirtszellen wurden mit RH/ $\Delta$ hxgprt/ $\Delta$ uprt/sag1-lacZ infiziert und 2,5 h p.i. einmalig mit 100 nM HDQ behandelt. Das Parasitenwachstum wurde zu den angegebenen Zeitpunkten gestoppt. Dargestellt sind die Ergebnisse in OD [570 nm] eines repräsentativen Versuchs mit Triplikaten  $\pm$ SE. Der Versuch wurde wiederholt und zeigte ähnliche Ergebnisse (siehe Tabelle 3.3).

Zusammenfassend sind in der Tabelle 3.2 die Langzeitversuche der Zählassays der UPRT-exprimierenden RH-Stämme (Abbildung 3.6) mit denen der *uprt*-Deletionsmutanten (Abbildung 3.10) im numerischen Vergleich gegenübergestellt. In Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse aller lacZ-Assays der Langzeitversuche des UPRT-exprimierenden RH-Stammes (Abbildung 3.7) und der UPRT-Defizienzmutante (Abbildung 3.11) dargestellt.

### 3 Ergebnisse

**Tabelle 3.2 Numerischer Vergleich der Zählassays von UPRT-exprimierenden RH-Stämmen mit *uprt*-Deletionsmutanten in Bezug auf die Sensitivität gegenüber HDQ über 96 h**

Dargestellt ist die durchschnittliche Parasitenzahl pro Vakuole  $\pm$ SE. Die Tabelle zeigt die Daten aus Vierfach-Bestimmungen. Die dazugehörigen Diagramme sind in den Abbildungen 3.6 und 3.10 grafisch dargestellt. Zu den Zeitpunkten 72 und 96 h p.i. wurde mikroskopisch eine partielle Lyse der Wirtszellen beobachtet, so dass eine quantitative Auswertung hier nicht mehr möglich war (\*).

<i>T. gondii</i> -Stamm	unbehandelte Kontrolle		+100 nM HDQ 0 h p.i.			
	24 h p.i.		48 h p.i.	72 h p.i.	96 h p.i.	
RH-TATi	7,3 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,01	3,2 $\pm$ 0,2	*	*	
RH/ $\Delta$ <i>hxgprt</i> / <i>sag1-lacZ</i>	6,2 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,04	6,6 $\pm$ 0,4	*	*	
RH/ $\Delta$ <i>uprt</i>	6,1 $\pm$ 0,5	1,02 $\pm$ 0,01	1,02 $\pm$ 0,01	1,1 $\pm$ 0,02	1,2 $\pm$ 0,02	
RH/ $\Delta$ <i>hxgprt</i> / $\Delta$ <i>uprt</i> / <i>sag1-lacZ</i>	7,1 $\pm$ 0,2	1,01 $\pm$ 0,01	1,04 $\pm$ 0,02	1,2 $\pm$ 0,02	1,3 $\pm$ 0,1	

**Tabelle 3.3 Numerischer Vergleich der *lacZ*-Assays eines UPRT-exprimierenden RH-Stammes mit einer *uprt*-Deletionsmutante in Bezug auf die Sensitivität gegenüber HDQ über 96 h**

Dargestellt sind jeweils zwei unabhängige Versuche mit Triplikaten in OD [570 nm]  $\pm$ SE. Der jeweils erste Versuch ist für RH/ $\Delta$ *hxgprt*/*sag1-lacZ* in Abbildung 3.7 und für RH/ $\Delta$ *hxgprt*/ $\Delta$ *uprt*/*sag1-lacZ* in Abbildung 3.11 grafisch gezeigt.

<i>T. gondii</i> -Stamm	Versuchs-Nr.	unbehandelte Kontrolle		+100 nM HDQ 0 h p.i.			
		24 h p.i.		48 h p.i.	72 h p.i.	96 h p.i.	
RH/ $\Delta$ <i>hxgprt</i> / <i>sag1-lacZ</i>	1.	0,27 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,02	0,46 $\pm$ 0,10	1,25 $\pm$ 0,04	
	2.	0,23 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,02	0,41 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,16	
RH/ $\Delta$ <i>hxgprt</i> / $\Delta$ <i>uprt</i> / <i>sag1-lacZ</i>	1.	0,91 $\pm$ 0,1	0,19 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01	
	2.	0,56 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,01	0,1 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,02	

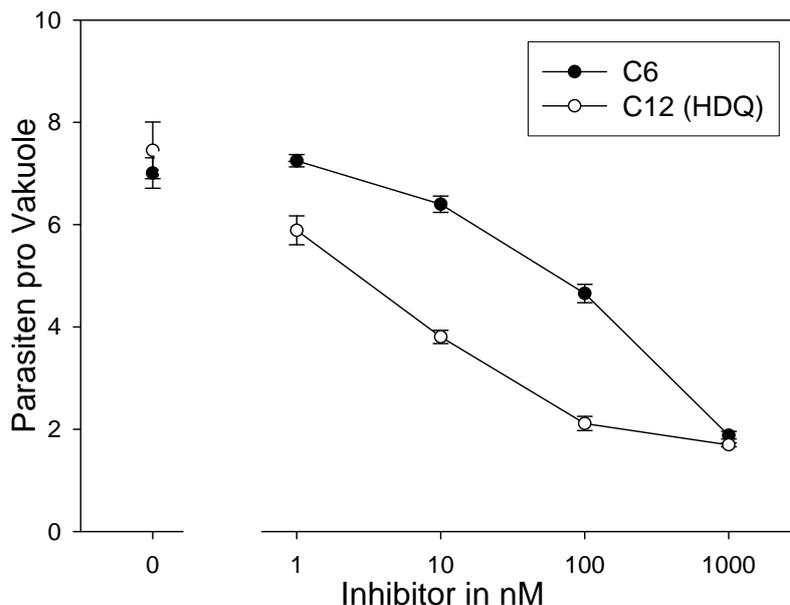
### 3.4 Die Länge der Alkyl-Seitenkette ist entscheidend für die Hemmung von *T. gondii* durch die 1-Hydroxy-2-Alkyl-4(1)Quinolon-Derivate C6 und C12 (HDQ)

HDQ besitzt eine lange hydrophobe Alkyl-Seitenkette  $(\text{CH}_2)_{11}\text{-CH}_3$  (C12) an Position zwei. Ein weiteres 1-Hydroxy-2-Alkyl-4(1)Quinolon-Derivat mit einer kürzeren Seitenkette von  $(\text{CH}_2)_5\text{-CH}_3$  (C6) wurde ebenfalls auf die Wirkung mit *T. gondii* sowohl im Zähl assay als auch im lacZ-Assay untersucht. Hierfür wurden Wirtszellen mit RH-TATi (Abbildung 3.12) bzw. mit RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ (Abbildung 3.13) infiziert und mit 1, 10, 100 und 1000 nM des jeweiligen 1-Hydroxy-2-Alkyl-4(1)Quinolon-Derivats behandelt. Das Parasitenwachstum wurde 24 bzw. 26 h p.i. durch Bestimmung der durchschnittlichen Toxoplasmenzahl pro Vakuole bzw. durch Messung der optischen Dichte bei 570 nm ermittelt. In beiden Methoden wird deutlich, dass die Parasitenreplikation weniger durch C6, sondern besser durch das C12-Derivat, also durch HDQ, inhibiert wird (vgl. Abbildungen 3.12 und 3.13). Ein Vergleich der IC 50% beider Derivate zeigt, dass HDQ in niedrig nanomolaren Konzentrationen und C6 erst in höher nanomolaren bzw. in mikromolaren Konzentrationen wirksam ist (siehe Tabelle 3.4). Die Länge der Alkyl-Seitenkette hat offenbar einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit des Derivates gegenüber *T. gondii*.

**Tabelle 3.4 Vergleich der IC 50% zweier 1-Hydroxy-2-Alkyl-4(1)Quinolon-Derivate mit unterschiedlicher Länge der Alkyl-Seitenkette**

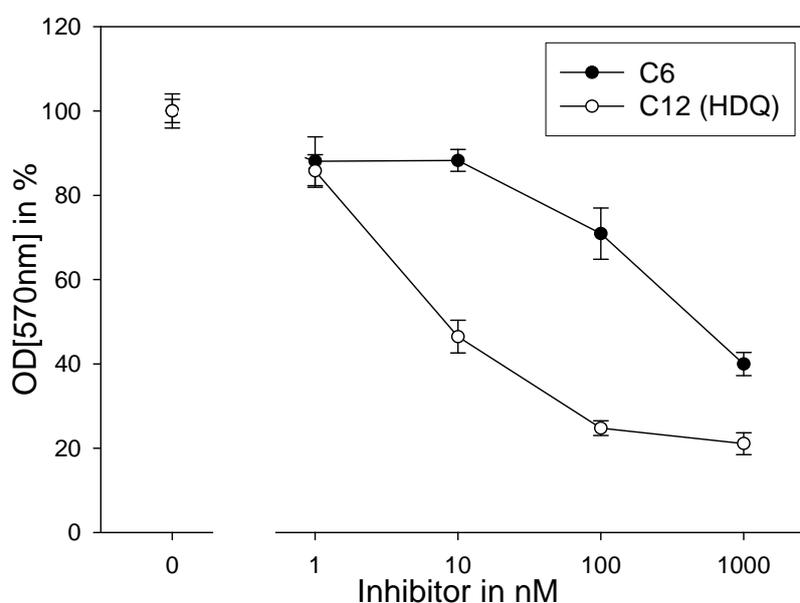
Dargestellt sind die IC 50% in nM  $\pm$ SE für die Inhibition von RH-TATi und RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ durch die C6 und C12 (HDQ)-Derivate aus den Zähl assays und aus den lacZ-Assays. Die Berechnung erfolgte mit SigmaPlot©.

Inhibitor	<i>T. gondii</i> -Stamm	IC 50% in nM $\pm$ SE	
		Zähl assay	LacZ-Assay
C6	RH-TATi	223,4 $\pm$ 210,1	-
	RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ	-	667,9 $\pm$ 3248,1
C12 (HDQ)	RH-TATi	5,7 $\pm$ 1,6	-
	RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ	-	3,9 $\pm$ 0,9



**Abbildung 3.12** Abhängigkeit der Empfindlichkeit von *T. gondii* für zwei 1-Hydroxy-2-Alkyl-4(1)Quinolon-Derivate im Zähl assay

HFF-Wirtszellen wurden mit dem *T. gondii*-Stamm RH-TATi infiziert. Zeitgleich zur Infektion wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen von 1-Hydroxy-2-Alkyl-4(1)Quinolon-Derivaten unterschiedlicher Alkyl-Seitenkettenlänge C6 und C12 (HDQ) inkubiert. 24 h p.i. wurde die durchschnittliche Parasitenzahl pro Vakuole im Phasenkontrast durch Auszählen von je 100 Vakuolen bestimmt. Die Abbildung zeigt Durchschnittswerte aus Vierfach-Bestimmungen  $\pm$ SE.



**Abbildung 3.13** Abhängigkeit der Empfindlichkeit von *T. gondii* für zwei 1-Hydroxy-2-Alkyl-4(1)Quinolon-Derivate im lacZ-Assay

Wirtszellen wurden mit den  $\beta$ -Galaktosidase-exprimierenden RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ-Parasiten (Bohne und Roos 1997) infiziert. 2,5 h p.i. wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen der 1-

Hydroxy-2-Alkyl-4(1)Quinolon-Derivate mit unterschiedlicher Länge der Alkyl-Seitenkette, C6 und C12 (HDQ), inkubiert. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde 26 h p.i. bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse als OD [570 nm] in Prozent des Mittelwertes der unbehandelten Kontrollen aus zwei unabhängigen Versuchen mit Triplikaten  $\pm$ SE.

### **3.5 Untersuchungen zum Synergismus von HDQ mit anderen Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette**

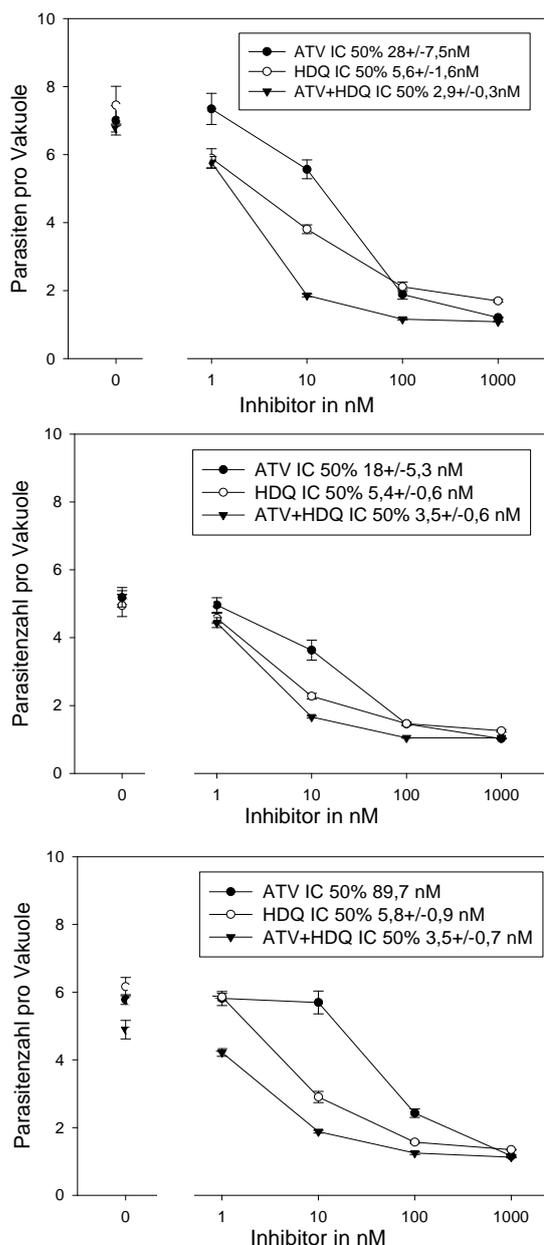
Für die Kombination von HDQ mit dem Komplex-III-Inhibitor Atovaquon konnte im RH-TATi-Stamm eine synergistische Wirkung gezeigt werden (Saleh et al. 2007). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob diese synergistische Wirkung auch bei Genotyp-II-*T. gondii*-Stämmen vorhanden ist. Des Weiteren sollte eine potenzielle synergistische Wirkung von HDQ mit dem Komplex-III-Inhibitor Antimycin A (Bohne et al. 1994) geprüft werden.

#### **3.5.1 HDQ und Atovaquon zeigen in Genotyp-II-*T. gondii*-Stämmen einen Synergismus**

Zur Untersuchung der Wirkung von HDQ mit Atovaquon wurden der Genotyp-I-*T. gondii*-Stamm RH-TATi sowie die Genotyp-II-*T. gondii*-Stämme ME49 und ME49/Atv<sup>r</sup> im Zähllassay getestet. Die Wirkstoffe wurden sowohl einzeln als auch in Kombination auf die Inhibition von *T. gondii* untersucht. Hierzu wurden HFF-Wirtszellen mit frisch lysierten Parasiten infiziert und zeitgleich zur Infektion mit HDQ, Atovaquon sowie HDQ und Atovaquon jeweils in einer Endkonzentration von 1, 10, 100 und 1000 nM inkubiert. Das Parasitenwachstum wurde bei RH-TATi 24 h, bei ME49 und ME49/Atv<sup>r</sup> 30 h p.i. durch Inkubation in 4% Paraformaldehyd gestoppt. Das Wachstum der Parasiten wurde durch die mikroskopische Bestimmung der durchschnittlichen Parasitenzahl pro Vakuole im Phasenkontrast ermittelt.

Die Berechnung der IC 50% für die Einzelsubstanzen und für die Kombination aus HDQ und Atovaquon wurde mit SigmaPlot© durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.3). Als Maß für die synergistische Wirkung wurde die Summe der fraktionierten IC 50%,  $\sum$ FIC (Berenbaum 1978) aus der in Abbildung 3.14 angegebenen Formel, berechnet.

Ein Wert  $<1$  zeigt einen Synergismus an, eine  $\Sigma\text{FIC} = 1$  zeigt eine additive Wirkung und ein Wert  $>1$  bedeutet eine antagonistische Wirkung zweier Wirkstoffe. Abbildung 3.14 zeigt die Wachstumskurven für die drei verwendeten *T. gondii*-Stämme. Sowohl Atovaquon als auch HDQ inhibieren die Parasitenreplikation in allen untersuchten Stämmen. Die Inhibition der Parasiten durch Atovaquon ist erst bei höheren Konzentrationen (von 100 und 1000 nM) sichtbar. Im Gegensatz dazu inhibiert HDQ die Parasitenreplikation bereits schon bei 10 nM deutlich. Werden beide Inhibitoren zusammen verwendet, fällt die Wachstumskurve deutlich steiler ab. Die ermittelte  $\Sigma\text{FIC}$  für RH-TATi liegt bei 0,62 und bestätigt den bereits bekannten Synergismus zwischen HDQ und Atovaquon. Die  $\Sigma\text{FIC}$  für ME49 von 0,84 und für ME49/Atv<sup>r</sup> von 0,65 zeigen, dass auch für diese Genotyp-II-*T. gondii*-Stämme ein Synergismus der Kombination von HDQ mit Atovaquon vorhanden ist. Eine vergleichende Übersicht der ermittelten IC 50%-Werte aus diesen Versuchen ist in Abbildung 3.15 dargestellt.

**A RH-TATi**

$$\sum \text{FIC} = \left[ \frac{\text{IC 50\% ATV + HDQ}}{\text{IC 50\% ATV}} \right] + \left[ \frac{\text{IC 50\% ATV + HDQ}}{\text{IC 50\% HDQ}} \right]$$

$$\sum \text{FIC} = \left[ \frac{2,9 \text{ nM}}{28 \text{ nM}} \right] + \left[ \frac{2,9 \text{ nM}}{5,6 \text{ nM}} \right]$$

$$\underline{\underline{\sum \text{FIC} = 0,62}}$$

**B ME49**

$$\sum \text{FIC} = \left[ \frac{\text{IC 50\% ATV + HDQ}}{\text{IC 50\% ATV}} \right] + \left[ \frac{\text{IC 50\% ATV + HDQ}}{\text{IC 50\% HDQ}} \right]$$

$$\sum \text{FIC} = \left[ \frac{3,5 \text{ nM}}{18 \text{ nM}} \right] + \left[ \frac{3,5 \text{ nM}}{5,4 \text{ nM}} \right]$$

$$\underline{\underline{\sum \text{FIC} = 0,84}}$$

**C ME49/Atv<sup>r</sup>**

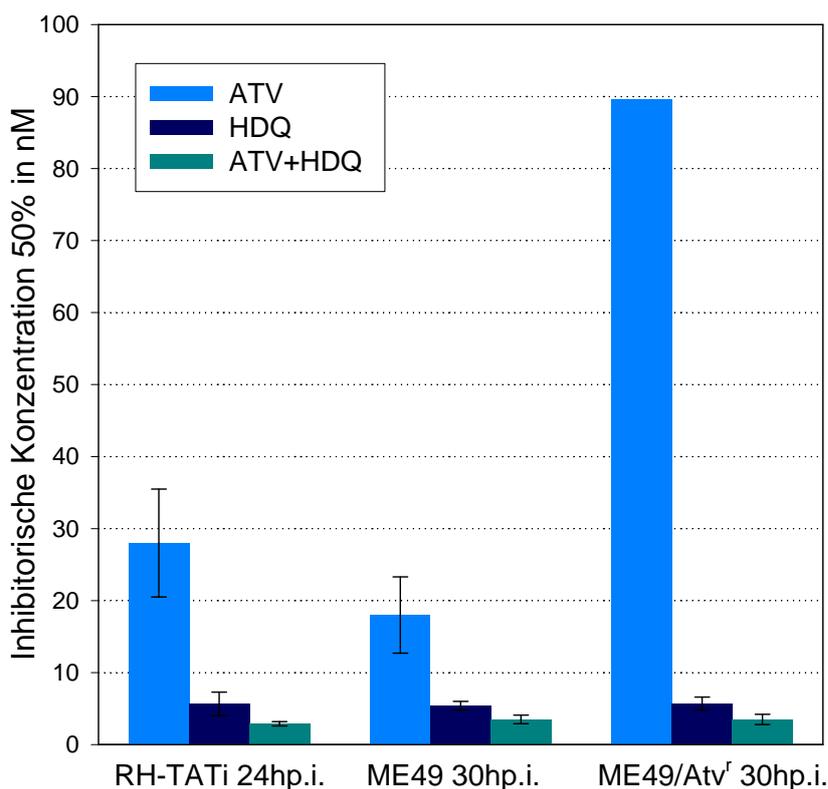
$$\sum \text{FIC} = \left[ \frac{\text{IC 50\% ATV + HDQ}}{\text{IC 50\% ATV}} \right] + \left[ \frac{\text{IC 50\% ATV + HDQ}}{\text{IC 50\% HDQ}} \right]$$

$$\sum \text{FIC} = \left[ \frac{3,5 \text{ nM}}{89,7 \text{ nM}} \right] + \left[ \frac{3,5 \text{ nM}}{5,8 \text{ nM}} \right]$$

$$\underline{\underline{\sum \text{FIC} = 0,65}}$$

**Abbildung 3.14 Synergismus von HDQ und Atovaquon bei Genotyp-I- und -II-*T. gondii*-Stämmen**

HFF-Wirtszellen wurden mit den angegebenen *T. gondii*-Parasiten infiziert und zeitgleich zur Infektion mit HDQ und Atovaquon (ATV) in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Bei diesen Kurzzeitversuchen wurde das Parasitenwachstum 24 h p.i. bei RH-TATi (A) sowie 30 h p.i. bei ME49 (B) und ME49/Atv<sup>r</sup> (C) gestoppt. Die durchschnittliche Parasitenzahl pro Vakuole wurde im Phasenkontrast bestimmt. Die Abbildungen zeigen jeweils Durchschnittswerte aus Vierfach-Bestimmungen  $\pm$ SE. Als Maß für den Synergismus wurde die Summe der fraktionierten IC 50% ( $\sum$ FIC) berechnet (Berenbaum 1978).



**Abbildung 3.15** Zusammenfassender Vergleich der IC 50% für Atovaquon und HDQ als Einzelbehandlung sowie in Kombination bei *T. gondii*

Die IC 50% für HDQ ist bei allen getesteten Stämmen um ein Vielfaches niedriger als die IC 50% für Atovaquon (ATV). Die Atovaquon-resistente Mutante (ME49/Atv<sup>r</sup>) zeigt wie erwartet eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber Atovaquon. Die Ermittlung der IC 50% erfolgte mit SigmaPlot©.

### 3.5.2 Inhibition der *T. gondii*-Replikation unter gleichzeitiger Gabe von HDQ und Antimycin A

Die inhibitorische Wirkung der Kombination von HDQ und Antimycin wurde am Genotyp-I-*T. gondii*-Stamm RH-TATi im Zähl assay untersucht. Die beiden Wirkstoffe wurden sowohl einzeln als auch in Kombination verabreicht, wobei die Zugabe der Substanzen zeitgleich mit der Infektion erfolgte. Es wurden HDQ-Konzentrationen von 1 bis 100 nM und Antimycin A-Konzentrationen von 2,5 bis 160 nM getestet. Das Parasitenwachstum wurde 24 h p.i. durch Auszählen der Parasitenzahl pro Vakuole mikroskopisch im Phasenkontrast bestimmt. Da im Gegensatz zum vorher beschriebenen Synergismus von HDQ und Atovaquon in diesem Versuchsaufbau die Kombination beider Substanzen nicht in äquimolaren Mengen erfolgte, konnte die  $\Sigma$ FIC nicht nach der Berenbaum-Formel bestimmt

werden (Berenbaum 1978) (siehe Kapitel 2.2.3). Tabelle 3.5 stellt die numerischen Werte dieser Versuche dar. Obwohl eine exakte Quantifizierung des Synergismus durch die Bestimmung der  $\Sigma$ FIC nicht möglich war, zeigen die erhaltenen Werte, dass die Kombination von HDQ mit Antimycin tendenziell additiv und nicht synergistisch wirkt.

**Tabelle 3.5 Inhibition von *T. gondii* bei gleichzeitiger Gabe von HDQ und Antimycin**

Die Tabellen zeigen die Inhibition von RH-TATi-Parasiten durch verschiedene Konzentrationen von HDQ (A), Antimycin (ANTI) (B) und durch die Kombination beider Inhibitoren (C). Numerisch dargestellt sind die durchschnittlichen Parasitenzahlen pro Vakuole aus Vierfach-Bestimmungen  $\pm$ SE.

A		B		C	
[HDQ] in nM	Parasiten pro Vakuole	[ANTI] in nM	Parasiten pro Vakuole	[HDQ]+[ANTI] in nM	Parasiten pro Vakuole
0	6,8 $\pm$ 0,3	0	7,2 $\pm$ 0,5	0+0	7,2 $\pm$ 0,4
1	6,7 $\pm$ 0,3	2,5	6,7 $\pm$ 0,2	1+2,5	5,7 $\pm$ 0,2
2,5	5 $\pm$ 0,1	5	5,3 $\pm$ 0,2	2,5+5	3,7 $\pm$ 0,1
5	3,7 $\pm$ 0,1	10	4,1 $\pm$ 0,1	5+10	2,9 $\pm$ 0,1
10	2,9 $\pm$ 0,1	20	3,1 $\pm$ 0,1	10+20	2,5 $\pm$ 0,1
100	1,7 $\pm$ 0,0	160	2 $\pm$ 0,0	100+160	1,7 $\pm$ 0,1
<b>IC 50% 4<math>\pm</math>0,5 nM</b>		<b>IC 50% 8,3<math>\pm</math>1,3 nM</b>		-	

## 4 Diskussion

### 4.1 HDQ inhibiert das Wachstum verschiedener *T. gondii*-Genotypen

Die mitochondriale Atmungskette von Parasiten stellt einen etablierten Angriffspunkt für Antiparasitika dar. Sie enthält parasitenspezifische Komponenten, die selektiv inhibiert werden können, ohne die Wirtszellen in ihrem Wachstum zu beeinträchtigen.

Beispielsweise zeigten sich Chalcone als Inhibitoren der Komplexe II und III der mitochondrialen Atmungskette in *Plasmodium falciparum* (Mi-Ichi et al. 2005). In der aktuellen Malariatherapie kommen Artemisinin-Derivate zur Anwendung (WHO 2006). Sie bewirken eine Depolarisation des mitochondrialen Membranpotenzials (Li et al. 2005). Der Komplex-III-Inhibitor Atovaquon wird sowohl zur Therapie der Malaria als auch der Toxoplasmose verwendet (Füssle und Willems 2007).

Der Wirkstoff 1-Hydroxy-2-Dodecyl-4(1*H*)Quinolon (HDQ) zeigte kürzlich im Enzymassay mit *Yarrowia lipolytica* eine viel versprechende inhibitorische Aktivität gegen die alternative NADH-Dehydrogenase mit einer IC 50% von 200 nM (Eschemann et al. 2005). In der Zellkultur konnte für die Inhibition von *Plasmodium falciparum* eine IC 50% von 14,0±1,9 nM demonstriert werden (Saleh et al. 2007). Für die Hemmung des Wachstums von *T. gondii*-Parasiten wurde für den Genotyp-I-Stamm RH-TATi eine IC 50% von 2,4±0,3 nM im Zähl assay und 3,7±1,4 nM im lacZ-Assay gezeigt (Saleh et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden Genotyp-I- und Genotyp-II-Parasiten mit verschiedenen Mutationen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber HDQ getestet. Für die RH-TATi-Parasiten konnte im Zähl assay eine IC 50% von 5,7±1,6 nM ermittelt werden. Mit RH/*Ahxgprt*/sag1-lacZ-Parasiten wurde im lacZ-Assay eine IC 50% von 3,9±0,9 nM und von 6,4±1,4 nM im Zähl assay bestimmt. Diese Werte liegen im Bereich der von Saleh et al. (2007) ermittelten IC 50% für HDQ und bestätigen somit die inhibitorische Wirkung von HDQ auf Genotyp-I-*T. gondii*-Stämme. Die Untersuchung der Genotyp-II-Parasiten ME49 und ME49/Atv<sup>f</sup> zeigte im Zähl assay eine IC 50% von 5,4±0,6 nM bzw. von 5,8±0,9 nM HDQ. Ein Vergleich der IC 50% der Genotyp-I-Parasiten mit den

Genotyp-II-Parasiten verdeutlicht, dass der Inhibitor die untersuchten *T. gondii*-Stämme unabhängig vom Genotyp im Wachstum hemmt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den von Meneceur et al. (2008) publizierten Daten: Sie testeten 17 *T. gondii*-Stämme<sup>38</sup> auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Sulfadiazin, Pyrimethamin und Atovaquon. Die von ihnen untersuchten Parasiten beinhalteten vier Laborstämme, zehn klinische Isolate von Patienten mit kongenitaler Toxoplasmose, ein Isolat von einer Erstinfektion und zwei von immunkomprimierten Patienten mit Toxoplasmen-Enzephalitis. Meneceur et al. (2008) konnten keine Beziehung zwischen der Empfindlichkeit auf eines der getesteten Medikamente und dem Genotyp des Parasiten feststellen.

Bei der vorliegenden Arbeit ist vor allem bedeutsam, dass sogar die Atovaquon-resistente Mutante genauso effektiv wie ihr Ursprungstamm durch HDQ in ihrem Wachstum inhibiert werden konnte.

Die gute inhibitorische Wirkung von HDQ auf unterschiedliche *T. gondii*-Genotypen in den Kurzzeitversuchen macht den Inhibitor zu einem viel versprechenden Wirkstoff. In der vorliegenden Arbeit zeigen Langzeitversuche mit RH-Parasiten im Zähl- und lacZ-Assay, dass HDQ effektiv bis 24 h p.i. parasitostatisch wirkt. Zu späteren Zeitpunkten vermindert sich die parasitostatische HDQ-Wirkung und ein Parasitenwachstum setzt wieder ein. Folgende drei theoretische Mechanismen würden die reduzierte Inhibition durch HDQ zwischen 24 und 96 h p.i. erklären.

Erstens: Der Parasit könnte den Wirkstoff mit Hilfe eines Transporters aus dem Mitochondrium bzw. aus der Zelle hinausschleusen.

Zweitens: Wenn HDQ tatsächlich kompetitiv mit einem hydrophoben Ubiquinon-Derivat um die Bindungsstelle an der alternativen NADH-Dehydrogenase konkurriert (Eschemann et al. 2005), könnte eine Anreicherung des natürlichen Substrates Ubiquinon in der inneren Mitochondrienmembran die Wirkung von HDQ reduzieren.

Drittens: Außerdem ist es möglich, dass der Parasit den Wirkstoff metabolisiert. Durch die Metabolisierung des Wirkstoffes reduziert sich die Konzentration von

---

<sup>38</sup> Unter diesen *T. gondii*-Stämmen waren 15 ursprünglich aus Menschen und zwei aus Tieren isoliert worden (Meneceur et al. 2008).

HDQ in der inneren Mitochondrienmembran. Die alternative NADH-Dehydrogenase wäre nicht mehr durch HDQ inhibiert.

Wenn letzteres zutrifft, müsste die erneute Zugabe von HDQ alle 24 h das Parasitenwachstum im Langzeitversuch ebenfalls wieder effektiv inhibieren. Aufgrund dieser Überlegung wurde *T. gondii* über 96 h auf die Wirkung mit HDQ getestet, wobei alle 24 h ein Mediumwechsel unter erneuter HDQ-Zugabe erfolgte. Die erneute HDQ-Zugabe hatte allerdings keinen Effekt und es kam trotzdem zu einem Parasitenwachstums zwischen 24 und 96 h p.i.. Somit ist es zumindest unwahrscheinlich, dass eine Metabolisierung des Wirkstoffes durch den Parasiten stattfindet.

Ein kritischer Punkt in der Struktur von 1-Hydroxy-2-Alkyl-4(1)Quinolon-Derivaten ist die Länge der Alkyl-Seitenkette an Position zwei. Das Derivat HDQ hat eine lange hydrophobe Alkyl-Seitenkette von 12 Kohlenstoff-Atomen (C). HDQ ist mit einer IC 50% im nanomolaren Bereich deutlich antiparasitisch wirksam. Im Gegensatz dazu zeigte ein weiteres Derivat mit einer kürzeren Alkyl-Seitenkette von 6 C-Atomen kaum eine Inhibition des Parasitenwachstums. Je länger die Alkyl-Seitenkette einer Substanz ist, desto schlechter ist diese Substanz in Wasser löslich; die Substanz mit längerer Alkyl-Seitenkette ist aber lipophiler. In Lipidmembranen wie beispielsweise der inneren Mitochondrienmembran kann möglicherweise das C12-Derivat besser als das C6-Derivat hinein diffundieren und sich durch den lipophilen Charakter besser in der Membran verteilen. Deshalb ist zur Erzeugung desselben Effektes (Reduzierung des Parasitenwachstums um 50%) von der eher lipophilen Substanz (C12, HDQ) eine geringere Konzentration notwendig als von der eher hydrophilen Substanz (C6). Wahrscheinlich ist eine definierte Mindestlänge der Alkyl-Seitenkette entscheidend für die Wirkung des Inhibitors (Saleh et al. 2007).

Die natürlichen Substrate der alternativen NADH-Dehydrogenase sind das lipophile, sich schnell in Lipidmembranen bewegend Ubiquinon und das eher hydrophile NADH. Der Wirkstoff HDQ weist deutlich strukturelle Ähnlichkeiten mit dem natürlichen Substrat Ubiquinon auf. Das hydrophobe Quinolon-Derivat HDQ könnte als Ubiquinon-Analogon fungieren und die alternative NADH-Dehydrogenase durch Verdrängung von Ubiquinon kompetitiv inhibieren. HDQ und Ubiquinon könnten somit um dieselbe Bindungsstelle in der alternativen NADH-Dehydrogenase

konkurrieren (Eschemann et al. 2005). Allerdings zeigten *steady-state*-Inhibitionsversuche mit HDQ bei *Y. lipolytica*, dass die Hemmung des Enzyms sowohl für NADH als auch für das hydrophobe Ubiquinon-Derivat DBQ einem klassischen nicht kompetitivem Muster folgt (Eschemann et al. 2005). Dieses unerwartete Ergebnis wurde mit einem möglichen *ping-pong*-Mechanismus erklärt: Die Autoren schlagen ein Modell vor, bei dem HDQ eine kompetitive Hemmung mit dem hydrophoben Substrat DBQ und eine nicht kompetitive Hemmung mit dem hydrophilen Substrat NADH zeigen würde (Eschemann et al. 2005).

### 4.2 Synergismus zwischen HDQ und anderen Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette

Der beobachtete Synergismus zwischen HDQ und dem Komplex-III-Inhibitor Atovaquon deutet darauf hin, dass beide Inhibitoren die mitochondriale Atmungskette an verschiedenen Stellen angreifen. Bereits Saleh et al. (2007) konnten einen Synergismus zwischen HDQ und Atovaquon in den Genotyp-I-RH-TATi-*T. gondii*-Parasiten und in *Plasmodium falciparum* zeigen. Die vorliegende Arbeit kann den bekannten Synergismus in RH-TATi-Parasiten bestätigen. Des Weiteren zeigt sie, dass in den Genotyp-II-*T. gondii*-Stämmen ME49 und ME49/Atv<sup>r</sup> ebenfalls ein Synergismus des Inhibitors der alternativen NADH-Dehydrogenase HDQ und Atovaquon vorliegt.

Dieser Synergismus ist vermutlich auf die Hemmung des Ubiquinon/Ubiquinol-Kreislaufs an zwei unterschiedlichen Angriffspunkten zurückzuführen. Für HDQ als Inhibitor der alternativen NADH-Dehydrogenase wäre das die reduzierende Seite und für Atovaquon als Komplex-III-Inhibitor die oxidierende Seite des Ubiquinon/Ubiquinol-Kreislaufs (Saleh et al. 2007). In *Plasmodium falciparum* wurde kürzlich ein Synergismus zwischen Atovaquon und niedrig affinen Inhibitoren der alternativen NADH-Dehydrogenase beschrieben (Biagini et al. 2006)<sup>39</sup>. Das Flavin DPI zeigte in Enzymassays bei Plasmodien eine ca. 600-fach höhere IC 50% (3 µM) (Biagini et al. 2006) als HDQ bei *T. gondii* in der vorliegenden Arbeit (4-

---

<sup>39</sup> Biagini et al. (2006) verwendeten DPI und IDP als Inhibitoren für einen Synergismus mit Atovaquon. Beide Flavin-Reagenzien sind bekannte niedrig affine Inhibitoren der alternativen NADH-Dehydrogenase. Die Rotenon-insensitive NADH-Dehydrogenase zeigte sich sensitiv gegenüber DPI in *Trypanosoma brucei* (Fang und Beattie 2002).

6 nM). Die Inhibition des Ubiquinon/Ubiquinol-Kreislaufs an verschiedenen Stellen wird als sehr effektiv betrachtet und besitzt ein viel versprechendes Potenzial für die Entwicklung neuer Chemotherapeutika (Biagini et al. 2006).

Neben Atovaquon wurden RH-TATi-Parasiten auch auf Antimycin A als Komplex-III-Inhibitor (Bohne et al. 1994) getestet. Antimycin A hemmt den Elektronentransport zwischen Cytochrom b und  $c_1$  im Komplex III der mitochondrialen Atmungskette. Die IC 50% für Atovaquon liegt dreifach höher ( $28 \pm 7,5$  nM) als die IC 50% für Antimycin A ( $8,3 \pm 1,3$  nM). Da die Versuche zur Testung eines möglichen Synergismus zwischen Antimycin A und HDQ nicht mit äquimolaren Konzentrationen durchgeführt wurden, ließ sich die  $\Sigma$ FIC der Kombination beider Inhibitoren nicht berechnen. Allerdings zeigt die Kombination von Antimycin A plus HDQ im tabellarischen Vergleich mit der Wirkung der Einzelkomponenten tendenziell einen additiven Effekt und unterscheidet sich damit deutlich von der synergistischen Wirkung der Kombination von HDQ mit Atovaquon.

### **4.3 UPRT-Defizienz in *Toxoplasma gondii* führt zu einer HDQ-Hypersensitivität**

Die Pyrimidinbasen Cytosin, Thymin und Uracil sind essenzielle Bausteine für die Bildung von RNA und DNA. Einerseits kann *T. gondii* Pyrimidine über die *de-novo*-Biosynthese herstellen (Schwartzmann und Pfefferkorn 1981). Alle notwendigen Enzyme für diesen Stoffwechselweg sind in *T. gondii* vorhanden (Asai et al. 1983). Das Zwischenprodukt der Pyrimidin-*de-novo*-Biosynthese ist Uridin-Monophosphat (UMP). Neben der *de-novo*-Biosynthese kann *T. gondii* UMP andererseits über den Pyrimidin-*salvage-pathway* generieren (Iltzsch 1993). Hierbei katalysiert die Uracil-Phosphoribosyl-Transferase (UPRT) die Umwandlung von Uracil zu UMP. Das durch diese zwei unterschiedlichen Synthesewege entstandene UMP stellt den Vorläufer für alle Pyrimidine dar, die von *T. gondii* gebraucht werden (Fox und Bzik 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden UPRT-Defizienzmutanten auf ihre Sensitivität gegenüber HDQ untersucht. Diese Mutanten sind nicht mehr in der Lage, Pyrimidine über den *salvage pathway* wieder zu verwerten. Ein aktives UPRT-Enzym ist für die Vermehrung der Toxoplasmen nicht notwendig, da *T. gondii* neben dem Pyrimidin-*salvage-pathway* auch zur Pyrimidin-*de-novo*-Synthese fähig ist (Iltzsch 1993, Schwartzmann und Pfefferkorn 1981). Deshalb zeigen *uprt*-Deletionsmutanten kein verändertes Wachstum unter Zellkulturbedingungen (Donald und Roos 1995, diese Arbeit<sup>40</sup>). In den vorliegenden Versuchen wurden UPRT-exprimierende RH-Parasiten mit UPRT-Defizienzmutanten nach Inkubation mit HDQ in ihrem Wachstumsverhalten verglichen. Bereits 24 h p.i. zeigten sich Unterschiede in ihrem Wachstum: Bei den UPRT-exprimierenden RH-Parasiten haben sich 35 bis 40% gar nicht vermehrt. Rund 60% dieser Parasiten machen trotz der Behandlung mit HDQ eine Replikation durch. Drei bis vier Prozent der UPRT-exprimierenden RH-Parasiten liegen im Vierzellstadium vor. Im Gegensatz dazu haben sich im selben Zeitraum 98% der UPRT-Defizienzmutanten unter Einwirkung von HDQ nicht vermehrt. Nur ein bis zwei Prozent der Mutanten liegen im Zweizellstadium vor. Dieser Unterschied im Parasitenwachstum unter Inkubation mit HDQ bleibt auch in den Langzeitversuchen bis 96 h p.i. erhalten. Bei den UPRT-exprimierenden Parasiten RH-TATi und RH/ $\Delta$ hxgprt/sag1-lacZ wirkt HDQ innerhalb von 24 h p.i. am effektivsten. Zu späteren Zeitpunkten lässt die inhibitorische Wirkung von HDQ nach. Im Gegensatz dazu bleiben die UPRT-Defizienzmutanten RH/ $\Delta$ uprt und RH/ $\Delta$ hxgprt/ $\Delta$ uprt/sag1-lacZ über den gesamten Zeitraum bis 96 h p.i. durch HDQ sehr wirksam inhibiert. Der Vergleich macht deutlich, dass eine UPRT-Defizienz in *T. gondii* zu einer HDQ-Hypersensitivität führt. Bei UPRT-Defizienzmutanten ist der Pyrimidin-*salvage-pathway* nicht funktionstüchtig und die überlebenswichtige Herstellung von Pyrimidinen somit nur noch über die *de-novo*-Biosynthese möglich. Eine Erklärungsmöglichkeit für die HDQ-Hypersensitivität der UPRT-Defizienzmutante wäre, dass HDQ neben der alternativen NADH-Dehydrogenase außerdem die Pyrimidin-*de-novo*-Synthese hemmt. Ein möglicher Kandidat hierfür ist die Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH), die die Oxidation von Dihydroorotat zu Orotat katalysiert (Abbildung 4.1). Dieses Enzym ist in vielen

---

<sup>40</sup> Vgl. das Wachstum der unbehandelten Kontrollen der UPRT-exprimierenden RH-Parasiten in Abbildung 3.6 (Kapitel 3.2.1) mit den unbehandelten Ansätzen der *uprt*-Deletionsmutanten in Abbildung 3.10 (Kapitel 3.3).

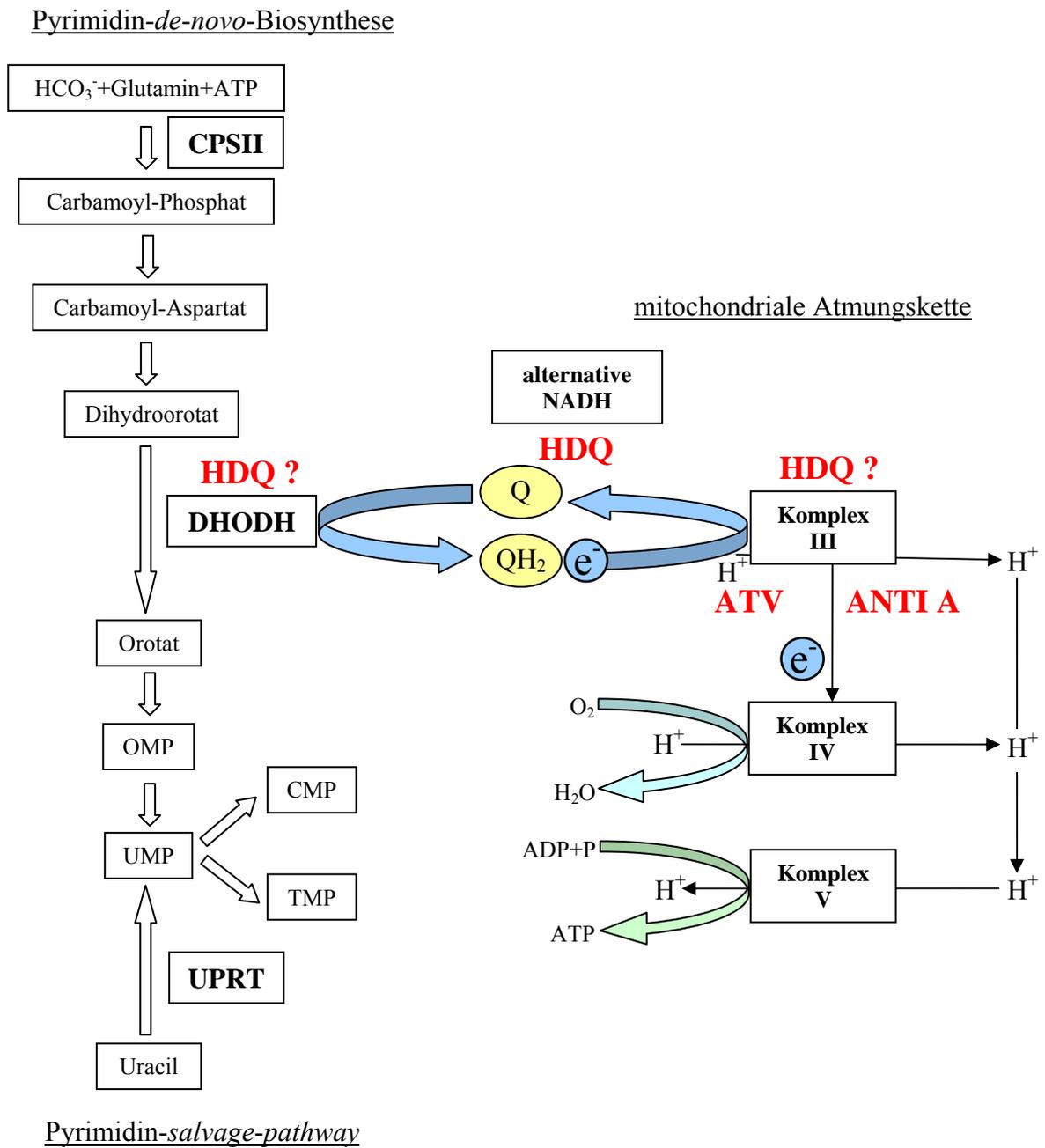
Organismen mit der mitochondrialen Atmungskette assoziiert und benutzt Ubiquinon als Elektronenakzeptor. Wie auch bei der alternativen NADH-Dehydrogenase könnte HDQ als Strukturanalogon von Ubiquinon zu einer direkten Hemmung der DHODH-Aktivität führen und somit die Hypersensitivität der UPRT-Defizienzmutanten gegenüber HDQ erklären. Des Weiteren ist es möglich, dass die DHODH indirekt inhibiert wird, indem HDQ den Komplex III ähnlich wie Atovaquon hemmt und somit das Recycling des für die DHODH notwendigen Elektronenakzeptors Ubiquinon verhindert (Abbildung 4.1).

Die Bedeutung der DHODH für das Überleben von *T. gondii* ist noch nicht ausreichend geklärt. Bei Plasmodien stellt die DHODH ein essenzielles Enzym zum Überleben des Malariaerregers dar: Plasmodien besitzen keinen Pyrimidin-*salvage-pathway* und sind daher auf die Pyrimidin-*de-novo*-Biosynthese angewiesen (Tamta und Mukhopadhyay 2003). Neuere Studien demonstrieren, dass verschiedene Substanzen die DHODH von *Plasmodium falciparum* sowohl in Enzymassays effektiv inhibieren können (Heikkilä et al. 2007, Baldwin et al. 2005) als auch in der Zellkultur gegen den Erreger wirksam sind (Heikkilä et al. 2007). Die Inhibition der Pyrimidin-*de-novo*-Synthese stellt in dem Malariaerreger einen viel versprechenden Angriffspunkt für neue Antiparasitika dar (Tamta und Mukhopadhyay 2003). In *T. gondii* ist dieser Syntheseweg offensichtlich auch von Bedeutung, denn eine funktionstüchtige Pyrimidin-*de-novo*-Biosynthese ist wichtig für das Wachstum und die Virulenz des Erregers (Fox und Bzik 2002). Fox und Bzik (2002) inaktivierten die Pyrimidin-*de-novo*-Synthese von *T. gondii*, indem sie das erste Enzym dieses Syntheseweges, die Carbamoyl-Phosphat-Synthetase II (CPSII), durch genetische Veränderung inhibierten. Diese CPSII-Defizienzmutanten infizierten die Wirtszellen *in vitro*, konnten sich aber in ihnen nicht replizieren. Durch die zusätzliche Gabe von Uracil in das Zellkulturmedium konnten sich die Parasiten wieder vermehren, ihr Wachstum war also abhängig von der externen Uracil-Zufuhr. In *T. gondii* wird durch die Zugabe von Uracil die Generierung von Pyrimidinen über den *salvage pathway* verstärkt (Abbildung 4.1). Eine reduzierte Virulenz der CPSII-Defizienzmutanten gegenüber sehr virulenten Wildtyp-Parasiten zeigte sich auch *in vivo* (Fox und Bzik 2002). Im Mausmodell wurde die Überlebenszeit der Wirtstiere nach intraperitonealer Inokulation der Parasiten untersucht. Die mit CPSII-

Defizienzmutanten infizierten Mäuse überlebten mehr als 12 Monate ohne Anzeichen einer Parasitenpersistenz. Im Gegensatz dazu starben die mit Wildtyp-Parasiten infizierten Mäuse bereits nach 9 Tagen. Bemerkenswert ist, dass auch die Infektion mit CPSII-Defizienzmutanten im immunkomprimierten Mausmodell<sup>41</sup> im Vergleich zu Wildtyp-Parasiten eine abgeschwächte Virulenz des Erregers zeigte (Überlebenszeit länger als 6 Monate). Des Weiteren konnte die Infektion mit CPSII-Defizienzmutanten eine Langzeitimmunität gegenüber virulenten Wildtyp-Parasiten im Mausmodell induzieren (Fox und Bzik 2002). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass in Wirtstieren ein Mangel an Pyrimidinen herrscht, der erklären würde, warum manche Parasiten die Fähigkeit zur Pyrimidin-*de-novo*-Synthese bewahrt haben (Sibley 2002). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Hypersensitivität von UPRT-Defizienzmutanten gegenüber HDQ könnte, wie bereits diskutiert, durch die gleichzeitige Hemmung von alternativer NADH-Dehydrogenase und DHODH erklärt werden (Abbildung 4.1). Die Hemmung der mitochondrialen Atmungskette und assoziierter Stoffwechselwege wie der Pyrimidin-*de-novo*-Biosynthese stellt in *T. gondii* einen viel versprechenden Ansatzpunkt für die weitere Entwicklung spezifischer Inhibitoren des Parasitenwachstums dar und ist daher sicherlich auch in Zukunft ein interessantes Forschungsobjekt.

---

<sup>41</sup> In diesem Modell sind die Mäuse nicht mehr in der Lage, Interferon- $\gamma$  zu bilden (Fox und Bzik 2002). Dieses Cytokin ist für die Kontrolle der *T. gondii*-Infektion durch den Wirtsorganismus notwendig.



**Abbildung 4.1** Darstellung möglicher Angriffspunkte von Inhibitoren in *T. gondii*

Die Abbildung zeigt die Inhibierung der *T. gondii*-Replikation durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette und den assoziierten Pyrimidin-Stoffwechsel (nach Tamta und Mukhopadhyay 2003, S.7 sowie Fox und Bzik 2002, S.926). Für nähere Erläuterungen siehe Kapitel 4.3. CPSII Carbamoyl-Phosphat-Synthetase II, DHODH Dihydroorotat-Dehydrogenase, UPRT Uracil-Phosphoribosyl-Transferase.

## 5 Zusammenfassung

Der obligat intrazelluläre Parasit *Toxoplasma gondii* gehört ebenso wie *Plasmodium falciparum* zu den Apicomplexa. Das in den letzten Jahren gehäufte Auftreten von Resistenzen gegenüber gängigen Therapeutika macht die Erforschung neuer medikamentöser Angriffspunkte für diese Parasiten notwendig. Die mitochondriale Atmungskette von Toxoplasmen und Plasmodien weist eine Komponente auf, die in Säugerzellen nicht vorkommt und deshalb einen viel versprechenden Angriffspunkt für Antiparasitika darstellt: *T. gondii* und *P. falciparum* besitzen anstelle des Komplexes I eine alternative NADH-Dehydrogenase. Die Substanz 1-Hydroxy-2-Dodecyl-4(1)-Quinolon (HDQ) wurde in Enzymassays als hoch affiner Inhibitor der alternativen NADH-Dehydrogenase des Hefepilzes *Yarrowia lipolytica* beschrieben. HDQ war außerdem in der Lage, das Wachstum von *P. falciparum* und Genotyp-I-Parasiten von *T. gondii* in der Zellkultur zu hemmen.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Wirkungsweise von HDQ in verschiedenen *T. gondii*-Stämmen und -Mutanten genauer zu charakterisieren. Mit zwei unabhängigen Wachstumsassays konnte nachgewiesen werden, dass HDQ das Wachstum unterschiedlicher *T. gondii*-Stämme im nanomolaren Bereich effektiv inhibiert unabhängig davon, ob es sich um Genotyp-I- oder Genotyp-II-Parasiten handelte. Der Inhibitor zeigte in den Kurzzeitversuchen eine parasitostatische Wirkung. Unerwarteterweise erholten sich die Parasiten unter der Behandlung mit HDQ im Langzeitversuch. Ein kritischer Punkt in der Struktur von 1-Hydroxy-2-Alkyl-4(1)Quinolon-Derivaten ist die Länge der Alkyl-Seitenkette an Position zwei. So zeigte sich HDQ als Derivat mit einer langen Alkyl-Seitenkette (C12) als effektiver Inhibitor der *T. gondii*-Replikation. Im Gegensatz dazu konnte ein Derivat mit einer kürzeren Alkyl-Seitenkette (C6) den Parasiten nicht in seinem Wachstum inhibieren. Eine definierte Mindestlänge der Alkyl-Seitenkette ist möglicherweise entscheidend, um in die innere Mitochondrienmembran zu diffundieren oder als Kompetitor zu Ubiquinon zu fungieren. Eine Inkubation von Toxoplasmen mit HDQ und dem Komplex-III-Inhibitor Atovaquon führte zu einem Synergismus, der unabhängig vom Genotyp des Parasiten vorhanden war. Vermutlich kommt es hierbei zu einer Inhibition des Ubiquinon/Ubiquinol-Kreislaufs an der

Reduktionsseite durch HDQ und an der Oxidationsseite durch Atovaquon. Die Behandlung von *T. gondii* mit HDQ und dem Komplex-III-Inhibitor Antimycin A war tendenziell additiv und unterscheidet sich somit von der synergistischen Wirkung zwischen HDQ und Atovaquon. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die vergleichende Untersuchung von Wildtyp-Parasiten und UPRT-Defizienzmutanten. Wildtyp-Parasiten können Pyrimidine sowohl über die *de-novo*-Biosynthese herstellen als auch über den *salvage pathway* wieder verwerten, wohingegen bei UPRT-Defizienzmutanten der *salvage pathway* funktionsunfähig ist. Die UPRT-Defizienzmutanten zeigten gegenüber HDQ im Vergleich zu den Wildtyp-Parasiten eine signifikant höhere Sensitivität. Diese HDQ-Hypersensitivität könnte auf eine direkte oder indirekte Hemmung der Pyrimidin-*de-novo*-Synthese hinweisen, da dieser Stoffwechselweg über die Dihydroorotat-Dehydrogenase mit der mitochondrialen Atmungskette verbunden ist und dieses Enzym Ubiquinon als Elektronenakzeptor verwendet.

Diese Arbeit verdeutlicht, dass die Inhibierung der *Toxoplasma-gondii*-Replikation durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette interessante Angriffspunkte für die Entwicklung spezifischer Antiparasitika liefert.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP (2001): *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. *Expert Rev Mol Med* 2001, 1-19, <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002204h.htm>
- Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, Dumètre A, Demar M, Carme B, Dardé ML (2004): Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 34, 1185-1196
- Ambroise-Thomas P, Pelloux H (1993): Toxoplasmosis - congenital and in immunocompromised patients: a parallel. *Parasitol Today* 9, 61-63
- Asai T, O'Sullivan WJ, Kobayashi M, Gero AM, Yokogawa M, Tatibana M (1983): Enzymes of the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 7, 89-100
- Auer H, Vander-Möse A, Picher O, Walochnik J, Aspöck H (2000): Clinical and diagnostic relevance of the *Toxoplasma* IgG avidity test in the serological surveillance of pregnant women in Austria. *Parasitol Res* 86, 965-970
- Baatz H, Mirshahi A, Puchta J, Gumbel H, Hattenbach LO (2006): Reactivation of toxoplasma retinochoroiditis under atovaquone therapy in an immunocompetent patient. *Ocul Immunol Inflamm* 14, 185-187
- Bahia-Oliveira LMG, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CCF, Oréfice F, Addiss DG (2003): Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerg Infect Dis* 9, 55-62

- Baldwin J, Michnoff CH, Malmquist NA, White J, Roth MG, Rathod PK, Phillips MA (2005): High-throughput screening for potent and selective inhibitors of *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase. *J Biol Chem* 280, 21847-21853
- Berenbaum MC (1978): A method for testing for synergy with any number of agents. *J Infect Dis* 137, 122-130
- Biagini GA, Viriyavejakul P, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA (2006): Functional characterization and target validation of alternative complex I of *Plasmodium falciparum* mitochondria. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1841-1851
- Bohne W, Roos DS (1997): Stage-specific expression of a selectable marker in *Toxoplasma gondii* permits selective inhibition of either tachyzoites or bradyzoites. *Mol Biochem Parasitol* 88, 115-126
- Bohne W, Heesemann J, Gross U (1994): Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect Immun* 62, 1761-1767
- Bonapace CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA (2000): Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 38, 43-50
- Camps M, Arrizabalaga G, Boothroyd J (2002): An rRNA mutation identifies the apicoplast as the target for clindamycin in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol* 43, 1309-1318
- Castagnini M, Bernazzali S, Ginanneschi C, Marchi B, Maccherini M, Tsioulpas C, Tanganelli P (2007): Fatal disseminated toxoplasmosis in a cardiac transplantation with seropositive match for *Toxoplasma*: should prophylaxis be extended? *Transpl Immunol* 18, 193-197

- Centers for Disease Control and Prevention (2002): Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons-2002: Recommendations of the U.S. Public Health Service and the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51, 5-7
- Chaudhary K, Donald RG, Nishi M, Carter D, Ullman B, Roos DS (2005): Differential localization of alternatively spliced hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase isoforms in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 280, 22053-22059
- Cook AJC, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, Foulon W, Semprini AE, Dunn DT (2000): Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *BMJ* 321, 142-147
- Couvreur J, Desmonts G, Thulliez P (1988): Prophylaxis of congenital toxoplasmosis. Effects of spiramycin on placental infection. *J Antimicrob Chemother* 22, 193-200
- Deplazes P, Eckert J: Parasitologie; in: Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie; hrsg. v. Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM, Haller O, Eckert J, Deplazes P; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005, 556-611
- Desmonts G, Couvreur J (1984): [Congenital toxoplasmosis. Prospective study of the outcome of pregnancy in 542 women with toxoplasmosis acquired during pregnancy. *Ann Pediatr (Paris)* 31, 805-809
- Dodd RY (1998): Transmission of parasites by blood transfusion. *Vox Sang* 74, 161-163
- Donald RGK, Roos DS (1995): Insertional mutagenesis and marker rescue in a protozoan parasite: Cloning of the uracil phosphoribosyltransferase locus from *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 5749-5753

- Dubey JP: The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*; in: *Toxoplasma gondii*. The model apicomplexan - perspectives and methods; hrgs. v. Weiss LM und Kim K; Academic Press Elsevier, London 2007, 1-18
- Dubey JP, Lindsay KD, Speer CA (1998): Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 11, 267-299
- Dunay IR, Heimesaat MM, Bushrab FN, Müller RH, Stocker H, Arasteh K, Kurowski M, Fitzner R, Borner K, Liesenfeld O (2004): Atovaquone maintenance therapy prevents reactivation of toxoplasmic encephalitis in a murine model of reactivated toxoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 4848-4854
- Ehrhardt S, Eggelte TA, Kaiser S, Adjei L, Burchard GD, Anemana SD, Bienzle U, Mockenhaupt FP (2007): Large-scale surveillance of *Plasmodium falciparum* crt(K76T) in Northern Ghana. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 3407-3409
- Eschemann A, Galkin A, Oettmeier W, Brandt U, Kerscher S (2005): HDQ (1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone), a high affinity inhibitor for mitochondrial alternative NADH dehydrogenase: evidence for a ping-pong mechanism. *J Biol Chem* 280, 3138-3142
- Fang J, Beattie DS (2002): Novel FMN-containing rotenone-insensitive NADH dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* mitochondria: isolation and characterization. *Biochemistry* 41, 3065-3072
- Fichera ME, Roos DS (1997): A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* 390, 407-409
- Fichera ME, Bhopale MK, Roos DS (1995): In vitro assays elucidate peculiar kinetics of clindamycin action against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 1530-1537

- Fox BA, Bzik DJ (2002): *De novo* pyrimidine biosynthesis is required for virulence of *Toxoplasma gondii*. Nature 415, 926-929
- Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL (1970): *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. Science 167, 893-896
- Füssle R und Willems WR: Antiinfektiva; in: Pharmakologie und Toxikologie für Studium und Praxis; hrsg. v. Estler CJ, Schmidt H; Schattauer Verlag, Stuttgart 2007, 785-894
- Gabaldón T, Rainey D, Huynen MA (2005): Tracing the evolution of a large protein complex in the eukaryotes, NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). J Mol Biol 348, 857-870
- Groß U: Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 1. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006
- Happe S, Fischer A, Heese C, Reichelt D, Grüneberg U, Freund M, Kloska S, Evers S, Hussstedt IW (2002): HIV-assoziierte zerebrale Toxoplasmose. Nervenarzt 73, 1174-1178
- Heikkilä T, Ramsey C, Davies M, Galtier C, Stead AMW, Johnson AP, Fishwick CWG, Boa AN, McConkey GA (2007): Design and synthesis of potent inhibitors of the malaria parasite dihydroorotate dehydrogenase. J Med Chem 50, 186-191
- Herold G: Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Eigenverlag Herold, Köln 2007
- Hsu E (2006): Reflections on the 'discovery' of the antimalarial qinghao. Br J Clin Pharmacol 61, 666-670

- Hudson AT (1993): Atovaquone - a novel broad-spectrum anti-infective drug. *Parasitol Today* 9, 66-68
- Hurt C, Tammaro D (2007): Diagnostic evaluation of mononucleosis-like illnesses. *Am J Med* 120, 911.e1-911.e8
- IfSG (Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen): "Infektionsschutzgesetz vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045), zuletzt geändert durch Artikel 2 des Gesetzes vom 13. Dezember 2007 (BGBl. I S. 2904)": 3. Abschnitt § 7 Absatz (3) Nr.6. [http://bundesrecht.juris.de/ifsg/\\_7.html](http://bundesrecht.juris.de/ifsg/_7.html) (14. April 2008)
- Iltzsch MH (1993): Pyrimidine salvage pathways in *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol* 40, 24-28
- Jones JL, Kruszon-Moran D, Wilson M (2003): *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2000. *Emerg Infect Dis* 9, 1371-1374
- Karow T, Lang-Roth R: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden. 15. Auflage; Thomas Karow, Pulheim 2007
- Kerscher SJ (2000): Diversity and origin of alternative NADH: ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta* 1459, 274-283
- Kerscher SJ, Okun JG, Brandt U (1999): A single external enzyme confers alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase activity in *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Sci* 112, 2347-2354
- Kessl JJ, Ha KH, Merritt AK, Meshnick SR, Trumppower BL (2006): Molecular basis of *Toxoplasma gondii* atovaquone resistance modeled in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biochem Parasitol* 146, 255-258

- Kim K, Weiss LM (2004): *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. Int J Parasitol 34, 423-432
- Kita K, Miyadera H, Saruta F, Miyoshi H (2001): Parasite mitochondria as a target for chemotherapy. J Health Sci 47, 219-239
- Köhler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJM, Palmer JD, Roos DS (1997): A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. Science 275, 1485-1489
- Kravetz JD, Federman DG (2005): Toxoplasmosis in pregnancy. Am J Med 118, 212-216
- Lambert RJW, Lambert R (2003): A model for the efficacy of combined inhibitors. J Appl Microbiol 95, 734-743
- Lang GE, Lang GK: Netzhaut (Retina); in: Augenheilkunde Verstehen-Lernen-Anwenden; hrsg. v. Lang GK u.a.; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2004, 321-392
- Lee MB (2000): Everyday and exotic foodborne parasites. Can J Infect Dis 11, 155-158
- Li W, Mo W, Shen D, Libo S, Wang J, Lu S, Gitschier JM, Zhou B (2005): Yeast model uncovers dual roles of mitochondria in the action of artemisinin. PLoS Genet 1, 329-334
- Lütgendorf C, Rojanawatsirivet C, Wernsdorfer G, Sirichaisinthop J, Kollaritsch H, Wernsdorfer WH (2006): Pharmacodynamic interaction between atovaquone and other antimalarial compounds against *Plasmodium falciparum* in vitro. Wien Klin Wochenschr 118, 70-76

- Marchetti O, Moreillon P, Glauser MP, Bille J, Sanglard D (2000): Potent synergism of the combination of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 2373-2381
- McFadden DC, Seeber F, Boothroyd JC (1997): Use of *Toxoplasma gondii* expressing beta-galactosidase for colorimetric assessment of drug activity in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 1849-1853
- McFadden DC, Tomavo S, Berry ES, Boothroyd JC (2000): Characterization of cytochrome b from *Toxoplasma gondii* and Q0 domain mutations as a mechanism of atovaquone-resistance. *Mol Biochem Parasitol* 108, 1-12
- Megged O, Shalit I, Yaniv I, Stein J, Fisher S, Levy I (2008): Breakthrough cerebral toxoplasmosis in a patient receiving atovaquone prophylaxis after a hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Transplant* 9. Januar 2008 [Epub ahead of print]
- Meissner M, Schluter D, Soldati D (2002): Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science* 298, 837-40
- Melo AMP, Bandejas TM, Teixeira M (2004): New insights into type II NAD(P)H: quinone oxidoreductases. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 603-616
- Meneceur P, Bouldouyre MA, Aubert D, Villena I, Menotti J, Sauvage V, Garin JF, Derouin F (2008): In vitro susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine and atovaquone. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 1269-1277
- Mi-Ichi F, Miyadera H, Kobayashi T, Takamiya S, Waki S, Iwata S, Shibata S, Kita K (2005): Parasite mitochondria as a target of chemotherapy: Inhibitory effect of Licochalcone A on the *Plasmodium falciparum* respiratory chain. *Ann N Y Acad Sci* 1056, 46-54

- Montoya JG, Liesenfeld O (2004): Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 1965-1976
- Murphy AD, Lang-Unnasch N (1999): Alternative oxidase inhibitors potentiate the activity of atovaquone against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 651-654
- Mutterschaftsrichtlinien (2007): Richtlinien des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen über die ärztliche Betreuung während der Schwangerschaft und nach der Entbindung („Mutterschafts-Richtlinien“) in der Fassung vom 10. Dezember 1985 (veröffentlicht im Bundesanzeiger Nr. 60 a vom 27. März 1986) zuletzt geändert am 13. September 2007, veröffentlicht im Bundesanzeiger Nr. 239: S. 8 326 vom 21. Dezember 2007, in Kraft getreten am 01. Januar 2008. [http://www.g-ba.de/downloads/62-492-245/RL\\_Mutter-2007-09-13\\_2.pdf](http://www.g-ba.de/downloads/62-492-245/RL_Mutter-2007-09-13_2.pdf) (14. April 2008)
- Nantapong N, Otofujii A, Migita CT, Adachi O, Toyama H, Matsushita K (2005): Electron transfer ability from NADH to menaquinone and from NADPH to oxygen of type II NADH dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 149-159
- Nicolle C, Manceaux LH (1909): Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C R Hebd Séances Acad Sci* 148, 369-372
- Omura S, Miyadera H, Ui H, Shiomi K, Yamaguchi Y, Masuma R, Nagamitsu T, Takano D, Sunazuka T, Harder A, Kölbl H, Namikoshi M, Miyoshi H, Sakamoto K, Kita K (2001): An anthelmintic compound, nafuredin, shows selective inhibition of complex I in helminth mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 60-62
- Pfefferkorn ER, Borotz SE (1994): Comparison of mutants of *Toxoplasma gondii* selected for resistance to azithromycin, spiramycin, or clindamycin. *Antimicrob Agents Chemother* 38, 31-37

- Pfefferkorn ER, Nothnagel RF, Borotz SE (1992): Parasiticidal effect of clindamycin on *Toxoplasma gondii* grown in cultured cells and selection of a drug-resistant mutant. *Antimicrob Agents Chemother* 36, 1091-1096
- Radke JR, White MW (1998): A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the *Herpes simplex* virus thymidine kinase. *Mol Biochem Parasitol* 94, 237-247
- RKI (Robert-Koch-Institut) (2007): Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. Toxoplasmose-neue Fassung des RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten-Merkblätter für Ärzte. *Epidemiol Bull* 2007/ 42, 390-394
- RKI (Robert-Koch-Institut) (2008): Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten. (Datenstand 1. März 2008) *Epidemiol Bull* 2008/ 10, 81
- Rasmusson AG, Soole KL, Elthon TE (2004): Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annu Rev Plant Biol* 55, 23-39
- Sacks JJ, Roberto RR, Brooks NF (1982): Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. *JAMA* 248, 1728-1732
- Saleh A: Characterization of alternative NADH dehydrogenases in the respiratory chain of *Toxoplasma gondii* as a novel drug target. *Biol. Diss. Göttingen* 2006
- Saleh A, Friesen J, Baumeister S, Gross U, Bohne W (2007): Growth inhibition of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* by nanomolar concentrations of HDQ (1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone), a high affinity inhibitor of alternative (type II) NADH dehydrogenases. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 1217-1222

- Schwartzmann JD, Pfefferkorn ER (1981): Pyrimidine synthesis by intracellular *Toxoplasma gondii*. J Parasitol 67, 150-158
- Sibley LD (2002): No more free lunch. Nature 415, 843-844
- Skinner LJ, Timperley AC, Wightman D, Chatterton JM, Ho-Yen DO (1990): Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family. Scand J Infect Dis 22, 359-361
- Smith JE (1995): A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol 25, 1301-1309
- Speer CP: Neonatologie; in: Kinder- und Jugendmedizin; hrsg. v. Koletzko B; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2007, 47-102
- Stahlmann R, Lode H: Antibiotika und Chemotherapeutika - antiinfektiöse Therapie; in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; hrsg. v. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K; Urban&Fischer, München 2005, 781-902
- Tamta H, Mukhopadhyay AK (2003): Biochemical targets for malaria chemotherapy. CRIPS 4, 6-9
- Teutsch SM, Juranek DD, Sulzer A, Dubey JP, Sikes RK (1979): Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. N Engl J Med 300, 695-699
- Tomavo S, Boothroyd JC (1995): Interconnection between organellar functions, development and drug resistance in the protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol 25, 1293-1299
- Uppuluri P, Nett J, Heitman J, Andes D (2008): Synergistic effect of calcineurin inhibitors and fluconazole against *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 52, 1127-1132

- Vercesi AE, Rodrigues CO, Uyemura SA, Zhong L, Moreno SNJ (1998): Respiration and oxidative phosphorylation in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 273, 31040-31047
- Weiss LM, Kim K (2000): The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci* 5, 391-405
- White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA (1996): Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and Etest. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 1914-1918
- WHO (World Health Organization): The World Health Report 2005: Make every mother and child count. WHO Press, Genf 2005
- WHO (World Health Organization): Guidelines for the treatment of malaria. WHO Press, Genf 2006
- Wulf MWH, van Crevel R, Portier R, ter Meulen CG, Melchers WJG, van der Ven A, Galama JMD (2005): Toxoplasmosis after renal transplantation: implications of a missed diagnosis. *J Clin Microbiol* 43, 3544-3547

## **Danksagung**

Mein Dank gilt allen, die mich bei der Verwirklichung meiner Promotion unterstützt haben.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Uwe Groß möchte ich mich herzlich für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Georg-August-Universität Göttingen durchführen zu können. Das motivierende Arbeitsklima und die herausragende wissenschaftliche Betreuung des Instituts waren sehr förderlich für meine Tätigkeit.

Besonders danke ich Herrn Dr. rer. nat. Wolfgang Bohne für die Überlassung des interessanten Themas und für die gute Betreuung während meiner Promotion. Sehr hilfreich waren Vorschläge und Korrekturen für die schriftliche Anfertigung meiner Dissertation.

Darüber hinaus geht ein Dankeschön an Lili Ens, Sansan Lin und Karin Rönnebäumer für ihre freundschaftliche Unterstützung bei meiner Laborarbeit sowie für anregende Gespräche und Diskussionen. Für das freundliche Miteinander im Institut und für die erlebnisreichen Stunden über die Arbeit hinaus bedanke ich mich außerdem bei Marialice Ferreira da Silva, Kristin Graumann, Diana Hippe, Andrea Hruzik, Nicole Molitor, Friedrich Schöttelndreier und Anna Takaács. Allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Bohne, Lüder, Lugert und Weig möchte ich ebenfalls für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Ein besonderes Dankeschön geht an Christine Nitschke sowie Katrin und Wolfgang Radenbach für Korrekturen, konstruktive Anregungen, aufmunternde Gespräche und fröhliche Abendessen. Meinen Mitbewohnern in Göttingen danke ich für die wunderbare Zeit im Wohnheim Humboldtallee 14. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Gisela und Bernd Naujoks für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotion. Der Druck meiner Dissertation wurde durch eine private Spende ermöglicht. Vielen Dank dafür.

## **Lebenslauf**

Am 13. Mai 1979 wurde ich als zweite Tochter von Gisela Naujoks, geb. von Rekowski, und Bernd Naujoks in Strausberg in der Mark Brandenburg geboren.

In meinem Heimatort Waldsieversdorf besuchte ich die Grundschule und ging anschließend auf das Gymnasium Müncheberg, an dem ich im Sommer 1998 die Abiturprüfung ablegte.

Nach dem Abitur sammelte ich erste praktische Erfahrungen im medizinischen Bereich. Als Praktikantin war ich unter anderem im Kreiskrankenhaus Strausberg, im Krankenhaus Bad Saarow und in einer Allgemeinarztpraxis tätig. Des Weiteren nahm ich an internationalen Freiwilligeneinsätzen in Großbritannien und Italien teil.

Im Sommersemester 1999 nahm ich das Medizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen auf. Die ärztliche Vorprüfung legte ich im März 2001 ab. Den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung absolvierte ich im September 2002. Nach zwei weiteren klinischen Semestern in Göttingen studierte ich von September 2003 bis Juli 2004 an der Università degli Studi di Siena in der Toskana, Italien. Dem zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung im September 2005 folgte mein praktisches Jahr, das ich in der Neurologie am Universitätsklinikum Göttingen begann. Das Tertial der Inneren Medizin absolvierte ich in der Kardiologie im St. Joseph's Health Centre in Toronto und in der Gastroenterologie im St. Clare's Mercy Hospital in Neufundland, Kanada. Das chirurgische Tertial leistete ich in der Herzchirurgie im Royal Victoria Hospital in Montreal, Kanada, und in der Unfallchirurgie im Universitätsklinikum Göttingen ab. Den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung bestand ich im November 2006 in Göttingen und erhielt im darauf folgenden Jahr die ärztliche Approbation.

Seit Januar 2007 promoviere ich in der Abteilung Parasitologie am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Uwe Groß.