

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie

(Prof. Dr. med. U. Groß)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Inhibitorische Effekte von 1-Hydroxychinolonen  
auf *Toxoplasma gondii***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

für Humanmedizin

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Christian Platte**

aus

Rinteln

Göttingen 2023

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent:	Prof. Dr. med. Uwe Groß
Ko-Referent:	PD Dr. Alexander Hahn
Drittreferent:	Prof. Dr. Ralf Dressel
Datum der mündlichen Prüfung:	14.11.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Inhibitorische Effekte von 1-Hydroxychinolonen auf *Toxoplasma gondii*“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den ..... ..

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Bajohr LL, Ma L, **Platte C**, Liesenfeld O, Tietze LF, Gross U, Bohne W (2010): In vitro and in vivo activities of 1-hydroxy-2-alkyl-4(1H)quinolone derivatives against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 517-21

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> , die Entdeckung.....	1
1.1.1 Stämme und Ultrastruktur von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	2
1.1.2 Der Lebenszyklus von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	3
1.2 Die klinische Bedeutung der Toxoplasmose.....	6
1.2.1 Die pränatale Infektion (Kongenitale Toxoplasmose) .....	7
1.2.2 Die postnatale Infektion .....	8
1.2.3 Toxoplasmose bei HIV-positiven Patienten .....	10
1.3 Prävention der Toxoplasmose.....	11
1.4 Therapie der Toxoplasmose .....	12
1.5 Die Atmungskette.....	14
1.6 Die alternative NADH-Dehydrogenase als Zielstruktur für 1-Hydroxychinolone.....	16
1.7 Die Pyrimidinbiosynthese in <i>Toxoplasma gondii</i> : <i>De-novo</i> -Synthese und <i>salvage pathway</i> .....	18
1.8 Ziele dieser Doktorarbeit .....	20
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.1 Material .....	22
2.1.1 Geräte.....	22
2.1.2 Medien und Zusätze .....	23
2.1.3 Reagenzien.....	23
2.1.4 Verbrauchsmaterial Zellkultur .....	24
2.1.5 Parasitenstämme und Wirtszellen.....	24
2.1.6 Chemikalien und Reagenzien .....	25
2.1.7 1-Hydroxychinolonverbindungen .....	26
2.2 Methoden .....	27
2.2.1 Zellkultur .....	27
2.2.1.1 Kultivierung von Humanen Vorhautfibroblasten.....	27
2.2.1.2 Kultivierung von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	28
2.2.1.3 Kryokonservierung von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	29
2.2.1.4 Das Auftauen von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	29
2.2.2 Bestimmung der Replikationsrate unter dem Phasenkontrastmikroskop .....	29
2.2.2.1 Die partielle Lyse der Wirtszelle.....	31
2.2.2.2 Berechnung der halb-maximalen inhibitorischen Konzentration .....	32
2.2.3 Bestimmung des relativen ATP-Levels .....	33
2.2.4 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials ( $\Delta\Psi_m$ ) .....	34

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>36</b>
3.1	Vergleich der 1-Hydroxychinolone hinsichtlich ihres wachstumshemmenden Potentials auf <i>Toxoplasma gondii</i> -Genotyp-I-Parasiten.....	36
3.1.1	<i>Compound A &amp; B</i> als potente Wachstumshemmer von <i>Toxoplasma gondii</i> -Genotyp-I-Parasiten 24 h p. i.....	37
3.1.2	Hypersensitivität von RH/ $\Delta uprt$ gegenüber Hydroxychinolonen 24 h p. i.....	40
3.1.3	Wachstumstest im Langzeitversuch über 48 h, 72 h und 96 h .....	42
3.2	Bestimmung des relativen ATP-Gehaltes von <i>Toxoplasma gondii</i> unter Einfluss von 1-Hydroxychinolonen .....	44
3.2.1	Verminderung des relativen ATP-Gehaltes für alle getesteten Stämme unter Einwirkung der 1-Hydroxychinolone .....	46
3.2.2	Verminderung des relativen ATP-Gehaltes des RH-Stammes durch CA, CB & HDQ.....	46
3.2.3	Verminderung des relativen ATP-Gehaltes von RH/ $\Delta uprt$ durch CA, CB & HDQ .....	48
3.2.4	Verminderung des ATP-Gehaltes von RH/ $\Delta scs$ durch CA, CB & HDQ .....	50
3.3	Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) .....	52
3.3.1	1-Hydroxychinolone führen zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials von Genotyp-I-Parasiten des RH-Stammes.....	54
3.3.2	1-Hydroxychinolone führen zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials von RH/ $\Delta scs$ .....	55
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>57</b>
4.1	<i>Compound A &amp; B</i> als potente Wachstumshemmer des Genotyp-I-Parasiten <i>Toxoplasma gondii</i> .....	57
4.2	Atmungskettenassoziierte Komponenten von <i>Toxoplasma gondii</i> als Angriffspunkt für Wirkstoffe .....	61
4.2.1	Die alternative NADH-Dehydrogenase als vielversprechender Angriffspunkt für 1-Hydroxychinolone.....	61
4.2.2	Die Dihydroorotat-Dehydrogenase als weiterer Angriffspunkt für 1-Hydroxychinolone.....	62
4.2.3	Interpretation des relativen ATP-Gehalts und des Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) unter Einfluss der 1-Hydroxychinolone.....	63
4.2.3.1	Einfluss der 1-Hydroxychinolone auf den ATP-Gehalt der RH-Parasiten .....	63
4.2.3.2	Störung des mitochondrialen Membranpotentials von RH-Parasiten unter Einwirkung von 1-Hydroxychinolonen .....	65
4.2.4	Betrachtung der Untersuchungsergebnisse anhand der Deletionsmutanten RH/ $\Delta uprt$ & RH/ $\Delta scs$ .....	67
4.3	Struktur und Funktionsaspekte .....	71
4.4	Weitere Wirkstoffe und Ausblick in die aktuelle Forschung .....	73
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>81</b>

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Die Pyrimidin- <i>de-novo</i> -Synthese und der <i>salvage pathway</i> .....	19
Abb. 2: 1-Hydroxy-2-Dodecyl-4(1)Quinolon, HDQ.....	26
Abb. 3: Molekularstruktur von <i>Compound A</i> und <i>Compound B</i> .....	26
Abb. 4: Molekularstruktur von <i>Compound C</i> und <i>Compound D</i> .....	27
Abb. 5: <i>T. gondii</i> im Phasenkontrast.....	31
Abb. 6: Wachstumsinhibitorisches Potential und IC <sub>50</sub> von CA auf <i>T. gondii</i> 24 h p. i. ....	38
Abb. 7: Wachstumsinhibitorisches Potential und IC <sub>50</sub> von CB auf <i>T. gondii</i> 24 h p. i. ....	38
Abb. 8: Wachstumsinhibitorisches Potential und IC <sub>50</sub> von HDQ auf <i>T. gondii</i> 24 h p. i. ...	39
Abb. 9: Wachstumsinhibitorisches Potential von CC und CD auf <i>T. gondii</i> 24 h p. i. ....	40
Abb. 10: Wachstumsinhibitorisches Potential von CA, CB und HDQ 24 h p. i. gegen- über RH/ $\Delta$ <i>uprt</i> .....	41
Abb. 11: Darstellung des Membranpotentials mittels DiOC <sub>6</sub> .....	53

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Mögliche klinische Auswirkungen der Kongenitalen Toxoplasmose für Neugeborene und im späteren Leben .....	8
Tab. 2: Therapie von HIV-positiven Patienten mit opportunistischer zerebraler Erkrankung durch <i>T. gondii</i> .....	13
Tab. 3: Verwendete Geräte mit Angabe von Modell und Hersteller.....	22
Tab. 4: Verwendete Medien und Zusätze.....	23
Tab. 5: Auflistung der Unternehmen von denen die Verbrauchsmaterialien bezogen wurden.....	24
Tab. 6: Verwendete Parasitenstämme und Unterscheidung in Spezifität .....	24
Tab. 7: Unternehmensbezogene Herkunft der Chemikalien und Reagenzien .....	25
Tab. 8: Nährmedium zur Kultivierung von Humanen Vorhautfibroblasten .....	28
Tab. 9: Nährmedium zur Kultivierung von <i>T. gondii</i> .....	28
Tab. 10: Inhaltsstoffe 4%-Paraformaldehyd .....	30
Tab. 11: Inhaltsstoffe 0,25%-Triton-X-100 .....	30
Tab. 12: Inhaltsstoffe Mowiol.....	31
Tab. 13: Wachstumsinhibitorische Wirkung von CA, CB und HDQ 48 h p. i. ....	43
Tab. 14: Wachstumsinhibitorische Wirkung von CA und CB 72 h und 96 h p. i. ....	44
Tab. 15: Relativer ATP-Gehalt des RH-Stammes unter den Wirkstoffen CA, CB & HDQ .....	47
Tab. 16: Relativer ATP-Gehalt von RH/ $\Delta uprt$ unter den Wirkstoffen CA, CB & HDQ ...	48
Tab. 17: Relativer ATP-Gehalt von RH/ $\Delta scs$ unter den Wirkstoffen CA, CB & HDQ.....	51
Tab. 18: Auswirkungen auf das Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) des RH-Stammes durch die Wirkstoffe CA, CB & HDQ .....	54
Tab. 19: Auswirkungen auf das Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) von RH/ $\Delta scs$ durch CA.....	56
Tab. 20: Durchschnittliche Zunahme der Parasitenzahl über die Zeitachse unter dem Einfluss von CA & CB in den Konzentrationen von 100 nM und 1 $\mu$ M.....	59



**Abkürzungsverzeichnis**

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ART	Antiretrovirale Therapie
ATP	Adenosintriphosphat
CA	<i>Compound A</i>
CB	<i>Compound B</i>
CC	<i>Compound C</i>
CD	<i>Compound D</i>
cLogP	Membrangängigkeit einer Verbindung
CPSII	Carbamoylphosphat-Synthetase II
$\Delta\Psi_m$	Membranpotential (-e,-s)
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DHO	Dihydroorotat
DHODH	Dihydroorotat-Dehydrogenase
DiOC <sub>6</sub>	3,3'-Dihexyloxycarbocyanin-Iodid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum
Fe-/S-Cluster	Eisen-/Schwefel-Cluster
FNM	Flavinmononukleotid
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HDQ	1-Hydroxy-2-Dodecyl-4(1)Quinolon
HHF	<i>human foreskin fibroblasts</i> , Humane Vorhautfibroblasten
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> , Humanes Immundefizienz-Virus
IC <sub>50</sub>	halb-maximale inhibitorische Konzentration
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
KG	Körpergewicht

LD	letale Dosis
MM	Mitochondrienmembran
Mn	Mikronemen
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NDH-1	konventionelle NADH-Dehydrogenase
NDH-2	alternative NADH-Dehydrogenase
OMP	Orotidin-5'-Monophosphat
PA	Parasitenanzahl
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
p. i.	postinfektion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
PA/PV	Parasitenanzahl/Parasitophore Vakuole
P/S	Penicillin/Streptomycin
PV	Parasitophore Vakuole
RKI	Robert Koch-Institut
SCS	Succinyl-CoA-Synthetase
SMX	Sulfamethoxazol
SSW	Schwangerschaftswoche
TD	toxische Dosis
<i>T.</i>	<i>Toxoplasma</i>
TI	therapeutischer Indize
TMP	Trimethoprim
U	<i>Unit</i> (-s), Einheit (-en)
UMP	Uridin-5'-Monophosphat
UPRT	Uracil-Phosphoribosyltransferase
ZNS	Zentralnervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 *Toxoplasma gondii*, die Entdeckung

*Toxoplasma (T.) gondii*, ein obligat intrazellulärer Parasit, wurde erstmals 1908 von Nicolle und Mancoux beschrieben, die den Parasiten sowohl intra- als auch extrazellulär in südafrikanischen Nagetieren, den Gundis (Ctenodactylidae), in Tunesien nachweisen konnten. Sie schilderten die offensichtliche Ähnlichkeit des Parasiten zu Leishmanien, die abgesehen von deren Geißel, in Form, Morphologie und Größe gegeben war (Nicolle und Manceaux 1909). Im selben Jahr wurde *T. gondii* vom brasilianischen Forscher Alfonso Splendor in Sao Paulo in Kaninchen nachgewiesen (Splendor 2009).

Der Name *Toxoplasma* leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet „bogenförmig“, womit das äußere Erscheinungsbild des Parasiten beschrieben wird. *Gondii* verweist auf das oben genannte Nagetier, in dem der Parasit Anfang des 20. Jahrhunderts nachgewiesen werden konnte (Innes 2010).

*T. gondii* kann als einer der erfolgreichsten Parasiten der Welt angesehen werden. Der Parasit kommt in den meisten Regionen der Welt vor und ist darüber hinaus fähig, nahezu alle kernhaltigen Zellen der Warmblüter (inklusive der Beuteltiere), der Menschen sowie verschiedener Meeressäuger zu infizieren. Die durch den Erreger *T. gondii* ausgelöste Toxoplasmose ist die weltweit weitverbreitetste Infektionskrankheit (Tener et al. 2000). In Schätzungen geht man davon aus, dass etwa ein Drittel der Weltbevölkerung mit Toxoplasmen infiziert ist (Innes 2010; Skariah et al. 2010), mit einer geschätzten Seroprävalenz von 30 – 50% der Gesamtpopulation (Flegr et al. 2014). In einer in Deutschland durchgeführten serologischen Studie wurde die Seroprävalenz erst kürzlich mit 55% angegeben (Wilking et al. 2016). Der Mensch zählt hierbei nur zu den zahlreichen Zwischenwirten des Parasiten. Erst sehr spät konnte die Katze als der definitive Endwirt von *T. gondii* identifiziert werden, in dem die geschlechtliche Vermehrung stattfindet.

In vielerlei Hinsicht ist die Erforschung des Parasiten von großem Interesse. Neben seiner weiten Verbreitung und Virulenz für den Menschen kommt hier insbesondere die Fragestellung auf, wie es dem Parasiten gelingt, sich erfolgreich gegen das Immunsystem seiner Wirte durchzusetzen und mitunter Jahrzehnte in dessen Zellen zu persistieren. Die klinische Mani-

festation eines Infizierten wird hierbei Toxoplasmose genannt, eine von *T. gondii* verursachte Zoonose. Für die medizinische Forschung ist die Behandlung von Infizierten von Interesse, da eine besondere Gefahr für den Fötus besteht, wenn sich die werdende Mutter im Rahmen einer Schwangerschaft erstmalig mit Toxoplasmen infiziert und somit eine Immunantwort bisher ausgeblieben ist. Weiterhin von klinischer Bedeutung ist die Infektion bei Immunsupprimierten, da ein geschwächtes Immunsystem den Parasiten in seiner Replikation nicht ausreichend eindämmen kann, was im schlimmsten Fall zum Tode des Infizierten führt.

### 1.1.1 Stämme und Ultrastruktur von *Toxoplasma gondii*

*T. gondii* ist ein einzelliger Eukaryont, der phylogenetisch zu der Gruppe der Apicomplexa gehört. Von *T. gondii* sind die drei Genotypen I, II und III bekannt. Sie unterscheiden sich in ihrer Epidemiologie und Virulenz. Spezifische Peptide im Serum des Patienten erlauben hierbei die Zuordnung zu einem Stamm (Montoya und Liesenfeld 2004). Genotyp I gilt als der virulenteste Typ mit einer Mortalitätsrate von 100% im *in vivo* Versuch mit Mäusen, wobei die letale Dosis (LD) bei < zehn Parasiten lag. Genotyp II und III waren weniger virulent, die LD betrug > 1000 Parasiten (Montazeri et al. 2017; Kim und Weiss 2004). Alle drei Stämme können serologisch beim Menschen nachgewiesen werden, wobei Genotyp I und II häufig bei kongenitalen Infektionen beobachtet wird und Typ III der am häufigsten isolierte im Tierreich ist (Montoya und Liesenfeld 2004). Die natürliche Virulenz des Parasiten, die ihm eine breite Anpassungsfähigkeit ermöglicht, wurde hierbei durch sexuelle Rekombination durch kombinierten Polymorphismus<sup>1</sup> zwischen getrennten und untereinander konkurrierenden Stämmen vorangetrieben (Grigg et al. 2001).

Die Apicomplexa sind eine Klasse der Protozoen<sup>2</sup>, zu denen neben *T. gondii* auch *Plasmodium* (der Erreger der Malaria) und *Cryptosporidium* (Auslöser von Diarrhoe und kolikartigen Abdominalkrämpfen) gezählt werden (Kim und Weiss 2004). Neben bekannten Zellorganellen, wie dem granulären Endoplasmatischen Retikulum (ER), in dem Teile der Proteinbiosynthese und der Membranproduktion ablaufen, oder den Mitochondrien, die als Hauptsynthesort von Adenosintriphosphat (ATP) dienen, besitzt das Cytosol von *T. gondii* einige Besonderheiten. So handelt es sich beim Apicoplast wahrscheinlich um ein Relikt früherer

---

<sup>1</sup> Polymorphismus bezeichnet in der Genetik das Auftreten einer oder mehrerer Sequenzvariationen innerhalb der Gene einer Population.

<sup>2</sup> Protozoen sind Einzeller, die ihre Organellen durch eine Zellmembran schützen. Sie zählen zu den Eukaryoten und besitzen (im Gegensatz zu Prokaryoten) einen festen Zellkern. Es sind heterotrophe Lebensformen, die für ihren Stoffwechsel auf die Verbindungen anderer Organismen als Wirt angewiesen sind. Hiernach unterteilt man Protozoen in mutualistisch, kommensalisch und parasitär. Zu letzteren zählt *T. gondii*.

Chloroplasten, dem Funktionen im Fett-, Isoprenoid<sup>3</sup>- und Eisenstoffwechsel zugeschrieben werden, der aber durch genetische Veränderung unfähig zur Photosynthese geworden ist (Kim und Weiss 2004). Weiterhin ist der Apicalpol für die Ultrastruktur von *T. gondii* charakteristisch. Als obligat intrazellulärer Parasit ist *T. gondii* darauf angewiesen in die Wirtszellen einzudringen, ein Prozess der als Invasion bezeichnet wird. Während der Invasion kommt es zu einer Sekretion von Proteinen aus speziellen sekretorischen Organellen, wie z.B. den Mikronemen<sup>4</sup> (Mn) und den am Apicalpol gelegenen Rhoptrien<sup>5</sup> (Muñiz-Hernández et al. 2011). Der Vorgang des Eindringens erfordert eine Eigenmotilität des Parasiten, die auf sein subpelliculäres Zytoskelett zurückzuführen ist (Muñiz-Hernández et al. 2011).

### 1.1.2 Der Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*

Seit der Entdeckung des Parasiten im Jahre 1908 konnte der Lebenszyklus von *T. gondii* lange Zeit nicht vollständig geklärt werden. Da man den Parasiten in untersuchten Wirtstieren sowohl frei extrazellulär, als auch in diversen Geweben wie Muskeln, Organen, Nervenzellen und Knochenmark fand (Nicolle und Manceaux 1909), ging man davon aus, dass vor allem Fleischfresser respektive Menschen durch die Aufnahme von mit Toxoplasmen befallenen Tieren infiziert würden. Mit der Einführung des Dye-Tests 1948 durch Albert Sabin und Harry Feldman änderte sich diese Ansicht. Mit diesem war ein direkter Nachweis einer Toxoplasmeninfektion möglich, wodurch festgestellt wurde, dass in der breiten Bevölkerung eine hohe Seroprävalenz vorlag (Sabin und Feldman 1948). Im Hinblick auf die Aufschlüsselung des Lebenszyklus von *T. gondii* war von Interesse, dass die Prävalenz der Infizierten hierbei nicht in direkter Korrelation zu deren individuellem Fleischkonsum stand und auch Vegetarier infiziert waren. Ähnliches beobachtete man im Tierreich, in dem ebenfalls eine hohe Prävalenz bei reinen Pflanzenfressern auftrat. Passend hierzu verzeichnete man im Neuseeland der 50er-Jahre eine auffällig hohe Abortquote bei den dort in großen Beständen als Nutztiere gehaltenen Schafen. Der größte Teil dieser Aborte konnte hierbei in Zusammenhang mit einer *T. gondii*-Infektion gebracht werden, da der Parasit aus Gewebeproben toter Feten isoliert werden konnte (Innes 2010). Die Muttertiere hatten folglich den Parasiten über die Plazentaschranke an ihre Frucht weitergegeben.

---

<sup>3</sup> Isoprenoide sind Moleküle mit einem Gerüst aus C-Atomen, deren Anzahl durch fünf teilbar ist (Isoprenregel). Sie weisen ein lipophiles Grundgerüst auf (was sie membrangängig macht) und sind Bestandteil von wichtigen Fetten, wie Steroiden und Terpenen.

<sup>4</sup> Mikronemen sind Organellen, die für die Anbindung des Apicalkomplexes an die Wirtszelle benötigt werden. Sie haben eine Länge von etwa 0,05 µm und enthalten spezifische Proteine für die Anhaftung an die Wirtszelle.

<sup>5</sup> Rhoptrien sind Sekretionsorganellen und enthalten lytische Enzyme, welche u. a. die Membranen von Wirtszellen durchgängig machen.

Wie bei anderen Apicomplexa entspricht es auch dem Lebenszyklus von *T. gondii*, dass sich die Morphologie des Parasiten in verschiedenen Entwicklungsstadien ändert (Skariah et al. 2010). Es gibt drei infektiöse Stadien von *T. gondii*, wobei von einer Vielzahl von Faktoren abhängt, in welchem Stadium sich der Parasit befindet. Hierbei spielt unter anderem eine Rolle, wie lange der Zeitpunkt der Infektion zurückliegt und ob sich *T. gondii* sexuell in seinem Endwirt oder asexuell vermehrt. Bei Letzterem kann der Parasit sich in fast allen kernhaltigen Zellen warmblütiger Lebewesen vermehren.

Im Rahmen einer Primärinfektion dominieren Tachyzoiten. Dieses Entwicklungsstadium von *T. gondii* misst 2 – 7  $\mu\text{m}$  (Kim und Weiss 2004) und weist die für Toxoplasmen typische halbmondförmige Struktur auf. Wie bei allen Entwicklungsstadien von *T. gondii* weisen auch Tachyzoiten keine Flagellen, Zilien oder Geißeln auf und bewegen sich durch Gleit- und Rotationsbewegungen fort. Sie besitzen ein abgerundetes hinteres Ende und einen vorne spitz zulaufenden Apicalkomplex, der es dem Parasiten ermöglicht, in die Wirtszellen einzudringen (Dubey et al. 1998). Nach dem Eindringen in die Wirtszelle ist der Parasit von einer Parasitophoren Vakuole (PV) umgeben, von der angenommen wird, dass sie von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle stammt (Dubey et al. 1998).

Tachyzoiten sind zur schnellen Replikation fähig, was sich auch in ihrem Namen widerspiegelt (tachy [gr.] = schnell). Abhängig von Stamm und Art der Wirtszelle teilt sich *T. gondii* innerhalb der Vakuolen alle 6 – 9 h asexuell via Endodyogenie<sup>6</sup> (Sibley et al. 2009).

Da sich die Parasiten nahezu synchron, d. h. zu einem Zeitpunkt, teilen, kann alle 6 – 9 h von einer Verdopplung ihrer Zellzahl ausgegangen werden. Dies führt dazu, dass das Zellsoma der Wirtszelle nach etwa 48 h aufbricht und die dann in großer Zahl freiwerdenden Tachyzoiten (im Rahmen eines 2. Infektionszyklus) neue Zellen befallen können. Über die Blutbahn können sie so beinahe sämtliche Gewebe ihres Wirtes wie ZNS, Knochenmark, viszerale Organe, Plazenta und, für die Diagnostik relevant, das Auge befallen. Da eine Primärinfektion mit Toxoplasmen eine starke Immunantwort auslöst, kann diese auch klinisch auffällig werden, wobei am ehesten eine grippale Symptomatik zu erwarten ist (Montoya und Liesenfeld 2004). Um der Immunantwort des Wirtes zu entgehen, infiltriert der Parasit Wirtszellen und konvertiert sich von der tachyzoiten in die weniger immunogene bradyzoite Entwicklungsform (Skariah et al. 2010). Diese ist den Tachyzoiten morphologisch sehr ähnlich, bildet aber intrazellulär eine Zyste aus, in denen der Parasit für Jahrzehnte in den Wirtszellen

---

<sup>6</sup> Die Endodyogenie ist ein Zellteilungsvorgang, bei der asexuell aus einer Mutterzelle zwei Tochterzellen entstehen. Sie ist für Apicomplexa typisch.

persistieren kann (Innes 2010). Innerhalb der Zysten teilt sich *T. gondii* in der bradyzoiten Form nur sehr langsam (*brady* [gr.] = langsam). Die Größe der Zysten hängt demnach von deren Verweildauer im Organismus ab. Hierbei messen noch junge Zysten eine Größe von 5 µm und beinhalten nur wenige Parasiten, wohingegen ältere Gewebezysten hunderte der Parasiten zählen können. Die Größe und Form der Zysten hängen neben ihrem Alter auch von der Art des befallenen Gewebes ab. So haben langjährig persistierende Zysten im Gehirn im Mittel einen Durchmesser von 70 µm bei einer eher rundlichen Form, wohingegen intramuskuläre Zysten länglich geformt sind und eine Größe von etwa 100 µm erreichen (Dubey et al. 1998).

Durch einen bisher nicht vollständig geklärten Mechanismus ist es *T. gondii* möglich, in die schnell teilende tachyzoite Form zurück zu konvertieren. Begünstigt wird diese erneute Transformation durch ein schwaches Immunsystems des Wirtes. Besonders bei immunsupprimierten Patienten kann ein erneutes Ausbrechen einer bereits durchgemachten Toxoplasmeninfektion beobachtet werden. Nachhaltig zur Kenntnis genommen wurde dies in den 80er-Jahren, als *T. gondii* als eine der Haupttodesursachen durch opportunistische Infektionen bei AIDS-Patienten in fortgeschrittenem Stadium identifiziert wurde (Dubey et al. 1998; Innes 2010). Dies spiegelte die Wichtigkeit eines intakten Immunsystems zur Kontrolle und Eindämmung einer Toxoplasmeninfektion wider.

Neben diesen zwei Entwicklungsstufen entdeckten Hutchison et al. (1969) in den 60er-Jahren mit der Oocyste ein neues Entwicklungsstadium des Parasiten. Kurze Zeit später wurde der Lebenszyklus von *T. gondii* endgültig entschlüsselt und die Katze als Endwirt für den Parasiten ausgemacht (Dubey et al. 1970; Hutchison et al. 1970).

Infiziert sich die Katze mit *T. gondii*, so kann sich der Parasit im Dünndarmepithel geschlechtlich fortpflanzen (Frenkel et al. 1970; Hutchison et al. 1970; Ferguson et al. 1974). Hier findet durch die Verschmelzung von weiblichen und männlichen Gameten die Fusion zur Zygote statt, die dann im Nachfolgenden die reife Oocyste ausbildet, welche mit dem Kot der Katze ausgeschieden wird. Je nachdem, welche infektiöse Form von *T. gondii* die Katze mit der Nahrung aufgenommen hat (Tachyzoit, Bradyzoit oder Oocyste), dauert es 3 – 18 Tage, bis die Katze zum Ausscheider wird (Dubey et al. 1998). Die Infektion der Katze durch Bradyzoiten ist dabei die für den Parasiten erfolgreichste, da nahezu 100% der Katzen, die diese durch infizierte Gewebezysten mit der Nahrung aufnahmen, später auch Oocysten mit dem Kot ausschieden. Dem gegenüber standen weniger als 30%, die das tachyzoite Stadium oder Oocysten aufgenommen hatten (Dubey et al. 1998).

Oocysten messen im Durchmesser 10 – 12  $\mu\text{m}$  und werden 1 – 5 d nach der Defäkation durch Sporulation infektiös. Jede sporulierte Oocyste enthält hierbei zwei Sporocysten, wovon wiederum jede vier Sporozoitien einschließt (Dubey 1998). Für Menschen und Tiere stellen Oocysten aufgrund der hohen Kontagiosität die Hauptinfektionsquelle von *T. gondii* dar, da sie, abhängig von der Witterung, extrem widerstandsfähig sind und 12 – 18 Monate überdauern können, ohne ihre Virulenz einzubüßen (Frenkel et al. 1975; Innes 2010).

## 1.2 Die klinische Bedeutung der Toxoplasmose

Im Menschen vermehrt sich *T. gondii* asexuell. Die Infektion erfolgt hierbei entweder durch die Aufnahme von Oocysten, welche durch den Endwirt (die Katze) ausgeschieden werden und somit auch Lebensmittel und Trinkwasser kontaminieren können, oder durch die Aufnahme von Gewebezysten (Bradyzoiten), infolge von nicht ausreichend gegartem Fleisch, was in erhöhtem Maße für Lamm- und Schweinefleisch zutrifft (Montoya und Liesenfeld 2004). Eine Infektion mit Tachyzoiten ist wenig wahrscheinlich, da diese in der Regel von der Magensäure abgetötet werden (Jacobs et al. 1960; Dubey et al. 1998). Dem Verdauungstrakt folgend dringen die Sporozoitien oder Bradyzoiten in das Darmepithel ein und differenzieren sich dort zu Tachyzoiten, die damit beginnen sich in ihrem neuen Wirt „überfallartig“ zu replizieren. Zwar kann eine durch Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) vermittelte Immunantwort einen Großteil der freiwerdenden Tachyzoiten abtöten, jedoch kann es einem Teil der Parasiten gelingen neue Gewebe zu infizieren, v. a. Zellen des Zentralen Nervensystems (ZNS) und des Muskelgewebes, wo dann eine Konvertierung in das bradyzoite Stadium erfolgt (Skariah et al. 2010). Auf diese Weise kann der Parasit dauerhaft in seinem Wirt persistieren.

Die Durchseuchungsrate in Deutschland mit *T. gondii* wird auf etwa 55% der Gesamtpopulation geschätzt und ist korrelierend mit steigendem Lebensalter, da die Wahrscheinlichkeit sich zu infizieren mit zunehmendem Alter annähernd linear ansteigt. Es wird dabei geschätzt, dass in Mitteleuropa die Durchseuchung um ca. 1% pro Lebensjahr zunimmt (Groß et al. 2001).

Bei der Infektion unterscheidet man die prä- und postnatale Infektion. Medizinisch bedeutsam ist vor allem die pränatale Infektion des Embryos/Fötus, sowie die postnatale Infektion bei geschwächtem Immunsystem. Im Nachfolgenden Kapitel werden beide Infektionswege erläutert.



### 1.2.1 Die pränatale Infektion (Kongenitale Toxoplasmose)

Akute Infektionen schwangerer Frauen mit *T. gondii* können beim Embryo/Fötus schwerwiegende gesundheitliche Schäden verursachen, wenn der Parasit diaplazentar übertragen wird (McLeod et al. 2009; Jones et al. 2001). Man spricht hierbei von Kongenitaler Toxoplasmose. Eine Transmission des Parasiten auf den Fötus erfolgt beinahe ausschließlich bei Müttern, die sich im Rahmen einer Erstinfektion mit *T. gondii* während der Schwangerschaft infizieren (Montoya und Remington 2008), da sie in diesem Fall noch keine Antikörper gegen den Parasiten bilden konnten. Ein serologisches Screening zeigte, dass etwa 41% der Schwangeren über eine spezifische Immunität gegen *T. gondii* verfügten (Roos et al. 1993). Das bedeutet, dass bei diesen nur wenig Gefahr für eine Ansteckung des Embryos/Fötus besteht (Groß et al. 2001; Jones et al. 2003).

Eine globale Auswertung verschiedener Studien ergab, dass bei 28,1% der Frauen, bei denen sich während einer Schwangerschaft eine Serokonversion<sup>7</sup> ergeben hatte, eine Transmission des Parasiten auf den Embryo/Fötus erfolgt war (Torgerson und Mastroiacovo 2013).<sup>8</sup> Die Höhe des Transmissionsrisikos steigt hierbei mit der Dauer der Schwangerschaft (Groß et al. 2001; Thiébaud et al. 2007; Hotop et al. 2012), wobei die Gefahr einer klinischen Manifestation der Kongenitalen Toxoplasmose am Anfang der Gestation am höchsten ist.<sup>9</sup> Eine Studie mit 542 Frauen, die sich während der Schwangerschaft erstmalig mit Toxoplasmen infizierten war hier aufschlussreich (Desmonts und Couvreur 1984). So lag das Transmissionsrisiko für Schwangere, die sich während der Schwangerschaft erstmals mit Toxoplasmose infizierten, im 1. Trimester bei 14%, im 2. Trimester bei 29% und im 3. Trimester bei 59%. Eine klinische Manifestation bei Geburt zeigte sich dabei abhängig vom Infektionszeitpunkt während der Schwangerschaft. So traten Symptome bei Geburt in 73% der Fälle auf, wenn die Infektion im 1. Trimester erfolgte, aber nur in 28% und 11% der Fälle im 2. und 3. Trimester. Die Schwere der beobachteten Störungen ist jedoch bei Infektionen im 1. und 2. Trimester am größten (Hotop et al. 2012), wobei die Infektion im 1. Trimester wahrscheinlich meist zum Abort führt (Groß et al. 2001).

---

<sup>7</sup> Eine Serokonversion während der Schwangerschaft spricht deutlich für eine Erstinfektion mit dem Parasiten.

<sup>8</sup> Von 6198 Schwangeren, bei denen eine Serokonversion während der Schwangerschaft erfolgt war, wurden 1740 Embryos/Feten infiziert.

<sup>9</sup> Besonders hoch sind klinische Manifestationen in der Embryogenese, da sich hier die Organogenese vollzieht und so besonders schwerwiegende Entwicklungsschäden auftreten können. Diese sind häufig nicht mit dem Leben vereinbar und führen zum Abort.

In ihrer klinischen Manifestation zeigt sich die Kongenitale Toxoplasmose mit unterschiedlichen Symptomen, die teils einzeln, teils zusammen auftreten (Tab. 1). Hierzu zählen durch die Erkrankungen des Sehorgans vermittelte Sehprobleme (Retinochoroiditis<sup>10</sup>), Minderung der Hörvermögens (Salviz et al. 2013)<sup>11</sup>, Wachstumsverzögerungen und Störungen des ZNS (Kaye 2011; Jones et al. 2003). Die klassisch in der Fachliteratur beschriebene Trias aus Retinochoroiditis, Hydrocephalus und intrakranieller Kalzifikation tritt nur selten auf (Jones et al. 2003; Montoya und Liesenfeld 2004).

**Tab. 1: Mögliche klinische Auswirkungen der Kongenitalen Toxoplasmose für Neugeborene und im späteren Leben**

Intrakranielle Verkalkungen*	Mikrozephalie	Geistige Behinderung
Hydrozephalus*	Organfehlbildungen	Taubheit
Retinochoroiditis*	Sehbehinderungen	Lähmungen

\* Klassische Trias der Symptome der Kongenitalen Toxoplasmose

Quelle: Nach Jones et al. (2003)

Häufig ist die Kongenitale Toxoplasmose bei Geburt jedoch klinisch uncharakteristisch und wird in Routineuntersuchungen nicht diagnostiziert. Bei etwa 80% der infizierten Kinder treten erst nach bis zu 20 Jahren Spätmanifestationen in Form von Strabismus, Retinochoroiditis, Taubheit, psychomotorische Retardierung oder Epilepsie auf (Groß et al. 2001). Bei Schuleintrittsalter wiesen in einer in Europa angelegten Studie 20% der betroffenen Kinder  $\geq 1$  retinochoroidale Läsion auf (Freeman et al. 2008).

### 1.2.2 Die postnatale Infektion

Bei der postnatalen Erstinfektion hängt die nachfolgende Klinik u. a. davon ab, ob die infizierte Person immunkompetent ist, oder ein supprimiertes Immunsystem aufweist. Beim erwachsenen Immunkompetenten verläuft die Infektion i. d. R. asymptomatisch, wobei die anschließend persistierenden Zysten kein Problem darstellen (Groß et al. 2001). Danach besteht durch Antikörperbildung weitestgehend eine lebenslange Immunität gegen Neuinfektionen. Nur selten zeigen Patienten grippeähnliche Symptome wie Fieber, allgemeines Schwächegefühl, Myalgien oder auch Schwellungen der Lymphknoten, wobei bei letzteren

<sup>10</sup> Bei der Retinochoroiditis handelt es sich um eine nekrotisierende Entzündung von Ader- und Netzhaut. Der Ursprung ist i. d. R. die Retina. Die Erkrankung tritt überwiegend unilateral auf.

<sup>11</sup> Die Folgen können eine Hypakusis bis hin zur Taubheit sein.

geschätzt wird, dass 3 – 7% aller klinisch signifikanten Lymphadenopathien auf eine Toxoplasmeninfektion zurückzuführen sind (McCabe et al. 1987). Die aufgezählten Symptome treten i. d. R. nur in der akuten Infektionsphase auf, in der der Parasit im tachyzoiten Stadium die Körperzellen disseminiert (Groß et al. 2001) und legen sich wieder, sobald sich intrazellulär die bradyzoite Form, also die weniger immunogene Gewebezyste, ausgebildet hat.

Patienten mit Defekten in der T-Zell-vermittelten Immunantwort (typisch für eine HIV-Infektion<sup>12</sup>) oder einem chemisch supprimierten Immunsystem, z. B. aufgrund der Behandlung mit Zytostatika oder Glukokortikoiden<sup>13</sup>, werden meist im Rahmen einer Reaktivierung einer bereits vorher erfolgten Toxoplasmeninfektion klinisch auffällig. Hierbei können ungleich schwerwiegendere Folgen für die Gesundheit auftreten (Weiss und Dubey 2009). Man unterscheidet nach der Klinik die intrazerebrale und extrazerebrale Toxoplasmose. Bei Ersterer fallen im Rahmen einer Enzephalitis teils große intrazerebrale, raumfordernde Prozesse an, bei denen, durch Zerstörung von Hirngewebe, verschiedenste Symptome auftreten können. Diese reichen von Kopfschmerzen bis zu Wesensveränderungen und können gekennzeichnet sein durch vielfältige neurologische Störungen und Ausfälle, die den befallenen Arealen zuzuordnen sind. Diagnostisch finden sich in der Computertomografie diffuse Hypodensitäten des Marklagers, wobei die Toxoplasmen sich typischerweise als runde, Kontrastmittel anreichernde Herde mit unregelmäßig dicker Wand darstellen.

Bei der extrazerebralen Toxoplasmose befällt der Erreger Gewebe außerhalb des ZNS. Hier sind in den meisten Fällen die Organe Auge, Herz, Lunge und Leber betroffen.<sup>14</sup> Insgesamt kann die fortgeschrittene Toxoplasmose, bei nicht ausreichender Immunantwort, zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen und ist nur eingeschränkt medikamentös behandelbar (vgl. Kap. 1.4). Aufgrund seiner nach wie vor hohen klinischen Relevanz soll an dieser Stelle genauer auf die Toxoplasmose im Rahmen einer HIV-Infektion (Humanes Immundefizienz-Virus) eingegangen werden.

---

<sup>12</sup> Toxoplasmose zählt nach wie vor zu den bedeutendsten opportunistischen Infektionen bei HIV-Patienten.

<sup>13</sup> Zytostatika kommen in der Humanmedizin i. d. R. zur Therapie von malignen Tumoren zum Einsatz. Glukokortikoide müssen dauerhaft gegeben werden, um eine Supprimierung des Immunsystems zu bewirken. Dies ist v. a. bei chronischen Autoimmunerkrankungen der Fall oder nach Organtransplantationen, um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, welche hauptsächlich T-Zell- und Antikörpervermittelt ablaufen.

<sup>14</sup> Wichtige klinische Komplikationen der extrazerebralen Toxoplasmose sind die Retinochoroiditis, Myokarditis und Pneumonie.

### 1.2.3 Toxoplasmose bei HIV-positiven Patienten

Noch immer gilt die durch Toxoplasmen ausgelöste Encephalitis als die bedeutendste opportunistische Infektion des ZNS bei HIV-infizierten Patienten (Hoffmann et al. 2007). Die Toxoplasmose wird bei betroffenen Patienten erfahrungsgemäß dann symptomatisch, wenn das Immunsystem signifikant geschwächt ist. Als Maßstab hierfür gilt die Bestimmung der Anzahl der T-Zellen, die den CD4-Rezeptor tragen.<sup>15</sup> Je nach Lektüre spricht man bei einer Zellzahl von etwa 500 – 1200 Zellen pro Mikroliter Blut von einem Normalwert. Ab < 500 Zellen/ $\mu$ l wird Patienten empfohlen eine Antiretrovirale Therapie (ART) zu beginnen<sup>16</sup> und bei < 200 Zellen/ $\mu$ l spricht man von einem erhöhten Risiko für opportunistische Infektionen, so auch der Toxoplasmose.

Historisch zeigte eine 1992 veröffentlichte Studie u. a. den klinischen Verlauf von an AIDS erkrankten Patienten in fortgeschrittenem Stadium<sup>17</sup> bei gleichzeitiger Toxoplasmose<sup>18</sup> auf (Porter und Sande 1992). Untersucht wurden 115 überwiegend männliche Patienten im Zeitraum von 1981 bis 1990 im General Hospital in San Francisco. Da es zu dieser Zeit noch nicht die Möglichkeit einer Antiretroviralen Therapie (ART) der Patienten gab, verstarben 90% der Patienten noch während dieser Studie. Bei den Probanden konnten die für eine Toxoplasmeninfektion typischen grippeähnlichen Symptome beobachtet werden. 50% der Patienten klagten über Kopfschmerzen und gaben Verwirrheitszustände an. 69% zeigten in neurologischen Untersuchungen Zeichen von fokalen Ausfällen, wobei hier am häufigsten eine Hemiparese<sup>19</sup> und/oder Ataxie<sup>20</sup> beobachtet wurden. Auch hatten fast 50% eine erhöhte Körpertemperatur (Porter und Sande 1992).

Als Mitte der 90er-Jahre die Antiretrovirale Therapie eingeführt wurde, hatten sich die Fälle von durch Toxoplasmose induzierter Encephalitis auf etwa ein Viertel der vorher verzeichneten Fälle reduziert, was als beachtlicher Erfolg verzeichnet werden konnte (Abgrall et al.

---

<sup>15</sup> Die T-Zellen werden im Thymus geprägt. Man unterscheidet hierbei die Rezeptoren CD4 und CD8, welche sich auf der Oberfläche der Zellen befinden. Zellen mit dem CD4-Rezeptor werden auch T-Helferzellen genannt und dienen im Rahmen einer HIV-Infektion als Indikator für die Funktionalität des Immunsystems.

<sup>16</sup> Auch bei einer höheren CD4-Zellzahl kann eine medikamentöse Therapie indiziert sein, wenn sogenannte Zusatzkriterien erfüllt sind. Hierzu zählen zum Beispiel ein Alter > 50 Jahre oder Koinfektionen mit Hepatitis B oder C.

<sup>17</sup> Fortgeschrittene Symptome sind beispielsweise die orale Haarzelleukoplakie oder Mundsoor. Schwerwiegende Symptome, welche auch als AIDS-definierende Erkrankungen bezeichnet werden, sind u. a. Toxoplasmose, Pneumocystis-Pneumonie, Soor-Ösophagitis und Tuberkulose.

<sup>18</sup> Die Diagnose Toxoplasmose wurde bei den Patienten histologisch gesichert. Gleichwohl wiesen die Patienten typische radiologische Veränderungen des ZNS auf.

<sup>19</sup> Eine Hemiparese ist eine halbseitige Körperlähmung, wie sie klinisch häufig nach Apoplex imponiert.

<sup>20</sup> Die Ataxie ist eine allg. Störung der Bewegungskoordination, häufig bei Störungen im Bereich des Kleinhirns.

2001<sup>21</sup>). Weitere Untersuchungen aus den Vereinigten Staaten von Amerika zeigten einen vergleichbaren Rückgang der mit der Krankheit assoziierten Mortalität unter HIV-positiven-Patienten (Jones et al. 2002<sup>22</sup>). Es zeigte sich hierbei, dass ein früher Therapiebeginn zu einem längeren Überleben beitrug, während die Mortalität im Zuge opportunistischer Infektionen bei Patienten, die sich bei Therapiebeginn schon im WHO-Stadium 3 oder 4 der HIV-Infektion befanden, mehr als doppelt so hoch lag. Dies galt besonders innerhalb der ersten sechs Monate nach Therapiebeginn (Marshall et al. 2013). Insgesamt ist das Auftreten opportunistischer Infektionen im Rahmen einer HIV-Infektion in den Industrieländern aufgrund besserer Therapieoptionen rückläufig. Als in der Behandlung problematisch gelten die Fälle, in denen die Infizierten nichts von ihrer Erkrankung wissen, wodurch sich diese bei Diagnosestellung schon in einem fortgeschrittenen Stadium befinden (Thoden et al. 2013).

### 1.3 Prävention der Toxoplasmose

Präventive Maßnahmen richten sich vor allem an Frauen, die eine Schwangerschaft planen oder schon schwanger sind (um eine Erstinfektion in dieser Zeit zu verhindern) sowie an Personen mit schwachem Immunsystem. Das Robert Koch-Institut (RKI) und die allgemeine Lehrmeinung empfehlen u. a. folgende Präventionsmaßnahmen: Fleisch gut abkochen, Rohverzehr vermeiden, Wasser abkochen, Gemüse und Obst vor Verzehr gründlich reinigen sowie den Umgang mit Katzen meiden. Ist letzteres nicht möglich, sollte darauf geachtet werden, die Katzentoilette täglich mit heißem Wasser zu reinigen, bestenfalls durch Personen die nicht zur Risikogruppe gehören.

Bei Frauen mit Kinderwunsch empfiehlt sich vor der Schwangerschaft ein Antikörpertest auf *T. gondii*. Sollte eine Seronegativität vorliegen, ist ein regelmäßiges Screening während der Schwangerschaft angeraten.

---

<sup>21</sup> In einer Auswertung der Datenbanken französischer Krankenhäuser wurden 19.598 Patienten von 1992 – 1995, vor Einführung der Antiretroviralen Therapie (ART), sowie 17.016 Patienten von 1996 – 1998, nach Einführung der ART, betrachtet. Das Auftreten von Toxoplasma-Encephalitis sank von 3,9% auf 1,0%.

<sup>22</sup> Es wurden Daten der Jahre 1992 – 1998 ausgewertet. Hierbei verzeichnete man im Jahre 1992 noch 1326 Todesfälle von HIV-positiven Patienten (infolge opportunistischer Erkrankungen) die durch Toxoplasmose ausgelöst wurden. Im Jahre 1998 ließen sich nur noch 324 Todesfälle auf den Parasiten zurückführen.

## 1.4 Therapie der Toxoplasmose

Bei Immunkompetenten bedarf die Infektion mit Toxoplasmen i. d. R. keiner chemischen Therapie, da betroffene Patienten in der Mehrzahl der Fälle nicht klinisch auffällig werden.

Therapiebedürftig sind in erster Linie Menschen mit Immunschwäche (vgl. Kap. 1.2.3) im Rahmen einer aktiven Toxoplasmose, die vom Immunsystem nicht eingedämmt werden kann, die okuläre Toxoplasmose sowie die prä- und postnatale Toxoplasmose.

Therapeutisch haben sich u. a. folgende Antibiotika und -parasitika bewährt: Spiramycin, Clindamycin, Pyrimethamin, Sulfadiazin und Atovaquon (vgl. Kap. 1.6). Diese richten sich überwiegend gegen die Stoffwechselwege der Protein- und Folsäuresynthese und dabei vornehmlich gegen Toxoplasmen im tachyzoiten Stadium. Damit wirkt die gegenwärtige Therapie kaum gegen die persistierenden, bradyzoiten Gewebezysten (de Lima et al. 2015). Die Therapie eines Immunkompetenten mit entsprechender klinischen Symptomatik besteht aus einer Kombinationstherapie aus Pyrimethamin, Sulfadiazin und Folsäure<sup>23</sup> (Leukovorin) für vier bis sechs Wochen (Montoya und Liesenfeld 2004). Folsäure wird aufgrund der Myelotoxizität des Pyrimethamin als Kombination gegeben.

Während der Akuttherapie sollten in regelmäßigen Abständen Bilder mittels Magnetresonanztomographen<sup>24</sup> angefertigt werden, um den Übergang von der Akut- zur Erhaltungstherapie zu bestimmen. Hierbei wird das Ausmaß der durch die Toxoplasmen verursachten Läsionen (die beispielsweise bei der zerebralen Toxoplasmose entstehen) bestimmt, wobei eine Reduktion um 50% und eine verbesserte Klinik<sup>25</sup> für die Einleitung der Erhaltungstherapie sprechen (Thoden et al. 2013). Die Erhaltungstherapie, auch Sekundärprophylaxe, erfolgt durch Therapeutika der Akuttherapie aber in reduzierter Dosis, wobei diese meist halbiert wird. Alternativ können in dieser Phase Dapsone<sup>26</sup> gegeben werden. In der folgenden Tabelle (Tab. 2) wird die Therapie der zerebralen Toxoplasmose bei HIV-positiven Patienten nach den Leitlinien der DGN aufgeführt.

---

<sup>23</sup> Pyrimethamin hemmt die Dihydrofolatreduktase (DHFR), ein Enzym, welches das Vitamin Folsäure aktiviert. Durch diesen Mechanismus ergibt sich durch Pyrimethamin eine Myelotoxizität, welcher mit der zusätzlichen Gabe von Folsäure entgegenwirkt werden kann. Folsäure entspricht dem aktiven Derivat der Folsäure.

<sup>24</sup> Die Magnetresonanztomografie (MRT) eignet sich aufgrund ihrer differenzierten Darstellung von Geweben und Organen gut zur Beurteilung des Ausmaßes einer Toxoplasmeninfektion. Kleinste Entzündungsherde können so sichtbar gemacht werden.

<sup>25</sup> Mit einer verbesserten Klinik wird hier eine Abnahme der Krankheitssymptomatik ausgedrückt.

<sup>26</sup> Dapsone sind Antirheumatika aus der Gruppe der Sulfone mit antibiotischer Wirkung.

**Tab. 2: Therapie von HIV-positiven Patienten mit opportunistischer zerebraler Erkrankung durch *Toxoplasma gondii***

<b>Akuttherapie</b>	
Erste Wahl	Pyrimethamin p. o. (1. Tag 200 mg, ab 2. Tag $\geq 60$ kg KG 1x 75 mg; $< 60$ kg KG 1x 50 mg/d) + Sulfadiazin p. o. ( $\geq 60$ kg KG 2x 3000 mg/d; $< 60$ kg KG 2x 2000 mg/d) + Folinsäure p. o. (15 mg/d) für etwa sechs Wochen
Zweite Wahl	Monotherapie mit Trimethoprim (TMP) + Sulfamethoxazol (SMX) p. o. (2x 5 mg TMP/kg KG/d + 2x 25 mg SMX/kg KG/d) für sechs Wochen
<b>Erhaltungstherapie</b>	Sulfadiazin (2x 1 g/d) + Pyrimethamin (25 mg/d) + Folinsäure (7,5 mg/d)

Quelle: DGN (2020)

Im Falle der Kongenitalen Toxoplasmose wird als maternofetale Therapie<sup>27</sup> ebenfalls auf eine Kombination von Pyrimethamin, Sulfadiazin und Folinsäure gesetzt, wobei bis zum Ende der 15. Schwangerschaftswoche (SSW) nur die Gabe von Spiramycin erfolgen sollte (Jones et al. 2003). Die Therapie bedarf fortwährende Kontrollen des Blutbildes, insb. der Organfunktionswerte. Die Behandlungsdauer richtet sich nach dem Nebenwirkungsprofil sowie beobachteter Symptomatik. Bei Allergie gegen Sulfonamide kann alternativ Sulfadiazin durch Spiramycin ersetzt werden (Groß et al. 2001).

In Studien zeigte sich in 223 untersuchten Fällen von werdenden Müttern mit dokumentierter Kongenitaler Toxoplasmose, dass bei nicht oder nur unzureichend behandelten Müttern lediglich in 10% der Fälle keine Toxoplasmen in der Plazenta nachgewiesen werden konnten. Diesen standen 50% gegenüber, wenn mit Spiramycin und der Kombination von Pyrimethamin + Sulfadiazin behandelt wurde (Couvreur et al. 1988). Auch zeigte sich ein geringeres Transmissionsrisiko des Parasiten auf das ungeborene Kind, wenn möglichst früh nach der Serokonversion der Mutter mit der Therapie begonnen wurde (Thiébaud et al. 2007).

Bei Neugeborenen wird auch auf die Kombinationstherapie von Pyrimethamin, Sulfadiazin und eines Folinsäurepräparats gesetzt (Jones et al. 2003). Die Behandlungsdauer hängt hierbei u. a. von der Schwere des Krankheitsbildes und dem Nebenwirkungsprofil ab. Obwohl die meisten *in utero* infizierten Neugeborenen bei Geburt keine klassischen Zeichen einer

<sup>27</sup> Maternofetale Therapie beschreibt eine Behandlung der werdenden Mutter, welche auch Effekt auf das ungeborene Kind hat.

Toxoplasmose in Routineuntersuchungen zeigen, fallen später etwa 80% durch Lern- und Sehschwächen auf (Jones et al. 2003). Eine fundierte ophthalmologische Untersuchung kann hier zielführend bei der Diagnose der Toxoplasmose sein.

## 1.5 Die Atmungskette

Die mitochondriale Atmungskette ist als Zielstruktur der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Substanzen von zentraler Bedeutung und wird dementsprechend in ihren Grundzügen erläutert. Sie gliedert sich im Wesentlichen in vier Enzymkomplexe sowie die ATP-Synthase, die am Ende einer Reaktionskette Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP phosphoryliert (Alberts et al. 2017).

Die Atmungskette befindet sich an der inneren Mitochondrienmembran (MM) und ist ein komplexes System aneinander geketteter, biochemischer Redoxreaktionen<sup>28</sup>. Als eines der Hauptziele der eingelagerten Enzymkomplexe gilt die Generierung der energiereichen Verbindung ATP. Dieses energiespeichernde Molekül wird von Körperzellen für Prozesse benötigt, bei denen chemische, mechanische oder osmotische Arbeit<sup>29</sup> anfällt. Die Zelle kann ATP durch die Phosphorylierung von ADP synthetisieren, was u. a. über die Substratkettenphosphorylierung<sup>30</sup> und die Elektronentransportkettenphosphorylierung (Atmungskette) geschieht. Bei letzterem Prozess kann die Zelle wesentlich mehr Energie in Form von ATP erzeugen. Die Atmungskette wird in verschiedene Komplexe unterteilt, welche hintereinandergeschaltete Redox-Moleküle bilden und an deren Ende die ATP-Synthase einen elektrochemischen Gradienten nutzt, um ATP zu synthetisieren.

Komplex I<sup>31</sup> oxidiert im ersten Schritt NADH (Nicotinamidadenindinukleotid) zu NAD<sup>+</sup>. Hierbei gibt NADH zwei Elektronen und ein Proton (Hydridion) an das Molekül ab, wo sie auf das gebundene Coenzym Flavinmononukleotid (FNM) übertragen werden, welches so zu FMNH<sub>2</sub> reduziert wird. Über Eisen-/Schwefel-Cluster (Fe-/S-Cluster/Rieske Protein)

---

<sup>28</sup> Redoxreaktionen sind durch die Übertragung von Elektronen von verschiedenen Reaktionspartnern gekennzeichnet. Eine Oxidation beschreibt dabei eine Elektronenabgabe, eine Reduktion deren Aufnahme.

<sup>29</sup> Ein Beispiel für chemische Arbeit ist die Proteinbiosynthese, wohingegen die Muskelkontraktion mechanische Arbeit darstellt. Als osmotische Arbeit gelten Ausgleichsbestrebungen von Verbindungen durch die Zellmembranen. Hierzu zählt aber auch die aktive Durchschleusung von Atomen durch die MM, um so einen elektrochemischen Gradienten aufzubauen.

<sup>30</sup> Bei der Substratkettenphosphorylierung wird ein Phosphatrest direkt von einer Substratgruppe auf Adenosindiphosphat übertragen, um so ATP zu bilden. Sie wird vor allem genutzt, wenn die Zelle keinen (oder nur wenig) Sauerstoff zur Verfügung hat

<sup>31</sup> Andere Bezeichnungen sind: NADH-Ubichinon-Reduktase, NADH-Dehydrogenase oder NADH-Oxidase.



werden die Elektronen dann weiter auf das Transportmolekül Ubichinon<sup>32</sup> übertragen, welches dann schließlich zu Ubihydrochinon (Ubichinol)<sup>33</sup> reduziert wird. Ein Molekül Ubichinon kann dabei immer zwei Elektronen aufnehmen. Da Komplex I gleichzeitig als Protonenpumpe fungiert, nutzt es die bei der enzymatischen Reaktion freiwerdende Energie, um vier Protonen vom Matrixraum in den intermembranösen Raum des Mitochondriums zu pumpen. Der durch die Verteilung der positiv geladenen Teilchen aufgebaute Gradient zwischen den Membranen dient dem Aufbau eines Membranpotentials, welches im letzten Abschnitt der Atmungskette zum Tragen kommt.

Komplex II (auch Succinat-Ubichinon-Reduktase) der Atmungskette wird durch das Enzym Succinat-Dehydrogenase gebildet und ist gleichzeitiger Bestandteil des Citratzyklus. Es findet eine Redoxreaktion statt, bei der Succinat zu Fumarat oxidiert wird, wobei hier freiwerdende Elektronen FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) zu FADH<sub>2</sub> reduzieren. FADH<sub>2</sub> wird im nächsten Schritt wieder oxidiert, wobei zwei freiwerdende Elektronen zunächst auf Fe-/S-Cluster übertragen und dann ebenfalls wie bei Komplex I an Ubichinon gebunden werden.

Im Komplex III (auch Cytochrom-c-Oxidoreduktase) der Atmungskette wird das in Komplex I und II reduzierte Transportmolekül Ubihydrochinon oxidiert. Über mehrere Zwischenschritte (Q-Zyklus) wird schließlich je ein Elektron an das Transportmolekül Cytochrom c gebunden. Wie bei Komplex I handelt es sich bei Komplex III um eine Protonenpumpe, die H<sup>+</sup>-Ionen aus der mitochondrialen Matrix in den intermembranösen Raum pumpt, um so einen H<sup>+</sup>-Gradienten aufzubauen.

Der Komplex IV (auch Cytochrom-c-Oxidase) katalysiert den letzten Schritt der Elektronentransportkette, indem das in Komplex III reduzierte Cytochrom c wieder oxidiert wird und somit je ein Elektron wieder abgibt. Nachdem dann zwei Elektronen an ein halbes Sauerstoffmolekül ( $\frac{1}{2}$  O<sub>2</sub>) gebunden werden, und H<sup>+</sup>-Ionen aus dem Matrixraum hinzugezogen werden, entsteht ein Molekül H<sub>2</sub>O. Auch der Komplex IV dient als Protonenpumpe und nutzt die bei der Reaktion frei gewordene Energie, um H<sup>+</sup>-Ionen in den intermembranösen Raum zu pumpen.

Die ATP-Synthase nutzt den elektrochemischen Gradienten, der in der Atmungskette aufgebaut wurde, indem sie die translozierten Protonen, die in den intermembranösen Raum

---

<sup>32</sup> Ubichinon bewegt sich innerhalb der inneren MM, was ihm als Chinon-Derivat u. a. mittels seiner lipophilen Seitenkette gelingt.

<sup>33</sup> Ubichinol ist die reduzierte Form von Coenzym Q und fungiert als Elektronendonator. Ubichinon ist die oxidierte Form von Coenzym Q und fungiert als Elektronenakzeptor.

gepumpt wurden, in den Matrixraum des Mitochondriums zurückströmen lässt. Die hierbei freiwerdende Energie wird verwendet, um aus einem anorganischen Phosphatteilchen und ADP die energiereiche Verbindung ATP zu synthetisieren.

## 1.6 Die alternative NADH-Dehydrogenase als Zielstruktur für 1-Hydroxychinolone

Die NADH-Dehydrogenase ist eine Hauptzielstruktur der Verbindungen dieser Arbeit. Apicomplexa, zu denen neben *T. gondii* auch *Plasmodium* (der Erreger der Malaria) zählt, besitzen eine von Säugetierzellen abweichende Struktur der Atmungskette (Ellis 1994), was diese als interessanten Interventionspunkt für Chemotherapeutika klassifiziert. Eine Hemmung der Atmungskette hat eine Störung der Nukleinsäure- und ATP-Synthese zur Folge. Dies kann z. B. durch eine Intervention an dem zur Energiegewinnung nötigen Elektronentransport entlang der MM geschehen.

Als medikamentöses Beispiel, welches in die Reaktionsschritte der Atmungskette eingreift, sei hier das Medikament Atovaquon angeführt, welches sowohl als Chemotherapeutikum gegen die Toxoplasmose (vgl. Kap. 1.4), als auch gegen Malaria eingesetzt wird und erstmals im Jahr 2000 klinisch angewendet wurde (Fiorillo et al. 2016). Atovaquon ( $C_{22}H_{19}ClO_3$ ,  $M_r = 366.8$  g/mol) ist ein Hydroxy-1,4-Naphthoquinon-Derivat und besitzt strukturelle Ähnlichkeiten mit Ubichinon, welches als Elektronentransportmolekül in der Atmungskette der Mitochondrien dient (Fiorillo et al. 2016; vgl. Kap 1.5).

Atovaquon ist ein antiparasitäres Medikament, das selektiv den Elektronentransport in der mitochondrialen Atmungskette am Komplex III (Cytochrom-c-Oxidoreduktase) hemmt und zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials führt (Mather et al. 2005; Fry und Pudney 1992). Während das Medikament in Versuchen mit Apicomplexa (*Plasmodium*) einen zellulären Schaden, bis hin zum Zelltod bewirkte, zeigte sich hingegen kein Effekt auf das Membranpotential von Säugetierzellen (Srivastava et al. 1997). Das war entscheidend für die Verträglichkeit des Medikamentes beim Menschen.

Bei den Apicomplexa ist die erste Komponente der Atmungskette grundlegend anders aufgebaut als beim Menschen und qualifiziert diese somit als vielversprechendes Ziel für Wirkstoffe. Anstelle der sog. konventionellen NADH-Dehydrogenase (NDH-1), dem ersten und längsten Komplex der Atmungskette (Melo et al. 2004), welcher aus mindestens 43 Unterein-

heiten besteht (Uyemura et al. 2004), konnte bei *Plasmodium* eine nur aus einem Protein bestehende NADH-Dehydrogenase (Eschemann et al. 2005) identifiziert werden. Dieses Enzym katalysiert die Ubichinon-Reduzierung ohne dabei Protonen vom Matrixraum in den intermembranösen Raum des Mitochondriums zu pumpen (Biagini et al. 2006; Gardner et al. 2002). Diese sog. alternativen NADH-Dehydrogenasen (NDH-2) sind für gewöhnlich einzelne Polypeptide mit einer molekularen Masse von etwa 50 kDa, die den Transfer von Elektronen von NADH zu Ubichinon katalysieren (Melo et al. 2004). Sie kommen in verschiedenen Bakterien-, Pilz- und Pflanzenzellen vor und dienen im Gegensatz zur NDH-1 nicht als Protonenpumpe (Rasmusson et al. 2004; Melo et al. 2004; Saleh et al. 2007). Die NDH-2 wird dabei bei *T. gondii* von zwei Genen (Tgndh2-I [accession no. DQ211932] und Tgndh2-II [accession no. DQ228957]), bei *Plasmodium* von einem einzigen Gen (Pfnhd2 [accession no. PFI0735c]) kodiert (Saleh et al. 2007).

Ein weiterer Unterschied der NDH-2 im Vergleich zur NDH-1 sind die verschiedenen Resistenzen gegenüber Antibiotika und Pflanzenstoffen. So ist die NDH-2 resistent gegenüber bekannten Komplex-I-Hemmstoffen wie Piericidin A<sup>34</sup>, Capsaicin<sup>35</sup> und Rotenon<sup>36</sup> (Pramanik et al. 2011; Melo et al. 2004), unterliegt dafür aber einer Inhibierung durch Flavone<sup>37</sup> (Eschemann et al. 2005).

Als hoch affiner NDH-2-Inhibitor konnte die Substanz 1-Hydroxy-2-Dodecyl-4(1)Quinolon (HDQ; s. Abb. 2) in Enzymtests an *Yarrowia lipolytica*, einer Hefepilzart, die ebenfalls über eine alternative NADH-Dehydrogenase verfügt, identifiziert werden (Eschemann et al. 2005). Die Kinetik der NDH-2 unterliegt hierbei einem Pingpong-Mechanismus, was annehmen lässt, dass HDQ mit dem Chinon-Derivat Ubichinon (Coenzym Q) aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit an derselben Bindungsstelle des Enzymkomplexes interagiert (Eschemann et al. 2005).

---

<sup>34</sup> Piericidin A ist ein Antibiotikum und Hemmstoff des ersten Komplexes der Atmungskette. Aufgrund seiner Strukturverwandtheit zu Ubichinon kompetiert es mit diesem und stört so den Elektronentransport der Atmungskette.

<sup>35</sup> Capsaicin ist ein Alkaloid der Nachtschattengewächse (z. B. Paprika) und findet in der Medizin verschiedene Anwendungsgebiete. Meist wird es aufgrund seiner vasodilatatorischen Wirkung als wärmende Salbe bei Verspannungen und Muskelschmerzen eingesetzt. Es kann an Rezeptoren aber auch einen Schärferreiz bewirken, weshalb es auch für pikante (scharfe) Soßen Verwendung findet.

<sup>36</sup> Rotenon hemmt den ersten Komplex der Atmungskette und kommt natürlich in Pflanzen vor (v. a. im Samen und Stiel). Es wird häufig als Insektizid eingesetzt (Milben und Zecken), wurde aber auch von Fischern beim Fischfang genutzt.

<sup>37</sup> Flavone gehören zu der Gruppe der Flavonoide und damit zu den sekundären Pflanzenstoffen. Ein Großteil wird den Blütenfarbstoffen zugeordnet.

## 1.7 Die Pyrimidinbiosynthese in *Toxoplasma gondii*: *De-novo*-Synthese und *salvage pathway*

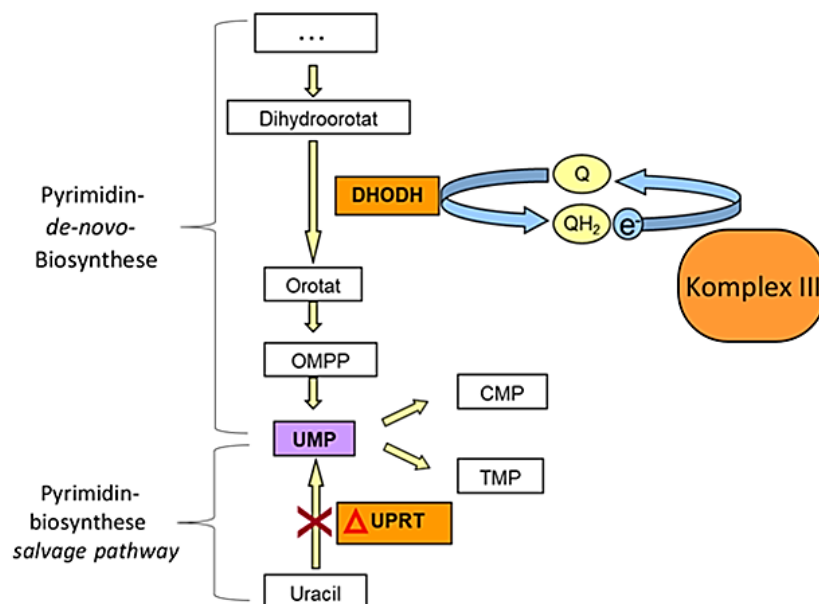
Die Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit getestet wurden, beeinflussen ebenfalls die Pyrimidinbiosynthese, weshalb diese an dieser Stelle erläutert wird. Weiterhin ist diese für das Verständnis einer verwendeten Deletionsmutante (RH/ $\Delta$ *uprt*, s. Kap. 2.1.5) von Bedeutung.

Pyrimidin ist eine heterozyklische, aromatische Verbindung mit der Summenformel  $C_4H_4N_2$ . Seine Ringstruktur dient als Grundgerüst für die organischen Basen Cytosin, Thymin und Uracil und ist somit ein Grundbaustein der DNA und RNA. Um den Organismus mit den essentiellen Pyrimidinen zu versorgen, verfügen menschliche Zellen über zwei Synthesewege dieses Moleküls. Zum einen wird es im *salvage pathway* aus intrazellulären Abbauprodukten hergestellt, was mit energiesparendem Recycling versinnbildlicht werden kann. Dieser Weg wird von der Zelle wegen der deutlich günstigeren Energiebilanz bevorzugt. Zum anderen können Pyrimidine über die Pyrimidin-*de-novo*-Synthese von Grund auf neu aufgebaut werden, was deutlich größere Mengen an Energie benötigt.

Als wichtiges Zwischenprodukt und Vorläufermolekül der Pyrimidine entsteht über beide Synthesewege Uridin-5'-Monophosphat (UMP). Im Falle des Apicomplexa *T. gondii* konnten sowohl der *salvage pathway* (Iltzsch 1993), als auch die *De-novo*-Synthese (Schwartzmann und Pfefferkorn 1981) als funktional identifiziert werden. Zur Pyrimidin-*de-novo*-Synthese gehören sechs Reaktionsschritte, die für *T. gondii* nachgewiesen wurden (Asai et al. 1983) und im nachfolgenden erklärt werden.

Im ersten Reaktionsschritt wird, von der Carbamoylphosphat-Synthetase II (CPSII) katalysiert, Carbamoylphosphat aus Glutamin,  $H_2O$  und Bicarbonat gebildet. Diese unter der CPSII ablaufende enzymatische Reaktion verbraucht zwei ATP. Frei werden Glutamat, zwei ADP und ein Phosphation. Danach wird im zweiten Schritt, katalysiert durch die Aspartat-Carbamoyltransferase (auch bekannt als ATCase), Carbamoylphosphat zu N-Carbamoylaspartat, wobei ein Phosphation frei wird. Im dritten Schritt erfolgt der Ringschluss, wenn N-Carbamoylaspartat durch die Dihydroorotase zu Dihydroorotat (DHO) umgewandelt und  $H_2O$  abgespalten wird. Im vierten Schritt wird DHO irreversibel zu Orotat oxidiert, beteiligtes Enzym ist das mitochondrienständige Flavoenzym Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH). Die durch die Oxidation von DHO zu Orotat freiwerdenden Elektronen

werden über Ubichinon (Coenzym Q), welches zu Ubichinol reduziert wird, in die Atmungskette geschleust. Dies ist der einzige Reaktionsschritt, der durch die mitochondriale Lokalisation der DHODH an der inneren MM stattfindet. Im fünften Schritt wird der Pyrimidinring des Orotat durch das Enzym Orotat-Phosphoribosyltransferase über eine N-glykosidische Bindung an Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) gekoppelt. Durch die Abspaltung von Pyrophosphat entsteht Orotidin-5'-Monophosphat (OMP). Im sechsten und letzten Schritt entsteht, durch die OMP-Decarboxylase katalysiert und unter Abspaltung von  $\text{CO}_2$  irreversibel das wichtige Stoffwechselzwischenprodukt UMP (s. Abb. 1). Aus diesem werden alle anderen Pyrimidinnukleotide gebildet.



**Abb. 1: Die Pyrimidin-*de-novo*-Synthese und der *salvage pathway*.** Über beide Wege kann im Mitochondrium UMP (Uridin-5'-Monophosphat) synthetisiert werden. Die durch die Oxidation von Dihydroorotat zu Orotat freiwerdenden Elektronen werden über Ubichinon in den Komplex III der Atmungskette geschleust. Der *salvage pathway* ist abhängig von der Uracil-Phosphoribosyltransferase (UPRT). Dieses Enzym ist in obiger Abbildung markiert, da es gezielt in einer Deletionsmutante dieser Arbeit deaktiviert wurde.

Die DHOHD konnte von Hegewald et al. (2013) als weiterer Angriffspunkt für HDQ (und *Compound B*, s. Kap. 1.8) bestätigt werden. Hierdurch wurde ein zusätzlicher, wachstumsinhibitorischer Effekt auf *T. gondii* offenbar. Wie schon bei der Interaktion mit Ubichinon an der NDH-2 wird als Wirkungsmechanismus eine kompetitive Hemmung von Ubichinon an der Bindungsstelle der DHODH vermutet. Hierdurch können sowohl eine Behinderung der Pyrimidin-*de-novo*-Synthese als auch eine störende Auswirkung auf den Elektronenfluss der

Atmungskette angenommen werden, da die durch Oxidation von DHO zu Orotat freierwerden Elektronen nicht nahtlos auf Ubichinon übertragen werden können, um dann in den dritten Komplex der Atmungskette eingeschleust zu werden.

## 1.8 Ziele dieser Doktorarbeit

Es war Ziel dieser Arbeit neue 1-Hydroxychinolonstrukturen auf ihr inhibitorisches Potential gegenüber *T. gondii* zu untersuchen. Hierbei spielte zum einen eine Rolle, dass ein größerer Pool an Behandlungsoptionen aufgrund von Resistenzbildungen stets erstrebenswert ist; zum anderen sind derzeitige Therapieoptionen in ihrer Wirkung nicht immer effektiv genug und verfügen zudem über ein breites, teils gravierendes Nebenwirkungsprofil, welches den Einsatz insbesondere bei Schwangeren und Immunsupprimierten erschwert (McFarland et al. 2016). Bei der Herstellung neuer Chemotherapeutika<sup>38</sup> war deshalb von Bedeutung, Angriffspunkte (*targets*) auszumachen, die spezifisch für die Ultrastruktur des Parasiten sind, bei somit anzunehmendem geringen Nebenwirkungsprofil für den Menschen.

Mit dem 1-Hydroxychinolon HDQ konnte ein affiner Wachstumsinhibitor gefunden werden, der sich in erster Linie gegen die NDH-2 von *T. gondii* richtet. Dies konnte in der Zellkultur sowohl für *T. gondii* als auch *Plasmodium falciparum* nachgewiesen werden (Saleh et al. 2007). Die NDH-2 bietet dabei einen vielversprechenden Angriffspunkt für Wirkstoffe, da sie sich in ihrer Molekularstruktur grundlegend vom ersten Komplex der Atmungskette des Menschen unterscheidet. Weiterhin zeigte sich bei den Parasiten unter Einwirkung von HDQ ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotenzials sowie eine Reduktion der zellulären ATP-Konzentration (Lin et al. 2009). Unter gleichzeitiger Behandlung mit Atovaquon, welches am dritten Komplex der Atmungskette (Cytochrom-c-Oxidoreduktase) inhibitorisch wirkt, konnte ein synergetischer Effekt im Versuch bestätigt werden (Saleh et al. 2007).<sup>39</sup>

Auf Basis der Molekularstruktur von HDQ wurden vier neue 1-Hydroxychinolonverbindungen synthetisiert, die im Rahmen dieser Arbeit auf ihr inhibitorisches Potential gegenüber *T. gondii* getestet wurden. Die Membrangängigkeit war bei der Synthese der Verbindungen ein wichtiger Faktor, da deren Hauptwirkungsort innerhalb der Mitochondrien

---

<sup>38</sup> Chemotherapeutikum ist ein Oberbegriff für z. T. künstlich synthetisierte Verbindungen, die gezielt Körperzellen oder Krankheitserreger wie Bakterien oder Parasiten angreifen.

<sup>39</sup> Die IC<sub>50</sub>-Werte (entspricht der halb-maximalen inhibitorischen Konzentration, vgl. Kap. 2.2.2.2) wurden bestimmt mit 9 nM für Atovaquone, 4 nM für HDQ und 0,45 nM für die Kombination beider Chemotherapeutika.

liegt, was eine Diffusion durch die Doppellipidschicht der MM erforderlich machte. Bezüglich dem 1-Hydroxychinolon HDQ erwies sich dabei die Länge der hydrophoben Alkyl-Seitenkette als maßgeblich, da diese mindestens über eine Länge von sechs Kohlenstoffatomen verfügen musste, um eine inhibitorische Wirkung gegen *T. gondii* zu erzielen (Saleh et al. 2007).

Die vier untersuchten Verbindungen *Compound* [C.] A, B, C und D (s. Abb. 2, 3 und 4) wurden im Rahmen dieser Arbeit in erster Linie auf ihr wachstumsinhibitorisches Potential gegen *T. gondii* getestet. Ergänzend erfolgte die Bestimmung des ATP-Gehaltes der Parasiten, da auch für *T. gondii* die Atmungskette als der Hauptsyntheseort von ATP gilt. Es wurde deshalb unter dem Einfluss der Verbindungen eine Abweichung vom natürlichen Gehalt erwartet. Zuletzt wurde das Membranpotential der inneren MM auf Veränderungen der Ladung hin untersucht. Das Membranpotential sollte bei funktionaler Atmungskette negativ geladen sein. Ein Abweichen von diesem Potential kann somit als Indikator für die Interaktion der Substanzen mit der Atmungskette betrachtet werden.

Um die Wirkungsweise der Verbindungen besser nachvollziehen zu können, wurden neben dem Wildtyp RH die zwei Deletionsmutanten RH/ $\Delta uprt$  und RH/ $\Delta scs$  untersucht. Bei diesen handelt es sich ebenfalls um Genotyp-I-Parasiten, wobei bei ersterer Mutante der Pyrimidinsalvage-Stoffwechselweg ausfällt und bei letzterer ein Enzym im Citratzyklus ausgeschaltet wurde (vgl. Kap. 2.1.5).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tab. 3: Verwendete Geräte mit Angabe von Modell und Hersteller

Gerät	Modell und Hersteller
Brutschrank	Heracell 240 und B 6200, Heraeus, Hanau
Fluoreszenzmikroskop	AxioVert 200M, Zeiss, Jena Modell DM R, Leica, Heidelberg
Magnetrührer	RCT basic, IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskop-Kamera	AxioCam MRm, Zeiss, Göttingen
pH-Meter	Modell 766 Calimatic, Knick, Berlin
Photometer	Nanodrop ND-1000, Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Pipetten	Modell Research, Eppendorf, Hamburg
Sterilbank	BDK-S 1800, BDK Luft- und Reinraum-Technik, Sonnenbrühl
Thermomixer	Modell Compact, Eppendorf, Hamburg
Videomikroskop	AxioVert 200M, Zeiss, Jena
Vortexer	Reax Top, Heidolph, Kelheim
Waagen	CP 224S, Sartorius, Göttingen LP 6200S, Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zählkammer	Neubauer Superior, Marienfeld, Lauda-Königshofen
Zellkulturmikroskop	Modell DM IL, Leica, Heidelberg
Zentrifugen	Mini-Centrifuge (1201), Labnet International, Woodbridge 5417 R, Eppendorf, Hamburg Megafuge 2.0 RS u. Multifuge 3 S-R, Heraeus, Hanau



### 2.1.2 Medien und Zusätze

Tab. 4: Verwendete Medien und Zusätze

Medien	Zusätze
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	580 mg/l L-Glutamin; 4,5 g/l, D-Glukose; 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> ; 8 mg/l Phenolrot
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	L-Glutamin; 4,5 g/l D-Glukose; 25 mM HEPES; ohne Natrium-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
Freeze Mix	60% DMEM, 20% DMSO, 20% FCS
Penicillin/Streptomycin (P/S)	10.000 U/10.000 µg/ml, steril filtriert
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	bidestilliert in H <sub>2</sub> O
Trypsin-EDTA 0,05%	in HBSS ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>

Die Medien und Zusätze wurden von Biochrom, Berlin bezogen; DMEM ohne Phenolrot von Gibco Invitrogen, Karlsruhe.

### 2.1.3 Reagenzien

BacTiter-Glo™

Microbial Cell Viability Assay, Promega, Mannheim

### 2.1.4 Verbrauchsmaterial Zellkultur

Tab. 5: Auflistung der Unternehmen von denen die Verbrauchsmaterialien bezogen wurden

Unternehmen	Standort
B. Braun Melsungen	Melsungen
Becton Dickinson	Heidelberg
Corning	Bodenheim
Greiner Bio-One	Frickenhausen
Nunc A/S	Roskilde*

\*Dänemark

### 2.1.5 Parasitenstämme und Wirtszellen

Tab. 6: Verwendete Parasitenstämme und Unterscheidung in Spezifität

Zelllinie	Spezifität
<i>Toxoplasma gondii</i>	RH (Wildtyp)
Stamm Genotyp-I	RH/ $\Delta$ <i>uprt</i>
	RH/ $\Delta$ <i>scs</i>
Wirtszellen	Humane Vorhautfibroblasten <i>human foreskin fibroblasts</i> , HFF

In den Versuchen wurden *T. gondii*-Genotyp-I-Parasiten verwendet (vgl. Kap. 1.1.1). Die Parasiten befanden sich im tachyzoiten Stadium. Als Wildtyp diente der RH-Stamm (Meissner et al. 2002). Als Wirtszellen dienten Humane Vorhautfibroblasten (*human foreskin fibroblasts*; HFF).

In RH/ $\Delta$ *uprt*-Parasiten liegt eine Deletion der Uracil-Phosphoribosyltransferase (UPRT) vor (Iltzsch 1993). Dieses Enzym ist ein zentrales Element der Pyrimidinbiosynthese und wird zur Synthese von UMP aus Uracil benötigt (s. Abb. 1). Es katalysiert die Synthese über einen *salvage pathway*, d. h., über einen Stoffwechselweg, der durch die Nutzung von angefallenen

Abbauprodukten (Recycling) zur Synthese eines Produktes unter niedrigem Energielevel gekennzeichnet ist. Als wichtigste Derivate des Pyrimidins zählen die Bausteine der Nucleinsäuren. Bei deletierter UPRT erfolgt die Synthese von UMP über die Pyrimidin-*de-novo*-Biosynthese, dem zweiten Syntheseweg des Moleküls, über den *T. gondii* verfügt. Dieser ist für den Organismus mit einem deutlich höheren Energieaufwand verbunden.

Bei RH/ $\Delta_{scs}$ -Parasiten liegt eine Deletion der Succinyl-CoA-Synthetase (SCS) vor (Fleige et al. 2008). Dieser Enzymkomplex findet sich an sechster Stelle des Citratzyklus und katalysiert die Reaktion von Succinyl-CoA zu Succinat. Die Energie der Spaltung des Substrates Succinyl-CoA in das Produkt Succinat wird dabei zur Bildung von energiereichen Verbindungen wie Guanosin triphosphat (GTP) und ATP genutzt, welche wiederum für andere Stoffwechselfvorgänge Verwendung finden.

### 2.1.6 Chemikalien und Reagenzien

Die Chemikalien und Reagenzien dieser Arbeit wurden, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Unternehmen bezogen:

**Tab. 7: Unternehmensbezogene Herkunft der Chemikalien und Reagenzien**

Unternehmen	Standort
Boehringer	Mannheim
Calbiochem-Novabiochem	Bad Soden
Merck	Darmstadt
Carl Roth	Karlsruhe
Sigma-Aldrich	Steinheim

### 2.1.7 1-Hydroxychinolonverbindungen

Im Rahmen dieser Arbeit kamen vier neu synthetisierten Verbindungen, *Compound A*, B, C und D, zum Einsatz. Diese basierten in ihrer Molekularstruktur auf dem 1-Hydroxy-2-Alkyl-4(1)Quinolon-Derivat HDQ (Abb. 2) und werden nachfolgend vorgestellt.

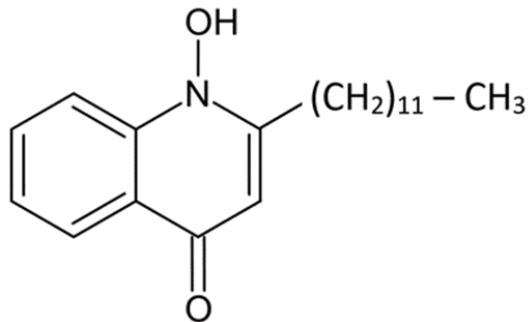


Abb. 2: 1-Hydroxy-2-Dodecyl-4(1)Quinolon, HDQ. Das Molekulargewicht beträgt 419 g/mol.

HDQ ist ein Chinolonanalogon, welches strukturelle Ähnlichkeit mit Ubichinon aufweist und ein hohes wachstumsinhibitorisches Potential gegenüber *T. gondii* zeigte (Saleh et al. 2007). Die Unterschiede zwischen HDQ und CA & CB (Abb. 3) ergeben sich dabei durch eine angefügte Methyl-Gruppe (-CH<sub>3</sub>) an C-3 (am dritten Kohlenstoffatom) resp. C-2. Außerdem wechselt die Alkyl-Seitenkette bei CB an C-3. In nachfolgender Abbildung werden CA und CB in ihrer Molekularstruktur dargestellt:

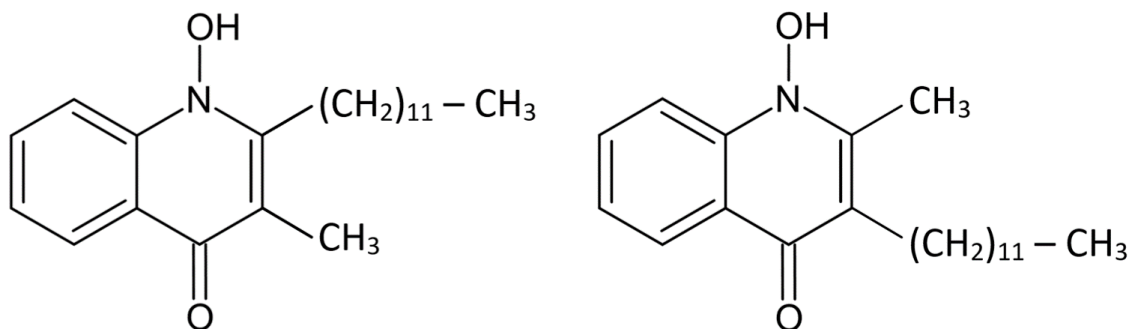
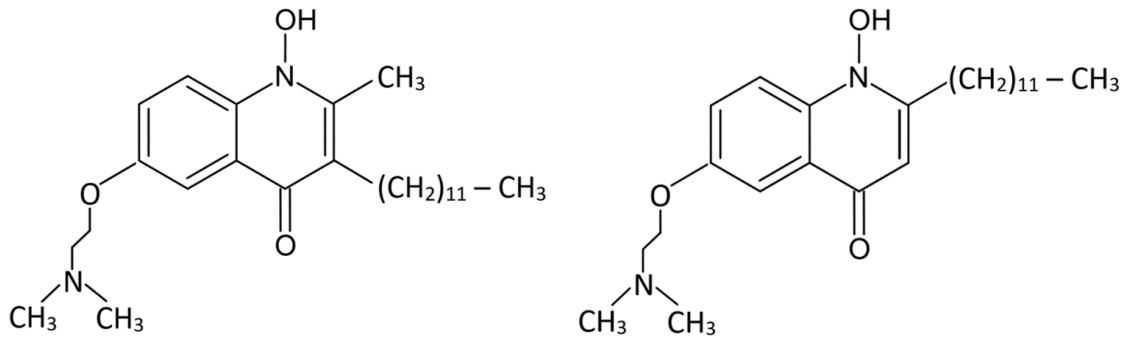


Abb. 3: Molekularstruktur von *Compound A* (links) und *Compound B* (rechts). Im Vergleich zu HDQ (s. Abb. 2) fällt die angefügte Methyl-Gruppe (-CH<sub>3</sub>) auf. Diese und die Alkyl-Seitenkette ((CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-CH<sub>3</sub>) wurden zwischen *Compound A* & B an den Kohlenstoffatomen C-2 und C-3 gespiegelt.

An CC & CD wurde an C-6 eine N,N-Dimethylaminoethoxy-Gruppe angefügt (Abb. 4). Ziel ist es, diese beiden Substanzen wasserlöslicher zu machen, nachdem es sich bei den vorhergenannten Molekülen um stark hydrophobe Verbindungen handelt.



**Abb. 4: Molekularstruktur von *Compound C* (links) und *Compound D* (rechts).** Bei CC & CD wurde u. a. eine N,N-Dimethylaminoethoxy-Gruppe an C-6 gebunden. Wie bei CA & CB wurde die Alkyl-Seitenkette an C-2 und C-3 gespiegelt. Zudem wurde die Methyl-Gruppe (-CH<sub>3</sub>) bei *Compound D* an C-3 entfernt.

Die chemische Verbindung HDQ wurde von Walter Oettmeier von der Ruhr-Universität Bochum zur Verfügung gestellt. CA, CB, CC & CD wurden von Lutz F. Tietze und Ling Ma vom Institute of Organic and Biomolecular Chemistry der Georg-August-Universität Göttingen synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Kultivierung von Humanen Vorhautfibroblasten

Für die Zellkultur wurden HFF als Wirtszellen für *T. gondii* verwendet. Diese Zellen wurden mit einer DMEM-Nährlösung versetzt (Tab. 8), mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) sowie 1% Penicillin/Streptomycin<sup>40</sup> (P/S) steril in Flaschen verschiedener Größe (25 – 100 cm<sup>2</sup>) filtriert oder wahlweise in 24-Well-Platten ausgesät. Anschließend erfolgte die Aufbewahrung im Brutschrank unter 5% CO<sub>2</sub> sowie einer Temperatur von 37°C. Nach sieben bis zehn Tagen zeigte sich am Boden der Flasche ein konfluenter Zellrasen. Anschließend wurden die Zellen für maximal 14 Tage für Versuche verwendet, indem sie mit *T. gondii* infiziert oder für eine weitere Passage genutzt wurden.

Um die HFF für erneute Passagen vom Flaschenboden zu lösen, wurde die Nährlösung abgesaugt und die Zellen 1x mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) gewaschen, um in wiederholtem Absaugvorgang Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend wurde Trypsin-EDTA

<sup>40</sup> Die Zugabe der Antibiotika diente dem Ziel, die Kulturen vor unerwünschten Keimbelastungen zu schützen.

0,05% hinzugegeben, um die adhärenen Zellverbindungen am Boden der Flasche zu lösen. Dieser Vorgang wurde unter dem Zellkulturmikroskop verfolgt, wobei das Trypsin-EDTA 0,05% abgesaugt wurde, bevor die Zellen sich vollständig vom Flaschenboden gelöst hatten. Danach wurde die Flasche wieder mit DMEM (versetzt mit 10% FCS und 1% P/S) befüllt und die Zellverbindungen durch leichtes Klopfen auf die Flasche gelöst. Dann konnten die HFF auf neue Flaschen/Lochplatten für die nächste Passage verteilt werden.

**Tab. 8: Nährmedium zur Kultivierung von Humanen Vorhautfibroblasten**

Inhaltsstoffe	Konzentration, Menge
DMEM	500 ml
FCS	50 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml 10000 U/10000 µg/ml

### 2.2.1.2 Kultivierung von *Toxoplasma gondii*

Für die Kultivierung von *T. gondii* wurden HFF verwendet, die in Zellkulturflaschen konfluent den Boden bedeckten. Das Nährmedium (Tab. 9) wurde durch DMEM mit 1% FCS und 1% P/S ersetzt, dann der Parasit hinzugefügt, welcher die Wirtszellen infiltrierte. Nach zwei bis drei Tagen zeigte sich eine Lyse der Wirtszellen, woraufhin eine Passagierung des Parasiten auf neue HFF vorgenommen wurde.

**Tab. 9: Nährmedium zur Kultivierung von *T. gondii***

Inhaltsstoffe	Konzentration, Menge
DMEM	500 ml
FCS	5 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml 10000 U/10000 µg/ml

### 2.2.1.3 Kryokonservierung von *Toxoplasma gondii*

*T. gondii* kann in flüssigem Stickstoff über mehrere Jahre konserviert werden. Nach dem Auftauen zeigt sich hierbei keine Einschränkung der Virulenz des Parasiten.

Zur Kryokonservierung wurde *T. gondii* in den Wirtszellen HFF belassen. Hierzu erfolgte eine Überführung des Parasiten in eine Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) und Infektion des konfluenten HFF-Zellrasens. Als Medium diente DMEM mit 1% FCS, 1% P/S. Danach wurden die Zellkulturflaschen für etwa 24 h im Brutschrank begast (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), das Medium abgesaugt und die Zellen mit EDTA gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA, um die adhärennten Zellverbindungen am Flaschenboden zu lösen. Nach wenigen Sekunden wurde das Trypsin-EDTA abgesaugt und die Zellen durch leichtes Klopfen mit der Hand an die Flaschenseite weiter gelöst. Es erfolgte die Zugabe des Mediums DMEM (10% FCS, 1% P/S), in welches die Zellen resuspendiert wurden. Anschließend erfolgte die Überführung der Suspension auf ein Falcon-Röhrchen (50 ml), wobei dieses vorübergehend auf Eis gestellt wurde, um die Suspension abzukühlen. Danach erfolgte die Zugabe eines Einfriermediums (*Freeze-Mix*) mit dem gleichen Volumen, die Aliquotierung auf Kryo-Röhrchen zu je einem Milliliter und die anschließende Zwischenlagerung in einem Kühlfach bei -80°C. Nach einigen Tagen erfolgte dann im letzten Schritt die Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

### 2.2.1.4 Das Auftauen von *Toxoplasma gondii*

Um *T. gondii* aus der Kryokonservierung aufzutauen, wurden die Kryo-Röhrchen aus dem flüssigen Stickstoff genommen und zeitnah im 37°C-Wasserbad aufgetaut. Anschließend erfolgte die Überführung in einem vorbereiteten Zellkulturfläschchen (25 cm<sup>2</sup>) mit konfluenten HFF. Als Medium diente DMEM mit 1% FCS, 1% P/S. Es erfolgte die Aufbewahrung im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um das für die Zellen toxische Dimethylsulfoxid (DMSO) aus dem *Freeze-Mix* zu entfernen.

## 2.2.2 Bestimmung der Replikationsrate unter dem Phasenkontrastmikroskop

Für die Bestimmung der Replikationsrate wurden in einem Wachstumszähltest die Stämme RH und die Genmutante RH/ $\Delta$ *uprt* (vgl. Kap. 2.1.5) verwendet. Der Parasit wurde in 24-Well-Platten gegeben, auf deren Grund sich Deckgläschen mit konfluenten HFF als Wirtszellen befanden. Die HFF waren zuvor im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> aufbewahrt

worden; als Nährlösung diente DMEM mit 1% FCS und 1% P/S. Mit dem Parasiten wurden die Wirkstoffe (CA, CB, CC, CD & HDQ) in die Näpfe gegeben, wobei jeweils eine Kontrolle ohne Wirkstoff mitgeführt wurde. Um einen Konzentrations-/Wirkungsgrafen erstellen zu können, wurden die 1-Hydroxychinolone in den Konzentrationen 0,1 nM, 0,3 nM, 0,7 nM, 1 nM, 3 nM, 10 nM, 100 nM und 1  $\mu$ M dazugegeben. Anschließend erfolgte die weitere Aufbewahrung im Brutschrank unter o. g. Bedingungen.

24, 48, 72 und 96 Stunden postinfektion (p. i.), also nachdem die Zellen infiziert und die Wirkstoffe hinzugefügt wurden, erfolgte zur Fixierung der Zellen das Absaugen der Nährlösung und, um Zelltrümmer zu entfernen, die Waschung der Zellen mit PBS (1ml/Well). Anschließend wurde zur Fixierung 4%-Paraformaldehyd (1 ml/Well; Tab. 10) für zehn Minuten auf die Zellen gegeben.

**Tab. 10: Inhaltsstoffe 4%-Paraformaldehyd**

Inhaltsstoffe	Konzentration
PFA	16 g
PBS	ad 400 ml

Nach dem Absaugen erfolgte ein nochmaliges Waschen mit PBS (1 ml/Well), welches durch das Detergens Triton-X-100 0,25% (0,5 ml/Well; Tab. 11) ersetzt wurde, um ein detaillierteres, kontrastreicheres Bild unter dem Phasenkontrastmikroskop zu ermöglichen.

**Tab. 11: Inhaltsstoffe 0,25%-Triton-X-100**

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

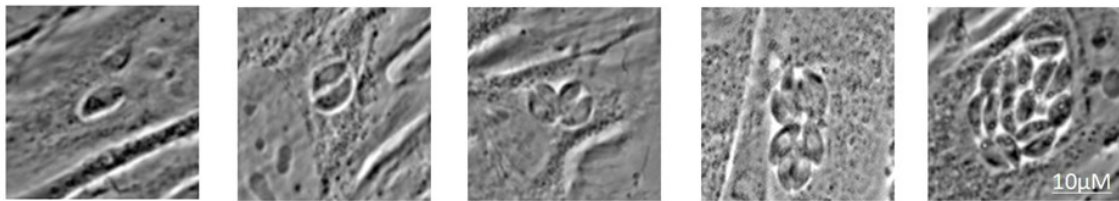
Nach 15 Minuten wurde Triton-X-100 abgesaugt und die Zellen erneut mit PBS (1 ml/Well) gewaschen. Alle aufgezählten Schritte erfolgten unter Raumtemperatur. Im letzten Schritt wurden die Deckgläschen mit einer Hakennadel aus den Näpfen entfernt, in bidestilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) getaucht und mit 10  $\mu$ l Mowiol (Tab. 12) auf Objektträger geklebt.



**Tab. 12: Inhaltsstoffe Mowiol**

Inhaltstoffe	Konzentration
Mowiol 4-88	2,4 g
Glycerol	6 g
Tris-Puffer	12 ml 0,2 M (pH 8,5)
ddH <sub>2</sub> O	6 ml

Die Auszählung der Parasiten erfolgte jeweils am nächsten Tag. Hierfür wurden nachfolgend unter dem Phasenkontrastmikroskop 100 Vakuolen betrachtet (Abb. 5), die Parasitenanzahl pro Vakuole notiert und abschließend die durchschnittliche Anzahl von Parasiten pro Vakuole ermittelt. Bei jedem Versuch wurden zwei identische Versuchsreihen angelegt, aus denen im Nachhinein der Mittelwert gebildet wurde.



**Abb. 5: *T. gondii* im Phasenkontrast.** Im linken Bild liegt *T. gondii* im Einzellstadium vor. D. h. der Parasit hat die HFF-Wirtszellen infiziert, ohne sich durch Endodyogenie zu teilen. In den darauffolgenden Bildern kann von links nach rechts der Parasit im Zweizell-, Vierzell-, Achtzell- und Sechzehnzellstadium gesehen werden. Eine Rupturierung der HFF-Wirtszelle ist üblicherweise im Zellstadium von 32 – 64 zu erwarten.

### 2.2.2.1 Die partielle Lyse der Wirtszelle

Mit fortschreitender Infektionsdauer setzte dabei eine partielle Wirtszellyse ein, welche, in Abhängigkeit vom gewählten Wirkstoff und dessen Konzentration, früher oder später auftrat. Durch die exponentielle Teilung von *T. gondii* kam es dabei zum Rupturieren der Wirtszellen, was zunehmende Verunreinigungen (z.B. Zelltrümmer) der Proben zur Folge hatte. Hierdurch wurde die Aussagekraft der Versuche zunehmend beeinflusst und genaue Rückschlüsse auf Teilungsverhalten des Parasiten waren nicht mehr möglich. Ein Zeichen für die partielle Lyse waren Mehrfachinfektionen einer Zelle (HFF) sowie eine Auflösung des kon-

fluenten Zellrasens mit zunehmend freien Toxoplasmen. Trat die partielle Lyse in den Versuchen auf, so wurde dies an entsprechender Stelle kenntlich gemacht und die Probe aus der Wertung genommen.

### 2.2.2.2 Berechnung der halb-maximalen inhibitorischen Konzentration

Die halb-maximale inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) zeigt bei biochemischen Reaktionen in *in-vitro*-Experimenten an, wie groß der hemmende Effekt einer Verbindung auf einen biologischen Prozess ist.

In Hinblick auf diese Arbeit entspricht die  $IC_{50}$  der Konzentration, bei der ein Hemmstoff 50% seiner maximal möglichen Hemmung erreicht. Im Falle von *T. gondii* wird somit die Konzentration gemessen, bei der ein Wirkstoff die halb-maximale Hemmung (50%) der Replikationsrate des Parasiten (gemessen an natürlichen Bedingungen) bewirkt.

Zur Berechnung der  $IC_{50}$  wurde in dieser Arbeit das Statistikprogramm SigmaPlot© verwendet, welches dazu dient wissenschaftliche Datenanalysen vorzunehmen und diese entsprechend in einem Diagramm darzustellen. Hierbei wurde ein sog. *pharmacology tool* verwendet, um die  $IC_{50}$  anhand eines Graphen mit s-förmiger Kurve zu berechnen und in einem Konzentrations-/Wirkungsgraphen darzustellen. Es wurden die Vierfach-Bestimmungen der Auszählungen als einzelne Replikate gewertet.

Die Formel zur Berechnung der  $IC_{50}$  wird in folgender Abbildung dargestellt und erläutert:

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + \left[ \frac{x}{IC_{50}} \right]^{-\text{Hillslope}}}$$

**Formel 1: Verwendete Gleichung zur Bestimmung der  $IC_{50}$  vom Statistikprogramm SigmaPlot©.** Die  $IC_{50}$  gibt die halb-maximale inhibitorische Konzentration eines Wirkstoffes an, wobei diese mathematisch nach dem Programm anhand einer nicht linearen Regressionsanalyse mit s-förmigem Kurvenverlauf dargestellt wird. In der Formel steht „min“ für den niedrigsten, „max“ für den höchsten Punkt der Kurve.  $IC_{50}$  ist der Wert der Kurve, der zwischen den maximalen und minimalen Parametern steht und wird „halb-maximale effektive Konzentration“ genannt. „Hillslope“ charakterisiert die Steigung der Kurve am Umschlagpunkt. Quelle: Die Formel zur Berechnung der  $IC_{50}$  entstammt SigmaPlot© und wurde grafisch selbst erstellt.

### 2.2.3 Bestimmung des relativen ATP-Levels

Zur Bestimmung des ATP-Gehalts von *T. gondii* wurde die Methode der luminometrischen Bestimmung mittels Luciferase (*BacTiter Glo™*) genutzt. Ein Luminometer misst die Lichtabstrahlung in einem festen Spektralbereich, die bei der enzymatischen, katalysierten Oxidation durch Luciferase mit d-Luciferin und ATP emittiert wird. Die Lichtemission ist dabei proportional zum ATP-Gehalt, welcher an der Reaktion beteiligt war. Um das relative ATP-Level eines Parasiten zu bestimmen, wurde die Lumineszenz/ml durch die Anzahl der Parasiten/ml geteilt.

Am ersten Tag des Versuches wurden 250 µl freie Toxoplasmen (*T. gondii*-Genotyp-I-Parasiten) aus vor 48 h infizierten Zellkulturflaschen entnommen (nach dieser Zeit hatte die Zellyse bereits eingesetzt) und in je eine Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) mit konfluentem HFF-Zellrasen gegeben. Das Nährmedium dieser Flaschen bestand aus DMEM mit 1% FCS und 1% P/S. Nach 24 h, und nachdem die Infektion der Wirtszellen erfolgt war, wurden die Wirkstoffe (CA, CB & HDQ) in den entsprechenden Konzentrationen hinzugegeben; bis auf die unbehandelte Kontrolle, welche bereits zu diesem Zeitpunkt geerntet wurde. Nach weiteren 24 h erfolgte die Ernte der mit Wirkstoffen versetzten Parasiten.

Zur Ernte wurden alle Zellkulturflaschen mit dem Proteasehemmer Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) versetzt. PMSF beugt dabei unerwünschtem Proteinabbau durch ebenfalls im Lysat befindliche Proteasen vor. Anschließend erfolgte eine Waschung mit 1x PBS. Nach dem Absaugen wurden je 5 ml DMEM (1% FCS, 1% P/S, ohne Phenolrot) pro Flasche dazugegeben und die Zellen vorsichtig mit einem Schaber vom Boden der Flasche gelöst. Die Parasiten wurden nun aus den Wirtszellen gelöst, indem sie durch eine Spritze mit Kanüle in ein Falcon-Röhrchen gespritzt wurden. Ab diesem Schritt wurden die Zellen zu allen Wartezeiten auf Eis gestellt, um biochemische Reaktionen zu minimieren. Das Falcon-Röhrchen wurde dann bei 34 x g für fünf Minuten zentrifugiert, mit dem Zweck die Wirtszellen auf dem Boden des Falcons zu sammeln und die freien Toxoplasmen im Überstand zu isolieren. Hierfür wurde nach der Zentrifugation der Überstand mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. In einer erneuten Zentrifugation bei 1314 x g wurden die Toxoplasmen für zehn Minuten am Grund des Falcons gesammelt, der Überstand wurde verworfen. Das Toxoplasmen-Pellet wurde zusammen mit 250 µl DMEM resuspendiert. 20 µl der Suspension wurden in ein Eppendorf-Röhrchen überführt, wobei hiervon 10 µl auf eine Glasplatte mit Zählkammern pipettiert wurden, um in einer Auszählung unter dem Zellkulturmikroskop die Parasitenzahl zu bestimmen. Die übrigen 230 µl der Suspension wurden

unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Versuchsdurchführung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Hierdurch sollten mögliche enzymatische Reaktionen, die den ATP-Gehalt hätten beeinflussen können, minimiert werden. Die Ernte der Kontrolle, welche bereits 24 h vorher erfolgte, wurde auf die gleiche Weise durchgeführt.

Zur luminometrischen Bestimmung des relativen ATP-Levels wurden im letzten Schritt des Versuches die Eppendorf-Röhrchen auf Eis liegend aufgetaut. Aus jedem Eppendorf-Röhrchen wurden je zweimal  $100\ \mu\text{l}$  entnommen und in eine 96-Well-Platte (schwarz mit transparentem Boden) pipettiert. Anschließend erfolgte im dunklen Raum die Zugabe von  $100\ \mu\text{l}$  Luciferase (*BacTiter Glo<sup>TM</sup>*), um mit dem Luminometer die Lichtemission zwei, fünf und acht Minuten nach Hinzugabe des Enzyms zu messen.

#### 2.2.4 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials ( $\Delta\Psi\text{m}$ )

Die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) wurde mit Hilfe von DiOC<sub>6</sub> (3,3'-Dihexyloxycarbocyanin-Iodid) durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen fluoreszierenden, lipophilen und positiv geladenen grünen Farbstoff, der, abhängig von der gewählten Konzentration, verschiedene Strukturen einer Zelle anfärben kann. Hierzu gehören Vesikel, das ER und, für diesen Versuch von Bedeutung, die MM. So wird in niedrigeren Konzentrationen eher die MM, in hohen das ER angefärbt. Aufgrund der lipophilen Struktur kann DiOC<sub>6</sub> Zellmembranen überwinden und sich durch seine positiv geladenen Eigenschaften an der intakten, negativ geladenen, MM anreichern.

Für den Versuch wurden schwarze 24-Well-Platten mit transparentem Boden benutzt und mit HFF besät. Als Medium diente DMEM mit 10% FCS und 1% P/S, die Aufbewahrung erfolgte im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5% CO<sub>2</sub>. Nachdem die Well-Platten einen konfluenten Zellrasen aufwiesen (nach fünf bis sieben Tagen), wurde das Medium durch DMEM 1% FCS und 1% P/S ersetzt und die HFF mit Toxoplasmen des RH- oder RH/ $\Delta\text{uprt}$  Stammes infiziert ( $30\ \mu\text{l}/\text{Well}$ ). Bei einer durchschnittlichen Replikationsrate von *T. gondii* befanden sich nach 24 h 8 bis 16 Parasiten in einer PV. 24 h p. i. wurde das Medium aus den Wells abgesaugt, erneuert und die 1-Hydroxychinolone (CA, CB & HDQ) in den Konzentrationen 1 nM und 100 nM dazu pipettiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Fluoreszenzbestimmung 1 h, 24 h und 48 h, nachdem die Verbindungen hinzugefügt wurden.

DiOC<sub>6</sub> wurde mit auf 37°C erwärmtem DMEM mit 1% FCS gemischt, so dass es in einer Endkonzentration von 5 nM in die Wells gegeben werden konnte. Für die Fluoreszenzbestimmung wurde die Nährlösung aus den Wells mit den infizierten Zellen abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend das Fluoreszenzmedium dazu pipettiert. Dieser Vorgang erfolgte unter Aussparung von UV-Licht, um ein vorzeitiges Reagieren von DiOC<sub>6</sub> zu vermeiden. Anschließend wurden die Wells mit Alufolie vor UV-Strahlung geschützt und für 25 Minuten unter einer CO<sub>2</sub>-Schutzatmosphäre gelagert, um dem Farbstoff Zeit zu geben, sich an der MM anzulagern. Danach wurden die Zellen schnellstmöglich am Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert, wobei Aufnahmen im Phasenkontrast und mit dem Fluoreszenzfarbstoff gemacht wurden.

Zur Auswertung wurden pro Wirkstoff und Konzentration 100 Vakuolen betrachtet, wobei beurteilt wurde, ob die intrazellulären Parasiten ein intaktes, also negatives  $\Delta\Psi_m$  besaßen, oder dieses nicht vorhanden war. In diesem Fall wird von einem zusammengebrochenen  $\Delta\Psi_m$  gesprochen. Um annähernd natürliche Bedingungen zu simulieren, erfolgte die Mikroskopierarbeit unter geschützter Atmosphäre mit einer Temperatur von 37°C. Im Ergebnisteil werden mikroskopische Beispiele für *T. gondii* angeführt, die den Parasiten unter dem Phasenkontrastmikroskop, wahlweise mit und ohne Fluoreszenzfarbstoff versehen, zeigen (s. Kap. 3.3, Abb. 11).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Vergleich der 1-Hydroxychinolone hinsichtlich ihres wachstumsinhibierenden Potentials auf *Toxoplasma gondii*-Genotyp-I-Parasiten

Die 1-Hydroxychinolone CA, CB, CC & CD wurden auf ihre replikationshemmenden Eigenschaften bezüglich der tachyzoiten Toxoplasmen der Stämme RH und RH/ $\Delta uprt$  (Genmutante, mit deletierter UPRT; vgl. Kap. 2.1.5) untersucht. Als Wirtszellen dienten HFF. Zur Ansicht der molekularen Struktur der 1-Hydroxychinolone wird auf das Kapitel 2.1.7 verwiesen.

Zum Vergleich der Arbeiten von Naujoks (2008) und Saleh et al. (2007) wurde das 1-Hydroxychinolon HDQ mitgeführt, welches sich zuvor als potente Verbindung zur Wachstumsinhibierung von *T. gondii*-Genotyp-I-Parasiten erwiesen hatte.

Mit dem methodischen Rahmen eines Zähltestes (vgl. Kap. 2.2.2) wurden die Parasiten pro Vakuole nach determinierten Zeiteinheiten gezählt, wobei als Variablen die 1-Hydroxychinolone und deren Konzentration sowie die Zeiteinheit selbst dienten. Zur Beurteilung des Effekts der Verbindungen wurde zu allen Versuchen eine Kontrolle mitgeführt, die von Wirkstoffen unbehandelt blieb. Unter dem Phasenmikroskop wurden je 100 Vakuolen ausgezählt und anschließend daraus die durchschnittliche Anzahl der Parasiten pro PV ermittelt. Insgesamt wurden alle Versuche unter gleichen Bedingungen (Verbindung/Konzentration, Parasitenstamm und Einwirkzeit der Verbindung) vier Mal durchgeführt. Anschließend wurden die Mittelwerte gebildet.

Als Wirkstoffkonzentrationen wurden zunächst 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1  $\mu$ M gewählt, da sich diese Dosen in vergangenen Versuchen mit HDQ für eine Skala bewährt hatten und die minimalen und maximalen Hemmeffekte auf die Replikationsrate von *T. gondii* gut abgebildet werden konnten. Im Verlauf der Versuche zeichnete sich für CA & CB jedoch eine deutlich stärkere inhibitorische Potenz ab, weshalb zusätzlich die Konzentrationen 0,1 nM, 0,3 nM, 0,7 nM und 3 nM mitbestimmt wurden. Dies war vor allem für die Berechnung der  $IC_{50}$  von Bedeutung, die somit präziser bestimmt und in einem Konzentrations-/Wirkungs-

graphen abgebildet werden konnte. Bei der  $IC_{50}$  handelt es sich um die halb-maximale inhibitorische Konzentration (vgl. Kap. 2.2.2.2), welche für diese Arbeit mit dem Statistikprogramm SigmaPlot© erstellt wurde. Sie gibt an, bei welcher Dosis ein Hemmstoff 50% der maximal möglichen Hemmung einer Zelle, eines Mikroorganismus oder eines Enzyms erreicht.

Auf die Versuche zur Wachstumsinhibierung bezogen gibt die  $IC_{50}$  somit die Wirkstoffkonzentration an, bei der *T. gondii* halb-maximal in seiner Replikationsrate inhibiert wird (gemessen an der unbehandelten Kontrolle und in vergleichbarem Zeitraum).

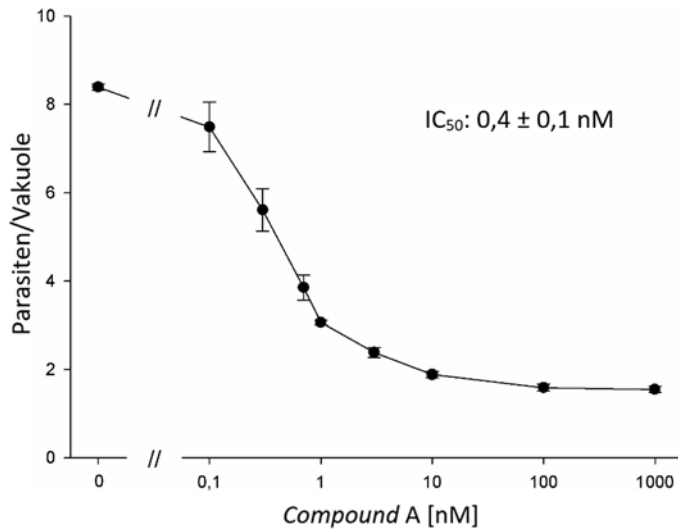
Die 1-Hydroxychinolone wurden vor der Zählung zunächst für 24 h und 48 h auf den mit *T. gondii* infizierten HFF belassen, da die Erfahrung mit HDQ für diesen Zeitraum bereits gezeigt hatte, dass es innerhalb dieser Zeit zu einer partiellen Zelllyse der Wirtszellen kommt (Naujoks 2008; vgl. Kap. 2.2.2). Dies bestätigte sich für HDQ auch im Rahmen dieser Arbeit. CA & CB zeigten jedoch auch 48 h p. i. noch eine stark replikationshemmende Wirkung. Deshalb wurden die Versuche für diese Verbindungen auf 72 h und 96 h Stunden ausgeweitet, wodurch eine präzisere Beurteilung der Langzeitinkubation möglich wurde.

### **3.1.1 *Compound A & B* als potente Wachstumsinhibitoren von *Toxoplasma gondii*-Genotyp-I-Parasiten 24 h p. i.**

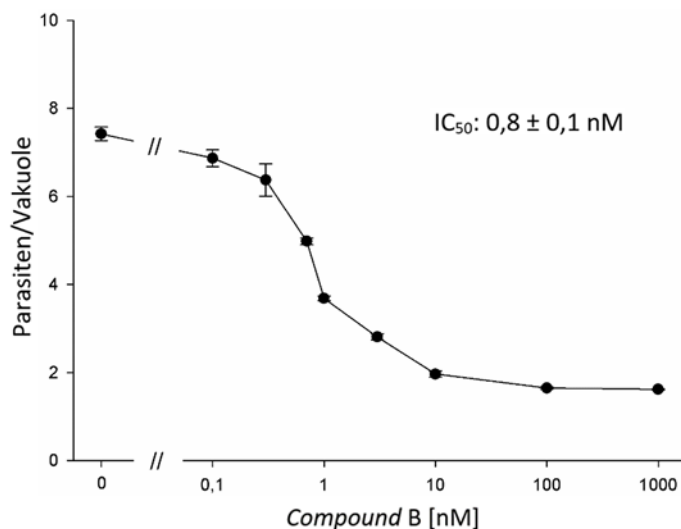
Im Zähltest erwiesen sich CA & CB 24 h p. i. als effektive Wachstumsinhibitoren von *T. gondii*-Genotyp-I-Parasiten (Abb. 6 und 7). Für das mituntersuchte HDQ (Abb. 8) konnte indes eine ähnliche inhibitorische Potenz wie in den Arbeiten von Saleh et al. (2007) und Naujoks (2008) bestätigt werden. CA & CB konnten 24 h p. i. als deutlich potentere Wachstumsinhibitoren identifiziert werden. Dies spiegelte sich auch im Zähltest und anhand der errechneten  $IC_{50}$  wider, die teils eine Zehnerpotenz niedriger ausfiel als bei HDQ. Die  $IC_{50}$  für CA & CB betragen 0,4 nM und 0,8 nM, für HDQ  $4,2 \text{ nM} \pm \text{SD}$ .<sup>41</sup> Dies machte deutlich, dass die neuen Verbindungen sich insbesondere in den niedrigen Wirkstoffkonzentrationen effektiv von HDQ absetzen konnten.

---

<sup>41</sup> Die Ergebnisse wurden auf eine Nachkommastelle gerundet.

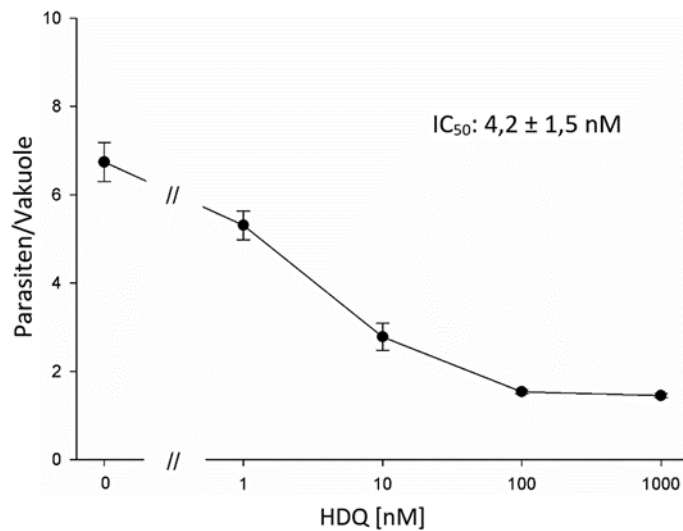


**Abb. 6: Wachstumsinhibitorisches Potential und  $IC_{50}$  von CA auf *T. gondii* 24 h p. i.** In dem Kurvendiagramm wird auf der X-Achse die Konzentration der Wirkstoffe (in nM), auf der Y-Achse die Anzahl der im Versuch ausgezählten Parasiten pro Vakuole aufgetragen, wobei immer 100 Vakuolen je Verbindung ausgezählt wurden. Die Auszählung erfolgte 24 h nach Infektion der Wirtszellen und Zugabe der Verbindungen. Die  $IC_{50}$  wurde mit dem Statistikprogramm SigmaPlot© berechnet und entspricht der halb-maximalen inhibitorischen Konzentration. Alle Angaben sind Durchschnittswerte aus Vierfachbestimmung  $\pm$  SD. Bereits in den niedrigen Konzentrationen unter 1 nM konnte ein deutlicher Abfall der durchschnittlichen Parasiten pro Vakuole beobachtet werden.



**Abb. 7: Wachstumsinhibitorisches Potential und  $IC_{50}$  von CB auf *T. gondii* 24 h p. i.** In dem Kurvendiagramm wird auf der X-Achse die Konzentration der Wirkstoffe (in nM), auf der Y-Achse die Anzahl der im Versuch ausgezählten Parasiten pro Vakuole aufgetragen, wobei immer 100 Vakuolen je Verbindung ausgezählt wurden. Die Auszählung erfolgte 24 h nach Infektion der Wirtszellen und Zugabe der Verbindungen. Die  $IC_{50}$  wurde mit dem Statistikprogramm SigmaPlot© berechnet und entspricht der halb-maximalen inhibitorischen Konzentration. Alle Angaben sind Durchschnittswerte aus Vierfachbestimmung  $\pm$  SD.





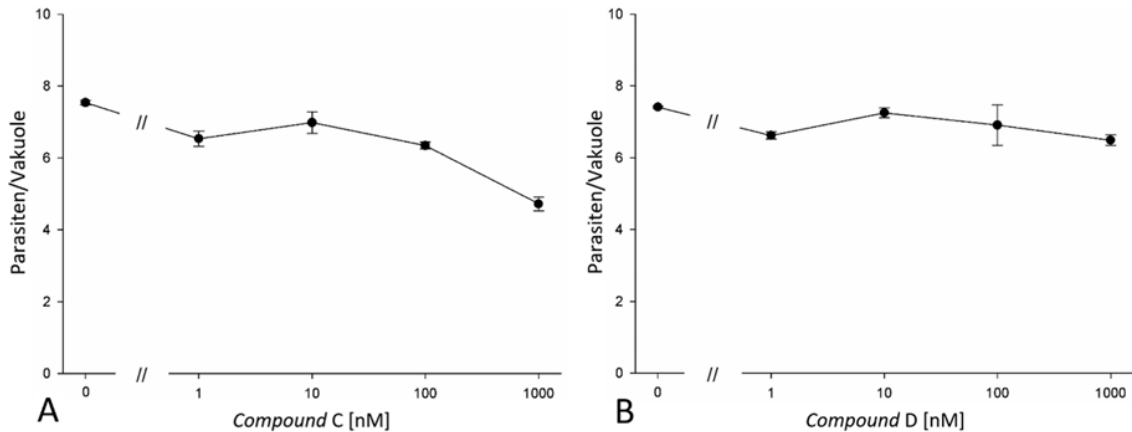
**Abb. 8: Wachstumsinhibitorisches Potential und  $IC_{50}$  von HDQ auf *T. gondii* 24 h p. i.** In dem Kurvendiagramm wird auf der X-Achse die Konzentration der Wirkstoffe (in nM), auf der Y-Achse die Anzahl der im Versuch ausgezählten Parasiten pro Vakuole aufgetragen, wobei immer 100 Vakuolen je Verbindung ausgezählt wurden. Die Auszählung erfolgte 24 h nach Infektion der Wirtszellen und Zugabe der Verbindungen. Die  $IC_{50}$  wurde mit dem Statistikprogramm SigmaPlot© berechnet und entspricht der halb-maximalen inhibitorischen Konzentration. Alle Angaben sind Durchschnittswerte aus Vierfachbestimmung  $\pm$  SD. Im Vergleich zu CA & CB setzte ein deutlich wachstumsinhibierender Effekt erst ab einer Dosis über 1 nM ein.

In den hohen Konzentrationen von 100 nM bzw. 1  $\mu$ M glich sich der hemmende Effekt der drei Wirkstoffe an und bot im Zähltest ein parasitostatisches Bild. Im Mittel zeigten unter dem Einwirken von CA in den o. g. Konzentrationen 41% bzw. 45%, bei CB 35% bzw. 38% der Toxoplasmen keine Teilungsaktivität.<sup>42</sup> Die anderen Toxoplasmen befanden sich überwiegend im Stadium nach der ersten und nur in Ausnahmen nach der zweiten Teilungsphase.<sup>43</sup>

Die Wirkstoffe CC & CD zeigten im Zähltest 24 h p. i. (Abb. 9) allenfalls einen geringen wachstumsinhibitorischen Effekt. Am deutlichsten konnte dieser bei CC in der hohen Konzentration von 1  $\mu$ M beobachtet werden. In den übrigen Dosen ist fraglich, ob die leicht verminderte Replikationsrate von *T. gondii* auf Wirken der Substanzen, oder auf Verunreinigungen, die beim Prozess der Wirkstoffzugabe und der Zellkultur entstanden sein können, zurückzuführen ist.

<sup>42</sup> Für HDQ ergaben sich vergleichbare Werte.

<sup>43</sup> Wenn keine Teilungsaktivität beobachtet wurde, lag ein Parasit pro Vakuole vor. Nach der ersten Teilungsphase wurden zwei Toxoplasmen pro Vakuole gezählt, nach der zweiten Phase vier u. s. w.



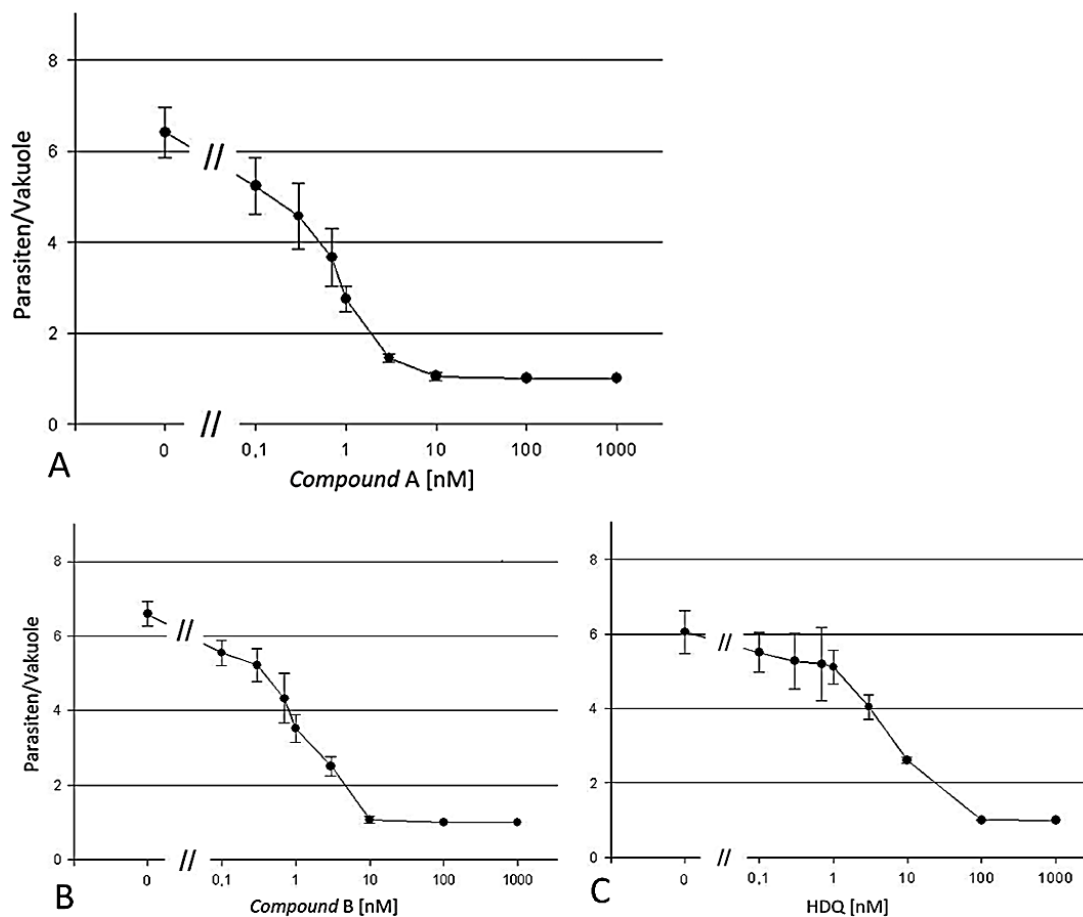
**Abb. 9: Wachstumsinhibitorisches Potential von CC (A) und CD (B) auf *T. gondii* 24 h p. i.** Die Kurvendiagramme stellen die Wirkstoffkonzentration (in nM) auf der X-Achse und die Anzahl der im Versuch ausgezählten Parasiten pro Vakuole auf der Y-Achse dar. Die Auszählung erfolgte 24 h nach Infektion der Wirtszellen und Zugabe der Verbindungen, mit je 100 betrachteten Vakuolen pro Verbindung und Konzentration. Alle Angaben sind Durchschnittswerte aus Vierfachbestimmung  $\pm$  SD. Im Vergleich zu den Verbindungen CA, CB und HDQ konnten CC & CD allenfalls einen leichten Effekt auf das Wachstum von *T. gondii* zeigen.

Das Anfügen der N,N-Dimethylaminoethoxy-Gruppe an C-6 des Moleküls (vgl. Kap. 2.1.7) sollte den ansonsten deutlich hydrophoben Substanzen eine bessere Wasserlöslichkeit verleihen. Insgesamt kann jedoch festgehalten werden, dass dies der hemmenden Wirkung, welche die oben angeführten Verbindungen im Zähltest zeigten, deutlich abträglich war. Dies kann darin begründet liegen, dass sich die molekulare Struktur von CC & CD zu weit vom strukturverwandten Ubichinon entfernt hat, womit die Wirkung beeinträchtigt worden wäre (vgl. Kap. 1.6 und 1.7). Am wahrscheinlichsten ist aber, dass die verminderte Hydrophobizität die Permeabilität durch die Doppellipidmembran der Mitochondrien eingeschränkt hat und somit weniger Wirkstoff am Wirkungsort angelangte.

### 3.1.2 Hypersensitivität von RH/ $\Delta$ uprt gegenüber Hydroxychinolonen 24 h p. i.

RH/ $\Delta$ uprt-Parasiten zeigten im Zähltest eine Hypersensibilität gegenüber den Wirkstoffen CA, CB & HDQ nach 24 h Inkubation. Dabei konnte in den hohen Konzentrationen von 100 nM und 1  $\mu$ M ein parasitostatischer Effekt beobachtet werden, bei dem die Parasiten innerhalb von 24 h nahezu keine Teilungsaktivität zeigten. Für HDQ wurden zusätzlich, wie bei den Verbindungen CA & CB, die niedrigen Konzentrationen von 0,1 nM, 0,3 nM, 0,7 nM und 3 nM mitbestimmt, da die Replikationsrate des Parasiten bereits in diesen Dosierungen merklich inhibiert wurde.

Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen (Abb. 10), da bei RH/ $\Delta uprt$ -Parasiten eine Defizienz der UPRT vorliegt. Dadurch fällt ein Schlüsselenzym des Pyrimidin-*salvage*-Stoffwechselwegs aus, womit die Deletionsmutante das essentielle UMP nur noch über die energetisch ineffizientere Pyrimidin-*de-novo*-Synthese synthetisieren kann (vgl. Kap. 2.1.5). Weiter einschränkend kommt für die Deletionsmutante zum Tragen, dass die 1-Hydroxychinolone ebenfalls in die *De-novo*-Synthese eingreifen, indem sie mit der DHODH interagieren (Hegewald et al. 2013; vgl. Kap. 1.7).



**Abb. 10: Wachstumsinhibitorisches Potential von CA, CB und HDQ 24 h p. i. gegenüber RH/ $\Delta uprt$ .**

In den Kurvendiagrammen wird auf der X-Achse die Konzentration der Wirkstoffe (in nM), auf der Y-Achse die Anzahl der im Versuch ausgezählten Parasiten pro Vakuole aufgetragen, wobei immer 100 Vakuolen je Verbindung ausgezählt wurden. Die Auszählung erfolgte 24 h nach Infektion der Wirtszellen und Zugabe der Wirkstoffe. A – C zeigen dabei die Ergebnisse der Verbindungen CA, CB & HDQ. Alle Angaben der Abbildung sind dabei Durchschnittswerte aus Vierfachbestimmung  $\pm$  SD. Besonders in den hohen Konzentrationen von 100 nM und 1  $\mu$ M zeigte RH/ $\Delta uprt$  nahezu keine Teilungsaktivität und sistierte 24 h p. i. im Einzelstadium.

Wie schon beim RH-Stamm stellten sich, verglichen mit HDQ, die neuen Verbindungen besonders in den niedrigeren Konzentrationen als potentere Wachstumsinhibitoren heraus. So fand bei CA & CB auch in der vergleichsweise niedrigen Konzentration von 10 nM 24 h p. i. fast keine Teilungsaktivität statt. Die  $IC_{50}$  ergab für CA 0,6 nM, für CB 0,9 nM und für HDQ 5,4 nM  $\pm$  SD (berechnet mit SigmaPlot©) und lag damit mit dem RH-Stamm auf vergleichbarem Niveau. Dass die  $IC_{50}$  trotz der Einschränkungen im Stoffwechsel der Mutante nicht niedriger ausfiel kann u. a. damit erklärt werden, dass RH/ $\Delta uprt$  in der Kontrolle eine etwas geringere Teilungsaktivität als der Wildstamm aufwies. Dies ergibt eine niedrigere Maximalauslenkung der Kurve für die Formel zur Berechnung der  $IC_{50}$  (s. Kap. 2.2.2.2) und lässt die halb-maximale inhibitorische Konzentration damit tendenziell höher ausfallen.

### 3.1.3 Wachstumszähltest im Langzeitversuch über 48 h, 72 h und 96 h

Im Zähltest über 48 h wurden Wirkstoffkonzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1  $\mu$ M auf ihr inhibitorisches Potential auf den RH-Stamm untersucht. Wie in den Versuchen zuvor wurden pro Verbindung 100 Vakuolen ausgezählt. Aufgrund zum Teil schon einsetzender partieller Lyse wurde im Langzeitversuch auf die Bestimmung der  $IC_{50}$  verzichtet. Diese lag vor, wenn es durch die Replikation von *T. gondii* zur Lyse der Wirtszellen kam. Dafür sprach eine Zerstörung des HFF-Zellrasens (was verstärkt Zelltrümmer nach sich zog), zunehmend freie Toxoplasmen (extrazellulär vorliegend und damit ohne PV) sowie Mehrfachinfektionen einer Zelle, die durch die freien Toxoplasmen bedingt wurden (s. Kap. 2.2.2.1).

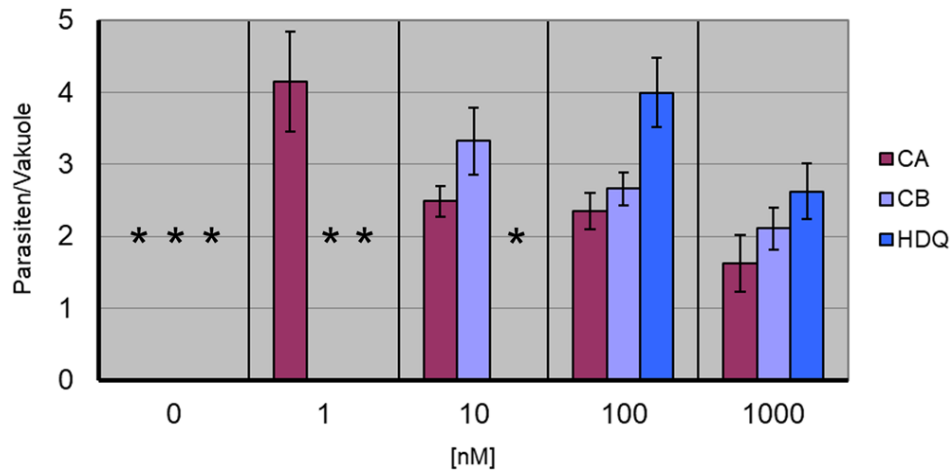
In der niedrigsten Konzentration von 1 nM konnte nur CA die Replikationsrate soweit hemmen, dass ein Auszählen der Zellen noch weiterstehend möglich war (s. Tab. 13).<sup>44</sup> Dabei konnte sich *T. gondii* durchschnittlich nur zweimal teilen, was vier Parasiten pro PV entspricht. Zum Vergleich: Ohne Wirkstoffe hätte der Parasit sich *in vitro* in dieser Zeit 7 – 8-mal geteilt, was 128 bzw. 256 Parasiten pro PV entsprächen und längst zur Wirtszelllyse geführt hätte. In den Konzentrationen von 10 nM und 100 nM ließen sich, wie im Zähltest über 24 h, Vorteile in der Wachstumshemmung zugunsten von CA & CB erkennen, wohingegen beim Wirkstoff HDQ die partielle Lyse bereits bei einer Konzentration von 10 nM einsetzte. Insgesamt zeigte der RH-Stamm 48 h p. i., korrelierend mit einer niedriger werdenden Wirkstoffkonzentration, eine ansteigende Wachstumsrate. Im Gegensatz dazu zeigte

---

<sup>44</sup> Bei CB & HDQ war in dieser Konzentration die partielle Lyse der Wirtszellen bereits zu weit fortgeschritten.

sich in den hohen Konzentrationen von 100 nM und 1  $\mu$ M, insbesondere bei CA & CB, ein deutlich inhibitorischer Effekt, bei dem *T. gondii* überwiegend nach der ersten Zellteilung sistierte.

Tab. 13: Wachstumsinhibitorische Wirkung von CA, CB und HDQ 48 h p. i.

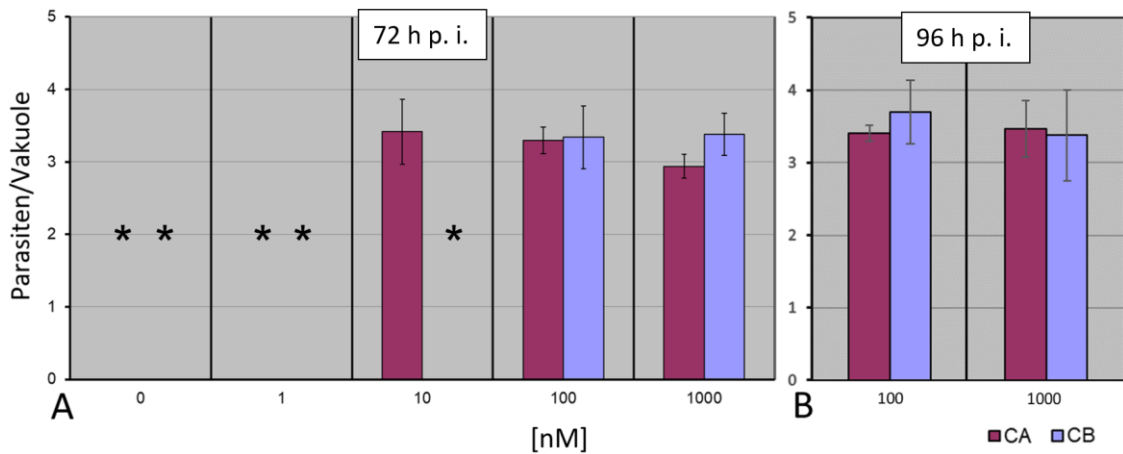


Die Tabelle stellt auf der X-Achse die Konzentration der Wirkstoffe CA, CB und HDQ (in nM) dar, wobei die Legende rechts durch die Farben die Verbindungen anzeigt. Auf der Y-Achse werden die Parasiten pro Vakuole dargestellt. Pro Verbindung wurden 100 Vakuolen ausgezählt. Alle Angaben sind Durchschnittswerte aus Vierfachbestimmung  $\pm$  SD. Die Sterne (\*) zeigen das Vorliegen der partiellen Lyse an, weshalb keine Auszählung erfolgte. Diese setzte bei HDQ in niedrigen Konzentrationen früher ein, als bei CA & CB.

Im Langzeitversuch, in dem eine Inkubation mit den 1-Hydroxychinolonen über 72 h und 96 h erfolgte, wurden nur CA & CB auf ihre inhibitorische Wirkung auf das Parasitenwachstum des RH-Stammes getestet. Für HDQ konnte bereits in der Arbeit von Naujoks (2008) gezeigt werden, dass bei einer Konzentration von 100 nM bereits 72 h p. i. die partielle Zelllyse eingesetzt hatte. CA & CB bestätigten hierbei erneut eine potente wachstumsinhibitorische Wirkung auf *T. gondii* und zeigten insbesondere in den Konzentrationen von 100 nM und 1  $\mu$ M einen anhaltend parasitostatischen Effekt (s. Tab. 14).

Werden die durchschnittlichen Teilungsstadien von *T. gondii* nach 72 h und 96 h p. i. verglichen, fällt auf, dass in dem zusätzlichen Zeitfenster von 24 Stunden kaum Parasitenreplikation stattgefunden hat. Dies lässt erneut auf einen parasitostatischen Effekt von CA & CB schließen. Auch eine parasitizide Wirkung kann diskutiert werden. Aufgrund der zunehmenden Verunreinigungen im Langzeitversuch (Zelltrümmer, partielle Lyse) war eine weitere Ausdehnung der Zeitachse mit der Methode eines Zähltestes jedoch nicht möglich, ohne eine Verfälschung der Ergebnisse in Kauf zu nehmen.

Tab. 14: Wachstumsinhibitorische Wirkung von CA und CB 72 h und 96 h p. i.



Die Tabellen A und B stellen auf der X-Achse die Konzentration der Wirkstoffe CA & CB (in nM) dar, wobei die Legende unten rechts durch verschiedene Farbwahl die Verbindungen anzeigt. Auf der Y-Achse sind die Parasiten pro Vakuole dargestellt. Pro Verbindung wurden immer 100 Vakuolen ausgezählt. Die linke Tabelle (A) zeigt den Zähltest 72 h p. i., die Rechte (B) 96 h p. i. Im Vergleich wird deutlich, dass in der Inkubationszeit von 72 h auf 96 h in den hohen Konzentrationen von 100 nM und 1000 nM kein signifikantes Parasitenwachstum stattgefunden hat. Alle Angaben sind Durchschnittswerte aus Vierfachbestimmung  $\pm$  SD. Die Sterne (\*) zeigen das Vorliegen der partiellen Lyse an, weshalb keine Auszählung erfolgte.

### 3.2 Bestimmung des relativen ATP-Gehaltes von *Toxoplasma gondii* unter Einfluss von 1-Hydroxychinolonen

Nachdem im ersten Versuch die inhibitorische Wirksamkeit von CA, CB & HDQ auf die Replikationsrate dargestellt werden konnte, war von Interesse, inwieweit die oben genannten Substanzen die ATP-Generierung des Parasiten durch beschriebene Inhibierung der Atmungskette einschränken (s. Kap. 1.6).

Die Atmungskette ist in der inneren MM eingelagert und besteht aus einer Abfolge biochemischer Redoxreaktionen, bei der im letzten Schritt, durch die ATP-Synthase, der universelle Energieträger ATP generiert wird (vgl. Kap. 1.5). Da die in dieser Arbeit getesteten Verbindungen als wichtige Zielstruktur die NDH-2 haben (welche den ersten Komplex der Atmungskette bildet) wurde unter Einwirken der 1-Hydroxychinolone ein Abweichen vom natürlichen ATP-Gehalt erwartet.

In dem Versuch wurden die Verbindungen CA, CB & HDQ auf ihre Auswirkung auf den ATP-Gehalt der Genotyp-I-Stämme RH, RH/ $\Delta uprt$  und RH/ $\Delta scs$  getestet. Als Konzentrationen wurden 1 nM und 1  $\mu$ M gewählt. Schon bei der niedrigen Konzentration von 1 nM

hatten dabei im Zähltest besonders CA & CB (vgl. Kap. 3.1.1) eine deutliche Inhibierung der Replikationsrate gezeigt (die  $IC_{50}$  lag bei unter 1 nM). Unter 1  $\mu$ M war es in den Versuchen zu einem so starken Abfall der Parasitenreplikationsrate gekommen, dass eine parasitostatische Wirkung diskutiert wurde.

Alle Versuche wurden für jeden Wirkstoff und jede Konzentration in Doppelbestimmung durchgeführt, wobei anschließend die Mittelwerte gebildet wurden. Zu jedem Versuch wurde eine Kontrolle ohne Wirkstoffe mitgeführt. Die Bestimmung des ATP-Gehalts erfolgte durch die Methode der luminometrischen Messung mittels Luciferase (BacTiter Glo™).

Am ersten Versuchstag wurden dabei konfluente HFF in Zellkulturflaschen mit dem jeweiligen *T. gondii*-Stamm angeimpft. Nach 24 h erfolgte die Zugabe der Verbindungen (CA, CB & HDQ) und nach weiteren 24 h die Ernte der Toxoplasmen für die Auswertung. Dafür wurden die Parasiten zunächst durch diverse Mediumwechsel und Zentrifugationsvorgänge (vgl. Kap. 2.2.3) aus den HFF isoliert. Ein Teil der Toxoplasmen wurde anschließend dazu genutzt, um in Zählkammern die Parasitenzahl pro Milliliter unter dem Zellkulturmikroskop zu ermitteln. Der andere Teil der Toxoplasmen wurde bis zur weiteren Versuchsdurchführung in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um enzymatische Reaktionen zu minimieren, die den ATP-Gehalt hätten beeinflussen können.

Im letzten Versuchsschritt wurden die Parasiten aufgetaut und der relative ATP-Gehalt pro Parasit bestimmt. Dazu wurde am Luminometer die Lichtemission gemessen, die bei der enzymatischen Reaktion unter Zugabe von Luciferase entstand und welche proportional zum relativen ATP-Gehalt war. Die Messung wurde dabei zwei, fünf und acht Minuten nach Zugabe der Luciferase ermittelt. Es zeigte sich jedoch, dass in fast allen Fällen bereits nach zwei Minuten ein Maximum des Messwertes erreicht wurde, weshalb nachfolgend die Ergebnisse dargestellt werden, die nach zwei Minuten Einwirkzeit der Luciferase gemessen wurden.

### 3.2.1 Verminderung des relativen ATP-Gehaltes für alle getesteten Stämme unter Einwirkung der 1-Hydroxychinolone

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigte der Versuch für alle getesteten Stämme (RH, RH/ $\Delta uprt$  und RH/ $\Delta scs$ ) 24 h p. i. eine Abnahme des ATP-Gehaltes unter Einwirken der 1-Hydroxychinolone CA, CB & HDQ. Dies galt sowohl für die niedrige Chinolonkonzentration von 1 nM als auch für die hohe von 1  $\mu$ M. Für alle getesteten Verbindungen ergaben sich leichte Schwankungen, bei aber insgesamt ähnlicher Verminderung des ATP-Gehaltes.

Die Verminderung des ATP-Gehaltes entsprach den Erwartungen, da dieser Effekt zuvor von Lin et al. (2009) für HDQ bestätigt werden konnte. Überraschend war jedoch, dass die niedrige Wirkstoffkonzentration (1 nM) für alle getesteten Substanzen und Stämme (nach luminometrischer Auswertung) den niedrigeren ATP-Gehalt aufwies. Dabei hätte es nahe gelegen, dass die hohe Konzentration (1  $\mu$ M) durch eine stärkere Hemmung der Atmungskette und somit stärkerer Beeinträchtigung der ATP-Synthese einen niedrigeren ATP-Gehalt nach sich gezogen hätte. Schließlich hatte der Zähltest deutlich gezeigt, dass das Ausmaß der Wachstumsinhibierung von *T. gondii* mit der Höhe der Konzentration der Verbindungen korrelierte. Mögliche Erklärungen zu diesem Resultat werden in der Diskussion erörtert. In den nächsten Kapiteln erfolgt eine Auflistung der Ergebnisse des Versuches, gegliedert nach den Parasiten-Stämmen.

### 3.2.2 Verminderung des relativen ATP-Gehaltes des RH-Stammes durch CA, CB & HDQ

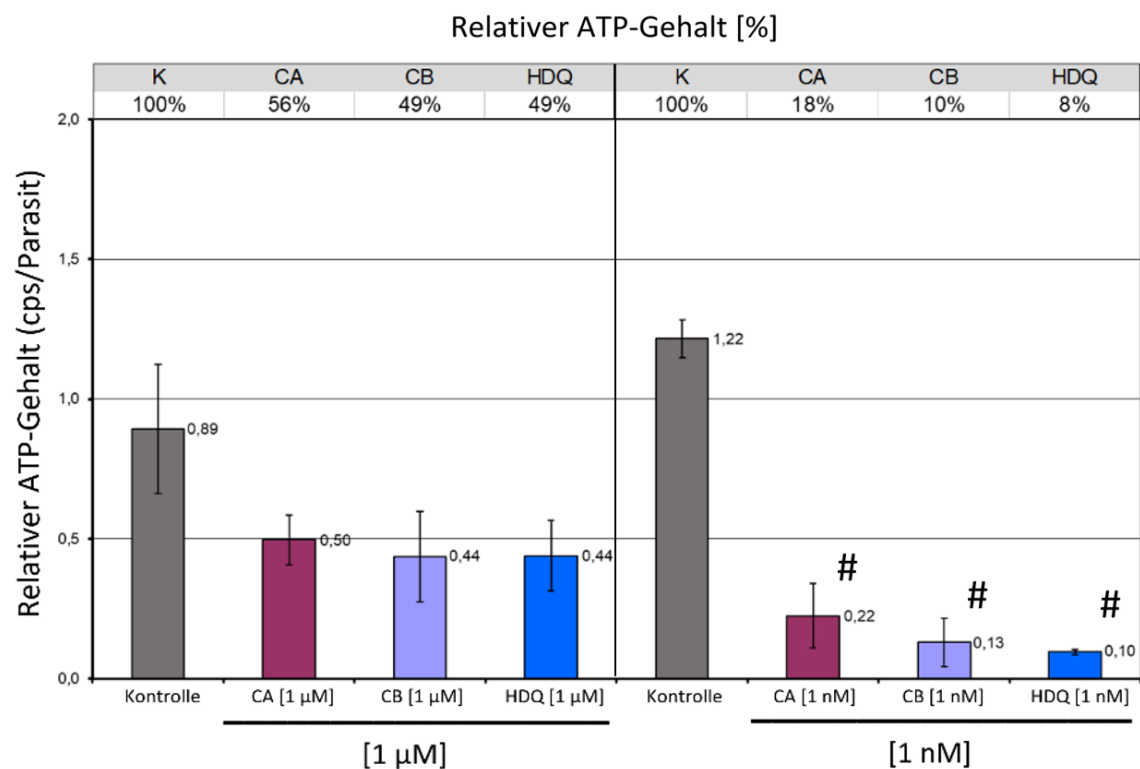
Der RH-Stamm zeigte unter Einfluss der 1-Hydroxychinolone CA, CB & HDQ eine deutliche Verminderung des ATP-Gehaltes für alle getesteten Konzentrationen von 1 nM und 1  $\mu$ M.

Dabei wies die niedrige Chinolonkonzentration (1 nM) einen deutlich größeren Einbruch des ATP-Gehalts aus, als die Hohe (1  $\mu$ M) und zeigte für alle getesteten Verbindungen einen signifikanten Unterschied gegenüber den unbehandelten Parasiten. Im Vergleich zur Kontrolle, deren Wert auf 100% gesetzt wurde, fiel der ATP-Gehalt der behandelten Parasiten auf 8 – 18%. Am stärksten senkte HDQ den ATP-Gehalt, wobei dieser auf 8% absank. Unter Einfluss von CA fiel der ATP-Gehalt auf 18%, die Ergebnisse von CB lagen dazwischen.



In der Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  konnte ebenfalls für alle Wirkstoffe eine Verminderung des ATP-Gehaltes gemessen werden. So wiesen die behandelten Parasiten im Vergleich zur Kontrolle ein um etwa 50% reduziertes ATP-Level auf. Alle getesteten 1-Hydroxychinolone lagen hierbei auf einem vergleichbaren Wirkungsniveau (Tab. 15). In Beschau der Arbeit von Lin et al. (2009) konnte für HDQ eine Verminderung des ATP-Gehaltes in der Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  bestätigt werden.<sup>45</sup>

Tab. 15: Relativer ATP-Gehalt des RH-Stammes unter den Wirkstoffen CA, CB & HDQ



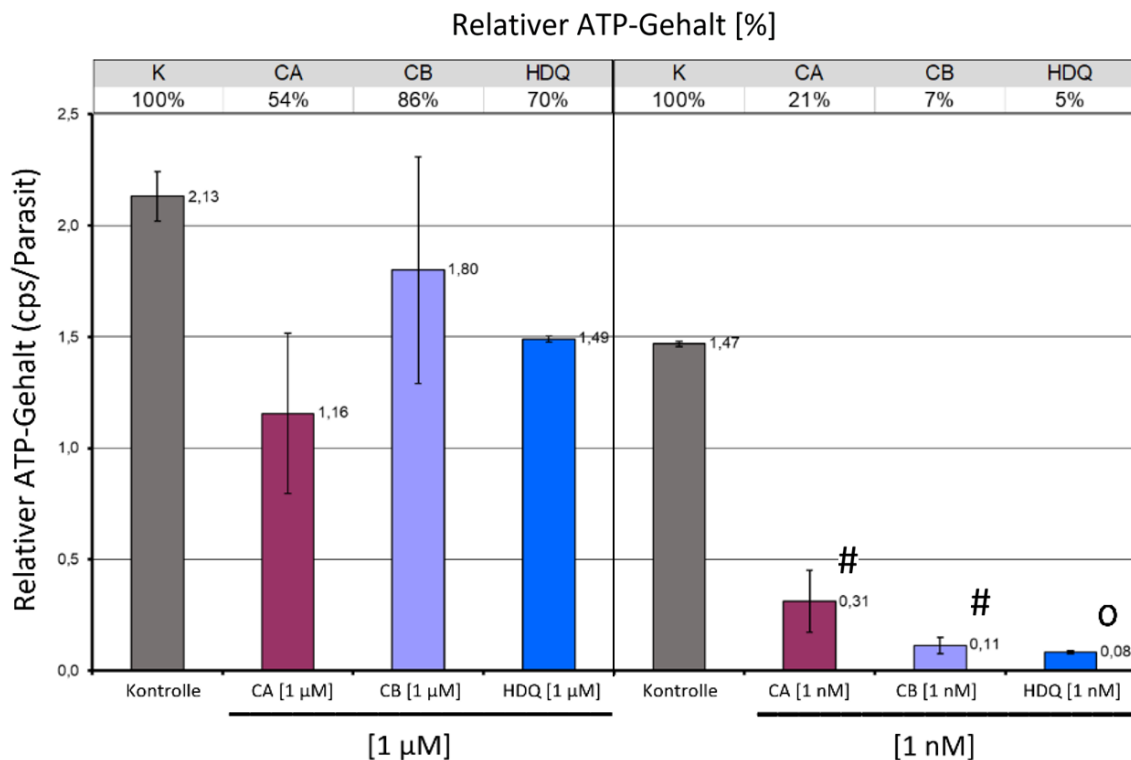
Auf der linken Seite der X-Achse (s. Trennstrich) werden die Kontrolle des RH-Stammes sowie nachfolgend die drei mit Wirkstoffen versetzten RH-Parasiten in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  dargestellt. Auf der rechten Seite der X-Achse sind die Versuche mit der Konzentration von 1 nM abgebildet. Die Y-Achse zeigt den relativen ATP-Gehalt pro Parasit. Die im Luminometer gemessene Lichtemission pro Parasit wird dabei in counts per second (cps) angegeben. Auf der sekundären horizontalen Achse wird zwecks besserer Vergleichbarkeit der relative ATP-Gehalt in Prozent angegeben, wobei die Kontrolle als Bezugswert auf 100% gesetzt wurde. Alle Versuche wurden für jeden Wirkstoff und jede Konzentration in Doppelbestimmung durchgeführt, wobei anschließend Mittelwerte  $\pm$  SD gebildet wurden. Bei allen getesteten Verbindungen bestand in der Konzentration von 1 nM ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle; entsprechende Balken wurden mit „#“ gekennzeichnet.

<sup>45</sup> Lin et al. (2009) konnten anhand des RH-Stammes unter Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  HDQ im *in-vitro*-Versuch ein um 70% niedrigeres ATP-Level im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachweisen.

### 3.2.3 Verminderung des relativen ATP-Gehaltes von RH/ $\Delta uprt$ durch CA, CB & HDQ

Auch bei RH/ $\Delta uprt$  konnte der ATP-Gehalt unter Einfluss der 1-Hydroxychinolone in allen Fällen gesenkt werden. Dabei wies die niedrigere Konzentration (1 nM) den stärker senkenden Effekt aus, was ebenfalls beim RH-Stamm beobachtet wurde (s. o.). So fiel der ATP-Gehalt bei Zugabe von 1 nM der Verbindungen auf 5 – 21% (verglichen mit der auf 100% gesetzten Kontrolle), wohingegen unter 1  $\mu$ M das ATP-Level von RH/ $\Delta uprt$  deutlich weniger stark gesenkt wurde (s. Tab. 16).

Tab. 16: Relativer ATP-Gehalt von RH/ $\Delta uprt$  unter den Wirkstoffen CA, CB & HDQ



Auf der linken Seite der X-Achse (s. Trennstrich) werden die Kontrolle des RH/ $\Delta uprt$ -Stammes sowie nachfolgend die drei mit Wirkstoffen versetzten Parasiten-Gruppen in einer Konzentration von 1  $\mu$ M dargestellt. Auf der rechten Seite der X-Achse werden die Versuche mit der Konzentration von 1 nM abgebildet. Die Y-Achse zeigt den relativen ATP-Gehalt pro Parasit. Die im Luminometer gemessene Lichtemission pro Parasit wird dabei in counts per second (cps) angegeben. Auf der sekundären horizontalen Achse wird der relative ATP-Gehalt in Prozent angegeben, wobei die Kontrolle als Bezugswert auf 100% gesetzt wurde. Alle Versuche wurden für jeden Wirkstoff und jede Konzentration in Doppelbestimmung durchgeführt, wobei anschließend Mittelwerte  $\pm$  SD gebildet wurden. Bei allen getesteten Verbindungen bestand in der Konzentration von 1 nM ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle; entsprechende Balken wurden mit „#“ gekennzeichnet; bei hoher Signifikanz wurde „o“ verwendet.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass der ATP-Gehalt der RH/ $\Delta uprt$ -Parasiten vergleichbar stark wie der vom Wildtyp RH gesenkt wurde. Dies entsprach nicht den Erwartungen. Aufgrund mehrerer Beeinflussungen der Stoffwechselprozesse von RH/ $\Delta uprt$  war unter Einfluss der 1-Hydroxychinolone ein stärkeres Abweichen des ATP-Gehaltes zu erwarten, als beim Wildtyp RH. RH/ $\Delta uprt$  kann durch eine Deletion der UPRT UMP nicht über den *salvage pathway* synthetisieren (vgl. Kap. 1.7). Da UMP essentiell für die Pyrimidinbiosynthese ist, muss die Mutante das Molekül über den noch verbleibenden Stoffwechselweg durch die Pyrimidin-*de-novo*-Synthese herstellen, was einen ungleich höheren Energiebedarf fordert. Ferner wurde für die Verbindungen nachgewiesen, dass sie ebenfalls in die Pyrimidin-*de-novo*-Synthese eingreifen, indem sie mit der DHODH interagieren (Hegewald et al. 2013).<sup>46</sup> Hierdurch lassen sich zusätzliche Einschränkungen in der oxidativen Phosphorylierung annehmen, da die DHODH ubichinonvermittelt Elektronen zum dritten Komplex der Atmungskette schleust und somit der Elektronenfluss beeinträchtigt wird (vgl. Kap. 1.5 und 1.7).

Auch das Ergebnis des relativen ATP-Gehaltes der Kontrollgruppe überraschte. Beim Vergleich der Tabellen 15 und 16 fällt auf, dass RH/ $\Delta uprt$  in der unbehandelten Probe einen höheren relativen ATP-Gehalt aufweist als der RH-Stamm und dies trotz der o. g. Einschränkungen in der Pyrimidinbiosynthese und der Berücksichtigung der Standardabweichung. Eine mögliche Erklärung hierfür wird in der Diskussion (s. Kap. 4.2.4) thematisiert. Vorausgreifend sei hier angeführt, dass RH/ $\Delta uprt$  über die Atmungskette mehr von dem universalen Energieträger ATP synthetisieren könnte, um so einen höheren Bedarf abzudecken, welcher durch die Notwendigkeit entsteht, die energetisch ineffizientere Pyrimidin-*de-novo*-Synthese nutzen zu müssen. Hierfür spricht, dass die Mutante im Wachstumstest eine Hypersensibilität (24 h p. i.) gegenüber CA, CB & HDQ aufweist, welche allesamt eine Reduktion des ATP-Levels nach sich ziehen. Der Effekt der 1-Hydroxychinoline wirkt sich somit theoretisch stärker auf den Stoffwechsel von RH/ $\Delta uprt$  aus, da ein ATP-Mangel weniger gut kompensiert werden kann.

---

<sup>46</sup> Der Nachweis erfolgte für die Verbindungen CB & HDQ.

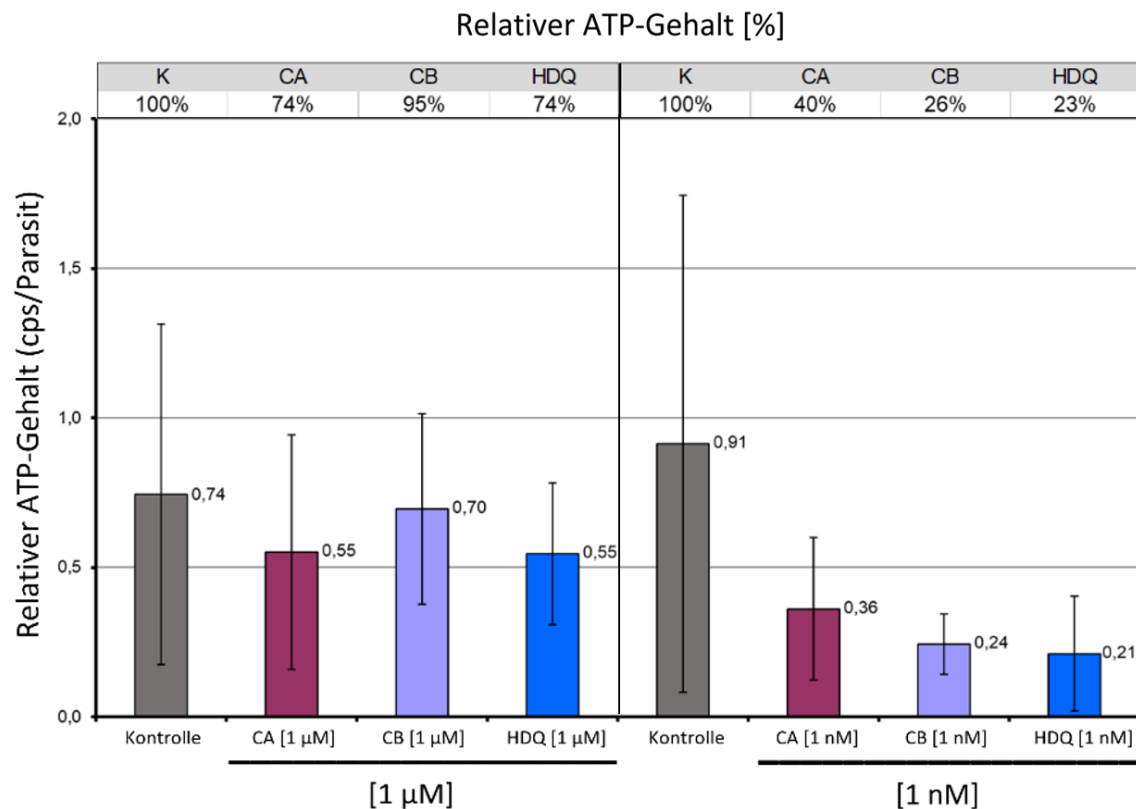
### 3.2.4 Verminderung des ATP-Gehaltes von RH/ $\Delta scs$ durch CA, CB & HDQ

Bei RH/ $\Delta scs$  handelt es sich um eine Deletionsmutante der SCS. Dies ist das sechste Enzym des Citratzyklus, welches die Reaktion vom Substrat Succinyl-CoA zum Produkt Succinat katalysiert. Die freiwerdende Energie, die bei der Spaltung von Succinyl-CoA entsteht, wird wiederum zur Bildung von energiereichen Verbindungen genutzt. Dadurch, dass Succinat in der Reaktionskette des Citratzyklus fehlt, können wichtige Folgereaktionen nicht oder nur eingeschränkt stattfinden. So entfällt u. a. die Phosphorylierung von ADP und GDP zu den energiereichen Formen ATP und GTP und das Coenzym FAD kann nicht als Elektronenakzeptor in seine reduzierte Form FADH<sub>2</sub> übergehen, was üblicherweise beim Reaktionsschritt von Succinat zu Fumarat katalysiert wird.

Durch diese Beeinflussung des Stoffwechsels konnten Fleige et al. (2008) für RH/ $\Delta scs$  in der Zellkultur eine um 30% reduzierte Wachstumsrate gegenüber dem Wildtyp RH nachweisen. Diese zeigte sich reversibel, wenn 2  $\mu$ M Succinat, also das durch die Ausschaltung der SCS entfallende Produkt, *T. gondii* über das Nährmedium wieder zugeführt wurde. Obwohl die Mutante also eine verminderte Replikationsrate zeigt, ist ein vollständiger Citratzyklus für die *in-vitro* Kultivierung des Parasiten nicht essentiell.

Für RH/ $\Delta scs$  wurde wegen der oben beschriebenen Einschränkung im Citratzyklus ein niedrigeres ATP-Level als für den RH-Stamm erwartet. Dies bestätigte sich für die unbehandelte Kontrolle. RH/ $\Delta scs$  wies im Vergleich zum RH-Stamm einen um 17% verringerten ATP-Gehalt als Basiswert auf. Unter Behandlung mit den 1-Hydroxychinolonen CA, CB & HDQ konnte in den getesteten Konzentrationen 1 nM und 1  $\mu$ M ein Abfall des ATP-Gehaltes festgestellt werden (Tab. 17).

Dabei verhielt sich bei Betrachtung der vorangegangenen Versuche gleich, dass der ATP-Gehalt in der niedrigeren Wirkstoffkonzentration stärker gesenkt werden konnte, als in der hohen. Auch der Effekt auf das ATP-Level war für alle drei getesteten Substanzen vergleichbar. Unter 1 nM konnte das ATP-Level je nach Verbindung auf 23 – 40% gesenkt werden (dabei entspricht die Kontrolle dem Bezugswert 100%). Bei der Konzentration von 1  $\mu$ M fiel die Verminderung (74 – 95%) deutlich geringer aus und war in Anbetracht der Standardabweichung nicht signifikant.

Tab. 17: Relativer ATP-Gehalt von RH/ $\Delta scs$  unter den Wirkstoffen CA, CB & HDQ

Auf der linken Seite der X-Achse werden die Kontrolle des RH/ $\Delta scs$ -Stammes sowie nachfolgend die drei mit Wirkstoffen versetzten Parasiten-Gruppen in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  dargestellt. Auf der rechten Seite der X-Achse werden die Versuche mit der Konzentration von 1 nM abgebildet. Die Y-Achse zeigt den relativen ATP-Gehalt pro Parasit. Die im Luminometer gemessene Lichtemission pro Parasit wird dabei in counts per second (cps) angegeben. Auf der sekundären horizontalen Achse wird der relative ATP-Gehalt in Prozent angegeben, wobei die Kontrolle als Bezugswert auf 100% gesetzt wurde. Alle Versuche wurden für jeden Wirkstoff und jede Konzentration in Doppelbestimmung durchgeführt, wobei anschließend Mittelwerte  $\pm$  SD gebildet wurden.

Abschließend ist festzustellen, dass RH/ $\Delta scs$  in den behandelten Proben, von allen getesteten Stämmen, den prozentual am geringsten senkenden Effekt auf den ATP-Gehalt aufwies. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass RH/ $\Delta scs$ , verglichen mit dem RH-Stamm, eine um 30% geringere Teilungsaktivität aufweist (Fleige et al. 2008) und der ATP-Verbrauch somit insgesamt niedriger ausfällt.

### 3.3 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ )

Für die untersuchten 1-Hydroxychinolone bestätigte sich in den vorangegangenen Versuchen sowohl eine wachstumsinhibierende Wirkung, als auch eine Verminderung des ATP-Gehalts von *T. gondii* (vgl. Kap. 3.1 und 3.2). Weiter war von Interesse, wie sich die Substanzen auf das Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) der MM auswirken, da diese als Indikator für die Funktionalität der Atmungskette angesehen werden kann.

Im Inneren der MM wird ein negatives  $\Delta\Psi_m$  durch einen elektrochemischen Protonengradienten erzeugt, indem Protonen aus dem Matrixraum in den intermembranösen Raum des Mitochondriums gepumpt werden. Durch die Potentialdifferenz wird somit die Außenseite der Membran positiv geladen. Um die Protonen in den intermembranösen Raum, entgegen dem elektrochemischen Gradienten, zu befördern, ist eine komplexe Abfolge biochemischer Redoxreaktionen notwendig, die innerhalb der Atmungskette ablaufen. Durch den Rückstrom der Protonen kann an deren Ende durch oxidative Phosphorylierung die energiereiche Verbindung ATP synthetisiert werden. Ein intaktes Membranpotential ist somit maßgeblich für die Funktionalität der Atmungskette.

Da 1-Hydroxychinolone die NDH-2 (vgl. Kap. 1.6) von *T. gondii* durch kompetitive Inhibition beeinträchtigen (Lin et al. 2008) und außerdem die DHODH inhibieren (Hegewald et al. 2013), welche ebenfalls ubiquinonvermittelt Elektronen zur Atmungskette leitet (Fang et al. 2013; Hortua Triana et al. 2016), wurde unter Einfluss von CA und CB eine Änderung des  $\Delta\Psi_m$  erwartet. Lin et al. (2009) konnten dies zuvor für HDQ bestätigen.

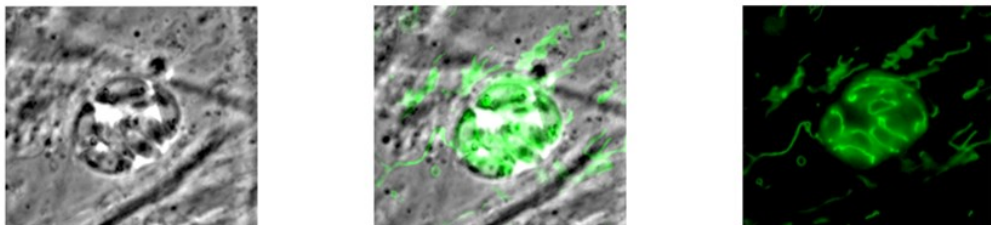
Für den Versuch wurden der RH-Stamm sowie die Mutante RH/ $\Delta_{scs}$  untersucht. Für ersteren Stamm wurden die Verbindungen CA, CB & HDQ, für RH/ $\Delta_{scs}$  nur CA auf seinen Effekt auf das  $\Delta\Psi_m$  getestet. Es wurden die Konzentrationen von 1 nM und 100 nM gewählt, die Auswertung erfolgte 1 h, 24 h und 48 h, nachdem die Verbindungen hinzugefügt wurden.

In der Versuchsvorbereitung wurden im ersten Schritt HFF, die sich konfluent am Glasboden von schwarzen 24-Well-Platten befanden, mit Parasiten infiziert. Nach 24 h wurden die Verbindungen in den Konzentrationen 1 nM und 100 nM dazupipettiert. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich bei einer angenommenen durchschnittlichen Replikationsrate von *T. gondii* 8 bis 16 Parasiten in einer PV.

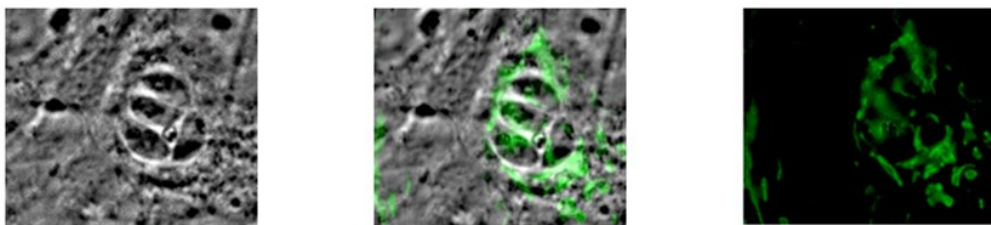
Nach 1 h, 24 h und 48 h p. i. erfolgte die Bestimmung des  $\Delta\Psi_m$  mit Hilfe der Zugabe von DiOC<sub>6</sub> (3,3'-Dihexyloxycarbocyanin-Iodid), einem fluoreszierenden grünen Farbstoff. Dank seiner lipophilen Struktur weist DiOC<sub>6</sub> eine hohe Permeabilität für Zellmembranen auf und kann sich durch seine positiv geladenen Eigenschaften an der intakten, negativ geladenen MM anreichern. Abschließend wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert (s. Abb. 11), wobei je Wirkstoff und Konzentration 100 PV beurteilt wurden.

Die intrazellulären Parasiten wurden daraufhin untersucht, ob ein  $\Delta\Psi_m$  durch Anfärbung der MM vorhanden war oder nicht, was somit zwei mögliche Zustände erlaubte. Wurde das Potential nachgewiesen, wird im Folgenden von einem intakten  $\Delta\Psi_m$  gesprochen. Fehlte eine Anfärbung der MM, wird von einem zusammengebrochenen  $\Delta\Psi_m$  gesprochen. Für jeden Wirkstoff und jede Konzentration wurden zwei Versuche durchgeführt und anschließend der Mittelwert gebildet. Außerdem wurde bei jedem Versuch eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt.

A



B

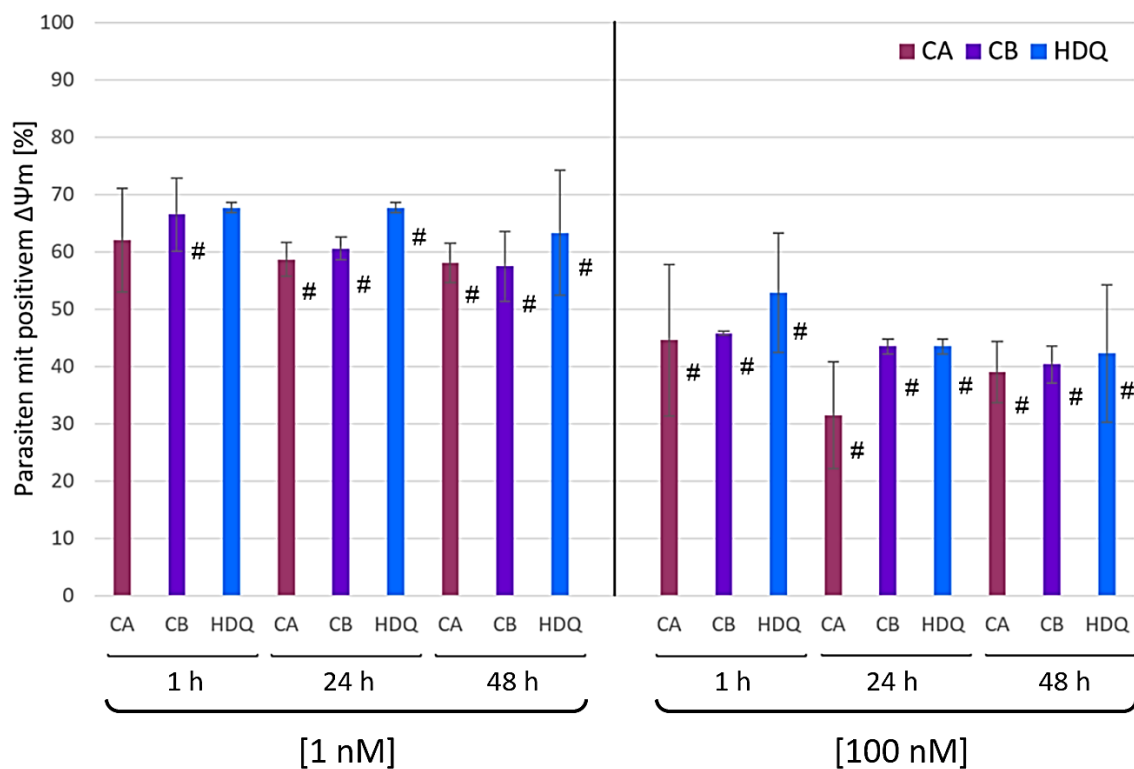


**Abb. 11: Darstellung des Membranpotentials mittels DiOC<sub>6</sub>.** In den Abbildungen wird links unter A und B jeweils eine exemplarische Parasitophore Vakuole (PV) im Phasenkontrastmikroskop dargestellt. In den Abbildungen rechts außen erfolgt unter A und B die alleinige Darstellung dieser PV mittels DiOC<sub>6</sub> (3,3'-Dihexyloxycarbocyanin-Iodid), einem fluoreszierenden Farbstoff, der sich u. a. an die Mitochondrienmembran (MM) anhaftet. Mittig ist in A und B die Übereinanderlagerung des rechten und linken Bildes dargestellt. Werden die beiden Bilder rechts außen verglichen, kann im oberen festgestellt werden, dass eine kräftige Anfärbung der MM erfolgte, was für ein intaktes Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) spricht. Im unteren rechten Bild hingegen blieb diese aus, weshalb das  $\Delta\Psi_m$  als zusammengebrochen gewertet wurde.

### 3.3.1 1-Hydroxychinolone führen zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials von Genotyp-I-Parasiten des RH-Stammes

In unbehandelten Kontrollen variierte der Anteil der Parasiten mit intaktem  $\Delta\Psi_m$  im Vergleich der biologischen Replikate relativ stark und lag zwischen 60% und 80%. Dies ist vermutlich auf die unterschiedliche Vitalität der Parasiten zum Zeitpunkt der Infektion zurückzuführen, die sich schwer standardisieren lässt. Technische Replikate innerhalb eines Versuches zeigten dagegen kaum Variabilitäten.

Tab. 18: Auswirkungen auf das Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) des RH-Stammes durch die Wirkstoffe CA, CB & HDQ



Die Tabelle stellt in der ersten Reihe der X-Achse die Verbindungen dar, mit denen der RH-Stamm behandelt wurde. In zweiter Reihe der X-Achse wird die Inkubationszeit der Verbindungen und in dritter deren Konzentration angezeigt. Auf der Y-Achse werden prozentual die Parasiten angegeben, bei denen eine typische Anfärbung der Mitochondrienmembran (MM) beobachtet und deren  $\Delta\Psi_m$  als intakt gewertet wurde. Als 100%-Wert diente das Ergebnis der unbehandelten Kontrolle. In der linken Hälfte der Tabelle (s. vertikaler Trennstrich) wurde für alle getesteten Verbindungen, unter einer Konzentration von 1 nM, das  $\Delta\Psi_m$  in nur noch etwa 60% der Fälle als intakt gewertet. Auf der rechten Seite (unter 100 nM) fiel dieser Anteil auf etwa 40% ab. Für jede Verbindung und jede Konzentration wurden zwei Versuche durchgeführt und anschließend der Mittelwert  $\pm$  SD gebildet. Beinahe alle Untersuchungsergebnisse zeigten signifikante Unterschiede und wurden entsprechend mit „#“ rechts neben dem Balken gekennzeichnet.



Um Versuche, die zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurden, vergleichen zu können, wurden die biologischen Replikate normalisiert und die unbehandelte Kontrolle jeweils als 100%-Wert festgelegt. Der jeweils gleiche Normalisierungsfaktor wurde dann für die mit den Wirkstoffen behandelten Proben verwendet.

Die Wirkstoffe zeigten im Versuch mit dem RH-Stamm in beinahe allen Konzentrationen eine signifikante Verminderung des Anteils der Parasiten mit intaktem  $\Delta\Psi_m$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle (s. Tab. 18).

In der Konzentration von 1 nM wiesen im Mittel nur noch etwa 60% der Toxoplasmen ein intaktes  $\Delta\Psi_m$  auf, wenn als Referenz die Kontrolle als 100%-Wert festgelegt wurde. In der Konzentration von 100 nM zeigt sich ein noch stärkerer Effekt; ein intaktes  $\Delta\Psi_m$  konnten hier im Mittel nur 40% der Parasiten des RH-Stammes aufweisen.

Die Inkubationszeit von 1 h, 24 h und 48 h spielte dabei in beiden untersuchten Konzentrationen kaum eine Rolle. Auch im Langzeitversuch blieb die Anzahl der als intakt gewerteten  $\Delta\Psi_m$  nahezu konstant, was die Beobachtungen von Sternisek (2009) bestätigt. Der Effekt, den die Verbindungen (CA, CB & HDQ) auf das  $\Delta\Psi_m$  ausübten, war dabei auf einem ähnlichen Niveau. Allenfalls in der niedrigen Konzentration von 1 nM konnten differierende Tendenzen beobachtet werden, da bei CA & CB die Anzahl der Mitochondrien, die mit einem zusammengebrochenen  $\Delta\Psi_m$  gewertet wurden etwas höher ausfiel als bei HDQ.

### **3.3.2 1-Hydroxychinolone führen zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials von RH/ $\Delta scs$**

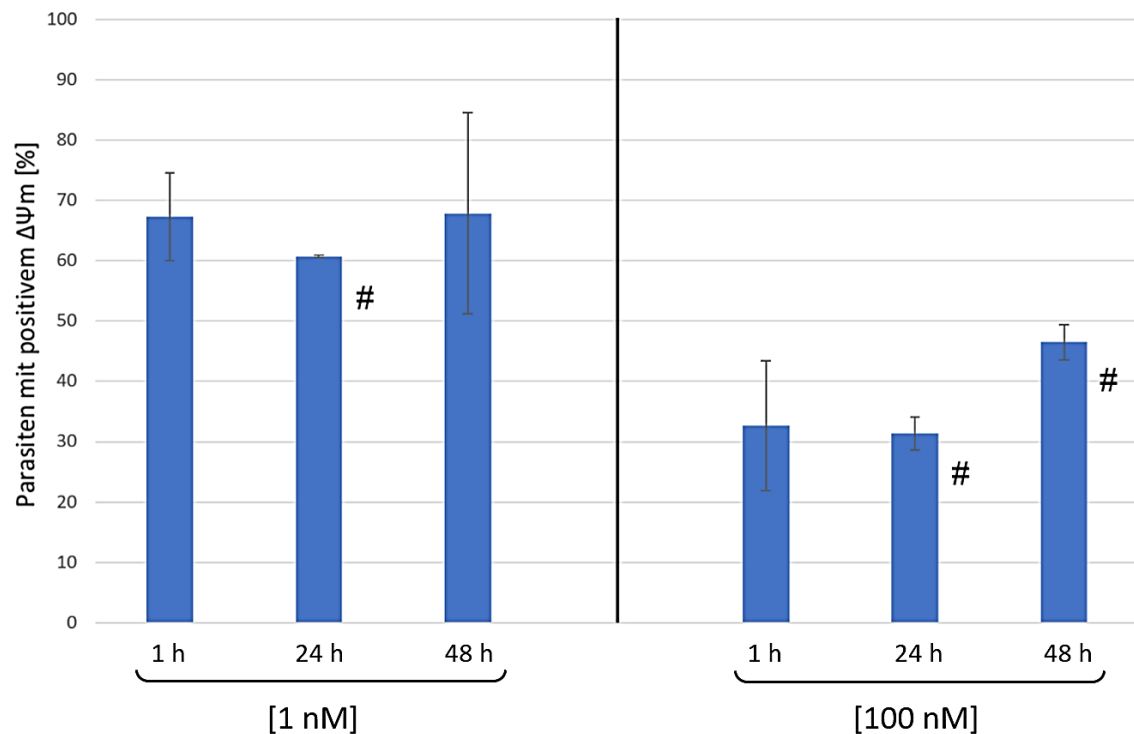
Bei RH/ $\Delta scs$  handelt es sich um eine Deletionsmutante der SCS (s. Kap. 2.1.5). Im Versuch wurde ausschließlich das 1-Hydroxychinolon CA getestet, die Inkubationszeiten betragen 1 h, 24 h und 48 h.

Das  $\Delta\Psi_m$  von RH/ $\Delta scs$  konnte unbehandelt ähnlich oft als intakt gewertet werden wie die unbehandelte Kontrolle des RH-Stammes (s. Tab. 19), was die Untersuchungsergebnisse von Fleige et al. (2008) bestätigt.

Unter Inkubation mit CA fiel die Anzahl der  $\Delta\Psi_m$ , die als intakt gewertet wurden, besonders in der hohen Chinolonkonzentration von 100 nM, überwiegend signifikant. Dabei ließ die Inkubationszeit mit dem Wirkstoff keinen wesentlichen Unterschied auf den Effekt erkennen.

In der niedrigen Wirkstoffkonzentration von 1 nM wiesen ungefähr 60 – 70% der Parasiten ein intaktes  $\Delta\Psi_m$  auf. In der hohen Konzentration von 100 nM fiel dieser Anteil auf etwa 30 – 50% (s. Tab. 19). Insgesamt waren unter Einfluss von CA die Effekte auf das  $\Delta\Psi_m$  von RH/ $\Delta scs$  und den RH-Stamm auf vergleichbarem Niveau.

**Tab. 19: Auswirkungen auf das Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) von RH/ $\Delta scs$  durch CA**



Die Tabelle stellt in der ersten Reihe der X-Achse die Inkubationszeit von CA und in zweiter dessen Konzentration dar. Auf der Y-Achse werden prozentual die Parasiten angegeben, bei denen eine typische Anfärbung der Mitochondrienmembran (MM) beobachtet und deren  $\Delta\Psi_m$  als intakt gewertet wurde. Als 100%-Wert diente das Ergebnis der unbehandelten Kontrolle. In der linken Hälfte der Tabelle (s. vertikaler Trennstrich) wurde unter einer Konzentration von 1 nM das  $\Delta\Psi_m$  nur noch in etwa 60 – 70% der Fälle als intakt gewertet. Unter 100 nM (rechte Hälfte der Tabelle) fiel dieser Anteil auf etwa 30– 50% ab. Für jeden Wirkstoff und jede Konzentration wurden zwei Versuche durchgeführt und anschließend der Mittelwert  $\pm$  SD gebildet. Signifikante Unterschiede wurden entsprechend mit „#“ rechts neben dem Balken gekennzeichnet.

## 4 Diskussion

### 4.1 *Compound A & B* als potente Wachstumsinhibitoren des Genotyp-I-Parasiten *Toxoplasma gondii*

CA & CB, zwei Verbindungen auf Basis der Substanz HDQ, zeigten *in vitro* im Zähltest eine signifikante Abnahme der Replikationsrate von *T. gondii*-Genotyp-I-Parasiten. Zusätzlich konnte unter deren Zugabe ein parasitostatischer Effekt beobachtet werden.

Ausgehend von HDQ, dessen  $IC_{50}$  (vgl. Kap. 2.2.2.2) 24 h p. i. mit  $4 \text{ nm} \pm \text{SD}$  (Saleh et al. 2007) respektive  $5,7 \text{ nm} \pm \text{SD}$  (Naujoks 2008) bestimmt wurde, erfolgte auch die Testung der neuen *Compounds* (CA, CB, CC & CD) zunächst mit den Konzentrationen 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1  $\mu\text{M}$ . Bereits in ersten Auszählungen zeichnete sich ab, dass CA & CB eine deutlich niedrigere  $IC_{50}$  als HDQ aufweisen würden. Deshalb wurden zusätzlich die Konzentrationen 0,1 nM, 0,3 nM und 0,7 nM gewählt, welche es ermöglichten, die  $IC_{50}$  genauer zu bestimmen und die Funktion exakter in einem Konzentrations-/Wirkungsgraphen abzubilden. CC & CD zeigten kaum inhibitorische Potenz und werden am Ende dieses Kapitels separat besprochen.

Für den RH-Stamm ergab sich für CA 24 h p. i. eine  $IC_{50}$  von  $0,4 \text{ nm} \pm \text{SD}$ , was im Vergleich zu HDQ, dessen  $IC_{50}$  in dieser Arbeit mit  $4,2 \text{ nm} \pm \text{SD}$  bestimmt wurde, eine Zehnerpotenz geringer war (vgl. Kap. 3.1.1, Abb. 6 und 8). CB zeigte ebenfalls eine höhere inhibitorische Potenz als HDQ und wies eine  $IC_{50}$  von  $0,7 \text{ nm} \pm \text{SD}$  auf (s. Abb. 7). Eine  $IC_{50} < 1 \text{ nm}$  kann in Anbetracht gängiger Arzneimittelkonzentrationen als äußerst niedrig erachtet werden, was besonders im Hinblick auf Toxizitätsbedenken von Bedeutung ist. Die  $IC_{50}$  für HDQ lag im Bereich der gemessenen Werte von Saleh et al. (2007) und Naujoks (2008) und konnte somit dessen inhibitorische Wirkung auf den Genotyp-I-Parasiten RH bestätigen.

Im Langzeitversuch  $> 24 \text{ h}$  setzte sich die Überlegenheit von CA & CB gegenüber HDQ fort. Hierbei wurden die Konzentrationen von 1 nM, 10 nM, 100 nM und 1  $\mu\text{M}$  zunächst mit einer Inkubationszeit von 48 h untersucht. Bei den Proben mit den niedrigen Konzentrationen von 1 nM und 10 nM setzte die partielle Lyse (vgl. Kap. 2.2.2.1) bei den mit HDQ behandelten Wirtszellen bereits wesentlich früher ein, als bei CA & CB. Diese zeigten im Vergleich zusätzlich eine deutlich niedrigere Replikationsrate des Parasiten in den hohen

Konzentrationen von 100 nM und 1  $\mu$ M (vgl. Kap. 3.1.3, Tab. 13). Im Langzeitversuch über 72 h und 96 h wiesen CA & CB in den Konzentrationen von 100 nM und 1  $\mu$ M weiter eine starke wachstumsinhibitorische Wirkung auf<sup>47</sup>, wobei die durchschnittliche ( $\bar{\emptyset}$ ) Parasitenanzahl (PA) pro Parasitophorer Vakuole (PV) – PA/PV – nahezu konstant blieb (s. Kap. 3.1.3, Tab. 14).

In Zusammenschau der Ergebnisse ließ sich für CA & CB eine starke Inhibition des Genotyp-I-Parasiten RH feststellen. Für CA zeigte sich für die hohen Konzentrationen von 100 nM und 1  $\mu$ M bereits 24 h p. i., dass im Mittel 41% bzw. 45% der Toxoplasmen keine Teilungsaktivität mehr aufwiesen; bei CB 35% bzw. 38%. Durchschnittlich ließen sich bei beiden Verbindungen in genannter Konzentration und Zeit 1,6 PA/PV zählen, die unbehandelte Kontrolle teilte sich im selben Zeitraum etwa dreimal ( $\cong \bar{\emptyset}$  7,52 PA/PV). Weiterhin ließen sich 48 h p. i.  $\bar{\emptyset}$  2,2 PA/PV zählen, 72 h p. i.  $\bar{\emptyset}$  3,2 PA/PV und 96 h p. i.  $\bar{\emptyset}$  3,5 PA/PV. Die unbehandelte Kontrolle wies bereits 48 h p. i. eine partielle Wirtszellyse auf, unter der die PV folglich mit etwa 32 – 64 Parasiten rupturierte. Werden die durchschnittlichen PA/PV im Langzeitversuch (24 – 96 h) betrachtet, wird deutlich, dass die durchschnittliche Zunahme der Parasitenzahl unter den hohen Konzentrationen von CA & CB (100 nM und 1  $\mu$ M) insgesamt erheblich gehemmt war. Dies war besonders eindrücklich im Zeitraum von 72 h auf 96 h p. i., da die Anzahl nur um  $\bar{\emptyset}$  +0,3 PA/PV zunahm. Für einen Parasiten, der sich unter Wildbedingungen alle 6 – 9 h exponentiell teilt, kann in diesem Fall von einem Zustand der Stase gesprochen, ferner gar eine parasitizide Wirkung diskutiert werden. Aufgrund der zunehmenden Verunreinigungen im Langzeitversuch (Zelltrümmer, partielle Lyse) war eine weitere Ausdehnung der Zeitachse mit der Methode eines Zähltests jedoch nicht geeignet. Eine Möglichkeit den Versuch auszudehnen wäre das Transferieren der Parasiten auf neue HFF, um die weiteren Langzeitfolgen unter dem Einfluss der 1-Hydroxychinolone zu erforschen.

Die Zunahmen der durchschnittlichen PA/PV unter Einfluss von CA & CB in den Konzentrationen von 100 nM und 1  $\mu$ M ließ im Langzeitversuch auf eine durchgehend effektive Wachstumsinhibierung schließen. Dies zeichnete sich über die vollen vier Versuchstage ab (Tab. 20). Interessant war allerdings, dass die durchschnittliche Zunahme der Parasitenzahl in den ersten beiden Tagen auf konstant niedrigem Niveau war, dann nach 48 h p. i. leicht zunahm (+1,0 PA/PV) und innerhalb der letzten 24 h wieder deutlich abfiel (+0,3 PA/PV).

---

<sup>47</sup> In den Konzentrationen von 1 nM und 10 nM trat sowohl 72 h p. i., als auch 96 h p. i. partielle Lyse auf.

**Tab. 20: Durchschnittliche Zunahme der Parasitenanzahl über die Zeitachse unter dem Einfluss von CA & CB in den Konzentrationen von 100 nM und 1  $\mu$ M**

Zeitraum	Durchschnittliche Zunahme der Parasiten pro Vakuole <sup>48</sup>
0 h $\rightarrow$ 24 h	+0,6 PA/PV*
24 h $\rightarrow$ 48 h	+0,6 PA/PV*
48 h $\rightarrow$ 72 h	+1,0 PA/PV*
72 h $\rightarrow$ 96 h	+0,3 PA/PV*

\*PA = Parasitenanzahl, PV = Parasitophore Vakuole

Diese Beobachtung der Zu- und Abnahme der Replikationsrate lässt folgende theoretische Erklärungsansätze zu:

Eine Möglichkeit für die wechselnde Teilungsaktivität ist das Hinausschleusen der Verbindungen aus dem Mitochondrium in das Zytosol mit Hilfe von Carriern. Mitochondrien verfügen über eine Vielzahl von Transportsystemen sowohl auf der inneren als auch äußeren Membran, deren Synthese und Einbau auch zusätzlich erfolgen kann, um die physiologischen Stoffwechselwege der Zelle aufrechtzuerhalten. Im Hinblick auf die leichte Zunahme der Teilungsaktivität 48 h p. i. und der darauffolgenden, deutlichen Abnahme 72 h p. i. ist denkbar, dass *T. gondii* die Verbindungen zumindest vorübergehend mittels Transportproteinen aus dem Mitochondrium in das Zytosol der Zelle transportiert. So könnte der Parasit damit beginnen, den Hemmstoff mit der Aktivierung/Installierung von mitochondrialen Carriersystemen abzubauen, was die zunächst steigende Teilungsaktivität begünstigen kann. Der Energieaufwand dafür und die zusätzlich erfolgende, ressourcenintensive, eukaryotische Zellteilung könnten ausschlaggebend dafür sein, dass diese Kompensationsmechanismen durch ein kritisches Konzentrationslevel der 1-Hydroxychinolone erschöpflich sind und die Teilungsaktivität somit wieder abnimmt. Hinzu kommt, dass die Molekularstrukturen von CA & CB lipophil sind (vgl. Kap. 4.3) und so gegen ein stetig wachsendes Konzentrationsgefälle aus dem Mitochondrium (wahrscheinlich durch aktiven Transport) transportiert werden müssten. Wird angenommen, dass diese Transportsysteme ATP verbrauchen, so müsste der Parasit bei einer durch die 1-Hydroxychinolone gehemmten Atmungskette im Verlauf mehrerer Tage stetig weniger ATP aufweisen (sofern *T. gondii* nicht über andere wesentliche Wege verfügt, um ATP zu generieren, wie den Citratzyklus). Diese Hypothese stützend

<sup>48</sup> Ausgehend davon, dass zum Zeitpunkt der Infektion die Parasiten im Einzellstadium vorlagen und nach 24 h durchschnittlich 1,6 Parasiten pro Parasitophorer Vakuole gezählt wurden.

konnte in den Versuchen dieser Arbeit bereits ein signifikanter Abfall des ATP-Gehaltes 24 h p. i. für alle getesteten Verbindungen (unter einer Konzentration von 1 nM) gegenüber Genotyp-I-Parasiten des RH- und RH/ $\Delta uprt$ -Stammes festgestellt werden (vgl. Kap. 3.2.2). Sternisek (2009) legte dar, dass der RH-Stamm unter Behandlung mit 1  $\mu$ M HDQ von 24 h p. i. zu 48 h p. i. einen tendenziell abfallenden ATP-Gehalt zeigt.<sup>49</sup> Noch deutlicher war diese Tendenz für die Deletionsmutante RH/ $\Delta uprt$ . Somit kann eine Regeneration des ATP-Levels für den beobachteten Zeitraum nahezu ausgeschlossen werden.

Eine weitere Möglichkeit für *T. gondii*, den toxischen Einfluss der Chinolonverbindungen zu vermindern und seinen Zellstoffwechsel zu schützen, ist der biochemische Um- oder Abbau der Verbindungen. Dafür könnte die zunächst ansteigende Teilungsaktivität 24 h p. i. sprechen. Eher unwahrscheinlich lässt dies jedoch der darauffolgende Abfall der Replikationsrate ab dem 3. Tag p. i. erscheinen. *T. gondii* würde eine angenommene Metabolisierung der Verbindungen so zumindest nicht dauerhaft vollziehen, bzw. diese nicht abbauen, sondern lediglich temporär umbauen. Naujoks (2008) konnte für das chemisch strukturverwandte HDQ aufzeigen, dass eine alle 24 h durchgeführte erneute Wirkstoffzugabe (in einer Konzentration von 100 nM) die anfänglich effektive Wachstumsinhibierung nicht aufrechterhalten konnte und es 72 h p. i. zur Wirtszelllyse kam. Diese Beobachtungen lassen zwei Schlüsse zu: Zum einen ist eine Metabolisierung der Chinolonverbindungen äußerst unwahrscheinlich, da im Falle von HDQ eine erneute Zugabe zu keiner erneuten Hemmung führte (s. o.) und im Falle von CA & CB sogar eine andauernde Stase des Parasiten aufrechterhalten wurde. Zum anderen kann festgehalten werden, dass CA & CB im Vergleich zu HDQ nicht nur die potenteren Wachstumsinhibitoren sind, sondern zusätzlich eine Erholung der Replikationsrate vom RH-Stamm im Langzeitversuch unterbinden konnten<sup>50</sup> und es zu keiner Wirtszelllyse kam. Die Gründe für die Überlegenheit der Verbindungen können vielschichtig sein. Die neuen 1-Hydroxychinolone könnten im Gegensatz zu HDQ stärker auf die bisher bekannten Zielstrukturen wirken (Kap. 4.2.1 und 4.2.2; Kap. 1.6 und 1.7) oder zusätzlich noch weitere beeinflussen. Hier ist auch zu diskutieren, ob sie zusätzlich störend auf die Biogenese des Apicoplasten wirken, was zuletzt für mehrere verwandte Chinolonstrukturen nachgewiesen werden konnte (Kadri et al. 2014) und in Kapitel 4.3.2 erörtert wird.

---

<sup>49</sup> Die Unterschiede waren jedoch marginal und Sternisek beschrieb, dass diese auch aufgrund von Messungenauigkeiten entstanden sein können. Als 1-Hydroxychinolon wurde HDQ [1  $\mu$ M] untersucht.

<sup>50</sup> Im Langzeitversuch über 48 h kam es unter Behandlung mit HDQ deutlich früher zur Wirtszelllyse, als unter Einfluss von CA & CB in gleicher Konzentration.

Die Verbindungen CC & CD konnten im Wachstumszähltest 24 h p. i. allenfalls einen geringen, nicht signifikanten wachstumsinhibitorischen Effekt zeigen. Am deutlichsten konnte dieser bei CC in der hohen Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  beobachtet werden (s. Kap. 3.1.1, Abb. 9). Diese Ergebnisse waren jedoch ebenfalls aufschlussreich und werden im Kapitel 4.3 Struktur und Funktionsaspekte diskutiert.

## 4.2 Atmungskettenassoziierte Komponenten von *Toxoplasma gondii* als Angriffspunkt für Wirkstoffe

### 4.2.1 Die alternative NADH-Dehydrogenase als vielversprechender Angriffspunkt für 1-Hydroxychinolone

Der Nachweis der Funktionalität der Atmungskette in *T. gondii* wurde erstmals 1998 erbracht (Vercesi et al. 1998). Untersuchungsergebnisse wiesen auf die Präsenz der Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III) und der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) hin und legten nahe, dass der biochemische Reaktionsweg der oxidativen Phosphorylierung über die Atmungskette in *T. gondii* ähnlich abläuft, wie in Vertebratenzellen (Vercesi et al. 1998). Ferner konnte bestätigt werden, dass die ATP-Synthase in Apicomplexa als ATP-Generator aktiv sowie essentiell für dessen Lebenszyklus ist (Nina et al. 2011; Sturm et al. 2015). Als Beispiel für ein Medikament, welches auf die Atmungskette wirkt, wurde in der Einführung bereits Atovaquon angeführt (s. Kap. 1.6). Dieses hemmt selektiv den Elektronentransport in der mitochondrialen Atmungskette am Komplex III (Cytochrom-c-Oxidoreduktase; McFadden et al. 2000) und führt so u. a. zu einem Zusammenbruch des  $\Delta\Psi\text{m}$  (Mather et al. 2005; Srivastava et al. 1997; Fry und Pudney 1992) und einer signifikanten Inhibierung der Replikationsrate von *T. gondii* (Saleh et al. 2007).<sup>51</sup>

*T. gondii* verfügt statt des Komplex I der Atmungskette über eine alternative NADH-Dehydrogenase, NDH-2, die einen vielversprechenden Angriffspunkt für Wirkstoffe darstellt (Lin et al. 2008). Die NDH-2 konnte zuvor bereits in verschiedenen Pflanzen, Bakterien und Pilzen nachgewiesen werden (Eschemann et al. 2005; Kerscher et al. 2008; Melo et al. 2004). Sie wird im Falle von *T. gondii* von zwei Genen kodiert (Saleh et al. 2007<sup>52</sup>) und liegt dabei in zwei Isoformen (TgNDH2-I und TgNDH2-II) vor, welche mit ihrer aktiven Seite zur mitochondrialen Matrix ausgerichtet sind (Lin et al. 2011). Es stellte sich heraus, dass die Funktio-

---

<sup>51</sup> Saleh et al. (2007) bestimmten für Atovaquon einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 9 nM  $\pm$  SD.

<sup>52</sup> (Tgndh2-I [accession no. DQ211932]) und (Tgndh2-II [accession no. DQ228957]), unveröffentlicht.

nalität beider Isoformen für sich genommen nicht essentiell für *T. gondii* ist, jedoch das Ausschalten von TgNDH2-I oder TgNDH2-II eine Reduzierung der Wachstumsrate und des Membranpotentials der tachyzoiten Form des Parasiten bewirkte (Lin et al. 2011). Als hoch affiner NDH-2-Inhibitor konnte die Substanz HDQ in Enzymzähltests an *Yarrowia lipolytica*, einer Hefepilzart, die ebenfalls über eine alternative NADH-Dehydrogenase verfügt, identifiziert werden (Eschemann et al. 2005). Die Kinetik der NDH-2 unterliegt hierbei einem Pingpong-Mechanismus, was annehmen lässt, dass HDQ mit dem Chinon-Derivat Ubichinon aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit an derselben Bindungsstelle des Enzymkomplexes interagiert (Eschemann et al. 2005; Lin et al. 2008). Für die in dieser Arbeit verwendeten Verbindungen wird ein vergleichbarer Wirkungsmechanismus angenommen. Ubichinon ist ein Coenzym, welches in der Atmungskette zwischen den Komplexen I, II und III als Überträger von Elektronen und Protonen fungiert. Es kann sich dabei aufgrund seiner hydrophoben Isoprenoid-Seitenkette an und in Zellmembranen etablieren, was auch für die Doppellipidmembran der Mitochondrien gilt.

#### 4.2.2 Die Dihydroorotat-Dehydrogenase als weiterer Angriffspunkt für 1-Hydroxychinolone

Neben der Atmungskette konnte innerhalb der Pyrimidinbiosynthese die Dihydroorotat-Dehydrogenase (DHODH) als weitere Zielstruktur für 1-Hydroxychinolone ausgemacht werden (Hegewald et al. 2013).<sup>53</sup>

In der Pyrimidinbiosynthese ist das Nukleotid UMP ein wichtiges Zwischenprodukt, welches als Grundgerüst für die Synthese der Pyrimidinnukleotide Cytosin, Thymin und Uracil dient, die wiederum essentielle Bausteine für die Proteinbiosynthese sind. *T. gondii* verfügt wie Vertebratenzellen über zwei Synthesewege von UMP. Beide, sowohl die Synthese durch den *salvage pathway* (Iltzsch 1993) als auch die Pyrimidin-*de-novo*-Synthese (Schwartzmann und Pfefferkorn 1981), konnten früh im Parasiten als funktional identifiziert werden. Beim *salvage pathway* handelt es sich um einen energieeffizienten Weg der Biosynthese, der durch die Wiederverwertung bereits vorhandener Molekülgruppen (bspw. Basen und Nukleoside) gekennzeichnet ist. Die Pyrimidin-*de-novo*-Synthese (s. Kap. 1.7) erfordert einen ungleich höheren Energiebedarf zur Synthese von UMP und wird von der Zelle erst in zweiter Instanz angestrebt. Sie besteht aus sechs funktional nachgewiesenen Reaktionsschritten mit sechs beteiligten Enzymen (Asai et al. 1983; vgl. Kap. 1.7). Das vierte Enzym, nachfolgend von

---

<sup>53</sup> Der Nachweis erfolgte für die Verbindungen CB & HDQ und kann für CA angenommen werden.



Interesse, ist die DHODH, welche ubichinonvermittelt DHO zu Orotat oxidiert. Das Enzym kommt in zwei Formen, Typ-1 und Typ-2, vor (Hortua Triana et al. 2012). Typ-1 findet sich vorwiegend in Grampositiven Bakterien und Archaeen<sup>54</sup>. Typ-2 kommt in Eukaryonten und Gramnegativen Bakterien vor und ist an der inneren MM lokalisiert. Dabei entspricht die DHODH von *T. gondii* (wie die menschliche und die von *Plasmodium*) Typ-2 (Hortua Triana et al. 2016). Weiterhin interagiert die DHODH in Eukaryonten mit den Komplexen II und III der Atmungskette (Fang et al. 2013) und nutzt Ubichinon, um freiwerdende Elektronen, welche bei der Oxidation von DHO entstehen, in die Atmungskette einzuschleusen (Hortua Triana et al. 2016). An humanen Zellen konnten Fang et al. (2013) nachweisen, dass eine Beeinträchtigung der DHODH ein geringeres Zellwachstum, eine geminderte Aktivität von Complex III der Atmungskette sowie ein gestörtes mitochondriales Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) zur Folge hatte.

Hegewald et al. (2013) identifizierten die DHODH als weitere Zielstruktur, wobei so (neben der bekannten Interaktion mit der NDH-2) ein zusätzlicher, wachstumsinhibitorischer Effekt auf *T. gondii* offenbar wurde. Der Nachweis erfolgte anhand von resistenten DHODH Mutanten (N203S). Im Vergleich konnte gezeigt werden, dass unter Einfluss von CB & HDQ die  $IC_{50}$  der Mutante höher war als beim RH-Stamm. Das bedeutet, dass eine ungleich höhere Dosis der Verbindungen bei der Mutante nötig war, um die gleiche, wachstumsinhibierende Wirkung zu erzielen.

### **4.2.3 Interpretation des relativen ATP-Gehalts und des Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) unter Einfluss der 1-Hydroxychinolone**

#### **4.2.3.1 Einfluss der 1-Hydroxychinolone auf den ATP-Gehalt der RH-Parasiten**

ATP ist ein universaler Energieträger für Stoffwechselfvorgänge, bei denen chemische, mechanische oder osmotische Arbeit anfällt. Die ATP-Synthase dient, wie bei menschlichen Zellen, im letzten Schritt der Atmungskette der Generierung von ATP und ist essentiell für den Lebenszyklus von *T. gondii* (Nina et al. 2011; Sturm et al. 2015). Ziel der Messung des ATP-Levels war es herauszustellen, wie stark die getesteten 1-Hydroxychinolone die ATP-

---

<sup>54</sup> Archaeen sind sog. Archebakterien, die mit den Bakterien zu den Prokaryonten gezählt werden. Sie besitzen somit keinen Zellkern.

Synthese des Parasiten einschränken, indem sie auf die bisher bekannten Zielstrukturen wirken, die in Kapitel 4.2.1 und 4.2.2 dargestellt wurden.

Das tachyzoite Stadium von *T. gondii* teilt sich alle 6 – 9 h innerhalb der PV asexuell via Endodyogenie (Sibley et al. 2009) und das nahezu synchron. Das bedeutet, der ATP-Gehalt der Zellpopulation sollte unter optimalen Bedingungen annähernd gleich sein. Durch die Beeinträchtigung des Stoffwechsels, durch die Zuführung der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Verbindungen, zeigte sich bereits im Wachstumszähltest *in vitro* eine verminderte Teilungsaktivität des Parasiten im tachyzoiten Stadium. Eine Abweichung des natürlichen ATP-Gehaltes wurde somit erwartet. Der ATP-Gehalt von *T. gondii* wurde mittels lumino-metrischer Bestimmung gemessen.

Die Ergebnisse zeigten, dass das ATP-Level 24 h nach Zugabe der 1-Hydroxychinolone deutlich niedriger ausfiel als bei der unbehandelten Kontrollgruppe (Für die Genotyp-I-Parasiten vom RH- und RH/ $\Delta uprt$ -Stamm war der Abfall des ATP-Levels in der niedrigen Konzentration von 1 nM signifikant). Dies ließ sich für alle Stämme und alle getesteten Verbindungen feststellen und bestätigte für HDQ die Beobachtungen von Lin et al. (2009). Überraschenderweise war der ATP-Gehalt unter Einfluss der hohen Konzentrationen der Verbindungen (1  $\mu$ M) höher als bei den niedrigen (1 nM), was sich für alle getesteten Wirkstoffe (CA, CB & HDQ) und Versuchsreihen gleich verhielt. Durch den hemmenden Effekt der 1-Hydroxychinoline auf die Atmungskette war vielmehr ein fallender ATP-Level korrelierend mit steigender Wirkstoffkonzentration erwartet worden. Einen Erklärungsansatz bietet das Ergebnis des Zähltests über 24 h selbst, welcher im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde (s. Kap. 3.1). Dort zeigte sich, dass *T. gondii* bei Zugabe von 1  $\mu$ M 1-Hydroxychinolonen kaum noch Teilungsaktivität aufwies und einen parasitostatischen Effekt erkennen ließ (s. Kap. 4.1). Ein in diesem Zustand gleichzeitig hoher ATP-Gehalt könnte im staseähnlichen Zustand selbst begründet liegen, in dem der Parasit das bis dahin synthetisierte ATP nicht mehr für Stoffwechselfvorgänge zur Anwendung bringen kann. Das ATP „ruht“ in der Stase und würde somit den höheren Messwert bei Zugabe der hohen Chinolonkonzentration erklärbar machen.

In der niedrigen Wirkstoffkonzentration (1 nM) war die Replikationsrate zwar auch deutlich gehemmt (so dass CA & CB 24 h p. i. die durchschnittliche Teilungsrate im Mittel um 57% reduzierte), trotzdem stieg diese im Vergleich zur Versuchsgruppe mit der hohen Konzentration an. Diese Beobachtung lässt folgende Theorie zu: *T. gondii* könnte bei geringer Chino-

lonkonzentration noch in der Lage sein, dass bis dahin synthetisierte ATP für Stoffwechselprozesse zu verbrauchen, was in dem Umfang in der hohen Konzentration nicht mehr der Fall wäre. Gleichzeitig würde der Parasit (durch die Hemmung der Atmungskette) nicht mehr in der Lage sein, so viel ATP zu synthetisieren, wie unter natürlichen Bedingungen, was insgesamt ein niedrigeres ATP-Level im Versuch erklären könnte.

#### **4.2.3.2 Störung des mitochondrialen Membranpotentials von RH-Parasiten unter Einwirkung von 1-Hydroxychinolonen**

Ein intaktes Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) ist ein Indikator für eine funktionale Atmungskette, weshalb sich dessen Betrachtung anbietet, um den Einfluss der 1-Hydroxychinolonverbindungen auf die oxidative Phosphorylierung sichtbar zu machen.

Im Inneren der MM wird entlang der Atmungskette ein negatives  $\Delta\Psi_m$  durch einen elektrochemischen Gradienten erzeugt (vgl. Kap. 1.5), der durch eine Kette von elektrochemischen Redoxreaktionen aufgebaut wird. Dabei werden Protonen ( $H^+$ ) aus dem Matrixraum in den intermembranösen Raum des Mitochondriums gepumpt. Deren Rückdiffusion wird im letzten Abschnitt der Atmungskette von der ATP-Synthase genutzt, um durch oxidative Phosphorylierung aus ADP und anorganischem Phosphat ATP zu generieren. Das  $\Delta\Psi_m$  ist somit erforderlich für die Synthese von ATP (Martínez-Reyes et al. 2016). Da schon HDQ die Atmungskette sowohl durch kompetitive Hemmung der NDH-2 beeinträchtigt (Lin et al. 2008) als auch die DHODH inhibiert (Hegewald et al. 2013), welche ebenfalls ubiquinonvermittelt Elektronen zur Atmungskette leitet (Fang et al. 2013; Hortua Triana et al. 2016), war auch unter Zugabe der 1-Hydroxychinolone CA & CB eine Störung des  $\Delta\Psi_m$  erwartet worden. Dafür sprach, dass in dieser Arbeit eine Verminderung des ATP-Gehaltes unter dem Einfluss der untersuchten Verbindungen beobachtet wurde (s. Kap. 3.2), was Rückschlüsse auf eine Beeinflussung der Atmungskette erlaubt.

Im Versuch ließen CA, CB & HDQ das  $\Delta\Psi_m$  des Genotyp-I-RH-Stammes, im Vergleich zur unbehandelten Probe, in signifikanter Zahl kollabieren, was die Beobachtungen von Lin et al. (2009) für HDQ bestätigt.

Unter Behandlung mit den 1-Hydroxychinolonverbindungen ergab sich für eine Konzentration von 100 nM, dass 57,5% der Parasiten vom RH-Stamm ein kollabiertes  $\Delta\Psi_m$  aufwiesen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, welche als 100%-Wert festgelegt wurde, zeigten so über die Hälfte der vorher als intakt gewerteten Parasiten ein kollabiertes  $\Delta\Psi_m$ . Der Anteil

mit als kollabiert gewertetem  $\Delta\Psi_m$  lag dabei in der Konzentration von 100 nM bei allen getesteten Verbindungen auf ähnlichem Niveau. Bei der geringen Konzentration von 1 nM zeigte sich ein Wirkungsunterschied zugunsten der neuen Verbindungen, welche das  $\Delta\Psi_m$  in 39% der Fälle zusammenbrechen ließen, HDQ in 28%. Dies kann, wie schon im Wachstumszähltest (Kap. 3.1), ein Hinweis auf einen stärkeren Effekt der neuen Verbindungen gegenüber HDQ (besonders in niedrigen Konzentrationen) sein; dieser Unterschied war jedoch für die Beobachtungen des  $\Delta\Psi_m$  in Anbetracht der Standardabweichung nicht signifikant (s. Tab. 18).

Ferner ist festzuhalten, dass die Inkubationszeit der Verbindungen (1 h, 24 h und 48 h) keinen signifikant differierenden Effekt auf das  $\Delta\Psi_m$  hatte. Die Anzahl der als kollabiert gewerteten  $\Delta\Psi_m$  blieb auch im Langzeitversuch nahezu konstant, was die Beobachtung von Sternisek (2009)<sup>55</sup> bestätigt. Gleichzeitig lässt sich somit festhalten, dass das  $\Delta\Psi_m$  unter Einfluss der 1-Hydroxychinolone keine Erholungstendenzen zeigt.

Abschließend stellt sich die Frage, welcher durch die 1-Hydroxychinolone vermittelte Effekt maßgeblich für den störenden Einfluss auf das  $\Delta\Psi_m$  der Mitochondrien ist. Als bekannte Angriffspunkte boten sich hier die Interaktionen mit der NDH-2 und/oder der DHODH an (vgl. Kap. 4.2.1 und 4.2.2). Da Erstere fester Bestandteil der Atmungskette (Komplex I; Kap. 1.5) ist, liegt die Vermutung nahe, dass der Effekt auf die NDH-2 hier maßgeblich ist. Hortua Triana et al. (2016) konnten, dies unterstreichend, anhand von Deletionsmutanten von *T. gondii* zeigen, dass die Inaktivierung der DHODH wahrscheinlich keinen signifikanten Effekt auf das  $\Delta\Psi_m$  der Mitochondrien hat. Daraus lässt sich schließen, dass eine funktionierende Pyrimidinbiosynthese nicht essentiell für die Prozesse der Atmungskette von *T. gondii* ist.

Eine andere Sicht erlauben die Beobachtungen von Fang et al. (2013). Diese stellten noch einmal heraus, dass die DHODH als einziges Enzym der Pyrimidin-*de-novo*-Synthese mit den Komplexen II und III der Atmungskette interagiert und mittels des Transportmoleküls Ubichinon fester Bestandteil der Atmungskette und der ATP-Synthese ist. Wurde in Zellen die DHODH ausgeschaltet (dies geschah mittels sog. Knock-out-Mutanten<sup>56</sup>), resultierte dies in mitochondrialen Fehlfunktionen, sowie einem verminderten oder gar kollabierten  $\Delta\Psi_m$ . Zwar beruhen die Ergebnisse von Fang et al. (2013) auf Untersuchungen an Eukaryonten

---

<sup>55</sup> Sternisek (2009) konnte nur für die Deletionsmutante RH/ $\Delta uprt$  einen Anstieg des prozentualen Anteils an Vakuolen ohne Membranpotential über die Zeitachse feststellen. Diese Mutante wurde in dieser Arbeit in diesem Versuch nicht getestet.

<sup>56</sup> Hierunter wird das Ausschalten eines Gens im Genom eines Organismus verstanden.

und nicht auf *T. gondii*, weshalb Rückschlüsse auf den Parasiten zumindest unter Vorbehalt getroffen werden sollten; insgesamt ergibt sich jedoch der Eindruck, dass 1-Hydroxychinolone das  $\Delta\Psi_m$  nicht nur über die NDH-2 stören, sondern die Interaktionen innerhalb der Mitochondrien wesentlich komplexer sind.

#### 4.2.4 Betrachtung der Untersuchungsergebnisse anhand der Deletionsmutanten RH/ $\Delta uprt$ & RH/ $\Delta scs$

Um die oben angeführten Zielstrukturen zu bestätigen und die Wirkungsweise der Verbindungen genauer einzuordnen, wurden in den Versuchen zwei Deletionsmutanten von *T. gondii* untersucht: Die RH/ $\Delta uprt$ - und RH/ $\Delta scs$ -Mutante. Die Mutanten werden nacheinander besprochen.

Bei RH/ $\Delta uprt$ -Parasiten liegt eine Defizienz der UPRT vor (Kap. 1.7, Abb. 1; Kap. 2.1.5). Dieses Schlüsselenzym der Pyrimidinbiosynthese katalysiert die Synthese UMP über den *salvage pathway* aus Uracil. Dabei scheint Uracil die einzige Nukleobase zu sein, die *T. gondii* über den *salvage pathway* zur Wiederverwertung nutzen kann (Iltzsch 1993). Obwohl die Deletionsmutante daher zur essentiellen Pyrimidinbiosynthese nur auf die energetisch ineffizientere Pyrimidin-*de-novo*-Synthese zurückgreifen kann, zeigte sie im Wachstumszähltest (in der unbehandelten Kontrolle nach 24 h Inkubation) nur eine unwesentlich verminderte Replikationsrate gegenüber dem Wildtyp RH und keine Abnahme der Virulenz, was die Beobachtungen von Donald und Roos (1995) und Naujoks (2008) stützt. Für RH/ $\Delta uprt$  ergab sich ein Mittelwert von 6,41 PA/PV 24 h p. i., für den RH-Stamm 7,58 PA/PV. Hieraus kann abgeleitet werden, dass *T. gondii* unter natürlichen Bedingungen kaum auf den *salvage pathway* angewiesen ist und über die Pyrimidin-*de-novo*-Synthese ausreichend UMP generieren kann.

Ein anderes Bild ergab sich nach Zugabe der 1-Hydroxychinolone. Hier zeigte die RH/ $\Delta uprt$ -Mutante im Zähltest 24 h p. i. eine Hypersensibilität gegenüber den Verbindungen CA, CB & HDQ. CA & CB erwiesen sich hierbei, wie schon beim Wildtyp, als potentere Wachstumsinhibitoren. Die  $IC_{50}$  24 h p. i. lag für CA bei 0,6 nM, für CB bei 0,9 nM und für HDQ bei  $5,4 \text{ nM} \pm \text{SD}$  (vgl. Kap. 3.1.1). Von besonderer Bedeutung war die Beobachtung, dass sich in den hohen Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  und 100 nM 24 h p. i. eine durchgängig parasitostatische Wirkung zeigte. Im Falle von CA & CB wiesen 100% (bei HDQ > 99%) der Parasiten keine Teilungsaktivität auf. Zum Vergleich: Beim Wildtyp RH zeigten 35 – 55%

der Parasiten unter vergleichbaren Bedingungen keine Replikation. Dies stützt die Untersuchungen von Naujoks (2008), in deren Arbeit sich 98% der Deletionsmutante RH/ $\Delta uprt$  innerhalb von 24 h p. i. unter Einwirkung von HDQ nicht replizierten. In einem Langzeitversuch mit der RH/ $\Delta uprt$ -Mutante konnten Hegewald et al. (2013) für CB & HDQ in einer Konzentration von 100 nM nachweisen, dass der Parasit auch nach 60 Stunden Inkubationszeit keine Erholungstendenzen (*Recovery Effect*) und somit keine Teilungsaktivität zeigte.

Der Grund für die Hypersensibilität von RH/ $\Delta uprt$  liegt aller Wahrscheinlichkeit nach in einer Kombination der Beeinträchtigung der Enzymaktivität und des Energiestoffwechsels, was nachfolgend erläutert wird: Durch den Ausfall des *salvage pathways* verbleibt RH/ $\Delta uprt$  nur noch die Möglichkeit, die essentielle Pyrimidinbiosynthese über die *De-novo*-Synthese zu betreiben (Kap. 1.7). Dieser Syntheseweg ist ebenfalls funktional eingeschränkt, da die DHODH, das vierte Enzym der Pyrimidinbiosynthese, durch die Interaktion mit den 1-Hydroxychinolenen beeinträchtigt wird (Hegewald et al. 2013). Durch Hemmung der DHODH können freiwerdende Elektronen, welche bei der Oxidation von DHO entstehen, nicht in die Atmungskette eingeschleust werden, was wiederum der ATP-Synthese abträglich ist. Da für RH/ $\Delta uprt$  ein erhöhter ATP-Bedarf angenommen wird (aufgrund energetisch ineffizienterer Pyrimidinbiosynthese) sollten die 1-Hydroxychinolone die Mutante stärker hemmen als den Wildtyp. Dies unterstreichend wies RH/ $\Delta uprt$ , neben der oben erwähnten Hypersensibilität unter Einfluss der Chinolonverbindungen, in den unbehandelten Kontrollgruppen einen höheren ATP-Grundgehalt auf, als der RH-Stamm (vgl. Kap. 3.1.1 und 3.1.2). Dies kann darauf hinweisen, dass sich der Stoffwechsel der Mutante an den höheren ATP-Bedarf angepasst hat. Die i. V. zum Wildtyp RH nur geringfügig langsamere Teilungsrate der Mutante lässt so auf einen höheren Energieumsatz schließen, da die energetischen Nachteile in der Pyrimidinbiosynthese durch eine ATP-Überexpression ausgeglichen werden müssten. Angesichts der invasiven Strategie des Parasiten wäre diese Hypothese nachvollziehbar, da die Virulenz von *T. gondii* nicht zuletzt von seiner schnellen, exponentiellen Replikationsrate abhängt, um sich gegen das Immunsystem seines Wirtes durchzusetzen.

Zusammenfassend zeigte (neben dem RH-Stamm) auch RH/ $\Delta uprt$  unter dem Einfluss der 1-Hydroxychinolone einen deutlich verringerten ATP-Gehalt. Die Werte lagen dabei auf einem vergleichbaren Niveau wie beim Wildtyp. Eine deutlichere Abweichung des ATP-Gehaltes der Mutante bestätigte sich somit nicht. Gleichwohl konnte für RH/ $\Delta uprt$  eine Hypersensibilität gegenüber den 1-Hydroxychinolonen im Wachstumszahltest beobachtet werden.

Bei RH/ $\Delta_{scs}$  handelt es sich um eine Deletionsmutante der SCS (Fleige et al. 2008), dem sechsten Enzym des Citratzyklus, welches die Reaktion vom Substrat Succinyl-CoA zum Produkt Succinat katalysiert. Die freiwerdende Energie, die bei der Spaltung von Succinyl-CoA entsteht, wird wiederum zur Bildung energiereicher Verbindungen genutzt. Dadurch, dass Succinat in der Reaktionskette des Citratzyklus fehlt, können wichtige Folgereaktionen nicht oder nur eingeschränkt stattfinden. Ferner, und für diese Arbeit von Bedeutung, ist auch eine Inhibierung der Atmungskette wahrscheinlich, welche mit dem Citratzyklus verbunden ist. Unter natürlichen Bedingungen würde am zweiten Komplex der Atmungskette (dieser ist Bestandteil des Citratzyklus) Succinat durch das Enzym Succinat-Dehydrogenase zu Fumarat oxidiert. Hierbei würde das Coenzym FAD als Elektronenakzeptor in seine reduzierte Form FADH<sub>2</sub> übergehen und die bei dieser Reaktion freiwerdenden Elektronen auf Fe-/S-Cluster und das für die Elektronentransportkette wichtige Transportmolekül Ubichinon übertragen. Als Folge des Mangels an Succinat und der Beeinflussung von Citratzyklus und Atmungskette konnten Fleige et al. (2008) für RH/ $\Delta_{scs}$  in der Zellkultur eine um 30% reduzierte Wachstumsrate gegenüber dem RH-Stamm nachweisen. Diese zeigte sich wiederum reversibel, wenn 2  $\mu$ M Succinat (also das durch die Ausschaltung der SCS entfallende Produkt) den Parasiten über das Nährmedium wieder zugeführt wurden. Insgesamt konnte somit einerseits eine verminderte Replikationsrate der Mutante bestätigt werden, andererseits zeigte sich aber auch, dass ein funktionaler Citratzyklus nicht maßgeblich für den Lebenszyklus von *T. gondii* ist.

In der luminometrischen Bestimmung wies RH/ $\Delta_{scs}$  in der unbehandelten Kontrolle einen um 17% verringerten ATP-Gehalt auf (verglichen mit der Kontrolle des RH-Stammes nach gleicher Infektionszeit; s. Kap. 3.2.4). Aufgrund der oben angeführten Einschränkungen des Stoffwechsels entsprach dies den Erwartungen. Eine Zugabe der Chinolonverbindungen ergab für alle drei getesteten Substanzen (CA, CB & HDQ) eine Verminderung des ATP-Gehaltes, wobei, wie zuvor bei den anderen Parasitenstämmen, die niedrige Konzentration der Verbindungen einen stärker senkenden Effekt auf den ATP-Gehalt von RH/ $\Delta_{scs}$  hatte. Als ursächlich dafür wird eine Abnahme des ATP-Verbrauches korrelierend mit steigender Wirkstoffkonzentration vermutet. Im Wachstumszähltest fiel *T. gondii* in hohen Konzentrationen der Verbindungen (1  $\mu$ M) in einen staseähnlichen Zustand, wobei angenommen wird, dass durch die folglich stark reduzierte Teilungsaktivität bereits generiertes ATP keinem Stoffwechselprozess mehr als Energieträger zugeführt wird. In niedrigen Konzentrationen (1 nM) hingegen konnte eine höhere Teilungsaktivität beobachtet werden. Dies legt nahe,

dass bereits synthetisiertes ATP noch zur Verstoffwechslung genutzt wird, gleichzeitig aber durch die Hemmung der Zielstrukturen kaum neues ATP nachgebildet werden kann.

Ferner wurde beobachtet, dass RH/ $\Delta scs$  unter Einfluss der Chinolonverbindungen von allen getesteten Stämmen den prozentual am wenigsten senkenden Effekt auf den ATP-Gehalt auswies. So konnte dieser, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, unter Zugabe von 1 nM Wirkstoff nur auf maximal 23% gesenkt werden. Im Vergleich: Beim RH-Stamm und RH/ $\Delta uprt$  wurde eine Verminderung des ATP-Gehaltes auf maximal 8% respektive 5% bestimmt (s. Kap. 3.2.2 und 3.2.3). Eine Erklärung für dieses Ergebnis kann in der geringeren Teilungsaktivität von RH/ $\Delta scs$  begründet liegen, die Fleige et al. (2008) etwa um 30% reduziert nachwies.<sup>57</sup> Hierdurch kann der ATP-Verbrauch der Mutante insgesamt geringer ausfallen. Dafür spricht der innerhalb dieser Arbeit gemessene niedrige ATP-Basiswert der unbehandelten Kontrolle, welcher um 17% niedriger lag, als der des RH-Stammes. RH/ $\Delta scs$  könnte somit auf die gegebenen Einschränkungen der Stoffwechselprozesse mit einer Verlangsamung dergleichen reagiert haben. Interessant wäre unter diesen Gesichtspunkten eine Bestimmung des ATP-Levels von RH/ $\Delta scs$  unter der Zugabe von Succinat, um die Einschränkungen des Citratzyklus und der Atmungskette zu minimieren. Da Fleige et al. (2008) unter diesen Gegebenheiten bereits eine Angleichung der Replikationsrate von RH/ $\Delta scs$  an den RH-Stamm nachweisen konnten, wäre Ähnliches für den ATP-Gehalt zu erwarten.

Für RH/ $\Delta scs$  wurde das  $\Delta\Psi_m$  der unbehandelten Kontrolle ähnlich häufig als intakt bewertet, wie beim RH-Stamm, was die Beobachtungen von Fleige et al. (2008) bestätigt. Die Einschränkungen der Stoffwechselprozesse scheinen sich somit in der Fluoreszenzbestimmung nicht messbar auf die Ladung der MM auszuwirken. In der Wirkstoffkonzentrationen von 1 nM zeigte RH/ $\Delta scs$  unter Einfluss von CA ähnliche Werte wie der Wildtyp. Dabei wiesen etwa 40% der PV (gemessen an der Kontrolle, deren Ergebnis auf 100% gesetzt wurde) ein kollabiertes  $\Delta\Psi_m$  auf. In der hohen Konzentration von 100 nM konnte in fast 70% der beobachteten PV ein kollabiertes  $\Delta\Psi_m$  beobachtet werden, was etwa 10% über dem Wert des RH-Stammes lag. Dies kann darauf hinweisen, dass der Parasit die Inhibierung der Atmungskette und die gleichzeitig vorliegenden Einschränkungen des Citratzyklus weniger gut kompensieren kann als der Wildtyp. Allerdings müssen hier ebenfalls Abweichungen beim Messvorgang und Standardabweichung berücksichtigt werden. Die Inkubationszeit der Quinolonverbindung ließ keinen wesentlichen Unterschied auf den Effekt erkennen, der auf

---

<sup>57</sup> Fleige et al. (2008) verglichen dabei RH/ $\Delta scs$  mit dem RH-Stamm.



das  $\Delta\Psi_m$  ausgeübt wurde, was zuvor schon bei den anderen untersuchten Parasitenstämmen beobachtet werden konnte.

### 4.3 Struktur und Funktionsaspekte

Im Ergebnisteil wurde der Effekt der getesteten Chinolonverbindungen auf die Wachstumsrate, den ATP-Gehalt und das  $\Delta\Psi_m$  von *T. gondii* untersucht. Für die Verbindungen CA, CB & HDQ konnte festgestellt werden, dass sie die Replikationsrate und das ATP-Level von *T. gondii* signifikant senkten sowie das  $\Delta\Psi_m$  in der Mehrzahl der Fälle signifikant kollabieren ließen.<sup>58</sup> Dabei zeigten CA & CB im Wachstumszähltest eine deutlich niedrigere  $IC_{50}$  als HDQ, was sie als potentere Wachstumsinhibitoren identifizierte. CC & CD hingegen ließen kaum einen Effekt auf die Replikationsrate von *T. gondii* erkennen.

Die naheliegendste Erklärung für die differierenden Ergebnisse und Effekte der getesteten Verbindungen liegt in der unterschiedlichen molekular-chemischen Struktur (s. Kap 2.1.7) des Chinolongrundgerüsts. Saleh et al. (2007) wiesen bereits am Beispiel von HDQ nach, dass die Länge der Alkyl-Seitenkette an C-2 (zweites Kohlenstoffatom) des Moleküls maßgeblich für die inhibitorische Wirkung von *T. gondii* im *in-vitro*-Versuch war. Getestet wurden hierfür mehrere 1-Hydroxychinolonverbindungen auf Basis von HDQ, welches selber an C-2 eine Seitenkette von zwölf Kohlenstoffatomen aufweist, wobei die Länge der Alkyl-Seitenkette variiert wurde. Dabei inhibierten Ketten mit  $(CH_2)_5-CH_3$  ( $\cong$  C6),  $(CH_2)_7-CH_3$  ( $\cong$  C8), und  $(CH_2)_{13}-CH_3$  ( $\cong$  C14) *T. gondii* vergleichbar wie HDQ (C12) in Konzentrationen von 1 nM bis 100 nM. Im Gegensatz dazu konnte eine Alkyl-Seitenkette mit  $(CH_2)_4-CH_3$  ( $\cong$  C5) keine Inhibierung der Replikation bewirken und verhielt sich im Ergebnis vergleichbar mit der unbehandelten Kontrollgruppe. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass die Alkyl-Seitenkette an C-2 des Moleküls über mindestens sechs Kohlenstoffatome verfügen musste, um replikationshemmend wirksam zu sein (Saleh et al. 2007). Eine mögliche Erklärung hierfür liegt darin, dass der Hauptwirkungsort der 1-Hydroxychinolone (nach bisherigem Wissensstand) im Inneren der Mitochondrien liegt (s. Kap. 4.2.1 und 4.2.2). Mit zunehmender Länge der Alkyl-Seitenketten nimmt auch die Lipophilie des Moleküls zu, was die Passage durch die durchgängig hydrophobe Doppellipidmembran der Mitochondrien zum Zielort erleichtert.

---

<sup>58</sup> Hierbei beeinflussten hohe Konzentrationen der Verbindungen die Wachstumsrate sowie das  $\Delta\Psi_m$  stärker, wohingegen der ATP-Gehalt in den niedrigeren Konzentrationen deutlicher gesenkt wurde.

CA & CB wiesen im Wachstumszähltest eine stärkere inhibitorische Potenz als HDQ auf. Dabei verfügen diese wie HDQ über eine Alkyl-Seitenkette mit zwölf Kohlenstoffatomen, wobei diese bei CA an C-2 und bei CB an C-3 gebunden wurde (s. Kap. 2.1.7). Neu hinzugekommen ist eine Methyl-Gruppe (-CH<sub>3</sub>), die bei CA an C-3 und bei CB an C-2 gebunden wurde. Methylgruppen werden, basierend auf Ladung und Polaritätsmerkmalen, den hydrophoben Elementen zugerechnet. Somit könnte der stärkere inhibitorische Effekt von CA & CB darin begründet liegen, dass deren Passage durch die Doppellipidmembran mittels größerer Lipophilität erleichtert wird und sie so in höherer Konzentration an ihren Wirkungsort, der NDH-2 und der DHODH, gelangen können. Der zusätzlich beschriebene positive Induktive Effekt<sup>59</sup>, welcher Methyl-Gruppen zugewiesen wird, kann dem weiter zuträglich sein.

Wird die Molekularstruktur betrachtet, lässt sich zum einen festhalten, dass es für die antiparasitäre Wirkung nicht von Bedeutung zu sein scheint, ob die Alkyl-Seitenkette an C-2 oder C-3 des Chinolonmoleküls gebunden ist. Zum anderen kann beobachtet werden, dass der wachstumshemmende Effekt der Verbindungen verstärkt wird, wenn zusätzlich an die Position C-2 (CB) oder C-3 (CA) eine Methyl-Gruppe gebunden wird.

Dementgegen zeigten CC & CD kaum einen Effekt auf die Wachstumsrate von *T. gondii* (s. Kap. 3.1.1). Diese Verbindungen wurden ursprünglich synthetisiert, um eine höhere Wasserlöslichkeit zu ermöglichen, da sowohl CA und CB, als auch HDQ, stark hydrophob einzuordnen sind. Diesbezüglich wurde eine N,N-Dimethylaminoethoxy-Gruppe an C-6 des Moleküls gebunden (s. Kap. 2.1.7, Abb. 4). CC & CD verfügen wie die anderen getesteten Verbindungen über eine Alkyl-Seitenkette mit zwölf Kohlenstoffatomen, welche als wichtiger Bestandteil für die antiparasitäre Wirksamkeit der 1-Hydroxychinolone klassifiziert wurde (s. o.). Diese ist bei CC an C-3 und bei CD an C-2 gebunden. Weiterhin verfügt CC über eine Methyl-Gruppe (-CH<sub>3</sub>) an C-2; bei CD ist an C-3 ein Wasserstoffatom gebunden.

Konnten die Alkyl-Seitenkette und die angefügte Methylgruppe bei CA & CB noch eine höhere inhibitorische Potenz bezüglich der antiparasitären Wirkung zeigen, hatte die angefügte N,N-Dimethylaminoethoxy-Gruppe bei den Verbindungen CC & CD zur Folge, dass

---

<sup>59</sup> Durch den Induktiven Effekt entsteht in Atomen und Molekülen eine Ladungsasymmetrie, wodurch die Elektronendichte im Element nicht gleichmäßig verteilt ist. Dieser Umstand kann die Wirkweise, in diesem Falle von Chemotherapeutika, beeinflussen.

keine inhibitorische Wirkung gegenüber *T. gondii* auftrat. In Zusammenschau ist wahrscheinlich, dass das Anfügen dieser hydrophilen Gruppe zu einer Abnahme der Diffusion von CC & CD durch die Zell- und Mitochondrienmembranen führte und somit die Konzentration der Wirkstoffe am Wirkungsort sank. Eine hohe Lipophilie scheint somit für den antiparasitären Effekt der 1-Hydroxychinolone essentiell zu sein. Dies bestätigt erneut die Beobachtungen von Saleh et al. (2007), denen zufolge ein Verkürzen der Alkyl-Seitenkette auf unter sechs Kohlenstoffatome, bei somit abnehmender Hydrophobizität, die antiparasitäre Wirkung aufhob.

Weiter ließ sich beobachten, dass CC im Gegensatz zu CD, zumindest in der hohen Konzentration von 1  $\mu$ M eine geringgradige, nicht signifikante inhibitorische Potenz aufwies (s. Kap. 3.1.1). Die Verbindung unterscheidet dabei hauptsächlich eine bei CC angehängte Methylgruppe (-CH<sub>3</sub>) an C-2, welche bei CD fehlt (s. Abb. 4). Als Grund für den Wirkungsvorteil von CC kann somit, wie schon unter Beschau der Alkyl-Seitenkette besprochen, eine damit einhergehende höhere Lipophilie angenommen werden. Die zusätzlichen Methylgruppen wurden schon bei den Verbindungen CA & CB als wahrscheinliche Wirkungsverstärker gegenüber HDQ diskutiert (s. o.). Unter biochemischen Aspekten ist dies nachvollziehbar, da die Effektivität der 1-Hydroxychinolone auf ihrer Strukturverwandtheit mit Ubichinon beruhen (Eschemann et al. 2005; s. Kap. 1.6), welches ebenfalls einen hydrophoben Aufbau aufweist und sich gerade wegen dieser Eigenschaft in und an der Doppel-lipidmembran der Mitochondrien anhaften und frei in diesen bewegen kann. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen besitzt Ubichinon gleich mehrere Methyl-Gruppen. Insgesamt wird so bei abnehmender Hydrophobizität eines Wirkstoffes erwartet, dass dessen Konzentration erhöht werden müsste, um denselben wachstumsinhibitorischen Effekt auf *T. gondii* zu erzielen.

#### 4.4 Weitere Wirkstoffe und Ausblick in die aktuelle Forschung

Bei der Herstellung antiparasitär wirksamer Verbindungen gegen *T. gondii* ist deren Fähigkeit das Parasitenwachstums zu kontrollieren ein Schlüsselement (McFarland et al. 2016). Die 1-Hydroxychinolonverbindung HDQ konnte als hoch affiner Inhibitor der NDH-2 identifiziert werden (Eschemann et al. 2005). Saleh et al. (2007) konnten kurz darauf die Verbindung in der Zellkultur als effektiven Wachstumshemmer von *T. gondii* identifizieren. Abgeleitet vom Grundgerüst von HDQ entstanden die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Chinolonverbindungen CA, CB, CC und CD, wovon insbesondere CA & CB eine sehr

niedrige  $IC_{50}$  von  $< 1$  nM aufwiesen (Bajohr et al. 2010). Diese und weitere Chinolonverbindungen sollen nachfolgend auf ihr antiparasitäres Potential hin beleuchtet werden.

Kadri et al. (2014) testeten 58 synthetisierte Chinolonverbindungen auf ihre wachstumsinhibitorischen Eigenschaften bezüglich *T. gondii*. Die Versuche erfolgten *in vitro*, wobei (wie in dieser Arbeit) *T. gondii* in HFF angezüchtet und mit Chinolonverbindungen angeimpft wurde. Dabei wurde ein Genotyp-I-Parasit vom RH-Stamm (RH 2F) verwendet (was ihn vergleichbar mit dem RH-Stamm dieser Arbeit macht), welcher mit  $\beta$ -Galactosidase als Reporterenzym versehen wurde (Seeber und Boothroyd 1996). Es wurde neben der  $IC_{50}$  die  $TD_{50}$  (toxische Dosis) bestimmt, die anzeigt, dass  $\geq 50\%$  der Monolage<sup>60</sup> zytotoxische Effekte aufwiesen. Für die Ermittlung des therapeutischen Index (TI) wurde die  $TD_{50}$  durch die  $IC_{50}$  geteilt. Dabei sprach ein hoher TI für eine vielversprechende Substanz, da sie diese als wenig toxisch klassifizierte und gleichzeitig eine hohe Inhibierung der Wachstumsrate von *T. gondii* anzeigte. Als letzter Parameter wurde die Membrangängigkeit der Verbindungen (cLogP) angegeben, da die Passage durch die Doppellipidmembran der Mitochondrien einen essentiellen Faktor für die Wirkung der Chinolonverbindungen darstellt (s. Kap. 4.3).

Die 58 Verbindungen wurden von Kadri et al. (2014) in drei Gruppen unterteilt: 24 Piperazinylochinolone<sup>61</sup>, 29 Aminochinolone und fünf sog. „Einfache Chinolone“, welche als einfach strukturierte Chinolonringe nur einen Substituenten<sup>62</sup> aufwiesen. Im Ergebnis zeigten 18 *Compounds* keine wachstumsinhibitorischen Eigenschaften gegenüber *T. gondii*, weitere acht wiesen eine  $IC_{50} > 100$   $\mu$ M aus, weshalb sie aufgrund der hohen benötigten Dosis und damit einhergehenden Toxizitätsbedenken in den Versuchen nicht weiterverfolgt wurden. Die untersuchten Piperazinylochinolone zeichneten sich strukturell durch das Bestehen eines Isatin-Rings<sup>63</sup>, sowie eines Chinolon-Rings und/oder einer Thiosemicarbazon-Einheit aus. Aufgrund ihrer Molekülgröße und Ladung wiesen die Piperazinylochinolone eine eher hohe cLogP aus, was für eine tendenziell schlechte Membrangängigkeit sprach; die  $IC_{50}$  differierte von 0,7  $\mu$ M bis 7,5  $\mu$ M  $\pm$  SD. Insgesamt war die Gruppe der Piperazinylochinolone am wenigsten wachstumsinhibitorisch effektiv.

---

<sup>60</sup> Die Monolage bezeichnet in diesem Fall den angezüchteten Zellrasen aus HFF. Hierbei bedecken die Zellen möglichst konfluent den Boden, d. h. es gibt keine Freiräume zwischen den HFF.

<sup>61</sup> Piperazine sind organische Verbindungen, bei denen sich zwei Stickstoffatome in einem Hexagon gegenüberstehen.

<sup>62</sup> Von Substituenten wird meist in der organischen Chemie gesprochen. Dies sind Atomgruppen (-reste), die ein Wasserstoffatom ersetzen/substituieren. Am Beispiel von CA wurde so an C-3 der Verbindung ein Wasserstoffatom ersetzt/substituiert, indem dort eine Methyl-Gruppe an das Kohlenstoffatom gebunden wurde.

<sup>63</sup> Isatine zählen zu den Indol-Derivaten. Das sind aromatische Heterocyclen. Diese Ringe enthalten verschiedene Elemente, wobei am häufigsten Stick- und Sauerstoff vertreten sind.

Die Aminochinolone wurden in struktureller Anlehnung an das Medikament Chloroquin (Resochin®) synthetisiert, welches als Medikament gegen Apicomplexa vom Typ *Plasmodium* therapeutische Verwendung findet. Chloroquin wurde in den Versuchen mitgeführt und wies als Ausgangssubstanz eine  $IC_{50}$  von  $2.25 \mu\text{M} \pm \text{SD}$ , einen  $c\text{LogP}$ -Wert von 5.06 und eine  $TD_{50}$  von  $9.00 \mu\text{M} \pm \text{SD}$  auf. Viele der untersuchten Derivate konnten eine niedrigere  $TD_{50}$  als Chloroquin aufweisen und einige konnten dessen TI sogar übertreffen, was sie für weitere Anwendungen interessant erscheinen ließ. Insgesamt hatten die Aminochinolone eine leicht höhere inhibitorische Potenz als die Piperazinylchinolone.

Den stärksten Effekt wies jedoch die Gruppe der Einfachen Chinolone auf, wobei alle von Kadri et al. (2014) getesteten Substanzen eine  $IC_{50} < 10 \mu\text{M}$  aufwiesen. Am vielversprechendsten war dabei eine 8-Hydroxychinolonstruktur mit einer  $IC_{50}$  von  $213 \text{ nM} \pm \text{SD}$ , dem für diese Gruppe höchsten TI (2,35) und einer eher durchschnittlichen Membrandurchgängigkeit von  $c\text{LogP}$  2,08. Insgesamt war die 8-Hydroxychinolonstruktur von allen 58 getesteten Verbindungen diejenige mit der höchsten wachstumsinhibierenden Potenz gegenüber *T. gondii*. Zum Vergleich: Die in dieser Arbeit verwendeten Chinolonverbindungen weisen eine ähnliche Molekularstruktur auf, mit dem Unterschied, dass die Hydroxygruppe (-OH) statt an C-8 an N-1, das Stickstoffatom, gebunden wurde. Ein weiterer Unterschied sind die bei CA & CB zusätzlich hinzugefügten lipophilen Gruppen durch die Alkyl-Seitenketten und die Methyl-Gruppen an C-2 respektive C-3 (s. Abb. 3). Diese scheinen ausschlaggebend dafür zu sein, dass die bereits gute inhibitorische Potenz des oben genannten 8-Hydroxychinolons von CA & CB noch deutlich übertroffen wird. Dabei lag die  $IC_{50}$  von CA & CB unter 1 nM (s. Kap. 3.1.1) ggü. 213 nM bei der 8-Hydroxychinolonstruktur (Kadri et al. 2014). Natürlich ist dies nur ein grober Vergleich. Zwar gab es in den Versuchen durchaus Parallelen, wie die Verwendung eines Parasiten des RH-Stammes sowie die Animpfung auf HFF als Wirtszellen, jedoch bieten die jeweiligen Untersuchungsbedingungen und Methoden auch Spiel für Abweichungen und müssen differenziert betrachtet werden.

Als weiterer, vielversprechender Angriffspunkt von Hydroxychinolonen konnte der Apicoplast ausgemacht werden. Dieses Organell ist essentiell für *T. gondii* und kommt nicht in den Wirtszellen vor (Montazeri et al. 2017; Saremy et al. 2011). Der Apicoplast ist ein für Apicomplexa spezifisches Zellorganell, welches wahrscheinlich aus Chloroplasten hervorging, aber die Fähigkeit zur Photosynthese verloren hat. Dafür übernimmt es für den Parasiten essentielle biochemische Funktionen, was es aufgrund seiner Spezifität zu einer aussichtsreichen Zielstruktur der Apicomplexa, so auch *Plasmodium falciparum*, macht.

Der Apicoplast unterstützt mehrere essentielle metabolische Funktionen in *T. gondii*: Die Hämsynthese, welche unter Mitwirken des Mitochondriums erfolgt (Sheiner et al. 2013). Die Synthese von Typ-II-Fettsäuren, welche (entgegen früherer Annahmen *T. gondii* würde sich rein über die Wirtszelle mit Lipiden versorgen) eine für den Parasiten wichtige Quelle von Fettsäuren darstellt (Ramakrishnan et al. 2012). Die Biosynthese von Isoprenoiden, welche als ein Derivat von Isopentenyl-Pyrophosphat als ein Bestandteil von Ubichinon vermutet werden, welches wiederum in der Atmungskette als Elektronen- und Protonenüberträger dient (Sheiner et al. 2013) und über eine entsprechende, lipophile Isoprenoid-Seitenkette verfügt.

Kadri et al. (2014) konnten weiterhin feststellen, dass die Behandlung mit bestimmten Chinolonverbindungen (speziell mit einfachen oder zweifachen Chinolonringstrukturen) den Verlust des Apicoplasten verursacht. So wurde am Beispiel des oben angeführten 8-Hydroxychinolons nur in 40 – 45% der untersuchten Parasiten des RH-Stammes ein Apicoplast nachgewiesen und fehlte bei den übrigen.<sup>64</sup> Dies bestätigte die Untersuchungen von Smith et al. (2007), die bereits zuvor anhand von Chinolon-Derivaten nachwiesen, dass diese neben einer Inhibierung der Wachstumsrate von *T. gondii* zusätzlich einen störenden Effekt auf den Apicoplasten ausübten und zu dessen Verlust führten.<sup>65</sup> Da die Molekularstruktur des 8-Hydroxychinolons verwandt ist mit den Wirkstoffen aus dieser Arbeit, kann für diese ebenfalls ein Effekt auf den Apicoplasten diskutiert werden. Damit würde sich neben den bereits aufgezählten Angriffspunkten (s. Kap. 4.2.1 und 4.2.2) ein zusätzlicher ergeben, welcher bei nachfolgender Betrachtung erheblich ist.

So konnten Amberg-Johnson und Yeh (2019) resp. Amberg-Johnson et al. (2017) ebenfalls für bestimmte Antibiotika den Effekt beobachten, dass diese zu einem Verlust der Apicoplasten von *T. gondii* sowie *Plasmodium falciparum* führten, was anschließend einen zeitversetzten Tod der Parasiten nach sich zog. In ihren Versuchen wurden *T. gondii*-Parasiten des RH-Stammes auf HFF angezüchtet und mit den Antibiotika Clindamycin, Actinonin und Ciprofloxacin (Proteinbiosyntheseinhibitoren) behandelt. Der Apicoplast wurde dabei mit einem Fluoreszenz-Marker nachgewiesen, der sich speziell an diesen anhaftete. Bei den mit Antibiotika behandelten Parasiten waren die Marker, im Gegensatz zu den unbehandelten Parasiten, kaum oder nicht nachweisbar. Eine Untersuchung des Genoms mittels quantitativer PCR zeigte dies unterstreichend, dass das Apicoplastengenom entsprechend reduziert

---

<sup>64</sup> Bei den unbehandelten Parasiten konnte ein Apicoplast in 75% der Fälle nachgewiesen werden.

<sup>65</sup> Dies wurde u. a. durch einen Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen, welcher neben der DNA auch die extrachromosomale DNA der Apicoplasten anfärbte und diese so sichtbar machte.

war oder ganz fehlte. Dabei teilte *T. gondii* sich im ersten Infektionszyklus noch wie erwartet. Es konnte jedoch eine fortschreitende Abnahme des Apicoplastengenoms festgestellt werden, so dass dieses 48 h p. i., also etwa zur üblichen Zeit der ersten Wirtszellyse, in nur noch 8 – 22% der Parasiten nachgewiesen werden konnte. Bedeutungsvoll war, dass *T. gondii* im nachfolgenden 2. Infektionszyklus<sup>66</sup> einen deutlichen Einbruch der Replikationsrate zeigte. Von diesem konnte sich der Parasit nicht mehr erholen, unabhängig davon, ob im 2. Zyklus erneut Medikamente hinzugegeben wurden oder nicht (Amberg-Johnson und Yeh 2019; Amberg-Johnson et al. 2017).

Unter o. g. Gesichtspunkten sind insbesondere die Ergebnisse des Wachstumszähltests von CA & CB zu diskutieren (s. Kap. 3.1). Dieser zeigte ab 72 h p. i. eine Replikationsstase für die behandelten Genotyp-I-Parasiten des RH-Stammes (s. Kap. 3.1.3), wobei unklar ist, ob auf diese Stase eine parasitizide Wirkung gefolgt wäre. HDQ zeigte diesen Effekt nicht. Der Parasit „erholte“ sich vielmehr, so dass die Teilungsraten wieder zunahm und schließlich zur Lyse der Wirtszelle führte (vgl. Kap. 3.1.3). Eine Erklärung hierfür kann die vermutete bessere Membrangängigkeit von CA & CB sein (s. Kap. 4.3). Denkbar wäre aber auch, dass die beiden Verbindungen entweder stärker auf die bisher bekannten Zielstrukturen wirken (Kap. 4.2.1 und 4.2.2) oder aber zusätzlich auch auf andere, wie den Apicoplasten. Letzteres wäre denkbar, da Hydroxychinolone nachweislich zu einem Verlust des Apicoplasten führen können (Kadri et al. 2014). Weiterhin zeigten Amberg-Johnson und Yeh (2019) bzw. Amberg-Johnson et al. (2017), dass es zu einem Absterben von *T. gondii* nach dem ersten Lysezyklus kam, wenn der Parasit chemotherapeutisch behandelt wurde (s. o.) und durch Beeinflussung des Genoms die Fähigkeit verlor, den Apicoplasten auszubilden. Da der 2. Infektionszyklus gut 48 h nach der ersten Wirtszellinfektion stattfindet (s. Kap. 1.1.2), fällt dies zeitlich in den Bereich, in dem CA & CB im Wachstumszähltest einen starken wachstumshemmenden Effekt zeigten. Demnach kam die Zellteilung des Parasiten 72 h p. i. beinahe zum Erliegen (s. Kap. 4.1), so dass neben einer Replikationsstase auch ein parasitizider Effekt diskutiert wurde. Das dies in Zusammenhang mit einer Störung der Ausbildung des Apicoplasten steht ist spekulativ. Es böten sich mehrere Methoden an, um dies zu überprüfen: Der Apicoplast kann (wie in oben beschriebenen Versuchen) über Gensequenzierung nachgewiesen werden. Es kann eine Transferierung der bereits behandelten Parasiten 48 h p. i. auf neue Wirtszellen erfolgen, um deren Virulenz erneut zu beurteilen. Über eine verlängerte

---

<sup>66</sup> Der 2. Infektionszyklus gibt dabei an, dass bereits eine vorangegangene Infektion von Wirtszellen erfolgte und diese nach mehreren Teilungszyklen des Parasiten rupturierten. Danach erfolgt dann, mit dem Befall neuer Wirtszellen, der 2. Infektionszyklus.

Zeitachse des Auszählungstests kann eruiert werden, ob die Stase 72 h respektive 96 h p. i. andauert bzw. ein parasitizider Effekt einsetzt.<sup>67</sup>

Neben den Chinolonverbindungen, welche nach bisherigem Kenntnisstand an Zielstrukturen innerhalb der Mitochondrien wirken, gibt es noch viele weitere Wirkstoffe gegen *T. gondii*, die aktuell Gegenstand der Forschung sind. Zum einen richten sich diese gegen andere Angriffspunkte wie die Zellmembran, die Mn, das Zytosol, das ER und den Zellkern. Zum andern visieren diese die verschiedenen Entwicklungsstadien von *T. gondii* an, da bisherige Therapeutika überwiegend gegen das tachyzoite Stadium des Parasiten wirken und die bradyzoiten Gewebezysten therapeutisch nur schwer erreichbar sind.

---

<sup>67</sup> Die Methode des Wachstumszähltests ist hierfür jedoch ungeeignet. Eine zeitliche Ausweitung des Versuches würde mit zunehmenden Verunreinigungen der Proben zu Messfehlern führen.



## 5 Zusammenfassung

*T. gondii* ist ein Vertreter der Apicomplexa und findet als obligat intrazellulärer Parasit weltweite Verbreitung. Die hohe Anpassungsfähigkeit erlaubt es *T. gondii* nahezu alle Vertebratenzellen zu infizieren, wobei die Seroprävalenz in Deutschland kürzlich mit 55% angegeben wurde. Die Toxoplasmose stellt insbesondere für werdende Mütter und deren Embryos/Feten, welche durch die Kongenitale Toxoplasmose bedroht werden, sowie für Immunsupprimierte eine Gefahr dar. Neben zunehmender Resistenzbildung sind gegenwärtige Behandlungsmethoden limitiert, da etablierte Medikamente ein hohes Toxizitätsprofil aufweisen und sich vornehmlich gegen Toxoplasmen im tachyzoiten Stadium richten, jedoch die persistierenden, bradyzoiten Gewebezysten therapeutisch kaum erreicht werden.

Innerhalb der Mitochondrien von *T. gondii* konnte die Substanz HDQ als affiner Inhibitor der alternativen NADH-Dehydrogenase am ersten Komplex der Atmungskette identifiziert werden. Als weitere Zielstruktur der Verbindung wurde die Dihydroorotat-Dehydrogenase, ein Enzym der Pyrimidinbiosynthese, bestätigt.

In dieser Arbeit wurden auf Basis von HDQ neue strukturverwandte Verbindungen auf ihre Wirkungsweise hin untersucht. Hierbei übertrafen die 1-Hydroxychinolone *Compound A & B* (CA & CB) in Wachstumszahltests die inhibitorische Potenz von HDQ noch einmal deutlich. Die  $IC_{50}$  (halb-maximale inhibitorische Konzentration) lag dabei unter einem Nanomolar, was in Anbetracht gängiger Arzneimittelkonzentrationen als äußerst niedrig erachtet werden kann und im Hinblick auf Toxizitätsbedenken aussichtsreich ist. Weiterhin zeigte sich, dass CA & CB in Konzentrationen ab 100 nM neben der inhibitorischen auch eine parasitostatische Wirkung auf *T. gondii*-Genotyp-I-Parasiten hatten und der Parasit im Langzeitversuch die Teilungsaktivität beinahe einstellte. Auch eine parasitizide Wirkung wurde diskutiert. Weiterhin konnte unter Einfluss von CA & CB ein signifikanter Abfall des ATP-Gehaltes sowie eine Störung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) in Genotyp-I-Parasiten nachgewiesen werden, was den Einfluss der Verbindungen auf den Stoffwechsel von *T. gondii* verdeutlichte. Das  $\Delta\Psi_m$  kann hierbei als Indikator für die Funktionalität der Atmungskette betrachtet werden, welche als Hauptsyntheseort von ATP gilt.

Um die Wirkungsweise der neuen *Compounds* eingehender zu beleuchten, wurden zwei Deletions-Mutanten untersucht: Bei RH/ $\Delta uprt$  wurde das Enzym UPRT ausgeschaltet, womit die Mutante die essentielle Pyrimidinbiosynthese nur noch über die energetisch ineffizientere

Pyrimidin-*de-novo*-Synthese betreiben kann. Unbehandelt konnte sich RH/ $\Delta uprt$  ähnlich schnell replizieren wie der Wildtyp, was zeigt, dass der Parasit nicht auf den entfallenden *salvage pathway* angewiesen ist. Unter Zugabe der 1-Hydroxychinolone und einhergehender Beeinträchtigung der Enzymaktivität und des Energiestoffwechsels zeigte sich RH/ $\Delta uprt$  hypersensibel und wies innerhalb der ersten 24 Stunden nach Infektion nahezu keine Teilungsaktivität auf. Dies weist darauf hin, dass die Mutante einen Mangel an ATP weniger gut kompensieren kann als der Wildtyp. Bei der zweiten Deletions-Mutante, RH/ $\Delta scs$ , handelt es sich um eine Deletionsmutante der Succinyl-CoA-Synthetase, dem sechsten Enzym des Citratzyklus. Für RH/ $\Delta scs$  konnte unbehindert einerseits eine verminderte Replikationsrate bestätigt werden (-30%), andererseits zeigte sich aber auch, dass ein funktionaler Citratzyklus nicht essentiell für den Lebenszyklus von *T. gondii* ist. RH/ $\Delta scs$  wies keine Hypersensitivität gegenüber den 1-Hydroxychinolonen auf. Eine mögliche Erklärung dafür ist die geringere Teilungsaktivität der Mutante und damit einhergehend ein geringerer ATP-Verbrauch.

Als wichtiger struktureller und funktioneller Aspekt der 1-Hydroxychinolone wurde bereits die Länge der Alkyl-Seitenkette identifiziert. Diese musste über mindestens sechs Kohlenstoffatome verfügen, um wachstumsinhibitorisch wirksam zu sein. Als Grund hierfür wurde eine Zunahme der Lipophilie vermutet, da die Verbindungen die Doppellipidmembran der Mitochondrien passieren müssen, um an ihren Wirkort zu gelangen. Die bei CA & CB zusätzlich addierten Methylgruppen an C-2 respektive C-3 erhöhen deren Lipophilie, was als die wirkungsverstärkende Komponente gegenüber HDQ diskutiert wurde. Diese Hypothese stützend wiesen hydrophilere Substanzen, die ebenfalls für diese Arbeit synthetisiert wurden, kaum eine inhibitorische Wirkung auf. Des Weiteren wurde eine mögliche Wirkung von CA & CB auf den Apicoplasten, einem Zellorganell von *T. gondii*, diskutiert.

Chinolonverbindungen zählen zu den vielversprechendsten Therapeutika der Toxoplasmose. Vorausschauend sind es aber die Synergismen, bewirkt durch eine Kombination verschiedener Therapeutika unterschiedlicher Zielstrukturen, welche das größte Potential zur Behandlung der Toxoplasmose versprechen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abgrall S, Rabaud C, Costagliola D (2001): Incidence and risk factors for toxoplasmic encephalitis in human immunodeficiency virus-infected patients before and during the highly active antiretroviral therapy era. *Clin Infect Dis* 33, 1747-55
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P; Schäfer U (Hrsg.): *Molekularbiologie der Zelle*. 6. Auflage; Wiley-VCH, Weinheim 2017
- Amberg-Johnson K, Yeh E (2019): Host Cell Metabolism Contributes to Delayed-Death Kinetics of Apicoplast Inhibitors in *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 63, e01646-18
- Amberg-Johnson K, Hari SB, Ganesan SM, Lorenzi HA, Sauer RT, Niles JC, Yeh E (2017): Small molecule inhibition of apicomplexan FtsH1 disrupts plastid biogenesis in human pathogens. *Elife* 6, e29865
- 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
- Bajohr LL, Ma L, Platte C, Liesenfeld O, Tietze LF, Gross U, Bohne W (2010): In vitro and in vivo activities of 1-hydroxy-2-alkyl-4(1H)quinolone derivatives against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 517-21
- 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, 1841-51

- Couvreur J, Desmonts G, Thulliez P (1988): Prophylaxis of congenital toxoplasmosis. Effects of spiramycin on placental infection. *J Antimicrob Chemother* 22, 193-200
- de Lima LP, Seabra SH, Carneiro H, Barbosa HS (2015): Effect of 3-bromopyruvate and atovaquone on infection during in vitro interaction of *Toxoplasma gondii* and LLC-MK2 cells. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 5239-49
- Desmonts G, Couvreur J (1984): Congenital toxoplasmosis. Prospective study of the outcome of pregnancy in 542 women with toxoplasmosis acquired during pregnancy. *Ann Pédiatr (Paris)* 31, 805-9
- DGN (2020): Diagnostik und Therapie HIV-1-assoziiierter neurologischer Erkrankungen (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie). S1-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_sz-leitlinien/030-044l\\_S1\\_Diagnostik-Therapie-HIV-1-assoziiierter\\_Erkrankungen\\_20-21-02.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_sz-leitlinien/030-044l_S1_Diagnostik-Therapie-HIV-1-assoziiierter_Erkrankungen_20-21-02.pdf); abgerufen am 12.02.2021
- Donald RG, 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 U S A* 92, 5749-53
- Dubey JP (1998): Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 28, 1019-24
- Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK (1970): The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med* 132, 636-62
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA (1998): Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 11, 267-99
- Ellis JE (1994): Coenzyme Q homologs in parasitic protozoa as targets for chemotherapeutic attack. *Parasitol Today* 10, 296-301

- 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, 3138-42
- Fang J, Uchiumi T, Yagi M, Matsumoto S, Amamoto R, Takazaki S, Yamaza H, Nonaka K, Kang D (2013): Dihydro-orotate dehydrogenase is physically associated with the respiratory complex and its loss leads to mitochondrial dysfunction. *Biosci Rep* 33, e00021
- Ferguson DJ, Hutchison WM, Dunachie JF, Slim JC (1974): Ultrastructural study of early stages of asexual multiplication and microgametogony of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* 82, 167-81
- Fiorillo M, Lamb R, Tanowitz HB, Mutti L, Krstic-Demonacos M, Cappello AR, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP (2016): Repurposing atovaquone: Targeting mitochondrial complex III and OXPHOS to eradicate cancer stem cells. *Oncotarget* 7, 34084-99
- Flegr J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH (2014): Toxoplasmosis--a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS One* 9, e90203
- Fleige T, Pfaff N, Gross U, Bohne W (2008): Localisation of gluconeogenesis and tricarboxylic acid (TCA)-cycle enzymes and first functional analysis of the TCA cycle in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 38, 1121-32
- Freeman K, Tan HK, Prusa A, Petersen E, Buffolano W, Malm G, Cortina-Borja M, Gilbert R (2008): Predictors of retinochoroiditis in children with congenital toxoplasmosis: European, prospective cohort study. *Pediatrics* 121, e1215-22

- Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL (1970): *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 167, 893-6
- Frenkel JK, Ruiz A, Chinchilla M (1975): Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg* 24, 439-43
- Fry M, Pudney M (1992): Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochem Pharmacol* 43, 1545-53
- Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S et al. (2002): Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419, 498-511
- Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y, Boothroyd JC (2001): Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science* 294, 161-5
- Groß U, Roos T, Friese K (2001): Toxoplasmose in der Schwangerschaft. *Dtsch Arztebl* 98, A 3293-300
- Hegewald J, Gross U, Bohne W (2013): Identification of dihydroorotate dehydrogenase as a relevant drug target for 1-hydroxyquinolones in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 190, 6-15
- Hoffmann C, Ernst M, Meyer P, Wolf E, Rosenkranz T, Plettenberg A, Stochr A, Horst HA, Marienfeld K, Lange C (2007): Evolving characteristics of toxoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus-1: clinical course and *Toxoplasma gondii*-specific immune responses. *Clin Microbiol Infect* 13, 510-5

- Hortua Triana MA, Huynh MH, Garavito MF, Fox BA, Bzik DJ, Carruthers VB, Löffler M, Zimmermann BH (2012): Biochemical and molecular characterization of the pyrimidine biosynthetic enzyme dihydroorotate dehydrogenase from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 184, 71-81
- Hortua Triana MA, Cajiao Herrera D, Zimmermann BH, Fox BA, Bzik DJ (2016): Pyrimidine Pathway-Dependent and -Independent Functions of the *Toxoplasma gondii* Mitochondrial Dihydroorotate Dehydrogenase. *Infect Immun* 84, 2974-81
- Hotop A, Hlobil H, Gross U (2012). Efficacy of rapid treatment initiation following primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis* 54, 1545-52
- Hutchison WM, Dunachie JF, Slim JC, Work K (1969): Life cycle of *toxoplasma gondii*. *Br Med J* 4, 806
- Hutchison WM, Dunachie JF, Slim JC, Work K (1970): Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. *Br Med J* 1, 142-4
- Iltzsch MH (1993): Pyrimidine salvage pathways in *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol* 40, 24-8
- Innes EA (2010): A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses Public Health* 57, 1-7
- Jacobs L, Remington JS, Melton ML (1960): The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 46, 11-21
- Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J, Gibbs R (2001): Congenital toxoplasmosis: a review. *Obstet Gynecol Surv* 56, 296-305
- Jones JL, Sehgal M, Maguire JH (2002): Toxoplasmosis-associated deaths among Human Immunodeficiency Virus-infected persons in the United States, 1992-1998. *Clin Infect Dis* 34, 1161

- Jones JL, Lopez A, Wilson M (2003): Congenital toxoplasmosis. *Am Fam Physician* 67, 2131-8
- Kadri D, Crater AK, Lee H, Solomon VR, Ananvoranich S (2014): The potential of quinoline derivatives for the treatment of *Toxoplasma gondii* infection. *Exp Parasitol* 145, 135-44
- Kaye A (2011): Toxoplasmosis: diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. *J Pediatr Health Care* 25, 355-64
- Kerscher S, Dröse S, Zickermann V, Brandt U (2008): The three families of respiratory NADH dehydrogenases. *Results Probl Cell Differ* 45, 185-222
- Kim K, Weiss LM (2004): *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol* 34, 423-32
- Lin SS, Kerscher S, Saleh A, Brandt U, Gross U, Bohne W (2008): The *Toxoplasma gondii* type-II NADH dehydrogenase TgNDH2-I is inhibited by 1-hydroxy-2-alkyl-4(1H)quinolones. *Biochim Biophys Acta* 1777, 1455-62
- Lin SS, Gross U, Bohne W (2009): Type II NADH dehydrogenase inhibitor 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone leads to collapse of mitochondrial inner-membrane potential and ATP depletion in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell* 8, 877-87
- Lin SS, Gross U, Bohne W (2011): Two internal type II NADH dehydrogenases of *Toxoplasma gondii* are both required for optimal tachyzoite growth. *Mol Microbiol* 82, 209-21
- Marshall CS, Curtis AJ, Spelman T, O'Brien DP, Greig J, Shanks L, du Cros P, Casas EC, da Fonseca MS, Athan E et al. (2013): Impact of HIV-associated conditions on mortality in people commencing anti-retroviral therapy in resource limited settings. *PLoS One* 8, e68445



- Martínez-Reyes I, Diebold LP, Kong H, Schieber M, Huang H, Hensley CT, Mehta MM, Wang T, Santos JH, Woychik R et al. (2016): TCA Cycle and Mitochondrial Membrane Potential Are Necessary for Diverse Biological Functions. *Mol Cell* 61, 199-209
- Mather MW, Darrouzet E, Valkova-Valchanova M, Cooley JW, McIntosh MT, Daldal F, Vaidya AB (2005): Uncovering the molecular mode of action of the antimalarial drug atovaquone using a bacterial system. *J Biol Chem* 280, 27458-65
- McCabe RE, Brooks RG, Dorfman RF, Remington JS (1987): Clinical spectrum in 107 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *Rev Infect Dis* 9, 754-74
- McFadden DC, Tomavo S, Berry EA, Boothroyd JC (2000): Characterization of cytochrome b from *Toxoplasma gondii* and Q(o) domain mutations as a mechanism of atovaquone-resistance. *Mol Biochem Parasitol* 108, 1-12
- McFarland MM, Zach SJ, Wang X, Potluri LP, Neville AJ, Vennerstrom JL, Davis PH (2016): Review of Experimental Compounds Demonstrating Anti-Toxoplasma Activity. *Antimicrob Agents Chemother* 60, 7017-34
- McLeod R, Kieffer F, Sautter M, Hosten T, Pelloux H (2009): Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 320-44
- Meissner M, Schlüter D, Soldati D (2002): Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science* 298, 837-40
- Melo AM, Bandejas TM, Teixeira M (2004): New insights into type II NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 603-16
- Montazeri M, Sharif M, Sarvi S, Mehrzadi S, Ahmadpour E, Daryani A (2017): A Systematic Review of *In vitro* and *In vivo* Activities of Anti-Toxoplasma Drugs and Compounds (2006-2016). *Front Microbiol* 8, 25

- Montoya JG, Liesenfeld O (2004): Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 1965-76
- Montoya JG, Remington JS (2008): Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis* 47, 554-66
- Muñiz-Hernández S, Carmen MG, Mondragón M, Mercier C, Cesbron MF, Mondragón-González SL, González S, Mondragón R (2011): Contribution of the residual body in the spatial organization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites within the parasitophorous vacuole. *J Biomed Biotechnol* 2011, 473983
- Naujoks B: Inhibierung der *Toxoplasma-gondii*-Replikation durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette. Med. Diss. Göttingen 2008
- Nicolle C, Manceaux LH (1909): Sur un protozoair nouveau du gondi. *C R Hebd Séances Acad Sci* 148, 369-72
- Nina PB, Morrissey JM, Ganesan SM, Ke H, Pershing AM, Mather MW, Vaidya AB (2011): ATP synthase complex of *Plasmodium falciparum*: dimeric assembly in mitochondrial membranes and resistance to genetic disruption. *J Biol Chem* 286, 41312-22
- Porter SB, Sande MA (1992): Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 327, 1643-8
- Pramanik KC, Boreddy SR, Srivastava SK (2011): Role of mitochondrial electron transport chain complexes in capsaicin mediated oxidative stress leading to apoptosis in pancreatic cancer cells. *PLoS One* 6, e20151
- Ramakrishnan S, Docampo MD, Macrae JI, Pujol FM, Brooks CF, van Dooren GG, Hiltunen JK, Kastaniotis AJ, McConville MJ, Striepen B (2012): Apicoplast and endoplasmic reticulum cooperate in fatty acid biosynthesis in apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 287, 4957-71

- Rasmusson AG, Soole KL, Elthon TE (2004): Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annu Rev Plant Biol* 55, 23-39
- Roos T, Martius J, Gross U, Schrod L (1993): Systematic serologic screening for toxoplasmosis in pregnancy. *Obstet Gynecol* 81, 243-50
- Sabin AB, Feldman HA (1948): Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (Toxoplasma). *Science* 108, 660-3
- Saleh A, Friesen J, Baumeister S, Gross U, Bohne W (2007): Growth inhibition of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* by nanomolar concentrations of 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone, a high-affinity inhibitor of alternative (type II) NADH dehydrogenases. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 1217-22
- Salviz M, Montoya JG, Nadol JB, Santos F (2013): Otopathology in congenital toxoplasmosis. *Otol Neurotol* 34, 1165-9
- Saremy S, Boroujeni ME, Bhattacharjee B, Mittal V, Chatterjee J (2011): Identification of potential apicoplast associated therapeutic targets in human and animal pathogen *Toxoplasma gondii* ME49. *Bioinformatics* 7, 379-83
- Schwartzmann JD, Pfefferkorn ER (1981): Pyrimidine synthesis by intracellular *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 67, 150-8
- Seeber F, Boothroyd JC (1996): *Escherichia coli* beta-galactosidase as an in vitro and in vivo reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Gene* 169, 39-45
- Sheiner L, Vaidya AB, McFadden GI (2013): The metabolic roles of the endosymbiotic organelles of *Toxoplasma* and *Plasmodium* spp. *Curr Opin Microbiol* 16, 452-8
- Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM (2009): Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364, 2749-61

- Skariah S, McIntyre MK, Mordue DG (2010): *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. *Parasitol Res* 107, 253-60
- Smith AT, Livingston MR, Mai A, Filetici P, Queener SF, Sullivan WJ Jr (2007): Quinoline derivative MC1626, a putative GCN5 histone acetyltransferase (HAT) inhibitor, exhibits HAT-independent activity against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 1109-11
- Splendor A (2009): A new protozoan parasite in rabbits. *Int J Parasitol* 39, 861-2
- Srivastava IK, Rottenberg H, Vaidya AB (1997): Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *J Biol Chem* 272, 3961-6
- Sternisek PS: Einfluss des Pyrimidin *Salvage Pathway* Enzyms UPRT auf die Sensitivität von *Toxoplasma gondii* gegenüber Inhibitoren der Atmungskette. Biol. Dipl.-Arb. Göttingen 2009
- Sturm A, Mollard V, Cozijnsen A, Goodman CD, McFadden GI (2015): Mitochondrial ATP synthase is dispensable in bloodstage *Plasmodium berghei* rodent malaria but essential in the mosquito phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 10216-23
- Tener AM, Heckerroth AR, Weiss LM (2000): *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30, 1217-58
- Thiébaud R, Leproust S, Chêne G, Gilbert R (2007): Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a meta-analysis of individual patients' data. *Lancet* 369, 115-22
- Thoden J, Potthoff A, Bogner JR, Brockmeyer NH, Esser S, Grabmeier-Pfistershammer K, Haas B, Hahn K, Härter G, Hartmann M et al. (2013): Therapy and prophylaxis of opportunistic infections in HIV-infected patients: a guideline by the German and Austrian AIDS societies (DAIG/ÖAG) (AWMF 055/066). *Infection* 41, 91-115

- Torgerson PR, Mastroiacovo P (2013): The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull World Health Organ* 91, 501-8
- Uyemura SA, Luo S, Vieira M, Moreno SN, Docampo R (2004): Oxidative phosphorylation and rotenone-insensitive malate- and NADH-quinone oxidoreductases in *Plasmodium yoelii* mitochondria in situ. *J Biol Chem* 279, 385-93
- Vercesi AE, Rodrigues CO, Uyemura SA, Zhong L, Moreno SN (1998): Respiration and oxidative phosphorylation in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* 273, 31040-7
- Weiss LM, Dubey JP (2009): Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol* 39, 895-901
- Wilking H, Thamm M, Stark K, Aebischer T, Seeber F (2016): Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. *Sci Rep* 6, 22551

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Uwe Groß bedanken, da er mir die Möglichkeit bot, die Dissertation am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Georg-August-Universität Göttingen anzufertigen. Er hat mich stets mit seinem Fachwissen, konstruktiver Kritik und Anregungen unterstützt. Am Institut habe ich das angenehme Arbeitsklima genossen und die Expertise der Forschungsgruppe sehr wertgeschätzt.

Weiter gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. rer. nat. Wolfgang Bohne für die Eingrenzung des Themas und die durchweg kompetente und freundliche Betreuung. Er unterstützte mich mit zahlreichen Vorschlägen und Korrekturen für die Anfertigung der Dissertation. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Andreas Zautner für seine Mithilfe bedanken, der mich insbesondere bei Fragen der Statistik unterstützte.

## Lebenslauf

Ich wurde am 09.07.1980 als erster Sohn von Heike und Horst Platte in Rinteln im Weserbergland geboren.

Die Grundschule besuchte ich in Rehren im Auetal und wechselte dann auf das Gymnasium von Rinteln. Nachdem ich im Jahr 2000 das Abitur erlangt hatte, leistete ich meinen Zivildienst im Rintelner Krankenhaus und konnte so bereits erste Erfahrungen mit dem medizinischen Alltag sammeln. Anschließend verschlug es mich nicht direkt zur Medizin, sondern zunächst zu einem Dualen Studium, welches ich nach drei Jahren mit dem Bachelorgrad (B. sc.) in Wirtschaftsinformatik abschloss.

Im Jahre 2005 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung legte ich im Jahr 2007 ab; das Studium schloss ich im November 2011 ab. Im selben Zeitraum meldete ich mein Dissertationsthema an, nachdem ich bereits zwei Jahre in der Abteilung für Parasitologie am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Uwe Groß praktische Erfahrungen im Labor gesammelt hatte.

Parallel zur Dissertationsarbeit nahm ich meine Tätigkeit als Arzt auf und stehe aktuell vor dem Abschluss der Facharztreihe für Psychiatrie und Psychotherapie. Dabei war ich in verschiedenen Kliniken als Stationsarzt tätig: Der KRH Psychiatrie Wunstorf, dem Maßregelvollzugszentrum Niedersachsen in Moringen, dem Krankenhaus Lindenbrunn in der Klinik für Neurologie in Coppenbrügge sowie in der Medianklinik für Psychosomatik und Verhaltensmedizin in Bad Pyrmont.