

**Therapie der Toxoplasma-Enzephalitis -  
In-vitro- und In-vivo-Modelle zur Passage von  
antiparasitären Substanzen durch  
die Blut-Hirn-Schranke**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Ildikò Rita Dunay**

aus Jászberény

Berlin, März 2005



- 1. Gutachter : Prof. Dr. Oliver Liesenfeld**
- 2. Gutachter : Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting**

**Disputation am : 09.06.2005**

"Nem elég a célt látni;  
járható útja kell!  
Nem elég útra lelni,  
az úton menni kell!  
Egyedül is! Elsőnek,  
elől indulni el!  
Nem elég elindulni,  
de mást is hívni kell!  
S csak az hívjon magával,  
aki vezetni mer!"

Váci Mihály

**Für meine Eltern**

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Campus Benjamin Franklin der Charité, Abteilung Medizinische Mikrobiologie und Infektionsimmunologie, unter der Leitung von Prof. Dr. Oliver Liesenfeld durchgeführt. Ich danke ihm für die kontinuierliche und motivierende Unterstützung meiner Arbeit sowie die Möglichkeit, unsere Ergebnisse auf zahlreichen Kongressen präsentieren zu dürfen und dadurch weiterführende Ideen zu gewinnen. Frau Prof. Monika Schäfer-Korting danke ich für die langjährige Kooperation und für den Vorsitz in der Promotionskommission.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Berit Söhl-Kielczynski, die mit mir zusammen vier Jahre lang so viel geleistet hat, und das immer bei sehr guter Laune.

Frau Dr. Maria Deli danke ich für ihre ständige Ansprechbarkeit und Hilfe bei alle Fragen und Problemen.

Ein Dankeschön gilt:

- Herrn Dr. Markus Heimesaat für die intensiven belebenden Gespräche,
  - Frau Andrea Maletz für die „schwesterliche“ Zusammenarbeit,
  - Herrn Uwe Lohmann für die anregende Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen sehr inspirierenden Diskussionen,
  - Frau Ines Sauer für die tolle Zusammenarbeit und den permanenten Austausch von Ideen,
  - Frau Dr. Margitta Dathe und Herrn Nadiem Bushrab für die gute Kooperation,
  - Solvy Wolke, Uschi Rüschenndorf, Jytte Krake und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsimmunologie, die zur angenehmen Arbeitsatmosphäre und zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.
- Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Helmut Hahn für seine unermüdliche, berufliche und sportliche Motivation, die mir mehr als “5%” wert ist. Ich bedanke mich für die einmalige Gelegenheit, die Doktorarbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Schließlich möchte ich meinen Eltern danken, deren moralische Unterstützung mir so viel Kraft und Ausdauer gegeben hat. Ihnen widme ich diese Arbeit.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND HINTERGRUND</b>	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b>DIE BLUT-HIRN-SCHRANKE (BHS)</b>	<b>9</b>
1.1.1	Aufbau und Funktion der BHS	9
1.1.2	Passage von Molekülen durch die BHS	13
1.1.3	Probleme des Gehirntargetings	13
1.1.4	In-vitro-Modelle der BHS	14
1.1.4.1	Endothelzelllinien	15
1.1.4.2	Primäre Endothelzellen	15
1.1.4.3	Zellkulturtechniken	16
1.1.4.4	Kokultur mit Astrozyten	16
1.1.4.5	Isolierte Kapillaren	17
<b>1.2</b>	<b>TOXOPLASMA-ENZEPHALITIS</b>	<b>18</b>
1.2.1	Allgemein	18
1.2.2	Therapie	18
1.2.2.1	Standardtherapeutika	19
1.2.2.1.1	Pyrimethamin	19
1.2.2.1.2	Sulfadiazin	20
1.2.2.1.3	Clindamycin	20
1.2.2.2	Alternativ-Therapeutika	21
1.2.2.2.1	Atovaquon	21
1.2.2.2.2	Weitere Alternativ-Therapeutika	22
1.2.2.3	Entwicklung neuer Therapeutika	22
1.2.3	Tiermodelle der Toxoplasma-Enzephalitis	23
1.2.3.1	Chronisch-progrediente und latente Toxoplasmose	24
1.2.3.2	Medikamenten- und Antikörper-induzierte Reaktivierungstoxoplasmose	24

1.2.3.3	Reaktivierungstoxoplasmose in Interferon- $\gamma$ -defizienten Mäusen.....	25
<b>2</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>SUBSTANZEN .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>GERÄTE.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>33</b>
3.3.1	In-vitro-Untersuchungen .....	33
3.3.1.1	Untersuchungen mit Zellen der BHS .....	33
3.3.1.1.1	Kultivierung von Endothelzelllinien .....	33
3.3.1.1.2	Gewinnung von primären Rattenendothelzellen .....	34
3.3.1.1.3	Isolierung von Astrozyten und Generierung von Astrozyten-konditioniertem Medium .....	35
3.3.1.1.4	Charakterisierung der Endothelzellen und Astrozyten .....	36
3.3.1.1.5	Etablierung des Kokultur-Modells .....	37
3.3.1.1.5.1	Kokultivierung von Astrozyten und Endothelzellen.....	37
3.3.1.1.5.2	Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes .....	38
3.3.1.1.5.3	Messung der parazellulären Permeabilität.....	38
3.3.1.1.6	Isolierung von Mikrokapillaren .....	40
3.3.1.2	Interaktion von Nanosuspensionen mit Endothelzellen .....	41
3.3.1.2.1	Herstellung von Nanosuspensionen .....	41
3.3.1.2.2	Charakterisierung von Nanosuspensionen.....	42
3.3.1.2.3	Zytotoxizitätstest.....	42
3.3.1.2.4	Passage von Nanosuspensionen durch die BHS im Kokultur-System .....	43
3.3.1.3	Interaktion von Toxoplasma-Tachyzoiten mit Endothelzellen .....	43
3.3.1.3.1	Toxoplasma-Tachyzoiten .....	43
3.3.1.3.2	Zytotoxizitätstest.....	43

3.3.1.3.3	Interaktion mit <i>tight junction</i> -Proteinen .....	44
3.3.1.4	Interaktion von Toxoplasma-Tachyzoiten mit Mikrokapillaren .....	45
3.3.2	In-vivo-Untersuchungen .....	45
3.3.2.1	Etablierung des Infektionsmodells der Reaktivierungstoxoplasmose .....	45
3.3.2.1.1	Optimierung der akuten Therapie mit Atovaquon-Nanosuspensionen .....	46
3.3.2.1.2	Etablierung des Erhaltungstherapie.....	46
3.3.2.2	Histologie .....	48
3.3.2.3	Immunhistologie.....	48
3.3.2.4	Atovaquon-Konzentrationen im Serum und Gewebe.....	49
3.3.2.4.1	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	49
3.3.2.4.2	Massenspektrometrie (MS).....	50
3.3.2.5	Statistische Analyse .....	50
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN MIT ENDOTHELZELLEN.....</b>	<b>51</b>
4.1.1	Etablierung des In-Vitro-Modells der BHS .....	51
4.1.1.1	Isolierung und Kultivierung von primären Rattenendothelzellen .....	51
4.1.1.2	Immunhistochemische Charakterisierung der Zellen der Blut-Hirn-Schranke..	54
4.1.1.3	Etablierung des Kokultur-Modells .....	56
4.1.1.4	Analyse der Schrankenfunktion .....	58
4.1.1.4.1	Mikroskopische Untersuchungen.....	58
4.1.1.4.2	Physikalische Untersuchungen .....	61
4.1.1.4.3	Chemische Untersuchungen .....	62
4.1.2	Zusammenfassung und Bedeutung der Ergebnisse .....	62
4.1.3	Interaktion von Nanosuspensionen mit Endothelzellen .....	64
4.1.4	Zusammenfassung und Bedeutung der Ergebnisse .....	68
4.1.5	Interaktion von <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten mit der Zellen der BHS .....	68

4.1.6 Interaktion von <i>T. gondii</i> -Tachyzoiten mit <i>tight junction</i> -Proteinen der Hirnendothelzellen.....	70
<b>4.2 IN-VIVO-UNTERSUCHUNGEN IM INFEKTIONSMODELL DER REAKTIVIERUNGSTOXOPLASMOSE.....</b>	<b>73</b>
4.2.1 Akuttherapie bei Reaktivierungstoxoplasmose.....	73
4.2.2 Zusammenfassung und Bedeutung der Ergebnisse .....	76
4.2.3 Erhaltungstherapie der Reaktivierungstoxoplasmose .....	77
4.2.3.1 Überlebensrate.....	77
4.2.3.2 Histologie/ Immunhistologie.....	79
4.2.3.3 Atovaquonkonzentrationen in Serum und Gewebe.....	82
4.2.3.4 Zusammenfassung und Bedeutung der Ergebnisse.....	84
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>87</b>
<b>6 SUMMARY .....</b>	<b>89</b>
<b>7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>91</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>92</b>
<b>9 CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>101</b>
<b>10 PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE.....</b>	<b>102</b>