

**Untersuchungen zur *in vitro* Aktivität  
von Tetrahydrolipstatin gegenüber  
dem Darmparasiten  
*Giardia duodenalis***

**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  
**Juliane Hahn**

Berlin 2014

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 2010 bis Juli 2014 unter Anregung und Leitung von Herrn Prof. Dr. Kolodziej an der Freien Universität Berlin im Fachbereich Pharmazeutische Biologie des Instituts für Pharmazie angefertigt. Ein Großteil der praktischen Arbeit wurde in Kooperation mit dem Robert Koch Institut durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. Herbert Kolodziej

Gutachter: Prof. Dr. Heinz H. Pertz

Disputation am 27. Februar 2015

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die am Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beteiligt waren, indem sie mich auf meinem Weg begleitet und unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Herbert Kolodziej für sein entgegengebrachtes Vertrauen, seine wissenschaftliche Betreuung sowie seine stetige Unterstützung. Seine wertvollen und hilfreichen Anregungen in fachlichen als auch privaten Belangen haben ihn für mich zu einem wichtigen und freundschaftlichen Ansprechpartner werden lassen.

Ebenso bedanke ich mich herzlich bei Professor Heinz Pertz für die Übernahme der Gutachtertätigkeit und sein Interesse an meiner Arbeit.

Ich bedanke mich bei Dr. Anton Aebischer und der gesamten Arbeitsgruppe FG16, insbesondere bei Dr. Christian Klotz, für die freundliche Aufnahme am Robert Koch Institut, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in angenehmer Atmosphäre und das fortwährende Interesse an meinem Forschungsprojekt. Dr. Michael Laue und seinen Mitarbeitern bin ich für ihre rasche und kompetente Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen dankbar.

Ein großes Dankeschön gebührt meinen geschätzten Kollegen und Freunden Ina Katharina Lucas, Nora Frohnecke, Stefanie Marek, Aurica-Maria Kaufeld, Adriana Preiß und Christoph Ufermann für zahlreiche und fruchtbare wissenschaftliche Diskussionen. Ihr Vermögen, mich auch an anstrengenden und frustrierenden Tagen zum Lachen zu bringen, hat so manches erleichtert.

Meiner lieben Freundin Sandra Otto bin ich dankbar, dass sie immer und jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte und Abwechslung vom Forschungsalltag in mein Leben brachte. Ich kann mich immer auf sie verlassen.

Nicht zuletzt, sondern im Besonderen danke ich meinem Vater, meinen Schwestern Claudia und Luisa, meiner Oma und Marina, die mir unermüdlich Mut zusprachen und in jeder Hinsicht zur Seite standen. Ich hätte nicht auf sie verzichten können.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>X</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>12</b>
1.1. <i>Giardia</i> - ein Überblick	12
1.1.1. Molekulare Klassifizierung und Charakterisierung von <i>G. duodenalis</i>	13
1.1.2. Lebenszyklus	15
1.2. Giardiasis und Epidemiologie	17
1.3. Der giardiale Stoffwechsel	20
1.4. Das giardiale Zytoskelett	21
1.5. Therapie der Giardiasis	23
1.6. Tetrahydrolipstatin (THL)	26
1.7. Zielsetzung	28
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>30</b>
2.1. Geräte	30
2.2. Chemikalien, Testsubstanzen und Verbrauchsmaterialien	31
2.3. Medien, Puffer und Lösungen	33
2.4. <i>Giardia duodenalis</i>	36
2.4.1. Genotypisierung	37
2.4.2. Agarose-Gelelektrophorese	39
2.4.3. Aufreinigung von Zysten und Exzystierung	39
2.4.4. Kultivierung	41
2.4.5. Herstellung eines <i>Giardia duodenalis</i> -Lysates	41
2.4.6. Kryokonservierung und Auftauen von <i>Giardia duodenalis</i> -Trophozoiten	42
2.5. Proteinbestimmung	42
2.6. Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer	43
2.7. Ermittlung der Wachstumskonstanten	43
2.8. Resazurin Assay	43

---

2.9.	Morphologische Untersuchungen	44
2.9.1.	Herstellen von mikroskopischen Präparaten	44
2.9.2.	Färben von Präparaten	45
2.9.3.	Elektronenmikroskopie (EM)	47
2.9.3.1.	Transmissions-EM	47
2.9.3.2.	Raster-EM	48
2.10.	Untersuchungen zum Fettstoffwechsel	49
2.10.1.	Nilrotfärbung	49
2.10.2.	BODIPY-Phosphatidylcholin	49
2.10.3.	Phospholipase A <sub>1</sub> Assay	50
2.10.4.	Lipoproteinlipase Assay	52
2.11.	Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen	53
2.12.	Dokumentation der mikroskopischen Präparate	54
2.13.	Analyse von Wirkstoffkombinationen	54
2.14.	Statistik	57
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>58</b>
3.1.	Antigiardiales Potential von THL <i>in vitro</i>	58
3.1.1.	Modifizierung und Optimierung eines Resazurin Assays zur Ermittlung der Proliferation von <i>Giardia duodenalis</i> -Trophozoiten	58
3.1.2.	Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration für Referenzstämme sowie Patientenisolat	61
3.1.3.	Wirkstoffkombinationen und ihre anti-giardialen Effekte	66
3.1.4.	Einfluss der Konzentration auf anti-giardiale Effekte (giardia- versus giardiastatisch)	68
3.2.	Mikroskopische Beurteilung des anti-giardialen Effektes von THL auf <i>Giardia duodenalis</i> -Trophozoiten	70
3.2.1.	Morphologische Veränderungen nach Behandlung mit THL	70
3.2.2.	Ultrastrukturelle Veränderungen nach Behandlung mit THL	73
3.3.	Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel	79
3.3.1.	Lipase-Aktivität und deren Beeinflussung durch THL	81
3.3.2.	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel	84
3.3.2.1.	Fettfärbung	84

---

3.3.2.2. Aufnahme von BODIPY-markiertem Phosphatidylcholin	87
<b>4. Diskussion</b>	<b>91</b>
4.1. Antigiardiale Aktivität der Wirksubstanzen	91
4.1.1. Optimierung des Resazurin Assays	92
4.1.2. Antigiardiale Aktivität in Korrelation zur Assemblage	93
4.2. Charakterisierung der antigiardialen Aktivität von THL	97
4.2.1. THL in Kombination mit MTZ	102
4.3. Ausblick und Fazit	104
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>106</b>
<b>6. Summary</b>	<b>108</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>110</b>
<b>Publikationsverzeichnis</b>	<b>122</b>
<b>Anhang</b>	<b>123</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>126</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologie von <i>G. duodenalis</i> _____	13
Abbildung 2: Lebenszyklus von <i>G. duodenalis</i> _____	17
Abbildung 3: Tetrahydrolipstatin (THL) _____	26
Abbildung 4: Bestimmung der Zellzahl _____	43
Abbildung 5: Umsetzung des Phospholipase A <sub>1</sub> -Substrats durch die Lecitase® Ultra	51
Abbildung 6: Umsetzung des Enzchek® Lipase Substrats durch die LPL_____	52
Abbildung 7: Umsetzung von Resazurin in Resorufin durch Reduktion _____	59
Abbildung 8: Bestimmung der optimalen Testbedingungen eines Resazurin-basierten Wachstumstests für <i>G. duodenalis</i> _____	60
Abbildung 9: Antigiardiale Aktivität von THL und MTZ im Resazurin Assay für die Referenzstämme WB C6 (AI) und GS H7 (B) sowie die Patientenisolat 103-01/C1 (AI) und 187-01/B1 (B)_____	62
Abbildung 10: Antigiardiale Aktivität von THL und MTZ im Resazurin Assay für die Patientenisolat 14-03/F7, 115-01/H2 und 143-01/D3 (AII) _____	63
Abbildung 11: Wachstumskonstanten $\lambda$ für <i>Giardia duodenalis</i> -Stämme _____	65
Abbildung 12: Additiver Effekt von MTZ und THL in der Kombinationsindex- Methode nach Chou und Talalay_____	67
Abbildung 13: Abhängigkeit der giardiaziden Wirkung von Konzentration und Genotyp _____	69
Abbildung 14: Veränderte Trophozoitenmorphologie nach THL Behandlung _____	71
Abbildung 15: THL induzierte Veränderungen der Trophozoitenmembran im Elektronenmikroskop (REM-Aufnahmen) _____	72
Abbildung 16: Keine Beeinträchtigung des giardialen Zytoskeletts unter THL-Behandlung im Elektronenmikroskop (TEM-Aufnahmen) _____	74
Abbildung 17: THL zeigt keine Auswirkung auf Mikrotubulstrukturen der Trophozoiten_____	76
Abbildung 18: THL zeigt keinen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität der detektierbaren Mikrotubulstrukturen _____	78
Abbildung 19: Einfluss von THL und Paclitaxel auf die anterolaterale Flagellenlänge _____	79

---

Abbildung 20: PLA <sub>1</sub> -Aktivität der <i>G. duodenalis</i> -Lysatfraktionen	82
Abbildung 21: <i>Giardia</i> -Lysat zeigt keine hydrolytische Eigenschaft gegenüber Triglyceriden	83
Abbildung 22: Verminderte Anfärbbarkeit von Lipiden nach THL-Behandlung der WB C6-Trophozoiten	85
Abbildung 23: Einfluss von THL auf die Fluoreszenzintensitäten der mit Nilrot detektierbaren Lipide der perinukleären Membran	86
Abbildung 24: Fluorophormarkiertes Phosphatidylcholin	87
Abbildung 25: BODIPY-Phosphatidylcholin-Aufnahme und Verteilung in WB C6-Trophozoiten unter THL-Behandlung	88
Abbildung 26: THL führt zu einem verminderten BODIPY-Phosphatidylcholin-Signal in WB C6-Trophozoiten	89



---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Giardia</i> -Arten _____	12
Tabelle 2: Molekulare Klassifizierung von <i>G. duodenalis</i> _____	14
Tabelle 3: Therapieoptionen der Giardiasis _____	26
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte _____	30
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Substanzen und Verbrauchsmaterialien _____	31
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Medien, Puffer und Lösungen _____	33
Tabelle 7: <i>Giardia duodenalis</i> -Stämme _____	36
Tabelle 8: PCR-Einstellungen für die Genotypisierung _____	37
Tabelle 9: PCR-Ansätze und Primer für die Genotypisierung _____	38
Tabelle 10: Sequenzansatz und Bedingungen für die Sequenzreaktion _____	39
Tabelle 11: IC <sub>50</sub> -Werte ( $\mu\text{M} \pm \text{SD}$ ) für THL und MTZ aus dem Resazurin Assay _____	64
Tabelle 12: Auflistung putativer Lipasen von <i>G. duodenalis</i> _____	80

---

## Abkürzungsverzeichnis

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
BODIPY	Bordipyrromethen (Difluoroboraindacen)
β-BODIPY® FL C <sub>12</sub> -HPC	2-(4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-dodecanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
BSA	Bovines Serumalbumin
CHMP	<i>Committee for Medicinal Products for Human Use</i> (Ausschuss für Humanarzneimittel)
CI	<i>Combination Index</i> (Kombinationsindex)
CWP	<i>Cyst Wall Protein</i>
Cy 3	Carbocyanin 3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Europäische Arzneimittel-Agentur)
ESV	<i>Encystation-Specific Vesicles</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
IgA	Immunglobulin A
IgM	Immunglobulin M
IL-6	Interleukin-6
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase)
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LPL	Lipoproteinlipase
min	Minute
MTZ	Metronidazol
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PLA <sub>1</sub>	Phospholipase A <sub>1</sub>
RKI	Robert Koch-Institut

---

SD	Standardabweichung
Syn.	Synonym
THL	Tetrahydrolipstatin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkungen
U/mg	Units/Milligramm
U/mL	Units/Milliliter
V/cm	Volt/Zentimeter
V/V	Volumen/Volumen (Volumenkonzentration)
m/V	Masse/Volumen (Massenkonzentration)
x g	x fache der Erdbeschleunigung

## 1. Einleitung

### 1.1. *Giardia* - ein Überblick

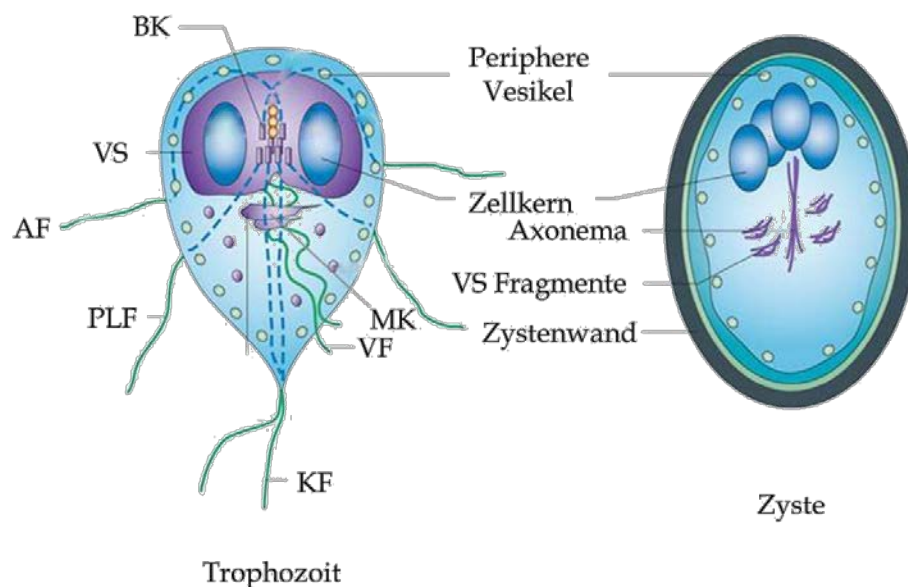
*Giardia* ist eine Gattung von Dünndarmparasiten und wurde das erste Mal bereits 1681 von van Leeuwenhoek beschrieben, als er in einem Brief an einen Freund seinen diarrhöischen Stuhl charakterisierte (BOREHAM *et al.*, 1990). Als zweikernige, amitochondriale und begeißelte eukaryotische Einzeller werden sie zu den Diplomonaden gezählt. Gegenwärtig werden aufgrund morphologischer Merkmale sechs Arten unterschieden, die jeweils unterschiedliche Genotypen aufweisen (Tab. 1). *Giardia duodenalis* (Syn. *G. lamblia*, *G. intestinalis*) als eine Art infiziert die verschiedensten Säuger, darunter den Menschen, und weist eine große genetische Vielfalt auf (MONIS *et al.*, 1999, ADAM, 2001).

**Tabelle 1: *Giardia*-Arten**

Art	Wirt
<i>G. agilis</i>	Amphibien
<i>G. muris</i>	Nager
<i>G. duodenalis</i>	verschiedene Säugetiere
<i>G. ardeae</i>	Reiher
<i>G. psittaci</i>	Papageien
<i>G. microti</i>	Nager, insbesondere Wühlmäuse, Bisamratten

Der Parasit ist ein aerotoleranter Anaerobier und durchläuft zwei verschiedene Entwicklungsstadien. Das vegetative und krankheitsbildende Trophozitenstadium sowie die infektiöse Dauerform, die Zyste. Zysten sind rundlich bis oval, ungefähr 8 µm breit und 12 µm lang. Sie werden von einer 0,3-0,5 µm dicken Zystenwand umgeben, welche die Zysten außerhalb des Wirtes schützt. Die Zystenwand besteht aus einer äußeren, filamentösen Membran und einer darunter liegenden inneren Doppelmembran. Die äußere Membran ist aus Polysacchariden (zum größten Teil β-1,3-N-acetyl-D-Galactosamin-Einheiten) und sogenannten *Cyst Wall Proteins* (CWP 1-3, derzeit sind drei identifiziert) zusammengesetzt und somit für die hohe Widerstandsfähigkeit und geringe Löslichkeit in Wasser verantwortlich (GERWIG *et al.*, 2002, ANKARKLEV *et al.*, 2010). Trophoziten haben eine birnen- bis tropfenförmige Gestalt und messen 12-15 µm in ihrer Länge sowie 5-9 µm in ihrer Breite. Dabei sind sie dorsal gewölbt und ventral abgeflacht (DAWSON and HOUSE, 2010, ANKARKLEV *et al.*, 2010). Das komplexe giardiale Zytoskelett besteht aus einzigartigen Strukturen, wie dem Mediankörper, der Ventralscheibe und der Funis. Die Funktionen von

Mediankörper und Funis sind derzeit noch unbekannt. Die Ventralscheibe dient dem Parasiten zum Adhären an das Darmepithel. *Giardia* besitzt genauso Elemente, die in begeißelten Protisten häufiger vorkommen, wie die vier Flagellenpaare, die hauptsächlich der Mobilität dienen und den Basalkörpern, zwischen den beiden Zellkernen positioniert, entspringen (DAWSON, 2010).



**Abbildung 1: Morphologie von *G. duodenalis***

Schematisch dargestellt sind der zweikernige Trophozoit und die vierkernige Zyste von *G. duodenalis*. Der Trophozoit mit der typischen Birnenform weist den charakteristischen Mediankörper (MK) auf und besitzt vier Flagellenpaare (anterolaterale Flagellen = AF, posterolaterale Flagellen = PLF, kaudale Flagellen = KF, ventrale Flagellen = VF), die den Basalkörpern (BK) entspringen und der Bewegung dienen, während das Anheften an das Darmepithel über die Ventralscheibe (VS) gewährleistet wird. (modifiziert nach ANKARKLEV *et al.*, 2010)

### 1.1.1. Molekulare Klassifizierung und Charakterisierung von *G. duodenalis*

Anhand von molekular-phylogenetischen Untersuchungen wird *G. duodenalis* in acht verschiedene Genotypen, sogenannte Assemblagen (A-H), unterteilt. Von denen werden einige wiederum in weitere Subtypen klassifiziert (bspw.: AI, AII) (AMAR *et al.*, 2002). Dazu werden sogenannte *Housekeeping-Genes*, d.h. konstitutiv exprimierte Gene ( $\beta$ -Giardin, Glutamat-Dehydrogenase, Triosephosphat-Isomerase und 18S rRNA-Gen) herangezogen und deren DNA-Sequenz analysiert (MONIS *et al.*, 2003, BERTRAND *et al.*, 2005, CACCIO and RYAN, 2008). Ein festgelegtes Typisierungsschema zur Charakterisierung von Genotypen gibt es derzeit nicht.

Assemblage A und B können die meisten Säugetiere infizieren, sind allerdings die einzigen Genotypen, die bisher im Menschen identifiziert wurden. Beiden Assemblagen werden daher ein hohes zoonotisches Potential zugesprochen. Obwohl die Weltgesundheitsorganisation (WHO) *Giardia* 1979 als Zoonose-Erreger eingestuft hat - es gibt Hinweise für die Übertragung der Assemblagen A und B von Tier zu Mensch (SPRONG *et al.*, 2009, LEBBAD *et al.*, 2010) - ist die zoonotische Relevanz für die Gesundheit der Bevölkerung noch unklar.

In der Gruppe der Assemblage B besteht generell eine größere genetische Vielfalt als in der von Assemblage A (THOMPSON, 2009). Der Subtyp AI wird in der Regel in Tieren gefunden, während AII vor allem im Menschen vorkommt (CACCIO and RYAN, 2008). Weltweit betrachtet, scheint eine Infektion des Menschen mit der Assemblage B gegenüber A zu dominieren (JERLSTROM-HULTQVIST *et al.*, 2010a). Assemblagen C-H hingegen werden als wirtsspezifisch angesehen (Tab. 2) (CACCIO and RYAN, 2008, FENG and XIAO, 2011). Interessanterweise werden auch Mischinfektionen beobachtet. Eine mögliche Ursache ist die Aufnahme von genetisch verschiedenen Zysten durch einen Wirt oder eine nachfolgende Infektion von einem bereits infizierten Wirt mit einer anderen Assemblage. Zudem wurde das Auftreten von gemischten Genotypen beobachtet, das mit dem Vorkommen allelischer Heterogenität und/oder genetischer Rekombination erklärt werden kann (SPRONG *et al.*, 2009, CACCIO and SPRONG, 2010).

### **Tabelle 2: Molekulare Klassifizierung von *G. duodenalis***

modifiziert nach CDC, 2014 <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/epi.html>,  
SPRONG *et al.*, 2009, FENG and XIAO, 2011

<b>Assemblage</b>	<b>häufig infizierte Wirte</b>
AI	Menschen, Tiere (Katzen, Hunde, Nutztiere, Bismarratten, Biber, Wühlmäuse, Meerschweinchen, Frettchen)
AII	Menschen (häufiger als AI)
AIII und AIV	ausschließlich Tiere
B	Menschen und Tiere (Nutztiere, Chinchillas, Biber, Nager)
C und D	Hunde, Kojoten
E	Alpakas, Rinder, Ziegen, Schweine, Schafe
F	Katzen
G	Nager
H	Seehunde

Bislang sind vier verschiedene *G. duodenalis*-Isolate vollständig sequenziert. 2007 erfolgte die Sequenzierung des *Giardia*-WB-Genoms (Assemblage AI) (MORRISON *et al.*, 2007), gefolgt vom *Giardia*-GS-Genom 2009 (Assemblage B) (FRANZEN *et al.*, 2009), 2010 dem Genom von *Giardia* P15 (Assemblage E) (JERLSTROM-HULTQVIST *et al.*, 2010b) und erst kürzlich, 2013, dem von *Giardia* DH (Assemblage AII) (ADAM *et al.*, 2013). Vergleichende genomische Analysen dokumentieren eine größere Übereinstimmung und engere Verwandtschaft zwischen den Assemblagen E und A, als zwischen A und B. Der Vergleich der beiden humanpathogenen Assemblagen AI (WB) und B (GS) auf Aminosäureebene (orthologe Proteine) zeigt eine Übereinstimmung in 78% (Nukleotidsequenz 77%), während das P15- und GS-Isolat zu 81% (Nukleotidsequenz 77%) und das P15- und WB-Isolat zu 90% (Nukleotidsequenz 87%) identisch sind. Es ist daher noch unklar und Gegenstand aktueller Diskussionen, ob es sich bei Assemblage A und B vielmehr um zwei verschiedene Arten handelt (FRANZEN *et al.*, 2009, JERLSTROM-HULTQVIST *et al.*, 2010a, JERLSTROM-HULTQVIST *et al.*, 2010b).

### 1.1.2. Lebenszyklus

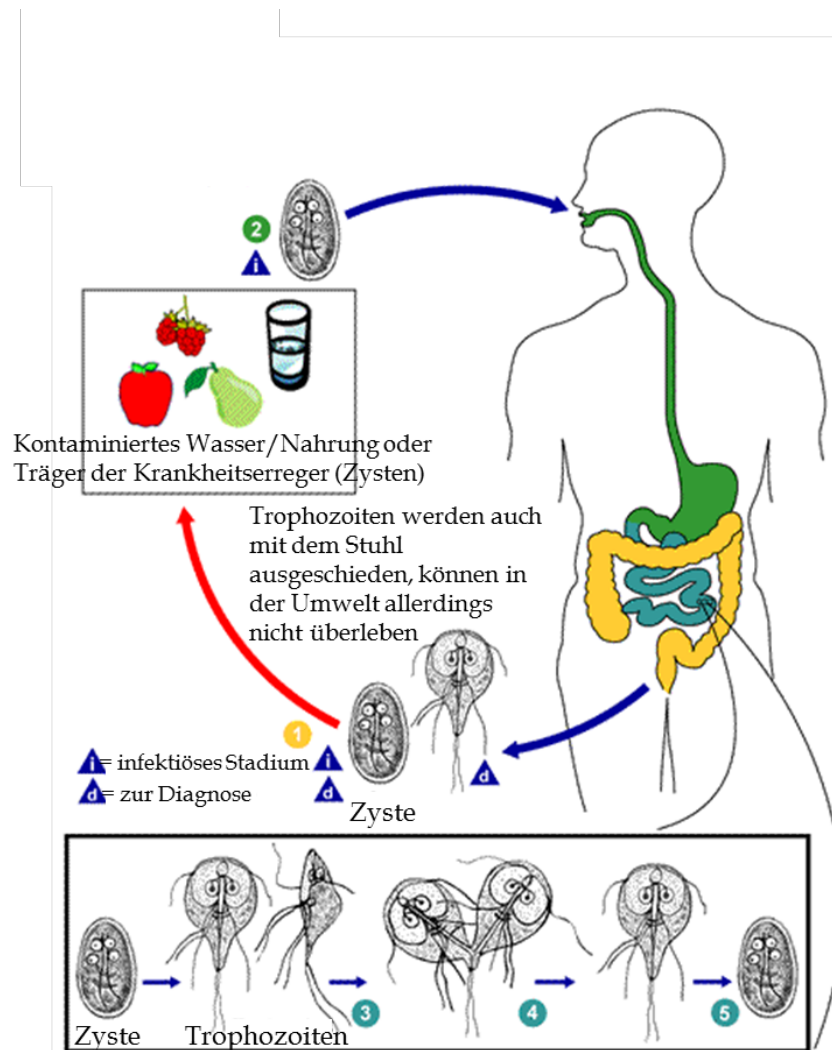
*Giardia*-Zysten werden auf einem fäkal-oralen Infektionsweg übertragen und im Allgemeinen über kontaminiertes Wasser oder kontaminierte Nahrung aufgenommen. In seltenen Fällen erfolgt die Infektion durch direkte Übertragung des zystenhaltigen Stuhls von Mensch oder infektiösen Gegenständen zu Mensch, d.h. durch eine Schmierinfektion. Die Zysten sind hochinfektiös und auch über Monate in Wasser oder feuchten Böden überlebensfähig. Die Infektionsdosis ist mit 10-100 Zysten sehr gering (FARTHING, 1997, CACCIO *et al.*, 2009).

Nach peroraler Aufnahme und Magenpassage der Zysten erfolgt im Duodenum die sogenannte Exzystierung. Stimuli für die Exzystierung sind unter anderem der durch die Magensäure verursachte pH-Wert-Abfall, der Temperaturanstieg und die Exposition gegenüber Proteasen (GILLIN *et al.*, 1996). Bei der Exzystierung werden innerhalb von 15 min Trophozoiten über eine Zwischenform (Excyzoit) aus Zysten gebildet. Dabei treten die Flagellen, zunächst an einem Ende der Zyste, aus und die Zystenwand wird, vermutlich bedingt durch die Freisetzung von Cysteinproteasen, abgebaut, (WARD *et al.*, 1997). Während dieses Prozesses kommt es zur Steigerung der Genexpression und dem Aufbau der Ventralscheibe. Letztendlich teilt sich der Excyzoit zweimal, allerdings ohne die S-Phase zu durchlaufen, so dass aus einer Zyste vier Trophozoiten entstehen (ANKARKLEV *et al.*, 2010). Mit Hilfe ihrer Ventralscheibe heften sich die Trophozoiten an das Darmepithel ihres Wirtes, wobei sie weder invasiv sind, noch Toxine bilden (SMITH *et al.*, 1982, ADAM, 1991), allerdings

---

die Funktion von Mikrovilli und *Tight junctions* beeinträchtigen können (CHIN *et al.*, 2002, MAIA-BRIGAGAO *et al.*, 2012). Im Dünndarm vermehren sich die Trophozoiten über mitotische Teilung, d.h. zunächst findet eine Verdopplung der Kerne statt, so dass intermediär ein Trophozoit mit vier Kernen entsteht. Anschließend teilt sich dieser unter Aufrechterhaltung der Links-Rechts-Symmetrie longitudinal (ADAM, 2001). Sobald die Trophozoiten in tiefer gelegene Dünndarmabschnitte (Jejunum) gelangen, beginnt der Prozess der Enzystierung. Dieser wird durch spezifische Faktoren, wie ein leicht alkalischer pH-Wert, eine geringe Konzentration an Cholesterin und erhöhte Gallensäurespiegel induziert (GILLIN *et al.*, 1988, ADAM, 2001). In der frühen Phase der Enzystierung runden sich die Trophozoiten ab und die Flagellen werden internalisiert. Zudem wird die Ventralscheibe fragmentiert, wodurch die Parasiten ihre Fähigkeit zum Anheften an das Darmepithel verlieren. Der Aufbau der Zystenwand beginnt mit dem Transport von CWP's mit Hilfe von *Encystation-Specific Vesicles* (ESV). Es folgt die Replikation der DNA, wobei der Zellzyklus allerdings nach der G2-Phase stoppt, so dass die Zelle zwei tetraploide Zellkerne enthält. In der späten Phase der Enzystierung teilen sich die beiden Kerne und es erfolgt eine weitere DNA-Replikation mit dem Ergebnis einer vierkernigen Zyste. Die robusten und infektiösen Zysten werden folgend mit dem Stuhl ausgeschieden (ADAM, 2001, ANKARKLEV *et al.*, 2010).





**Abbildung 2: Lebenszyklus von *G. duodenalis***

Die Abbildung gibt einen Überblick über die Entwicklungsstadien von *G. duodenalis*, von der infektiösen Zyste zum krankheitsbildenden Trophozoiten. Peroral aufgenommene Zysten werden nach der Magenpassage in Trophozoiten umgewandelt, welche im Duodenum persistieren und das Krankheitsbild der Giardiasis auslösen können. In tieferen Abschnitten des Dünndarms angelangt, folgt der Prozess der Enzystierung, der letztendlich in der Ausscheidung von Zysten mit dem Stuhl endet.

(modifiziert nach CDC, 2014 <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/biology.html>)

## 1.2. Giardiasis und Epidemiologie

*Giardia* ist weltweit verbreitet und infiziert eine Vielzahl von Wirbeltieren. *G. duodenalis* befällt u.a. den Menschen und ist der Erreger der Giardiasis, einer der häufigsten parasitären Erkrankungen des Menschen weltweit (LANE and LLOYD, 2002). Dabei unterscheidet sich die Symptomatik stark von Individuum zu Individuum. Die Infektion verläuft häufig asymptomatisch, verursacht aber auch eine Vielzahl von Magen-Darm-Beschwerden. Nach einer Inkubationszeit von ein bis zwei Wochen beginnt die akute Phase mit Unwohlsein,

Übelkeit und Appetitlosigkeit, zum Teil verbunden mit leichtem Fieber und Schüttelfrost. Typische Symptome der Giardiasis sind schwere wässrige und übelriechende Durchfälle, Abdominalkrämpfe sowie Flatulenzen (WOLFE, 1992, GARDNER and HILL, 2001). Oft ist die Erkrankung innerhalb von sechs Wochen selbstlimitierend, führt unbehandelt allerdings auch zu chronischen oder rezidivierenden Infektionen, die über Monate bis Jahre anhalten können. In der Folge treten Gewichtsverlust sowie Malabsorption von Fetten, Vitaminen (A, B<sub>12</sub>) und Kohlenhydraten auf (FLANAGAN, 1992, WOLFE, 1992). Besonders bei jungen Kindern ist eine chronische Infektion gefährlich, da sie mit einer verzögerten kognitiven und körperlichen Entwicklung des Kindes einhergehen kann (FARTHING *et al.*, 1986, BERKMAN *et al.*, 2002). Todesfälle treten nur sehr selten auf, sind aber bereits, insbesondere bei Kindern, beschrieben worden (USEPA, 1999). Vereinzelt kann es auch zu einer Einwanderung der Trophozoiten in die Gallenblase kommen und so zu einer Cholezystitis oder Pankreatitis führen (MCGOWAN *et al.*, 1948, MIYAHARA *et al.*, 1997). Zudem gibt es Hinweise auf eine Assoziation von Giardiasis mit Arthritis (SHAW and STEVENS, 1987, HILL GASTON and LILLICRAP, 2003), Reizdarmsyndrom (HANEVIK *et al.*, 2009) und Allergien gegenüber Lebensmitteln und/oder Urticaria (DI PRISCO *et al.*, 1998, BAYRAKTAR *et al.*, 2005).

Die bereits erwähnte Variabilität in der Symptomatik der Giardiasis ist bis heute wenig verstanden und scheint von multiplen Faktoren, wie Genotyp des Parasiten, Alter sowie Immun- und Ernährungsstatus des Wirtes abhängig zu sein (ROXSTROM-LINDQUIST *et al.*, 2006), wobei auch immunkompetente Patienten eine chronische Giardiasis entwickeln können. Aus pathophysiologischer Sicht verursacht *Giardia* Diarrhö und Malabsorption zum einen über eine induzierte Chlorid-Ionen-Hypersekretion (CEVALLOS *et al.*, 1995, TROEGER *et al.*, 2007), wodurch ein verstärkter Einstrom von Natrium-Ionen und Wasser in das Darmlumen resultiert, zum anderen durch den Verlust der Barrierefunktion des Darmepithels. Dieser Verlust ist durch eine erhöhte Apoptoserate von Enterozyten (CHIN *et al.*, 2002, TROEGER *et al.*, 2007) und die Schädigung von *Tight junctions* charakterisiert (BURET *et al.*, 2002, MAIA-BRIGAGAO *et al.*, 2012), die sich wiederum in einer gesteigerten epithelialen Permeabilität zeigt (SCOTT *et al.*, 2002). Zudem ist bei einer *Giardia*-Infektion im Tiermodell die Disaccharidase-Aktivität vermindert (BELOSEVIC *et al.*, 1989, CEVALLOS *et al.*, 1995), was zu einer Malabsorption beitragen kann. Durch Beeinträchtigung, u.a. durch Verkürzung, der Mikrovilli (BURET *et al.*, 1992, SCOTT *et al.*, 2000) reduziert sich zusätzlich die Resorptionsoberfläche des Dünndarms und führt darüber hinaus zu einer Malabsorption. Die Schädigung der Mikrovilli und das Disaccharidase-Defizit scheinen T-Zell-vermittelt (CD8<sup>+</sup>) zu sein und nicht direkt durch den Parasiten ausgelöst zu werden. CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten hingegen sind an der Eradikation des Parasiten beteiligt (SCOTT *et al.*,

2004, ECKMANN, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass mit *G. duodenalis* infizierte T-Zell-defiziente-Mäuse nicht in der Lage waren, die Infektion zu eliminieren und eine Depletion der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu einer chronischen Manifestation führte (SINGER and NASH, 2000). Mit *G. duodenalis* infizierte Menschen zeigen zudem erhöhte IgA-Titer (NASH *et al.*, 1987). Während IgA-defiziente Mäuse die Infektion nicht ausheilen konnten, waren IgM-defiziente Mäuse dazu fähig (LANGFORD *et al.*, 2002). Weiterhin erkrankten Kleinkinder unter sechs Monaten, die über die Muttermilch sekretorisches IgA erhalten seltener an Giardiasis (TELLEZ *et al.*, 2003). Neben dem adaptiven Immunsystem spielen aber auch das angeborene Immunsystem und die physiologische Barrierefunktion eine große Rolle bei der Eradikation der *Giardien*. So werden von dem Darmepithel antimikrobielle Peptide wie Defensin und Lactoferrin (ALEY *et al.*, 1994, TURCHANY *et al.*, 1995) sowie NO (ECKMANN *et al.*, 2000) gebildet. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass bei der Eliminierung von *Giardia*-Infektionen Mastzellen (ERLICH *et al.*, 1983, LI *et al.*, 2004), IL-6 und TNF- $\alpha$  (ZHOU *et al.*, 2007) eine bedeutende Position einnehmen. Ferner beeinflussen probiotische Bakterien der natürlichen Darmflora wie beispielsweise *Lactobacillus rhamnosus* die Immunantwort positiv (BENYACOUB *et al.*, 2005, HUMEN *et al.*, 2005, GOYAL and SHUKLA, 2013).

Aufgrund ihrer enormen Auswirkung auf die Gesundheit der Weltbevölkerung in Entwicklungsländern als auch Industrieländern wurde die Infektionskrankheit Giardiasis im Jahr 2004 in die Liste der *Neglected Diseases* der WHO aufgenommen (SAVIOLI *et al.*, 2006). Ihre Inzidenzrate pro Jahr liegt schätzungsweise bei 280 Millionen Menschen weltweit (LANE and LLOYD, 2002). Laut CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) sind rund 2% der Erwachsenen und 6-8% der Kinder in Industrieländern infiziert. In Entwicklungsländern sind im Durchschnitt 33% der Bevölkerung von einer Giardiasis betroffen, die vor allem bei Kindern verbreitet ist. In Deutschland ist Giardiasis eine meldepflichtige Krankheit und die häufigste Protozoeninfektion bei Tropenrückkehrern. Zwei Drittel der in Deutschland diagnostizierten *Giardia*-Infektionen werden aber wahrscheinlich in Deutschland erworben. Im Jahr 2012 traten 4228 Fälle mit einer Inzidenzrate von 5,2 bezogen auf 100.000 Personen auf. Dabei erkrankten Kinder (1-4 Jahre) und junge Erwachsene häufiger als andere Altersgruppen (RKI Infektionsepidemiologisches Jahrbuch 2012).

### 1.3. Der giardiale Stoffwechsel

Wie bereits erwähnt, besitzen *Giardien* weder Mitochondrien noch Peroxisomen und sind somit nicht zur oxidativen Phosphorylierung befähigt. Stattdessen decken *Giardien* ihren Energiebedarf über die Glykolyse. Glucose wird über Pyruvat nur unvollständig zu Acetat, Alanin, Ethanol und Kohlenstoffdioxid abgebaut. Das Verhältnis der Endprodukte ist dabei von der Sauerstoffkonzentration der Umgebung abhängig. Unter strikt anaeroben Bedingungen ist Alanin das Hauptprodukt, während in Anwesenheit von geringen Mengen Sauerstoff vorrangig Ethanol entsteht. Bei höheren Sauerstoffkonzentrationen dominiert die Bildung von Acetat- und Kohlenstoffdioxid (EDWARDS *et al.*, 1989, PAGET *et al.*, 1990, PAGET *et al.*, 1993). Pyruvat wird in einer ferredoxinabhängigen (Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase) Reaktion zu Acetyl-Coenzym A oxidiert (TOWNSON *et al.*, 1994, TOWNSON *et al.*, 1996), welches wiederum in einer Acetat-Thiokinase-katalysierten Reaktion unter Bildung von ATP zu Acetat umgewandelt wird (SANCHEZ *et al.*, 2000). Alternativ wird aus Acetyl-CoA mit Hilfe des reduzierten Ferredoxins aus der Pyruvat-Oxidation und einer Alkoholdehydrogenase Ethanol gebildet (SANCHEZ, 1998, DAN and WANG, 2000). Zudem verfügen *Giardien* über den Arginin-Dihydrolase-Stoffwechselweg, der unter den Eukaryoten sonst nur bei den Trichomonaden vorkommt. Dabei wird L-Arginin zu L-Ornithin, Kohlenstoffdioxid und Ammoniak unter Bildung von ATP abgebaut (SCHOFIELD *et al.*, 1990, SCHOFIELD *et al.*, 1992). Dadurch entziehen *Giardien* dem Wirt zugleich L-Arginin, das als Substrat der iNOS zur Bildung von NO in der unspezifischen Immunabwehr dient (ECKMANN *et al.*, 2000, LI *et al.*, 2006).

*Giardien* besitzen nur eingeschränkt die Fähigkeit zur Synthese von Lipiden, wie Fettsäuren, Phospholipiden und Cholesterol (ELLIS *et al.*, 1996, DAS *et al.*, 2002). Wie allen lebenden Organismen dienen Lipide den *Giardien* u.a. als Membranbausteine und Signalmoleküle. Dementsprechend sind sie von der Aufnahme exogener Lipide aus ihrer Umgebung stark abhängig (KANEDA and GOUTSU, 1988, MOHAREB *et al.*, 1991). Über die Fähigkeit aufgenommene Lipide umzubauen oder Fettsäuren einzubauen, scheint der Parasit seinen Bedarf an speziellen Phospholipiden zu decken (STEVENS *et al.*, 1997, GIBSON *et al.*, 1999). Die Deacylierung und Reacylierung von Phospholipiden wird auch als Lands-Zyklus bezeichnet und beinhaltet Acyl-CoA-Transferasen und Phospholipasen als beteiligte Schlüsselenzyme. Dabei generieren Phospholipasen Lysophospholipide und freie Fettsäuren, die wiederum zum Aufbau neuer und veränderter Phospholipide dienen (DAS *et al.*, 2001). *Giardien* sind im Dünndarm ihres Wirtes einer Vielzahl von Lipiden ausgesetzt. Freie und konjugierte Fettsäuren, Phospholipide, Cholesterol und Gallensäuren stehen dem Parasiten zur

Aufnahme zur Verfügung. Dabei nutzt *Giardia* u.a. Aktin- und Mikrotubulifilamente für die Absorption und den intraparasitären Transport. So ist unter dem Einfluss von Mitose-Hemmstoffen, wie Vinorelbin oder Paclitaxel, die Internalisierung von Ceramiden, Sphingomyelinen und Phosphatidylglycerolen vermindert oder zumindest verändert. Cytochalasin wiederum, welches die Polymerisation von Aktin verhindert, führt zur Bildung vesikulärer Aggregate der genannten Phospholipide (HERNANDEZ *et al.*, 2007, CASTILLO *et al.*, 2009). Darüber hinaus zeigten HERNANDEZ *et al.* (2007), dass Ceramide auch über eine Clathrin-abhängige Endozytose aufgenommen werden. Zudem besitzen *Giardien* einen LDL-like-Rezeptor, der an der Bindung und Aufnahme von Lipoproteinen und somit auch von Cholesterol beteiligt ist (RIVERO *et al.*, 2011, RIVERO *et al.*, 2013).

Die am häufigsten in *Giardia* vorkommenden Phospholipide sind Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Sphingomyelin, gefolgt von Phosphatidylglycerol und Phosphatidylinositol. Phosphatidylglycerole, Ceramide und Sphingomyeline sind bevorzugt in der perinukleären Membran, Sphingomyeline aber auch in der Zellmembran lokalisiert. Phosphatidylethanolamine werden vorwiegend in die Zellmembran eingebaut, während Phosphatidylcholine in die Zellmembran und die Membran der Flagellen inkorporiert werden (STEVENS *et al.*, 1997, GIBSON *et al.*, 1999, DAS *et al.*, 2001).

#### 1.4. Das giardiale Zytoskelett

Generell ist das Zytoskelett höherer Eukaryoten aus verschiedenen dynamischen Strukturen aufgebaut. Diese Zytoskelettfilamente umfassen 1.) Mikrotubuli, die aus Tubulin-Dimeren gebildet werden, 2.) Mikrofilamente, bestehend aus Aktin-Monomeren, die auch als F-Aktin bezeichnet werden und 3.) Intermediärfilamente sowie 4.) die mit den Filamenten assoziierten Proteine, wie beispielsweise die Motorproteine Kinesin und Dynein. *G. duodenalis* besitzt ein komplexes Zytoskelett, welches entscheidend für Fortbewegung, Anheftung, intrazellulären Transport, Zellteilung sowie für Ex- und Enzystierung des Parasiten verantwortlich ist. Den größten Anteil am giardialen Zytoskelett machen Mikrotubuli aus (ELMENDORF *et al.*, 2003). Das Mikrotubulisystem ist gut konserviert und weist alle Tubulinformen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) und Proteine zum Aufbau und zur Organisation von Tubuli (Tubulin-spezifische Chaperone, Centrin) auf. Demgegenüber findet sich im Genom von *G. duodenalis* ausschließlich ein Aktin-Gen aber kein Hinweis auf andere klassische Mikrofilament-Proteine (MORRISON *et al.*, 2007). Allerdings konnten, indirekt über Immunfluoreszenzfärbung mit heterologen Antikörpern, Aktin-assoziierte Proteine (Vinculin,  $\alpha$ -Aktinin) nachgewiesen werden (FEELY *et al.*, 1982, NARCISI *et al.*, 1994). Das

Vorkommen von Intermediärfilamenten wurde bis dato in keinem Protisten beschrieben (ELMENDORF *et al.*, 2003).

Das giardiale Zytoskelett umfasst neben dem Mediankörper und der Funis die Ventralscheibe und vier Flagellenpaare. Die Funis, mit derzeit noch unklarer Funktion, besteht aus Mikrotubuli-Anreihungen. Aufgrund ihrer Verbindung mit den Axonema der kaudalen Flagellen wird allerdings eine Beteiligung an der kaudalen Bewegung und Beugung des „Schwanzteils“ des Parasiten vermutet (GHOSH *et al.*, 2001, BENCHIMOL *et al.*, 2004). Auch der Mediankörper ist eine im Wesentlichen aus Mikrotubuli bestehende Zellstruktur mit noch unbekannter Funktion, der in Trophozoiten, aber nicht in Zysten auszumachen ist. Möglicherweise ist er ein Reservoir für Tubulin-Einheiten. Aufgrund der variablen Form und Position des Mediankörpers wurden früher taxonomische Unterscheidungen zwischen den *Giardia*-Arten mit Hilfe des Mediankörpers vorgenommen. Neben Tubulinen, die acetyliert (SOLTYS and GUPTA, 1994), glutaminiert (CAMPANATI *et al.*, 1999) oder tyrosiniert (CAMPANATI *et al.*, 2003) vorkommen, wurden auch Kinesin-13 (DAWSON *et al.*, 2007), EB1 (ein Mikrotubuli-bindendes Protein, welches am Aufbau und Stabilisierung der Mikrotubuli beteiligt ist) (KIM *et al.*, 2008) und  $\beta$ -Giardin (PIVA and BENCHIMOL, 2004) im Mediankörper identifiziert. Darüber hinaus sind andere kontraktile und Calcium-bindende Proteine wie Centrin, Aktin oder  $\alpha$ -Aktinin im Mediankörper lokalisiert (FEELY *et al.*, 1982, MENG *et al.*, 1996). Giardine sind eine Klasse von Proteinen, die ausschließlich in *Giardia spp.* vorkommen und in vier nicht homologe Gruppen eingeteilt werden:  $\alpha$ -Giardin,  $\beta$ -Giardin,  $\gamma$ -Giardin und  $\delta$ -Giardin. Während  $\alpha$ -Giardine, die zu den stark exprimierten Proteinen in *Giardia* zählen (WEILAND *et al.*, 2005), eine Verwandtschaft zu den Annexinen zeigen (MORGAN and FERNANDEZ, 1995, SZKODOWSKA *et al.*, 2002), weisen  $\beta$ -Giardine eine Homologie zu Mikrotubulin-assoziierten Proteinen, den SF-Assemblinen, auf (WEBER *et al.*, 1993). Für  $\gamma$ - und  $\delta$ -Giardine konnten keine Ähnlichkeiten zu einer bekannten Proteingruppe gefunden werden (NOHRIA *et al.*, 1992). Die Giardine sind insbesondere in der Ventralscheibe lokalisiert, finden sich aber auch in den Flagellen. Ihre Aufgabe liegt wahrscheinlich in der Stabilisierung und Aufrechterhaltung der Ventralscheibe (ORTEGA-PIERRES *et al.*, 2011). Die Ventralscheibe ist eine charakteristische Struktur des Zytoskeletts von *G. duodenalis* und vermittelt die Anheftung des Parasiten an das Darmepithel seines Wirtes. Dabei ist der Mechanismus, über den die Anheftung erfolgt, derzeit noch umstritten. Gegenstand der Diskussion sind Mechanismen, die ein Ansaugen, Greifen oder Klammern mit Hilfe der Ventralscheibe beinhalten (FRIEND, 1966, HOLBERTON, 1973, 1974, SOUSA *et al.*, 2001, ELMENDORF *et al.*, 2003, HANSEN *et al.*, 2006). Die Ventralscheibe besteht aus drei Strukturelementen, 1.) aus spiralförmig angeordneten Mikrotubuli, die mit

der angrenzenden Zellmembran durch dünne Filamente von unbekannter Zusammensetzung verbunden sind, 2.) aus dreischichtigen „*Microribbons*“, die senkrecht zur Spirale stehen und der Länge nach mit ihr verbunden sind und 3.) aus Querverbindungen, die die „*Microribbons*“ horizontal verbinden (HOLBERTON, 1973, 1981, CROSSLEY and HOLBERTON, 1983, CROSSLEY and HOLBERTON, 1985, SCHWARTZ *et al.*, 2012). Vorrangig wird die Ventralscheibe aus Tubulinen ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin) und Giardinen, insbesondere  $\beta$ -Giardin, gebildet (PEATTIE, 1990, CAMPANATI *et al.*, 2003, PALM *et al.*, 2005, WEILAND *et al.*, 2005). Dahingegen befindet sich im Zentrum der Ventralscheibe, wo sich die Mikrotubuli der Spirale überlappen, die sogenannte „*Bare Area*“, die frei von Mikrotubuli und „*Ribbons*“ ist (ELMENDORF *et al.*, 2003, DAWSON, 2010). Umgeben ist die Ventralscheibe von einer fibrillären Struktur, der „*Lateral Crest*“. Im Gegensatz zur Ventralscheibe selbst wurden in der „*Lateral Crest*“ Aktin und Aktin-assoziierte Proteine, wie  $\alpha$ -Aktinin und Vinculin, zumindest indirekt lokalisiert (FEELY *et al.*, 1982, NARCISI *et al.*, 1994). Bislang wurden keine Mikrotubuli-Motorproteine, wie Kinesin oder Dynein gefunden, die mit der Ventralscheibe assoziiert sind (ELMENDORF *et al.*, 2003). *G. duodenalis* besitzt vier Flagellenpaare, die symmetrisch angeordnet sind und nach ihrer topographischen Anatomie in die anterolateralen, posterolateralen, kaudalen und ventralen Flagellen eingeteilt werden. Auch sie sind aus Mikrotubuli aufgebaut und weisen die für Eukaryoten typische  $(9 \times 2) + 2$ -Anordnung auf. Dabei umgeben neun periphere Doppelmikrotubuli zwei einzelne zentral liegende Mikrotubuli zylinderförmig. Neben EB1 und Kinesin-13 wurden auch  $\alpha$ -Giardine in allen Flagellen nachgewiesen (WEILAND *et al.*, 2005, DAWSON *et al.*, 2007, KIM *et al.*, 2008, VAHRMANN *et al.*, 2008, SARIC *et al.*, 2009).

## 1.5. Therapie der Giardiasis

Als erste gegen Giardiasis eingesetzte Verbindung ist Quinacrin\*, auch bekannt als Mepacrin, zu nennen. Ursprünglich wurde das Therapeutikum in der Therapie und Prophylaxe von Malariaerkrankungen eingesetzt. Später zeigte sich, dass es auch wirksam gegen *Giardien* ist und wurde bereits 1941 für die Behandlung der Giardiasis empfohlen (TAYLOR *et al.*, 1987, GARDNER and HILL, 2001). Der Wirkmechanismus ist nicht vollständig geklärt. Vermutlich scheint Quinacrin aber über eine Interkalation in die DNA und folglich über die Hemmung der DNA-Replikation und Transkription seine Wirkung zu entfalten (HOSSAIN *et al.*, 2008). Aufgrund der zahlreichen und häufigen unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW), wie Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen und Schwindel sowie der zwar seltenen aber schwerwiegenden Arzneimittel-induzierten Psychose (SAPP, 1964, LINDENMAYER and

\* Strukturformel siehe Anhang

VARGAS, 1981, GARDNER and HILL, 2001, HARRIS *et al.*, 2001), findet Quinacrin, welches keine Zulassung als Arzneimittel hat, heutzutage nur noch mit Sondergenehmigung und sehr selten Anwendung. Es wurde von den Nitroimidazolen, insbesondere von Metronidazol\* (MTZ) verdrängt. Zu den therapeutisch eingesetzten Nitroimidazolen zählen weiterhin Ornidazol\* (Tiberal®), Tinidazol\* (Simplotan®) und Nimorazol\* (Naxogin®). Die zwei letztgenannten Arzneistoffe wurden allerdings aus wirtschaftlichen Gründen vom deutschen Markt genommen. Ornidazol ist beispielsweise noch in der Schweiz erhältlich. Das Mittel der Wahl in der Therapie der Giardiasis ist derzeit MTZ. MTZ ist ein Prodrug und selbst nicht antimikrobiell wirksam. Indem die Nitrogruppe intramikrobiell reduktiv verstoffwechselt wird, entstehen hoch reaktive Zwischenprodukte, wie Acetamid, *N*-(2-Hydroxyethyl)-oxamidsäure und Nitroradikale. Die Reduktion erfolgt durch parasitäre Reduktasen. Dabei sind die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase, Nitroreduktase und Thioredoxinreduktase involviert (TOWNSON *et al.*, 1996, MÜLLER *et al.*, 2007b, NILLIUS *et al.*, 2011, LEITSCH *et al.*, 2011). Die reaktiven Zwischenprodukte wirken DNA-schädigend, vorwiegend durch Adduktbildung und führen somit u.a. zu DNA-Strangbrüchen und zum Verlust der Helix-Struktur (EDWARDS, 1977, KNIGHT *et al.*, 1978, UPCROFT and UPCROFT, 1998). In Zellen mit oxidativem Stoffwechsel und geringer Reduktase-Aktivität erfolgt die Aktivierung von MTZ in nur geringem Umfang und begründet die Indikation von MTZ bei Infektionen mit Anaerobiern. Die DNA-schädigende Wirkung erklärt, warum MTZ in hohen Dosen in Bakterien mutagen und in Mäusen und Ratten kanzerogen ist (RUSTIA and SHUBIK, 1972, VOOGD *et al.*, 1974, LINDMARK and MULLER, 1976) und beschränkt, obwohl für den Menschen bislang keine Mutagenität dokumentiert wurde, die Anwendungsdauer von MTZ. Sie sollte 10 Tage nicht überschreiten. Schwangerschaft und Stillzeit gelten als Kontraindikationen. Darüber hinaus hat MTZ ein nicht zu vernachlässigendes Nebenwirkungsprofil, welches neben gastrointestinalen Beschwerden, wie Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe und vereinzelt Pankreatitis auch neurologische Beeinträchtigungen umfassen. Dazu zählen nicht nur Kopfschmerzen und Schwindel, sondern auch periphere Neuropathien, Ataxie und epileptische Anfälle. Zudem verursacht MTZ einen unangenehmen metallischen Geschmack und bei gleichzeitiger Einnahme von Alkohol einen Disulfiram-Effekt.

Als Alternative und *Off-Label-Use* zur Behandlung der Giardiasis stehen die Benzimidazole Albendazol\* und Mebendazol\* zur Verfügung. Sie entfalten ihre Wirkung über die Hemmung der Tubulin-Polymerisierung und führen darüber zum Absterben der *Giardien*. Aufgrund ihrer Wirkungsweise und möglichen Teratogenität sind Benzimidazole in der Schwangerschaft kontraindiziert. Bezüglich ihrer Wirksamkeit gegenüber *Giardien* liegen

\* Strukturformel siehe Anhang



allerdings kontroverse Studiendaten vor. In Abhängigkeit der Wirkstoffdosis und Therapiedauer schwankt der Behandlungserfolg (BULUT *et al.*, 1996, SADJJADI *et al.*, 2001, KARABAY *et al.*, 2004, CANETE *et al.*, 2006).

Paromomycin\* (Humatin®) ist eine weitere Therapieoption, insbesondere bei refraktären Infektionen und während der Schwangerschaft (KREUTNER *et al.*, 1981, THOMPSON *et al.*, 1993). Paromomycin gehört zu den Aminoglykosid-Antibiotika und wirkt über eine Inhibition der Proteinbiosynthese durch Bindung an ribosomale Untereinheiten toxisch auf *Giardien* (EDLIND, 1989). Die Resorptionsrate von Paromomycin aus dem Gastrointestinaltrakt ist sehr gering, so dass zum einen hohe Wirkstoffkonzentrationen im Darmlumen erreicht werden und zum anderen die sonst typischen UAW der Aminoglykoside, Nephro- und Ototoxizität, Patienten mit gesunder Nierenfunktion nicht betreffen sollten (GARDNER and HILL, 2001). Klinische Studien mit Paromomycin sind limitiert und zeigen starke Schwankungen in der Wirksamkeit gegenüber *Giardien*. Paromomycin scheint weniger effektiv als die anderen anti-giardialen Therapeutika zu sein.

Furazolidon\* und Nitazoxanid\* sind zwei weitere Wirkstoffe, die in der Therapie der Giardiasis eingesetzt werden können, zeigen allerdings keine Überlegenheit im Vergleich zu den genannten Verbindungen (ESCOBEDO and CIMERMAN, 2007, WATKINS and ECKMANN, 2014) und besitzen in Deutschland keine Zulassung als Arzneimittel.

Zwar stehen zur Behandlung der Giardiasis einige Therapeutika zur Verfügung, jedoch besitzt keines der Arzneimittel ein optimales Profil hinsichtlich der Wirksamkeit und Sicherheit, insbesondere im Hinblick auf die Therapie pädiatrischer und schwangerer Patienten. Zudem wurde unter allen eingesetzten Arzneimittelklassen ein Therapieversagen in bis zu 20% der Fälle beobachtet (ABBOUD *et al.*, 2001, GARDNER and HILL, 2001, NASH *et al.*, 2001, UPCROFT and UPCROFT, 2001, TEJMAN-YARDEN *et al.*, 2011, TEJMAN-YARDEN and ECKMANN, 2011).

Aufgrund dieser Einschränkungen in den aktuellen Therapieregimen ist es dringend erforderlich neue, effiziente und besser verträgliche Therapieansätze auszumachen und zu erforschen. Hierbei ist es eine vielversprechende Strategie, bereits für die Anwendung am Menschen zugelassene Arzneimittel zu evaluieren.

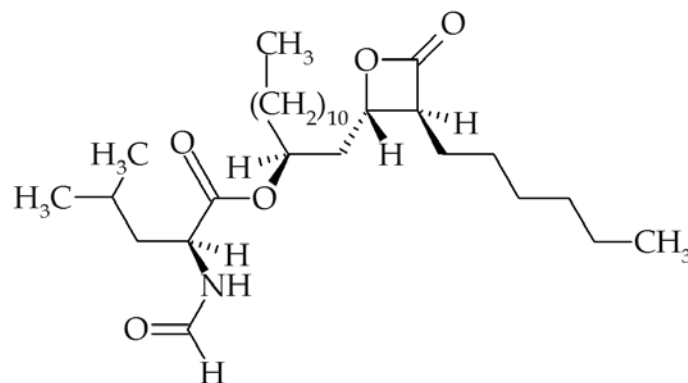
\* Strukturformel siehe Anhang

**Tabelle 3: Therapieoptionen der Giardiasis**

Arzneimittel	Dosis		UAW
	Erwachsene	Kinder	
Metronidazol	p.o. 3 x 400 mg // 5-7 Tage	p.o. 15-40 mg/kg/d in 2-3 Dosen // 3 Tage	Kopfschmerzen, Schwindel, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, metallischer Geschmack, Disulfiram-Effekt zusammen mit Alkoholgenuss, Pankreatitis, Neuropathien, Ataxie, epileptische Anfälle Mutagenität/Teratogenität ?
Albendazol / Mebendazol	p.o. 1 x 400 mg // 5-10 Tage	p.o. 15 mg/kg/d in 1 Dose // 5-7 Tage	Kopfschmerzen, Schwindel, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, erhöhte Leberenzymwerte, reversibler Haarausfall Teratogenität
Paromomycin	p.o. 3 x 500 mg // 10 Tage	p.o. 25-30 mg/kg/d in 3 Dosen // 5-10 Tage	Oto- und Nephrotoxizität bei systemischer Anwendung

## 1.6. Tetrahydrolipstatin (THL)

Tetrahydrolipstatin (THL), auch als Arzneistoff Orlistat bekannt, ist ein Derivat des Lipstatin, ein von *Streptomyces toxytricini* produzierten lipophilen, langkettigen Ester mit einem mittelständigen  $\beta$ -Lactonring und *N*-Formyl-L-Leucin als Seitenkette.



Tetrahydrolipstatin ((2*S*)-2-Formylamino-4-methylpentansäure-(1*S*)-1-[[3*S*,4*S*]-3-hexyl-2-oxo-4-oxetanyl]methyl)dodecylester)

### Abbildung 3: Tetrahydrolipstatin (THL)

Dargestellt ist das Derivat des in *Streptomyces toxytricini* natürlich vorkommenden Lipstatins. THL besitzt einen für seine Inhibition auf Lipasen wesentlichen  $\beta$ -Lactonring und weist eine ausgeprägte Lipophilie auf.

THL wird unter dem Handelsnamen Xenical® bzw. Alli® als Inhibitor gastrointestinaler Lipasen zur Therapie der Adipositas eingesetzt. Dabei inhibiert THL gastrische und pankreatische Lipasen im Lumen des Magens und Duodenums, indem der Serinrest im aktiven Zentrum der Lipasen unter Öffnung des  $\beta$ -Lactonrings verestert wird (BORGSTROM, 1988, WEIBEL *et al.*, 1987). Dadurch werden ca. ein Drittel weniger als Triglyceride vorliegende Nahrungsfette in resorbierbare freie Fettsäuren und Monoglyceride hydrolysiert. THL selbst wird nur minimal aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert und vor allem in der Darmwand metabolisiert. Seine Metabolite haben einen offenen  $\beta$ -Lactonring und weisen eine sehr schwache lipasehemmende Aktivität auf. Sie gelten daher als pharmakologisch unwirksam. Der Hauptanteil von THL (97%) wird fäkal und unverändert (83%) ausgeschieden (EMA, 2012 European Medicines Agency). Orlistat wurde 1998 als verschreibungspflichtiges Arzneimittel (Xenical®) in Form von 120 mg-Kapseln in Deutschland zugelassen und im Jahr 2009 auf Empfehlung der EMA für Niedrigdosierungen von 60 mg (Alli®) aus der Rezeptpflicht entlassen. Bis dato wurden mehrere Kurz- und Langzeitstudien zur Wirksamkeit und Sicherheit von THL durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass THL, wie aufgrund des Wirkmechanismus zu erwarten, vorrangig UAW gastrointestinaler Natur hervorruft. Dazu zählen Fettstühle, Flatulenzen oder Abdominalschmerzen (SJOSTROM *et al.*, 1998, VAN GAAL *et al.*, 1998, MCDUFFIE *et al.*, 2002, TORGERSON *et al.*, 2004, RUCKER *et al.*, 2007). Zuletzt machte THL wegen möglicher hepatotoxischer Wirkungen auf sich aufmerksam. Innerhalb eines Verfahrens zur Neubewertung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses durch den CHMP konnte der Ausschuss anhand der verfügbaren Daten allerdings keinen direkten Zusammenhang einer Hepatotoxizität mit der Einnahme von THL feststellen (BFARM, 2012 Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte).

In einigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass THL das Wachstum verschiedener Krankheitserreger, einschließlich einzelliger Parasiten (*Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*), inhibiert und *in vitro* hemmend auf Tumorzellen wirkt (KRIDEL *et al.*, 2004, KREMER *et al.*, 2005, MICULKA *et al.*, 2011, WANKHADE *et al.*, 2012, YANG *et al.*, 2012, KANT *et al.*, 2014). Diese Aktivitäten zeigen, dass THL antimikrobielle Eigenschaften hat, die therapeutisch ausgenutzt werden könnten.

## 1.7. Zielsetzung

Aufgrund der vielversprechenden Datenlage zur antiparasitären Aktivität von Tetrahydrolipstatin (THL) als bereits am Menschen zugelassenes und gut verträgliches Arzneimittel und der Notwendigkeit für neue Therapiemöglichkeiten der Giardiasis sollte THL auf anti-giardiale Eigenschaften untersucht werden.

Zur Durchführung dieser Untersuchungen stand zunächst die Auswahl und Evaluierung eines geeigneten, kostengünstigen und effizienten Testsystems zur Bestimmung der *in vitro* anti-giardialen Aktivität von THL im Vordergrund. Als eine angemessene Methode sollte ein Viabilitätstest, in der vorliegenden Arbeit ein Resazurin-basierter Assay, zur Anwendung kommen. Dieses Zellkultur-basierte Verfahren sollte entsprechend der Zielsetzung optimiert und standardisiert werden.

Neben der Testung und Ermittlung der inhibitorischen Konzentration der einzelnen Arzneistoffe (THL, MTZ) sollten in einem weiteren Schritt kombinatorische Effekte von THL mit dem Standardtherapeutikum MTZ unter Anwendung der Kombinationsindex-Methode analysiert werden. Zum einen können hierdurch UAW reduziert werden, zum anderen haben sich Kombinationstherapien bei Therapieversagern als erfolgsversprechend hinsichtlich der Eradikation der *Giardien* erwiesen (TAYLOR *et al.*, 1987, NASH *et al.*, 2001). Die Ursachen einer erfolglosen Behandlung können vielseitig sein. Neben Faktoren, die im Zusammenhang mit dem Menschen als Wirt stehen, wie eine schlechte Compliance des Patienten, sind Resistenzentwicklung des Parasiten und/oder Assemblage-abhängige Kriterien Gegenstand der Diskussion. So zeigten Studien erhebliche Unterschiede in der *in vitro*-Sensitivität von Isolaten aus verschiedenen Patienten gegenüber den gängigen Therapeutika (FARBAY *et al.*, 1995, CRUZ *et al.*, 2003, BENERE *et al.*, 2011). Durch Einbeziehung verschiedener *Giardia*-Genotypen in der Testung zur anti-giardialen Aktivität von THL, einzeln und in Kombination mit MTZ, sollten etwaige Variabilitäten von Assemblagen in ihren *in vitro*-Sensitivitäten unter diesen experimentellen Bedingungen erfasst werden. Dazu sollten sowohl Referenzstämme, die bereits gängig in Laboratorien eingesetzt werden, als auch aus Patienten isolierte Genotypen herangezogen werden. Zudem sollte geklärt werden, ob THL giardiazid oder giardiastatisch wirkt.

Neben Viabilitätstestungen sollten mikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden, um morphologische und ultrastrukturelle Veränderungen durch THL aufzuzeigen und Anhaltspunkte für einen denkbaren Wirkmechanismus zu liefern. Dies sollte sowohl mit Fluoreszenzfärbungen als auch elektronenmikroskopischen Verfahren umgesetzt werden.

---

*G. duodenalis* ist bekanntlich in seinem Lipidstoffwechsel begrenzt und deckt seinen Lipidbedarf u.a. durch die Aufnahmen von Lipiden aus seiner Umgebung. Ein Einfluss von THL auf den giardialen Lipidstoffwechsel sollte unter Nutzung von fluorometrischen Methoden untersucht werden.

Die Therapie der durch *G. duodenalis* hervorgerufenen Erkrankung stellt nach wie vor eine Herausforderung dar, insbesondere in Entwicklungsländern und bei Risikogruppen. Die Ergebnisse sollen einerseits zu einer Therapieoptimierung der Giardiasis und andererseits zu einem besseren Verständnis der Biologie des Parasiten beitragen.

## 2. Material und Methoden

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien benannt und die zum Einsatz gekommenen methodischen Verfahren geschildert.

### 2.1. Geräte

Die in Tabelle 4 gelisteten Geräte wurden für die experimentellen Durchführungen verwendet.

**Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte**

Gerät	Firma, Ort
Analysenwaage A200S	Sartorius, Göttingen
Axio Imager Z1 (mit ApoTome-Funktion)	Carl Zeiss, Jena
Axioskop 2	Carl Zeiss, Jena
Axiostar plus (Lichtmikroskop)	Carl Zeiss, Jena
Begasungsbrutschrank HERAcell 150i	Thermo Scientific, Dreieich
DNA-Arbeitsstation UVC/T-M-AR	Kisker Biotech, Steinfurt
Feinwaage MC1 LC 620 S	Sartorius, Göttingen
Geldokumentationssystem XR+ System	Bio-Rad Laboratories, München
Nalgene® Freezing Container	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnetrührer (IKA Ret basic)	IKA®-Werke, Staufen
Mikroliter-Pipetten Biohit mLine	Sartorius, Göttingen
Mikroliter-Pipetten Eppendorf Research, Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
Mikrozentrifuge CT15RE	VWR, Darmstadt
Mikroplattenreader Infinite M200Pro	Tecan, Männedorf (Schweiz)
NanoDrop® ND-1000 Spektralphotometer	Thermo Scientific, Karlsruhe
Sonoplus HD 2070	Bandelin, Berlin
Sterilwerkbank BDK-S 1200	BDK Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen
Heraeus® Multifuge 1S-R	Thermo Scientific, Karlsruhe
pH-Meter CG 825	Schott, Mainz
Wasserbad WNB 7-45	Memmert, Büchenbach
Vortexer (Minishake 3 basic)	IKA®-Werke, Staufen

## 2.2. Chemikalien, Testsubstanzen und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendet Chemikalien und Substanzen waren von analytischem Reinheitsgrad und wurden von den in Tabelle 5 genannten Firmen bezogen.

**Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Chemikalien, Substanzen und Verbrauchsmaterialien**

Chemikalien/ Substanzen/ Materialien	Firma, Ort
Ammoniumeisen(III)citrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
AnaeroJar™/AnaeroGen™	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
β-BODIPY® FL C12-HPC	Life Technologies, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA), fettsäurefrei	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim
CryoTubes Nunc®	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAPI	Carl Roth, Karlsruhe
Diff-Quik®-Set	Medion Diagnostics, Düdingen
Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
Entellan®	Merck, Darmstadt
EnzChek® Lipase Substrat	Life Technologies, Darmstadt
Enzchek® Phospholipase A <sub>1</sub> Assay Kit	Life Technologies, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Galle von Rind und Schaf	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutathion	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Hank's Puffer (HBSS 10x)	Life Technologies, Darmstadt
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Cystein	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lipoproteinlipase (from bovine milk)	Sigma Aldrich
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt

Chemikalien / Substanzen / Materialien	Firma, Ort
Metronidazol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Neubauer Zählkammer (Einweg) (C-Chip)	NanoEnTek, Seoul (Korea)
Nilrot	Sigma-Aldrich, Steinheim
Normales Ziegenserum (gNS)	Zentrum für experimentelle Tierhaltung im Bundesinstitut für Risikobewertung
Penicillin/Streptomycin (100 U/mL, 100 µg/mL)	PAA Laboratories, Cölbe
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pepton aus Casein	Merck, Darmstadt
Protease-Inhibitor Complete Ultra (EDTA-free)	Roche Diagnostics, Mannheim
Resazurin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rindertrypsin	Merck, Darmstadt
schwarze 96-Well-Mikrotiterplatte, flacher transparenter Boden, steril	Corning Incorporated, New York
Tetrahydrolipstatin (THL, Orlistat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vectashield® HardSet Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame (Kanada)
Verbrauchsmaterialien für PCR	
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Bioline, Luckenwalde
PCR Puffer	Bioline, Luckenwalde
dATP, dCTP, dTTP, dGTP	Carl Roth, Karlsruhe
Mango Taq DNA Polymerase	Bioline, Luckenwalde
H <sub>2</sub> O <small>reinst</small> (HPLC-Wasser)	Carl Roth, Karlsruhe
GelGreen™	Biotium, Hayward (USA)
Zwittergent (3-(N,N-Dimethyloctadecylammonio)- propansulfonat)	Sigma-Aldrich, Steinheim



### 2.3. Medien, Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders benannt, wurde zur Herstellung der Medien, Puffer und Lösungen Elga-Ultra Wasser (ddH<sub>2</sub>O, Hersteller: ELGA LabWater PURELAB Ultra Genetic) verwendet. Das doppelt destillierte Wasser war frei von Endotoxinen (<0,001 EU/ml) sowie DNasen und RNasen und somit für gentechnisches Arbeiten und die Bereitung von Medien und Puffer für die Zellkultur geeignet.

**Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Medien, Puffer und Lösungen**

Name	Zusammensetzung	Menge
<b>Blocklösung</b>	normales Ziegenserum gelöst in PBS	5% (V/V)
<b>BODIPY-Assay-Puffer</b>	Glucose L-Cystein gelöst in PBS	5 mM 5 mM
<b>BODIPY-Phosphatidylcholin-Stammlösung</b>	β-BODIPY® FL C12-HPC gelöst in DMSO	1 mM
<b>DAPI-Stammlösung</b>	DAPI ddH <sub>2</sub> O	1 mg 0,4 mL
<b>Enzchek® Lipase Substrat</b>	Enzchek® Lipase Substrat gelöst in DMSO	1 mM
<b>Exzystierungslösung I, sterilfiltriert, pH 2,0</b>	wässrige HCl Hank's Puffer + 29 mM L-Cystein, 67 mM Glutathion 0,1 M NaHCO <sub>3</sub>	5 mL 2,5 mL 2,5 mL

Name	Zusammensetzung	Menge
<b>Exzystierungslösung II, sterilfiltriert, pH 8,0</b>	Tyrode-Lösung	
	NaCl	136,9 mM
	KCl	2,7 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1,8 mM
	MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 mM
	Glucose	5,55 mM
	Rindertrypsin	0,1% (m/V)
	gelöst in ddH <sub>2</sub> O	
Der pH-Wert wurde mit 7,5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung (m/V) eingestellt.		
<b>GelGreen™ Lösung</b>	GelGreen™	45 µL
	ddH <sub>2</sub> O	150 mL
<b>LPL-Puffer, pH 8,0</b>	NaCl	0,3 M
	Tris-HCl	40 mM
	BSA (fettsäurefrei)	3,0% (m/V)
	gelöst in ddH <sub>2</sub> O	
<b>Nilrot-Stammlösung</b>	Nilrot	1,57 mM
	gelöst in Aceton	
<b>Permeabilisierungspuffer</b>	Triton® X-100	0,25% (V/V)
	Glycin	0,1 M
	gelöst in PBS	
<b>Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7,2</b>	NaCl	137,0 mM
	KCl	2,7 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,5 mM
	gelöst in ddH <sub>2</sub> O	
Der Puffer wurde steril hergestellt und wird nachfolgend als PBS bezeichnet.		

Name	Zusammensetzung	Menge
<b>Resazurinlösung, sterilfiltriert</b>	Resazurin	200 µM
	gelöst in PBS	
Resazurin wurde gelöst, sterilfiltriert und unter Ausschluss von Licht bei 4 °C maximal vier Wochen gelagert.		
<b>TAE-Puffer, pH 8,5</b>	Tris	40 mM
	Essigsäure	20 mM
	EDTA	1 mM
	gelöst in ddH <sub>2</sub> O	
<b>TYI-S-33 Medium, sterilfiltriertes modifiziertes pH 7,0</b>	Grundmedium	
	Pepton aus Casein	18,0 g/L
	Hefeextrakt	9,0 g/L
	Glucose	55,5 mM
	NaCl	34,2 mM
	L-Ascorbinsäure	1,1 mM
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,7 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,4 mM
	gelöst in ddH <sub>2</sub> O	
	Zusätze	
FCS, hitzeinaktiviert	10% (V/V)	
Galle von Rind und Schaf	0,05% (m/V)	
Ammoniumeisen(III)citrat	0,00228% (m/V)	
L-Cystein	16,5 mM	
Penicillin	100 U/ mL	
Streptomycin	172 µM	
Das Grundmedium wurde nach Sterilfiltration bei -30 °C gelagert und die gelisteten Additive dem Medium kurz vor Gebrauch zugefügt. Das gebrauchsfertige Medium wurde bei 4 °C gelagert und innerhalb von 2 Wochen verwendet. Es wird nachfolgend als <i>Giardia</i> -Kulturmedium bezeichnet.		

## 2.4. *Giardia duodenalis*

Der WB C6-Stamm wurde von der American Type Culture Collection (ATCC #50803) bezogen.

Dieser Klon stammt ursprünglich aus einem amerikanischen Patienten, der gegenüber verschiedenen Therapien mit Metronidazol und Quinacrin refraktär blieb. Im November 1979 konnte mittels Dünndarmin-tubation der Erreger gewonnen, anschließend isoliert und kultiviert werden (SMITH *et al.*, 1982).

Der GS H7-Stamm (ATCC #50581) wurde mir freundlicherweise von Prof. Dr. Staffan Svärd (UppsalaUniversity) überlassen. Auch dieser Klon konnte aus einem Patienten isoliert werden, der sich in Alaska infizierte (NASH *et al.*, 1985).

Die Isolate 14-03/F7, 103-01/C1, 115-01/H2, 143-01/D3, 187-01/B1 entstammen ebenfalls infizierten Patienten, die zum Teil gegenüber einer Metronidazoltherapie unempfindlich blieben. Von Prof. Dr. med. Ralf Ignatius (Institut für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit Berlin) wurden die entsprechenden Stuhlproben zur Verfügung gestellt.

In Tabelle 7 sind die für diese Arbeit verwendeten *G. duodenalis*-Stämme gelistet.

**Tabelle 7: *Giardia duodenalis*-Stämme**

Name	Vermutlicher Ursprungsort der Infektion	Assemblage	Symptomatik	Therapie-Resistenz (MTZ)
WB C6	Afghanistan	AI	Erbrechen, Blähungen, Bauchkrämpfe, Durchfall (übelriechende, wässrige Stühle), Gewichtsverlust	ja
GS H7	Alaska	B	symptomatisch	-
103-01/C1,	Indien	AI	nicht zuordnungsfähig, da Koinfektion mit <i>Campylobacter spp.</i>	nein
187-01/B1	Indien	B	nicht zuordnungsfähig, da Koinfektion mit <i>Campylobacter spp.</i>	nein
14-03/F7,	Dominikanische Republik	AII	Malabsorption	ja
115-01/H2,	Belize	AII	nicht zuordnungsfähig, da Koinfektion mit <i>Clostridium difficile</i>	nein
143-01/D3,	Hongkong	AII	symptomatisch	nein

### 2.4.1. Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte routinemäßig und generell vor dem Beginn einer Versuchsreihe. Sie diente der Überprüfung und Sicherstellung der Assemblage-Zugehörigkeit der eingesetzten *Giardia*-Trophozoiten. Für eine Typisierung ist das Triosephosphatisomerase-Gen besonders geeignet, da es eine hohe Sequenzheterogenität innerhalb der *Giardia ssp.* besitzt und bereits gut untersucht wurde (MONIS *et al.*, 1999, SULAIMAN *et al.*, 2003).

Die Trophozoiten-DNA der verschiedenen Isolate wurde mit dem Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit entsprechend der Anleitung des Herstellers isoliert und nachfolgend unter Verwendung spezifischer Primer das Triosephosphatisomerase-Gen mittels einer *Nested*-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dabei werden zwei PCR Reaktionen nacheinander geschaltet und das PCR-Produkt aus der ersten Amplifikation dient als Matrize für die zweite PCR. In dieser wird ein Primerpaar verwendet, das innerhalb des ersten Amplifikats bindet, so dass nur noch DNA aus der ersten PCR amplifiziert werden kann, die diese zwei Primerbindungsstellen ebenfalls enthält. Unspezifische PCR-Produkte aus der ersten PCR werden nicht mehr amplifiziert. Dadurch ergibt sich eine gesteigerte Sensitivität sowie Spezifität gegenüber einer Standard-PCR. Die jeweiligen PCR-Bedingungen und Primer sind in Tabelle 8 und 9 gelistet. Die Synthese der Primer wurde von der Firma Eurofins MWG Operon übernommen.

**Tabelle 8: PCR-Einstellungen für die Genotypisierung**

PCR	PCR-Schritt	Temperatur in °C	Zeit in min:sek	Zyklen
1. PCR	Initiale Denaturierung	95	05:00	1
	Denaturierung	95	00:45	35
	Primerhybridisierung	50	00:45	
	Elongation	72	00:60	
	Finale Elongation	72	07:00	1
2. PCR	Initiale Denaturierung	95	05:00	1
	Denaturierung	95	00:30	35
	Primerhybridisierung	50	00:30	
	Elongation	72	00:15	
	Finale Elongation	72	01:00	1

**Tabelle 9: PCR-Ansätze und Primer für die Genotypisierung**

PCR	PCR-Ansatz	Primernamen	Primersequenz
1. PCR	3 mM MgCl <sub>2</sub> je 200 µM dATP, dCTP, dTTP, dGTP je 200 nM Primer 2,5 U/µL Mango Taq DNA Polymerase 3 µL DNA 1x PCR Puffer H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>	AL3543 AL3546	5'-AAATIATGCCTGCTCGTCG-3' 5'-CAAACCTTITCCGCAAACC-3'
2. PCR	3 mM MgCl <sub>2</sub> je 200 µM dATP, dCTP, dTTP, dGTP je 200 nM Primer 2,5 U/µL Mango Taq DNA Polymerase 1 µL PCR Produkt 1x PCR Puffer H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>	AL3544 AL3545	5'-CCCTTCATCGGIGGTAACCTT-3' 5'-GTGGCCACCACICCCGTGCC-3'

Zur Überprüfung wurden die PCR-Produkte einer Agarose-Gelelektrophorese und Visualisierung mittels GelGreen™ unterzogen. Um das Produkt der zweiten PCR von ungebundenen Primern, Nukleotiden und Puffer zu reinigen, wurde das QIAquick PCR Purification Kit verwendet. Im Anschluss wurde die Sequenzreaktion für das aufgereinigte PCR-Produkt unter Verwendung des BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits durchgeführt. Die Bedingungen für die Sequenzreaktion sind in Tabelle 10 gelistet. Die Sequenzierung erfolgte im hauseigenen Sequenzierlabor des RKI.

**Tabelle 10: Sequenzansatz und Bedingungen für die Sequenzreaktion**

Ansatz für Sequenzreaktion			
	Volumen		
Primer AL 3544 oder AL3545 (aus 10 mM Stammlösung)	0,5 µL		
gereinigtes 2. PCR-Produkt (10-20 ng/µL)	1,5 µL		
BigDye 3.1	1,0 µL		
5x BigDye Terminator Puffer	1,5 µL		
H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>	5,5 µL		
Sequenzreaktionsschritt	Temperatur in °C	Zeit in min:sek	Zyklen
Initiale Denaturierung	96	01:00	1
Denaturierung	96	00:10	} 25
Primerhybridisierung	59	00:05	
Elongation	60	04:00	

Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe der Software Geneious. Dazu wurden die ermittelten Sequenzen mit Referenzsequenzen (GenBank: Identifikationscode: AI: L02120, AII: U57897, AIII: DQ650648, BIII: AF069561, BIV: AF069560, C: AY228641, D: DQ246216, E: AY228645, F: AF069558, G: EU781013) verglichen.

#### 2.4.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mit 6x Ladepuffer (Fermentas) im Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend auf 1%iges Agarosegel aufgetragen. Als Elektrophoresepuffer diente TAE, die zur Auftrennung angelegte Spannung betrug 10 V/cm und als Größenstandard wurde GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas) verwendet. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel für 15 min in GelGreen™ Lösung gefärbt, um die DNA sichtbar zu machen. GelGreen™ interkaliert in die DNA und fluoresziert unter Anregung mit UV-Licht.

#### 2.4.3. Aufreinigung von Zysten und Exzystierung

Die jeweilige Stuhlprobe wurde in 10 mL ddH<sub>2</sub>O homogenisiert und durch vierlagige Gaze filtriert, um größere Partikel aus der Probe zu entfernen. Das Filtrat wurde bei Raumtemperatur und 900 x g für 5 min zentrifugiert, das Pellet in 50 mL ddH<sub>2</sub>O gewaschen und erneut zentrifugiert bis der Überstand klar erschien. Anschließend wurde der Rückstand in 10 mL ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, resuspendiert und einer

Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Dazu wurde die Probe mit 10 mL kalter 1 M Saccharoselösung unterlegt und bei 600 x g und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Dabei darf der Rotor ausschließlich ungebremst auslaufen, um ein Verwirbeln des Dichtegradienten zu verhindern. Die Interphase wurde entnommen, mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, bei 900 x g und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 5 mL ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, um die Dichtegradientenzentrifugation mit 0,5 M Saccharoselösung zu wiederholen. Das erhaltene Zystenpellet wurde abschließend mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in 1 mL ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, die Zystenanzahl mittels Neubauer Zählkammer ermittelt und bei 4 °C aufbewahrt.

Die aus der Stuhlprobe mittels Dichtegradientenzentrifugation angereicherten Zysten wurden nachfolgend in die Exzystierung gebracht. Um die *in vitro* Exzystierung zu initiieren, wurde nach einem modifizierten Protokoll von RICE and SCHAEFER (1981) vorgegangen. Zunächst wurden die angereicherten Zysten (mindestens  $5 \times 10^5$ ) für mindestens eine Woche in ddH<sub>2</sub>O bei 4 °C aufbewahrt, um ihre Reifung zu gewährleisten. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit Antibiotika (Erythromycin 136 µM, Chloramphenicol 613 µM, Amikacin 342 µM, Tetracyclin 450 µM, Rifampicin 243 µM) bei Raumtemperatur bevor die Exzystierung durch Absenkung des pH Wertes eingeleitet wurde. Der Zystensuspension wurden 10 mL der Exzystierungslösung I zugesetzt und sodann für 30 min bei 37 °C im Wasserbad belassen. Anschließend wurden die Zysten bei 1000 x g für 5 min sedimentiert, um sie mit 10 mL der vorgewärmten (37 °C) Exzystierungslösung II zu waschen, erneut zu zentrifugieren, in 1 mL Exzystierungslösung II aufzunehmen und für weitere 30 min bei 37 °C im Wasserbad zu inkubieren. Die Zysten wurden erneut sedimentiert und in *Giardia*-Kulturmedium, komplettiert mit Antibiotika (Erythromycin 2,7 µM, Chloramphenicol 12,3 µM, Amikacin 6,8 µM, Tetracyclin 9,0 µM, Rifampicin 4,9 µM, Fosfomycin 724 µM, Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 172 µM) resuspendiert.

Von dieser Zystensuspension wurde eine serielle Verdünnung in einer 96-Well-Mikrotiterplatte hergestellt und soweit verdünnt, dass sich statistisch nur noch eine Zyste pro Vertiefung befand. Es folgte eine Inkubation unter sauerstoffarmen Bedingungen bei 37 °C. Nach erfolgreicher Exzystierung wurde aus der jeweiligen Vertiefung eine Kultur angezogen. Jedes Isolat stammte aus einer Vertiefung und wurde genotypisch charakterisiert.

Die Aufreinigung und Exzystierung der Zysten wurde routinemäßig von Fr. Petra Gosten-Heinrich (FG16, RKI) übernommen.



#### 2.4.4. Kultivierung

*G. duodenalis*-Trophozoiten wurden axenisch in Kulturflaschen mit einer planaren Seite und Schraubverschluss bei 37 °C kultiviert. Um weitestgehend anaerobes Wachstum zu gewährleisten, erfolgte eine maximale Befüllung der Flaschen mit *Giardia*-Kulturmedium (vgl. 2.3.). Bevor die *Giardien*-Kulturen vollständig konfluent waren, wurden die Trophozoiten in eine neue Kulturflasche mit frischem Medium umgesetzt. Dazu wurden die Kulturflaschen für mindestens eine halbe Stunde auf Eis gelagert, so dass sich die adhärenen Trophozoiten von der Wand ablösen konnten. Über anschließendes Abklopfen wurden sie vollständig in Suspension gebracht. Eine Verdünnung von 1:100 oder 1:50 der Trophozitensuspension diente als Inokulum. Dieser Wechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage.

#### 2.4.5. Herstellung eines *Giardia duodenalis*-Lysates

Konfluente Kulturen von *G. duodenalis*-Trophozoiten wurden für mindestens 30 min auf Eis gestellt, zentrifugiert (900 x g für 10 min, 4 °C), nach Verwerfen des Überstandes in eiskaltem PBS aufgenommen und vereint. Die Trophozitensuspension wurde insgesamt dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und schlussendlich in 1 mL Puffer aufgenommen. Es wurde der Puffer eingesetzt, der später in der entsprechenden Methode genutzt wurde. Nach Ermittlung der Trophozitenzahl mittels Neubauer Zählkammer wurden die Trophozoiten per Ultraschall (Sonoplus HD 2070; Auslastungsgrad 80%, 1 min 30 sek) mechanisch lysiert. Um eine Überhitzung und eventuelle Denaturierung der Proteinbestandteile zu verhindern, wurde die Lyse unter Zugabe von Proteaseinhibitoren (Protease-Inhibitor Complete Ultra) auf Eis durchgeführt. Ein Teil des Lysates wurde entnommen und bei -80 °C aufbewahrt. Der verbliebene Teil wurde für 30 min bei 20000 x g und 4 °C zentrifugiert, um die zellulären Bestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und separiert aufbewahrt. Das Pellet wurde in dem entsprechenden Puffer resuspendiert. Überstand und Pellet wurden ebenfalls bei -80 °C gelagert. Am Ende wurde von den drei erhaltenen Fraktionen (Totalextrakt (TE), lösliche Fraktion (S) und unlösliche zelluläre Fraktion (P)) jeweils der Gesamtproteingehalt bestimmt.

#### 2.4.6. Kryokonservierung und Auftauen von *Giardia duodenalis*-Trophozoiten

Um Trophozoiten der verschiedenen Isolate über einen längeren Zeitraum aufzubewahren, wurden sie kryokonserviert. Dazu wurden jeweils konfluente Kulturen ( $0,5-1,0 \times 10^7$  Trophozoiten) verwendet. Nachdem die Trophozoiten für 30 min auf Eis gestellt wurden, um ihre Ablösung zu gewährleisten, folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei  $900 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$ . Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in *Giardia*-Kulturmedium, versetzt mit 10% DMSO, aufgenommen. Die Trophozoitensuspension wurde anschließend in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden, aufbewahrt in Nalgene® Nunc Cryo 1 °C Mr. Frosty Freezing Container, langsam bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Nach 24 bis 48 h konnten sie dann in flüssigen Stickstoff eingelagert werden.

Die eingefrorene Probe wurde nach dem Auftauen in ein mit vorgewärmten *Giardia*-Kulturmedium gefülltes Kulturröhrchen überführt und anschließend zentrifugiert ( $900 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 5 min), um das DMSO ausreichend zu verdünnen und schlussendlich zu entfernen. Im Folgenden wurden die Trophozoiten in frischem *Giardia*-Kulturmedium resuspendiert und kultiviert (vgl. 2.4.4.).

#### 2.5. Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge diente der BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce (Thermo Scientific). Nach dem Prinzip der Biuretreaktion reduzieren Proteine im alkalischen Milieu  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen, welche dann über die Bildung eines violetten Chelatkomplexes mit Bicinchoninsäure (BCA) detektiert werden können (SMITH *et al.*, 1982). Dazu wird die Absorption des Komplexes bei 562 nm vermessen.

Entsprechend der Anleitung des Herstellers wurde aus den mitgelieferten Rinderserumalbumin(BSA)-Referenzen eine Standardkurve zur Bestimmung der Proteinkonzentration erstellt. Die zu untersuchenden Proben ( $10 \mu\text{L}$ ) sowie die BSA-Standards ( $10 \mu\text{L}$ ) wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit der zuvor frisch hergestellten Reaktionslösung ( $200 \mu\text{L}$ ) versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  unter Lichtausschluss und anschließendem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Platte bei 562 nm am ELISA-Reader photometrisch vermessen.

## 2.6. Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer

Für die Bestimmung der Trophozoitenzahl mussten die adhärenen Trophozoiten zunächst von der Wand der Kulturflasche gelöst werden. Dazu wurden sie, wie unter 2.4.4. beschrieben, in Suspension gebracht.

Da *G. duodenalis*-Trophozoiten begeißelt sind, wurden sie mit Paraformaldehyd immobilisiert. Die Verdünnung wurde in der Berechnung berücksichtigt. Nach Einbringen der Suspension in die Neubauer Zählkammer und wenigen Minuten Wartezeit, um sicher zu stellen, dass die Parasiten vollkommen fixiert waren, wurden sie ausgezählt. Es wurden vier Großquadrate ausgezählt und anschließend die Gesamtzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Anzahl der Zellen/mL} = \frac{\text{Anzahl der Zellen in 4 Großquadraten}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

### Abbildung 4: Bestimmung der Zellzahl

Zur Ermittlung wurde das Lichtmikroskop Axiostar plus (Zeiss) verwendet.

## 2.7. Ermittlung der Wachstumskonstanten

Um für die verschiedenen *G. duodenalis*-Isolate eine vergleichende Aussage über deren Wachstum treffen zu können, wurde für jedes Isolat die Wachstumskonstante bestimmt. Dazu wurden aus einer konfluenten Kultur  $1 \times 10^5$  Trophozoiten zur Inokulation einer neuen verwendet. Die Kultivierung erfolgte unter sauerstoffarmen Bedingungen. Nach 24 h, 48 h, 72 h, und 96 h wurde die Trophozoitenzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Mit Hilfe von GraphPadPrism 5.0 konnten anhand der erstellten Wachstumskurven Parameter wie Wachstumskonstante  $\lambda$  und Verdopplungszeit  $t$  ermittelt werden.

## 2.8. Resazurin Assay

Zur Beurteilung der anti-giardialen Eigenschaften der zu untersuchenden Substanzen und der Trophozoitenproliferation unter Behandlung mit selbigen wurde der Resazurin Assay (BENERE *et al.*, 2007) in modifizierter Form durchgeführt. Zunächst wurden die optimalen Bedingungen für dieses Testsystem ermittelt, indem verschiedene Trophozoitenzahlen pro Well über 24 h, 48 h und 72 h untersucht wurden. Aus diesen Voruntersuchungen

resultierend wurden die Testbedingungen wie folgt festgelegt: Inokulum  $5 \times 10^3$ , Behandlungsdauer von 24 h (siehe Ergebnisse).

Für die Durchführung des Resazurin Assays wurden Trophozoiten aus konfluenten Kulturen genutzt. Diese wurden, wie unter 2.6. beschrieben, geerntet und ausgezählt.  $5 \times 10^3$  Trophozoiten pro Well (in 100  $\mu\text{L}$  *Giardia*-Kulturmedium) wurden in eine schwarze 96-Well-Platte eingesetzt und für 30 min bei 37 °C belassen, so dass sie hinreichend adhären konnten. Im Anschluss folgte die Inkubation mit den zu testenden Substanzen (Probenvolumen 100  $\mu\text{L}$ ) für 24 h bei 37 °C und unter anaeroben Bedingungen, die über die Aufbewahrung der Platte in einem mit AnaeroGen Sacht bestücktem AnaeroJar gewährleistet wurde. Nach 24 h wurde das Medium vorsichtig gegen vorgewärmtes PBS (37 °C) ausgetauscht, indem die Trophozoiten nach Abnahme des Mediums zweimal mit PBS gewaschen wurden. Anschließend wurde Resazurininlösung (20  $\mu\text{L}$ ; Endkonzentration 20  $\mu\text{M}$ ) hinzugefügt und für weitere 4 h bei 37 °C und unter Sauerstoffausschluss inkubiert. Die Fluoreszenzintensitäten (550Ex/595Em) wurden mit einem Mikroplattenreader (Tecan) vermessen und unter Verwendung von Microsoft Excel 2010 und GraphPad Prism 5.0 ausgewertet.

Um den anti-giardialen Effekt der zu untersuchenden Substanzen zu testen, wurden Verdünnungsreihen angefertigt und die Trophozoiten einzeln oder in Kombination behandelt. Dabei wurde der Lösungsmittelanteil (DMSO, EtOH) von 0,12% (V/V) nicht überschritten, welcher keinen signifikanten Effekt auf das Trophozoitenwachstum hatte. Für die Auswertung der Daten wurde der Messwert der unbehandelten Trophozoiten als 100% (Prozent des Wachstums) definiert und die Messwerte der behandelten Trophozoiten dazu in Relation gesetzt.

## 2.9. Morphologische Untersuchungen

### 2.9.1. Herstellen von mikroskopischen Präparaten

Zur Vorbereitung der verschiedenen Färbungen (Diff-Quik®, DAPI, Fluoreszenz) wurden *G. duodenalis*-Trophozoiten entweder auf sterile Deckgläschen mit einem Durchmesser von 13 mm (eingesetzt in das Well einer 24-Well-Platte) oder direkt in die Kammern eines sterilen Kammerobjektträgers eingesetzt. Daraufhin folgte eine Ruhephase von 30 min bei 37 °C unter sauerstoffarmen Bedingungen. Nach erfolgreicher Adhäsion der Parasiten, sichergestellt durch mikroskopische Überprüfung, erfolgte die Zugabe der jeweiligen Testsubstanzen. Das Endvolumen im Well wurde einer optimalen Befüllung entsprechend gewählt (Deckgläschen: 1000  $\mu\text{L}$ , Kammerobjektträger: 400  $\mu\text{L}$ ). Nach Ablauf der Inkubation,

die ebenfalls unter sauerstoffarmen Bedingungen bei 37 °C durchgeführt wurde, wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Probe einmal mit 37 °C warmen PBS gewaschen. Anschließend galt es die Trophozoiten zu fixieren, um die entsprechenden Färbungen durchführen zu können. Die Fixierung erfolgte mit 37 °C vorgewärmten 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in PBS über 30 min. Unter Beteiligung der Aldehydgruppen des PFA kommt es im Wesentlichen zu einer Quervernetzung von Proteinen. Durch diese Fixierung wird der Proteinstatus der Zelle erhalten. Um das PFA sorgfältig zu entfernen, wurde das Präparat ausgiebig mit PBS gewaschen und anschließend entsprechend gefärbt. Um optimale optische Ergebnisse des gefärbten Präparats zu erhalten, wurden sie mit einem passenden Eindeckmittel eingedeckt.

## 2.9.2. Färben von Präparaten

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Färbemethoden einzeln vorgestellt. Zum Teil wurden die Färbungen sukzedan für eine Präparation angewendet.

### *Modifizierte Pappenheim-Färbung (Diff-Quik®)*

Die Diff-Quik®-Schnellfärbemethode ist angelehnt an die Pappenheim-Färbung, vereint das Spektrum der Giemsa- und der May-Grünwald-Färbung und ist somit geeignet, morphologische Besonderheiten differenziert darzustellen. Das Set besteht aus drei Lösungen, zum einen aus der Diff-Quik®-Fixierlösung und zum anderen aus zwei Färbelösungen. Die Fixierlösung, bestehend aus Fast Green (0,002 g/L) gelöst in Methanol, erfüllt den Zweck der Fixierung und Färbung von Proteinen (bläulich). Die Färbelösung I enthält den sauren Xanthenfarbstoff Eosin Y (1,22 g/L PBS, pH 6,6) und färbt Zellbestandteile wie das Zytoplasma rötlich. Die Thiazin enthaltende Färbelösung II (1,1 g/L PBS, pH 6,6) dient vorrangig der Färbung des Zellkerns (dunkelblau). Färbedauer, pH-Wert der Reagenzien sowie der Fixierungstyp können das Färberesultat dennoch beeinflussen und zu deutlichen Unterschieden führen.

Nach 24-stündiger Inkubation der WB C6-Trophozoiten ( $5 \times 10^4$ ) mit THL in verschiedenen Konzentrationen (3,1  $\mu\text{M}$ , 6,3  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ ) oder der Vehikelkontrolle (EtOH 0,06%) und anschließender Fixierung wie unter 2.9.1. beschrieben, wurden die Deckgläschen vorsichtig mit der Fixierlösung für eine Sekunde bedeckt und wieder von der Lösung befreit. Dieser Zyklus wurde fünfmal wiederholt. Mit den Färbelösungen I und II wurde in gleicher Weise verfahren, der Zyklus wurde dabei jeweils um einen Durchlauf verkürzt. Nach sorgfältigem Waschen der Deckgläschen mit PBS, um die überschüssige Färbelösung zu entfernen,

wurden die Deckgläschen vorsichtig mit Hilfe eines Kanülenhakens aus dem Well gehiebt. Anschließend trockneten die Präparate an der Luft und wurden mit Entellan® auf einem Objektträger fixiert und eingedeckt.

#### *4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Färbung*

Für die Zellkernfärbung wurde der Farbstoff 4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet. DAPI lagert sich bevorzugt an AT-reiche (Adenin, Thymin) Regionen der DNA und fluoresziert nach Anregung mit ultraviolettem Licht im sichtbaren Bereich mit blauer Farbe.

Die Kernfärbung wurde nach der Fixierung der Trophozoiten mit PFA (vgl. 2.9.1.) durchgeführt. Dazu wurde jeweils eine frisch zubereitete DAPI-Lösung (1 ng/ $\mu$ L in PBS) auf das Objekt pipettiert und 30 min unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit 37 °C warmen PBS (Einwirkzeit jeweils 10 min) um den überschüssigen Fluoreszenzfarbstoff zu entfernen. Zum Eindecken diente das Vectashield® Mounting Medium, um das Ausbleichen des Farbstoffes zu verzögern und die Beobachtungsdauer am Mikroskop zu verlängern.

#### *Immunfluoreszenzfärbung*

Zur Visualisierung der  $\alpha$ -Tubulinstrukturen von unbehandelten und behandelten (THL, Paclitaxel) WB C6-Trophozoiten wurde die indirekte Immunfluoreszenzfärbung genutzt. Dazu wurden die auf Kammerobjektträger fixierten Trophozoiten ( $1,25 \times 10^5$ ) (vgl. 2.9.1.) zunächst mit Permeabilisierungspuffer inkubiert. Nach 30 min wurde selbiger entfernt und die Trophozoiten einmal mit 37 °C warmen PBS gewaschen (Einwirkzeit 10 min). Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden, wurden die Präparate nachfolgend mit einer Blocklösung für 60 min inkubiert. Nachdem die Blocklösung vorsichtig abgenommen und die Präparate mit 37 °C warmen PBS gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation mit 5  $\mu$ g/mL monoklonalem Maus Primärantikörper DM1A gegen  $\alpha$ -Tubulin (1:200 verdünnt in Blocklösung) (Sigma-Aldrich) für weitere 60 min. Der Primärantikörper wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit 37 °C warmen PBS entfernt und 0,75  $\mu$ g/mL des Sekundärantikörpers, polyklonaler FITC-konjugierter Ziege-Anti-Maus-IgG Antikörper (1:2000 verdünnt in Blocklösung) (Jackson ImmunoResearch), zugesetzt. Die Inkubation erfolgte unter Lichtausschluss. Nach 60 min wurde erneut dreimal mit 37 °C warmen PBS gewaschen. Als Gegenfärbung zur besseren Detektion wurde zum einen ein polyklonaler Cy3-markierter Ratte IgG Antikörper

(Troph-o-Glo™, unverdünnt) (Waterborne, Inc.) gegen die Trophozoiten selbst eingesetzt - Inkubation für 60 min unter Lichtausschluss und Entfernung durch dreimaliges Waschen mit 37 °C warmen PBS - zum anderen wurde die Kernfärbung mit DAPI durchgeführt (siehe oben). Abschließend wurden die Objektträger mit Vectashield® Mounting Medium eingedeckt.

### 2.9.3. Elektronenmikroskopie (EM)

Um die Morphologie der *Giardia*-Trophozoiten in ihrer Gesamtheit und ultrastrukturell zu untersuchen, wurden Kulturen unbehandelter und behandelter WB C6-Trophozoiten für die Raster- (REM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) aufbereitet. Dazu wurden Parasiten aus einer konfluenten Kultur, wie unter 2.6. beschrieben, geerntet und ausgezählt, um anschließend in Kunststoff-Petrischalen (für TEM,  $1 \times 10^7$  Trophozoiten) oder auf Deckgläschen ( $\varnothing$  10 mm), eingesetzt in eine 24-Well-Platte (für REM,  $1 \times 10^5$  Trophozoiten), überführt zu werden. Nach einer Ruhephase von einer Stunde, um eine ausreichende Adhärenz der Trophozoiten gewährleisten zu können, erfolgte die Inkubation mit den Testsubstanzen THL (5 und 15  $\mu$ M) und MTZ (11 und 33  $\mu$ M) sowie den Vehikelkontrollen (EtOH 0,04%, DMSO 0,03%) für 24 h.

#### 2.9.3.1. Transmissions-EM

Nach erfolgter Inkubation mit den Testsubstanzen wurde der Überstand sorgfältig abgenommen, in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C auf Eis gelagert, um auch die abgelösten Parasiten zu untersuchen.

Die adhärennten Trophozoiten wurden einmal mit 37 °C warmen PBS (12 mL) gewaschen und anschließend mit 37 °C vorgewärmten Fixans (4% PFA, 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2; 10 mL) überschichtet. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Petrischalen im Kühlschrank aufbewahrt.

Die in Zentrifugenröhrchen befindlichen Überstände wurden bei 4 °C und 900 x g für 10 min pelletiert und der Überstand im Anschluss verworfen. Das Pellet wurde in 4 °C kaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 4 °C vorgekühltem Fixans (siehe oben) aufgenommen und im Kühlschrank aufbewahrt.

Letztendlich mussten die Pellets mit ihren korrespondierenden fixierten Trophozoiten (erhalten durch vorsichtiges Abschaben von den Petrischalen) wieder vereint werden, da das Material aus den Überständen nicht für eine separate Untersuchung mittels TEM ausreichte.

Nach der Probenvorbereitung wurden die rasterelektronischen Präparate freundlicherweise in der Abteilung ZBS 4 spezielle Licht- und Elektronenmikroskopie des RKI unter der Leitung von Dr. M. Laue angefertigt.

Dazu wurden die vereinigten Trophozoiten in niedrigschmelzender Agarose aufgenommen und in Osmiumtetroxid (1% in destilliertem Wasser) postfixiert. Um den Kontrast des Probenmaterials im TEM zu steigern, wurde eine Blockkontrastierung durchgeführt. Das heißt die Probe wurde durch Immersion in Tannin (0,1% in 0,05 M Hepes) und Uranylacetat (2% in destilliertem Wasser) imprägniert, so dass die Elektronen an dem Schwermetall stärker gestreut werden konnten. Anschließend wurden die Proben entwässert und in Epon-Harz eingebettet (LAUE, 2010). Nachfolgend wurden Ultradünnschnitte mit einem Ultramikrotom angefertigt (UC7, Leica), die abschließend einer Schnittkontrastierung mit Uranylacetat (2% in destilliertem Wasser, 20 min) und Bleicitrat (3 min) unterzogen wurden. Die Schnitte wurden mit einem Tecnai 12 Transmissionselektronenmikroskop (FEI) bei 120 kV untersucht.

### 2.9.3.2. Raster-EM

Nach erfolgter Inkubation mit den Testsubstanzen wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Trophozoiten wurden einmal mit 37 °C warmen PBS (1 mL) gewaschen und anschließend mit 37 °C vorgewärmten Fixans (siehe oben; 500 µL) überschichtet. Im Anschluss wurden die Kulturen im Kühlschrank aufbewahrt.

Nach der Probenvorbereitung wurden die rasterelektronischen Präparate freundlicherweise in der Abteilung ZBS 4 spezielle Licht- und Elektronenmikroskopie des RKI unter der Leitung von Dr. M. Laue angefertigt.

Zur zusätzlichen Lipidfixierung und Kontraststeigerung wurden die adhärenen Trophozoiten in Osmiumtetroxid (1% in destilliertem Wasser) für eine Stunde postfixiert. Die fixierten, kontrastierten Proben mussten für die REM vollständig entwässert werden. Dazu wurden diese mit Ethanol in steigender Konzentration behandelt und anschließend getrocknet. Um eine Artefaktbildung zu vermeiden, erfolgte die Trocknung mit Hilfe der Kritischen-Punkt-Trocknung mit Kohlenstoffdioxid (Emitech K850, Quorum Technologies). Zuletzt wurden die Proben auf Halterungen angebracht und mit einer dünnen Gold-Palladium-Schicht beschichtet (E5100 Sputter Coater, Quorum Technologies), so dass einfallenden Elektronen abgeleitet und statische Aufladungsphänomene vermieden wurden. Die Untersuchungen der Proben erfolgten am LEO 1530 Rasterelektronenmikroskop (Zeiss) bei 5 kV unter Verwendung eines Sekundärelektronendetektors.



## 2.10. Untersuchungen zum Fettstoffwechsel

### 2.10.1. Nilrotfärbung

Nilrot, ein lipophiler fluoreszierender Phenoxazin-Farbstoff, eignet sich zum Anfärben von Lipiden. Dabei ist die Fluoreszenz von der Hydrophobie der Fette abhängig.

WB C6-Trophozoiten ( $1,25 \times 10^5$ ) wurden über einen Zeitraum von einer Stunde oder für 24 h mit THL (2,15  $\mu$ M, 12,9  $\mu$ M) oder MTZ (33  $\mu$ M) inkubiert und auf Kammerobjektträger fixiert (vgl. 2.9.1.). Zur Vorbereitung auf die Nilrot-Färbung wurden die Parasiten für 60 min mit einer 37 °C warmen Lösung aus 2% BSA (V/V) und 100 mM Glycin in PBS bedeckt. Nachdem die Lösung vorsichtig abgenommen und dreimal mit 37 °C warmen PBS gewaschen wurde (Einwirkzeit 10 min), erfolgte die Zugabe der Nilrotlösung (0,5  $\mu$ g/mL PBS). Dazu wurde eine Nilrot-Stammlösung von 0,5 mg/mL Aceton angefertigt, die für den Einsatz als Färbelösung auf eine Konzentration von 0,5  $\mu$ g/mL PBS verdünnt wurde. Die Inkubation hatte eine Dauer von 30 min und erfolgte unter Lichtausschluss. Anschließend wurden die Präparate dreimal mit 37 °C warmen PBS gewaschen (Einwirkzeit 20 min). Als Gegenfärbung zur besseren Detektion wurde die Kernfärbung mit DAPI eingesetzt (vgl. 2.9.2.). Abschließend wurden die Objektträger mit Vectashield® Mounting Medium eingedeckt.

### 2.10.2. BODIPY-Phosphatidylcholin

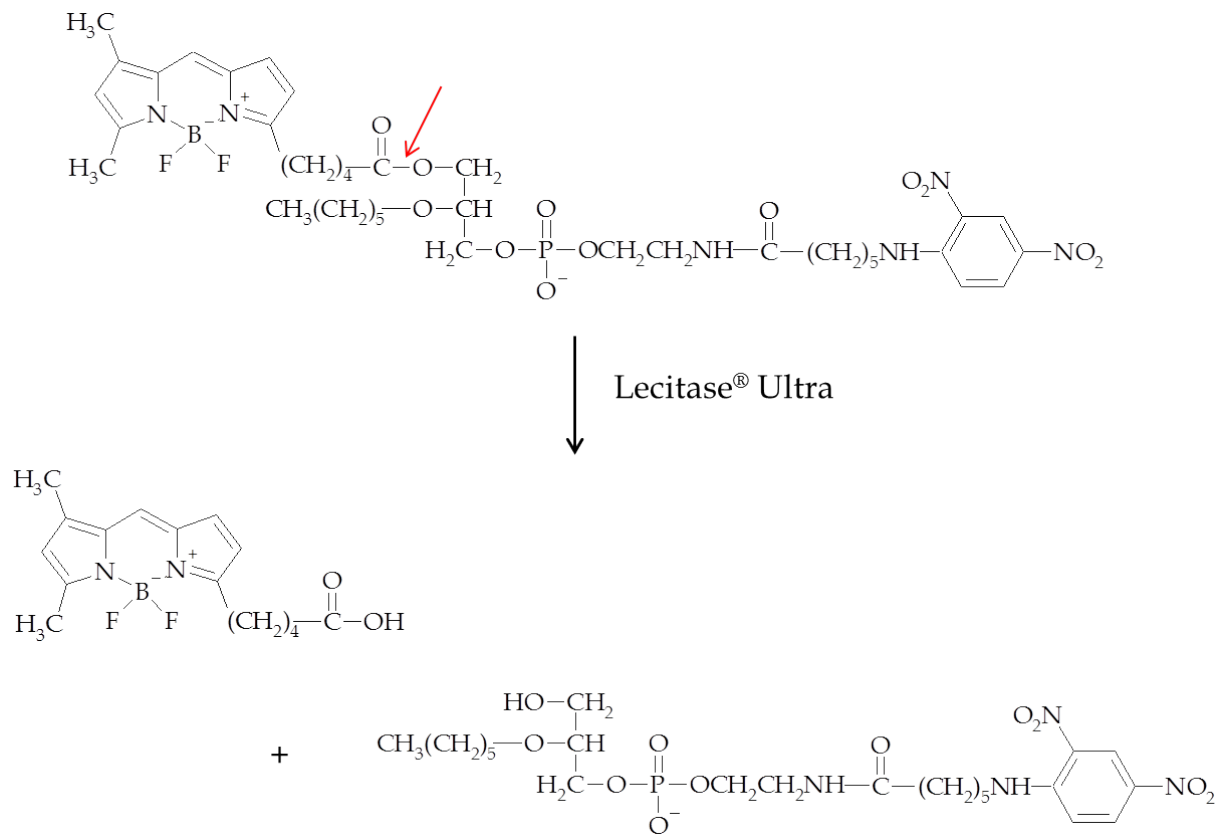
$\beta$ -BODIPY® FL C<sub>12</sub>-HPC (2-(4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-dodecanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin) ist ein Phospholipid-Analogon (Phosphatidylcholin), an dessen  $\beta$ -C-Atom, verbunden über einen C<sub>12</sub>-Alkylrest, ein BODIPY-Fluorophor gekoppelt ist. Über diese Fluorophormarkierung ist eine Visualisierung der Lipidaufnahme in die Zelle möglich.

Zunächst wurden WB C6-Trophozoiten ( $1,25 \times 10^5$ ) in die Kammern eines sterilen Kammerobjektträgers eingesetzt und für 30 min bei 37 °C unter sauerstoffarmen Bedingungen belassen. Nachdem die Trophozoiten hinreichend adhäriert waren, erfolgte die Inkubation mit THL (12,9  $\mu$ M) bzw. der Vehikelkontrolle (EtOH 0,02%) für verschieden Zeiten (0,5 h, 1 h, 2 h und 24 h), jeweils unter sauerstoffarmen Bedingungen und bei 37 °C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium vorsichtig abgenommen und die Trophozoiten einmal mit 37 °C warmen PBS gewaschen. Anschließend wurde die BODIPY-Phosphatidylcholin-Lösung (200 nM in BODIPY-Assay-Puffer) hinzugefügt und für 30 min inkubiert. Die Lösung wurde aus einer 1 mM Stammlösung frisch hergestellt. In

Vorversuchen zur Ermittlung der Inkubationszeit mit BODIPY-Phosphatidylcholin kristallisierte sich ein Zeitraum von 30 min als optimal heraus (Daten nicht gezeigt). Die Inkubation mit der BODIPY-Phosphatidylcholin-Lösung wurde beendet, indem die Lösung vorsichtig abgenommen und einmal mit 37 °C warmen PBS gewaschen wurde. Gleich im Anschluss erfolgte die Fixierung mit 4%igem PFA für 30 min. Das PFA wurde danach durch einmaliges Waschen mit warmer Zwittergentlösung (0,016% in PBS) und zweimaliges Waschen mit warmen PBS (37 °C) entfernt. Als Gegenfärbung zur besseren Detektion wurde die Kernfärbung mit DAPI eingesetzt (vgl. 2.9.2.). Abschließend wurden die Objektträger mit Vectashield® Mounting Medium eingedeckt und mit Nagellack fixiert.

### 2.10.3. Phospholipase A<sub>1</sub> Assay

Die Phospholipase A<sub>1</sub>(PLA<sub>1</sub>)-Aktivität von *Giardia*-Trophozoiten wurde unter Verwendung des Enzchek® Phospholipase A<sub>1</sub> Assay Kits beurteilt. Das Kit enthält ein PLA<sub>1</sub>-Substrat (PED-A1), welches ausschließlich ein Fluoreszenzsignal gibt, wenn es von Enzymen mit PLA<sub>1</sub>-Aktivität umgesetzt wird. Die Lecitase® Ultra ist beispielsweise solch ein Enzym und dient in dem Kit als Kontrolle (MISHRA *et al.*, 2009).



**Abbildung 5: Umsetzung des Phospholipase A<sub>1</sub>-Substrats durch die Lecitase® Ultra**

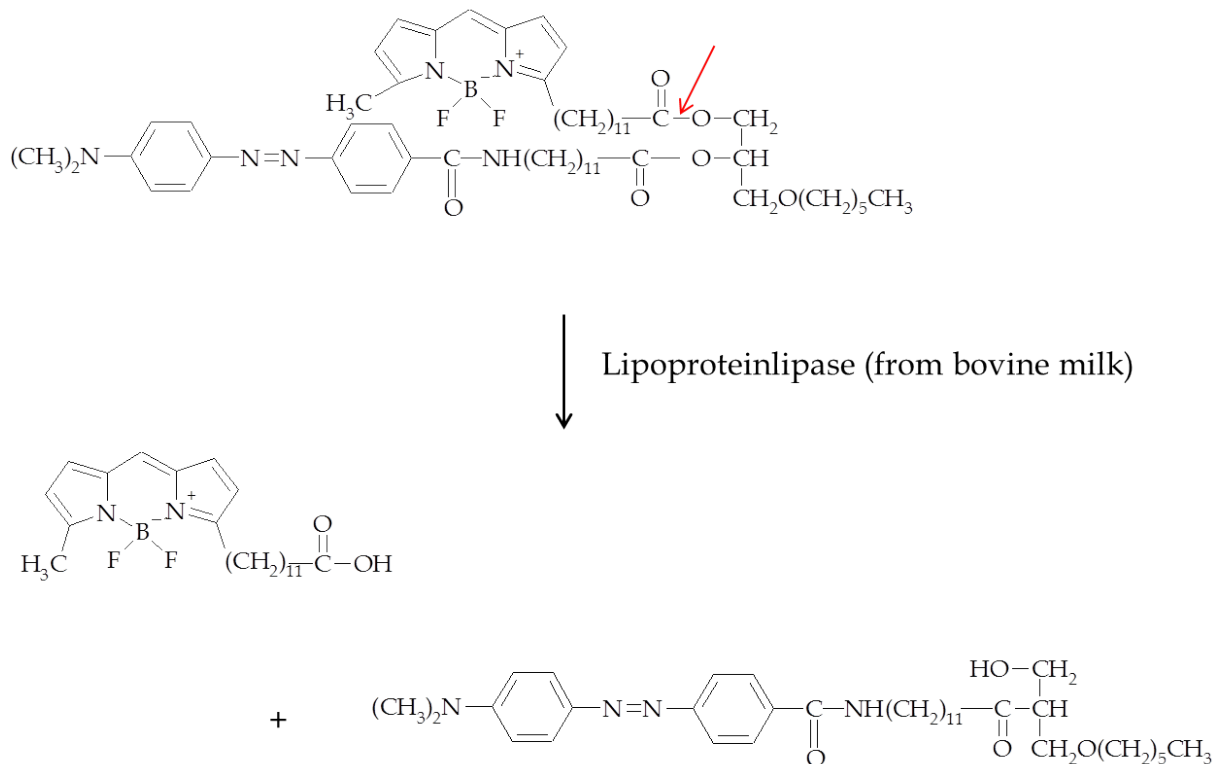
Das Phosphatidylethanolamin trägt an der Alkylkette am  $\alpha$ -C-Atom das Fluorophor BODIPY® FL und einen sogenannten Quencher („Fluoreszenzlöcher“) am Ethanolamin. Durch Abspaltung des BODIPY® FL durch die Lecitase® Ultra wird die Fluoreszenzlöschung aufgehoben.

Zunächst wurden die *Giardia*-Lysatfraktionen (Totalextrakt (TE), lösliche Fraktion (S) und unlösliche zelluläre Fraktion (P)), wie unter 2.4.5. hergestellt und angesetzt in 1 x PLA<sub>1</sub>-Reaktionspuffer, in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert (je 25  $\mu$ L). Die Fraktionen wurden entweder mit 43  $\mu$ M THL (25  $\mu$ L) oder alternativ mit PLA<sub>1</sub>-Puffer (25  $\mu$ L) inkubiert. Die Zugabe des Substrat-Liposomen-Gemisches (50  $\mu$ L), bestehend aus Dioleoylphosphatidylcholin (16,5  $\mu$ M), Dioleoylphosphatidylglycerol (16,5  $\mu$ M) und PLA<sub>1</sub>-Substrat (3,3  $\mu$ M), erfolgte unmittelbar vor Beginn der Messung. Über einen Bereich von 0 - 2,5 U/mL bestand zwischen der Fluoreszenzintensität und der Volumenaktivität der Lecitase® Ultra ein linearer Zusammenhang. Daher wurde die PLA<sub>1</sub> mit einer Aktivität von 0,625 U/mL als Kontrolle eingesetzt. Die Durchführung des Versuchs erfolgte bei einem pH-Wert von  $\sim$ 7 und 37 °C. Die Fluoreszenzintensitäten (460Ex/515Em) wurden über einen Zeitraum von 5 min gemessen. Anhand der erhaltenen Intensität der PLA<sub>1</sub> konnte die Volumenaktivität und unter Verwendung der Gesamtproteinmenge des Lysates die

spezifische Aktivität des Lysates ermittelt werden. Zur Auswertung der Daten wurde Microsoft Excel 2010 und GraphPad Prism 5.0 verwendet.

### 2.10.4. Lipoproteinlipase Assay

Mit Hilfe eines Lipoproteinlipase(LPL)-Assay nach BASU *et al.* (2011) wurde untersucht, ob *Giardien* Triglyceride hydrolysieren können. Dazu wurde das nicht fluoreszierende Enzchek® Lipase Substrat, ein mit BODIPY-gekoppeltes Triglycerid-Analogon verwendet. Nach Hydrolyse durch die LPL (Lipoproteinlipase from bovine milk) erfolgte die Freisetzung der mit dem BODIPY® 500/510 markierten Fettsäure und deren fluorometrische (Ex 485 nm/Em 515 nm) Vermessung.



**Abbildung 6: Umsetzung des Enzchek® Lipase Substrats durch die LPL**

Das Triglycerid-Analogon trägt an der Alkylkette am  $\alpha$ -C-Atom das Fluorophor BODIPY® 500/510 und einen sogenannten Quencher („Fluoreszenzlöscher“) am Laurinsäurerest. Durch Abspaltung des BODIPY® 500/510 durch die LPL wird die Fluoreszenzlöschung aufgehoben.

Die durch die Abspaltung der BODIPY-gekoppelten Fettsäure entstehende Fluoreszenzintensität war über die Dauer des Assays von neun Minuten zur eingesetzten Enzymmenge (0-370 ng) proportional. Die Verwendung von 185 ng und 1  $\mu$ M Substrat

(in 0,025% Zwittergent) ergab ein gut messbares Fluoreszenzsignal und wurde als Kontrolle gesetzt. Für die Auswertung der Daten wurde der Messwert der Kontrolle als 100% definiert. Der Totalextrakt des Giardia-Lysates (TE), wie unter 2.4.5. hergestellt und angesetzt in LPL-Puffer, wurde in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert (50 µL, 160 µg Gesamtprotein pro Well). Unmittelbar vor Beginn der Messung wurde das Enzchek® Lipase Substrat (50 µL) zugegeben. Die Durchführung des Versuchs erfolgte bei einem pH-Wert von 8 und 37 °C. Die Fluoreszenzintensitäten (485Ex/515Em) wurden über einen Zeitraum von neun Minuten gemessen.

Zur Auswertung der Daten wurde Microsoft Excel 2010 und GraphPad Prism 5.0 verwendet.

## 2.11. Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden, wie unter 2.9. bzw. 2.10. beschrieben, angefertigt und am Axio Imager Z1 dokumentiert (vgl. 2.12.). Die Fluoreszenzintensitäten wurden entweder aus Z-Stapeln, d.h. Aufnahmen unterschiedlicher Fokusebenen, die kombiniert ein tiefenscharfes Bild ergeben, bestimmt oder aus einer fokussierten Ebene, die mit Hilfe der Kernfärbung festgelegt wurde, ermittelt. Unter Verwendung der Software ImageJ 1.47 wurde die sogenannte korrigierte Gesamtzellfluoreszenz (CTCF = corrected total cell fluorescence) berechnet. Dazu wurden zunächst der zu analysierende Bereich sowie eine Fläche ohne Fluoreszenz in der Nähe der ausgewählten Region mit Hilfe eines Auswahlwerkzeuges markiert. Anschließend wurden von der Software die entsprechenden Werte für die ausgewählte Fläche (selected area), die integrierte Dichte (integrated density) und den durchschnittlichen Grauwert (mean gray value) gemessen. Mit Hilfe der Gleichung:

$$\text{CTCF} = \text{integrated density} - (\text{selected area} \times \text{mean gray value of background})$$

konnte die korrigierte Fluoreszenz bestimmt werden. Für die Quantifizierung wurden mindestens 10 ROI's (*Region of Interest*) aus mindestens drei verschiedenen Bildausschnitten herangezogen.

## 2.12. Dokumentation der mikroskopischen Präparate

Lichtmikroskopische Untersuchungen der angefertigten Präparate erfolgten am nicht motorisierten Axioskop 2 (Zeiss), ausgestattet mit der Digitalkamera AxioCam color. Die Analyse der Fluoreszenzpräparate wurde am motorisierten Axio Imager Z1 mit ApoTome-Funktion (Zeiss) - zur Erstellung überstrahlungsfreier optischer Schnitte - vorgenommen. Bei dem letztgenannten Mikroskop war die Aufnahme von Z-Stapeln - Aufnahmen unterschiedlicher Fokusebenen, die kombiniert ein tiefenscharfes Bild ergeben - möglich. Die Bildaufnahmen erfolgten mit der Digitalkamera AxioCam MR. Zur Dokumentation wurde die Software AxioVision 4.8.2.0 verwendet. Für eine nachträgliche Bildbearbeitung und Analyse diente die Software ImageJ 1.47 (National Institutes of Health, USA).

Zu Beginn der Dokumentation wurden für jede Untersuchungsreihe anhand der Kontrollpräparate Spezifikationen wie Belichtungszeit festgelegt und für die folgende Analyse beibehalten.

Die dargestellten Bilder im Ergebnisteil sind beispielhaft und repräsentativ für die durchgeführten Experimente.

## 2.13. Analyse von Wirkstoffkombinationen

Die Kombinationsindex-Methode nach CHOU and TALALAY (1984) wurde zur Beurteilung der Wirkstoffkombination von THL und MTZ verwendet. Chou leitete in den Siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts die sogenannte mittlere Wirkungsgleichung (*median-effect equation*) aus dem Prinzip des Massenwirkungsgesetzes ab und führte die mittlere Wirkungskurve (*median-effect plot*) ein (CHOU, 1976).

Die mittlere Wirkungsgleichung dient der Beschreibung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen.

$$\frac{f_a}{f_u} = \left( \frac{D}{D_m} \right)^m \quad (1)$$

Wobei  $f_a$  der Anteil (englisch: *fraction*) des Systems ist, der von der Dosis  $D$  beeinflusst (englisch: *affected*) wird. Entsprechend steht  $f_u$  ( $f_u = 1 - f_a$ ) für den nicht beeinflussten (englisch: *unaffected*) Teil des Systems.  $D_m$  ist diejenige Wirkstoffdosis, die den mittleren Effekt bewirkt, im Allgemeinen auch als  $LD_{50}$  oder  $IC_{50}$  bezeichnet. Die Steigung des Graphen wird durch die Variable  $m$  beschrieben. Nach Umformen ergeben sich folgende Gleichungen:

$$f_a/(1 - f_a) = [(f_a)^{-1} - 1]^{-1} = (D/D_m)^m \quad (2)$$

$$f_a = 1/[1 + (D_m/D)^m] \quad (3)$$

$$D = D_m [f_a/(1 - f_a)]^{1/m} \quad (4)$$

Werden  $m$  und  $D_m$  experimentell bestimmt, können Aussagen über das gesamte Dosis-Wirkungsspektrum getroffen werden. Anhand einer bestimmten Dosis  $D$  kann rechnerisch eine spezifische Wirkung ( $f_a$ ) zugeordnet werden und umgekehrt.

Wird Gleichung (1) logarithmiert, erhält man die linearisierte Form der Dosis-Wirkungskurve.

$$\log(f_a/f_u) = m \log(D) - m \log(D_m) \quad (5)$$

oder

$$\log[(f_a)^{-1} - 1]^{-1} = m \log(D) - m \log(D_m) \quad (6)$$

Wird  $x = \log(D)$  gegen  $y = \log(f_a/f_u)$  bzw.  $y = \log[(f_a)^{-1} - 1]^{-1}$  aufgetragen, erhält man die mittlere Wirkungskurve. Mit Hilfe derer die Steigung der Geraden, sprich die Variable  $m$  ermittelt werden kann. Am Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse gilt:

$$f_a = f_u, \text{ d.h. } f_a/f_u = 1 \text{ und } \log(f_a/f_u) = 0$$

Eingesetzt in Gleichung (5) ergibt sich der Wert für  $\log(D_m)$ . Die mittlere Wirkungs-dosis  $D_m$  ist demnach die zehnte Potenz des Wertes des Schnittpunktes mit der Abszisse.

Die bisher genannten Zusammenhänge beziehen sich auf die Dosis-Wirkungsbeziehung einer einzelnen Substanz. Um die Interaktion zweier Wirkstoffe zu beschreiben, wird die mittlere Wirkungsgleichung (1) um einen Term erweitert.

$$\left[ \frac{(f_a)_{1,2}}{(f_u)_{1,2}} \right]^{\frac{1}{m}} = \left[ \frac{(f_a)_1}{(f_u)_1} \right]^{\frac{1}{m}} + \left[ \frac{(f_a)_2}{(f_u)_2} \right]^{\frac{1}{m}} = \frac{(D)_1}{(D_m)_1} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2} \quad (7)$$

$(f_a)_{1,2}$ : durch die Kombinationstherapie beeinflusster Teil des Systems

$(f_u)_{1,2}$ : durch die Kombinationstherapie nicht beeinflusster Teil des Systems

$(f_a)_1$ : durch den Wirkstoff 1 beeinflusster Teil

$(f_a)_2$ : durch den Wirkstoff 2 beeinflusster Teil

$(D)_1$ : Dosis des Wirkstoffs 1

$(D)_2$ : Dosis des Wirkstoffs 2

$(D_m)_1$ : Dosis des Wirkstoffes 1, die den mittleren Effekt bewirkt

$(D_m)_2$ : Dosis des Wirkstoffes 2, die den mittleren Effekt bewirkt

$m$ : Steigung der mittleren Wirkungskurve

Der Kombinationsindex (CI) wurde eingeführt, um eine Aussage über die Auswirkung kombinierter Wirkstoffe zu treffen und ist auf Grundlage der Gleichung (7) folgendermaßen definiert:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} \quad (8)$$

Wobei  $D_x$  die Dosis des Wirkstoffes  $x$  ist, die einzeln eingesetzt den Effekt  $x$  bewirkt.

Dabei bedeutet:

$CI > 1,2$  Antagonismus

$1,2 > CI > 0,8$  Additivität

$CI < 0,8$  Synergismus.

Zur Bestimmung des CI wurde in der Praxis folgendermaßen vorgegangen:

Zunächst wurde mit Hilfe des Resazurin Assay (vgl. 2.8.) die Konzentrations-Wirkungskurve für die Arzneistoffe THL (0,33–27  $\mu$ M) und MTZ (0,33–81  $\mu$ M) einzeln und für die Kombination der beiden in verschiedenen Verhältnissen bestimmt. Dabei wurden THL und MTZ in einem äquivalenten Verhältnis von 1:1 eingesetzt (0,66–54  $\mu$ M), aber jeweils auch der Überschuss (3:1) eines der beiden Arzneistoffe getestet (0,33–108  $\mu$ M). Durch logarithmieren der Daten, wie in Gleichung (5) bzw. (6) beschrieben, wurden jeweils die mittleren Wirkungskurven erhalten und die zugehörigen Variablen  $m$  und  $D_m$  bestimmt. Anschließend wurde für einen Wirkungsgrad von  $x\%$ , beispielsweise 10% ( $f_a = 0,1$ ), die korrespondierenden Konzentrationen  $(D_x)_1$ ,  $(D_x)_2$  und  $(D_x)_{1+2}$  mit Hilfe der Gleichung (4)  $D_x = D_m [f_a / (1 - f_a)]^{1/m}$  berechnet. Aus der Wirkstoffmischung  $(D_x)_{1+2}$  mussten die Konzentrationen  $(D)_1$  und  $(D)_2$  bestimmt werden, d.h. die anteiligen Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe, die in Kombination den Effekt  $x$  erzielen. Da das Verhältnis der Wirkstoffe in der Kombination aus dem Versuchsaufbau bekannt war  $(D)_1 / (D)_2 = P / Q$ , gilt:

$$(D)_1 = (D_x)_{1+2} \times \frac{P}{(P + Q)}$$

und

$$(D)_2 = (D_x)_{1+2} \times \frac{Q}{(P + Q)}$$

Letztendlich wurden die Werte für  $(D)_1$ ,  $(D)_2$ ,  $(D_x)_1$  und  $(D_x)_2$  in Gleichung (8) eingesetzt und der CI-Wert für den zuvor festgelegten Wirkungsgrad ermittelt.

Wie oben beschrieben wurden die CI-Werte für einen Wirkungsgrad von 10–90% berechnet.

Dazu wurden die Programme Microsoft Excel 2010 und GraphPad Prism 5.0 verwendet.



---

## 2.14. Statistik

Jedes Experiment wurde mindestens dreimal, unabhängig voneinander, wiederholt. Die Messdaten sind als arithmetisches Mittel und dessen Standardabweichung abgebildet.

Für die schließende Statistik wurden die nichtparametrischen Tests nach Mann-Whitney-U zum Vergleich von zwei Stichproben und der Kruskal-Wallis-Test zum Vergleich von mehr als zwei Stichproben angewandt. Bei signifikanten Unterschieden im Kruskal-Wallis-Test wurde mittels Dunn-Test als Post-hoc-Test auf Unterschiede zwischen den einzelnen Stichproben geprüft. Als parametrischer Test kam die Einweg-ANOVA zur Anwendung, vorausgesetzt dass die Stichprobe aus einer normalverteilten Population (Shapiro-Wilk-Test) stammte und Varianzhomogenität (Bartlett Test) aufwies. Wurden signifikante Unterschiede durch die Einweg-ANOVA aufgedeckt, erfolgte mit Hilfe des Bonferroni-Test als Post-hoc-Test die Prüfung auf Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Die verwendeten Tests sind in den einzelnen Abbildungen aufgeführt.

Sämtliche Analysen wurden mit dem Programm GraphPadPrism 5.0 ausgeführt.

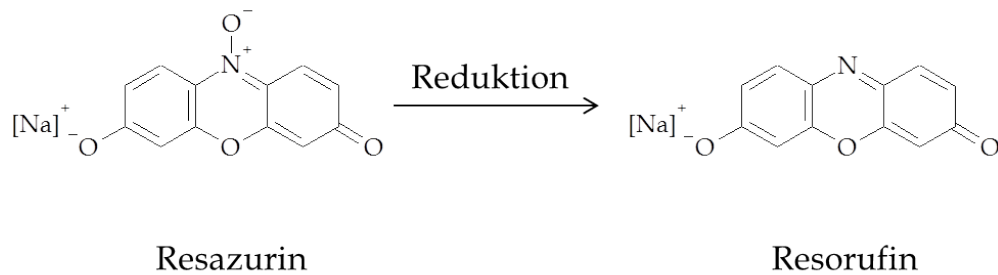
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Antigiardiales Potential von THL *in vitro*

Um den Effekt eines potentiellen Wirkstoffs gegenüber *Giardia*-Parasiten testen zu können, bedarf es eines geeigneten Testsystems. Viele der zu Verfügung stehenden *in vitro* Assays beruhen auf einer mikroskopischen Beurteilung wie beispielsweise der Inhibition der Adhärenz (MELONI *et al.*, 1990, CRUZ *et al.*, 2003) oder dem Einbau radioaktiv markierter Substanzen wie des tritiummarkiertem Thymidin ( $^3\text{H-TdR}$ ) (ARGUELLO-GARCIA *et al.*, 2004). Diese Methoden sind zum einen sehr zeitaufwendig und erlauben nur einen geringen Probendurchsatz, zum anderen erfordern Tests mit radioaktiven Substanzen eine anspruchsvolle Ausrüstung und Abfallbeseitigung. BENERE *et al.* (2007) haben erstmalig Resazurin zur Bestimmung der Viabilität von *G. duodenalis*-Trophozoiten eingesetzt und somit eine Möglichkeit geschaffen, diese fluorometrisch zu bestimmen.

##### 3.1.1. Modifizierung und Optimierung eines Resazurin Assays zur Ermittlung der Proliferation von *Giardia duodenalis*-Trophozoiten

Resazurin ist ein blauer Farbstoff, der selbst nur sehr schwach fluoresziert. Lebende Zellen können ihn kontinuierlich zum rosafarbenen Resorufin reduzieren (Abb. 7). Dieses wiederum zeichnet sich durch seine starke Fluoreszenz aus und hat bei 595 nm sein Emissionsmaximum ( $\lambda$  550Ex). Diese Umsetzung ist zugleich Indikator für proliferative Prozesse. Nachteilig ist die Umsetzung von Resazurin durch das *Giardia*-Kulturmedium selbst, bedingt durch die in ihm enthaltenen reduzierenden Substanzen wie L-Ascorbinsäure und L-Cystein, was einen Austausch gegen PBS nötig macht (O'BRIEN *et al.*, 2000). Hervorzuheben ist allerdings, dass Resazurin sowie Resorufin nicht zytotoxisch sind.

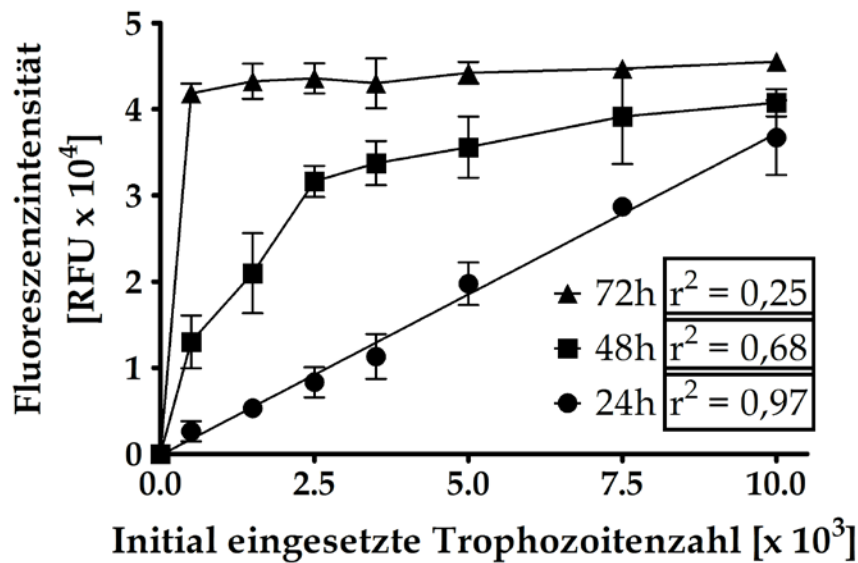


### Abbildung 7: Umsetzung von Resazurin in Resorufin durch Reduktion

Dargestellt ist die Reduktion des blauen, nicht fluoreszierenden Resazurins durch lebensfähige Zellen in das fluoreszierende rosafarbene Resorufin.

Auf Grundlage der Arbeit von BENERE *et al.* (2007) wurde der Resazurin Assay modifiziert und optimiert, um letztendlich die *in vitro* Aktivität antiangiogener Substanzen zuverlässig bestimmen zu können.

Aus Voruntersuchungen zur Ermittlung der optimalen Testbedingungen für den Resazurin Assay stellte sich heraus, dass für Inkubationszeiten von 48 h und 72 h kein linearer Zusammenhang zwischen der initial eingesetzten Anzahl an Trophozoiten ( $0,5 \times 10^3$ - $1 \times 10^4$  / Well) und der Fluoreszenzintensität besteht (Abb. 8). Wahrscheinlich führen Überwucherung, die dadurch bedingte unzureichende Möglichkeit des Anheftens an der Plattenfläche für die Trophozoiten und der resultierende Parasitenverlust beim Waschen zu diesem diskrepanten Resultat (BENERE *et al.*, 2007). Für eine Trophozoitenanzahl von  $0,5 \times 10^3$  bis  $10^4$  Parasiten pro Well und eine Inkubationszeit von 24 h wurde über die Dauer des Assays (einschließlich der Inkubation von Resazurin für 4 h) Linearität nachgewiesen, so dass die folgenden Untersuchungen standardisiert mit einem Inokulum von  $5 \times 10^3$  und einer Inkubationszeit von 24 h durchgeführt wurden.



**Abbildung 8: Bestimmung der optimalen Testbedingungen eines Resazurin-basierten Wachstumstests für *G. duodenalis***

Zur Feststellung der optimalen Assay-Bedingungen wurden als Inokulum verschiedene WB C6-Trophozoitenzahlen ( $0,5 \times 10^3$  bis  $10^4$ ) in eine 96-Well-Platte eingesetzt und über 24 h, 48 h und 72 h unter sauerstoffarmen Bedingungen kultiviert. Nach Austausch des *Giardia*-Kulturmediums gegen PBS wurden die Trophozoiten für weitere 4 h mit Resazurin inkubiert.

Die Fluoreszenzintensität wurde fluorometrisch mit einer Anregungswellenlänge von 550 nm und einer Emissionswellenlänge von 595 nm vermessen.

Die Ergebnisse werden als Fluoreszenzintensität (RFU) in Bezug auf die initial eingesetzte Anzahl von Trophozoiten dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten ( $n = 3$ ). Der Korrelationsfaktor ( $r^2$ ) wurde durch lineare Regression unter Verwendung des Programms GraphPadPrism 5.0 berechnet.

Dargestellt ist der lineare Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzintensität und der eingesetzten Trophozoitenzahl für eine 24-stündige Kultivierung der Trophozoiten in einer 96-Well-Platte ( $\bullet$ ). Eine Kultivierung darüber hinaus (48 h  $\blacksquare$ ; 72 h  $\blacktriangle$ ) führt zum Verlust dieser Korrelation.

### 3.1.2. Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration für Referenzstämme sowie Patientenisolat

Mit Hilfe des Resazurin-Testsystems konnte THL auf anti-giardiale Aktivität getestet werden. Dazu wurden *Giardia*-Trophozoiten mit steigender THL-Konzentration (0,05-37,5  $\mu\text{M}$ ) für 24 h unter sauerstoffarmen Bedingungen bei 37 °C inkubiert oder unbehandelt vermessen. MTZ, therapeutisch eingesetzt als Mittel der Wahl bei Giardiasis, wurde in den Versuchen stets mitgeführt (0,05-50  $\mu\text{M}$ ), zum einen aus Kontrollgründen, zum anderen um eine vergleichende Aussage über die *in vitro* Aktivität von THL machen zu können.

Zunächst wurden Trophozoiten des Referenzstammes WB C6 zur Testung herangezogen. THL zeigte eine potente und konzentrationsabhängige Inhibition der Trophozoitenreplikation. Zudem ergab sich für die mittleren inhibitorischen Konzentrationen ( $\text{IC}_{50}$ ) von THL und MTZ ein signifikanter Unterschied. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert von THL war mit 4,9  $\mu\text{M}$  deutlich niedriger als der von MTZ mit 13,5  $\mu\text{M}$  (Abb. 9 und Tab. 11).

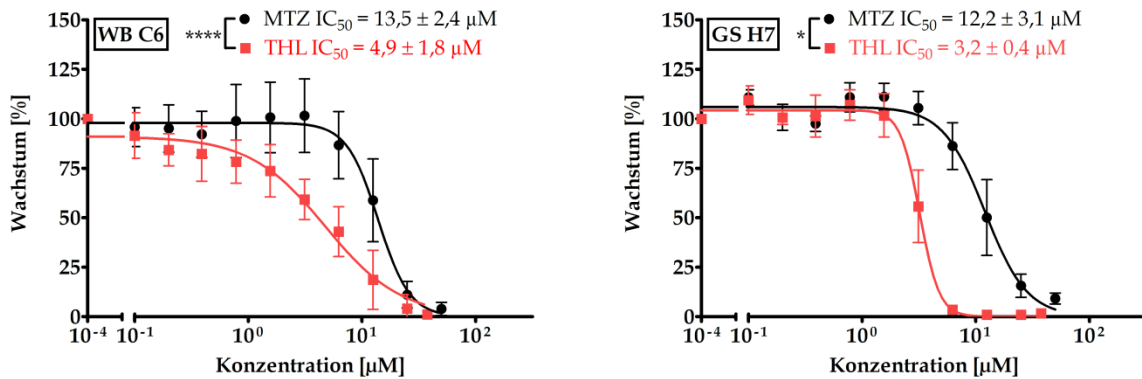
Da es sich bei dem WB C6-Stamm um Trophozoiten des Genotyps AI handelt, war es von großem Interesse das Ansprechen auch anderer Genotypen zu testen. Zumal es sich bei den Assemblagen AI, AII und B um humanpathogene Erreger handelt (THOMPSON, 2009). Getestet werden konnten ein weiterer Referenzstamm, mit Zuordnung zum Genotyp B, und frisch isolierte Trophozoiten aus Patienten, die zuvor nur bedingt auf eine medikamentöse Therapie mit MTZ ansprachen. Diese Patientenisolat waren sowohl den Genotypen AI, AII und B zuzuordnen.

Gegenüber dem Referenzstamm vom Genotyp B, GS H7, zeigte sich ebenfalls ein sehr gutes anti-giardiales Potential von THL. Im Vergleich mit MTZ war auch hier ein signifikanter Unterschied bezüglich der  $\text{IC}_{50}$ -Werte zu verzeichnen. THL erwies sich in etwa um den Faktor 4 effektiver als die Referenzsubstanz (Abb. 9 und Tab. 11).

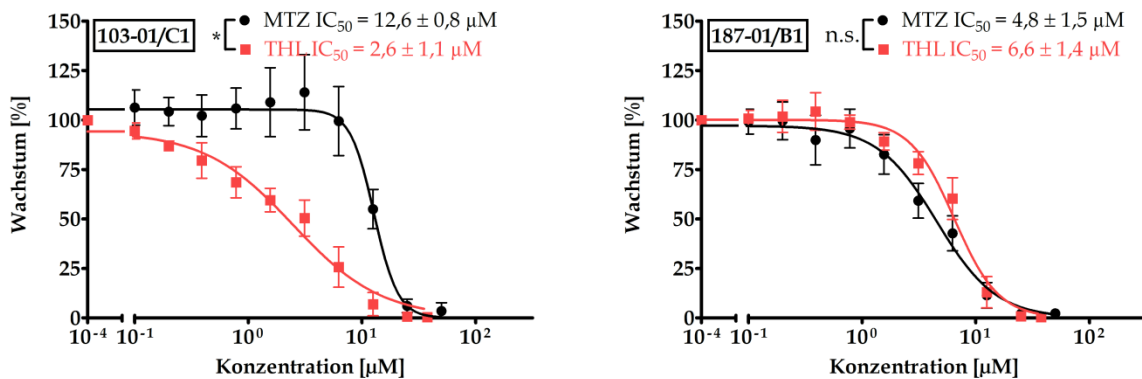
Nach diesen vielversprechenden Resultaten wurde die Testung auf vorgenannte Patientenisolat erweitert. Es konnten jeweils ein Isolat vom Genotyp AI und B und drei Isolate vom Genotyp AII geprüft werden. Interessanterweise zeigten die Trophozoiten des Patientenisolates vom Genotyp AI, 103-01/C1, ein sehr ähnliches Ansprechen auf THL und MTZ im Vergleich mit dem zugehörigen Referenzstamm (WB C6). Der ermittelte  $\text{IC}_{50}$ -Wert für THL war mit 2,6  $\mu\text{M}$  signifikant niedriger als der von MTZ mit 12,6  $\mu\text{M}$ . Für das Isolat 187-01/B1 vom Genotyp B hingegen konnte kein signifikanter Unterschied in der Behandlung mit THL und MTZ beobachtet werden. Diese Trophozoiten waren ähnlich sensitiv gegenüber den beiden Arzneistoffen. Verglichen mit dem Referenzstamm vom

Genotyp B (GS H7) zeigten sie eine deutlich höhere Empfindlichkeit gegenüber MTZ und eine etwas geringere gegenüber THL (Abb. 9 und Tab. 11).

### Referenzstämmen



### Patientenisolate



Assemblage AI

Assemblage B

**Abbildung 9: Antigiardiale Aktivität von THL und MTZ im Resazurin Assay für die Referenzstämmen WB C6 (AI) und GS H7 (B) sowie die Patientenisolate 103-01/C1 (AI) und 187-01/B1 (B)**

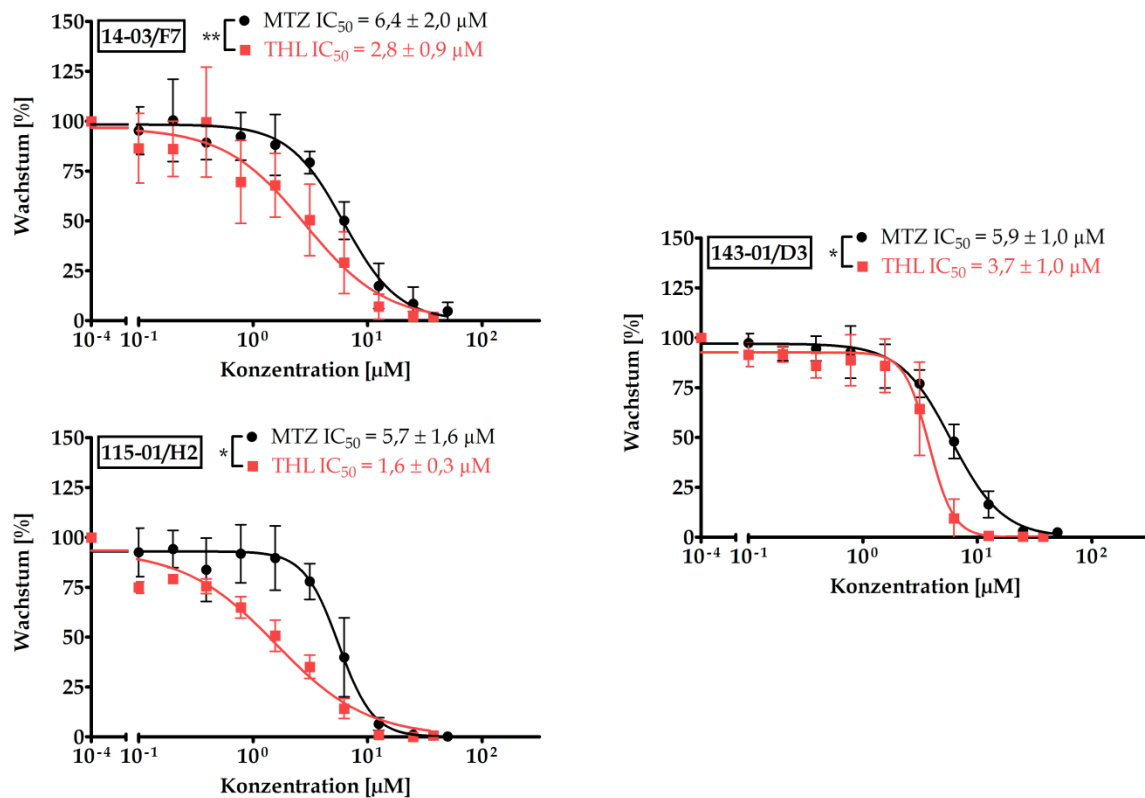
Die anti-giardiale Aktivität von THL (■) und MTZ (•) wurde im Resazurin Assay bestimmt (vgl. 2.8.). Dargestellt ist das prozentuale Wachstum behandelter Trophozoiten relativ zur unbehandelten Kontrolle.

Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Als statistisch signifikant gelten \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ , n.s. bedeutet nicht signifikant.

Die Trophozoiten der Referenzstämmen (WB C6 (AI), GS H7 (B)) sprechen ähnlich auf eine Behandlung mit THL und MTZ an. Beide sind gegenüber THL signifikant sensitiver. Das Patientenisolat vom Genotyp AI, 103-01/C1, verhält sich annähernd wie der Referenzstamm vom selbigen Genotyp. Auch hier ist der  $IC_{50}$ -Wert für THL signifikant niedriger als der von MTZ. 187-01/B1-Trophozoiten hingegen, isoliert aus einem Patienten und vom Genotyp B, sind hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber den beiden Arzneistoffen nicht mit dem Referenzstamm GS H7 vergleichbar. Für die  $IC_{50}$ -Werte von THL und MTZ ergibt sich kein signifikanter Unterschied, die Trophozoiten sind ähnlich sensitiv gegenüber THL und MTZ.

Zur Beurteilung der anti-giardialen Aktivität von THL auf Trophozoiten vom Genotyp AII standen drei Patientenisolat, 14-03/F7, 115-01/H2 und 143-01/D3, zur Verfügung. Die Testung ergab durchweg eine hohe Sensitivität gegenüber THL mit signifikant niedrigeren  $IC_{50}$ -Werten im Vergleich zu MTZ (Abb. 10 und Tab. 11).

### Patientenisolate



### Assemblage AII

**Abbildung 10: Antigiardiale Aktivität von THL und MTZ im Resazurin Assay für die Patientenisolat 14-03/F7, 115-01/H2 und 143-01/D3 (AII)**

Die anti-giardiale Aktivität von THL (■) und MTZ (•) wurde im Resazurin Assay bestimmt (vgl. 2.8.). Dargestellt ist das prozentuale Wachstum behandelter Trophozoiten relativ zur unbehandelten Kontrolle.

Angegeben sind die Mittelwerte ± SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n = 3$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Als statistisch signifikant gelten \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ , n.s. bedeutet nicht signifikant.

Die drei zur Verfügung stehenden Patientenisolat vom Genotyp AII, 14-03/F7, 115-01/H2 und 143-01/D3, zeigen generell eine signifikant höhere Sensitivität gegenüber THL als MTZ.

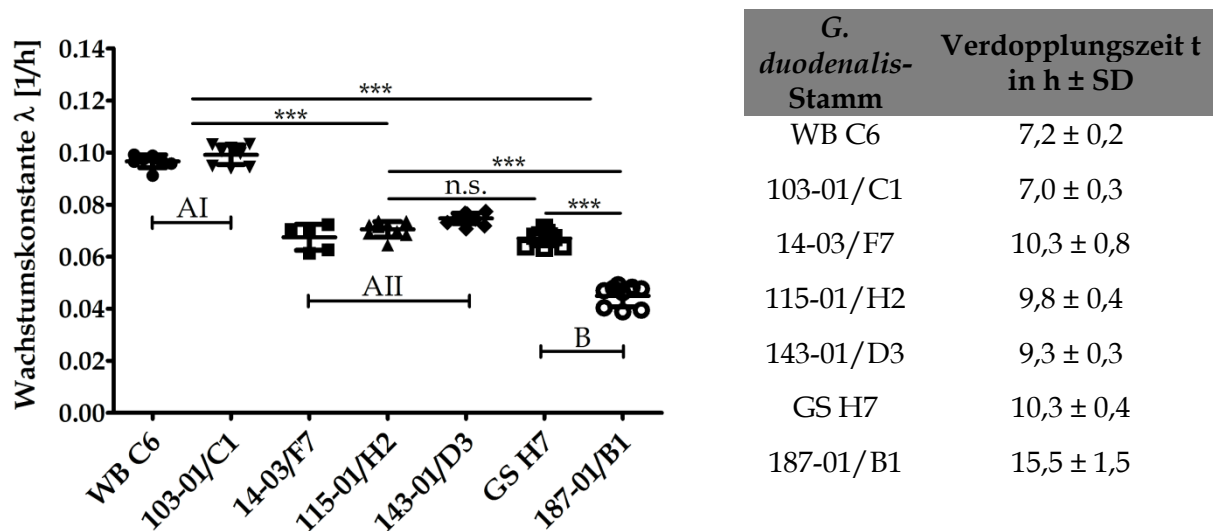
**Tabelle 11: IC<sub>50</sub>-Werte ( $\mu\text{M} \pm \text{SD}$ ) für THL und MTZ aus dem Resazurin Assay**

	Name	Assemblage	THL	MTZ	
Referenzstamm	WB C6	AI	$4,9 \pm 1,8$	$13,5 \pm 2,4$	****
	GS H7	B	$3,2 \pm 0,4$	$12,2 \pm 3,1$	*
Patientenisolat	103-01/C1,	AI	$2,6 \pm 1,1$	$12,6 \pm 0,8$	*
	187-01/B1	B	$6,6 \pm 1,4$	$4,8 \pm 1,5$	n.s.
	14-03/F7,	AII	$2,8 \pm 0,9$	$6,4 \pm 2,0$	**
	115-01/H2,	AII	$1,6 \pm 0,3$	$5,7 \pm 1,6$	*
	143-01/D3,	AII	$3,7 \pm 1,0$	$5,9 \pm 1,0$	*

Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n = 3).

THL ist *in vitro* in der Lage das Trophozitenwachstum zu inhibieren und dies zum größten Teil effektiver als das Standardtherapeutikum MTZ. Das gilt im Besonderen für die Referenzstämme WB C6 (AI) und GS H7 (B). Die Patientenisolate mit Ausnahme von 103-01/C1 (AI) sprechen im Allgemeinen besser auf beide Arzneistoffe an, was durchaus im Zusammenhang mit ihrer Generationszeit stehen kann. Die Isolate mit höherer Empfindlichkeit gegenüber THL und MTZ zeigten durchweg ein langsames *in vitro* Wachstum, kenntlich an den generell kleineren Wachstumskonstanten  $\lambda$  (Abb. 11). Die Patientenisolate vom Genotyp AII (14-03/F7, 115-01/H2 und 143-01/D3) benötigten 9 bis 10 h um ihre Trophozitenzahl zu verdoppeln, während AI-Trophoziten, ob Referenzstamm oder Patientenisolat, generell mit einer Verdopplungszeit t von ca. 7 h am schnellsten wuchsen. Das Patientenisolat 187-01/B1 zeigte sich auch hinsichtlich seiner Verdopplungszeit t auffällig. Referenzstamm und Patientenisolat vom Genotyp B divergieren nicht nur in ihrer Sensibilität gegenüber THL und MTZ. Ihre Verdopplungszeiten t unterscheiden sich signifikant (Abb. 11).





**Abbildung 11: Wachstumskonstanten  $\lambda$  für *Giardia duodenalis*-Stämme**

Zur Bestimmung der Wachstumskonstante wurden aus einer konfluenten Kultur eines jeden Isolates  $1 \times 10^5$  Trophozoiten zur Inokulation einer neuen Kultur verwendet. Die Kultivierung erfolgte unter sauerstoffarmen Bedingungen über einen Zeitraum von 96 h. Das Wachstum wurde jeweils nach 24 h mittels Zählung (Neubauer Zählkammer) dokumentiert und unter Verwendung von GraphPadPrism 5.0 entsprechende Wachstumskurven erstellt. Daraus wurden Wachstumskonstante  $\lambda$  und Verdopplungszeit  $t$  ermittelt.

Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Einweg-ANOVA und dem Bonferroni-Test als Post-hoc-Test. Als statistisch signifikant gelten \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , n.s. bedeutet nicht signifikant.

Dargestellt sind die Wachstumskonstanten  $\lambda$  der in dieser Arbeit verwendeten *Giardia*-Isolate. Die Wachstumskonstante ist ein Maß für die Stärke eines Wachstums und artspezifisch. Die Isolate der verschiedenen Assemblagen zeigen innerhalb ihres Genotyps ähnliche Generationszeiten. Die Wachstumskonstanten der unterschiedlichen Genotypen untereinander dagegen divergieren signifikant. Eine Ausnahme stellt Assemblage B dar. Der Referenzstamm GS H7 ( $\square$ ) verhält sich in seinem Wachstum wie die Isolate der Assemblage AII ( $\blacksquare$ ,  $\blacktriangle$ ,  $\blacklozenge$ ) und signifikant verschieden von dem Patientenisolat 187-01/B1 ( $\circ$ ) der Assemblage B. Trophozoiten der Assemblage AI ( $\bullet$ ,  $\blacktriangledown$ ) wachsen am schnellsten. Sie verdoppeln sich im Schnitt alle 7 h. Assemblage AII-Trophozoiten ( $\blacksquare$ ,  $\blacktriangle$ ,  $\blacklozenge$ ) und der Referenzstamm GS H7 ( $\square$ ) benötigen dafür ungefähr 9 bis 10 h, während die Trophozoiten des Patientenisolates 187-01/B1 ( $\circ$ ) eine Verdopplungszeit  $t$  von 15,5 h aufweist.

### 3.1.3. Wirkstoffkombinationen und ihre anti-giardialen Effekte

Die Verwendung mehrerer Arzneistoffe mit verschiedenen Wirkmechanismen zur Behandlung einer Krankheit kann von großem therapeutischen Nutzen sein, wenn die Kombination zu einer Erhöhung der Wirksamkeit bei, im besten Fall, gleichzeitiger Dosisreduktion führt. Über eine Dosisminimierung können gleichsam unerwünschte und toxische Wirkungen reduziert werden, aber auch die Entstehung von Resistenzen. Aus diesen Gründen werden Arzneistoffkombinationen heutzutage weitreichend eingesetzt, finden in den medizinischen Leitlinien Eingang und erzielen gute Erfolge bei der Therapie, unter anderem von Tumoren und Infektionskrankheiten wie HIV (CHOU, 2006).

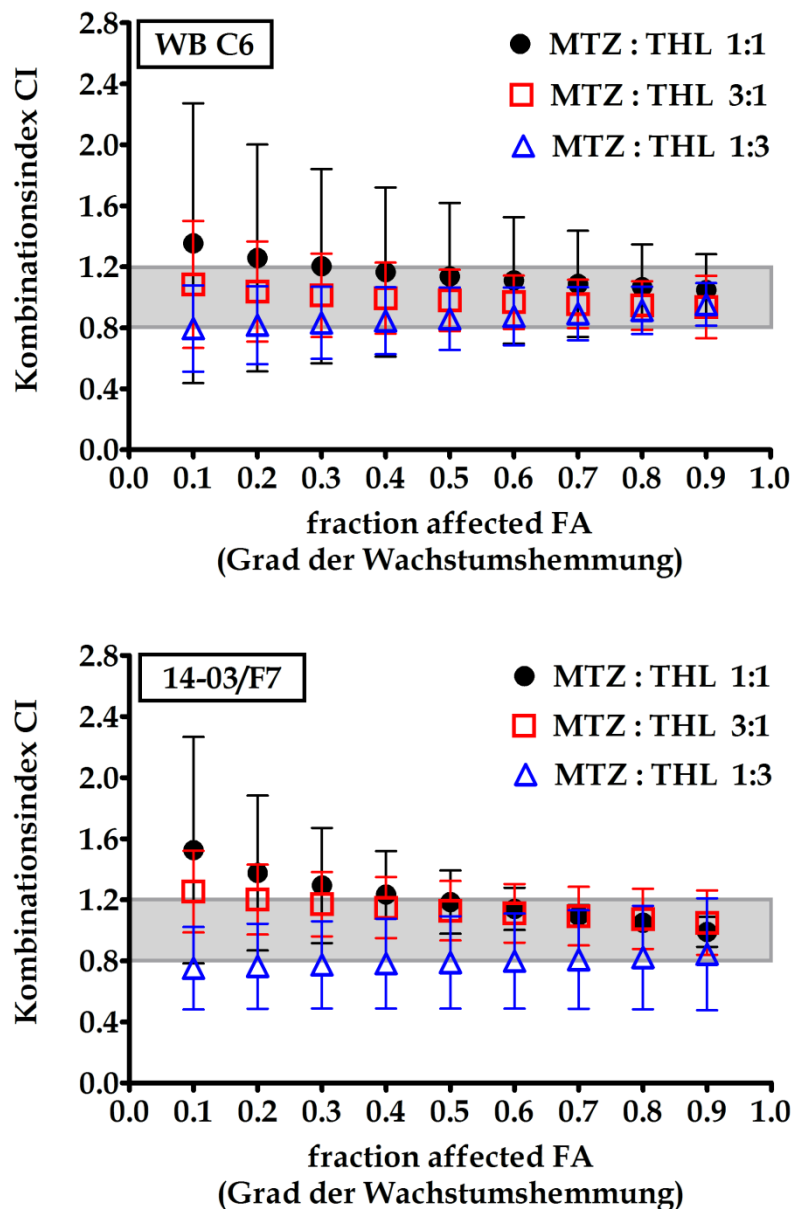
Da *in vivo* Studien zur Testung von Wirkstoffkombinationen sehr zeitaufwendig und teuer sind, ist es nur sinnvoll zuvor in *in vitro* Untersuchungen herauszufiltern, ob mit der Kombination synergistische Effekte erzielt werden können, oder ob sie gar antagonistisch wirkt. Es gibt verschiedene Ansätze zur Bestimmung von Additivität, Synergismus und Antagonismus. Zu den meist verwendeten Methoden zählt die Kombinationsindex-Methode nach CHOU and TALALAY (1984). Dabei wird der Kombinationsindex (CI) mittels der Konzentration-Effekt-Kurven der Einzelsubstanzen sowie der Kombination ermittelt. Ein CI-Wert größer 1,2 lässt auf Antagonismus schließen, während Werte unter 0,8 Synergismus anzeigen und Werte zwischen 0,8 und 1,2 Additivität bedeuten (BIJNSDORP *et al.*, 2011).

In dieser Arbeit wurde zur Evaluierung von Kombinationseffekten die CI-Methode herangezogen.

FA-Werte (= *fraction affected*) unter 0,5 sind in der Regel nur wenig klinisch relevant, da sie nur eine geringe Wachstumshemmung von unter 50% indizieren. Zur Beurteilung der Kombination wurden daher nur Werte ab 0,5 berücksichtigt.

Getestet wurde eine Kombination von MTZ, dem Standardtherapeutikum bei Giardiasis, und THL an *Giardia*-Trophozoiten von WB C6 (AI) und 14-03/F7 (AII). Die beiden Arzneistoffe wurden in äquivalenten Anteilen (1:1) eingesetzt, sowie jeweils im wechselseitigen Überschuss von 3:1 bzw. 1:3.

Für beide Trophozoiten-Stämme zeigt sich ein ähnliches Bild. Die Mittelwerte der CI-Werte bewegen sich für die getesteten Kombinationen (1:1, 3:1, 1:3) im Bereich von 0,8 und 1,2 (Abb. 12), indikativ für additive Effekte der Kombination und ein deutlicher Hinweis dafür, dass zumindest *in vitro* keine antagonistischen Wechselwirkungen bezüglich der Wachstumshemmung vorliegen. Die Ergebnisse zeigen auch, dass eine Kombination von MTZ und THL, in der einer der Arzneistoffe im Überschuss vorliegt, kleinere CI-Werte erzielt und somit deutlicher auf Additivität hinweist.



**Abbildung 12: Additiver Effekt von MTZ und THL in der Kombinationsindex-Methode nach Chou und Talalay**

Trophozoiten des WB C6-Stammes sowie des Patientenisolates 14-03/F7 wurden in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von THL (0,33–27  $\mu\text{M}$ ) oder MTZ (0,33–81  $\mu\text{M}$ ) oder einer Kombination der beiden Arzneistoffe über 24 h kultiviert. THL und MTZ in der Kombination wurden entweder in äquivalenten Mengen (1:1 •) oder im wechselseitigen Überschuss (MTZ 3:THL 1 □; MTZ 1:THL 3 △) eingesetzt. Mit Hilfe der daraus ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven wurde letztendlich der Kombinationsindex (CI) für THL und MTZ bestimmt (vgl. 2.13.). Dabei bedeutet  $\text{CI} > 1,2$  Antagonismus,  $\text{CI} < 0,8$  Synergismus,  $1,2 > \text{CI} > 0,8$  Additivität.

Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n \geq 3$ ).

Dargestellt ist der Kombinationseffekt von THL und MTZ *in vitro* sowohl für Trophozoiten des WB C6-Stammes (AI) als auch des Patientenisolates 14-03/F7 (AII). Die Kombination zeigt keine antagonistischen Wechselwirkungen in Bezug auf ihre wachstumshemmende Wirkung, vielmehr sprechen die Ergebnisse für einen additiven Effekt.

### 3.1.4. Einfluss der Konzentration auf anti-giardiale Effekte (giardia- versus giardiastatisch)

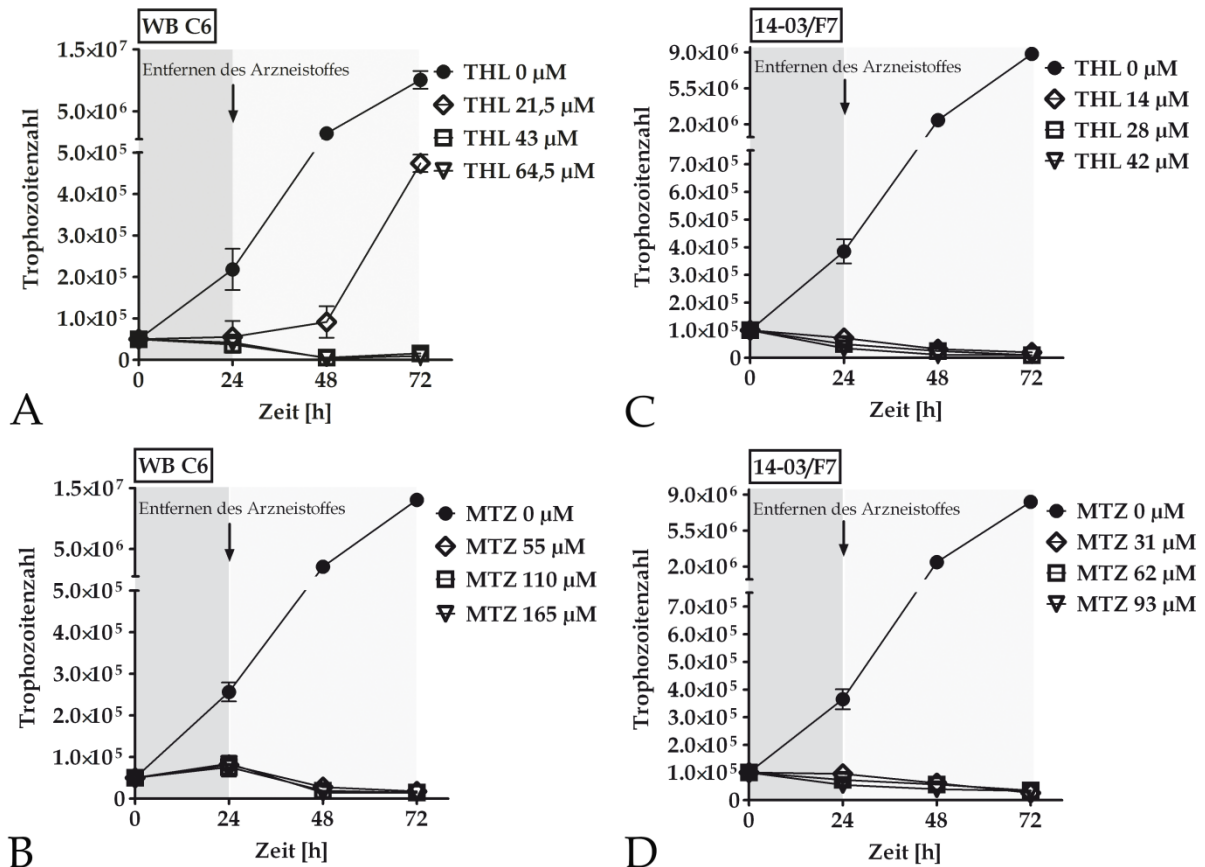
Die Wirkweise von Antiinfektiva kann im Allgemeinen in abtötend (~-id) oder wachstumshemmend (~-statisch) unterschieden werden, wobei diese Unterscheidung auch konzentrationsabhängig sein kann.

Um zu beurteilen, ob THL giardia- oder giardiastatisch wirkt, wurden die Trophozoiten mit verschiedenen Konzentrationen von THL behandelt. Nach 24 h wurde der Arzneistoff vollständig aus der Kultur entfernt und über weitere 48 h beobachtet, ob die Trophozoiten ihr Wachstum wieder aufnehmen konnten. Da für MTZ eine giardia-ide Wirkung bereits belegt ist (UPCROFT and UPCROFT, 2001), wurde MTZ stets mitgeführt. Beide Substanzen wurden in der jeweils 5fachen, 10fachen und 15fachen Konzentration des ermittelten  $IC_{50}$ -Wertes eingesetzt.

Dabei sei darauf hingewiesen, dass die im Folgenden angegebenen  $IC_{50}$ -Werte aufgrund der Berücksichtigung von zusätzlichen  $IC_{50}$ -Bestimmungen mittels des Resazurin Assay geringfügig von den unter 3.1.2. aufgeführten  $IC_{50}$ -Werten divergieren.

Trophozoiten des WB C6- (AI) und des 14-03/F7- (AII) Stammes wurden zur Diskriminierung zwischen giardia-ider und giardiastatischer Wirkung herangezogen und dazu mit THL ( $IC_{50}$  (WB C6) = 4,3  $\mu$ M / 21,5, 43 und 64,5  $\mu$ M;  $IC_{50}$  (14-03/F7) = 2,8  $\mu$ M / 14,28 und 42  $\mu$ M) sowie MTZ ( $IC_{50}$  (WB C6) = 11  $\mu$ M / 55, 110 und 165  $\mu$ M;  $IC_{50}$  (14-03/F7) = 6,2  $\mu$ M / 31, 62 und 93  $\mu$ M) inkubiert. Wie aus vorherigen Untersuchungen zu erwarten war, führte die 24-stündige Behandlung mit THL und MTZ für alle getesteten Konzentrationen zu einer vollständigen Wachstumsinhibition der Trophozoiten. Die Trophozoitenzahl korrespondierte mit der eingesetzten Anzahl an Trophozoiten oder lag darunter. Es sei erwähnt, dass jegliche als Trophozoit zu identifizierende Parasiten unabhängig von ihrer Viabilität berücksichtigt wurden. Die weitere Kultivierung in Abwesenheit der Arzneistoffe zeigte die Fähigkeit von THL und MTZ, die Trophozoiten irreversibel zu schädigen. Die giardia-iden Effekte von THL für den WB C6-Stamm traten allerdings erst ab einer Konzentration von 43  $\mu$ M ( $10 \times IC_{50}$ ) auf. Bei Verwendung einer Konzentration von 21,5  $\mu$ M ( $5 \times IC_{50}$ ) konnten die Trophozoiten während der Regenerationszeit von 48 h ihre Replikationsfähigkeit zurückerlangen (Abb. 13 A, B).

Im Gegensatz dazu führte bereits eine THL-Exposition mit der 5fachen Konzentration des  $IC_{50}$ -Wertes (14  $\mu$ M) bei dem Patientenisolat 14-03/F7 zum Abtöten der Parasiten, was auf genotypische Unterschiede oder zumindest auf Divergenz der beiden Klone hindeutet (Abb. 13 C, D).



**Abbildung 13: Abhängigkeit der giardiaziden Wirkung von Konzentration und Genotyp**

Trophozoiten des WB C6-Stammes ( $5 \times 10^4$ ) (A, B) sowie des Patientenisolates 14-03/F7 ( $1 \times 10^5$ ) (C, D) blieben für 24 h unbehandelt oder wurden jeweils mit THL (A, C) oder MTZ (B, D) behandelt. Nach Entfernen des Arzneistoffes wurden die Trophozoiten für weitere 48 h in Abwesenheit der Testsubstanz kultiviert. Die Trophozoitenzahl wurde jeweils im Abstand von 24 h bestimmt.

Abgebildet ist repräsentativ eines von drei Experimenten. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD der Trophozoitenzahl ( $n = 3$ ).

Dargestellt ist der giardiazide Effekt von THL sowie MTZ auf WB C6- und 14-03/F7-Trophozoiten. Für THL konnte in Abhängigkeit des Genotyps ein konzentrationsabhängiger giardiazider Effekt nachgewiesen werden. MTZ war in der Lage unabhängig vom Genotyp oder der eingesetzten Konzentration die Trophozoiten irreversibel zu schädigen.

(A) Inkubation der WB C6-Trophozoiten mit THL in 5facher ( $21,5 \mu\text{M}$   $\diamond$ ), 10facher ( $43 \mu\text{M}$   $\square$ ) und 15facher ( $64,5 \mu\text{M}$   $\nabla$ ) Konzentration des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes ( $4,3 \mu\text{M}$ ).

(B) Inkubation der WB C6-Trophozoiten mit MTZ in 5facher ( $55 \mu\text{M}$   $\diamond$ ), 10facher ( $110 \mu\text{M}$   $\square$ ) und 15facher ( $165 \mu\text{M}$   $\nabla$ ) Konzentration des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes ( $11 \mu\text{M}$ ).

(C) Inkubation der 14-03/F7-Trophozoiten mit THL in 5facher ( $14 \mu\text{M}$   $\diamond$ ), 10facher ( $28 \mu\text{M}$   $\square$ ) und 15facher ( $42 \mu\text{M}$   $\nabla$ ) Konzentration des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes ( $2,8 \mu\text{M}$ ).

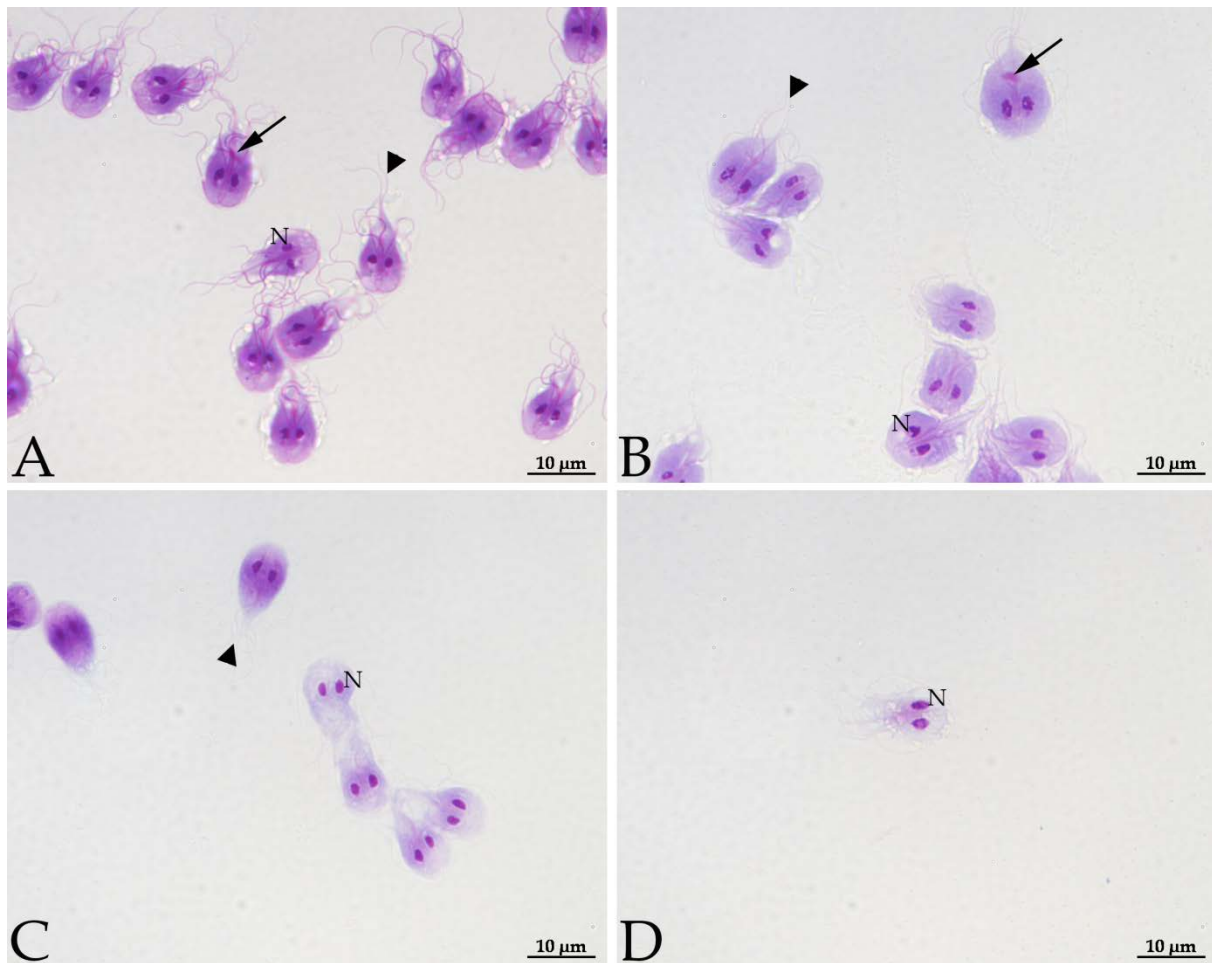
(D) Inkubation der 14-03/F7-Trophozoiten mit MTZ in 5facher ( $31 \mu\text{M}$   $\diamond$ ), 10facher ( $62 \mu\text{M}$   $\square$ ) und 15facher ( $93 \mu\text{M}$   $\nabla$ ) Konzentration des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes ( $6,2 \mu\text{M}$ ).

## 3.2. Mikroskopische Beurteilung des anti-giardialen Effektes von THL auf *Giardia duodenalis*-Trophozoiten

Zur Beurteilung des anti-giardialen Effektes von THL wurden zusätzlich mikroskopische Untersuchungen herangezogen. Zunächst wurde mit Hilfe der Diff-Quik®-Färbung die Morphologie betrachtet, später folgten auch ultrastrukturelle Analysen durch Elektronenmikroskopie und Immunfluoreszenzfärbung.

### 3.2.1. Morphologische Veränderungen nach Behandlung mit THL

Die Behandlung der Trophozoiten mit steigenden Konzentrationen an THL führte zu einem vermehrten Ablösen der Parasiten von der Oberfläche. Um die Morphologie der behandelten und unbehandelten Trophozoiten besser diskriminieren zu können, wurde die Diff-Quik®-Färbung angewandt. Die unbehandelten Trophozoiten zeigten ihre typische birnenförmige Gestalt und morphologische Merkmale waren aufgrund der Färbung gut erkennbar. Das Zytoplasma, der Mediankörper und die Flagellen waren rötlich-violett gefärbt, während die zwei Zellkerne dunkelviolett erkennbar wurden (Abb. 14 A). Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit steigenden Konzentrationen an THL (3,1-25  $\mu\text{M}$ ) über 24 h bei den noch adhärennten Trophozoiten mitunter zum Verlust der klaren Zellform. Vielmehr zeigten sich desintegrierte Zellmembranen und morphologische Charakteristika wie Flagellen oder Mediankörper ließen sich nur noch schwach färben (Abb. 14 B, C, D).



**Abbildung 14: Veränderte Trophozoitenmorphologie nach THL Behandlung**

WB C6-Trophozoiten ( $5 \times 10^4$ ) blieben für 24 h unbehandelt (A) oder wurden mit steigenden Konzentrationen von THL (B-D) behandelt. Im Anschluss wurde mittels Diff-Quik®-Färbung die Parasitenmorphologie analysiert. Die Dokumentation erfolgte am Axioskop 2 (Zeiss).

Nukleus (N), Mediankörper (Pfeil), Flagellen (Pfeilspitze)

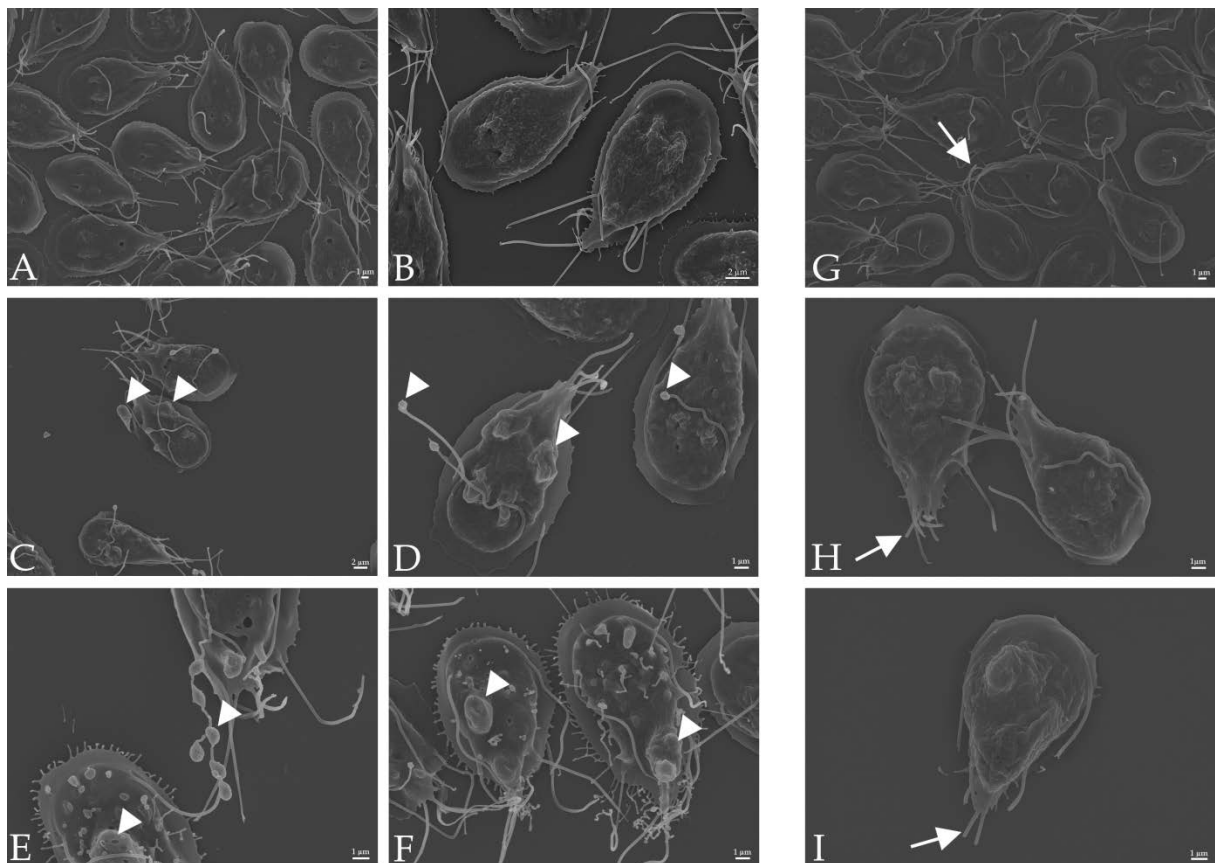
(A) unbehandelte Trophozoiten (Lösungsmittelkontrolle (EtOH 0,06%)), (B) Inkubation mit  $3,1 \mu\text{M}$  THL, (C) Inkubation mit  $6,3 \mu\text{M}$  THL, (D) Inkubation mit  $25 \mu\text{M}$  THL.

Dargestellt ist der Effekt von THL auf die Trophozoiten, der sich zum einen in verstärktem Ablösen von der Oberfläche der Kulturplatte und zum anderen in deformierten und desintegrierten Parasiten manifestierte.

Da die THL-Behandlung offensichtlich zu einem verstärkten Ablösen der Trophozoiten von der Oberfläche führte, wurden die Überstände mit den nicht mehr adhäsionsfähigen Parasiten zunächst gesondert untersucht. Eine Analyse war allerdings nicht möglich, da es zu einer erheblichen Schädigung der Trophozoiten kam und dadurch nur unzureichendes Material zu Verfügung stand.

Für eingehende Untersuchungen der morphologischen Veränderungen wurden elektronenmikroskopische Verfahren herangezogen. Rasterelektronenmikroskopische (REM) Analysen ließen bei THL-behandelten Trophozoiten (Abb. 15 C-D) eine stark unebene Oberflächenstruktur erkennen, die mit einer deutlichen Blasenbildung einschließlich an den

Flagellen einherging. Zumeist bildeten sich Einzelblasen, seltener trat eine multiple Blasenbildung auf. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig und daher eindeutig THL bedingt. Trophozoiten der Kontrollgruppe (Abb. 15 A, B) behielten im Vergleich ihre typische Erscheinungsform und die charakteristische Gruppierung der vier Flagellenpaare. Anders präsentierte sich der Einfluss von MTZ auf die Morphologie der Trophozoiten. Nach einer 24-stündigen Inkubation wiesen die Trophozoiten keine verstärkte Blasenbildung auf, zeigten allerdings deutlich verkürzte Flagellen (Abb. 15 H, I).



**Abbildung 15: THL induzierte Veränderungen der Trophozoitenmembran im Elektronenmikroskop (REM-Aufnahmen)**

WB C6-Trophozoiten ( $1 \times 10^5$ ) blieben für 24 h unbehandelt (A, B, G) oder wurden mit steigenden Konzentrationen von THL (C, D, E, F) oder MTZ (H, I) behandelt. Im Anschluss wurde ihre Morphologie rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Dokumentation erfolgte am LEO 1530 Rasterelektronenmikroskop (Zeiss).

Flagellen (Pfeil), Blasenbildung an Flagellen wie Trophozoitenoberfläche (Pfeilspitze) (A, B) unbehandelte Trophozoiten (Lösungsmittelkontrolle (EtOH 0,04%)), (C, D) Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  THL, (E, F) Inkubation mit 15  $\mu\text{M}$  THL, (G) unbehandelte Trophozoiten (Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,03%)), (H) Inkubation mit MTZ 11  $\mu\text{M}$ , (I) Inkubation mit 33  $\mu\text{M}$  MTZ.

Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Modifikation der Membran unter THL-Behandlung gekennzeichnet durch starke Blasenbildung und der Einfluss von MTZ auf die Flagellenlänge der Trophozoiten.

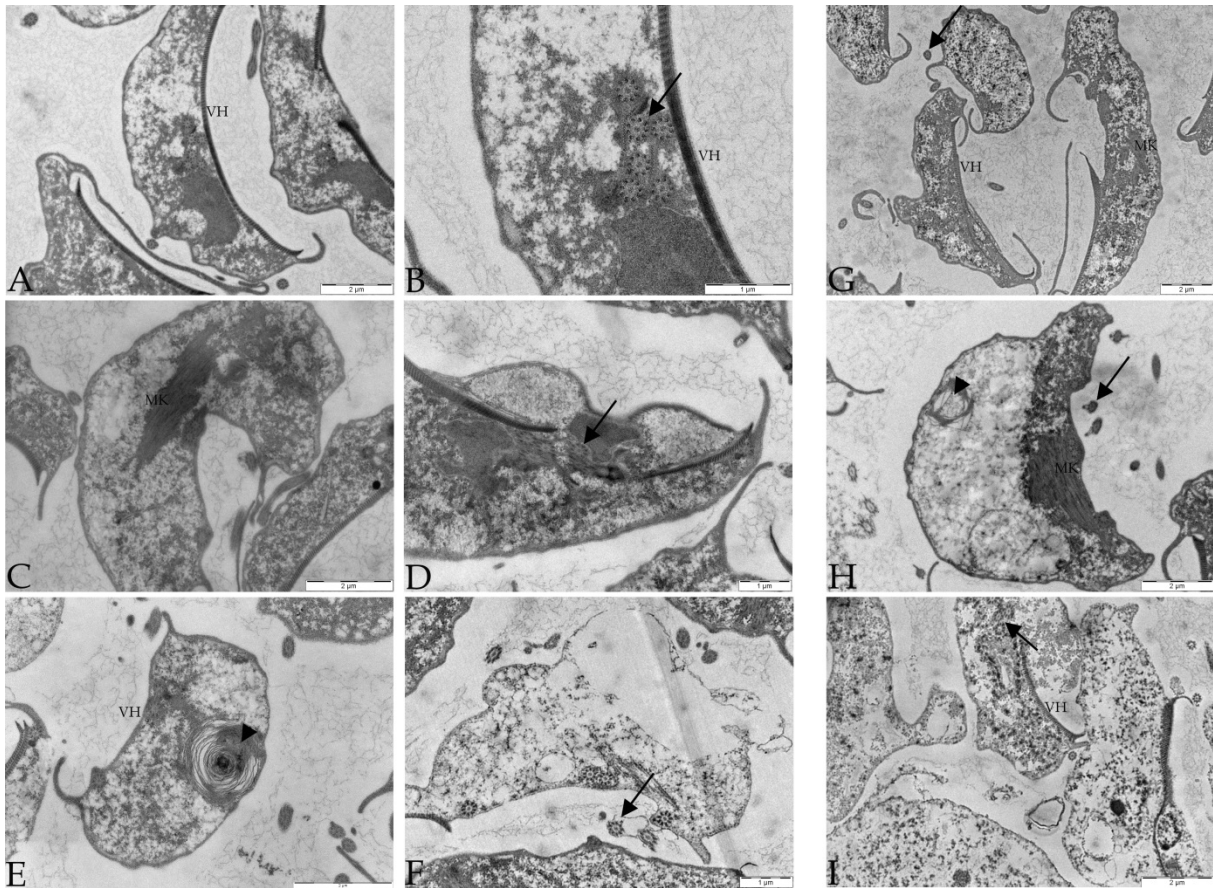


### 3.2.2. Ultrastrukturelle Veränderungen nach Behandlung mit THL

Die Resultate aus den Untersuchungen mit Hilfe der Diff-Quik®-Färbung legten nahe, dass THL möglicherweise Einfluss auf das giardiale Zytoskelett nimmt. Flagellen und Mediankörper wurden nach Behandlung mit THL wesentlich schwächer gefärbt. Um Aufschluss über einen Effekt auf das Zytoskelett oder andere Zellorganellen zu erlangen, wurden transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Untersuchungen vorgenommen.

Generell zeigten Trophozoiten, die unter 24-stündiger Inkubation mit THL oder MTZ standen, vermehrt Zellausstülpungen (Abb. 16 D, F, I) und verstärkt Desintegration einhergehend mit einer erhöhten Extraktion des Zytoplasmas (Abb. 16 C-F, H, I). Zudem traten mit zunehmender Wirkstoffkonzentration große membranlamellenenthaltende Einschlusskörper (Abb. 16 E, H) auf, die vermutlich einen unspezifischen Effekt der Zellschädigung darstellen. Das Zytoskelett der Flagellen und der ventralen Haftscheibe ließ keine spezifischen Beeinträchtigungen erkennen. Die typische  $9 \times 2 + 2$ -Struktur der Mikrotubuli blieb sowohl unter THL- als auch unter MTZ-Behandlung erhalten (Abb. 16 D, F, H, I). Veränderungen in Größe und Form des Mediankörpers ließen sich nicht zuverlässig analysieren, da der Mediankörper aus schnittechnischen Gründen in nur wenigen Parasitenanschnitten pro Probe erfasst werden konnte. Soweit beurteilbar blieb der Mediankörper in seiner Feinstruktur aber ebenfalls unverändert. Die Mikrotubulistrukturen im Mediankörper zeigten keine negative Beeinflussung (Abb. 16 C, H).

Die verminderte Anfärbbarkeit der Flagellen und der Mediankörper in der Diff-Quik®-Färbung nach THL-Behandlung beruhen demnach nicht auf einem Verlust der Mikrotubulistrukturen, sondern scheint durch andere morphologische oder physiologische Modifikationen induziert zu werden. Denkbar sind eine Membranpermeabilisierung, eine Extraktion zytosolischer Komponenten oder eine pH-Wert Veränderung mit Auswirkung auf die Anfärbbarkeit.



**Abbildung 16: Keine Beeinträchtigung des giardialen Zytoskeletts unter THL-Behandlung im Elektronenmikroskop (TEM-Aufnahmen)**

WB C6-Trophozoiten ( $1 \times 10^7$ ) blieben für 24 h unbehandelt (A, B, G) oder wurden mit steigenden Konzentrationen von THL (C, D, E, F) oder MTZ (H, I) behandelt. Im Anschluss wurde ihre Ultrastruktur transmissionselektronenmikroskopisch untersucht. Die Dokumentation erfolgte am Tecnai 12 Transmissionselektronenmikroskop (FEI). Mediankörper (MK), ventrale Haftscheibe (VH), Mikrotubuli (Pfeil), Einschlusskörper mit Membranlamellen (Pfeilspitze)

(A, B) unbehandelte Trophozoiten (Lösungsmittelkontrolle (EtOH 0,04%)), (C, D) Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  THL, (E, F) Inkubation mit 15  $\mu\text{M}$  THL, (G) unbehandelte Trophozoiten (Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,03%)), (H) Inkubation mit MTZ 11  $\mu\text{M}$ , (I) Inkubation mit 33  $\mu\text{M}$  MTZ.

Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Trophozoitenschädigung unter THL- und MTZ-Behandlung, verbunden mit einer erheblichen Extraktion des Zytoplasmas, während das Zytoskelett strukturell unbeeinflusst bleibt.

Um zu unterstreichen, dass THL nicht beeinträchtigend auf die Mikrotubulistrukturen wirkt, wurde zusätzlich eine Immunfluoreszenzfärbung gegen alpha( $\alpha$ )-Tubulin, gemeinsam mit beta( $\beta$ )-Tubulin Hauptbestandteil der Mikrotubuli, angefertigt.

Mit Hilfe der Immunfärbung konnten die Axonema und Mediankörper der Trophozoiten deutlich illustriert werden (Abb. 17 A). Die ventrale Haftscheibe war, wie in anderen Veröffentlichungen dokumentiert (SAGOLLA *et al.*, 2006), im Vergleich zu den anderen Mikrotubuli-Organellen nur schwach angefärbt. Anti-Tubulin-Antikörper erreichen die

---

Epitope der ventralen Haftscheibe nur sehr schlecht, da lediglich 2 von den 13 Protofilamenten zugänglich für die Antikörper sind. Mikrotubuli-assoziierte-Proteine und Multiproteinkomplexe führen zur räumlichen Abschirmung der Epitope (SCHWARTZ *et al.*, 2012). Zur besseren Visualisierung der Trophozoiten wurde zusätzlich ein  $\alpha$ -Tropho-Antikörper eingesetzt und die Kernfärbung mit DAPI durchgeführt (Abb. 17 A'-D').

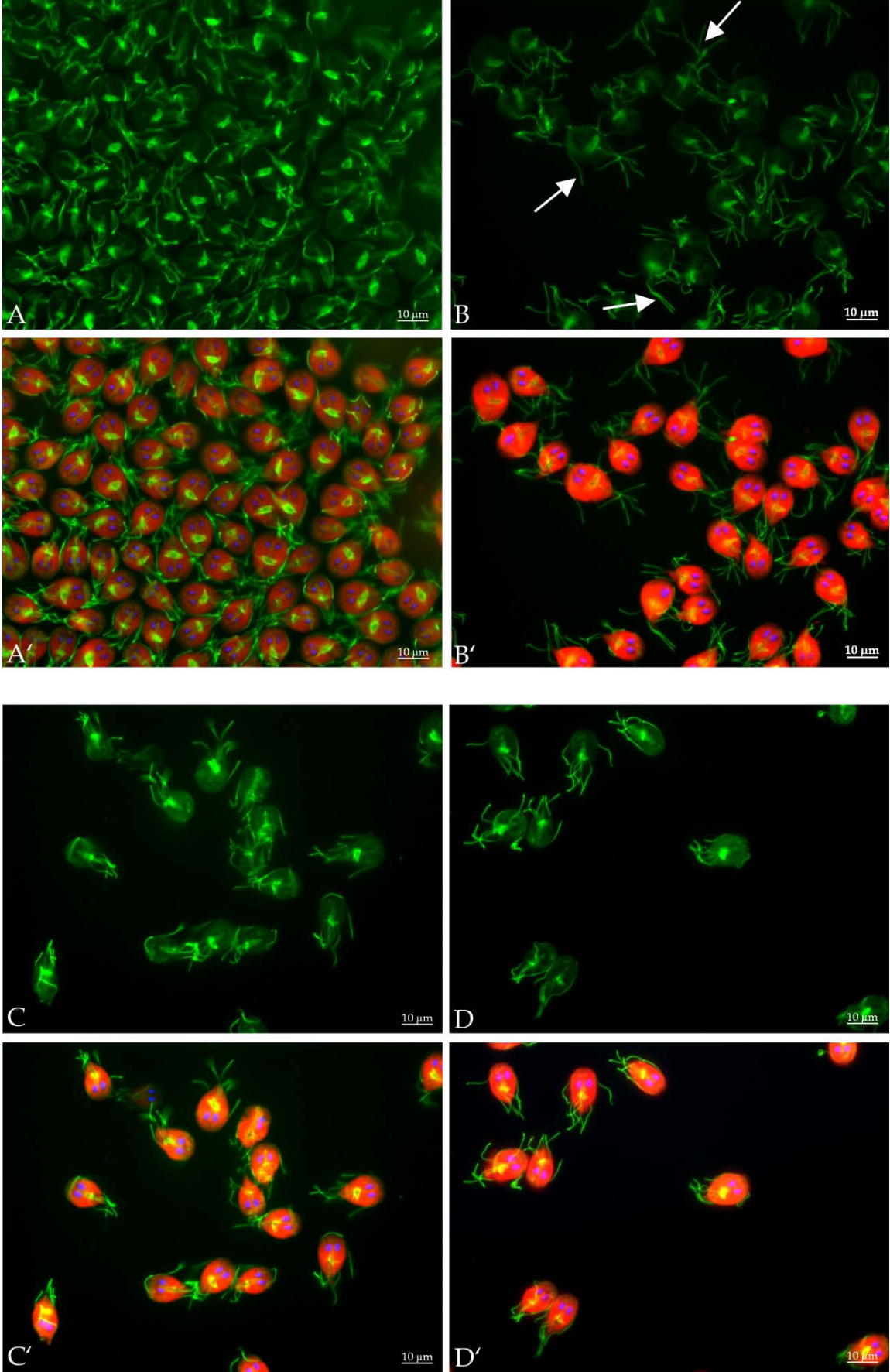


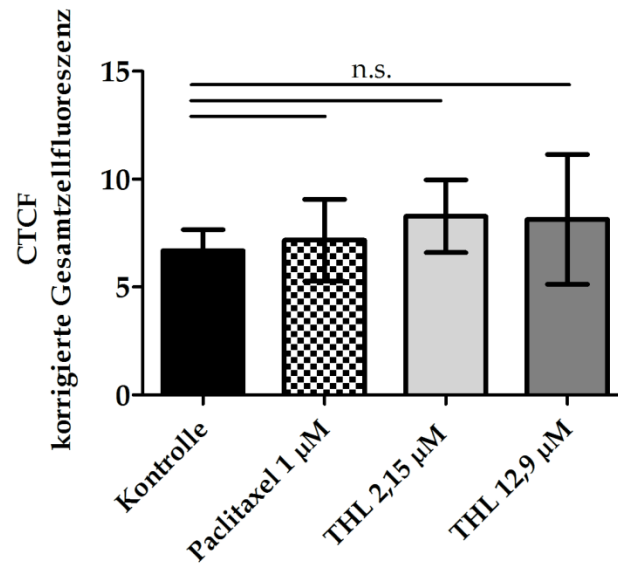
Abbildung 17: THL zeigt keine Auswirkung auf Mikrotubulstrukturen der Trophozoiten

WB C6-Trophozoiten ( $1,25 \times 10^5$ ) blieben für 24 h unbehandelt (A, A') oder wurden mit THL (C, C', D, D') oder Paclitaxel (B, B') behandelt. Nach der Fixierung wurden  $\alpha$ -Tubulinstrukturen mit dem Primärantikörper Anti- $\alpha$ -Tubulin DM1A (Maus, 1:200) detektiert. Die Färbung erfolgte mit dem FITC-konjugierten Sekundärantikörper Anti-Maus-IgG (Ziege, 1:2000, Grün), dem Cy3-markiertem Troph-o-Glo™-Antikörper (unverdünnt, Rot) sowie dem DNA-Farbstoff DAPI (1 ng/ $\mu$ L Blau). Die Dokumentation erfolgte am Axio Imager Z1/ApoTome (Zeiss).

(A, A') unbehandelte Trophozoiten, (B, B') Inkubation mit 1  $\mu$ M Paclitaxel, (C, C') Inkubation mit 2,15  $\mu$ M THL, (D, D') Inkubation mit 12,9  $\mu$ M THL.

Dargestellt sind die Axonema und Mediankörper der adhärennten Trophozoiten. Sie sind deutlich zu erkennen und zeigen in der THL-behandelten Gruppe keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Paclitaxel hingegen führt zu einer sichtbaren Verlängerung der Axonema (Pfeil). In keiner Behandlungsgruppe kommt es zur Abnahme oder Zunahme der Fluoreszenz.

Wie aus vorherigen Untersuchungen zu erwarten war, führte eine 24-stündige Behandlung mit THL zu einem verstärkten Ablösen der Trophozoiten von der Oberfläche. Die Mikrotubuli der adhärennten Trophozoiten blieben jedoch unbeeinflusst, sowohl Axonema als auch Mediankörper zeigten keine visuellen Veränderungen (Abb. 17 C, D). Ferner ergab die Bestimmung der Fluoreszenzintensität dieser Strukturen für THL keine signifikante Änderung in der Intensität gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 18). Paclitaxel als Tubulininhibitor wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Aufgrund seiner stabilisierenden Wirkung auf Mikrotubulipolymere wird deren Abbau verhindert, so dass es nicht überrascht, dass sich für Paclitaxel kein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ergab (Abb. 18).



**Abbildung 18: THL zeigt keinen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität der detektierbaren Mikrotubulistrukturen**

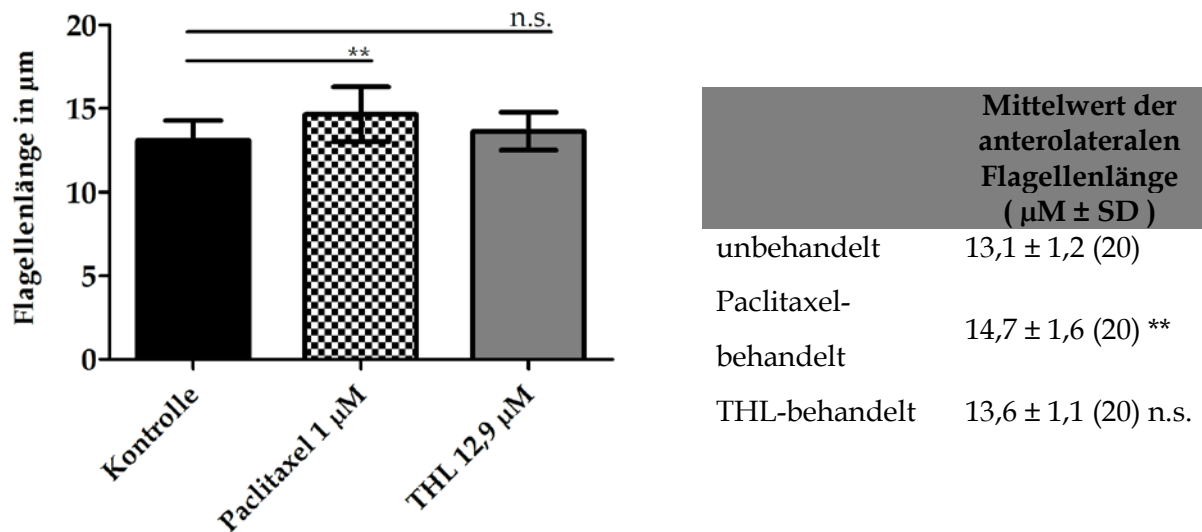
Nach einer Inkubationszeit von 24 h und anschließender Fixierung wurden die Tubulinstrukturen der WB C6-Trophozoiten mit Anti- $\alpha$ -Tubulin DM1A (Maus, 1:200) detektiert und mit einem fluoresceinkonjugierten Sekundärantikörper Anti-Maus-IgG (Ziege, 1:2000) gefärbt (vgl. 2.9.2.). Unbehandelte Trophozoiten dienten als Kontrolle.

Die Fluoreszenzintensität wurde, basierend auf der Immunfärbung gegen  $\alpha$ -Tubulin, aus einem aus mehreren optischen Ebenen zusammengesetzten Bildstapel unter Verwendung der Software ImageJ 1.47 bestimmt.

Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus jeweils 16 Einzelwerten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Dunn-Test als Post-hoc-Test. Als statistisch signifikant gelten \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , n.s. bedeutet nicht signifikant.

Dargestellt ist die Fluoreszenz der detektierten Mikrotubuli nach 24-stündiger Behandlung mit THL oder Paclitaxel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Es zeigt sich, dass weder THL noch Paclitaxel Einfluss auf die Intensität der Fluoreszenz nehmen.

Dieser stabilisierende Effekt äußerte sich darüber hinaus in einer signifikanten Zunahme der Flagellenlänge um 12% (Abb. 17 B, Abb. 19). Aus früheren Untersuchungen zum giardialen Zytoskelett mit Hilfe von Paclitaxel (DAWSON *et al.*, 2007) war dieser Effekt bereits bekannt und konnte somit bestätigt werden. Im Gegensatz zu Paclitaxel hatte THL keinen Einfluss auf die Länge der Axonema (Abb. 17 C, D, Abb. 19).



**Abbildung 19: Einfluss von THL und Paclitaxel auf die anterolaterale Flagellenlänge**

Nach einer Inkubationszeit von 24 h und anschließender Fixierung wurden die Tubulinstrukturen der WB C6-Trophozoiten mit Anti- $\alpha$ -Tubulin DM1A (Maus, 1:200) detektiert und mit einem fluoresceinkonjugierten Sekundärantikörper Anti-Maus-IgG (Ziege, 1:2000) gefärbt (vgl. 2.9.2.). Unbehandelte Trophozoiten dienen als Kontrolle.

Die Flagellenlänge wurde, basierend auf der Immunfärbung der Axonema, aus einem aus mehreren optischen Ebenen zusammengesetzten Bildstapel unter Verwendung der Software ImageJ 1.47 bestimmt.

Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus jeweils 20 Einzelwerten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Einweg-ANOVA und dem Bonferroni-Test als Post-hoc-Test. Als statistisch signifikant gelten \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , n.s. bedeutet nicht signifikant.

Dargestellt ist der Einfluss von THL (12,9  $\mu$ M) und Paclitaxel (1  $\mu$ M) auf die anterolaterale Flagellenlänge der WB C6-Trophozoiten. Eine Behandlung mit Paclitaxel resultiert in einer signifikanten Verlängerung der Flagellen, während THL weder einer Verkürzung noch eine Verlängerung bewirkt. THL zeigt keinen Einfluss auf die Axonema der Trophozoiten.

Die Ergebnisse aus der TEM-Analyse und Immunfärbung gemeinsam lassen demnach auf einen anti-giardialen Effekt von THL schließen, der sich nicht über ein Auswirken auf das mikrotubuläre Zytoskelett entfaltet.

### 3.3. Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel

*G. duodenalis* besitzt lediglich begrenzt die Fähigkeit zur Synthese eigener Lipide und Lipidderivate und ist daher abhängig von der Aufnahme freier Fettsäuren und Lipide aus der Umgebung (ELLIS *et al.*, 1996, STEVENS *et al.*, 1997). Untersuchungen zur Aufnahme und Lokalisierung verschiedener Lipide lassen vermuten, dass *G. duodenalis* über Umlagerungsreaktionen (Umesterung) in der Lage ist, spezielle Phospholipide (Phosphoglyceride) aufzubauen (GIBSON *et al.*, 1999, DAS *et al.*, 2002). Darüber hinaus gibt es

Hinweise aus den Genomen der vier derzeit zur Verfügung stehenden, vollständig sequenzierten *G. duodenalis* Isolate auf putative am Lipidstoffwechsel beteiligte Enzyme, unter anderem Lipasen (www.giardiadb.org) (Tab. 12). THL entfaltet seine Wirkung als Lipaseinhibitor im menschlichen Körper nach bisherigem Kenntnisstand über die kovalente Bindung des Serins im aktiven Zentrum. Das katalytische Serin befindet sich in dem hochkonservierten GXSXG-Motiv (BORGSTROM, 1988, HADVARY *et al.*, 1991). Vor diesem Hintergrund lag es nahe, die Auswirkungen einer THL-Behandlung auf die *Giardia*-Trophozoiten im Hinblick auf den parasitären Lipidstoffwechsel zu untersuchen.

**Tabelle 12: Auflistung putativer Lipasen von *G. duodenalis***

Mit Hilfe der Stichwortsuche „\*Lipase“ wurden die Genome der sequenzierten *Giardia*-Isolate, welche in der *Giardia* Datenbank hinterlegt sind, durchsucht. Anschließend wurde die Suche mittels der Konsensussequenz GXSXG der Lipasen eingegrenzt.

Suchergebnisse	<i>Giardia</i> -Isolat DH (Assemblage AII)	<i>Giardia</i> -Isolat WB (Assemblage AI)	<i>Giardia</i> -Isolat GS (Assemblage B)	<i>Giardia</i> -Isolat P15 (Assemblage E)
Stichwortsuche „*Lipase“	10	9	10	11
Gen-ID	DHA2_151650 *	GL50803_15157	GSB_8713 *	GLP15_2505
	DHA2_152339	GL50803_3950 *	GSB_152676 *	GLP15_394 *
	DHA2_8713 *	GL50803_5987 *	GSB_152123	GLP15_3885 *
	DHA2_152914 *	GL50803_8713 *	GSB_152444 *	GLP15_198 *
	DHA2_100845 *	GL50803_93548	GSB_100845 *	GLP15_711
	DHA2_115159	GL50803_17277	GSB_93548	GLP15_2398
	DHA2_17277	GL50803_100845 *	GSB_17277	GLP15_1744
	DHA2_93548	GL50803_15311 *	GSB_115159	GLP15_2645 *
	DHA2_152464	GL50803_115159	GSB_150828 *	GLP15_928
	DHA2_151535 *		GSB_153043	GLP15_4938 *
				GLP15_511 *

\* Treffer für putative Lipasen, die sich nach Stichwortsuche „\*Lipase“ und Motivsuche GXSXG ergaben



### 3.3.1. Lipase-Aktivität und deren Beeinflussung durch THL

In den rasterelektronenmikroskopischen Analysen wurde eine starke Blasenbildung der Trophozoitenmembran nach THL-Behandlung beobachtet, was auf eine gestörte Membranintegrität oder Beeinflussung von Membrankomponenten hindeutet. Für eine funktionale und stabile Membran bedarf es Phospholipide und für Phospholipid-Remodeling-Reaktionen entsprechende Enzyme, wie Acyltransferasen und Phospholipasen. In der Literatur wurde bereits Phospholipase-Aktivität für *G. duodenalis* postuliert (DAS *et al.*, 2001) und von VARGAS-VILLARREAL *et al.* (2007) experimentell bestimmt.

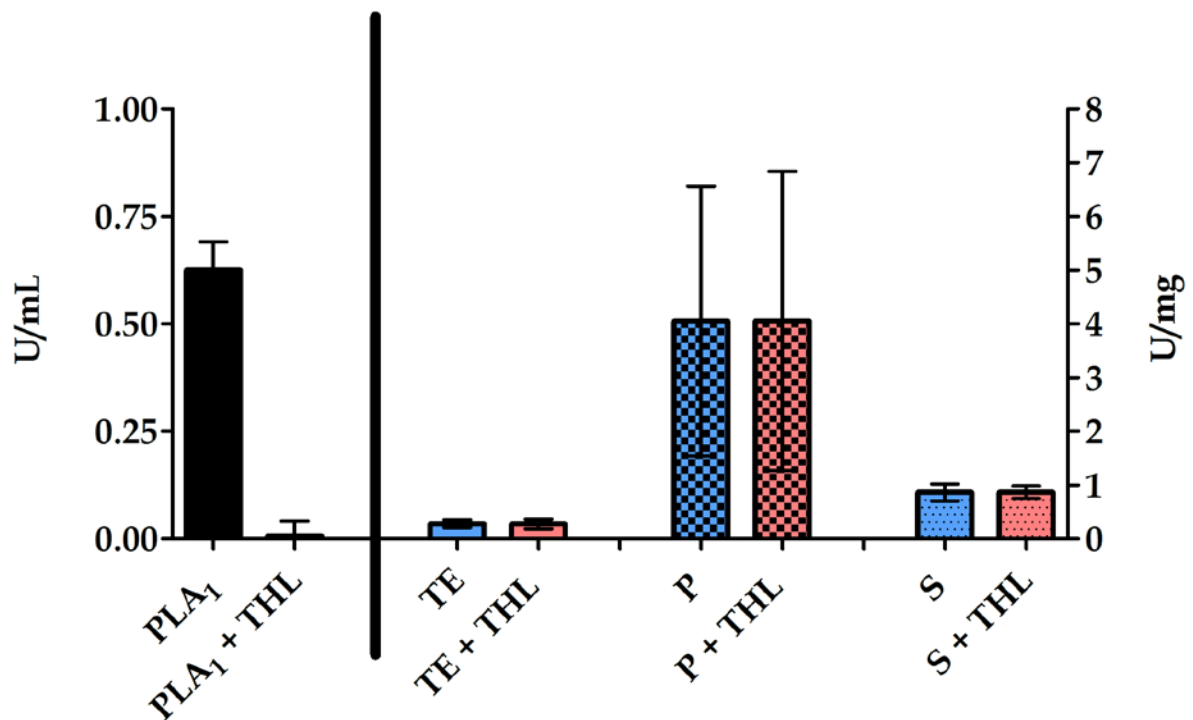
In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Testsysteme ausgewählt, um die Lipase-Aktivität von *G. duodenalis* zu bestimmen. Zum einen ein System mit dem auf die Hydrolysefähigkeit von Phospholipiden durch *Giardia* getestet wurde (PLA<sub>1</sub>), zum anderen ein System, das die Fähigkeit zur Spaltung von Triglyceriden durch *G. duodenalis* untersucht (LPL).

Die Phospholipase A<sub>1</sub>(PLA<sub>1</sub>)-Aktivität wurde mit Hilfe des Enzchek® Phospholipase A<sub>1</sub> Assay Kits bestimmt (vgl. 2.10.3). Als Kontrolle zur Überprüfung der Funktionalität des Testsystems und zur Bestimmung der Aktivität diente die mitgelieferte Lecitase® Ultra (PLA<sub>1</sub>). THL konnte eine Umsetzung des Substrats durch die Lecitase® Ultra zu 100% inhibieren (Abb. 20, links).

Die, wie unter 2.4.5 beschrieben, hergestellten *G. duodenalis*-Lysatfraktionen wurden auf ihre PLA<sub>1</sub>-Aktivität mit und ohne Zugabe von THL (43 µM) getestet. Grundsätzlich ließ sich in allen untersuchten Fraktionen eine geringe PLA<sub>1</sub>-Aktivität nachweisen. Dabei zeigte der Totalextrakt (TE) die geringste Aktivität, während das Pellet (P), bestehend aus unlöslichen und membrangebundenen Ingredienzien, die höchste Enzymaktivität aufwies. Die Umsatzrate der löslichen Fraktion (S) lag dazwischen. THL konnte allerdings in keiner Fraktion eine Inhibition dieser Aktivität erzielen (Abb. 20, rechts).

Die mit dem Enzchek® Kit ermittelten Ergebnisse bezüglich der PLA<sub>1</sub>-Aktivität zeigten zwar in den durchgeführten Einzelexperimenten die gleiche Tendenz, jedoch Abweichungen in den Absolutwerten, zumindest für die zelluläre Fraktion. Diese Diskrepanz kann durch eine schwankende Emulgierung des Substrats durch die in der zellulären Fraktion enthaltenden emulgierenden Phospholipide (wie Lecithin) erklärt werden. Eine abschließende Ermittlung der spezifischen Aktivität wurde deshalb nicht durchgeführt.

Anhand dieser Versuchsdurchführung scheint die PLA<sub>1</sub> kein Target von THL zu sein.

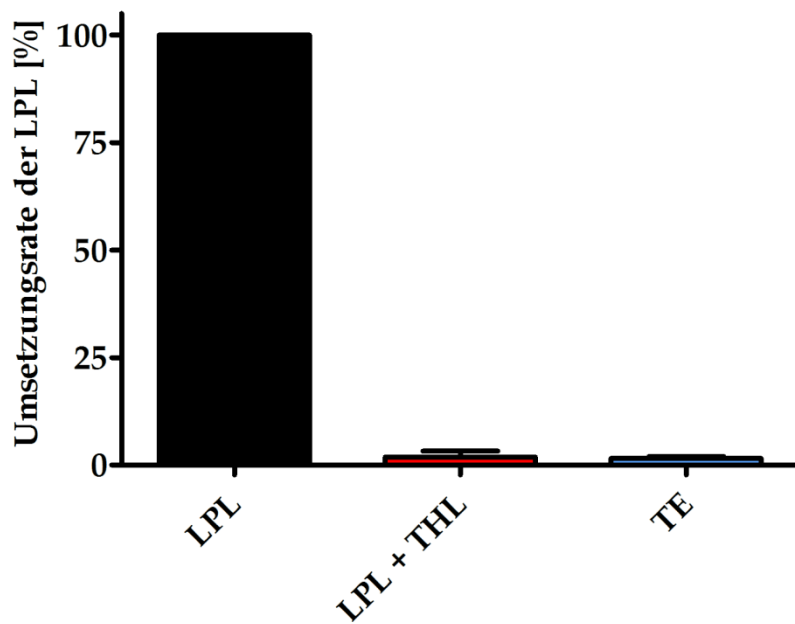


**Abbildung 20: PLA<sub>1</sub>-Aktivität der *G. duodenalis*-Lysatfraktionen**

Die PLA<sub>1</sub>-Aktivität in U/mg wurde im Totalextrakt (TE), in der löslichen Fraktion (S) und in der zellulären Fraktion (P) des WB C6-Trophozoiten-Lysates sowohl in Ab- (blau dargestellt) als auch in Anwesenheit von 43 µM THL (rot dargestellt) getestet. THL führt in keiner Fraktion zu einer Inhibition der gemessenen Aktivität. Unter Zugabe von THL konnte die Aktivität (U/mL) der Kontrolle Lecitase® Ultra inhibiert werden.

Angegeben sind die Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Experimenten (n = 3).

Neben der Untersuchung auf PLA<sub>1</sub>-Aktivität sollte auch geprüft werden, ob *Giardia*-Trophozoiten Triglyceride hydrolysieren können. Zur Testung wurde ein Lipoproteinlipase(LPL)-Assay herangezogen, der sich an der Veröffentlichung von BASU *et al.* (2011) orientiert (vgl. 2.10.4.) Die kommerziell erworbene LPL setzte das Enzchek® Lipase Substrat, indiziert durch einen Anstieg der Fluoreszenzintensität, um und diente daher als Kontrolle im Testsystem. THL (43 µM) war in der Lage auch diese Lipase zu 100% zu inhibieren. Der Totalextrakt (TE) des *Giardia*-Lysates bewirkte jedoch keine Änderung in der Fluoreszenzintensität. Im ausgewählten Testsystem zeigten die Trophozoiten somit keine Fähigkeit zur Hydrolyse von Triglyceride (Abb. 21).



**Abbildung 21:** *Giardia*-Lysat zeigt keine hydrolytische Eigenschaft gegenüber Triglyceriden

Dargestellt ist die Umsetzung des Enzchek® Lipase Substrats im LPL-Assay relativ zur eingesetzten Kontrolle (LPL) (vgl. 2.10.4.). Die kommerziell erworbene LPL ist durch THL inhibierbar. Das *Giardia*-Lysat (TE) kann das Substrat nicht umsetzen und zeigt keine Hydrolyseeigenschaft gegenüber Triglyceriden.

Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten ( $n = 3$ ).

In den dargestellten Experimenten konnte gezeigt werden, dass *Giardia*-Trophoziten PLA<sub>1</sub>-Aktivität besitzen. Eine Inhibition dieser Enzymaktivität durch THL wurde jedoch nicht festgestellt. Ferner wurde eine Triglycerid-Lipase-Aktivität von *Giardia*-Trophoziten unter den gewählten Testbedingungen nicht nachgewiesen. Weitere Arbeiten hinsichtlich anderer Lipase-Aktivitäten und deren mögliche Hemmung durch THL wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

### 3.3.2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel

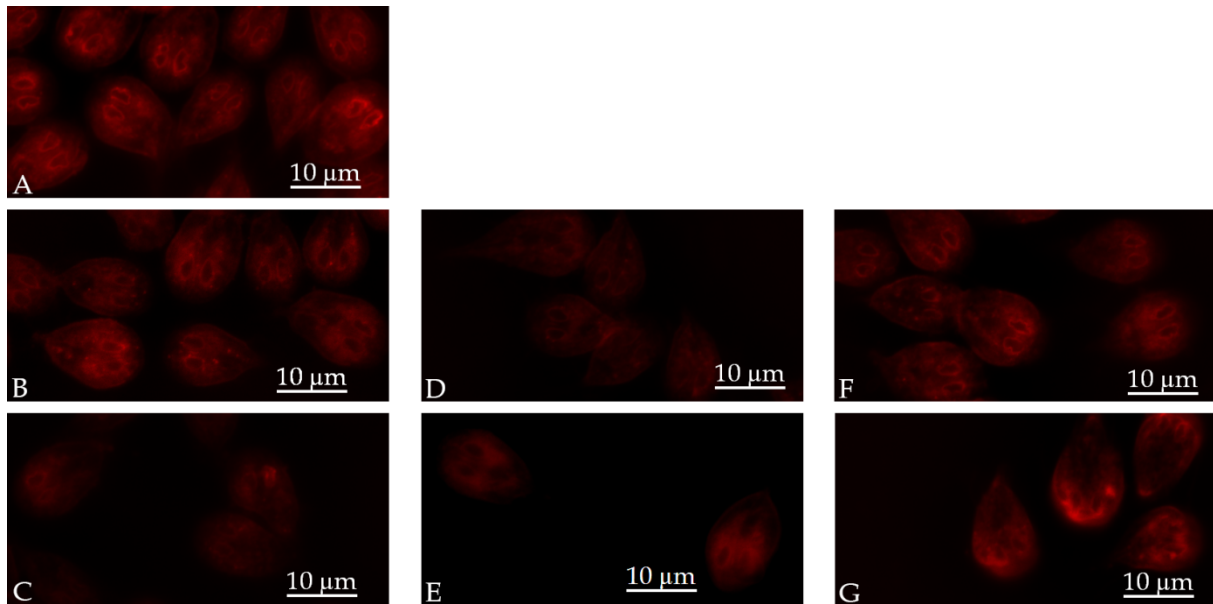
Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sollte untersucht werden, inwieweit THL einen Einfluss auf die Verteilung oder den Einbau von Lipiden insbesondere Phospholipiden in *G. duodenalis* hat.

#### 3.3.2.1. Fettfärbung

Nilrot ist ein Farbstoff, der sich zum Anfärben von Lipiden besonders eignet. Die Fluoreszenz ist dabei abhängig von der Hydrophobie der Lipide, d.h. die Fluoreszenzemission verschiebt sich von rot nach gelb. Hydrophile Lipide, wie Phospholipide, fluoreszieren rot, während neutrale Fette, wie Triglyceride, gelb fluoreszieren (GREENSPAN *et al.*, 1985, DIAZ *et al.*, 2008). Die Analyse der mikroskopischen Präparate erfolgte dementsprechend mit einer Exzitationwellenlänge von 530 – 560 nm und einer Emissionswellenlänge von > 590 nm.

Mit Hilfe der Nilrotfärbung wurden die Membranen der Trophozoiten, insbesondere die Kernmembran, besonders gut sichtbar. Aber auch Komponenten im Zytoplasma ließen sich anfärben (Abb. 22 A). Nach 24-stündiger Inkubation mit THL in geringer (2,15  $\mu\text{M}$ , Abb. 22 C) sowie in hoher (12,9  $\mu\text{M}$ , Abb. 22 E) Konzentration konnte eine Abnahme der Fluoreszenzintensität der gefärbten Strukturen verzeichnet werden. Dieser Effekt betraf besonders auffällig die perinukleären Membranen und zeigte sich bereits nach einstündiger Inkubation mit 12,9  $\mu\text{M}$  THL (Abb. 22 D). Eine Behandlungszeit von einer Stunde mit 2,15  $\mu\text{M}$  THL führte zu keiner sichtbaren Veränderung im Färbungsprofil (Abb. 22 B).

Die Aufnahmen der WB C6-Trophozoiten, die mit 33  $\mu\text{M}$  MTZ für eine Stunde inkubiert wurden, ließen keinen Unterschied zur Kontrollgruppe erkennen (Abb. 22 F) und auch eine 24-stündige Inkubation mit MTZ führte hinsichtlich der Kernmembranfärbung zu keiner Divergenz (Abb. 22 G). Die zytoplasmatischen Lipide hingegen schienen jedoch beeinträchtigt in ihrer Anfärbbarkeit, was mit einer allgemeinen Zellschädigung durch eine 24-stündige Behandlung mit MTZ in Verbindung stehen kann.

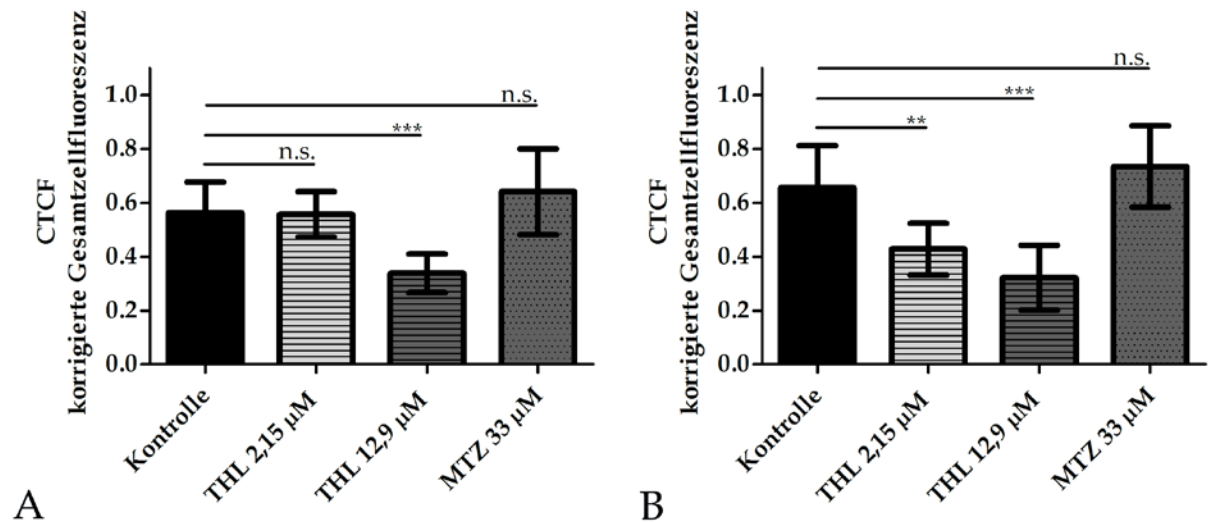


**Abbildung 22: Verminderte Anfärbbarkeit von Lipiden nach THL-Behandlung der WB C6-Trophozoiten**

WB C6-Trophozoiten ( $1,25 \times 10^5$ ) blieben für eine Stunde bzw. 24 h unbehandelt (A) oder wurden mit THL  $2,15 \mu\text{M}$  (B, C), THL  $12,9 \mu\text{M}$  (D, E) oder  $33 \mu\text{M}$  MTZ (F, G) inkubiert. Im Anschluss wurde die Nilrotfärbung (vgl. 2.10.1.) durchgeführt, um einen Einfluss der Behandlung auf die Lipidverteilung zu untersuchen. Die Dokumentation erfolgte am Axio Imager Z1/ApoTome (Zeiss).

(A) unbehandelte Trophozoiten (repräsentativ für alle durchgeführten Kontrollen), (B) einstündige Inkubation mit  $2,15 \mu\text{M}$  THL, (C) 24-stündige Inkubation mit  $2,15 \mu\text{M}$  THL, (D) einstündige Inkubation mit  $12,9 \mu\text{M}$  THL, (E) 24-stündige Inkubation mit  $12,9 \mu\text{M}$  THL, (F) einstündige Inkubation mit  $33 \mu\text{M}$  MTZ, (G) 24-stündige Inkubation mit  $33 \mu\text{M}$  MTZ. Dargestellt sind die mit Nilrot gefärbten Lipidstrukturen der WB C6-Trophozoiten. Die Inkubation mit THL in hohen Konzentrationen ( $12,9 \mu\text{M}$ ) führt bereits nach einer Stunde zu einer verminderten Anfärbbarkeit der Lipide mit Nilrot, während eine Behandlung mit MTZ ( $33 \mu\text{M}$ ) für eine Stunde keinen Einfluss auf das Färbungsprofil hat. Die Färbung der perinukleären Membran scheint nach 24 h ebenso wenig beeinträchtigt. Eine Inkubation mit THL ( $2,15$  und  $12,9 \mu\text{M}$ ) für 24 h hingegen resultiert in einer Abnahme der Fluoreszenz.

Die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals (vgl. 2.11.) der perinukleären Membran ergab ein analoges Bild. Eine einstündige Inkubation mit THL  $12,9 \mu\text{M}$  führte zu einer signifikanten Abnahme der Fluoreszenzintensität, während  $2,15 \mu\text{M}$  THL und  $33 \mu\text{M}$  MTZ keinen Einfluss auf die Intensität ausübten (Abb. 23 A). Nach einer Behandlungsdauer von 24 h zeigte sich ein signifikant vermindertes Signal bereits für  $2,15 \mu\text{M}$  THL, jedoch nicht für  $33 \mu\text{M}$  MTZ (Abb. 23 B). MTZ entfaltet seine toxische Wirkung auf *G. duodenalis* über reaktive Zwischenprodukte, die mit der DNA interkalieren, nicht über einen Eingriff in den parasitären Lipidstoffwechsel.



**Abbildung 23: Einfluss von THL auf die Fluoreszenzintensitäten der mit Nilrot detektierbaren Lipide der perinukleären Membran**

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde (A) bzw. von 24 h (B) mit THL oder MTZ wurde anschließend die Nilrotfärbung (vgl. 2.10.1.) durchgeführt. Unbehandelte Trophozoiten dienen als Kontrolle.

Die Fluoreszenzintensität wurden unter Verwendung der Software ImageJ 1.47 bestimmt (vgl. 2.11.).

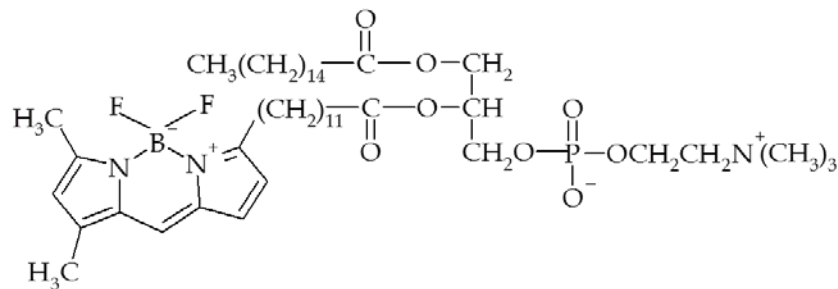
Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus jeweils 18 Einzelwerten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Dunn-Test als Post-hoc-Test. Als statistisch signifikant gelten \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , n.s. bedeutet nicht signifikant.

Dargestellt ist die Fluoreszenz der detektierten Lipide der Kernmembran nach ein- bzw. 24-stündiger Behandlung mit THL oder MTZ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. THL bewirkt eine signifikante Verminderung der Intensität, während MTZ keinen Einfluss auf die Intensität der Fluoreszenz nimmt.

Die verwendete Nilrotfärbung diene zur Detektion von Lipiden, insbesondere von Phospholipiden. Da in der perinukleären Membran von *Giardia*-Trophozoiten vorrangig Phospholipide wie Phosphoglyceride und Sphingomyeline lokalisiert sind (STEVENS *et al.*, 1997, GIBSON *et al.*, 1999) und eine Behandlung mit THL die Anfärbbarkeit dieser Membran auffällig beeinträchtigte, scheint ein Einfluss auf diese Komponenten des Lipidstoffwechsels denkbar.

### 3.3.2.2. Aufnahme von BODIPY-markiertem Phosphatidylcholin

Phosphatidylcholine (PC) werden bevorzugt in die giardiale Zellmembran und die Membran der Flagellen eingebaut (STEVENS *et al.*, 1997). Um eine gestörte Aufnahme oder Verteilung von PC durch THL zu untersuchen, wurden im folgenden Versuch *Giardia*-Trophozoiten mit einem fluoreszenzmarkierten Phospholipid-Analogen, dem  $\beta$ -BODIPY® FL C<sub>12</sub>-HPC, über verschiedene Zeiträume (0,5–24 h) inkubiert.

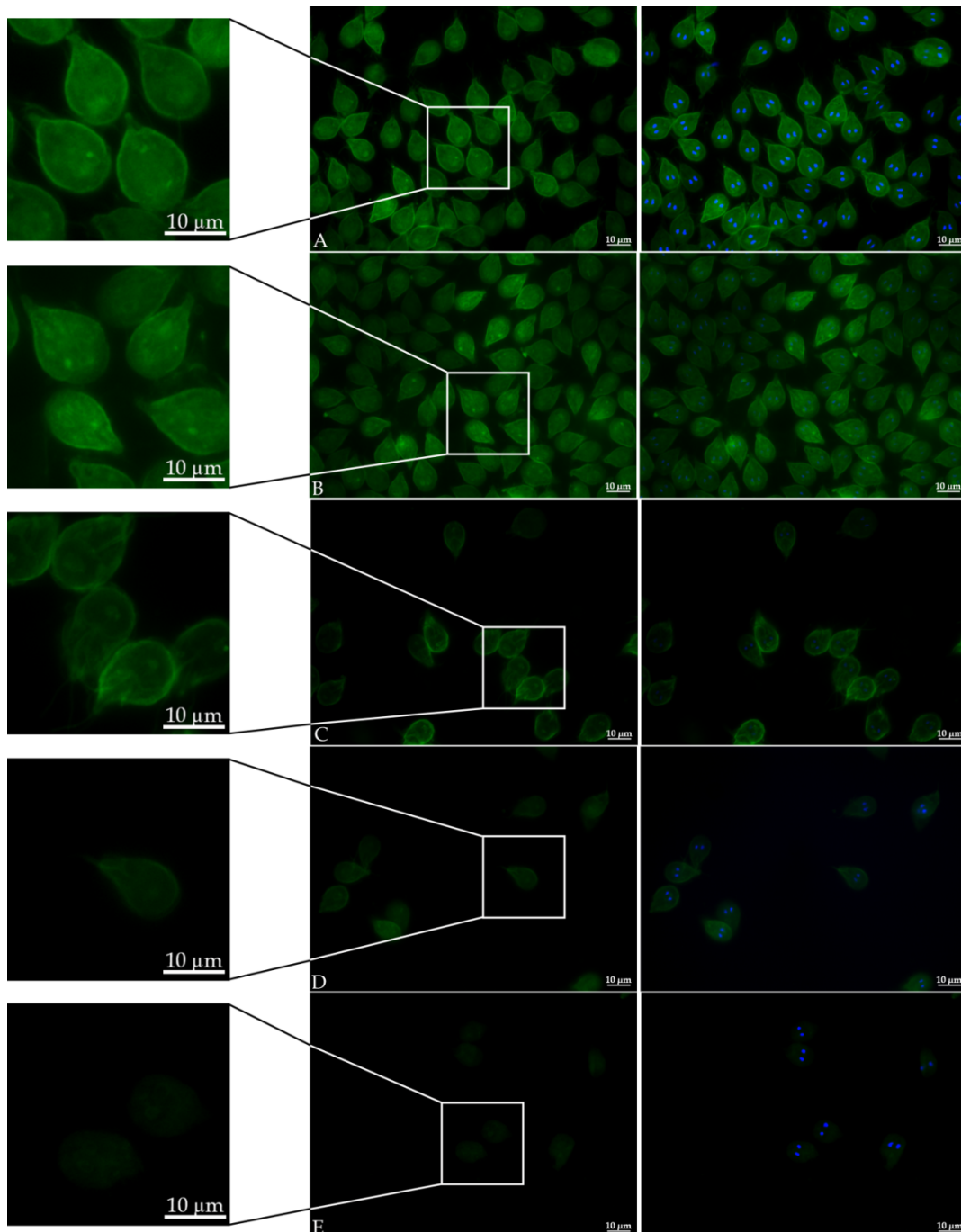


$\beta$ -BODIPY® FL C<sub>12</sub>-HPC (2-(4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-dodecanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin)

#### Abbildung 24: Fluorophormarkiertes Phosphatidylcholin

Dargestellt ist das  $\beta$ -BODIPY® FL C<sub>12</sub>-Phosphatidylcholin, an dessen  $\beta$ -C-Atom über einen Laurinsäurerest ein fluorogener Substituent (BODIPY FL) gekoppelt ist. Die Verbindung fluoresziert bei einer Emissionswellenlänge von 510 nm.

Die WB C6-Trophozoiten der Kontrollgruppe zeigten deutlich, dass das BODIPY-Phosphatidylcholin in der Zellmembran und Flagellenmembran lokalisiert wurde (Abb. 25 A). Eine 30-minütige Inkubation mit THL (12,9  $\mu$ M) beeinträchtigte diese Integration nicht (Abb. 25 B). Ab einer Behandlungsdauer von einer Stunde konnten erste Veränderungen verzeichnet werden. Die Fluoreszenzintensität war vermindert und die Zellmembran wurde zum Teil nur unvollständig detektiert (Abb. 25 C). Eine Inkubation mit THL über zwei Stunden führte zu einer weiteren Abnahme der Fluoreszenzintensität und die Flagellen konnten nicht mehr markiert werden (Abb. 25 D). Nach 24 h konnte eine BODIPY-Phosphatidylcholin-Aufnahme in die Trophozoitenmembran nicht mehr erfasst werden. Die Fluoreszenz war abermals vermindert (Abb. 25 E).



**Abbildung 25: BODIPY-Phosphatidylcholin-Aufnahme und Verteilung in WB C6-Trophozoiten unter THL-Behandlung**

Vitale WB C6-Trophozoiten wurden für verschiedene Zeiten (0,5 h, 1 h, 2 h und 24 h) mit  $12,9 \mu\text{M}$  THL behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einer BODIPY-Phosphatidylcholin-Lösung ( $200 \text{ nM}$ ) für 30 min (vgl. 2.10.2.).

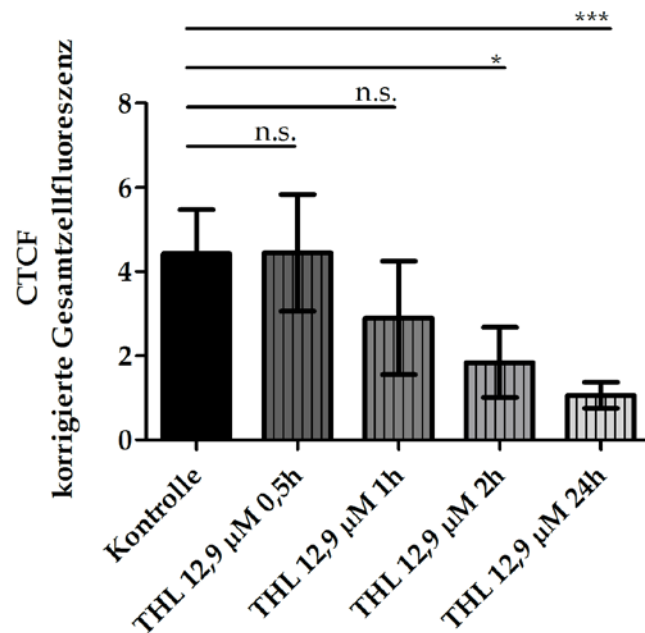
Die Dokumentation erfolgte am Axio Imager Z1/ApoTome (Zeiss).

(A) unbehandelte Trophozoiten (repräsentativ für alle durchgeführten Kontrollen), (B) Inkubation mit  $12,9 \mu\text{M}$  THL für 0,5 h, (C) Inkubation mit  $12,9 \mu\text{M}$  THL für 1 h, (D) Inkubation mit  $12,9 \mu\text{M}$  THL für 2 h, (E) Inkubation mit  $12,9 \mu\text{M}$  THL für 24 h.

Dargestellt ist die Aufnahme des BODIPY-markierten Phosphatidylcholin in WB C6-Trophozoiten. Eine vorherige Behandlung mit THL führt ab einer Inkubationszeit von mehr als einer Stunde zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität, verbunden mit einer sichtbar verminderten Integration.



Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität des BODIPY-Phosphatidylcholins unterstrich die visuellen Ergebnisse aus der mikroskopischen Analyse. Eine Inkubationszeit von einer halben bis einer Stunde ergab keinen signifikanten Unterschied in der Fluoreszenzintensität. Eine Inkubation von zwei Stunden hingegen führte zu einer deutlichen Abnahme des Signals, die sich nach 24 h zusätzlich verstärkte (Abb. 26).



**Abbildung 26: THL führt zu einem verminderten BODIPY-Phosphatidylcholin-Signal in WB C6-Trophozoiten**

Nach verschiedenen Inkubationszeiten (0,5 - 24 h) mit THL (12,9 µM) und anschließender Inkubation mit BODIPY-Phosphatidylcholin wurden die WB C6-Trophozoiten fixiert (vgl. 2.10.2.) Unbehandelte Trophozoiten dienten als Kontrolle.

Die Fluoreszenzintensität wurde unter Verwendung der Software ImageJ 1.47 bestimmt (vgl. 2.11.).

Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus jeweils 10 Einzelwerten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Dunn-Test als Post-hoc-Test. Als statistisch signifikant gelten \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , n.s. bedeutet nicht signifikant.

Dargestellt ist die Fluoreszenz des BODIPY-markierten Phosphatidylcholin, vorrangig lokalisiert in der Zellmembran, nach Inkubation mit THL (12,9 µM) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. THL führt zu einer signifikanten Verminderung der Intensität nach zwei Stunden.

Mit Hilfe der BODIPY-Phosphatidylcholin-Markierung konnte keine Blasenbildung der Zellmembran sichtbar gemacht werden. Allerdings zeigte sich, dass unter dem Einfluss von THL die Fluoreszenzintensität deutlich vermindert und die Integration von PC verändert

---

war. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass THL die Aufnahme von PC in die Zell- und Flagellenmembran beeinträchtigt.

## 4. Diskussion

Giardiasis ist eine der häufigsten intestinalen parasitären Erkrankungen weltweit und betrifft zumeist Kinder, insbesondere in Entwicklungsländern. Die jährliche Inzidenz liegt weltweit bei schätzungsweise 280 Millionen Menschen. Ihr Erreger, *G. duodenalis*, infiziert Menschen wie andere Säugetiere und stellt ein ernstes Gesundheitsproblem dar. Zwar gibt es einige wenige Therapiemöglichkeiten, allerdings kommt es zunehmend zu einem Therapieversagen. Die zugrunde liegenden Mechanismen für dieses Therapieversagen sind nicht vollständig geklärt und stehen wahrscheinlich mit einer Resistenzentwicklung des Parasiten selbst, aber auch einer schlechten Compliance der Patienten aufgrund der Vielzahl an UAW der Standardtherapeutika im Zusammenhang. Dementsprechend groß ist der Bedarf an besser wirksamen und verträglichen Arzneimitteln.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des anti-giardialen Potentials von THL, für das als zugelassenes Arzneimittel in der Therapie der Adipositas seine Unbedenklichkeit bereits in präklinischen und klinischen Studien nachgewiesen ist. Mehrere Faktoren haben diese Untersuchung angeregt. Zum einen konnte in vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass THL antiparasitäre Aktivität gegen einige Protozoen besitzt, zum anderen war es der Wirkmechanismus in der Behandlung der Adipositas selbst. THL entfaltet seine Wirksamkeit über die kovalente Bindung an das Serin im katalytischen Zentrum u.a. der Pankreaslipase. Das Serin liegt in dem hochkonservierten GXSXG-Motiv der Lipasen. *G. duodenalis* besitzt zwar einen limitierten Lipidstoffwechsel, allerdings gibt es Hinweise auf putative Lipasen und somit potentielle Targets für THL in den Genomen der derzeit vollständig sequenzierten *Giardia*-Isolate.

Im Zuge der Untersuchungen zur anti-giardialen Aktivität von THL sollte auch ein Einblick in den möglichen Wirkmechanismus von THL gewonnen werden.

### 4.1. Antigiardiale Aktivität der Wirksubstanzen

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass THL potente inhibitorische Effekte auf das *in vitro* Trophozoiten-Wachstum von *G. duodenalis* hat. Die Trophozoiten aller getesteten Assemblagen waren unter den Testbedingungen gegenüber THL sensitiv und die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte lagen im unteren mikromolaren Bereich (1,6-6,6 µM). Herauszustellen ist, dass THL gegenüber MTZ, dem Standardtherapeutikum in der Behandlung der Giardiasis, überwiegend eine signifikant effektivere Reduktion der Parasitenzahl bewirkt oder aber eine mit MTZ vergleichbare anti-giardiale Aktivität aufweist.

#### 4.1.1. Optimierung des Resazurin Assays

Um die anti-giardiale Aktivität von THL zu testen, wurde ein Viabilitätstest, der Resazurin Assay, herangezogen. Resazurin wird weitreichend in der Forschung eingesetzt und hat sich bereits bei der Bestimmung von Zellviabilität und Zytotoxizität von Substanzen bewährt (O'BRIEN *et al.*, 2000). Dabei wurde die metabolische Aktivität verschiedenster Zelllinien darunter Fibroblasten und Krebszellen (NAKAYAMA *et al.*, 1997) sowie primärer neuronaler Zellen (WHITE *et al.*, 1996), aber auch Mikroorganismen wie *M. tuberculosis* (MARTIN *et al.*, 2005) oder *H. pylori* (GAVRISH *et al.*, 2014) beurteilt. Darüber hinaus zeigten BENERE *et al.* (2007), dass sich Resazurin auch zur Bestimmung der Viabilität von *G. duodenalis* eignet. In der vorliegenden Arbeit wurde der Assay allerdings modifiziert, da sich über den von BENERE *et al.* (2007) vorgeschlagenen Inkubationszeitraum von 72 h kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der vitalen Trophozoitenzahl und dem Fluoreszenzsignal ergab. Wird davon ausgegangen, dass sich die Trophozoiten (Inokulum:  $5 \times 10^4$ ;  $100 \mu\text{m}^2$ ) im Durchschnitt alle 8 h teilen und die Durchführung des Assays in einer Mikrotiterplatte mit einer Wachstumsfläche von ca.  $32 \text{ mm}^2/\text{Well}$  stattfindet, erklärt sich, dass die Fläche nicht ausreicht, um eine Überwucherung zu vermeiden. Nach 36 h wäre die Wachstumsfläche bereits vollständig besetzt und die Kultur konfluent. Daher wurden für die Durchführung der Experimente in dieser Arbeit modifizierte Bedingungen mit einer kürzeren Inkubationszeit gewählt (siehe Abschnitt 2.8.).

Die Methodik zur Bestimmung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte ist generell bedeutsam. BENERE *et al.* (2011) ermittelten für MTZ gegenüber dem WB C6-Stamm einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $2,35 \mu\text{M}$ . Dieser ist fünf bis sechsfach kleiner als der in dieser Arbeit bestimmte  $\text{IC}_{50}$ -Wert ( $13,5 \mu\text{M}$ ). Im Gegensatz dazu konnten MÜLLER *et al.* (2007a) für den gleichen Klon einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $8,1 \mu\text{M}$  eruieren. Dabei wurde der  $\text{IC}_{50}$ -Wert über das Auszählen der vitalen Trophozoiten und Extrapolation mit Hilfe der Kontrolle ermittelt. So ergeben sich variierende  $\text{IC}_{50}$ -Werte für MTZ in Abhängigkeit der angewandten Methode aber auch des getesteten *Giardia*-Stamms. PEREZ-VILLANUEVA *et al.* (2013) beispielsweise verwendeten das *Giardia*-Isolat IMSS 0981 und ermittelten einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $1,2 \mu\text{M}$  (CRUZ *et al.*, 2003, PEREZ-VILLANUEVA *et al.*, 2013). Dazu nutzten sie ebenfalls die Methode über das Auszählen der vitalen Trophozoiten. Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte variieren nicht erheblich und liegen ausnahmslos im niedrigen mikromolaren Bereich. Dennoch sollte vor diesem Hintergrund die Methodenauswahl bei einer vergleichenden Studienanalyse berücksichtigt werden. Der modifizierte Resazurin Assay kam letztendlich in dieser Arbeit zum Einsatz, da er sowohl

einfach in der Handhabung sowie zeit- und kosteneffizient ist, als auch zuverlässige Ergebnisse lieferte.

#### 4.1.2. Antigiardiale Aktivität in Korrelation zur Assemblage

Vorausgegangene *in vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass *Giardia*-Isolate verschieden sensitiv auf die Behandlung mit anti-giardialen Wirkstoffen ansprechen (FARBAY *et al.*, 1995, ADAGU *et al.*, 2002). Dazu wurden Trophozoiten aus humanen Stuhlproben gewonnen und ihr Ansprechen auf MTZ oder andere anti-giardiale Wirkstoffe wie Nitazoxanid und Albendazol untersucht. Unabhängig von der verwendeten Methode (Adhärenz-Inhibition, [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Assay) ergab sich für die untersuchten Isolate eine hohe Variabilität in der Empfindlichkeit gegenüber MTZ, welche weniger ausgeprägt gegenüber den anderen Arzneistoffen auftrat. Zugleich zeigten ADAGU *et al.* (2002), dass diese Variabilität auch bei der Behandlung von *Entamoeba histolytica* und *Trichomonas vaginalis* zu verzeichnen war. Inwieweit dabei Resistenzmechanismen gegenüber MTZ eine Rolle spielen oder ein Zusammenhang mit dem Genotyp besteht, blieb allerdings unklar.

Demgegenüber ist in dieser Arbeit eine geringere Empfindlichkeit der Referenzstämme WB C6 und GS H7 sowie des Patientenisolats 103-01/C1 gegenüber MTZ im Vergleich zu den anderen frisch isolierten Patientenisolaten auffällig. WB C6- und 103-01/C1-Trophozoiten gehören zur Assemblage AI und weisen beide, mit einer Verdopplungszeit von ca. 7 h, eine höhere Wachstumsrate als alle anderen getesteten Assemblagen auf. Die Patientenisolate der Assemblage AII zeigen untereinander ebenfalls vergleichbare Wachstumskonstanten. Ihre Verdopplungszeiten liegen bei 9 bis 10 h. Der Referenzstamm der Assemblage B (GS H7) dagegen teilt sich auch alle 10 h und somit schneller als sein genotypisches Pendant unter den frisch isolierten Patientenisolaten (187-01/B1) mit einer Verdopplungszeit von 15,5 h. Allerdings sind GS H7-Trophozoiten bereits über Jahrzehnte an eine *in vitro* Kultivierung adaptiert, was eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen *in vitro* Wachstumsraten ist. Zudem zeigen Ergebnisse aus dem *Giardia*-Biobank-Projekt (Daten nicht gezeigt), dass die erfolgreiche Kultivierung von Trophozoiten der Assemblage B, welche aus Patienten isoliert wurden, generell schwieriger ist. Die Erfolgsrate beträgt lediglich 2% und kann die niedrigere Wachstumsrate begründen. Darüber hinaus weist Assemblage B eine hohe genetische Diversität auf, so dass es sich bei dem Referenzstamm GS H7 (BIV) und Patientenisolat 187-01/B1 sehr wahrscheinlich um verschiedene Subtypen handelt. Das Patientenisolat 187-01/B1 konnte mittels der hier durchgeführten Typisierung am Triosephosphatisomerase-Lokus nicht eindeutig einem

Subtypen zugeordnet werden, unterscheidet sich aber vom Referenzstamm GS H7 (BIV). Die Differenzierung der Assemblage B-Subtypen ist generell schwieriger und kann selbst bei einer Multilokus-Genotypisierung ( $\beta$ -Giardin, Glutamat-Dehydrogenase, Triosephosphat-Isomerase, rRNA-Gen) zu Schwierigkeiten bei der taxonomischen Zuordnung führen (CACCIO *et al.*, 2008, WIELINGA *et al.*, 2011). Die Ergebnisse aus dieser Arbeit bezüglich der Wachstumsraten entsprechen denen aus einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung (BENERE *et al.*, 2011). Dabei zeigen Trophozoiten der Assemblage AI ( $\sim 8,5$ - $10$  h) ein signifikant schnelleres *in vitro* Wachstum im Vergleich zu AII-Trophozoiten ( $\sim 12$ - $15$  h) und B-Trophozoiten ( $\sim 13$  h) ein langsames *in vitro* Wachstum als die der Assemblage AI. Zusammengenommen sprechen diese Daten für eine Abhängigkeit des *in vitro* Wachstumsverhalten der Trophozoiten vom Genotyp, wobei ein Einfluss der Kultivierungsbedingungen schlussendlich nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann (BINZ *et al.*, 1992).

Interessanterweise korreliert die Sensitivität von Assemblage AI- und AII-Trophozoiten gegenüber MTZ mit der Wachstumsrate. Diese wiederum scheint vom Genotyp abhängig zu sein. Die langsamer wachsenden Trophozoiten der Assemblage AII sprechen deutlich besser auf eine Behandlung mit MTZ ( $5,7$ - $6,4$   $\mu\text{M}$ ) an als die Trophozoiten der Assemblage AI ( $12,6$ - $13,5$   $\mu\text{M}$ ). Assemblage B liefert dahingehend keine eindeutigen Ergebnisse, was möglicherweise auf die bereits oben angesprochenen Gründe, wie der höheren genetischen Diversität, zurückzuführen ist. Die 187-01/B1-Trophozoiten haben zwar die kleinste Wachstumskonstante und die ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte für MTZ ( $4,8$   $\mu\text{M}$ ) sind deutlich kleiner als bei Trophozoiten der Assemblage AI, allerdings ergibt sich für den Referenzstamm der Assemblage B ein divergentes Bild. Hier zeigt sich ein mit den AII-Trophozoiten vergleichbares Wachstum, jedoch sind die Parasiten gegenüber MTZ signifikant weniger sensitiv ( $12,2$   $\mu\text{M}$ ). Für die Assemblage B Trophozoiten lässt sich demnach kein Zusammenhang zwischen dem Genotyp und der Sensitivität erkennen. Es bleibt festzuhalten, dass sich die Trophozoiten der B-Assemblage in dieser Arbeit untereinander sehr divergent verhalten. Sie weisen unterschiedliche Generationszeiten auf und ihre Empfindlichkeit gegenüber MTZ und THL korreliert nicht miteinander. Für die Subtypen der Assemblage A scheint eine Verbindung zwischen Genotyp und Sensitivität gegenüber MTZ allerdings naheliegend. CRUZ *et al.* (2003) untersuchten die *in vitro* Sensitivität von 18 humanen *Giardia*-Isolaten (aus Zysten gewonnene Trophozoiten) gegenüber MTZ und ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte zwischen  $2,38$   $\mu\text{M}$  und  $11,5$   $\mu\text{M}$ , was in Einklang mit den in dieser Arbeit generierten Werten steht. Auch wenn aufgrund der fehlenden Typisierung keine

eindeutige Assemblage-Zuordnung möglich ist, lässt sich auf der Basis der IC<sub>50</sub>-Werte eine Gruppierung (2,5-7,5 µM vs. 10-11,5 µM) erkennen, die eine Übereinstimmung mit den Assemblage A-Subtypen, AI und AII, widerspiegeln könnte. Die oben bereits angesprochene Studie der Arbeitsgruppe um BENERE *et al.* (2011) ergab konträre Ergebnisse in der Korrelation zwischen Genotyp und Sensitivität. Für die dort untersuchten Assemblagen AI, AII und E ließen sich keine und für A und B lediglich moderate Unterschiede in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Nitroimidazolen feststellen. Die Abweichungen zu den Ergebnissen in dieser Arbeit können allerdings in der eingangs diskutierten Problematik der verwendeten Methode liegen. Hervorzuheben ist, dass der hier beschriebene Zusammenhang zwischen Genotyp und Sensitivität in keinem Fall für die Behandlung mit THL zutrifft. Alle untersuchten Assemblagen sprechen vergleichbar und potent auf das Therapeutikum an (1,6-6,6 µM).

Inwieweit das *in vitro* Wachstumsverhalten und/oder der Genotyp mit der Empfindlichkeit gegenüber den Arzneistoffen zusammenhängen, bleibt demnach weiteren Untersuchungen vorbehalten. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einige Hinweise auf eine Korrelation, vor allem bezüglich der Assemblage AI und AII in der Behandlung mit MTZ. Ein Einfluss des Genotyps scheint bei dem Einsatz von THL aber keine Rolle zu spielen. Allerdings bedarf es eines größeren Studienkollektivs, das alle relevanten Assemblagen umfasst, um eindeutige Rückschlüsse auf einen Zusammenhang ziehen zu können.

Die von BENERE *et al.* (2011) aufgedeckten Unterschiede in der *in vitro* Sensitivität von Assemblage A und B konnten nicht im Mausmodell bestätigt werden. Dort ergab sich keine Assemblage-abhängige Korrelation zur Sensitivität. Inwieweit diese *in vitro* Daten daher einen Rückschluss auf die *in vivo* Situation am Menschen zulassen, und ob der Genotyp im Zusammenhang mit der variabel auftretenden Symptomatik steht, ist derzeit noch unklar. Untersuchungen im Mausmodell zeigen Assemblage-spezifische Unterschiede in der Pathogenität. Dabei stellten BENERE *et al.* (2012) fest, dass die Assemblagen AI und B infektiöser waren (höhere Trophozoitenbelastung über einen längeren Zeitraum) und das Darmepithel ausgeprägter schädigten (Kryptenhyperplasie) als Assemblage AII und E. Eine Vielzahl an Studien hat die Korrelation zwischen klinischen Symptomen und dem Genotyp untersucht. Dabei wurden deutliche Unterschiede mit mitunter kontroversen Ergebnissen aufgezeigt. READ *et al.* (2002) stellten fest, dass Kinder, die mit *G. duodenalis*-Trophozoiten der Assemblage A infiziert waren häufiger eine Symptomatik mit Diarrhö entwickelten als Kinder, die mit Trophozoiten der Assemblage B infiziert waren. Dementsprechend ermittelten HAQUE *et al.* (2005) in einer Fall-Kontroll-Studie an 322 Patienten aus

Bangladesch, wenngleich Assemblage B die höchste Prävalenz hatte, dass Patienten mit einer Assemblage AIII-Infektion eine höhere Wahrscheinlichkeit zeigten an einer Giardiasis mit Diarrhö zu erkranken. Im Gegensatz dazu dokumentierten GELANEW *et al.* (2007) in einer Studie mit 59 *Giardia*-Isolaten aus äthiopischen Patienten eine signifikante Korrelation zwischen der Manifestation der Giardiasis und der Infektion mit *G. duodenalis*-Trophozoiten der Assemblage B. HOMAN und MANK (2001) kamen zu ähnlichen Erkenntnissen. Dabei waren Infektionen mit Assemblage B-Trophozoiten mit persistierendem und Infektionen mit Assemblage A-Trophozoiten mit intermittierendem Durchfall assoziiert. KOHLI *et al.* (2008) wiederum konnten keine Korrelation hinsichtlich einer symptomatischen Giardiasis und einer Assemblage (A, B) finden. Die unterschiedlichen Beobachtungen der verschiedenen Studien können in der nicht erfassten genetischen Variabilität innerhalb der Assemblage B liegen. Es ist aber gleichermaßen denkbar, dass die Ausprägung und Entwicklung der Erkrankung von verschiedenen Wirtsfaktoren abhängig ist.

Bemerkenswert ist zudem, dass das in dieser Arbeit untersuchte Isolat 14-03/F7 aus einem Patienten stammt, der bereits erfolglos mit MTZ therapiert wurde, die Trophozoiten allerdings *in vitro* auf MTZ sensitiv reagieren. Fraglich ist, ob sich der Patient schlicht reinfizierte, eine schlechte Compliance aufwies und der Erreger daher nicht eradiziert wurde oder mit einem MTZ-resistenten Stamm infiziert war. MÜLLER *et al.* (2008) konnten in einer ihrer Studien zeigen, dass induzierte MTZ/Nitazoxanid-resistente WB C6-Trophozoiten nach erneuter En- und Exzystierung keine Resistenz mehr gegenüber MTZ zeigten. Das Expressionslevel für die an der Aktivierung von MTZ beteiligten Nitroreduktase beispielsweise war bei den resistenten Trophozoiten signifikant niedriger als beim Wildtyp und nach erfolgter En- und Exzystierung wieder auf dem Niveau des Wildtyps. Möglicherweise ist eine mit der Resistenz verbundene veränderte Genexpression nicht über die Enzystierung zu erhalten und daher nicht auf die nächste Generation übertragbar. Weshalb in diesem Fall auch besser von einer Toleranz als einer Resistenz gesprochen werden sollte. In einer Untersuchung von MCINTYRE *et al.* (1986) wurden 13 *Giardia*-Isolate aus dem Darmsaft von erkrankten Kindern isoliert und ihre *in vitro* Sensitivität gegenüber anti-giardialen Arzneistoffen analysiert, d.h. die Trophozoiten durchliefen vor ihrer Testung keine erneute En- und Exzystierung. Zwei dieser Isolate, charakterisiert durch die größten IC<sub>50</sub>-Werte für Furazolidon, verursachten in den entsprechenden Patienten persistierende Symptome und konnten nicht mit Hilfe von Furazolidon erfolgreich eradiziert werden. Sie zeigten dementsprechend resistentes Verhalten. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Isolate verwendet, die aus Zysten gewonnen wurden. Dies ist eine mögliche Erklärung für



die Sensitivität des Patientenisolates 14-03/F7 gegenüber MTZ, obwohl es aus einem gegenüber MTZ refraktären Patienten stammt.

Die *in vitro* Testungen zeigen deutlich, dass der anti-giardiale Effekt von MTZ gegenüber verschiedenen *Giardia*-Isolaten unterschiedlich ausgeprägt ist, eine Beobachtung, welche mit den Erkenntnissen aus der Literatur übereinstimmt. Den durchgeführten Studien (ausgenommen BENERE *et al.* (2011)) fehlt allerdings zumeist die genotypische Charakterisierung der untersuchten *Giardia*-Isolate, so dass bis dato noch unklar ist, inwieweit diese Unterschiede in der Sensitivität tatsächlich vom Genotyp abhängig sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen allerdings eine Korrelation zwischen Genotyp, Wachstum und Sensitivität gegenüber MTZ. Bemerkenswert ist, dass THL unabhängig vom Genotyp und der Generationszeit eine potente anti-giardiale Aktivität aufweist, was generell einen Vorteil gegenüber MTZ darstellt, da auch eine Assemblage-abhängige Manifestation der Symptomatik der Giardiasis nicht ausgeschlossen werden kann.

#### 4.2. Charakterisierung der anti-giardialen Aktivität von THL

Die Frage, ob ein Antiinfektivum abtötend oder wachstumshemmend wirkt, hängt entscheidend vom Wirkmechanismus, der Wirkstoffkonzentration und dem Erreger ab. Für den klinischen Einsatz ist dabei bedeutend, dass bei wachstumshemmenden Antiinfektiva das körpereigene Immunsystem die nach wie vor vorhandenen Erreger abtöten muss und nach frühzeitigem Absetzen der Arzneistoffe die Vermehrung der Erreger wieder einsetzt. Der Vorteil einer abtötenden Wirkung liegt in ihrem irreversiblen Charakter.

Für THL konnte für die in dieser Arbeit getesteten Assemblagen (WB C6 (AI): > 43  $\mu\text{M}$ , 14-03/F7 (AII): > 14  $\mu\text{M}$ ) eine giardiazide Wirkung nachgewiesen werden. Dabei war der Effekt allerdings zum Teil konzentrationsabhängig (WB C6). Inwieweit diese Auffälligkeit vom Genotyp abhängig ist, bedarf weiterer Untersuchungen mit einem deutlich größerem Testkollektiv. In einer *in vitro* Untersuchung zur Testung verschiedener Antibiotika gegen unterschiedliche Lyme-Genospezies (*Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia burgdorferi*) stellte sich allerdings auch heraus, dass in Abhängigkeit der Genospezies die minimale bakterizide Konzentration einiger Antibiotika signifikant variierte (SICKLINGER *et al.*, 2003). Letztendlich ist aber bedeutend, dass THL in ausreichend hohen Konzentrationen zu einer irreversiblen Schädigung des Parasiten führt und diese somit entscheidend bei der Ermittlung einer geeigneten Wirkstoffdosis wäre.

In den Untersuchungen zum anti-giardialen Potential von THL fiel auf, dass steigende Konzentrationen an THL zu einem vermehrten Ablösen der Trophozoiten führen. Das Zytoskelett von *G. duodenalis*, insbesondere die Ventralscheibe, ist entscheidend an der Anheftung der Trophozoiten an das Darmepithel des Wirtes oder sonstiger Oberflächen beteiligt und besteht zu einem großen Teil aus Tubulinen ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin). In verschiedenen Studien wurde beschrieben, dass sowohl stabilisierende (Paclitaxel) (SAGOLLA *et al.*, 2006, DAWSON *et al.*, 2007) als auch depolymerisierende (Colchicin, Nocodazol) (KATELARIS *et al.*, 1995, SOUSA *et al.*, 2001, MARIANTE *et al.*, 2005) Mikrotubuli-Inhibitoren Auswirkungen auf die Mikrotubuli-Strukturen haben und im Zuge dessen eine reduzierte Adhärenz bewirken. Zugleich zeigten MARIANTE *et al.* (2005), dass Nocodazol (10  $\mu$ M) sowohl zur Missbildung der Trophozoiten mit einer unregelmäßigen, blasenbildenden Oberfläche und zu einer abweichenden Flagellenanzahl, als auch zur Fragmentierung der Ventralscheibe und zu einer verstärkten Vakuolenbildung führt. Colchicin bewirkt diese Veränderungen auch, allerdings sind dafür höhere Wirkstoffkonzentrationen (>100  $\mu$ M) nötig. Zu den gleichen Ergebnissen kamen schon CHAVEZ *et al.* (1992), die andere Benzimidazole (Albendazol, Mebendazol) auf ihre Wirkung gegenüber *G. duodenalis* untersuchten. Unter THL-Behandlung wurde keine Beeinträchtigung des Zytoskeletts festgestellt. Sowohl die ventrale Haftscheibe, als auch die Axonema mit der typischen  $9 \times 2 + 2$ -Struktur blieben unbeeinträchtigt. Der in der Diff-Quik®-Färbung schwächer bis gar nicht angefärbte Mediankörper zeigte in den TEM-Analysen keine Veränderungen, konnte aus schnitttechnischen Gründen jedoch nicht abschließend beurteilt werden. Allerdings ist das Vorhandensein des Mediankörpers während des gesamten Zellzyklus in Fachkreisen umstritten. PIVA and BENCHIMOL (2004) haben den Mediankörper in jeder Phase nachweisen können. Andere Forschergruppen postulieren, dass er nach der Mitose verschwindet (DAWSON, 2010). Die Ergebnisse aus der Immunfluoreszenzfärbung gegen alpha( $\alpha$ )-Tubulin, in der die Mediankörper sehr gut detektierbar waren, bestätigen aber, dass die Mediankörper unter THL unbeeinflusst blieben. Nach einer Behandlung mit Nocodazol hingegen kann die Immunfluoreszenzfärbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen alpha( $\alpha$ )-Tubulin (TAT-1-AK) entweder fragmentierte Mikrotubuli-Strukturen detektieren oder ist diffus im Zytoplasma verteilt. Mediankörper sind nicht mehr nachweisbar und Flagellen nur bedingt (MARIANTE *et al.*, 2005). Genauso zeigen sich für THL keine Effekte, die beispielsweise stabilisierende Mikrotubuli-Inhibitoren wie Paclitaxel verursachen. Paclitaxel führt zu einer signifikanten Verlängerung der Flagellen (DAWSON *et al.*, 2007), während THL keinen Einfluss auf die Flagellenlänge hat (siehe Abschnitt 3.2.2.).

Die TEM- und REM-Analysen in dieser Arbeit zeigen allerdings deutlich eine erhebliche Beeinträchtigung der Morphologie von *G. duodenalis* unter THL- sowie MTZ-Einwirkung. THL verursacht dabei eine außergewöhnlich starke Blasenbildung, insbesondere an der dorsalen Oberfläche und den Flagellen sowie lamellare Einschlüsse und Zellausstülpungen. Die Zellmembran ist somit ein denkbare Target von THL. Aus verschiedenen Arbeiten (BLAIR and WELLER, 1987, STEVENS *et al.*, 1997, GIBSON *et al.*, 1999) kann geschlossen werden, dass die Zellmembran von *G. duodenalis* aus exogen aufgenommenen Lipiden, Fettsäuren und Sterolen, die als Vorstufen dienen, gebildet wird. So ergab die Analyse der Lipidzusammensetzung von *G. duodenalis* u. a. deutliche Unterschiede im Vergleich zum *Giardia*-Kulturmedium. Mit Hilfe von GC-MS-Untersuchungen zeigte YICHOY (2009), dass *Giardia*-Trophozoiten Phosphatidylglycerine (PG), Phosphatidylethanolamine (PE) und Phosphatidylcholine (PC) aufweisen, obwohl das Medium frei von PG und PE war und lediglich PC enthielt. PG und PE müssen somit aus PC als Vorstufe synthetisiert worden sein. An solchen Modifikationen sind u. a. Lipasen beteiligt, die Lysophospholipide und freie Fettsäuren generieren (ROCHA *et al.*, 2014).

Inwieweit daher eine Inhibition von putativen *Giardia*-Lipasen durch THL an den drastischen morphologischen Veränderungen involviert ist, sollte in dieser Arbeit geklärt werden. VARGAS-VILLARREAL *et al.* (2007) konnten bereits Phospholipase-Aktivität in *Giardia*-Trophozoiten nachweisen, die hier bestätigt werden konnte. *Giardia*-Trophozoiten sind zur Hydrolyse von Phospholipiden befähigt, allerdings nicht in der Lage Triglyceride zu spalten (siehe Abschnitt 3.3.1.). Phospholipasen kommen neben dem Recyclen von Membran-Phospholipiden weitere biologische Bedeutungen zu. So dienen sie u. a. der Freisetzung von Arachidonsäure als biogenetische Vorstufe von Prostaglandinen, Thromboxanen und Leukotrienen (VAN DEN BOSCH, 1980), aber auch der Lyse von Membranen, seien sie eukaryotischen (Phospholipase A<sub>2</sub> im Gift von Bienen oder Schlangen) oder bakteriellen Ursprungs (Phospholipase C konnte aus *Clostridium perfringens* und *Bacillus cereus* isoliert werden) (TITBALL, 1993). In anderen Parasiten wie *Trypanosoma brucei* ist die Phospholipase A<sub>2</sub> an Wirt-Parasit-Interaktionen beteiligt, in dem sie die Freisetzung von Arachidonsäure katalysiert und damit die Bildung von Eicosanoiden reguliert (EINTRACHT *et al.*, 1998). Die in *Trypanosoma cruzi* vorkommende Phospholipase A<sub>1</sub> hydrolysiert Phospholipide der Wirtszellmembran und ist so in Veränderungen des Lipidprofils der Wirtszellen vor Beginn des Parasitenbefalls involviert (BELAUNZARAN *et al.*, 2011). Eine zytopathogene Wirkung von *G. duodenalis* wird in Fachkreisen kontrovers diskutiert. Einige Forschergruppen beobachteten lediglich eine oberflächliche Beeinträchtigung, andere schwere Läsionen des intestinalen Epithels (TROEGER *et al.*, 2007).

Bisher konnte für *G. duodenalis* kein Virulenzfaktor identifiziert oder isoliert werden. Möglicherweise verwendet *G. duodenalis* seine Phospholipase-Aktivität zur Zellschädigung, so wie andere parasitäre Protozoen. *Mykobakterium tuberculosis* besitzt ebenfalls Phospholipase A-Aktivität, die durch THL vollständig inhibiert werden kann. Es konnte auch gezeigt werden, dass THL das Wachstum von *M. tuberculosis* inhibiert und dabei durch die verminderte Bildung der für die Stabilität der Zellwand essentiellen Mykolsäuren zu Zellwanddefekten führt. Das primäre Target von THL konnte bisher aber nicht identifiziert werden. Nachweislich inhibiert THL allerdings das rekombinant hergestellte Rv3802-Protein aus *M. tuberculosis* mit Phospholipase- und Thioesterase-Aktivität sowie die mykobakterielle ES-31 Serinprotease, ebenfalls mit Phospholipase-Aktivität (PARKER *et al.*, 2009, WANKHADE *et al.*, 2012).

Die in dieser Arbeit nachgewiesene giardiale Phospholipase A<sub>1</sub>-Aktivität vermag THL *in vitro* nicht zu inhibieren. Es ist fraglich, ob eine Enzymhemmung *in vivo* zum Tragen kommt, so dass dieses Enzym daher nicht als Target von THL angesehen werden kann. Dennoch wäre es interessant in weiterführenden Untersuchungen dieses Enzym zu isolieren und zu charakterisieren, um dessen Bedeutung im giardialen Lipidstoffwechsel und für die Pathogenität von *G. duodenalis* zu klären.

Die Forschergruppe um YICHOY (2009) postuliert, dass *G. duodenalis* für PE und PC spezifische Flippase-ähnliche Transporter in der Zellmembran besitzt und so deren Aufnahme reguliert. Flippasen sind Phospholipidtranslokatoren, die Phospholipide von der extrazellulären zur zytosolischen Seite verschieben und somit an der Aufrechterhaltung der asymmetrischen Phospholipidverteilung in der Zellmembran beteiligt sind. Sie besitzen Sulfhydrylgruppen als Teil der Aminosäure Cystein, die mit Hilfe von N-Ethylmaleinimid (NEM) inhibiert werden können. Unter dem Einfluss von NEM zeigten sich deutliche Veränderungen in der Lipidverteilung. Die verwendete Nilrot-Färbung ließ eine verminderte Lokalisierung der Lipide in der perinukleären Membran erkennen und die Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem PC war drastisch verringert. Interessanterweise wurden diese Beobachtungen auch in der vorliegenden Arbeit unter Behandlung der Trophozoiten mit THL gemacht. THL führte zur Abnahme des Nilrot-Fluoreszenzsignals, insbesondere in den Regionen um die Zellkerne. Darüber hinaus beeinträchtigte THL die Inkorporation des in dieser Arbeit verwendeten PC signifikant (siehe Abschnitt 3.3.2.1. und 3.3.2.2.). Diese Ergebnisse unterstreichen die Hypothese, dass THL über eine Beeinflussung des Lipidstoffwechsels anti-giardial wirksam ist und eröffnen Spekulationen über Flippasen als potentielles Target von THL. Perspektivisch wäre es somit von großer Bedeutung

Flippasen zu isolieren, um sie strukturell und funktionell zu charakterisieren und eine mögliche Interaktion mit THL zu untersuchen.

Die eingangs beschriebenen abnormalen Strukturen der Zellmembran von *G. duodenalis*, die lamellaren Einschlüsse im Zytoplasma sowie die Extraktion des selbigen nach THL-Behandlung können ebenfalls Anzeichen eines programmierten Zelltodes sein, sprich in Folge der Behandlung zu einem selbstgesteuerten Untergang des Parasiten führen. Der Begriff „programmierter Zelltod“ umfasst und beschreibt verschiedene Formen des gerichteten Zelltodes, darunter Apoptose und Autophagie, die sich auch morphologisch abgrenzen lassen. Während sich autophagosomaler Zelltod in einer erheblichen Vakuolisierung durch exzessive Eigenverdauung oder Degradation essentieller Zellbestandteile zeigt, ist Apoptose durch Veränderungen der Zellmembran („membrane blebbing“, Externalisierung von Phosphatidylserin) und Fragmentierung charakterisiert. Programmierter Zelltod konnte bereits in anderen einzelligen Eukaryoten wie Trypanosomen, Plasmodien oder Trichomonaden beobachtet werden. Dabei wurden charakteristische apoptotische Veränderungen, wie DNA-Fragmentierung, Externalisierung von Phosphatidylserin, Blasenbildung an der Zellmembran, Vakuolisierung und Caspase-Aktivität verzeichnet. Die exakten molekularen Mechanismen, die zum Ablauf des programmierten Zelltodes bei diesen Organismen führen, sind allerdings nicht bekannt (DEPONTE, 2008). Für *G. duodenalis* wurden Charakteristika des programmierten Zelltodes als Reaktion auf verschiedene Stimuli, wie oxidativer Stress ( $H_2O_2$ ) oder Entzug von Wachstumsfaktoren (Minimalmedium), beschrieben, die auf zwei verschiedene Formen des programmierten Zelltodes deuten, apoptose-ähnliche Mechanismen und Autophagie. So zeigten sich apoptose-ähnliche morphologische Veränderungen, wie Kernkondensation, Zellausstülpungen und Fragmentierung der Ventralscheibe, mit Hilfe der TUNEL-Methode DNA-Fragmentierung und zumindest unter Einwirkung von  $H_2O_2$  die typische Annexin-V-Propidiumiodid-Färbung. Allerdings konnten weder in biochemischen Untersuchungen Caspase-Aktivität in *G. duodenalis* detektiert, noch Hinweise im *Giardia*-Genom auf Gene gefunden werden, die an der Apoptose beteiligt sind (Caspasen, AIF, Fas). Demgegenüber wurden Schlüssel-Gene identifiziert, die mit Autophagie im Zusammenhang stehen (mTOR, ATG8). Zudem wiesen *Giardia*-Trophozoiten, die für mindestens 12 Stunden ausschließlich in PBS kultiviert wurden, ein punktiertes Färbeprofil nach Behandlung mit dem autophagosomen-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Monodansylcadaverin auf, welches nach Vorinkubation mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin nicht zu verzeichnen war (BAGCHI *et al.*, 2012). In einer Reihe von Studien zur

Untersuchung anti-giardial wirksamer Substanzen und Extrakte (u.a. Miltefosin und *Syzygium aromaticum*) werden deren morphologische Effekte, wie Vakuolisierung, das Auftreten von multilamellaren Einschlüssen und eine starke Blasenbildung an der Trophozoitenmembran mit apoptotischen und/oder autophagosomalen Prozessen assoziiert (CORREA *et al.*, 2009, MACHADO *et al.*, 2011, EISSA and AMER, 2012).

#### 4.2.1. THL in Kombination mit MTZ

Im Zuge der Untersuchung von THL hinsichtlich seiner anti-giardialen Aktivität wurde zudem geprüft, ob die Kombination mit dem Standardtherapeutikum MTZ therapeutisch von Vorteil sein kann. Bei einer Kombinationstherapie wird die Erhöhung der Wirksamkeit der Arzneistoffe unter Reduktion der UAW ausgenutzt. Gleichzeitig kann durch den Einsatz von kombinierten Arzneistoffen, die ihre Wirkung durch unterschiedliche Mechanismen entfalten, einer Resistenzentwicklung entgegen gewirkt werden. In der Behandlung von Infektionskrankheiten wie HIV oder Tuberkulose werden daher seit Jahrzehnten ausschließlich Arzneistoffkombinationen eingesetzt (RKI, 2014 [http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_HIV\\_AIDS](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HIV_AIDS), 2014 [http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Tuberkulose](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tuberkulose)).

Vor dem Hintergrund, dass *G. duodenalis in vitro* schnell Resistenzen gegen die eingesetzten Wirkstoffe entwickeln kann (MÜLLER *et al.*, 2007a, STERK *et al.*, 2007), resistente Isolate bereits aus Patienten isoliert wurden (UPCROFT and UPCROFT, 2001) und der Einsatz einer Kombinationstherapie bei Patienten, die zuvor refraktär gegenüber einer Monotherapie waren, Erfolge in der Eradikation des Parasiten erzielte (TAYLOR *et al.*, 1987, NASH *et al.*, 2001, LOPEZ-VELEZ *et al.*, 2010), wurde für THL und MTZ der Kombinationsindex (CI) nach Chou und Talalay *in vitro* bestimmt. SMITH *et al.* (1982) konnten schon 1982 zeigen, dass eine Kombination von MTZ und Quinacrin effektiver das Trophozoitenwachstum *in vitro* inhibiert als einer der beiden Arzneistoffe einzeln. Diese Kombination, aus MTZ und Quinacrin, konnte 1985 letztendlich einen Patienten erfolgreich therapieren, der zuvor fünfmal mit MTZ und einmal mit Quinacrin in der Monotherapie erfolglos behandelt wurde (TAYLOR *et al.*, 1987). Mit Hilfe des CI kann die Interaktion von Arzneistoffen charakterisiert werden. Durch die kombinierte Verwendung von Arzneistoffen kann es zu additiven, synergistischen oder antagonistischen Effekten kommen. Dabei ist Synergie definiert als eine Kombinationswirkung, die größer ist, als die aufgrund der Dosis-Effekt-Wirkungen der Einzelsubstanzen zu erwartenden Wirkung. Eine Kombination, die weniger effektiv ist, als zu erwarten lässt, verhält sich antagonistisch, während von Additivität gesprochen wird,

wenn weder Synergie noch Antagonismus vorliegen (CHOU, 2006). Von Nutzen ist eine Kombination, wenn sie zu additiven oder synergistischen Effekten führt. Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse zum CI wurde für die Kombination MTZ und THL an zwei Genotypen untersucht. Zum einen an dem langjährig an Kulturbedingungen adaptierten Referenzstamm WB C6 (Assemblage AI), zum anderen an dem Patientenisolat 14-03/F7 (Assemblage AII). Ab einer Wachstumshemmung der Trophozoiten von über 50% ließen sich mit der Kombination aus MTZ und THL für beide getesteten Isolate additive Effekte unter *in vitro* Bedingungen erzielen. Dabei war der Genotyp irrelevant. Allerdings empfiehlt sich nach den vorliegenden Ergebnissen für die Durchführung von *in vivo* Versuchen der Einsatz eines der Kombinationspartner im Überschuss, da so generell kleinere CI-Werte mit kleineren Standardabweichungen erreicht wurden, die für ein präziseres Ergebnis sprechen (siehe Abschnitt 3.1.3.). Insgesamt lässt sich festhalten, dass für die Kombinationen aus MTZ und THL *in vitro* additive Effekte festgestellt wurden, was im Hinblick auf die Durchführung klinischer Studien ganz klar von Vorteil ist. Beispielsweise wurden mit Hilfe von *in vitro* Untersuchungen zum CI von Carboplatin und Paclitaxel für verschiedene humane Brustkrebszelllinien (MDA MB-231, SK-BR-3) additive Effekte festgestellt, die letztendlich Anstoß zur Prüfung im klinischen Rahmen gaben (KONECNY *et al.*, 2001). In einer klinischen Phase III Studie an 196 Frauen mit HER-2-positiven und metastasierenden Brustkrebs verbesserte die Zugabe von Carboplatin zu Paclitaxel und Trastuzumab die mittlere progressionsfreie Überlebenszeit (10,7 vs. 7,1 Monate) (ROBERT *et al.*, 2006). Die in dieser Arbeit ermittelten additiven Effekte von MTZ und THL auf die Wachstumshemmung von *G. duodenalis* bieten diesbezüglich einen soliden Ansatz, um die Durchführung klinischer Studien in Betracht zu ziehen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass THL das Wachstum, die Viabilität, Adhärenz und Morphologie des Parasiten erheblich beeinflusst, und dass THL und MTZ ihre anti-giardiale Aktivität in jedem Fall über verschiedene Wirkmechanismen entfalten. Die dokumentierten Unterschiede in den visuellen morphologischen Veränderungen und die ermittelten additiven Effekte der beiden Arzneistoffe, d.h. über unabhängige Mechanismen ohne negative Interaktionen, unterstreichen diese Aussage.

### 4.3. Ausblick und Fazit

Die Suche nach innovativen Therapeutika unter bereits am Menschen zugelassenen Arzneimitteln für neue Indikationen ist sehr vielversprechend und kann den Weg von einer aussichtsreichen Wirksubstanz über präklinische und klinische Studien zum zugelassenen Arzneimittel erheblich beschleunigen. Zudem können dadurch die Kosten in der Entwicklung gesenkt und die Sicherheit für den Patienten gesteigert werden, wenn in präklinischen Prüfungen die Unbedenklichkeit bereits nachgewiesen wurde und in Beobachtungsstudien Sicherheit und Verträglichkeit weiter geprüft werden (ASHBURN and THOR, 2004). In der Therapie der caninen Leishmaniose beispielweise wird u.a. Allopurinol, zugelassen für die Behandlung der Hyperurikämie beim Menschen, angewendet (MIRO *et al.*, 2009). Dieser *Modus Operandi* ist besonders im Hinblick auf vernachlässigte Krankheiten, wie auch der Giardiasis, bedeutend.

Für THL wurde, als zugelassenes Arzneimittel, die Wirksamkeit bei der Behandlung der Adipositas, aber auch dessen Unbedenklichkeit bereits in zahlreichen Studien (u.a. fünf 2-Jahresstudien, eine 4-Jahresstudie) belegt (siehe Abschnitt 1.6.). Zudem haben Untersuchungen bei normal- und übergewichtigen Probanden gezeigt, dass das Ausmaß der Resorption von THL bei oraler Gabe therapeutischer Dosen minimal ist (Plasmakonzentration  $< 5$  ng/mL nach 8 h) und der nicht resorbierte Wirkstoff größtenteils (97%) fäkal ausgeschieden wird, 83% davon als unverändertes THL. Für die Therapie der Giardiasis wäre diese *in situ* Bioverfügbarkeit von THL ein großer Vorteil, um ausreichend hohe Konzentrationen des Wirkstoffs am Ort der Infektion zu gewährleisten. Unter der groben Annahme, dass der menschliche Dünndarm 10 L Fassungsvermögen und Umsatz pro Tag aufweist und  $3 \times 120$  mg THL als Tagesdosis (empfohlene Dosis) vorausgesetzt werden, liegt die berechnete Wirkstoffkonzentration vor Ort bei ca.  $72 \mu\text{M}$  und somit 17fach höher als der in dieser Arbeit ermittelte  $\text{IC}_{50}$  für THL. Daher könnte das für THL geltende und erprobte Dosierungsschema bei der Behandlung der Adipositas geeignet sein, um Wirkstoffspiegel zu erreichen, die giardiazid sind. THL ist in der Regel gut verträglich und die UAW bei oraler Gabe beschränken sich zum Großteil auf den GI-Trakt. Darüber hinaus sind selbst bei Überdosierungen mit THL ( $3 \times \text{tgl. } 400\text{mg}$  über 15 Tage;  $3 \times \text{tgl. } 240$  mg über 6 Monate) keine signifikanten UAW's aufgetreten (MCCLENDON *et al.*, 2009). Obwohl THL kaum systemisch resorbiert wird, sollte eine Anwendung von THL bei Patienten mit bereits bestehender Medikation oder schweren Vorerkrankungen, wie bei jeder anderen Arzneimitteltherapie, unter strenger Nutzen-Risiko-Bewertung angewandt werden. Es ist hinreichend bekannt, dass lipophile Arzneimittel wie Levothyroxin, Efavirenz oder das



Immunsuppressivum Ciclosporin bei Komedikation mit THL zusammen mit nicht resorbierbaren Lipiden ausgeschieden werden und somit deren Bioverfügbarkeit vermindert wird (FILIPPATOS *et al.*, 2008, KENT, 2012). Nach einer *in vitro* Untersuchung von XIAO *et al.* (2013) zum inhibitorischen Effekt von THL auf Carboxylesterasen (CES) steht THL außerdem im Verdacht über die Hemmung dieser Enzyme, die an der Hydrolyse von Arzneistoffen und deren Prodrugs in der Leber beteiligt sind, Interaktionen mit weiteren Arzneimitteln, wie dem Zytostatikum Irinotecan, hervorzurufen. Inwieweit diese *in vitro* Hemmung aber auch klinische Konsequenzen hat, ist derzeit noch völlig unklar.

Ungeachtet dessen wurde in dieser Arbeit THL als geeigneter Kandidat für den Einsatz bei einer Infektion mit *G. duodenalis* identifiziert. THL hat auf die krankheitsgebende Form, die *Giardia*-Trophoziten, einen zytotoxischen Effekt und wirkt zudem additiv im Zusammenspiel mit dem Standardtherapeutikum MTZ.

Möglicherweise existiert nicht nur ein einzelner, sondern ein vielschichtiger Mechanismus, der für die anti-giardialen Effekte verantwortlich ist und weitere umfassende Untersuchungen erforderlich macht.

Dennoch sprechen die in dieser Arbeit erstmalig zusammengetragenen Ergebnisse zur *in vitro* Wirksamkeit von THL gegenüber *G. duodenalis* für die Durchführung kontrollierter klinischer Studien, um den Nutzen von THL in der Behandlung der Giardiasis, insbesondere bei MTZ-refraktären Infektionen, an Mensch und Tier beurteilen zu können.

## 5. Zusammenfassung

Giardiasis ist eine durch den Endoparasiten *Giardia duodenalis* (*G. duodenalis*) verursachte Infektionskrankheit des gastrointestinalen Trakts, die sowohl asymptomatisch als auch symptomatisch verläuft und sich unbehandelt in chronischen oder rezidivierenden Infektionen manifestieren kann. Die Therapie erfolgt vorwiegend mit dem Nitroimidazol Metronidazol (MTZ). Ein hohe Rate an Therapieversagern und die weltweite Verbreitung der Erkrankung reflektieren die Notwendigkeit für alternative Behandlungsmöglichkeiten. Umso wichtiger ist es innovative und sichere Substanzen zu erschließen, die eine effektive Bekämpfung des Parasiten gewährleisten.

Tetrahydrolipstatin (THL) ist das gesättigte Derivat von Lipstatin, einem natürlich vorkommenden Lipasehemmer aus *Streptomyces toxytricini*. Aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung auf gastrointestinale Lipasen findet THL eine weitverbreitete Anwendung in der Therapie der Adipositas und gilt als sicheres und nebenwirkungsarmes Arzneimittel.

Die Evaluierung der anti-giardialen Aktivität von THL war vor allem deshalb von großem Interesse, weil THL in einigen Untersuchungen bereits wachstumshemmende Effekte auf einzellige parasitäre Organismen zeigte und aufgrund seiner Pharmakokinetik den Vorteil einer *in situ* Bioverfügbarkeit mit sich bringt.

In dieser Arbeit wurde das anti-giardiale Potential von THL gegenüber der sich replizierenden Form von *G. duodenalis*, den Trophozoiten, *in vitro* untersucht. *G. duodenalis* weist eine hohe genetische Vielfalt auf und wird in verschiedene Assemblagen gruppiert, von denen zwei, Assemblage A und B, humanpathogen sind. Daher wurden sowohl Patientenisolat, als auch Referenzstämme dieser Assemblagen in die Beurteilung miteinbezogen. Mit Hilfe des Resazurin Assays konnten die anti-giardialen Aktivitäten von THL und MTZ vergleichend bewertet werden. THL zeigte dabei eine potente und konzentrationsabhängige Inhibition der Trophozoitenreplikation, die unabhängig vom Genotyp beobachtet wurde und überwiegend effektiver war als die durch MTZ erzielte. Demgegenüber weisen die Ergebnisse dieser Arbeit auf einen Zusammenhang zwischen der Sensitivität gegenüber MTZ und dem Genotyp der Trophozoiten hin. THL führte *in vitro* zu einer irreversiblen Schädigung der Trophozoiten, die sich u.a. in einer erheblichen Beeinträchtigung der Morphologie äußerte. Während mit zunehmender THL-Konzentration keine Veränderungen am Mikrotubuli-System festgestellt werden konnten, zeigten Flagellen und dorsale Oberfläche in transmissions- und rasterelektronenmikroskopischen Analysen eine außergewöhnlich starke Blasenbildung. Zudem dokumentierte die für Lipide selektive Nilrotfärbung eine verminderte Lokalisierung der Lipide in der perinukleären Membran der

Trophozoiten durch THL. Um zu überprüfen, ob THL einen Einfluss auf die Inkorporation von bevorzugt in der Zellmembran und Membran der Flagellen vorkommenden Phosphatidylcholine hat, wurde ein fluoreszenzmarkiertes Analogon eingesetzt. THL führte zu einer signifikant verringerten Aufnahme dieses Phosphatidylcholins. Diese Effekte deuten darauf hin, dass THL über eine Einflussnahme auf den Lipidstoffwechsel anti-giardial wirksam ist.

Auf der Suche nach möglichen Mechanismen für die beobachteten toxischen Effekte von THL auf die Trophozoiten war die Untersuchung hinsichtlich einer Lipase-Aktivität und deren Inhibition durch THL ein weiterer Ansatz, da es u.a. Hinweise auf putative Lipasen in den Genomen der derzeit vollständig sequenzierten *Giardia*-Isolate gibt. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass *Giardia*-Trophozoiten die Fähigkeit zur Hydrolyse von Phospholipiden besitzt. Allerdings war eine Inhibition durch THL *in vitro* nicht zu verzeichnen.

Im Hinblick auf den erfolgsversprechenden Einsatz von Arzneimittelkombinationen und der zunehmenden Anzahl an Therapieversagern bei der Behandlung der Giardiasis wurde unter Verwendung der Kombinationsindex-Methode nach CHOU and TALALAY (1984) die Interaktion von THL und MTZ charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass diese Kombination *in vitro* additive Effekte bewirkt.

In dieser Arbeit konnte erstmals dargelegt werden, dass THL potent und effektiv das Wachstum verschiedener *Giardia*-Trophozoiten inhibiert und, erstaunlicherweise, der Wirkung von MTZ überlegen war. Diese positiven Effekte sprechen für die Durchführung tierexperimenteller und klinischer Studien, um den therapeutische Nutzen von THL bei der Behandlung der Giardiasis aufzuzeigen.

## 6. Summary

Giardiasis is a prevalent gastrointestinal infection caused by the protozoan parasite *Giardia duodenalis* (*G. duodenalis*). In humans, giardiasis can be either asymptomatic or symptomatic, commonly with manifestations in chronic or relapsing infections if left untreated. The therapy is predominantly based on the treatment with the nitroimidazole metronidazole (MTZ). However, a high rate of treatment failure and the fact that giardiasis is one of the most common parasitic infections of the human intestinal tract worldwide reflect the urgent need for alternative treatment options. Therefore it is important to develop innovative and safe drug candidates to ensure the effective defeat of this parasite.

Tetrahydrolipstatin (THL) is the saturated derivative of lipstatin, a naturally occurring lipase inhibitor isolated from *Streptomyces toxytricini*. Due to its inhibitory effect on gastrointestinal lipases THL has been evaluated in clinical trials in obesity, is currently widely used as a medication in the treatment of obesity and is considered safe, with few side effects.

The evaluation of the anti-giardial activity of THL was of particularly high interest following some previous reports on its growth inhibiting effects on several protozoan parasites and its pharmacokinetic properties associated with favourable *in situ* bioavailability.

In this study the anti-giardial potential of THL against the trophozoites, the proliferating stage of *G. duodenalis*, was examined under *in vitro* conditions. *G. duodenalis* shows a high genetic variability and is grouped into different assemblages, of which two (the assemblages A and B) are pathogenic to humans. For this reason, isolates of patients as well as reference strains of these assemblages were considered in this study. The anti-giardial activities of THL and MTZ were compared using the resazurin assay. THL showed a potent and concentration dependent inhibition of the trophozoites' replication. This effect was independent of the genotype and was shown to be more effective compared with that of MTZ. In addition, a correlation between the genotype of the trophozoites and their sensitivity to MTZ was clearly demonstrated. THL produced an irreversible damage to the trophozoites under the experimental conditions, evident from dramatic effects on their morphology. While increasing THL concentrations did not alter the microtubule system, flagella and dorsal surfaces showed extraordinary high membrane blebbing in transmission and scanning electron microscopy analyses. Furthermore, the selective staining of lipids by Nile red revealed a reduced accumulation of lipids in the perinuclear membrane of the trophozoites in the presence of THL. To verify whether THL affected the incorporation of phosphatidylcholines, which are primarily found in the cell membrane and membrane of the flagella, a fluorescently labelled analogue was used, demonstrating that THL significantly

---

reduced the uptake of this phosphatidylcholine. These findings suggest that the anti-giardial effects of THL are closely related to an influence on the lipid metabolism.

Since there is strong evidence for the presence of putative lipases in the genomes of fully sequenced *Giardia* isolates, the examination of the activity of lipases and the inhibition of these enzymes by THL appeared reasonable. The results confirmed that *Giardia* trophozoites possess the capability to hydrolyse phospholipids. However, THL apparently failed to inhibit the activity of these enzymes under the *in vitro* conditions.

With regard to reported promising applications of combining drugs and the increasing number of treatment failure in the therapy of giardiasis, the interaction of the combination of THL and MTZ was evaluated using the combination index method according to CHOU and TALALAY (1984). Interestingly, the results provided evidence for additive effects of this drug combination *in vitro*.

In conclusion, this study showed for the first time that THL effectively inhibits the growth of different *Giardia* trophozoites and, most notably, is superior MTZ. The demonstrated beneficial effects warrant experimental animal and clinical studies of THL, approved as a medication in obesity, to also establish its therapeutic application in the treatment of the neglected disease giardiasis.

## 7. Literaturverzeichnis

- ABBOUD P, LEMEE V, GARGALA G, BRASSEUR P, BALLEST JJ, BORSA-LEBAS F, CARON F & FAVENNEC L 2001. Successful treatment of metronidazole- and albendazole-resistant giardiasis with nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis*, 32, 1792-4.
- ADAGU IS, NOLDER D, WARHURST DC & ROSSIGNOL JF 2002. In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *J Antimicrob Chemother*, 49, 103-11.
- ADAM RD 1991. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol Rev*, 55, 706-32.
- ADAM RD 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev*, 14, 447-75.
- ADAM RD, DAHLSTROM EW, MARTENS CA, BRUNO DP, BARBIAN KD, RICKLEFS SM, HERNANDEZ MM, NARLA NP, PATEL RB, PORCELLA SF & NASH TE 2013. Genome sequencing of *Giardia lamblia* genotypes A2 and B isolates (DH and GS) and comparative analysis with the genomes of genotypes A1 and E (WB and Pig). *Genome Biol Evol*, 5, 2498-511.
- ALEY SB, ZIMMERMAN M, HETSKO M, SELSTED ME & GILLIN FD 1994. Killing of *Giardia lamblia* by cryptidins and cationic neutrophil peptides. *Infect Immun*, 62, 5397-403.
- AMAR CF, DEAR PH, PEDRAZA-DIAZ S, LOOKER N, LINNANE E & MCLAUCHLIN J 2002. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. *J Clin Microbiol*, 40, 446-52.
- ANKARKLEV J, JERLSTROM-HULTQVIST J, RINGQVIST E, TROELL K & SVARD SG 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol*, 8, 413-22.
- ARGUELLO-GARCIA R, CRUZ-SOTO M, ROMERO-MONTOYA L & ORTEGA-PIERRES G 2004. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in vitro. *J Antimicrob Chemother*, 54, 711-21.
- ASHBURN TT & THOR KB 2004. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 673-83.
- BAGCHI S, ONIKU AE, TOPPING K, MAMHOUD ZN & PAGET TA 2012. Programmed cell death in *Giardia*. *Parasitology*, 139, 894-903.
- BASU D, MANJUR J & JIN W 2011. Determination of lipoprotein lipase activity using a novel fluorescent lipase assay. *J Lipid Res*, 52, 826-32.
- BAYRAKTAR MR, MEHMET N & DURMAZ R 2005. Serum cytokine changes in Turkish children infected with *Giardia lamblia* with and without allergy: Effect of metronidazole treatment. *Acta Trop*, 95, 116-22.
- BELAUNZARAN ML, LAMMEL EM & DE ISOLA EL 2011. Phospholipases a in trypanosomatids. *Enzyme Res*, 2011, 392082.
- BELOSEVIC M, FAUBERT GM & MACLEAN JD 1989. Disaccharidase activity in the small intestine of gerbils (*Meriones unguiculatus*) during primary and challenge infections with *Giardia lamblia*. *Gut*, 30, 1213-9.
- BENCHIMOL M, PIVA B, CAMPANATI L & DE SOUZA W 2004. Visualization of the funis of *Giardia lamblia* by high-resolution field emission scanning electron microscopy--new insights. *J Struct Biol*, 147, 102-15.
- BENERE E, DA LUZ RA, VERMEERSCH M, COS P & MAES L 2007. A new quantitative in vitro microculture method for *Giardia duodenalis* trophozoites. *J Microbiol Methods*, 71, 101-6.
- BENERE E, T VANA, COS P & MAES L 2011. Variation in growth and drug susceptibility among *Giardia duodenalis* assemblages A, B and E in axenic in vitro culture and in the gerbil model. *Parasitology*, 138, 1354-61.

- BENERE E, VAN ASSCHE T, VAN GINNEKEN C, PEULEN O, COS P & MAES L 2012. Intestinal growth and pathology of *Giardia duodenalis* assemblage subtype A(I), A(II), B and E in the gerbil model. *Parasitology*, 139, 424-33.
- BENYACOUB J, PEREZ PF, ROCHAT F, SAUDAN KY, REUTELER G, ANTILLE N, HUMEN M, DE ANTONI GL, CAVADINI C, BLUM S & SCHIFFRIN EJ 2005. Enterococcus faecium SF68 enhances the immune response to *Giardia intestinalis* in mice. *J Nutr*, 135, 1171-6.
- BERKMAN DS, LESCANO AG, GILMAN RH, LOPEZ SL & BLACK MM 2002. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet*, 359, 564-71.
- BERTRAND I, ALBERTINI L & SCHWARTZBROD J 2005. Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human feces by PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol*, 43, 5940-4.
- BFARM 2012 Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. Bulletin zur Arzneimittelsicherheit: Informationen aus BfArM und PEI. *Ausgabe 2*.
- BIJNSDORP IV, GIOVANNETTI E & PETERS GJ 2011. Analysis of drug interactions. *Methods Mol Biol*, 731, 421-34.
- BINZ N, THOMPSON RC, LYMBERY AJ & HOBBS RP 1992. Comparative studies on the growth dynamics of two genetically distinct isolates of *Giardia duodenalis* in vitro. *Int J Parasitol*, 22, 195-202.
- BLAIR RJ & WELLER PF 1987. Uptake and esterification of arachidonic acid by trophozoites of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol*, 25, 11-8.
- BOREHAM PF, UPCROFT JA & UPCROFT P 1990. Changing approaches to the study of *Giardia* epidemiology: 1681-2000. *Int J Parasitol*, 20, 479-87.
- BORGSTROM B 1988. Mode of action of tetrahydrolipstatin: a derivative of the naturally occurring lipase inhibitor lipstatin. *Biochim Biophys Acta*, 962, 308-16.
- BULUT BU, GULNAR SB & AYSEV D 1996. Alternative treatment protocols in giardiasis: a pilot study. *Scand J Infect Dis*, 28, 493-5.
- BURET A, HARDIN JA, OLSON ME & GALL DG 1992. Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. *Gastroenterology*, 103, 506-13.
- BURET AG, MITCHELL K, MUENCH DG & SCOTT KG 2002. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitology*, 125, 11-9.
- CACCIO SM, BECK R, LALLE M, MARINCULIC A & POZIO E 2008. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *Int J Parasitol*, 38, 1523-31.
- CACCIO SM, LALLE M, BECK R & POZIO E 2009. Insights into the molecular detection of *Giardia duodenalis*: Implications for epidemiology. In: ORTEGA-PIERRES G, CACCIO S, FAYER R, MANK TG, SMITH H & THOMPSON RCA (eds.) *Giardia and Cryptosporidium: From molecules to disease*.
- CACCIO SM & RYAN U 2008. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol*, 160, 75-80.
- CACCIO SM & SPRONG H 2010. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol*, 124, 107-12.
- CAMPANATI L, BRE MH, LEVILLIERS N & DE SOUZA W 1999. Expression of tubulin polyglycylation in *Giardia lamblia*. *Biol Cell*, 91, 499-506.
- CAMPANATI L, TROESTER H, MONTEIRO-LEAL LH, SPRING H, TRENDELENBURG MF & DE SOUZA W 2003. Tubulin diversity in trophozoites of *Giardia lamblia*. *Histochem Cell Biol*, 119, 323-31.
- CANETE R, ESCOBEDO AA, GONZALEZ ME & ALMIRALL P 2006. Randomized clinical study of five days apostrophe therapy with mebendazole compared to quinacrine in the treatment of symptomatic giardiasis in children. *World J Gastroenterol*, 12, 6366-70.

- CASTILLO C, HERNANDEZ Y, ROYCHOWDHURY S & DAS S 2009. Cytoskeleton-based Lipid Transport in a Parasitic Protozoan, *Giardia lamblia*. In: ORTEGA-PIERRES G, CACCIO S, FAYER R, MANK TG, SMITH H & THOMPSON RCA (eds.) *Giardia and Cryptosporidium: From molecules to disease*.
- CDC 2014 <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/biology.html>.
- CDC 2014 <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/epi.html>.
- CEVALLOS A, CARNABY S, JAMES M & FARTHING JG 1995. Small intestinal injury in a neonatal rat model of giardiasis is strain dependent. *Gastroenterology*, 109, 766-73.
- CHAVEZ B, CEDILLO-RIVERA R & MARTINEZ-PALOMO A 1992. *Giardia lamblia*: ultrastructural study of the in vitro effect of benzimidazoles. *J Protozool*, 39, 510-5.
- CHIN AC, TEOH DA, SCOTT KG, MEDDINGS JB, MACNAUGHTON WK & BURET AG 2002. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun*, 70, 3673-80.
- CHOU TC 1976. Derivation and properties of Michaelis-Menten type and Hill type equations for reference ligands. *J Theor Biol*, 59, 253-76.
- CHOU TC 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*, 58, 621-81.
- CHOU TC & TALALAY P 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*, 22, 27-55.
- CORREA G, VILELA R, MENNA-BARRETO RF, MIDLEJ V & BENCHIMOL M 2009. Cell death induction in *Giardia lamblia*: effect of beta-lapachone and starvation. *Parasitol Int*, 58, 424-37.
- CROSSLEY R & HOLBERTON D 1985. Assembly of 2.5 nm filaments from giardin, a protein associated with cytoskeletal microtubules in *Giardia*. *J Cell Sci*, 78, 205-31.
- CROSSLEY R & HOLBERTON DV 1983. Selective extraction with Sarkosyl and repolymerization in vitro of cytoskeleton proteins from *Giardia*. *J Cell Sci*, 62, 419-38.
- CRUZ A, SOUSA MI, AZEREDO Z, LEITE E, FIGUEIREDO DE SOUSA JC & CABRAL M 2003. Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: in vitro susceptibility to metronidazole and albendazole. *J Antimicrob Chemother*, 51, 1017-20.
- DAN M & WANG CC 2000. Role of alcohol dehydrogenase E (ADHE) in the energy metabolism of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol*, 109, 25-36.
- DAS S, CASTILLO C & STEVENS T 2001. Phospholipid remodeling/generation in *Giardia*: the role of the Lands cycle. *Trends Parasitol*, 17, 316-9.
- DAS S, STEVENS T, CASTILLO C, VILLASENOR A, ARREDONDO H & REDDY K 2002. Lipid metabolism in mucous-dwelling amitochondriate protozoa. *Int J Parasitol*, 32, 655-75.
- DAWSON SC 2010. An insider's guide to the microtubule cytoskeleton of *Giardia*. *Cell Microbiol*, 12, 588-98.
- DAWSON SC & HOUSE SA 2010. Life with eight flagella: flagellar assembly and division in *Giardia*. *Curr Opin Microbiol*, 13, 480-90.
- DAWSON SC, SAGOLLA MS, MANCUSO JJ, WOESSNER DJ, HOUSE SA, FRITZ-LAYLIN L & CANDE WZ 2007. Kinesin-13 regulates flagellar, interphase, and mitotic microtubule dynamics in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot Cell*, 6, 2354-64.
- DEPONTE M 2008. Programmed cell death in protists. *Biochim Biophys Acta*, 1783, 1396-405.
- DI PRISCO MC, HAGEL I, LYNCH NR, JIMENEZ JC, ROJAS R, GIL M & MATA E 1998. Association between giardiasis and allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 81, 261-5.
- DIAZ G, MELIS M, BATETTA B, ANGIUS F & FALCHI AM 2008. Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by Nile Red red/yellow emission ratio. *Micron*, 39, 819-24.
- ECKMANN L 2003. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol*, 25, 259-70.
- ECKMANN L, LAURENT F, LANGFORD TD, HETSKO ML, SMITH JR, KAGNOFF MF & GILLIN FD 2000. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for



- arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *J Immunol*, 164, 1478-87.
- EDLIND TD 1989. Susceptibility of *Giardia lamblia* to aminoglycoside protein synthesis inhibitors: correlation with rRNA structure. *Antimicrob Agents Chemother*, 33, 484-8.
- EDWARDS DI 1977. The action of metronidazole on DNA. *J Antimicrob Chemother*, 3, 43-8.
- EDWARDS MR, GILROY FV, JIMENEZ BM & O'SULLIVAN WJ 1989. Alanine is a major end product of metabolism by *Giardia lamblia*: a proton nuclear magnetic resonance study. *Mol Biochem Parasitol*, 37, 19-26.
- EINTRACHT J, MAATHAI R, MELLORS A & RUBEN L 1998. Calcium entry in *Trypanosoma brucei* is regulated by phospholipase A2 and arachidonic acid. *Biochem J*, 336 ( Pt 3), 659-66.
- EISSA MM & AMER EI 2012. *Giardia lamblia*: a new target for miltefosine. *Int J Parasitol*, 42, 443-52.
- ELLIS JE, WYDER MA, JARROLL EL & KANESHIRO ES 1996. Changes in lipid composition during in vitro encystation and fatty acid desaturase activity of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol*, 81, 13-25.
- ELMENDORF HG, DAWSON SC & MCCAFFERY JM 2003. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *Int J Parasitol*, 33, 3-28.
- EMA 2012 European Medicines Agency. Assessment report for orlistat-containing medicinal products. EMA/276546/2012.
- ERLICH JH, ANDERS RF, ROBERTS-THOMSON IC, SCHRADER JW & MITCHELL GF 1983. An examination of differences in serum antibody specificities and hypersensitivity reactions as contributing factors to chronic infection with the intestinal protozoan parasite, *Giardia muris*, in mice. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 61 ( Pt 5), 599-615.
- ESCOBEDO AA & CIMERMAN S 2007. Giardiasis: a pharmacotherapy review. *Expert Opin Pharmacother*, 8, 1885-902.
- FARBAY MD, REYNOLDS JA & THOMPSON RC 1995. In vitro drug susceptibility of 29 isolates of *Giardia duodenalis* from humans as assessed by an adhesion assay. *Int J Parasitol*, 25, 593-9.
- FARTHING MJ 1997. The molecular pathogenesis of giardiasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 24, 79-88.
- FARTHING MJ, MATA L, URRUTIA JJ & KRONMAL RA 1986. Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. *Am J Clin Nutr*, 43, 395-405.
- FEELY DE, SCHOLLMAYER JV & ERLANDSEN SL 1982. *Giardia* spp.: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp Parasitol*, 53, 145-54.
- FENG Y & XIAO L 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev*, 24, 110-40.
- FILIPPATOS TD, DERDEMEZIS CS, GAZI IF, NAKOU ES, MIKHAILIDIS DP & ELISAF MS 2008. Orlistat-associated adverse effects and drug interactions: a critical review. *Drug Saf*, 31, 53-65.
- FLANAGAN PA 1992. *Giardia*--diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. *Epidemiol Infect*, 109, 1-22.
- FRANZEN O, JERLSTROM-HULTQVIST J, CASTRO E, SHERWOOD E, ANKARKLEV J, REINER DS, PALM D, ANDERSSON JO, ANDERSSON B & SVARD SG 2009. Draft genome sequencing of *giardia intestinalis* assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? *PLoS Pathog*, 5, e1000560.
- FRIEND DS 1966. The fine structure of *Giardia muris*. *J Cell Biol*, 29, 317-32.
- GARDNER TB & HILL DR 2001. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev*, 14, 114-28.
- GAVRISH E, SHRESTHA B, CHEN C, LISTER I, NORTH EJ, YANG L, LEE RE, HAN A, WILLIAMS B, CHARNUSKA D, COLEMAN K, LEWIS K & LAFLEUR MD 2014. In Vitro and In Vivo

- Activities of HPi1, a Selective Antimicrobial against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 3255-3260.
- GELANEW T, LALLE M, HAILU A, POZIO E & CACCIO SM 2007. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Trop*, 102, 92-9.
- GERWIG GJ, VAN KUIK JA, LEEFLANG BR, KAMERLING JP, Vliegenthart JF, KARR CD & JARROLL EL 2002. The *Giardia intestinalis* filamentous cyst wall contains a novel beta(1-3)-N-acetyl-D-galactosamine polymer: a structural and conformational study. *Glycobiology*, 12, 499-505.
- GHOSH S, FRISARDI M, ROGERS R & SAMUELSON J 2001. How *Giardia* swim and divide. *Infect Immun*, 69, 7866-72.
- GIBSON GR, RAMIREZ D, MAIER J, CASTILLO C & DAS S 1999. *Giardia lamblia*: incorporation of free and conjugated fatty acids into glycerol-based phospholipids. *Exp Parasitol*, 92, 1-11.
- GILLIN FD, REINER DS & BOUCHER SE 1988. Small-intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia* in vitro. *Infect Immun*, 56, 705-7.
- GILLIN FD, REINER DS & MCCAFFERY JM 1996. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu Rev Microbiol*, 50, 679-705.
- GOYAL N & SHUKLA G 2013. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG modulates the mucosal immune response in *Giardia intestinalis*-infected BALB/c mice. *Dig Dis Sci*, 58, 1218-25.
- GREENSPAN P, MAYER EP & FOWLER SD 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol*, 100, 965-73.
- HADVARY P, SIDLER W, MEISTER W, VETTER W & WOLFER H 1991. The lipase inhibitor tetrahydrolipstatin binds covalently to the putative active site serine of pancreatic lipase. *J Biol Chem*, 266, 2021-7.
- HANEVIK K, DIZDAR V, LANGELAND N & HAUSKEN T 2009. Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection. *BMC Gastroenterol*, 9, 27.
- HANSEN WR, TULYATHAN O, DAWSON SC, CANDE WZ & FLETCHER DA 2006. *Giardia lamblia* attachment force is insensitive to surface treatments. *Eukaryot Cell*, 5, 781-3.
- HAQUE R, ROY S, KABIR M, STROUP SE, MONDAL D & HOUPTE ER 2005. *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. *J Infect Dis*, 192, 2171-3.
- HARRIS JC, PLUMMER S & LLOYD D 2001. Antigiardial drugs. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57, 614-9.
- HERNANDEZ Y, CASTILLO C, ROYCHOWDHURY S, HEHL A, ALEY SB & DAS S 2007. Clathrin-dependent pathways and the cytoskeleton network are involved in ceramide endocytosis by a parasitic protozoan, *Giardia lamblia*. *Int J Parasitol*, 37, 21-32.
- HILL GASTON JS & LILICRAP MS 2003. Arthritis associated with enteric infection. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 17, 219-39.
- HOLBERTON DV 1973. Fine structure of the ventral disk apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. *J Cell Sci*, 13, 11-41.
- HOLBERTON DV 1974. Attachment of *Giardia*-a hydrodynamic model based on flagellar activity. *J Exp Biol*, 60, 207-21.
- HOLBERTON DV 1981. Arrangement of subunits in microribbons from *Giardia*. *J Cell Sci*, 47, 167-85.
- HOMAN WL & MANK TG 2001. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol*, 31, 822-6.
- HOSSAIN M, GIRI P & KUMAR GS 2008. DNA intercalation by quinacrine and methylene blue: a comparative binding and thermodynamic characterization study. *DNA Cell Biol*, 27, 81-90.
- HUMEN MA, DE ANTONI GL, BENYACOUB J, COSTAS ME, CARDOZO MI, KOZUBSKY L, SAUDAN KY, BOENZLI-BRUAND A, BLUM S, SCHIFFRIN EJ & PEREZ PF 2005. *Lactobacillus johnsonii* La1 antagonizes *Giardia intestinalis* in vivo. *Infect Immun*, 73, 1265-9.

- JERLSTROM-HULTQVIST J, ANKARKLEV J & SVÄRD SG 2010a. Is human giardiasis caused by two different *Giardia* species? *Gut Microbes*, 1, 379-382.
- JERLSTROM-HULTQVIST J, FRANZEN O, ANKARKLEV J, XU F, NOHYNKOVA E, ANDERSSON JO, SVARD SG & ANDERSSON B 2010b. Genome analysis and comparative genomics of a *Giardia intestinalis* assemblage E isolate. *BMC Genomics*, 11, 543.
- KANEDA Y & GOUTSU T 1988. Lipid analysis of *Giardia lamblia* and its culture medium. *Ann Trop Med Parasitol*, 82, 83-90.
- KANT S, KUMAR A & SINGH SM 2014. Tumor growth retardation and chemosensitizing action of fatty acid synthase inhibitor orlistat on T cell lymphoma: implication of reconstituted tumor microenvironment and multidrug resistance phenotype. *Biochim Biophys Acta*, 1840, 294-302.
- KARABAY O, TAMER A, GUNDUZ H, KAYAS D, ARINC H & CELEBI H 2004. Albendazole versus metronidazole treatment of adult giardiasis: An open randomized clinical study. *World J Gastroenterol*, 10, 1215-7.
- KATELARIS PH, NAEEM A & FARTHING MJ 1995. Attachment of *Giardia lamblia* trophozoites to a cultured human intestinal cell line. *Gut*, 37, 512-8.
- KENT SJ 2012. Loss of control of HIV viremia associated with the fat malabsorption drug orlistat. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 28, 961-2.
- KIM J, SIM S, KIM J, SONG K, YONG TS & PARK SJ 2008. *Giardia lamblia* EB1 is a functional homolog of yeast Bim1p that binds to microtubules. *Parasitol Int*, 57, 465-71.
- KNIGHT RC, SKOLIMOWSKI IM & EDWARDS DI 1978. The interaction of reduced metronidazole with DNA. *Biochem Pharmacol*, 27, 2089-93.
- KOHLI A, BUSHEN OY, PINKERTON RC, HOUPTE E, NEWMAN RD, SEARS CL, LIMA AA & GUERRANT RL 2008. *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102, 718-25.
- KONECNY G, UNTCH M, SLAMON D, BERYT M, KAHLERT S, FELBER M, LANGER E, LUDE S, HEPP H & PEGRAM M 2001. Drug interactions and cytotoxic effects of paclitaxel in combination with carboplatin, epirubicin, gemcitabine or vinorelbine in breast cancer cell lines and tumor samples. *Breast Cancer Res Treat*, 67, 223-33.
- KREMER L, DE CHASTELLIER C, DOBSON G, GIBSON KJ, BIFANI P, BALOR S, GORVEL JP, LOCHT C, MINNIKIN DE & BESRA GS 2005. Identification and structural characterization of an unusual mycobacterial monomeromycolyl-diacylglycerol. *Mol Microbiol*, 57, 1113-26.
- KREUTNER AK, DEL BENE VE & AMSTEY MS 1981. Giardiasis in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 140, 895-901.
- KRIDEL SJ, AXELROD F, ROZENKRANTZ N & SMITH JW 2004. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res*, 64, 2070-5.
- LANE S & LLOYD D 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol*, 28, 123-47.
- LANGFORD TD, HOUSLEY MP, BOES M, CHEN J, KAGNOFF MF, GILLIN FD & ECKMANN L 2002. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infect Immun*, 70, 11-8.
- LAUE M 2010. Electron microscopy of viruses. *Methods Cell Biol*, 96, 1-20.
- LEBBAD M, MATSSON JG, CHRISTENSSON B, LJUNGSTROM B, BACKHANS A, ANDERSSON JO & SVARD SG 2010. From mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Vet Parasitol*, 168, 231-9.
- LEITSCH D, BURGESS AG, DUNN LA, KRAUER KG, TAN K, DUCHENE M, UPCROFT P, ECKMANN L & UPCROFT JA 2011. Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thioredoxin reductase are involved in 5-nitroimidazole activation while flavin metabolism is linked to 5-nitroimidazole resistance in *Giardia lamblia*. *J Antimicrob Chemother*, 66, 1756-65.
- LI E, ZHOU P, PETRIN Z & SINGER SM 2004. Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun*, 72, 6642-9.

- LI E, ZHOU P & SINGER SM 2006. Neuronal nitric oxide synthase is necessary for elimination of *Giardia lamblia* infections in mice. *J Immunol*, 176, 516-21.
- LINDENMAYER JP & VARGAS P 1981. Toxic psychosis following use of quinacrine. *J Clin Psychiatry*, 42, 162-4.
- LINDMARK DG & MULLER M 1976. Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. *Antimicrob Agents Chemother*, 10, 476-82.
- LOPEZ-VELEZ R, BATLLE C, JIMENEZ C, NAVARRO M, NORMAN F & PEREZ-MOLINA J 2010. Short course combination therapy for giardiasis after nitroimidazole failure. *Am J Trop Med Hyg*, 83, 171-3.
- MACHADO M, DINIS AM, SALGUEIRO L, CUSTODIO JB, CAVALEIRO C & SOUSA MC 2011. Anti-*Giardia* activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. *Exp Parasitol*, 127, 732-9.
- MAIA-BRIGAGAO C, MORGADO-DIAZ JA & DE SOUZA W 2012. *Giardia* disrupts the arrangement of tight, adherens and desmosomal junction proteins of intestinal cells. *Parasitol Int*, 61, 280-7.
- MARIANTE RM, VANCINI RG, MELO AL & BENCHIMOL M 2005. *Giardia lamblia*: evaluation of the in vitro effects of nocodazole and colchicine on trophozoites. *Exp Parasitol*, 110, 62-72.
- MARTIN A, MORCILLO N, LEMUS D, MONTORO E, TELLES MA, SIMBOLI N, PONTINO M, PORRAS T, LEON C, VELASCO M, CHACON L, BARRERA L, RITACCO V, PORTAELS F & PALOMINO JC 2005. Multicenter study of MTT and resazurin assays for testing susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs. *Int J Tuberc Lung Dis*, 9, 901-6.
- MCCLENDON KS, RICHE DM & UWAIFO GI 2009. Orlistat: current status in clinical therapeutics. *Expert Opin Drug Saf*, 8, 727-44.
- MCDUFFIE JR, CALIS KA, UWAIFO GI, SEBRING NG, FALLON EM, HUBBARD VS & YANOVSKI JA 2002. Three-month tolerability of orlistat in adolescents with obesity-related comorbid conditions. *Obes Res*, 10, 642-50.
- MCGOWAN JM, NUSSBAUM CC & BURROUGHS EW 1948. Cholecystitis due to *Giardia Lamblia* in a Left-sided Gallbladder. *Ann Surg*, 128, 1032-7.
- MCINTYRE P, BOREHAM PF, PHILLIPS RE & SHEPHERD RW 1986. Chemotherapy in giardiasis: clinical responses and in vitro drug sensitivity of human isolates in axenic culture. *J Pediatr*, 108, 1005-10.
- MELONI BP, THOMPSON RC, REYNOLDSON JA & SEVILLE P 1990. Albendazole: a more effective anti-giardial agent in vitro than metronidazole or tinidazole. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 84, 375-9.
- MENG TC, ALEY SB, SVARD SG, SMITH MW, HUANG B, KIM J & GILLIN FD 1996. Immunolocalization and sequence of caltractin/centrin from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol*, 79, 103-8.
- MICULKA C, TRAN HQ, MEYER T, HECKEROTH A & BAUMEISTER S 2011. Orlistat: A Repositioning Opportunity as a Growth Inhibitor of Apicomplexan Parasites? In: BECKER K & SELZER PM (eds.) *Apicomplexan Parasites: Molecular Approaches toward Targeted Drug Development*. Weinheim: Wiley-VCH
- MIRO G, OLIVA G, CRUZ I, CANAVATE C, MORTARINO M, VISCHER C & BIANCIARDI P 2009. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Vet Dermatol*, 20, 397-404.
- MISHRA MK, KUMARAGURU T, SHEELU G & FADNAVIS NW 2009. Lipase activity of Lecitase® Ultra: characterization and applications in enantioselective reactions. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20, 2854-2860.
- MIYAHARA T, KUBOKAWA M, KOYANAGI S, MIGITA Y, OOGOSHI K, SAKAI H, ITO T, NAKANO I & NAWATA H 1997. A case of successfully treated giardiasis in pancreas. *Fukuoka Igaku Zasshi*, 88, 313-8.

- MOHAREB EW, ROGERS EJ, WEINER EJ & BRUCE JI 1991. Giardia lamblia: phospholipid analysis of human isolates. *Ann Trop Med Parasitol*, 85, 591-7.
- MONIS PT, ANDREWS RH, MAYRHOFER G & EY PL 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoan Giardia intestinalis. *Mol Biol Evol*, 16, 1135-44.
- MONIS PT, ROSS H. A., MAYRHOFER G. & L. EP 2003. Genetic diversity within the morphological species Giardia intestinalis and its relationship to host origin. *Infection, Genetics and Evolution*, 3, 29-38.
- MORGAN RO & FERNANDEZ MP 1995. Molecular phylogeny of annexins and identification of a primitive homologue in Giardia lamblia. *Mol Biol Evol*, 12, 967-79.
- MORRISON HG, MCARTHUR AG, GILLIN FD, ALEY SB, ADAM RD, OLSEN GJ, BEST AA, CANDE WZ, CHEN F, CIPRIANO MJ, DAVIDS BJ, DAWSON SC, ELMENDORF HG, HEHL AB, HOLDER ME, HUSE SM, KIM UU, LASEK-NESSELQUIST E, MANNING G, NIGAM A, NIXON JE, PALM D, PASSAMANECK NE, PRABHU A, REICH CI, REINER DS, SAMUELSON J, SVARD SG & SOGIN ML 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite Giardia lamblia. *Science*, 317, 1921-6.
- MÜLLER J, LEY S, FELGER I, HEMPHILL A & MÜLLER N 2008. Identification of differentially expressed genes in a Giardia lamblia WB C6 clone resistant to nitazoxanide and metronidazole. *J Antimicrob Chemother*, 62, 72-82.
- MÜLLER J, STERK M, HEMPHILL A & MÜLLER N 2007a. Characterization of Giardia lamblia WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole. *J Antimicrob Chemother*, 60, 280-7.
- MÜLLER J, WASTLING J, SANDERSON S, MÜLLER N & HEMPHILL A 2007b. A novel Giardia lamblia nitroreductase, GINR1, interacts with nitazoxanide and other thiazolides. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 1979-86.
- NAKAYAMA GR, CATON MC, NOVA MP & PARANDOOSH Z 1997. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods*, 204, 205-8.
- NARCISI EM, PAULIN JJ & FECHHEIMER M 1994. Presence and localization of vinculin in Giardia. *J Parasitol*, 80, 468-73.
- NASH TE, HERRINGTON DA, LOSONSKY GA & LEVINE MM 1987. Experimental human infections with Giardia lamblia. *J Infect Dis*, 156, 974-84.
- NASH TE, MCCUTCHAN T, KEISTER D, DAME JB, CONRAD JD & GILLIN FD 1985. Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 Giardia isolates obtained from humans and animals. *J Infect Dis*, 152, 64-73.
- NASH TE, OHL CA, THOMAS E, SUBRAMANIAN G, KEISER P & MOORE TA 2001. Treatment of patients with refractory giardiasis. *Clin Infect Dis*, 33, 22-8.
- NILLIUS D, MULLER J & MULLER N 2011. Nitroreductase (GINR1) increases susceptibility of Giardia lamblia and Escherichia coli to nitro drugs. *J Antimicrob Chemother*, 66, 1029-35.
- NOHRIA A, ALONSO RA & PEATTIE DA 1992. Identification and characterization of gamma-giardin and the gamma-giardin gene from Giardia lamblia. *Mol Biochem Parasitol*, 56, 27-37.
- O'BRIEN J, WILSON I, ORTON T & POGNAN F 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*, 267, 5421-6.
- ORTEGA-PIERRES G, BAZÁN-TEJEDA ML, FONSECA-LIÑÁN R, BERMÚDEZ-CRUZ RM & ARGÜELLO-GARCÍA R 2011. Interaction of Giardia with Host Cells. In: LUJÁN HD & S.G. S (eds.) *Giardia: A Model Organism*.
- PAGET TA, KELLY ML, JARROLL EL, LINDMARK DG & LLOYD D 1993. The effects of oxygen on fermentation in Giardia lamblia. *Mol Biochem Parasitol*, 57, 65-71.
- PAGET TA, RAYNOR MH, SHIPP DW & LLOYD D 1990. Giardia lamblia produces alanine anaerobically but not in the presence of oxygen. *Mol Biochem Parasitol*, 42, 63-7.

- PALM D, WEILAND M, MCARTHUR AG, WINIECKA-KRUSNELL J, CIPRIANO MJ, BIRKELAND SR, PACOCHA SE, DAVIDS B, GILLIN F, LINDER E & SVARD S 2005. Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. *Mol Biochem Parasitol*, 141, 199-207.
- PARKER SK, BARKLEY RM, RINO JG & VASIL ML 2009. Mycobacterium tuberculosis Rv3802c encodes a phospholipase/thioesterase and is inhibited by the antimycobacterial agent tetrahydrolipstatin. *PLoS One*, 4, e4281.
- PEATTIE DA 1990. The giardins of *Giardia lamblia*: genes and proteins with promise. *Parasitol Today*, 6, 52-6.
- PEREZ-VILLANUEVA J, HERNANDEZ-CAMPOS A, YEPEZ-MULIA L, MENDEZ-CUESTA C, MENDEZ-LUCIO O, HERNANDEZ-LUIS F & CASTILLO R 2013. Synthesis and antiprotozoal activity of novel 2-[[2-(1H-imidazol-1-yl)ethyl]sulfanyl]-1H-benzimidazole derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 23, 4221-4.
- PIVA B & BENCHIMOL M 2004. The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. *Biol Cell*, 96, 735-46.
- READ C, WALTERS J, ROBERTSON ID & THOMPSON RC 2002. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int J Parasitol*, 32, 229-31.
- RICE EW & SCHAEFER FW, 3rd 1981. Improved in vitro excystation procedure for *Giardia lamblia* cysts. *J Clin Microbiol*, 14, 709-10.
- RIVERO MR, JAUSORO I, BISBAL M, FELIZIANI C, LANFREDI-RANGEL A & TOUZ MC 2013. Receptor-mediated endocytosis and trafficking between endosomal-lysosomal vacuoles in *Giardia lamblia*. *Parasitol Res*, 112, 1813-8.
- RIVERO MR, MIRAS SL, QUIROGA R, ROPOLLO AS & TOUZ MC 2011. *Giardia lamblia* low-density lipoprotein receptor-related protein is involved in selective lipoprotein endocytosis and parasite replication. *Mol Microbiol*, 79, 1204-19.
- RKI 2014  
[http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_HIV\\_AIDS](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HIV_AIDS).
- RKI 2014  
[http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Tuberkulose](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tuberkulose).
- RKI RKI Infektionsepidemiologisches Jahrbuch 2012.
- ROBERT N, LEYLAND-JONES B, ASMAR L, BELT R, ILEGBODU D, LOESCH D, RAJU R, VALENTINE E, SAYRE R, COBLEIGH M, ALBAIN K, MCCULLOUGH C, FUCHS L & SLAMON D 2006. Randomized phase III study of trastuzumab, paclitaxel, and carboplatin compared with trastuzumab and paclitaxel in women with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 24, 2786-92.
- ROCHA S, DE KEERSMAECKER H, HUTCHISON JA, VANHOORELBEKE K, MARTENS JA, HOFKENS J & UJI-I H 2014. Membrane remodeling processes induced by phospholipase action. *Langmuir*, 30, 4743-51.
- ROXSTROM-LINDQUIST K, PALM D, REINER D, RINGQVIST E & SVARD SG 2006. *Giardia* immunity--an update. *Trends Parasitol*, 22, 26-31.
- RUCKER D, PADWAL R, LI SK, CURIONI C & LAU DC 2007. Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis. *BMJ*, 335, 1194-9.
- RUSTIA M & SHUBIK P 1972. Induction of lung tumors and malignant lymphomas in mice by metronidazole. *J Natl Cancer Inst*, 48, 721-9.
- SADJJADI SM, ALBORZI AW & MOSTOVFI H 2001. Comparative clinical trial of mebendazole and metronidazole in giardiasis of children. *J Trop Pediatr*, 47, 176-8.
- SAGOLLA MS, DAWSON SC, MANCUSO JJ & CANDE WZ 2006. Three-dimensional analysis of mitosis and cytokinesis in the binucleate parasite *Giardia intestinalis*. *J Cell Sci*, 119, 4889-900.

- SANCHEZ LB 1998. Aldehyde dehydrogenase (CoA-acetylating) and the mechanism of ethanol formation in the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *Arch Biochem Biophys*, 354, 57-64.
- SANCHEZ LB, GALPERIN MY & MULLER M 2000. Acetyl-CoA synthetase from the amitochondriate eukaryote *Giardia lamblia* belongs to the newly recognized superfamily of acyl-CoA synthetases (Nucleoside diphosphate-forming). *J Biol Chem*, 275, 5794-803.
- SAPP OL, 3rd 1964. Toxic Psychosis Due to Quinacrine and Chloroquine. *JAMA*, 187, 373-5.
- SARIC M, VAHRMANN A, NIEBUR D, KLUEMPERS V, HEHL AB & SCHOLZE H 2009. Dual acylation accounts for the localization of {alpha}19-giardin in the ventral flagellum pair of *Giardia lamblia*. *Eukaryot Cell*, 8, 1567-74.
- SAVIOLI L, SMITH H & THOMPSON A 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol*, 22, 203-8.
- SCHOFIELD PJ, COSTELLO M, EDWARDS MR & O'SULLIVAN WJ 1990. The arginine dihydrolase pathway is present in *Giardia intestinalis*. *Int J Parasitol*, 20, 697-9.
- SCHOFIELD PJ, EDWARDS MR, MATTHEWS J & WILSON JR 1992. The pathway of arginine catabolism in *Giardia intestinalis*. *Mol Biochem Parasitol*, 51, 29-36.
- SCHWARTZ CL, HEUMANN JM, DAWSON SC & HOENGER A 2012. A detailed, hierarchical study of *Giardia lamblia*'s ventral disc reveals novel microtubule-associated protein complexes. *PLoS One*, 7, e43783.
- SCOTT KG, LOGAN MR, KLAMMER GM, TEOH DA & BURET AG 2000. Jejunal brush border microvillous alterations in *Giardia muris*-infected mice: role of T lymphocytes and interleukin-6. *Infect Immun*, 68, 3412-8.
- SCOTT KG, MEDDINGS JB, KIRK DR, LEES-MILLER SP & BURET AG 2002. Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. *Gastroenterology*, 123, 1179-90.
- SCOTT KG, YU LC & BURET AG 2004. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infect Immun*, 72, 3536-42.
- SHAW RA & STEVENS MB 1987. The reactive arthritis of giardiasis. A case report. *JAMA*, 258, 2734-5.
- SICKLINGER M, WIENECKE R & NEUBERT U 2003. In vitro susceptibility testing of four antibiotics against *Borrelia burgdorferi*: a comparison of results for the three genospecies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *J Clin Microbiol*, 41, 1791-3.
- SINGER SM & NASH TE 2000. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun*, 68, 170-5.
- SJOSTROM L, RISSANEN A, ANDERSEN T, BOLDRIN M, GOLAY A, KOPPESCHAAR HP & KREMPF M 1998. Randomised placebo-controlled trial of orlistat for weight loss and prevention of weight regain in obese patients. European Multicentre Orlistat Study Group. *Lancet*, 352, 167-72.
- SMITH PD, GILLIN FD, SPIRA WM & NASH TE 1982. Chronic giardiasis: studies on drug sensitivity, toxin production, and host immune response. *Gastroenterology*, 83, 797-803.
- SOLTYS BJ & GUPTA RS 1994. Immunoelectron microscopy of *Giardia lamblia* cytoskeleton using antibody to acetylated alpha-tubulin. *J Eukaryot Microbiol*, 41, 625-32.
- SOUSA MC, GONCALVES CA, BAIROS VA & POIARES-DA-SILVA J 2001. Adherence of *Giardia lamblia* trophozoites to Int-407 human intestinal cells. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8, 258-65.
- SPRONG H, CACCIO SM, VAN DER GIESSEN JW, NETWORK Z & PARTNERS 2009. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis*, 3, e558.
- STERK M, MULLER J, HEMPHILL A & MULLER N 2007. Characterization of a *Giardia lamblia* WB C6 clone resistant to the isoflavone formononetin. *Microbiology*, 153, 4150-8.

- STEVENS TL, GIBSON GR, ADAM R, MAIER J, ALLISON-ENNIS M & DAS S 1997. Uptake and cellular localization of exogenous lipids by *Giardia lamblia*, a primitive eukaryote. *Exp Parasitol*, 86, 133-43.
- SULAIMAN IM, FAYER R, BERN C, GILMAN RH, TROUT JM, SCHANTZ PM, DAS P, LAL AA & XIAO L 2003. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis*, 9, 1444-52.
- SZKODOWSKA A, MULLER MC, LINKE C & SCHOLZE H 2002. Annexin XXI (ANX21) of *Giardia lamblia* has sequence motifs uniquely shared by giardial annexins and is specifically localized in the flagella. *J Biol Chem*, 277, 25703-6.
- TAYLOR GD, WENMAN WM & TYRRELL DL 1987. Combined metronidazole and quinacrine hydrochloride therapy for chronic giardiasis. *CMAJ*, 136, 1179-80.
- TEJMAN-YARDEN N & ECKMANN L 2011. New approaches to the treatment of giardiasis. *Curr Opin Infect Dis*, 24, 451-6.
- TEJMAN-YARDEN N, MILLMAN M, LAUWAET T, DAVIDS BJ, GILLIN FD, DUNN L, UPCROFT JA, MIYAMOTO Y & ECKMANN L 2011. Impaired parasite attachment as fitness cost of metronidazole resistance in *Giardia lamblia*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 4643-51.
- TELLEZ A, WINIECKA-KRUSNELL J, PANIAGUA M & LINDER E 2003. Antibodies in mother's milk protect children against giardiasis. *Scand J Infect Dis*, 35, 322-5.
- THOMPSON RC, REYNOLDS JA & MENDIS AH 1993. *Giardia* and giardiasis. *Adv Parasitol*, 32, 71-160.
- THOMPSON RCA 2009. The impact of *Giardia* on science and society. In: ORTEGA-PIERRES G, CACCIO S, FAYER R, MANK TG, SMITH H & THOMPSON RCA (eds.) *Giardia and Cryptosporidium: From molecules to disease*.
- TITBALL RW 1993. Bacterial phospholipases C. *Microbiol Rev*, 57, 347-66.
- TORGERSON JS, HAUPTMAN J, BOLDRIN MN & SJOSTROM L 2004. XENical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care*, 27, 155-61.
- TOWNSON SM, HANSON GR, UPCROFT JA & UPCROFT P 1994. A purified ferredoxin from *Giardia duodenalis*. *Eur J Biochem*, 220, 439-46.
- TOWNSON SM, UPCROFT JA & UPCROFT P 1996. Characterisation and purification of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Giardia duodenalis*. *Mol Biochem Parasitol*, 79, 183-93.
- TROEGER H, EPPEL HJ, SCHNEIDER T, WAHNSCHAFFE U, ULLRICH R, BURCHARD GD, JELINEK T, ZEITZ M, FROMM M & SCHULZKE JD 2007. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut*, 56, 328-35.
- TURCHANY JM, ALEY SB & GILLIN FD 1995. Giardicidal activity of lactoferrin and N-terminal peptides. *Infect Immun*, 63, 4550-2.
- UPCROFT J & UPCROFT P 1998. My favorite cell: *Giardia*. *Bioessays*, 20, 256-63.
- UPCROFT P & UPCROFT JA 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin Microbiol Rev*, 14, 150-64.
- USEPA 1999. *Giardia*: Drinking Water Health Advisory. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency.
- VAHRMANN A, SARIC M, KOEBSCH I & SCHOLZE H 2008. alpha14-Giardin (annexin E1) is associated with tubulin in trophozoites of *Giardia lamblia* and forms local slubs in the flagella. *Parasitol Res*, 102, 321-6.
- VAN DEN BOSCH H 1980. Intracellular phospholipases A. *Biochim Biophys Acta*, 604, 191-246.
- VAN GAAL LF, BROOM JI, ENZI G & TOPLAK H 1998. Efficacy and tolerability of orlistat in the treatment of obesity: a 6-month dose-ranging study. Orlistat Dose-Ranging Study Group. *Eur J Clin Pharmacol*, 54, 125-32.
- VARGAS-VILLARREAL J, ESCOBEDO-GUAJARDO BL, MATA-CARDENAS BD, PALACIOS-CORONA R, CORTES-GUTIERREZ E, MORALES-VALLARTA M, SAMPAYO-REYES A & SAID-



- FERNANDEZ S 2007. Activity of intracellular phospholipase A1 and A2 in *Giardia lamblia*. *J Parasitol*, 93, 979-84.
- VOOGD CE, VAN DER STEL JJ & JACOBS JJ 1974. The mutagenic action of nitroimidazoles. I. Metronidazole, nimorazole, dimetridazole and ronidazole. *Mutat Res*, 26, 483-90.
- WANKHADE G, HUTKE V, WAGHMARE PJ, MISRA AK, VARMA SK & HARINATH BC 2012. Inhibitory effect of isoniazid and orlistat combination on mycobacterial ES-31 serine protease in vitro and on the growth of M.tb bacilli in axenic culture. *Indian J Tuberc*, 59, 156-61.
- WARD W, ALVARADO L, RAWLINGS ND, ENGEL JC, FRANKLIN C & MCKERROW JH 1997. A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*. *Cell*, 89, 437-44.
- WATKINS RR & ECKMANN L 2014. Treatment of giardiasis: current status and future directions. *Curr Infect Dis Rep*, 16, 396.
- WEBER K, GEISLER N, PLESSMANN U, BREMERICH A, LECHTRECK KF & MELKONIAN M 1993. SF-assemblin, the structural protein of the 2-nm filaments from striated microtubule associated fibers of algal flagellar roots, forms a segmented coiled coil. *J Cell Biol*, 121, 837-45.
- WEIBEL EK, HADVARY P, HOCHULI E, KUPFER E & LENGSELD H 1987. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)*, 40, 1081-5.
- WEILAND ME, MCARTHUR AG, MORRISON HG, SOGIN ML & SVARD SG 2005. Annexin-like alpha giardins: a new cytoskeletal gene family in *Giardia lamblia*. *Int J Parasitol*, 35, 617-26.
- WHITE MJ, DICAPRIO MJ & GREENBERG DA 1996. Assessment of neuronal viability with Alamar blue in cortical and granule cell cultures. *J Neurosci Methods*, 70, 195-200.
- WIELINGA C, RYAN U, ANDREW THOMPSON RC & MONIS P 2011. Multi-locus analysis of *Giardia duodenalis* intra-Assemblage B substitution patterns in cloned culture isolates suggests sub-Assemblage B analyses will require multi-locus genotyping with conserved and variable genes. *Int J Parasitol*, 41, 495-503.
- WOLFE MS 1992. Giardiasis. *Clin Microbiol Rev*, 5, 93-100.
- XIAO D, SHI D, YANG D, BARTHEL B, KOCH TH & YAN B 2013. Carboxylesterase-2 is a highly sensitive target of the antiobesity agent orlistat with profound implications in the activation of anticancer prodrugs. *Biochem Pharmacol*, 85, 439-47.
- YANG PY, WANG M, LIU K, NGAI MH, SHERIFF O, LEAR MJ, SZE SK, HE CY & YAO SQ 2012. Parasite-based screening and proteome profiling reveal orlistat, an FDA-approved drug, as a potential anti *Trypanosoma brucei* agent. *Chemistry*, 18, 8403-13.
- YICHOY M. 2009. *Lipid Uptake and Metabolism in the parasitic Protozoan Giardia lamblia*. University of Texas at El Paso.
- ZHOU P, LI E, SHEA-DONOHUE T & SINGER SM 2007. Tumor necrosis factor alpha contributes to protection against *Giardia lamblia* infection in mice. *Parasite Immunology*, 29, 367-374.

---

## Publikationsverzeichnis

### Originalarbeit

Hahn J, Seeber F, Kolodziej H, Ignatius R, Laue M, et al. (2013) High Sensitivity of *Giardia duodenalis* to Tetrahydrolipstatin (Orlistat) *In Vitro*. PLoS ONE 8(8): e71597. doi: 10.1371/journal.pone.0071597

### Vortrag

Statusworkshop der DGHM-Fachgruppe Eukaryontische Krankheitserreger, Berlin, Februar 2012

Drug susceptibility of *Giardia duodenalis* - towards new potential treatment approaches.

### Posterpräsentation

Tag der Pharmazie, Freie Universität Berlin, Berlin, September 2012

Hahn J, Klotz C, Aebischer T, Kolodziej H

Drug susceptibility of *Giardia duodenalis* to tetrahydrolipstatin: towards new potential treatment approaches.

64. DGHM Jahrestagung, Hamburg, Oktober 2012

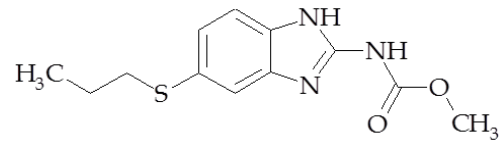
Hahn J, Seeber F, Klotz C, Aebischer T, Ignatius R, Kolodziej H

High sensitivity of *Giardia duodenalis* to Tetrahydrolipstatin *in vitro*.

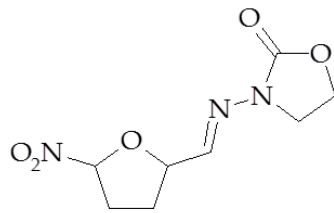
## Anhang

### Strukturformeln

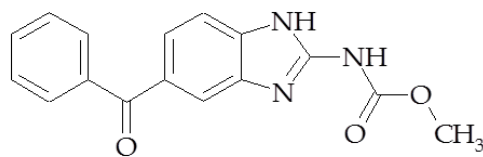
#### Albendazol



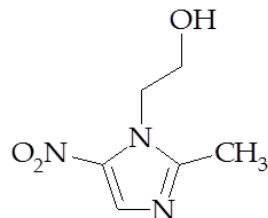
#### Furazolidon



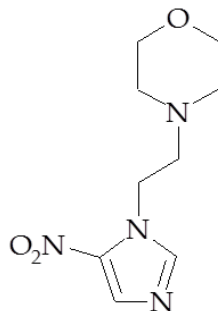
#### Mebendazol

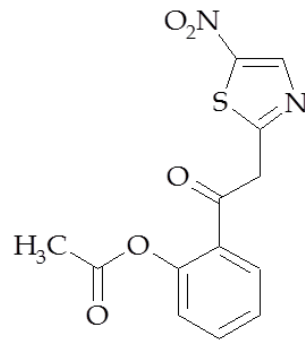
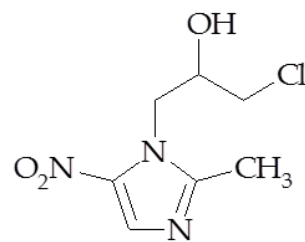
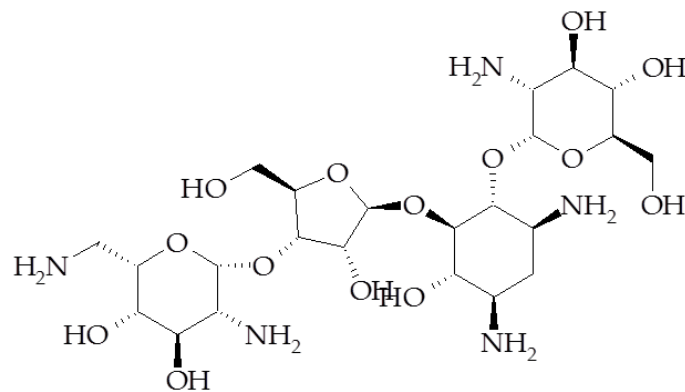
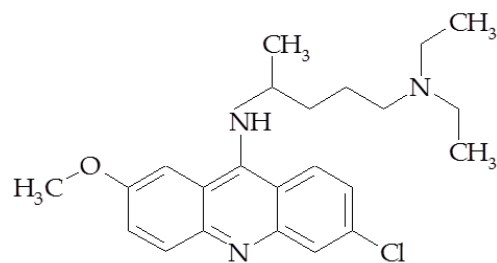


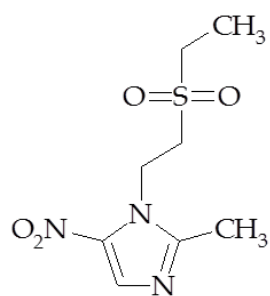
#### Metronidazol



#### Nimorazol



**Nitazoxanid****Ornidazol****Paromomycin****Quinacrin (Mepacrin)**

**Tinidazol**

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass diese Arbeit noch in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder als ungenügend beurteilt wurde. Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, 18. Dezember 2014

Juliane Hahn