

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Therapeutischer Effekt von neuen Hydroxyquinolonen gegen
Toxoplasma gondii in vivo

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lara Liv Bajohr

aus Fortaleza/Brasilien

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. O. Liesenfeld

2. Prof. Dr. med. U. Gross

3. Prof. Dr. D. Schlüter

Datum der Promotion: 03.09.2010

Danksagung

„Deus quer, o homem sonha, a obra nasce“ (Fernando Pessoa)

“Gott will, der Mensch träumt, das Werk ist geboren“

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Oliver Liesenfeld, für die Betreuung, fachlichen Ratschläge, konstruktive Kritik und Freundschaft, die mich motiviert haben, diese Arbeit zu schreiben.

Ein besonderes Dankeschön auch an Sabrina Lachenmaier und ihre freundschaftliche Unterstützung bei meiner Laborarbeit sowie für die anregenden Gespräche und Diskussionen.

Bei allen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe, Anna Gomes, Melba Muñoz, Uwe Lohmann, Berit Söhl-Kielczynski, Solvy Wolke, Vladimir Magalhães und Agata Dukaczewska, bedanke ich mich für die motivierende und angenehme Arbeitsatmosphäre. Allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Dr. Markus Heimesaat, insbesondere Michaela Wattrodt und Rita Plickert, möchte ich ebenfalls danken.

Dank auch an alle Mitarbeiter des Tierstalls für ihre Unterstützung und Hilfe.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Ulf B. Göbel möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit im Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät der Charité durchführen zu können.

Ich möchte mich insbesondere bei meinem Mann, Dr. Konstantin Bajohr, für seine Unterstützung, Geduld und Hilfe bedanken. Dank auch an meine Eltern Laurênia und

Alberto, Tio Carlos, meine Geschwister Livius und Natércia, Márcio und Mara, Maiteé, Ester und Levi. Ich danke auch meiner Familie in Deutschland, Jochen, Jutta, Sophie, Oliver, Barbara und Peter, und meinen Freunden Prof. Dr. Ralf Ignatius und George Magalhães.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	8
Abkürzungsverzeichnis	12
1. Einleitung	15
1.1 Einführung	15
1.2 <i>Toxoplasma gondii</i>	17
1.2.1 Erreger.....	17
1.3 Prävalenz.....	18
1.4 Klinik.....	18
1.4.1 Immunkompetente Patienten	18
1.4.2 Immunsupprimierte Patienten	19
1.4.3 Konnatale Toxoplasmose	20
1.4.4 Augentoxoplasmose	21
1.5 Diagnostik.....	21
1.6 Therapie	22
1.6.1 Therapie der Infektion beim Menschen	22
1.6.2 Experimentelle Therapie der Infektion.....	26
1.7 Zellkulturmodelle zur Prüfung der antiparasitären Wirksamkeit von Medikamenten gegen <i>Toxoplasma gondii</i>	28
1.8 Mausmodelle der Infektion zur Untersuchung der therapeutischen Wirksamkeit von neuen Medikamenten gegen <i>Toxoplasma gondii</i>	28
1.9 Fragestellung.....	30
2. Material und Methoden.....	31
2.1 Mäuse und Parasiten	31
2.1.2 Mäuse.....	31
2.1.3 Parasiten	31

2.2	Chemikalien und Reagenzien	31
2.3	Geräte, Plastikware und kommerzielle „Kits“	34
2.3.1	Geräte und Materialien	34
2.3.2	Plastikwaren	35
2.3.3	Kommerzielle „Kits“	36
2.4	Puffer und Lösungen.....	36
2.5	Enzyme und Antikörper.....	37
2.6	Software und Datenbanken.....	39
2.7	Vermehrung von <i>Toxoplasma-gondii</i> -Tachyzoiten	39
2.8	Murine Infektionsmodelle	39
2.8.1	Akute Infektion	39
2.8.2	Mausmodell der Reaktivierungstoxoplasmose	40
2.9	Vorbereitung der Medikamente	42
2.10	Tötung der Tiere und Organentnahme	42
2.11	Histologie.....	43
2.11.1	Färbung mit Hämatoxilin und Eosin	43
2.11.2	Mikroskopische Auswertung	43
2.12	Durchflusszytometrie (FACS).....	44
2.13	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	45
2.13.1	Isolierung der DNA.....	45
2.13.2	Quantifizierung der DNA von <i>Toxoplasma gondii</i>	45
2.14	Statistische Analysen.....	46
3.	Ergebnisse	47
3.1	Untersuchungen zur antiparasitären Wirkung neuer Quinolone im Modell der akuten Toxoplasmose.....	47
3.1.1	Quantifizierung Toxoplasma-spezifischer DNA in Leber und Lunge	47
3.1.2	Histologische Befunde	49
3.1.3	Durchflusszytometrische Untersuchung von Peritonealzellen.....	51

3.1.4	Durchflusszytometrische Untersuchung peritonealer Immunzellpopulationen	53
3.2	Untersuchungen zur antiparasitären Wirkung neuer Quinolone im Modell der Reaktivierungstoxoplasmose	60
3.2.1	Quantifizierung Toxoplasma-spezifischer DNA im Gehirn.....	60
3.2.2	Histologische Befunde	61
4.	Diskussion	66
4.1	Zeigt 1-hydroxy-2-dodecyl-4-(1H)-Quinolon (HDQ) einen therapeutischen Effekt im Mausmodell der akuten Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i> ?.....	67
4.2	Zeigen 1-hydroxy-2-dodecyl-3-methyl-4(1H)-Quinolon (Substanz A) und 1-hydroxy-2-methyl-3-dodecyl-4(1H)-Quinolon (Substanz B) einen Effekt auf <i>T. gondii</i> in einem Modell der akuten Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i> ? ...	69
4.3	Weisen 1-hydroxy-2-dodecyl-4-(1H)-Quinolon (HDQ), 1-hydroxy-2-dodecyl- 3-methyl-4(1H)-Quinolon (Substanz A) und 1-hydroxy-2-methyl-3-dodecyl-4(1H)- Quinolon (Substanz B) eine therapeutische Wirksamkeit gegen <i>Toxoplasma gondii</i> in einem Modell der Reaktivierungstoxoplasmose auf?	70
4.4	Zusammensetzung der Zellpopulationen in der Peritonealhöhle	71
4.5	Die Wirkung von Atovaquon und Pyrimethamin/Sulfadiazin auf <i>Toxoplasma gondii</i>	72
5.	Zusammenfassung	74
6.	Summary	76
7.	Literaturverzeichnis	77
	Lebenslauf	82
	Erklärung	88

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungverzeichnis

Abbildung 1:	A: Tachyzoiten von <i>T. gondii</i> . B: <i>T. gondii</i> Gewebezyste und freie Tachyzoiten im Gehirn einer Maus	17
Abbildung 2:	Kernspintomographie mit multiplen zerebralen Toxoplasmose-Läsionen im Bereich der Stammganglien bei AIDS. Ringförmige Läsion nach KM-Gabe und perifokales Ödem	20
Abbildung 3:	Strukturen von HDQ, Substanz A und Substanz B	27
Abbildung 4:	Mausmodell der Reaktivierungstoxoplasmose in Anlehnung an den Verlauf der Infektion beim Immunsupprimierten	41
Abbildung 5:	Toxoplasma-spezifische DNA in der Leber. NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 10^5 GFP-exprimierenden RH-Tachyzoiten infiziert und 3 Tage nach der Infektion für 5 Tage täglich behandelt. Am Tag 8 post-infectionem wurden die Organe gewonnen. Die Abbildung zeigt gepoolte Daten aus 3 unabhängigen Versuchen	48
Abbildung 6:	Toxoplasma-spezifische DNA in der Lunge. NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 10^5 GFP-exprimierenden RH-Tachyzoiten infiziert und 3 Tage nach der Infektion für 5 Tage täglich behandelt. Am Tag 8 post-infectionem wurden die Organe entfernt. Die Abbildung zeigt gepoolte Daten aus 3 unabhängigen Versuchen	49
Abbildung 7:	Zahl inflammatorischer Areale in der Leber infizierter Mäuse. NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 10^5 GFP-exprimierenden RH-Tachyzoiten infiziert und 3 Tage nach der Infektion für 5 Tage täglich behandelt. Am Tag 8 post-infectionem wurden die Organe entfernt. Die Abbildung zeigt gepoolte Daten aus 3 unabhängigen Versuchen	50

Abbildung 8:	Histologische Veränderungen in der Leber <i>T. gondii</i> -infizierter Mäuse. A, unbehandelte Kontrolle. B, Behandlung mit Pyrimethamin/Sulfadiazin. C, Behandlung mit Atovaquon. D, Behandlung mit HDQ. E, Behandlung mit Substanz A. F, Behandlung mit Substanz B. Pfeile weisen auf entzündliche Areale hin	51
Abbildung 9:	Prozentzahl infizierter Peritonealzellen 8 Tage nach Infektion mit 10^5 GFP-expressing RH-Tachyzoiten und antiparasitärer Behandlung. Die Abbildung zeigt gepoolte Daten aus 3 unabhängigen Versuchen...	52
Abbildung 10:	Anteil verschiedener Immunzellpopulationen an der Gesamtzahl aller Peritonealzellen. NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 10^5 GFP-exprimierenden RH-Tachyzoiten infiziert und 3 Tage nach der Infektion für 5 Tage täglich behandelt. Am Tag 8 post-infectionem wurde die Peritonealflüssigkeit gewonnen	54
Abbildung 11:	Anteil verschiedener Immunzellpopulationen an der infizierten Zellpopulation. NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 10^5 GFP-exprimierenden RH-Tachyzoiten infiziert und 3 Tage nach der Infektion für 5 Tage täglich behandelt. Am Tag 8 post- infectionem wurde die Peritonealflüssigkeit entfernt	55
Abbildung 12:	Anteil verschiedener Immunzellpopulationen an der nicht infizierten Zellpopulation. NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 10^5 GFP-exprimierenden RH-Tachyzoiten infiziert und 3 Tage nach der Infektion für 5 Tage täglich behandelt. Am Tag 8 post-infectionem wurde die Peritonealflüssigkeit entfernt	56
Abbildung 13:	Anteil verschiedener Immunzellpopulationen an der gesamten Zellpopulation. NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 10^5 GFP-exprimierenden RH-Tachyzoiten infiziert und 3 Tage nach der Infektion für 5 Tage täglich behandelt. Am Tag 8 post-infectionem wurde die Peritonealflüssig- keit entfernt	57

- Abbildung 14: Anteil verschiedener Immunzellpopulationen an der infizierten Zellpopulation. NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 10^5 GFP-exprimierenden RH-Tachyzoiten infiziert und 3 Tage nach der Infektion für 5 Tage täglich behandelt. Am Tag 8 post-infectionem wurde die Peritonealflüssigkeit entfernt..... 58
- Abbildung 15: Anteil verschiedener Immunzellpopulationen an der nicht infizierten Zellpopulation. NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 10^5 GFP-exprimierenden RH-Tachyzoiten infiziert und 3 Tage nach der Infektion für 5 Tage täglich behandelt. Am Tag 8 post-infectionem wurde die Peritonealflüssigkeit entfernt..... 59
- Abbildung 16: Toxoplasma-spezifische DNA im Gehirn. IRF8^{-/-}-Mäuse wurden i.p. mit 10 Zysten des *T. gondii*-Stammes ME49 Typ II infiziert und 2 Tage nach der Infektion täglich für 28 Tage mit Sulfadiazin (400mg/l) behandelt. Drei Tage nach dem Entfernen des Sulfadiazins wurden die Tiere an 5 aufeinander folgenden Tagen mit den entsprechenden Medikamenten behandelt. Am Tag 39 post-infectionem wurden die Organe entfernt. Die Abbildung zeigt gepoolte Daten aus 3 unabhängigen Versuchen..... 61
- Abbildung 17: Histologische Befunde in der Leber. IRF8^{-/-}-Mäuse wurden i.p. mit 10 Zysten des *T. gondii*-Stammes ME49 Typ II infiziert und 2 Tage nach der Infektion täglich für 28 Tage mit Sulfadiazin (400mg/l) behandelt. Drei Tage nach dem Entfernen des Sulfadiazins wurden die Tiere an 5 aufeinander folgenden Tagen mit den entsprechenden Medikamenten behandelt. Am Tag 39 post-infectionem wurden die Organe entfernt. Die Abbildung zeigt gepoolte Daten aus 3 unabhängigen Versuchen... 62
- Abbildung 18: Histologische Befunde im Gehirn. IRF8^{-/-}-Mäuse wurden i.p. mit 10 Zysten des *T. gondii*-Stammes ME49 Typ II infiziert und 2 Tage nach der Infektion täglich für 28 Tage mit Sulfadiazin (400mg/l) behandelt. Drei Tage nach dem Entfernen des Sulfadiazins wurden die Tiere an 5 aufeinander folgenden Tagen

mit den entsprechenden Medikamenten behandelt.

Am Tag 39 post-infectionem wurden die Organe entfernt. Die

Abbildung zeigt gepoolte Daten aus 3 unabhängigen Versuchen..... 63

Abbildung 19: Histologische Veränderungen im Gehirn *T. gondii*-infizierter Mäuse unter i.p. Behandlung. A, unbehandelte Kontrolle mit Verdickung der Meningen und inflammatorischen foci. B, Behandlung mit Pyrimethamin + Sulfadiazin. C, Behandlung mit Atovaquon. D, Behandlung mit HDQ. E, Behandlung mit Substanz A. F, Behandlung mit Substanz B 64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufigkeit der Symptome bei immunsupprimierten Patienten mit Toxoplasma-Enzephalitis 20

Tabelle 2: Nebenwirkungen von Pyrimethamin, Sulfadiazin, Spyramicin und Atovaquon..... 23

Tabelle 3: Leitlinien für die Behandlung von *T. gondii*-Infektionen 25

Tabelle 4: Mausmodelle der *T. gondii*-Infektion 29

Tabelle 5: Definition der Inflammationsgrade in histologischen Schnitten der Leber.. 44

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADH	Antidiuretisches Hormon
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
bzw.	Beziehungsweise
C	Kohlenstoff
Ca	Calcium
ca.	Circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CBF	Campus Benjamin Franklin
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Cytomegalie-Virus
° C	Grad Celsius
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Et al.	Et alii (und andere)
FACS	„Fluorescence activated cell sorting“ (fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie)
FBS	„Fetal bovine serum“ (fötales Rinderserum)
FEM	Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin
G	Gauge
g	g-force (relative Zentrifugationsbeschleunigung) bzw. Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
H	Hydrogen
HCl	Salzsäure (Acidum hydrochloricum)
HDQ	1-hydroxy-2-dodecyl-4-(1H)-Quinolon
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIV	Human immunodeficiency virus
IC50	Inhibitorische Konzentration 50% (half maximal inhibitory concentration)

ICSBP	Interferon-Consensus-Sequenz-Bindungs-Protein
IFT	Immunfluoreszenz-Test
IFN- γ	Gamma-Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-12	Interleukin-12
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
J	Jahre
Kg	Kilogramm
KM	Kontrastmittel
L	Liter
Lageso	Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und Soziales Berlin
M	Molar
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minute
ml	Milliliter
NADH	Ubiquinone oxidoreductases
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NMRI	„Naval Medical Research Institute“
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Micrometer
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Pikogramm
p.o.	Peroral
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat

s	Sekunde
TE	Toxoplasma-Enzephalitis
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
v.a.	Vor allem
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervöses System

1. Einleitung

1.1 Einführung

Die Prävalenz der Infektion mit *Toxoplasma gondii* steigt beim Menschen proportional mit dem Lebensalter um etwa ein Prozent pro Jahr an. In Deutschland weisen im Durchschnitt 60-70% der erwachsenen Bevölkerung Antikörper gegen *T. gondii* auf ¹⁻². Schätzungen gehen davon aus, dass bis zu sieben von 1.000 Schwangeren an einer *T. gondii*-Infektion erkranken, während der Parasit in ca. 50% der Fälle auf den Fötus übertragen wird ¹. Die Infektion mit *T. gondii* verläuft meist latent und daher unbemerkt, resultiert aber beim Immungeschwächten (AIDS-Patient oder Patient mit therapeutisch induzierter Immunsuppression) in einer Reaktivierungstoxoplasmose. Auch die Infektion des Ungeborenen kann ohne Behandlung tödlich verlaufen ³. Die Standardtherapie aller Verlaufsformen der Toxoplasmose besteht seit mehreren Jahrzehnten aus der Kombination von zwei Folsäureantagonisten, Pyrimethamin und Sulfadiazin, obwohl diese Therapie von schwerwiegenden Nebenwirkungen begleitet wird. In bis zu 50% der Fälle werden allergische Reaktionen beobachtet, die zum Absetzen bzw. Umstellen der Therapie führen ⁴⁻⁷. Daneben können Knochenmarkdepressionen, gastrointestinale Beschwerden, Kopfschmerzen, Kristallurie sowie Hämaturie auftreten. Auch die Teratogenität dieser Therapie stellt in der Frühschwangerschaft ein Problem dar. Da die Alternativtherapien, die meist die Kombination von Pyrimethamin mit anderen, weniger effektiven Medikamenten umfassen, wenig untersucht sind, die Zahl der Patienten mit induzierter Immunsuppression und Reaktivierungstoxoplasmose aber zukünftig weiter ansteigen dürfte, besteht ein großer Bedarf an neuen, mit weniger Nebenwirkungen behafteten Medikamenten.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der therapeutische Effekt von ausgewählten Therapeutika der neuen Wirkstoffklasse der Hydroxyquinolone untersucht. Der antiparasitäre Effekt eines dieser Therapeutika (HDQ) war bereits *in vitro* gezeigt worden⁸⁻¹⁰. Um die Wirksamkeit *in vivo* zu demonstrieren, wurden zwei Mausmodelle verwendet, die zum einen die akute Infektion, zum anderen die Reaktivierungstoxoplasmose des Menschen repräsentieren. Die Standardtherapie mit Pyrimethamin und Sulfadiazin sowie die Therapie mit Atovaquon wurden zum Vergleich untersucht.

1.2 *Toxoplasma gondii*

1.2.1 Erreger

Toxoplasma gondii ist ein weltweit verbreitetes, obligat intrazelluläres Protozoon (Sporozoon) aus der Unterklasse der Kokzidien.

Nach oraler Infektion durch Gewebezysten wird der Parasit im Darm als Tachyzoit freigesetzt und disseminiert im gesamten Organismus (Abbildung 1A). Dabei werden aktiv Gewebeschranken wie beispielsweise die Blut-Hirn-Schranke oder die Blut-Plazenta-Schranke passiert. Wenn nach Einsatz der antiparasitären Immunantwort zelluläre Mechanismen und spezifische Antikörper im Wirt eine gewisse Konzentration erreicht haben, verlangsamt sich die Vermehrung der Tachyzoiten im infizierten Wirt. Es entstehen Bradyzoiten, die sich in ihren Wirtszellen nur noch sehr langsam teilen. Die jetzt entstandenen Gewebezysten kommen überwiegend im Gehirn, der Retina sowie der Skelett- oder Herzmuskulatur vor (Abbildung 1B); Zysten bleiben lebenslang als Ausdruck der latenten Infektion bestehen und scheinen die Ursache der rezidivierenden Infektion zu sein ¹¹.

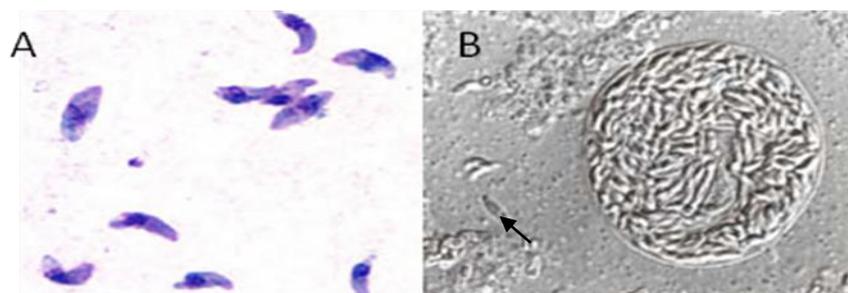


Abbildung 1: A: Tachyzoiten von *T. gondii* (www.cdc.org). B: *T. gondii* Gewebezyste und freie Tachyzoiten (Pfeil) im Gehirn einer Maus ¹²

1.3 Prävalenz

Die *T. gondii*-Infektion ist beim Menschen weit verbreitet, wobei die Prävalenz von Ort zu Ort erheblich variiert. Es wird geschätzt, dass in den Vereinigten Staaten von Amerika und Großbritannien 16-40% der Bevölkerung infiziert sind, während in Zentral- und Südamerika sowie Kontinentaleuropa die Zahl der Infizierten 50-80% erreicht ¹³. Diese Unterschiede entstehen zum einen auf Grund von kulturellen, hygienischen und ernährungsbedingten Gewohnheiten der Bevölkerung, zum anderen auf Grund von Umweltbedingungen ¹³⁻¹⁴. Die Seroprävalenz von *T. gondii* bei Frauen im gebärfähigen Alter liegt zwischen 30 und 60% ¹⁵. Die Inzidenz der konnatalen Toxoplasmose beträgt etwa 0,1 bis 0,2% ¹⁶⁻²². Das bedeutet, dass in Deutschland bei 800.000 Geburten pro Jahr 800 bis 1.600 Kinder zum Zeitpunkt der Geburt mit *T. gondii* infiziert sind ²³.

1.4 Klinik

1.4.1 Immunkompetente Patienten

Bei Immunkompetenten verläuft die Infektion in der Regel asymptomatisch (80-90% der Fälle). Nach einer Inkubationszeit von 1-3 Wochen kann es zu leichten Allgemeinerscheinungen wie Fieber, Mattigkeit, Arthralgien, Kopfschmerzen und Myalgien kommen. Die häufigste Organmanifestation ist die subakute Lymphadenitis ²⁴⁻²⁵. In ca. 5% aller Fälle kommt es zu einer symptomatischen Lymphadenopathie ²⁶, in seltenen Fällen zu fieberhaften Erkrankungen mit generalisierter Lymphadenopathie und Hepatosplenomegalie mit erhöhten Entzündungsparametern.

Andere Organmanifestationen wie Pneumonien, Hepatitis, Myokarditis und Polymyositis sind selten ²⁷.

1.4.2 Immunsupprimierte Patienten

Die Toxoplasma-Enzephalitis (TE) ist die häufigste Manifestation der Toxoplasmose bei immunsupprimierten Patienten (Defizienz der T-Zell-Immunität). Insbesondere Patienten mit AIDS, solche unter Kortikosteroid- oder zytotoxischer Therapie, Patienten mit hämatologischen Erkrankungen (besonders Hodgkin-Lymphom) oder Organtransplantation sind betroffen ²⁸⁻²⁹. Die Enzephalitis bei immunkomprimierten Patienten verläuft ohne Behandlung tödlich ³⁰. Bei Transplantatempfängern kann es ebenfalls zur Reaktivierung, aber auch zu Neuinfektionen (durch das Transplantat) kommen. Die TE stellt die häufigste Ursache fokaler Läsionen des zentralen Nervensystems bei AIDS-Patienten dar ³¹⁻³². Bis zu 10% der an AIDS erkrankten Patienten in den Vereinigten Staaten von Amerika und bis zu 30% der AIDS-Erkrankten in Europa entwickeln eine Reaktivierungs-Toxoplasmose, wenn sie nicht die hochaktive antiretrovirale Therapie oder eine antiparasitäre Prophylaxe erhalten ³³.

Die häufigste Präsentation (circa 75% der Fälle) ist ein subakuter Beginn mit fokalen neurologischen Symptomen (z.B. Hemiparese, Persönlichkeitsveränderung oder Aphasie) ²⁹. Mittels Computer- und Kernspintomographie des Schädels lassen sich einzelne, meist aber mehrere, Herde nachweisen, die durch ringförmige Kontrastmittelanreicherungen in multifokalen Aufhellungszonen gekennzeichnet sind (Abbildung 2; ³⁴⁻³⁵).

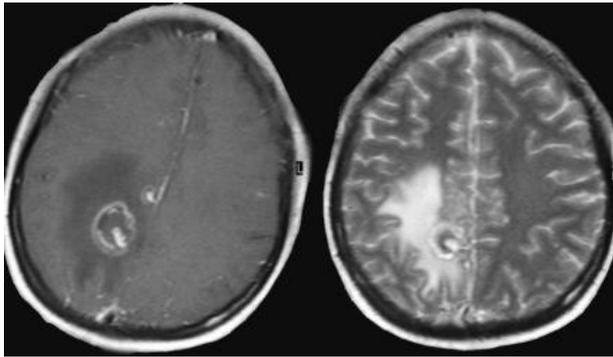


Abbildung 2: Kernspintomographie mit zerebraler Toxoplasmose-Läsion im Bereich der Stammganglien bei AIDS. Ringförmige Läsion nach KM-Gabe und perifokales Ödem (Abb.: Prof. Dr. med. Gabriele Arendt (Neurologische Klinik, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf))

Nach der CMV-Retinitis, die bei etwa 25% der AIDS-Patienten auftritt, gilt die Augentoxoplasmose mit ca. 3% als zweithäufigste retinale Infektionskrankheit bei AIDS-Patienten ^{31 36}.

Tabelle 1: Häufigkeit der Symptome bei immunsupprimierten Patienten mit Toxoplasma-Enzephalitis

Symptome	Häufigkeit (%)
Hemiparese	39-52
Verwirrtheit	30-42
Krämpfe	15-29
Hirnnervenausfälle	7-28
Sprachstörungen	6-26
Kleinhirnzeichen	9-30
Meningismus	10-16
Psychomotorische Manifestationen und Verhaltensauffälligkeiten, beispielsweise Demenz, Psychose, Angstzustände	30-42

(aus: Petersen, E. und Liesenfeld, O. ³⁷)

1.4.3 Konnatale Toxoplasmose

Ungefähr ein Drittel aller Kinder, deren Mutter sich in der Schwangerschaft akut infiziert, entwickelt eine konnatale Toxoplasmose ¹¹. Infektionen im 1. und 2.

Trimenon führen häufig zu Aborten oder zu schwerwiegenden Erkrankungen des Neugeborenen mit Missbildungen im Bereich des ZNS und Anämie, Thrombozytopenie, Ikterus, und Erythem¹⁴. Infektionen im 3. Schwangerschaftsdrittel rufen meist keine oder milde Schäden zum Zeitpunkt der Geburt hervor³⁸⁻⁴⁰. In den folgenden Monaten oder Jahren, oft auch erst im jungen Erwachsenenalter, entwickeln infizierte Kinder in vielen Fällen eine Retinochoroiditis⁴¹. Andere Schädigungen, wie z. B. geistige Retardierung, werden ebenfalls beobachtet.

1.4.4 Augentoxoplasmose

Die Retinochorioiditis ist eine häufige Manifestation der Toxoplasmose und kann Ausdruck der akuten postnatalen Infektion oder der konnatalen Infektion sein⁴²⁻⁴³. Sie äußert sich meist in einer fokal nekrotisierenden Entzündung von Netz- und Aderhaut, wodurch das Sehvermögen akut gefährdet sein kann, und hinterlässt charakteristische pigmentierte Narben.

1.5 Diagnostik

Die Diagnose einer akuten Toxoplasmose wird meist serologisch durch den Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gestellt. Der direkte Nachweis des Erregers ist nur durch ein Biopstat, die Gewinnung von Körperflüssigkeiten, oder postmortal möglich. Bei immunsupprimierten *T. gondii*-infizierten Patienten ist zumeist nur IgG als Ausdruck der latenten Infektion nachweisbar. Da die Serologie wenig aussagekräftig ist, wird zur Diagnosestellung neben der klinischen Symptomatik das

Vorliegen charakteristischer Läsionen im Computertomogramm (hypodense Läsionen mit perifokalem Ödem und Kontrastmittelanreicherung am Rand) oder Kernspintomogramm herangezogen. Auch hier kann die direkte Diagnostik mittels PCR die Diagnosestellung unterstützen.

1.6 Therapie

1.6.1 Therapie der Infektion beim Menschen

Die Entscheidung, ob die Infektion zu behandeln ist, hängt von ihrer Lokalisation, dem Immunstatus des Patienten, und, im Fall der akuten Toxoplasmose, auch davon ab, ob die Erkrankte schwanger ist. Behandlungsbefürftig sind die Retinochoroiditis (v.a. bei akut gefährdetem Sehvermögen, multifokalen Herden und rezidivierendem Verlauf) ⁴⁴⁻⁴⁶, konnatale Infektion des Neugeborenen ^{28 47-48}, Primärttoxoplasmose in der Schwangerschaft ab der 17. Schwangerschaftswoche ⁴⁹, akut erworbene Toxoplasmose mit Organkomplikationen bei Immunkompetenten, Laborinfektion oder durch Bluttransfusion erworbene Infektionen sowie die primäre und Reaktivierungstoxoplasmose bei AIDS und Immundefizienz anderer Ursache ⁵⁰.

Die Standardtherapie ist die Kombination von Folsäureantagonisten, v.a. Pyrimethamin und Sulfadiazin ⁵¹. Im Falle von schweren Nebenwirkungen, wie Allergien gegen Sulfonamide, werden Clindamycin, Azithromycin oder Atovaquon in Kombination mit Pyrimethamin eingesetzt ⁵¹.

Pyrimethamin hemmt die Dehydrofolatreduktase, Sulfadiazin die Dehydrofolatsynthetase ⁵⁰. Der daraus resultierende Folinsäuremangel kann durch die präventive Gabe von Folinsäure ausgeglichen werden. Große Probleme der

Therapie mit einer Antifolatkombination stellen die oft schlechte Toleranz bei Patienten und die, besonders bei HIV-Patienten, häufigen und schwerwiegenden Nebenwirkungen der Substanzen dar. Bei bis zu 50% der Patienten kommt es zum Abbruch der Therapie oder zum Wechsel auf weniger wirksame Medikamente⁵²⁻⁵⁴. Ausschlag, hämatologische Störungen, Kristallurie, Hämaturie, Nierensteine und Nierentoxizität sind wichtige Komplikationen⁵⁵. In seltenen Fällen kann es zu einem Stevens-Johnson- oder Lyell-Syndrom kommen^{50 56-57} (Tabelle 2).

Tabelle 2: Nebenwirkungen von Pyrimethamin, Sulfadiazin, Spiramicin und Atovaquon

Medikament	Häufige und gelegentliche Nebenwirkungen	Seltene Nebenwirkungen
Sulfadiazin	Übelkeit und Erbrechen, Durchfall, allergische Reaktionen, Arzneimittelfieber, Kopfschmerzen, Gelenkschmerzen	Leberstörungen, Anämie in Verbindung mit Durchfall als Ausdruck eines Folsäuremangels
Pyrimethamin	Übelkeit, Erbrechen, Fieber, Durchfall, Leukopenie, Anämie oder Thrombozytopenie, Kopfschmerzen, Schwindel, Hautausschlag, abnorme Pigmentierung der Haut	Schwindel
Spiramicin	Erbrechen, Bauchschmerzen, Missempfindungen, Übelkeit, Magen-Darm-Beschwerden, Durchfall	Störung der Leberfunktion, allergische Reaktion, Hautausschlag
Atovaquon	Gastrointestinale Beschwerden wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall (oft, aber milde), Überempfindlichkeitsreaktionen einschließlich Angioödem,	Kopfschmerzen, Schlaflosigkeit, erhöhte Leberenzyme, Anämie, Leukopenie

	Bronchospasmus und Engegefühl im Hals, Hautexantheme, Hyponatriämie, Fieber	
--	--	--

Die Standardtherapie richtet sich nur gegen das Tachyzoitenstadium, nicht aber gegen die Zystenstadien des Erregers, so dass eine akute Behandlung nicht zu einer sterilen Immunität führt. Die CDC-Richtlinien empfehlen die Therapie von symptomatischen immunkompetenten Patienten. Die Behandlung von Patienten mit Augentoxoplasmose hängt von den Eigenschaften der Läsion ab (akut aktiv versus chronisch progressiv). Schließlich müssen immunsupprimierte Patienten, bei denen ein Verdacht auf Toxoplasmose besteht, behandelt werden. Für HIV-Patienten kann die Fortsetzung der Medikamente für den Rest ihres Lebens notwendig sein, oder solange, wie sie immunsupprimiert sind ^{33 58}.

Die Kombination Pyrimethamin/Sulfadiazin ist die Standardtherapie der Toxoplasmose seit Anfang der 50er Jahre ⁵⁹. Sie zeigt gute Wirksamkeit gegen die Tachyzoitenform, aber nicht gegen die Zysten ^{54 60}. Außerdem ist Pyrimethamin gut gehirngängig ⁶¹. Pyrimethamin ist teratogen und darf nicht vor der 17. Schwangerschaftswoche verwendet werden.

Atovaquon wirkt als Analogon zu Uboquinon auf die mitochondriale Atmungskette der Toxoplasmen und verhindert durch die Blockade der Dehydroorotat-Dehydrogenase, eines Schlüsselenzyms der Pyrimidin-Biosynthese, die Bildung von Pyrimidin ⁶²⁻⁶⁴. Experimentell wurde eine gute Wirksamkeit gegen Tachyzoiten, weniger auch gegen Gewebezysten festgestellt ^{32 60 62 65}. Atovaquon weist eine geringere Nebenwirkungsrate auf als andere Therapeutika und ist auch in hoher Dosierung gut verträglich ^{50 63 66-67}. Nachteile von Atovaquon sind seine kurze Halbwertszeit und die geringe Resorption ⁵⁰. Auch der hohe Preis schränkt seine Anwendung ein ⁶⁸. Die Nebenwirkungen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Neuere Medikamente wie z.B. Rifabutin haben eine gute Aktivität gegen *T. gondii in vitro* und weniger Nebenwirkungen als die Standardtherapeutika. Der *in-vivo*-Gebrauch ist jedoch durch eine unzureichende Blut-Hirn-Schranken-Passage und/oder eine geringe Bioverfügbarkeit eingeschränkt ^{46 62 68-71}.

Tabelle 3: Behandlung der *T. gondii*-Infektionen ³⁰

Verlaufsform	Behandlung
Akute erworbene Infektion (asymptomatisch)	Nicht empfohlen
Akute Toxoplasmose bei Schwangeren	Spiramycin*
Nachgewiesene fetale Infektion	Pyrimethamin/Sulfadiazin (ab 18. Schwangerschaftswoche‡) Folinsäure
Koninatale Toxoplasmose	Pyrimethamin/Sulfadiazin Folinsäure Kortikosteroide (Prednison)§
Toxoplasma-Retinochoroiditis	Pyrimethamin/Sulfadiazin Folinsäure Kortikosteroide§
Akute TE bei HIV-Patienten	Pyrimethamin/Sulfadiazin oder Clindamycin Folinsäure
Alternative Therapien	Trimethoprim

	Pyrimethamin + Folinsäure und eines der folgenden Medikamente: Clarithromycin, Atovaquon, Azithromycin, Dapson
--	--

* Deutsche und österreichische Richtlinien empfehlen eine Spiramycin-Prophylaxe bis zur 17. Woche der Schwangerschaft. † Variiert in der Praxis stark von Ort zu Ort.
§ Wenn das Protein in der Zerebrospinalflüssigkeit $\geq 1\text{g/dL}$ und wenn akute Retinochorioiditis das Sehvermögen bedroht.

1.6.2 Experimentelle Therapie der Infektion

Aufgrund der vielen Nebenwirkungen der Standardtherapie und der schlechten Toleranz bei Patienten, insbesondere HIV-Patienten, werden neue Medikamente oder Kombinationen von Medikamenten benötigt. Ein möglicher Angriffspunkt der antiparasitären Medikamente ist die mitochondriale Elektronentransportkette des Parasiten. Einige Komponenten der Elektronentransportkette unterscheiden sich in wesentlichen Punkten von der der Säugetiere. Ein wichtiger Unterschied liegt bei der NADH-Quinon-Oxidoreduktase, auch bekannt als NADH-Dehydrogenase ^{8 72}. Säugetiere besitzen eine rotenon-sensitive Typ-I-NADH-Dehydrogenase in der inneren Mitochondrienmembran. *T. gondii* hingegen besitzt eine alternative Typ-II-NADH-Dehydrogenase ⁷³.

In neuesten Veröffentlichungen zeigte sich die Substanz 1-hydroxy-2-dodecyl-4-(1H)-Quinolon (HDQ) (Abbildung 3) als hochaffiner Inhibitor dieser alternativen NADH-Dehydrogenase bei dem Pilz *Yarrowia lipolytica* ⁷² sowie bei *Plasmodium falciparum* und *T. gondii* ⁸. Saleh et al. ⁸ berichteten über die antiparasitäre Wirkung von HDQ in *T. gondii*-infizierten humanen Fibroblasten in Konzentrationen von 1 nM bis 10 μM . HDQ hemmte die *T. gondii*-Replikation in nanomolarer mittlerer inhibitorischer Konzentration (IC50). Gleichzeitig wurde keine Toxizität auf die Wirtszellen

festgestellt. Ein Synergismus mit Atovaquon wurde nachgewiesen⁸. Ein besonderes Merkmal von 1-hydroxy-2-alkyl-4-(1H)-Quinolonen ist die Länge der Alkylseitenkette in der Position 2^{8 10}. Im Gegensatz zu Derivaten mit C₆, C₈, C₁₂, wie HDQ oder C₁₄-Alkylseitenketten, die hervorragende antiparasitäre Effekte in nanomolarer Konzentration haben, hat ein C₅-Derivat keinen antiparasitären Effekt^{8 10}. Es scheint, dass ein Minimum von C₆-Alkylseitenkettenlänge erforderlich für die antiparasitäre Wirkung ist⁸. Zwei weitere quinolon-artige Substanzen, 1-hydroxy-2-dodecyl-3-methyl-4-(1H)-Quinolon (Substanz A) und 1-hydroxy-2-methyl-3-dodecyl-4-(1H)-Quinolon (Substanz B) (Abbildung 3) haben bereits eine gute Effektivität gegen *T. gondii in vitro* gezeigt (Tietze et al., in Vorbereitung).

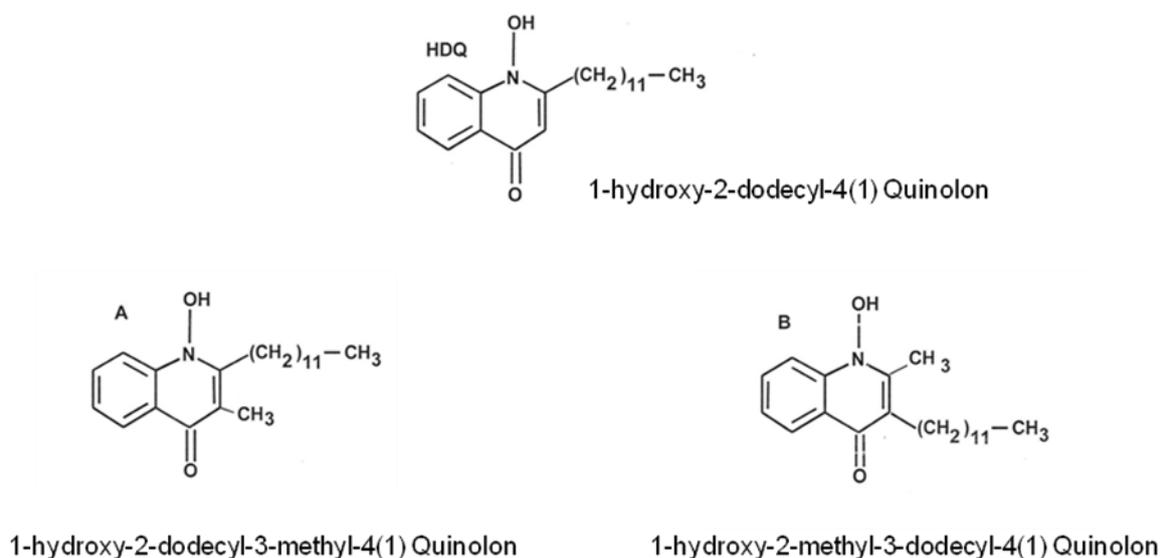


Abbildung 3: Strukturen von HDQ, Substanz A und Substanz B

1.7 Zellkulturmodelle zur Prüfung der antiparasitären Wirksamkeit von Medikamenten gegen *Toxoplasma gondii*

Es gibt zwei häufig benutzte *in-vitro*-Modelle für die Prüfung von Medikamenten gegen *T. gondii*. Das erste Modell ist für die akute Infektion wichtig, denn es benutzt die Tachyzoitenform. In diesem Modell werden Zellkulturen mit Tachyzoiten in einem Parasit-zu-Zellquotient von 1:2 bis 8:1 infiziert ⁴. Das zweite Modell hat die Gewebezyste als Angriffsziel. Die Zysten aus den Gehirnen von infizierten Mäusen werden isoliert und in einem Nährmedium kultiviert ⁷⁴.

Es werden verschiedene Zelllinien wie beispielsweise Maus-Makrophagen (J744A.1) oder humane Fibroblasten benutzt. Die *in-vitro*-Aktivität von Medikamenten gegen den Parasiten wird durch Messung der Fähigkeit des Medikaments bestimmt, die intrazelluläre Replikation der Parasiten in Zellkultur zu hemmen. Die antiparasitäre Wirkung kann durch Mikroskopie, Durchflusszytometrie oder ELISA bestimmt werden ⁷⁵⁻⁷⁶.

1.8 Mausmodelle der Infektion zur Untersuchung der therapeutischen Wirksamkeit von neuen Medikamenten gegen *Toxoplasma gondii*

Es gibt verschiedene Mausmodelle der Infektion mit *T. gondii*, die zur Testung der Wirksamkeit von antiparasitären Medikamenten eingesetzt werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Mausmodelle der *T. gondii*-Infektion ⁵¹

Mausmodelle der Infektion	Bemerkungen	Literatur
Modelle der akuten Infektion	i.p.-Infektion mit 100% Mortalität innerhalb von 8-10 Tagen (Typ-I-Stämme)	⁷⁷⁻⁸⁰
Modelle der chronischen Infektion	I.p.- oder orale Infektion mit Typ-II-Stämmen	^{2 81-82}
Modelle der Reaktivierung	Infektion mit Typ-II-Stämmen; Arzneimittelinduzierte Immunsuppression von Mäusen oder Verwendung von immundefizienten Mäusen	^{4 83-84}

Bei Modellen der akuten Infektion wird die therapeutische Wirksamkeit von Medikamenten gegen das Tachyzoitenstadium untersucht. Sie sind die bevorzugten Modelle für die Medikamentenprüfung, vor allem wegen ihrer Reproduzierbarkeit ⁵¹. Hierzu werden Mäuse mit maus-virulenten Typ-I-Stämmen i.p. ^{77-79 85} oder p.o. mit 10 Zysten von Typ-II-Stämmen infiziert ^{78-79 86}. Die akute primäre Toxoplasmose in Tiermodellen ist eine generalisierte Infektion mit Schäden an extrazerebralen Organen wie der Lunge und der Leber ⁵¹. Um die Reaktivierung der latenten Infektion bei immunsupprimierten Patienten zu imitieren, wurden Infektionsmodelle in immunsupprimierten Mäusen entwickelt ^{4 83-84 87-88}. Bei den Reaktivierungsmodellen werden zystenbildende Typ-II-Stämme verwendet, da sie für die Mehrheit der Fälle von humaner TE verantwortlich sind ⁸⁹. Die Infektion kann durch Behandlung mit

Sulfadiazin zur Chronizität gebracht werden, während das Absetzen zur Reaktivierung führt ⁵¹. Alternativ können Mäuse mit Dexamethason allein oder kombiniert mit Hydrokortison ^{83 90} oder durch Virusinfektionen ⁹¹⁻⁹³ immunsupprimiert werden.

1.9 Fragestellung

Die Reaktivierungstoxoplasmose des Immunsupprimierten und verschiedene symptomatische Formen der akuten Toxoplasmose des Immungesunden stellen ein großes klinisches Problem dar. Da die Standardtherapie durch das häufige Auftreten von Nebenwirkungen kompliziert ist, besteht großer Bedarf für die Entwicklung neuer antiparasitärer Medikamente. Die antiparasitäre Wirkung von HDQ, Substanz-A- und Substanz-B-Quinolonen wurde bereits *in vitro*, nicht jedoch *in vivo* gezeigt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, diese neuen Quinolone in 2 Mausmodellen der Infektion mit *T. gondii* zu testen, die die akute Infektion und die Reaktivierungstoxoplasmose des Menschen widerspiegeln.

Im Detail wurden die folgenden Fragen bearbeitet:

- 1) Besitzt 1-hydroxy-2-dodecyl-4-(1H)-Quinolon (HDQ) therapeutische Effekte gegen *T. gondii* in einem Mausmodell der akuten Infektion?
- 2) Zeigen 1-hydroxy-2-dodecyl-3-methyl-4(1H)-Quinolon (Substanz A) und 1-hydroxy-2-methyl-3-dodecyl-4(1H)-Quinolon (Substanz B) therapeutische Effekte gegen *T. gondii* in einem Mausmodell der akuten Infektion?
- 3) Besitzen die neuen Quinolone therapeutische Wirksamkeit gegen *T. gondii* in einem Mausmodell der Reaktivierungstoxoplasmose?

2. Material und Methoden

2.1 Mäuse und Parasiten

2.1.1 Mäuse

Es wurden NMRI-Auszucht-Mäuse und IRF-8^{-/-}-Mäuse auf dem C57BL/6-Hintergrund verwendet. Alle Mäuse wurden in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité – Universitätsmedizin Berlin gezüchtet und gehalten. Sie erhielten Wasser und Futter *ad libitum*. Die Versuche wurden vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und Soziales Berlin (Lageso) genehmigt.

2.1.2 Parasiten

Der Typ-II-Stamm ME49 von *T. gondii* wurde freundlicherweise von Prof. J. Remington, Stanford University, USA, zur Verfügung gestellt. Typ-II-Parasiten wurden in Mäusen passagiert und gehalten. GFP⁺-Tachyzoiten des RH-Stammes von *T. gondii* wurden freundlicherweise von Prof. Dominique Soldati-Favre, Institut für Mikrobiologie und Molekulare Medizin, Universität Genf, zur Verfügung gestellt und in Zellkulturen gehalten.

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller/Zulieferer
1-hydroxy-2-dodecyl-3-methyl-4(1H)-Quinolon (Substanz A)	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Göttingen, Deutschland

1-hydroxy-2-dodecyl-4-(1H)-Quinolon (HDQ)	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Göttingen, Deutschland
1-hydroxy-2-methyl-3-dodecyl-4(1H)-Quinolon (Substanz B)	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Göttingen, Deutschland
Aqua dest.	Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité, Berlin, Deutschland
Atovaquon (Wellvone®)	GlaxoSmithKline, München, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Entelan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Formaldehyd (37%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fötale Rinderserum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Hämatoxilin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isofluran (Forene®)	Abbot, Illinois, USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim,

	Deutschland
Kaliumaluminiumsulfat (Kalialaun)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Medium RPMI 1640 (GIBCO)	Invitrogen, Grand Island, USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumjodat	Riedel-de Haen AG, Seelze, Deutschland
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phosphat-gepufferte Kochsalzlg. (Dulbecco`s PBS 1x ohne Ca & Mg)	PAA, Cölbe, Deutschland
Pyrimethamin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salzsäure rauchend 37% (HCL 37%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Bio-Rad, München, Deutschland
Sulfadiazin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris	Bio-Rad, München, Deutschland
Trypanblau	Biochrom, Berlin, Deutschland
Xylol	J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.3 Geräte, Plastikware und Kommerzielle „Kits“

2.3.1 Geräte und Materialien

Gerätebezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Diavert Stereomikroskop	Leitz, Stuttgart, Deutschland
Exsikkator (Diaphragma-Membranpumpe)	Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
FACSCalibur™	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Feinwaagen	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gefrierschrank 4°C	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Rostock, Deutschland
LightCycler®	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Mikroskop	Leitz, Stuttgart, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plattenzentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland
Rotationsmikrotom HM355	Microm, Walldorf, Deutschland
Schüttler	Braun, Melsungen, Deutschland
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Transsonic Wasserbad	Elma, Pforzheim, Deutschland
Trockenschrank	Memmert, Heilbronn, Deutschland
Waagen	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	GFL, Wunsdorf, Deutschland
Zentrifuge, groß	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge, klein	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.3.2 Plastikwaren

Bezeichnung	Hersteller
96 Well Plate (Cellstar)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
FACS Tubes	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Histologiekassetten	Simport, Beloeil, QC, Canada
Kanülen 26G, 22G	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Küvette für Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
LightCycler Kapillaren	Gen Axxon Bioscience, Biberach, Deutschland
Mikro-Schraubröhre (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA
Pipetten 5 mL, 10 mL, 25 mL	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

	bzw. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 mL/1,5 mL/2 mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röhrchen 15 mL und 50 mL	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Spritzen 1/10 mL	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.3.3 Kommerzielle „Kits“

LightCycler [®] FastStart DNA Master	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
---	---

2.4 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Aufbewahrungspuffer für FACS-Proben	2% FBS, 0,1% Na-Azid, in PBS
Eosin-Lösung	1 g Eosin, 3 Tropfen Eisessig, 100 mL A. dest.
“FACS-Fix”	3,7% Formaldehydlösung, in PBS
“FACS-Flow”	BD Bioscience, Heidelberg
“FACS-Wash”	5% FBS in PBS
Hämatoxylin-Lösung	1 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumjodat, 50 g Kaliumaluminiumsulfat, 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure, ad 1 L A. dest.

HCL-Alkohol	25 mL 37% HCl, 900 mL 100% Ethanol
Lyse-Puffer für DNA-Isolierung aus Gewebe	100 mM Tris-HCl pH 8-8,5 mM EDTA pH 8, 0,2% SDS, 200 mM NaCl, 4% Proteinase K-Lösung, in A. dest.
Erythrozyten-Lyse-Puffer	0,2% NaCl Aqua sowie 1,6% NaCl in A. dest. oder 8,26 g NH ₄ Cl, 1 g KHCO ₃ , 0,0037 g EDTA in 1 L A. dest.
Trypanblau-Lösung	0,05% Trypanblau in PBS

2.5 Enzyme und Antikörper

Produktbezeichnung	Hersteller
Oligonukleotide für PCR	
Oligonukleotidprimer	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
Hybridisierungsoligonukleotide	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
Enzyme	
Proteinase K	Quiagen, Hilden, Deutschland
FACS Antikörper	
Anti-Maus B220 PE Ratte IgG2a	BD Bioscience Pharmigen, Heidelberg, Deutschland
Isotyp B220 PE: Ratte IgG2a PE	BD Bioscience Pharmigen, Heidelberg, Deutschland

Anti-Maus CD11b PE Ratte IgG2b	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Isotyp CD11b PE: Ratte IgG2a PE	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-Maus CD11c APC Armenischer Hamster IgG1	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Isotyp CD11c APC: Armenischer Hamster IgG1 APC	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-Maus CD3 PerCP Armenischer Hamster IgG1	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Isotyp CD3 PerCP: Armenischer Hamster IgG1 PerCP	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-Maus Gr-1 APC Ratte IgG2b	eBioscience, San Diego, CA, USA
Isotyp Gr-1 APC: Ratte IgG2b APC	eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti-Maus Ly6C Biotin	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Streptavidin-APC	BioLegend, San Diego, CA, USA
Serum	
Rattenserum (Wistar Han)	gewonnen aus Ratten der FEM, Charité, Berlin
Hamsterserum	Sigma, Steinheim, Deutschland

2.6 Software und Datenbanken

Acrobat Reader	Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
Cellquest Pro	BD, Bioscience, Heidelberg, Deutschland
LightCycler Software, Version 3.5	Roche, Mannheim, Deutschland

2.7 Vermehrung von *Toxoplasma-gondii*-Tachyzoiten

Eine murine Makrophagenzelllinie (J774A.1) wurde mit Tachyzoiten des RH-Stammes von *T. gondii* infiziert und bis zur Lyse der Wirtszellen in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt. Nach 3-4 Tagen waren die Tachyzoiten extrazellulär und es wurden entweder neue Wirtszellen infiziert oder die Tachyzoiten wurden für die Infektion von Mäusen entnommen.

2.8 Murine Infektionsmodelle

2.8.1 Akute Infektion

NMRI-Mäuse wurden mit einer Dosis von 10⁵ Tachyzoiten in 0,2 mL PBS intraperitoneal infiziert. Drei Tage nach der Infektion wurden die Tiere an fünf aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal mit den entsprechenden Medikamenten behandelt. Nach der Behandlung erfolgten an Tag 8 die Tötung der Mäuse, Sektion,

und Aufarbeitung der Organe zur Beurteilung der Wirksamkeit der Medikamente. Die folgenden Medikamente und Dosierungen wurden täglich verabreicht:

Atovaquon:	100 mg/kg Körpergewicht, in 0,2 mL PBS
Pyrimethamin und Sulfadiazin:	0,71 mg/kg Körpergewicht bzw. 30mg/kg Körpergewicht, in jeweils 0,2 mL PBS
Substanz A:	32 mg/kg Körpergewicht, in 0,2 mL PBS, (Ethanol+DMSO 1:1) 1:1
Substanz B:	32 mg/kg Körpergewicht, in 0,2 mL PBS, (Ethanol+DMSO 1:1) 1:1
HDQ:	32 mg/kg Körpergewicht, in 0,2 mL PBS, (Ethanol+DMSO 1:1) 1:1

2.8.2 Mausmodell der Reaktivierungstoxoplasmose

Zysten des *T. gondii*-Stammes ME49 wurden aus Gehirnen von NMRI-Mäusen gewonnen, die 2-3 Monate vorher mit 10 Zysten intraperitoneal infiziert worden waren. Nach Tötung durch Isofloran-Inhalation wurde das Gehirn entnommen und in 1 ml PBS mit Mörser und Pistill homogenisiert. Die Zahl der Zysten im Homogenisat wurde mikroskopisch bestimmt und mit PBS auf 10 Zysten pro 0,2 ml eingestellt. Diese Zystenlösung wurde IRF-8^{-/-} Mäusen oral mit einer Knopfkanüle verabreicht. 48 Stunden nach der Infektion erfolgte für 28 Tage eine Prophylaxe mit Sulfadiazin (400mg/l Trinkwasser) (Abbildung 4). Das beschriebene Mausmodell basiert auf den Publikationen von Suzuki et al.⁹⁴ und Schöler et al.⁴. Nach Absetzen der Sulfadiazin-Therapie an Tag 30 entwickelten die Mäuse eine Reaktivierungstoxoplasmose. Drei Tage nach Absetzen des Sulfadiazins wurde an fünf aufeinander folgenden Tagen mit den unten stehenden Medikamenten

behandelt.

Atovaquon: 100 mg/kg Körpergewicht, in 0,2 mL PBS

Pyrimethamin und Sulfadiazin: 0,71 mg/kg Körpergewicht bzw. 30mg/kg Körpergewicht, in jeweils 0,2 mL PBS

Substanz A: 32 mg/kg Körpergewicht, in 0,2 mL PBS,
(Ethanol+DMSO 1:1) 1:1

Substanz B: 32 mg/kg Körpergewicht, in 0,2 mL PBS,
(Ethanol+DMSO 1:1) 1:1

HDQ: 32 mg/kg Körpergewicht, in 0,2 mL PBS,
(Ethanol+DMSO 1:1) 1:1

An Tag 39 erfolgte die Tötung und Sektion der Mäuse mit nachfolgender Aufarbeitung der Organe zur Testung der Wirksamkeit der Medikamente.

Infektion mit 10 Zysten

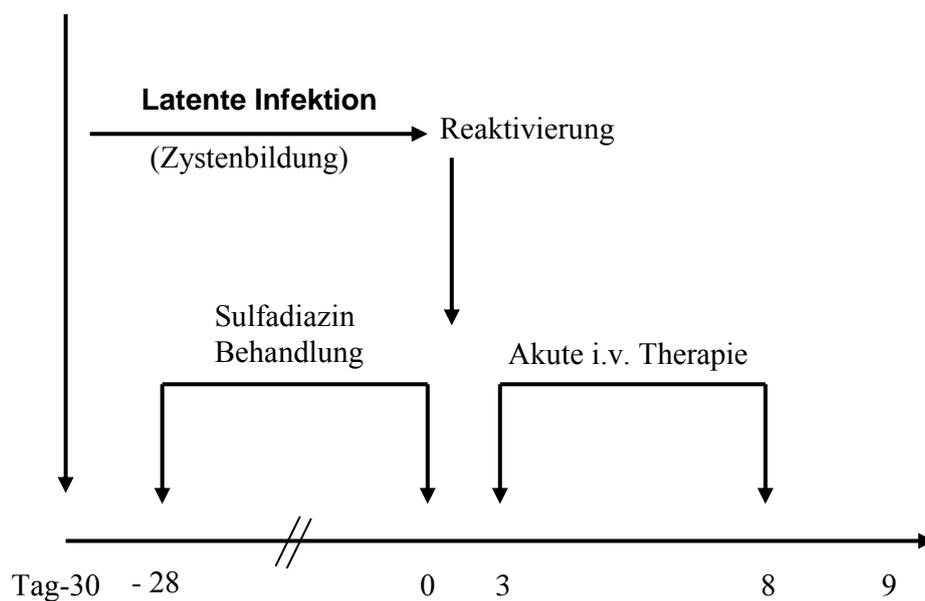


Abbildung 4: Mausmodell der Reaktivierungstoxoplasmosis in Anlehnung an den Verlauf der Infektion beim Immunsupprimierten

2.9 Vorbereitung der Medikamente

Als Positivkontrollen wurden die Standardtherapie bei Patienten, Pyrimethamin (0,71 mg/kg Körpergewicht) und Sulfadiazin (30 mg/kg Körpergewicht), sowie Atovaquon (100 mg/kg Körpergewicht) verwendet. Pyrimethamin, Sulfadiazin und Atovaquon wurden in der entsprechenden Konzentration in PBS gelöst. Um die Medikamente HDQ, Substanz A und Substanz B in Lösung zu bringen, mussten diese aufgrund geringer Wasserlöslichkeit zuerst in einer Mischung aus gleichen Teilen DMSO und Ethanol aufgenommen und anschließend bei 70°C in einem transsonischen Wasserbad gelöst werden. Nach Lösung der Medikamente wurde noch einmal das gleiche Volumen PBS zugegeben.

2.10 Tötung der Tiere und Organentnahme

Die Mäuse wurden mittels Isofloran-Inhalation getötet. Zur Gewinnung von Peritonealzellen wurden 6 ml PBS in die Bauchhöhle gespritzt. Nach vorsichtigem Bewegen des Tieres und Massieren des Bauchs wurde die Peritonealflüssigkeit mit zellulärem Inhalt entnommen. Bauchhöhle, Thorax und Schädel wurden eröffnet, um Milz, Leber, Lunge und das Gehirn zu entnehmen. Für histologische Analysen wurden die Organe in Histologiekassetten in 4%iger Formaldehydlösung gelagert. Für PCR-Analysen wurden die Organe bei 4°C für 48 Stunden gelagert.

2.11 Histologie

Organe in 4%iger Formaldehydlösung wurden entwässert und anschließend über Nacht in Paraffin eingegossen (Institut für Pathologie, CBF, Charité, Berlin). Die Paraffinblöcke wurden in Histologiekassetten eingebettet und auf einer Kühlplatte ausgehärtet. Aus den Paraffinblöcken wurden mit Hilfe eines Mikrotoms 4 µm dicke Organschnitte angefertigt, auf Objektträger aufgenommen und bei 56°C im Trockenschrank über Nacht getrocknet.

2.11.1 Färbung mit Hämatoxin und Eosin

Nach dem Schneiden und Trocknen wurden die Organschnitte durch dreimaliges Waschen in Xylol entparaffiniert und nachfolgend in absteigender Ethanolreihe (2x 100%, 2x 96%, 80%, 70% Ethanol) präpariert. Die Proben wurden in Aqua dest. gewässert und schließlich in einer Hämalaunlösung nach Mayer gefärbt. Nach einer Hämatoxininkubation wurden die Objektträger in Aqua dest. gespült, kurz in 1% HCL-Alkohol eingetaucht und in Leitungswasser und Aqua dest. gespült. Die Schnitte wurden danach in saurem Eosin nach Mayer gefärbt und nach einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol-Inkubation mit Entelan eingedeckt.

2.11.2 Mikroskopische Auswertung

Die HE-gefärbten Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop bei 100- und 200-facher Vergrößerung nach einem standardisierten Scoring-Verfahren auf das Vorhandensein von inflammatorischen Veränderungen in der Leber beurteilt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Definition der Inflammationsgrade in histologischen Schnitten der Leber

Inflammatorische Areale	Score
Klein (0–80 µm)	1 Punkt
Mittel (81–210 µm)	2 Punkte
Groß (>210 µm)	3 Punkte

2.12 Durchflusszytometrie (FACS)

Peritonealflüssigkeiten wurden bei 4°C und 400 g für 10 Minuten zentrifugiert. Durch Zugabe von Erythrozyten-Lyse-Puffer und erneuter Zentrifugation wurden Erythrozyten entfernt. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 2 ml FACS-Wash suspendiert. Die Zellen wurden gezählt und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro Färbung eingesetzt. Die Proben wurden bei 500 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand anschließend abgenommen. Jedes Pellet wurde in 100 ml FACS-Wash aufgenommen. Danach erfolgte die Zugabe von jeweils 2,5 µl Ratten- und Hamsterserum (um unspezifische Bindungen zu blockieren) und den entsprechenden Antikörpern (0,1 µg/100.000 Zellen). Die Proben wurden bei 4°C im Dunkeln für 20 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben mit 100 µl FACS-Wash versetzt, erneut zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Zu den Proben, die Ly6c-Antikörper enthielten, wurde zusätzlich der Zweitantikörper Streptavidin-APC zugegeben. Die Proben wurden erneut bei 4°C im Dunkeln für 15 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben zweimal mit FACS-Wash gewaschen und der Überstand abgenommen. Unter Lichtabschluss wurden die Zellen mit 100 µl FACS-Fix für 15 Minuten bei 4°C fixiert, in Aufbewahrungspuffer suspendiert und bis

zur Messung dunkel und bei 4°C gelagert. Entsprechende Isotypkontrollen wurden für alle Färbungen in gleicher Weise durchgeführt.

2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.13.1 Isolierung der DNA

1 cm große Organstücke wurden in 500 µl Lysispuffer bei 56°C im Schüttler inkubiert, bis sich die Organstücke aufgelöst hatten. Durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 17.000 g wurden Zellreste vom DNA-haltigen Überstand abgetrennt. Die DNA aus 400 µl des Überstandes wurde mit 400 µl Isopropanol gefällt. Das Präzipitat wurde um eine Pipettenspitze gewickelt, kurz in 70% Ethanol getaucht und bis zum Trocknen der DNA aufbewahrt. Die getrocknete DNA wurde in 200-500 µl H₂O aufgenommen und die DNA-Konzentration der Lösung photometrisch bei 260/280 nm bestimmt.

2.13.2 Quantifizierung der DNA von *T. gondii*

Die Quantifizierung der Toxoplasma-DNA in einem DNA-Gemisch wurde mittels Lightcycler[®]-PCR durchgeführt. Hierfür wurde das LightCycler[®] FastStart DNA Master Hybridization Probes-Kit verwendet. 250 ng der DNA aus Organen wurden mit 2 µl Enzymmix, 2 mM MgCl₂, 1 µM jedes Oligonukleotid-Primers (TOX-9: 5'-AggAgAgATATCAggACTgTAg-3'; TOX-10as: 5'-gCgTCgTCTCgTCTAgATCg-3'), 0,2 µM der Hybridisierungs-Oligonukleotide (TOX-HP-1: 5'-gAgTCggAgAgggAgAAgATgTT-FAM-3'; TOX-HP-2: 5'-RED-640-

CCggCTTggCTgCTTTTCCTg-PH-3') zu einem Endvolumen von 10 µl in LightCycler[®]-Plastikkapillaren zusammengefügt. Die PCR wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt: 10 Minuten 95° C zur initialen Denaturierung, 50 Zyklen 95°C für 10 s, 52°C für 20 s und 72°C für 30 s. Zum Abschluss erfolgte ein Zyklus bei 40°C für 30 s mit einem einzelnen Aufnahmepunkt der Fluoreszenz am Ende. Mit jedem Lauf wurde parallel eine Standardkurve der Fluoreszenz einer Verdünnungsreihe von 2,5 pg bis 250 pg *T. gondii*-DNA erstellt. Die Fluoreszenzemission wurde mittels LightCycler[®] Data Analysis Software 3.5 berechnet. Zur Bestimmung des Cp-Wertes (Crossing points) wurde die Methode der zweiten Ableitung benutzt.

2.14 Statistische Analysen

Die Daten wurden mit Hilfe der Software Excel (Version 2008) in eine Datenbank eingegeben. Signifikanzen wurden mit dem Student's t-Test berechnet. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ und eine Tendenz wurde mit $0,05 < p < 0,08$ festgelegt. Für Tierversuche im Model der akuten und reaktivierten Infektion wurden jeweils 3 Versuche durchgeführt. In allen Versuchen wurden 4 Tiere/Gruppe verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur antiparasitären Wirkung neuer Quinolone im Modell der akuten Toxoplasmose

Um den therapeutischen Effekt der neuen Quinolone HDQ, Substanz A und Substanz B gegen den Parasiten *Toxoplasma gondii* zu untersuchen, wurde die antiparasitäre Wirkung im Vergleich zur Kombination aus Pyrimethamin und Sulfadiazin, der Standardtherapie der Toxoplasmose, sowie gegen Atovaquon untersucht. Die Parasitenlast in Leber, Lunge und Gehirn wurde initial im Mausmodell der akuten Infektion, später in einem Modell der Reaktivierungstoxoplasmose, untersucht.

3.1.1 Quantifizierung Toxoplasma-spezifischer DNA in Leber und Lunge

Da die Leber und die Lunge bei der akuten i.p.-Infektion wichtige Orte der Parasitenreplikation darstellen, wurde in diesen Organen mittels quantitativer PCR (qPCR) der Effekt der Therapie auf die Parasitenzahl untersucht. Dabei wurde in der Leber der mit HDQ, Substanz A bzw. Substanz B behandelten Tiere signifikant weniger Toxoplasma-DNA detektiert als bei unbehandelten Kontrolltieren (Abbildung 5). Die Kombinationstherapie mit Pyrimethamin/Sulfadiazin zeigte keinen Unterschied zur Kontrolle. Atovaquon-behandelte Tiere wiesen signifikant weniger Toxoplasma-DNA als Kontrolltiere auf; für Substanz B fand sich zudem eine Tendenz zu geringeren Parasitenkonzentrationen im Vergleich zu Pyrimethamin/Sulfadiazin-behandelten Tieren. Atovaquon erwies sich bei den Untersuchungen als das Therapeutikum mit der größten antiparasitären Wirkung. Die Menge an Toxoplasma-

spezifischer DNA war bei mit Substanz B behandelten Tieren signifikant geringer als bei Tieren, die mit Substanz A bzw. HDQ behandelt worden waren.

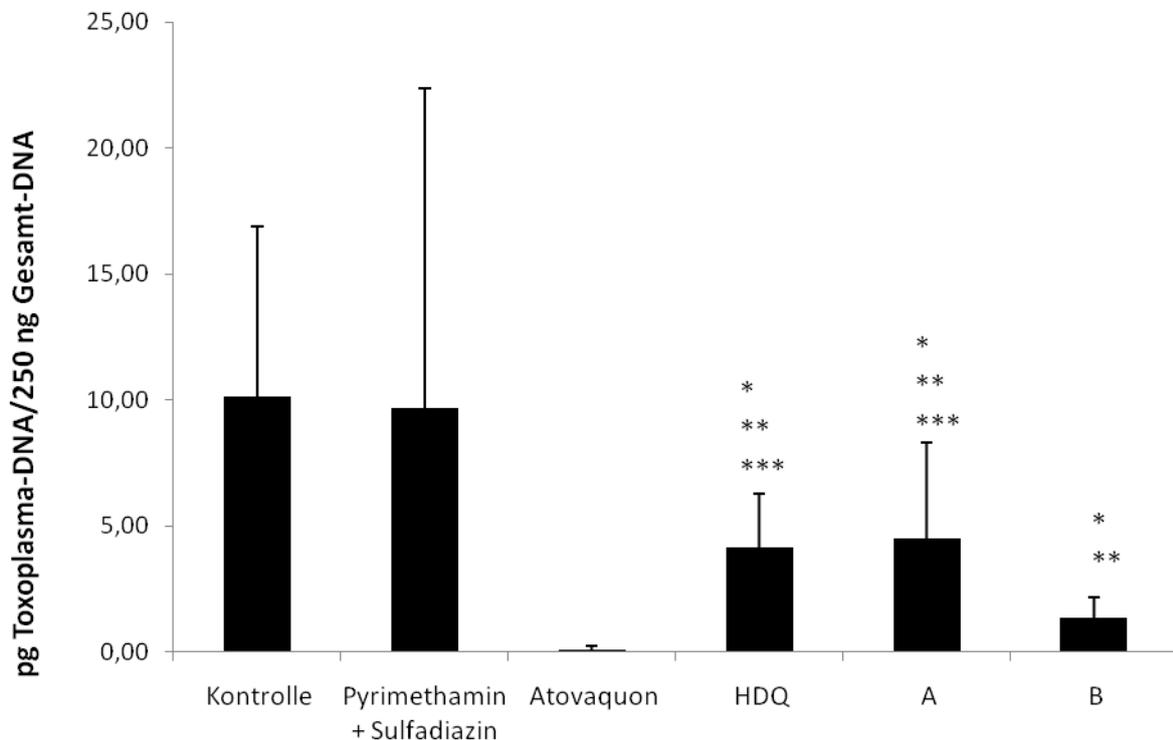


Abbildung 5: Toxoplasma-spezifische DNA in der Leber. NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 10^5 GFP-exprimierenden RH-Tachyzoiten infiziert und 3 Tage nach der Infektion für 5 Tage täglich behandelt. Am Tag 8 post-infectionem wurden die Organe gewonnen. Die Abbildung zeigt gepoolte Daten aus 3 unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. ** $p < 0,05$ vs. Atovaquon. * $p < 0,05$ vs. Substanz B.**

Aufgrund einer hohen Standardabweichung der Einzelwerte der Parasitenkonzentrationen fanden sich in der Lunge keine signifikanten Unterschiede in der Toxoplasmen-Konzentration der unterschiedlichen Therapiegruppen (Abbildung 6) im Vergleich zu den Kontrolltieren. Nur Atovaquon zeigte im Vergleich zur Kontrolle bzw. der Pyrimethamin/Sulfadiazin-Therapie eine tendenziell geringere DNA-Konzentration. Sowohl Atovaquon als auch Substanz B und Substanz A zeigten einen signifikant stärkeren antiparasitären Effekt als HDQ.

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass neue Quinolone, insbesondere Substanz B, antiparasitäres Potential im Modell der akuten Infektion mit *T. gondii* besitzen.

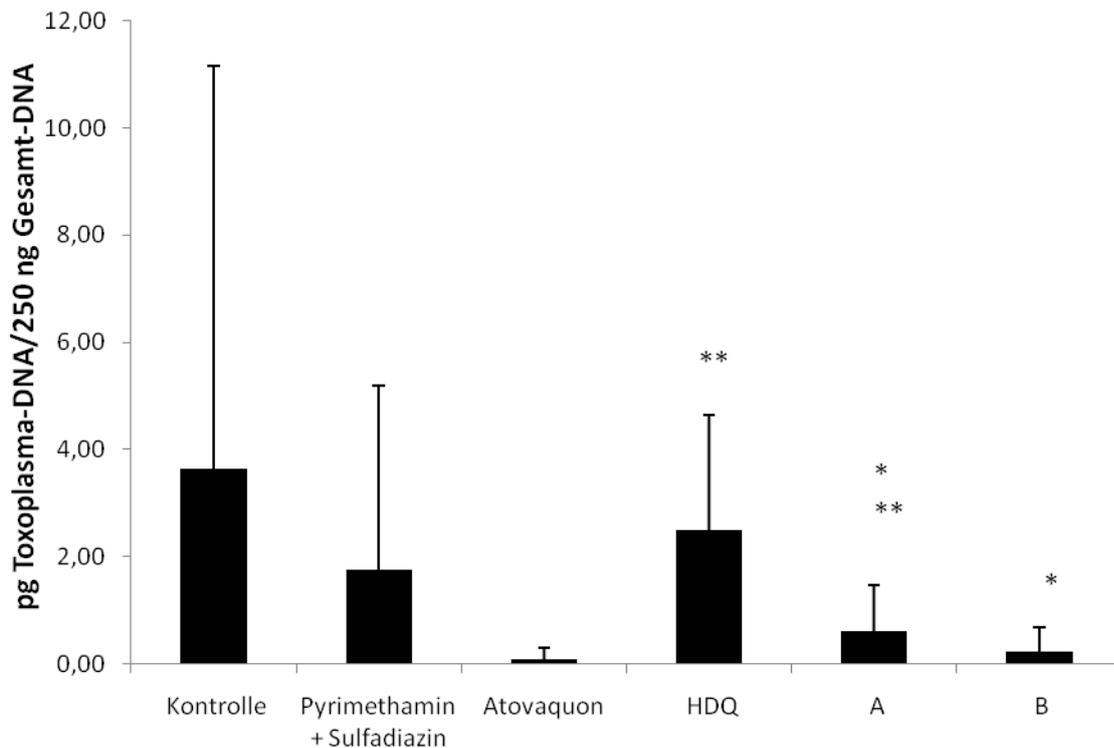


Abbildung 6: Toxoplasma-spezifische DNA in der Lunge. NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 10^5 GFP-exprimierenden RH Tachyzoiten infiziert und 3 Tage nach der Infektion für 5 Tage täglich behandelt. Am Tag 8 post-infectionem wurden die Organe entfernt. Die Abbildung zeigt gepoolte Daten aus 3 unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ vs. HDQ. ** $p < 0,05$ vs. Atovaquon.

3.1.2 Histologische Befunde

Neben der Bestimmung der Toxoplasma-DNA-Konzentrationen wurden auch histologische Untersuchungen zur Bestimmung des Inflammationsgrades in Organen durchgeführt. Die histologische Beurteilung inflammatorischer Areale in der Leber zeigte für alle Medikamente einen im Vergleich zur Kontrolle signifikant geringeren Inflammationsgrad (Abbildung 7). Der Einsatz von Atovaquon reduzierte die Zahl

inflammatorischer Areale am deutlichsten, was am ehesten durch die geringe Parasitenlast erklärt wird. Bei den mit Substanz A behandelten Tieren waren signifikant weniger inflammatorische Areale als bei den mit HDQ behandelten Tieren nachweisbar. Auch für die Substanz B wurde ein tendenziell geringerer Grad an inflammatorischen Veränderungen im Vergleich zu HDQ gefunden (Abbildungen 7 und 8).

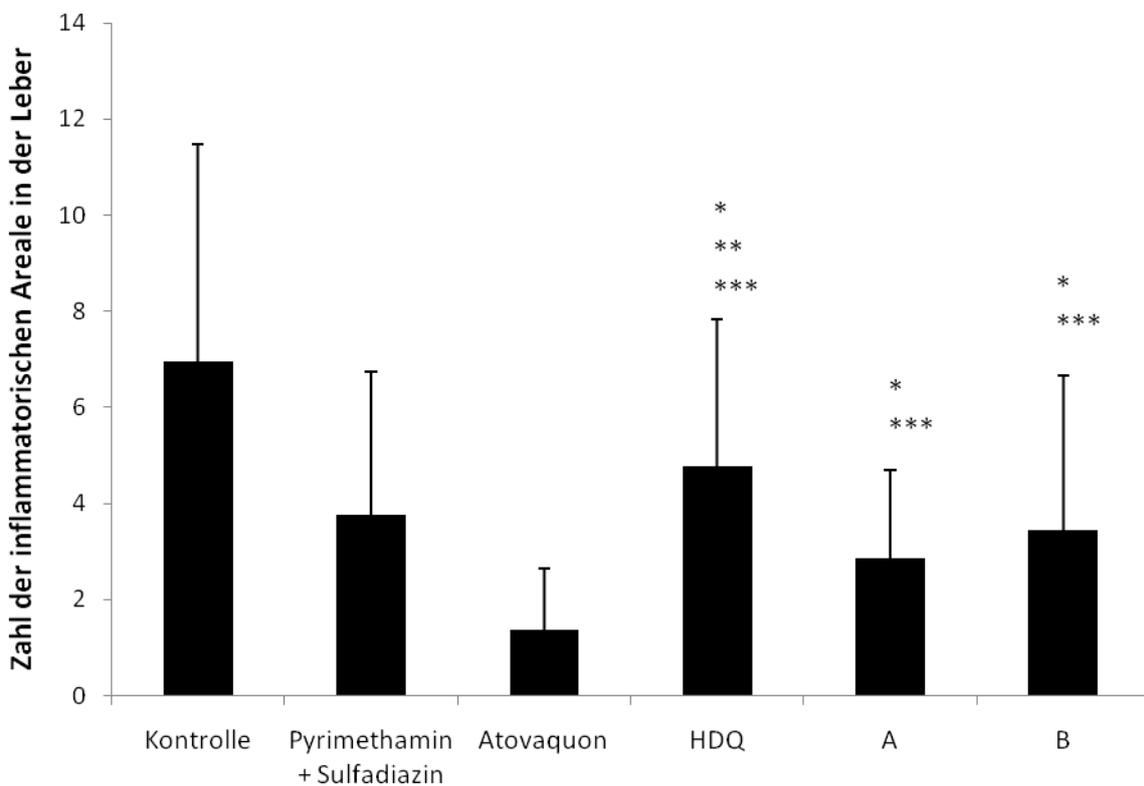


Abbildung 7: Zahl inflammatorischer Areale in der Leber infizierter Mäuse. NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 10^5 GFP-exprimierenden RH Tachyzoiten infiziert und 3 Tage nach der Infektion für 5 Tage täglich behandelt. Am Tag 8 post-infectionem wurden die Organe entfernt. Die Abbildung zeigt gepoolte Daten aus 3 unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. ** $p < 0,05$ vs. Pyrimethamin + Sulfadiazin. * $p < 0,05$ vs. Atovaquon.**

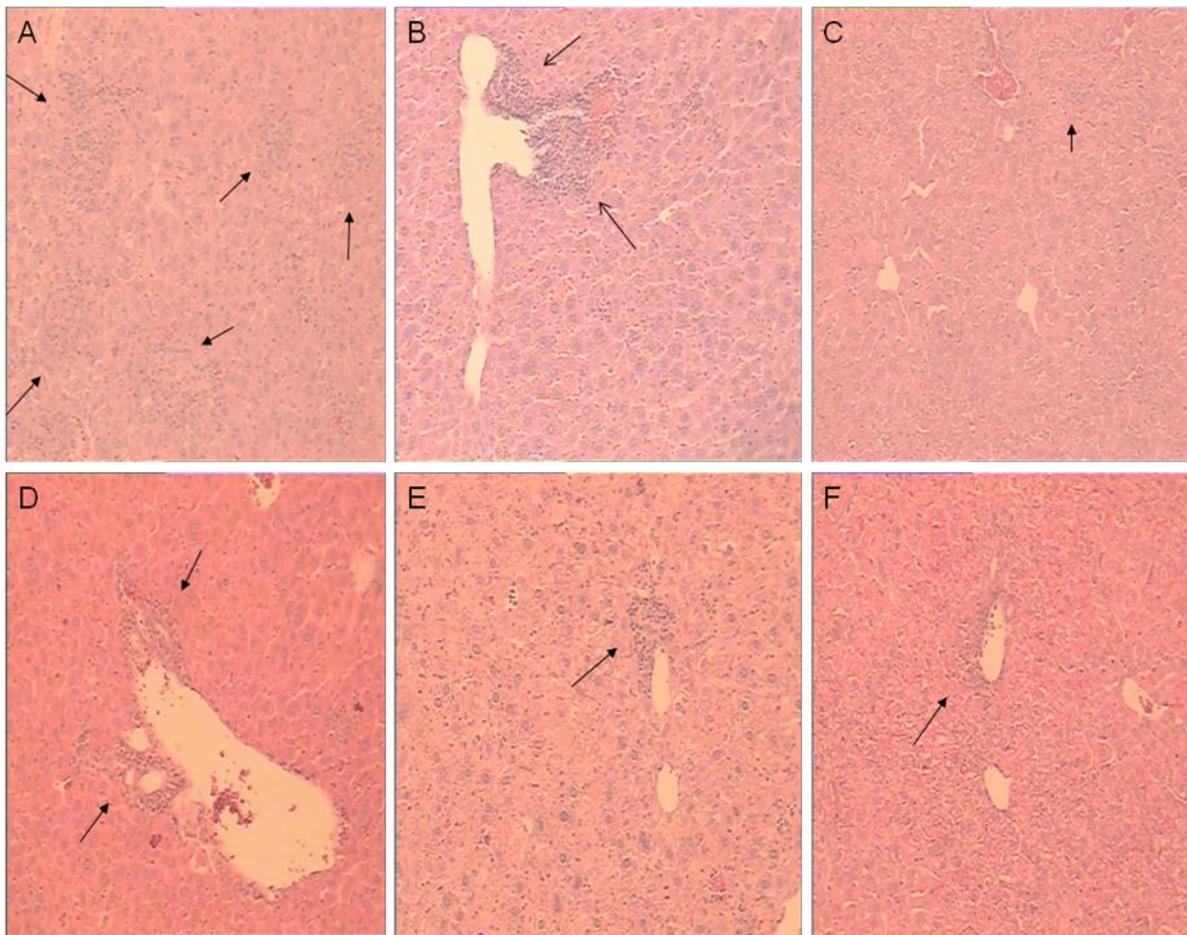


Abbildung 8: Histologische Veränderungen in der Leber *T. gondii*-infizierter Mäuse. A, unbehandelte Kontrolle. B, Behandlung mit Pyrimethamin/Sulfadiazin. C, Behandlung mit Atovaquon. D, Behandlung mit HDQ. E, Behandlung mit Substanz A. F, Behandlung mit Substanz B. Pfeile weisen auf entzündliche Areale hin.

3.1.3 Durchflusszytometrische Untersuchung von Peritonealzellen

Die Zahl infizierter Peritonealzellen wurde als zusätzlicher Parameter zur Beurteilung der antiparasitären Wirkung der Medikamente bestimmt. Bei Tieren, die mit Atovaquon oder den neuen Quinolonen HDQ, Substanz A und Substanz B behandelt worden waren, konnte ein signifikant geringerer Prozentsatz an infizierten Peritonealzellen als bei unbehandelten Kontrolltieren oder bei mit

Pyrimethamin/Sulfadiazin behandelten Tieren nachgewiesen werden (Abbildung 9). Zudem war die Infektionsrate der Peritonealzellen nach Atovaquonbehandlung niedriger als nach Behandlung mit HDQ, während die Substanzen A und B lediglich zu einer tendenziell geringeren Infektionsrate als HDQ führten. Somit zeigen die neuen Quinolone eine bessere antiparasitäre Wirkung als die herkömmliche Standardtherapie mit Pyrimethamin/Sulfadiazin.

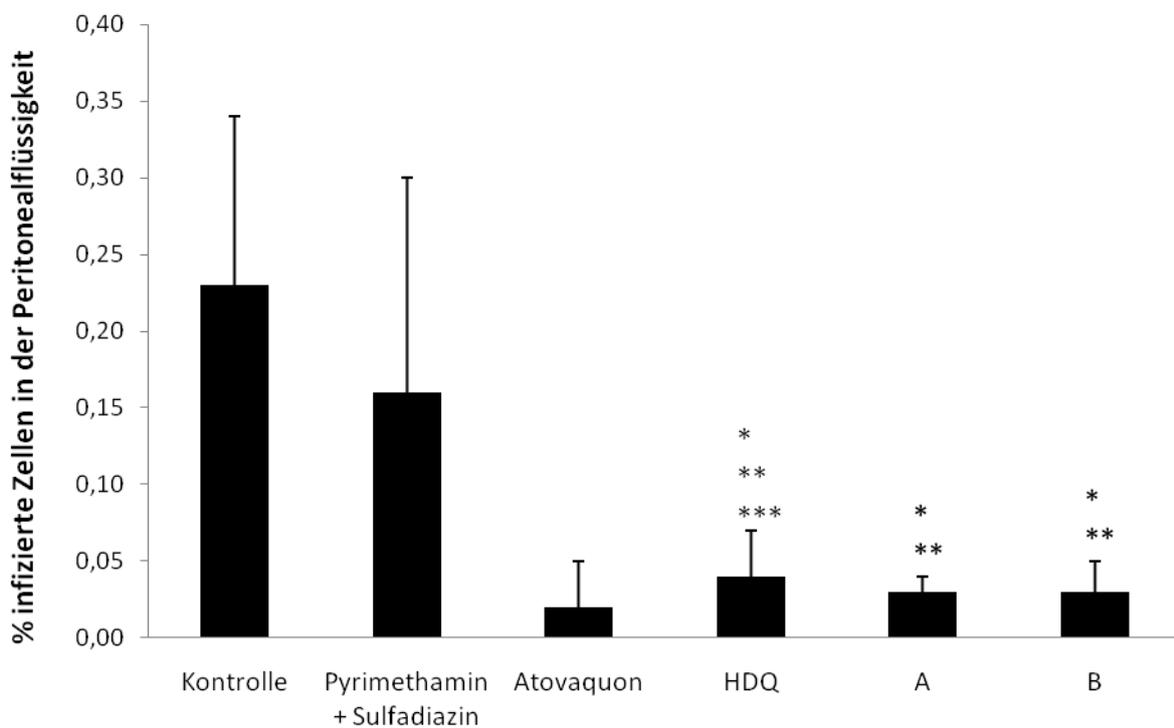


Abbildung 9: Prozentzahl infizierter Peritonealzellen 8 Tage nach Infektion mit 10^5 GFP-expressing RH Tachyzoiten und antiparasitärer Behandlung. Die Abbildung zeigt gepoolte Daten aus 3 unabhängigen Versuchen. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. ** $p < 0,05$ vs. Pyrimethamin + Sulfadiazin. * $p < 0,05$ vs. Atovaquon.**

3.1.4 Durchflusszytometrische Untersuchung peritonealer Immunzellpopulationen

Um die Zusammensetzung der Immunzellen in der Peritonealflüssigkeit zu untersuchen, wurden Peritonealzellen isoliert und mit zellspezifischen Antikörpern gefärbt. Peritonealzellen infizierter Kontrolltiere setzten sich 8 Tage nach der Infektion wie folgt zusammen: 38,7±16,1% Granulozyten/Monozyten (Gr-1⁺), 41,7±7,9% T-Lymphozyten (CD3⁺), 36,3±6,2% Monozyten (CD11b⁺/CD11c⁻), 3,7±2,9% dendritische Zellen (CD11c⁺). Die mit HDQ, Atovaquon und Substanz A behandelten Gruppen zeigten eine signifikant höhere Anzahl an Monozyten. Die Atovaquon-behandelte Gruppe wies eine deutlich größere Zahl an Granulozyten und weniger T-Lymphozyten auf. Die HDQ-behandelte Gruppe zeigte eine signifikant geringere Anzahl von T-Lymphozyten als Kontrolltiere.

Monozyten zeigten die höchsten Infektionsraten, dendritische Zellen hingegen die geringsten. Die Infektionsraten unterschiedlicher Zellen infizierter Kontrolltiere waren wie folgt: Granulozyten (Gr-1⁺) 60,9±20,6%, T-Lymphozyten (CD3⁺) 23,4±7,8%, Monozyten (CD11b⁺/CD11c⁻) 63,8±12,1% und dendritische Zellen (CD11c⁺) 2,6±3,3%. Bei Substanz-A- und Substanz-B-behandelten Gruppen war eine signifikant höhere Anzahl von infizierten Monozyten zu beobachten. Die mit HDQ behandelte Gruppe wies eine deutlich größere Zahl von infizierten Monozyten und infizierten Granulozyten auf. Auch war die Menge dendritischen Zellen signifikant geringer.

Bei der nicht-infizierten Zellpopulation war die Anzahl der T-Lymphozyten am höchsten und die der dendritischen Zellen am geringsten. Peritonealzellen nicht-infizierter Kontrolltiere setzten sich wie folgt zusammen: Granulozyten (Gr-1⁺) 38,7±16,1%, T-Lymphozyten (CD3⁺) 41,9±7,9%, Monozyten (CD11b⁺/CD11c⁻)

36,2±6,3% und dendritische Zellen (CD11c⁺) 3,7±2,9%. Die Anzahl an T-Lymphozyten war bei mit HDQ-, Atovaquon-, Substanz-A- und Substanz-B-behandelten Gruppen signifikant geringer als bei Kontrollgruppe. Bei den mit HDQ-, Atovaquon- und Substanz-A- behandelten Gruppen war die Anzahl von Monozyten deutlich größer.

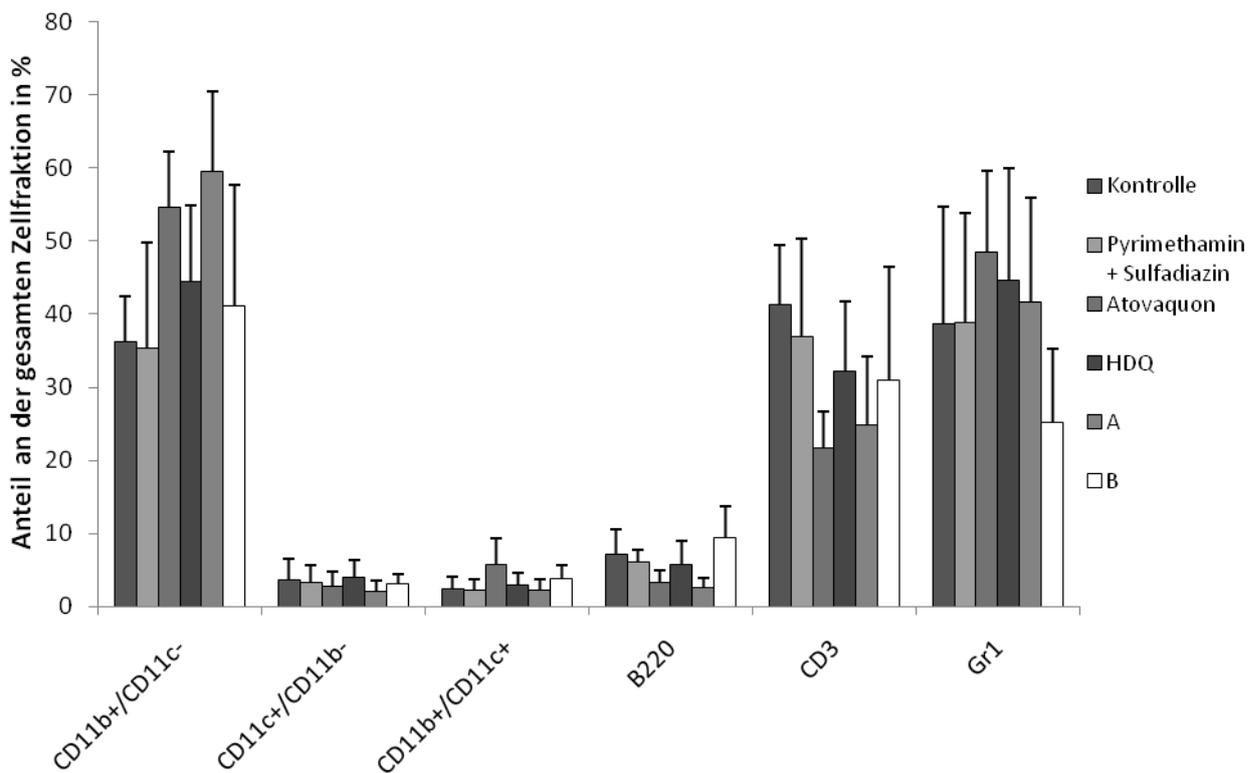


Abbildung 10: Anteil verschiedener Immunzellpopulationen an der Gesamtzahl aller Peritonealzellen. NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 10⁵ GFP-exprimierenden RH Tachyzoiten infiziert und 3 Tage nach der Infektion für 5 Tage täglich behandelt. Am Tag 8 post-infectionem wurde die Peritonealflüssigkeit gewonnen.

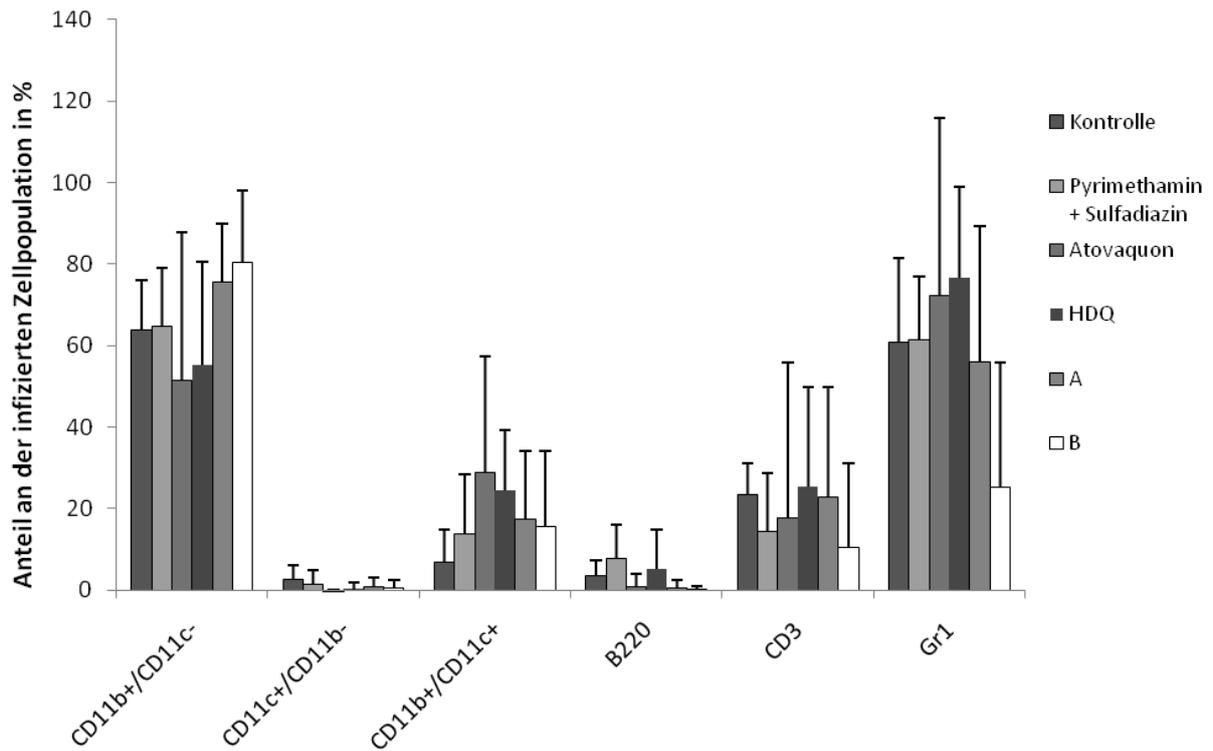


Abbildung 11: Anteil verschiedener Immunzellpopulationen an der infizierten Zellpopulation. NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 10^5 GFP-exprimierenden RH-Tachyzoiten infiziert und 3 Tage nach der Infektion täglich für 5 Tage behandelt. Am Tag 8 post-infectionem wurde die Peritonealflüssigkeit entfernt.

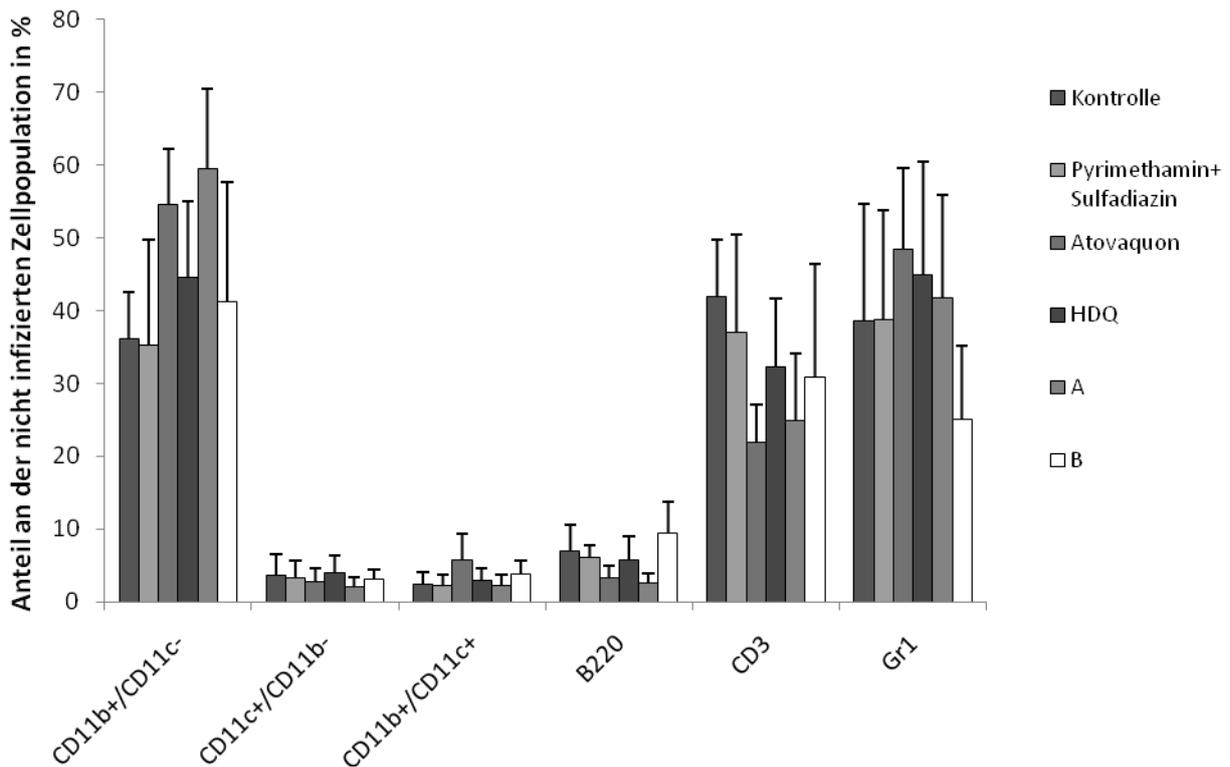


Abbildung 12: Anteil verschiedener Immunzellpopulationen an der nicht infizierten Zellpopulation. NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 10^5 GFP-exprimierenden RH-Tachyzoiten infiziert und 3 Tage nach der Infektion für 5 Tage täglich behandelt. Am Tag 8 post-infectionem wurde die Peritonealflüssigkeit entfernt.

Zusammenfassend setzten sich die Peritonealzellen infizierter Kontrolltiere 8 Tage post-infectionem v.a. aus Granulozyten, Monozyten und T-Lymphozyten zusammen. Beim Vergleich der Peritonealflüssigkeit der unbehandelten Kontrollgruppe mit anderen Gruppen fiel v.a. die bei mit HDQ-, Substanz-A- und Atovaquon-behandelten Gruppen signifikant höhere Anzahl von Monozyten auf.

Auch der Anteil an $Ly6c^+/CD11b^+$ -Zellen (am ehesten inflammatorische Monozyten) wurde bestimmt, da ihre Anwesenheit entscheidend für die Kontrolle der *T. gondii*-Infektion ist⁹⁵. Bei allen Gruppen, außer der Kontroll- und Standardtherapie-gruppe, bestand die Mehrheit der $Ly6c^+$ - und/oder $CD11b^+$ -exprimierenden Peritonealzellen aus $Ly6c^+/CD11b^+$ -Zellen. Atovaquon- und Substanz-A-behandelte Tiere zeigten

eine signifikant höhere Menge an Ly6c⁺/CD11b⁺ als die Kontrollgruppe (Abbildung 13).

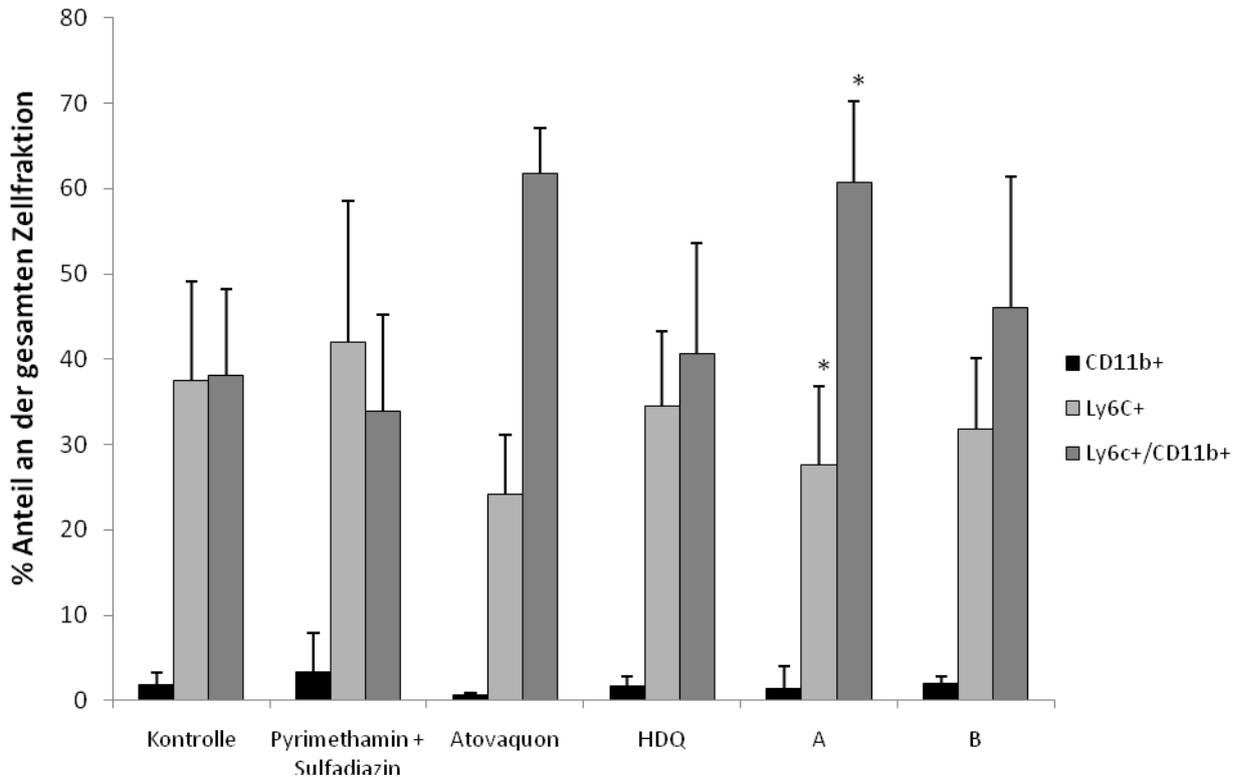


Abbildung 13: Anteil verschiedener Immunzellpopulationen an der gesamten Zellpopulation. NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 10^5 GFP-exprimierenden RH-Tachyzoiten infiziert und 3 Tage nach der Infektion für 5 Tage täglich behandelt. Am Tag 8 post-infectionem wurde die Peritonealflüssigkeit entfernt * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Die Ly6c⁺/CD11b⁺-Immunzellpopulation zeigte dabei die höchste Infektionsrate in allen Gruppen im Vergleich zu CD11b⁺/Ly6c⁻ und zu Ly6c⁺/CD11b⁻ (Abbildung 14).

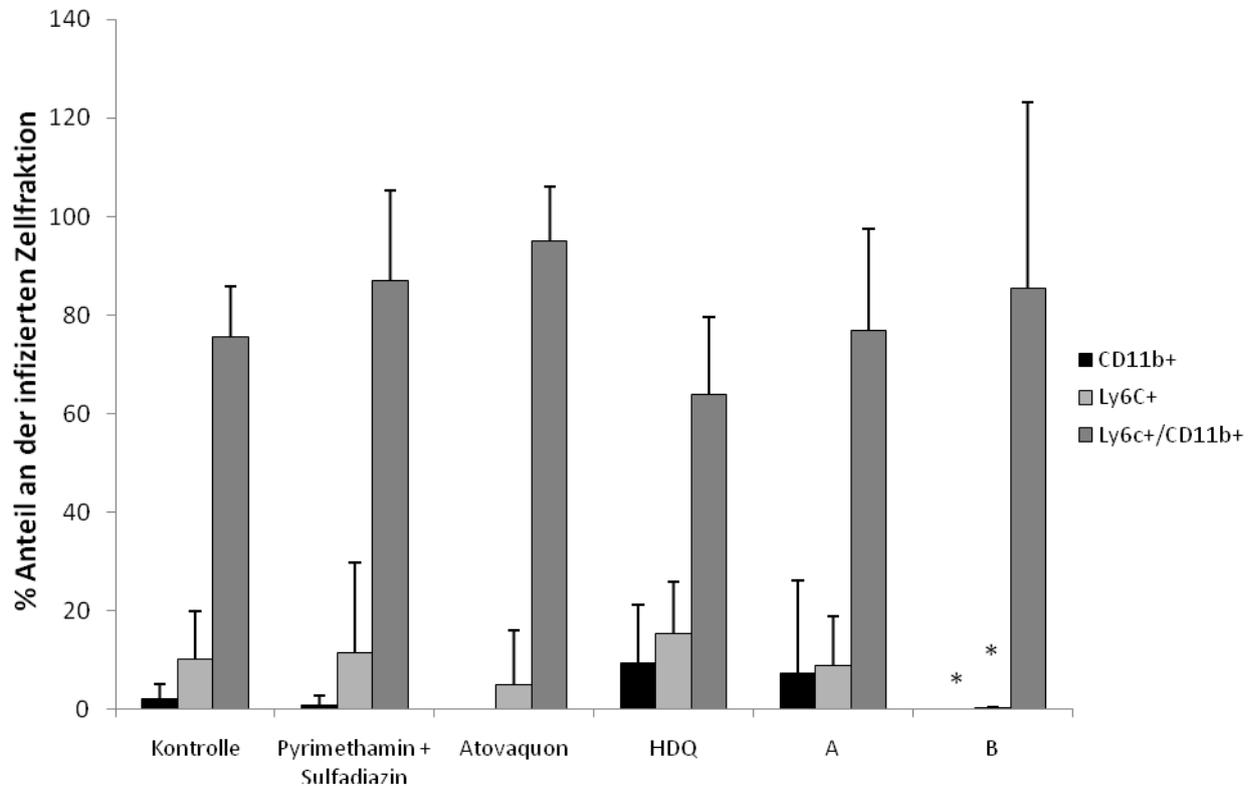


Abbildung 14: Anteil verschiedener Immunzellpopulationen an der infizierten Zellpopulation. NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 10^5 GFP-exprimierenden RH-Tachyzoiten infiziert und 3 Tage nach der Infektion für 5 Tage täglich behandelt. Am Tag 8 post-infectionem wurde die Peritonealflüssigkeit entfernt. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Bei den nicht infizierten Peritonealzellen war die Anzahl inflammatorischer Monozyten bei den Atovaquon- und Substanz-A-behandelten Gruppen signifikant höher als bei der Kontrollgruppe (Abbildung 15).

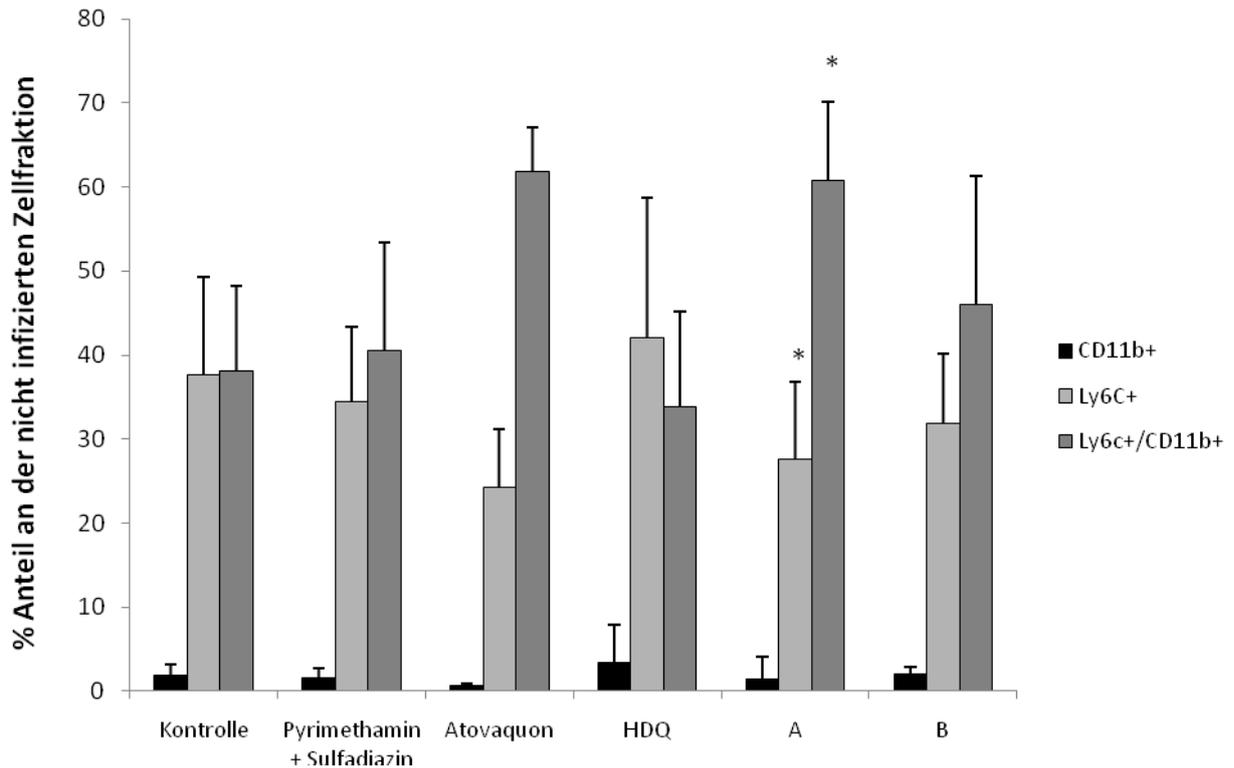


Abbildung 15: Anteil verschiedener Immunzellpopulationen an der nicht infizierten Zellpopulation. NMRI-Mäuse wurden i.p. mit 10^5 GFP-exprimierenden RH-Tachyzoiten infiziert und 3 Tage nach der Infektion für 5 Tage täglich behandelt. Am Tag 8 post-infectionem wurde die Peritonealflüssigkeit entfernt. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der PCR, der Histologie und der Durchflusszytometrie darauf hin, dass neue Quinolone, insbesondere die Substanzen A und B, antiparasitäre Wirksamkeit im Modell der akuten Infektion mit *T. gondii* besitzen. Der antiparasitäre Effekt war dem der Standardtherapie Pyrimethamin/Sulfadiazin ähnlich, teilweise sogar überlegen.

3.2 Untersuchungen zur antiparasitären Wirkung neuer Quinolone im Modell der Reaktivierungstoxoplasmose

Nachdem im Modell der akuten Infektion mit *T. gondii* eine antiparasitäre Wirkung der neuen Quinolone gezeigt werden konnte, wurde im Folgenden die Wirksamkeit in einem Modell der Reaktivierungstoxoplasmose untersucht, das den Verlauf der reaktivierten Infektion bei Immunsupprimierten widerspiegelt.

3.2.1 Quantifizierung Toxoplasma-spezifischer DNA im Gehirn

Wie im Modell der akuten Infektion wurde auch im Modell der Reaktivierungstoxoplasmose mittels qPCR eine Quantifizierung Toxoplasma-spezifischer DNA in Leber und Gehirn vorgenommen. Bei der Untersuchung der Gehirnproben stellte sich heraus, dass nur die Atovaquon-Behandlung zu einem signifikanten Rückgang der Toxoplasma-konzentration führte (Abbildung 16). Die Gabe von Pyrimethamin/Sulfadiazin sowie von Substanz B führte zu einer tendenziellen Verringerung der Parasitenlast, während sich die Parasitenlast in den restlichen Gruppen nicht von der der Kontrollgruppe unterschied.

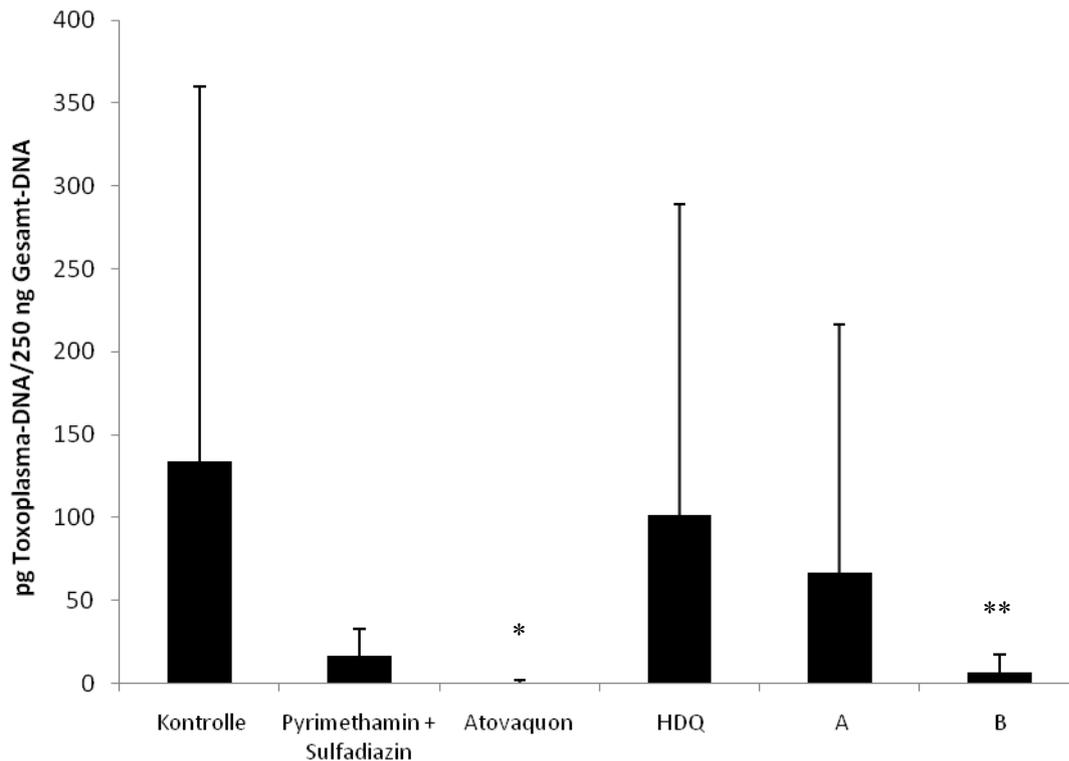


Abbildung 16: Toxoplasma-spezifische DNA im Gehirn. IRF8^{-/-}-Mäuse wurden i.p. mit 10 Zysten des *T. gondii*-Stammes ME49 Typ II infiziert und 2 Tage nach der Infektion täglich für 28 Tage mit Sulfadiazin (400mg/l) behandelt. Drei Tage nach dem Entfernen des Sulfadiazins wurden die Tiere an 5 aufeinander folgenden Tagen mit den entsprechenden Medikamenten behandelt. Am Tag 39 post-infectionem wurden die Organe entfernt. Die Abbildung zeigt gepoolte Daten aus 3 unabhängigen Versuchen. * p < 0,05 vs. Kontrolle. ** p = Tendenz vs. Kontrolle.

3.2.2 Histologische Befunde

Zusätzlich zeigte sich in histologischen Untersuchungen von Leberschnitten, dass alle Medikamente die Anzahl inflammatorischer Areale im Parenchym und perivaskulär verringerten (Abbildung 17).

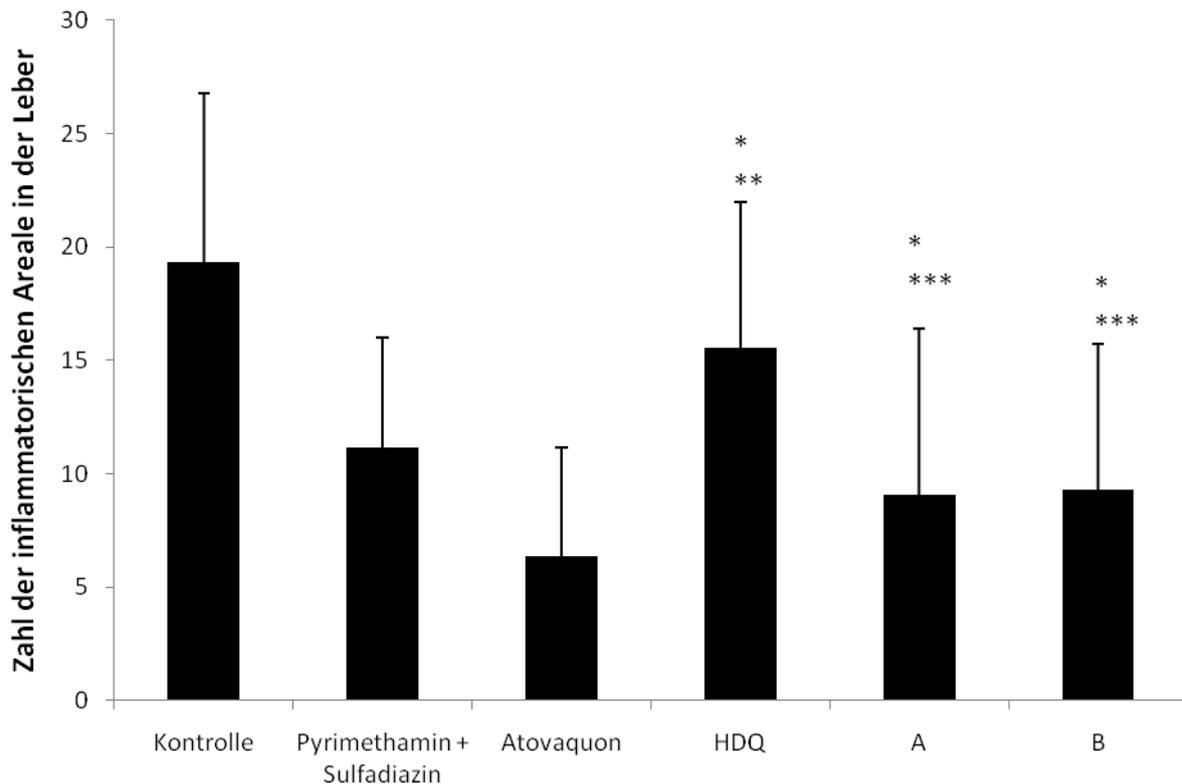


Abbildung 17: Histologische Befunde in der Leber. IRF8^{-/-}-Mäuse wurden i.p. mit 10 Zysten des *T. gondii*-Stammes ME49 Typ II infiziert und 2 Tage nach der Infektion täglich für 28 Tage mit Sulfadiazin (400mg/l) behandelt. Drei Tage nach dem Entfernen des Sulfadiazins wurden die Tiere an 5 aufeinander folgenden Tagen mit den entsprechenden Medikamenten behandelt. Am Tag 39 post-infectionem wurden die Organe entfernt. Die Abbildung zeigt gepoolte Daten aus 3 unabhängigen Versuchen. * p < 0,05 vs. Kontrolle. ** p < 0,05 vs. Pyrimethamin + Sulfadiazin. *** p < 0,05 vs. HDQ.

Die Therapie mit den Substanzen A und B führte zu einer signifikant geringeren Zahl an inflammatorischen Arealen als die Therapie mit HDQ. In Gehirnschnitten konnte gezeigt werden, dass Atovaquon sowie die Substanzen A und B auch im Gehirn für eine signifikant geringere Anzahl inflammatorischer foci als in den Kontrolltieren sorgten (Abbildung 18).

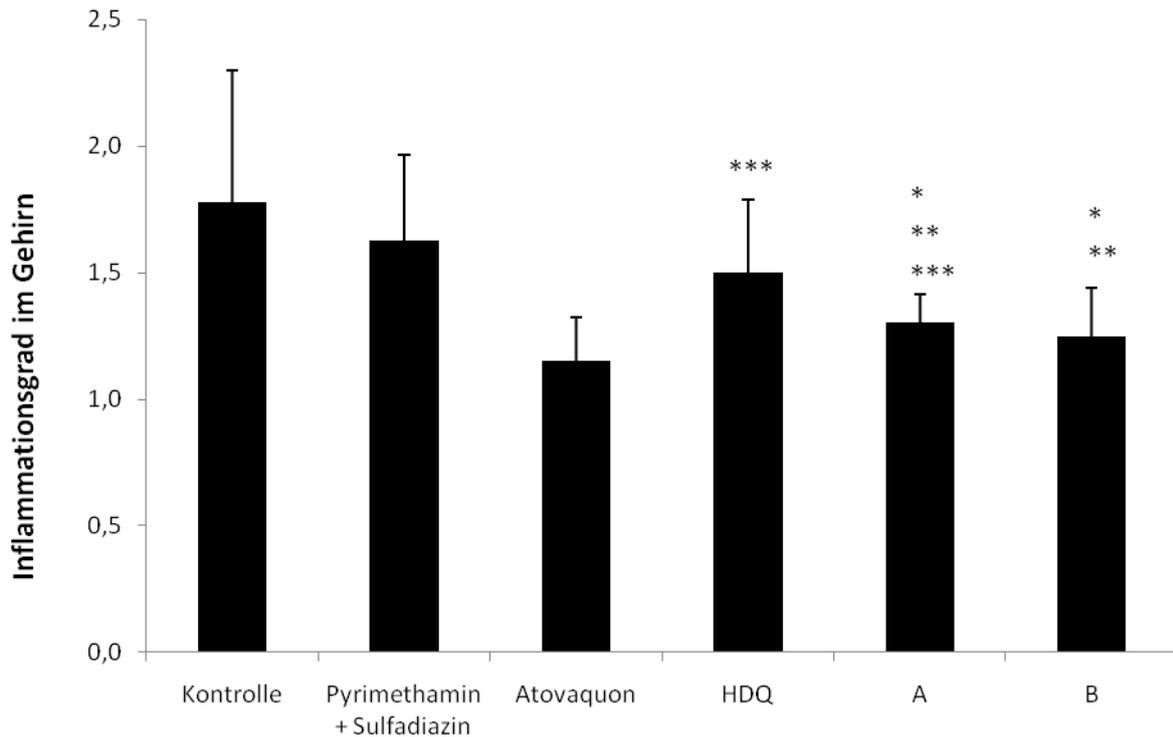


Abbildung 18: Histologische Befunde im Gehirn. IRF8^{-/-}-Mäuse wurden i.p. mit 10 Zysten des *T. gondii*-Stammes ME49 Typ II infiziert und 2 Tage nach der Infektion täglich für 28 Tage mit Sulfadiazin (400mg/l) behandelt. Drei Tage nach dem Entfernen des Sulfadiazins wurden die Tiere an 5 aufeinander folgenden Tagen mit den entsprechenden Medikamenten behandelt. Am Tag 39 post-infectionem wurden die Organe entfernt. Die Abbildung zeigt gepoolte Daten aus 3 unabhängigen Versuchen. * p < 0,05 vs. Kontrolle. ** p < 0,05 vs. Pyrimethamin + Sulfadiazin. * p < 0,05 vs. Atovaquon.**

Die Substanzen A und B führten dabei zu einer signifikant geringeren Zahl an inflammatorischen Arealen als HDQ und die Standardtherapie mit Pyrimethamin und Sulfadiazin.

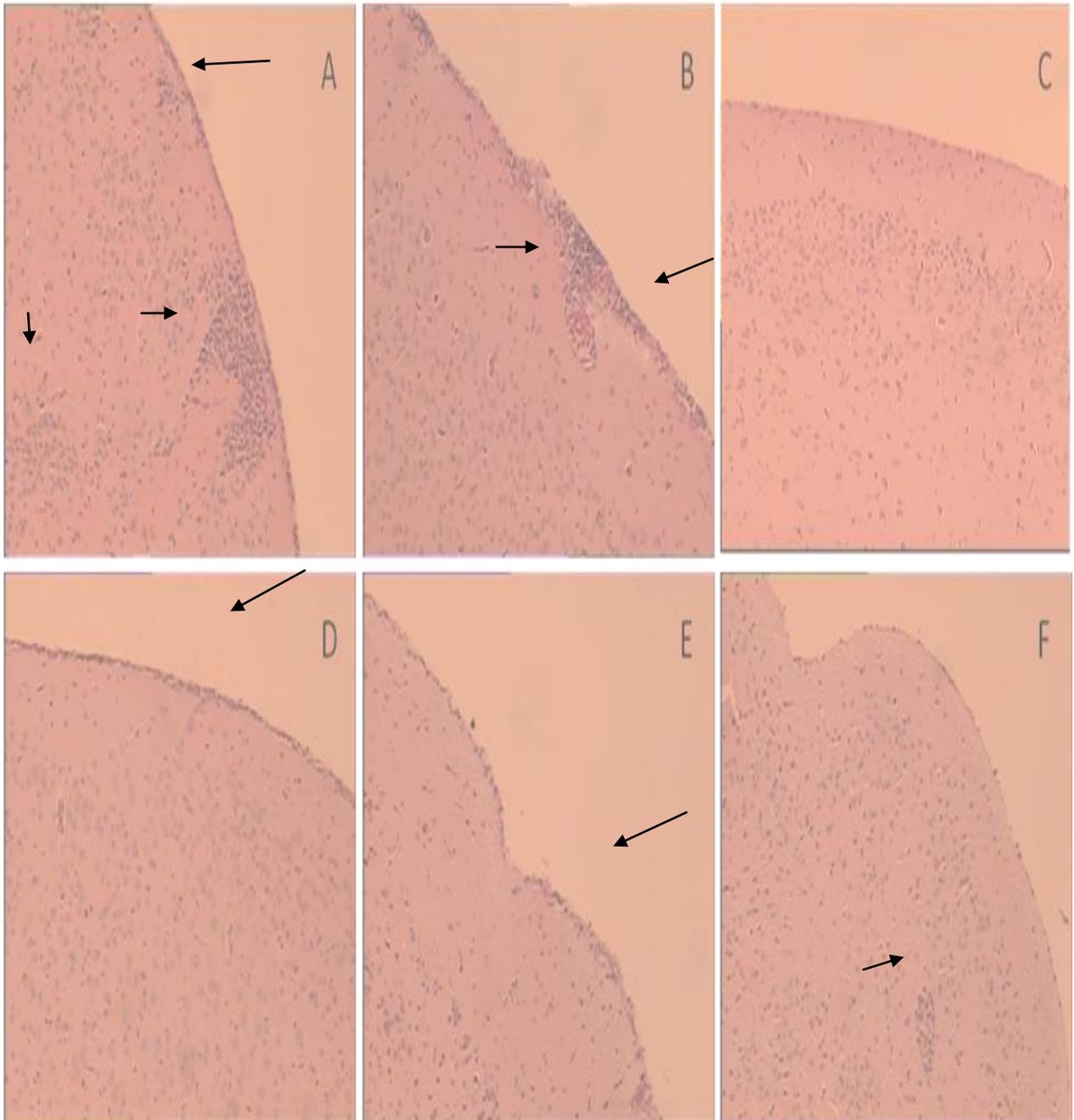


Abbildung 19: Histologische Veränderungen im Gehirn *T. gondii*-infizierter Mäuse unter i.p. Behandlung. A, unbehandelte Kontrolle mit Verdickung der Meningen und inflammatorischen foci. B, Behandlung mit Pyrimethamin + Sulfadiazin. C, Behandlung mit Atovaquon. D, Behandlung mit HDQ. E, Behandlung mit Substanz A. F, Behandlung mit Substanz B. Lange Pfeile weisen auf verdickte Meningen hin, kurze Pfeile auf entzündliche Areale im Parenchym.

Zusammenfassend weisen die Daten zur Parasitenlast und den histologischen Veränderungen im Gehirn darauf hin, dass die neuen Quinolone Substanz A und

Substanz B therapeutische Wirksamkeit gegen *T. gondii* im Modell der Reaktivierungstoxoplasmose haben. Die Substanzen A und B wiesen in der histologischen Analyse des Gehirnes sogar bessere Ergebnisse als die Standardtherapie auf. Nur die Behandlung mit Atovaquon zeigte eine den neuen Quinolonen überlegene Wirksamkeit gegen *T. gondii*.

4. Diskussion

Die Standardtherapie zur Behandlung von Infektionen durch *T. gondii* ist die Kombination von Pyrimethamin und Sulfadiazin oder Clindamycin³⁰. Allerdings ist diese Kombination mit viele Nebenwirkungen wie anaphylaktischen Reaktionen und Knochenmarkdepression assoziiert^{2 96-97}. Bei HIV-Patienten ist die Häufigkeit der Nebenwirkungen so hoch, dass sie in etwa 40–50% der Fälle zum Absetzen oder Umstellen der Behandlung auf weniger wirksame Therapeutika führt^{5 52 96}. Darüber hinaus ist diese Therapie nur zur Abtötung der Tachyzoiten, nicht jedoch der Zystenform in der Lage; die Zysten aber stellen die Quelle der klinisch bedeutsamen Reaktivierungen bei Immunsupprimierten dar.

Alternative Therapien setzen sich aus der Kombination von Pyrimethamin mit Atovaquon oder Makroliden zusammen. Diese Kombinationen sind allerdings weniger gut untersucht und erreichen nicht den Wirkungsgrad der Standardkombination Pyrimethamin plus Sulfadiazin^{33 58}.

Neuere experimentelle Therapien, die ein weniger nebenwirkungsreiches Profil zum Ziel haben, sind gegen parasitenspezifische Enzyme gerichtet. Während Säugetiere eine rotenonempfindliche Typ-I-NADH-Dehydrogenase besitzen, verfügt *T. gondii* über eine alternative (Typ-II)-NADH-Dehydrogenase⁸. Dies kann in der Therapie mit Arzneimitteln wie dem Komplex-III-Hemmer Atovaquon ausgenutzt werden⁹⁸⁻¹⁰⁰. Die Substanz 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)-Quinolon (HDQ), ein Hochaffinitätsinhibitor der alternativen NADH-Dehydrogenase von *T. gondii* (TgNDH2-I)¹⁰, hemmt die Replikation von *T. gondii* durch einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und eine Verringerung der zellulären ATP-Konzentration⁹⁻¹⁰. Darüber hinaus wurden zwei neue 1-Hydroxyquinolone, Substanz A und Substanz B,

hergestellt (Tietze et al., in Vorbereitung), in denen bei Substanz A das Wasserstoffatom an C-3 des HDQ durch eine Methylgruppe ersetzt wurde, während bei Substanz B die Dodecyl- und die Methylgruppe ausgetauscht wurden. Saleh et al. zeigten, dass HDQ eine hohe antiparasitäre Wirkung gegen *T. gondii* in einem *in-vitro*-Modell besitzt⁸. Die Substanz konnte die Vermehrung des Parasiten mit einer IC50 im nanomolaren Bereich hemmen. Gleichzeitig wurde auch bei einer Konzentration von 10 µM keine Toxizität auf die Wirtszellen festgestellt⁸.

Aufgrund der vielversprechenden *in-vitro*-Ergebnisse sollte in der vorliegenden Arbeit anhand von zwei klinisch relevanten Mausmodellen der Infektion mit *T. gondii* die therapeutische Wirksamkeit des HDQ sowie der Substanzen A und B untersucht werden. Neben der Wirksamkeit bei der akuten Infektion wurde die Wirksamkeit zur Behandlung einer Reaktivierung im Vergleich zur Standardtherapie und der Therapie mit Atovaquon thematisiert.

4.1 Zeigt 1-hydroxy-2-dodecyl-4-(1H)-Quinolon (HDQ) einen therapeutischen Effekt im Mausmodell der akuten Infektion mit *Toxoplasma gondii*?

Die beschriebenen *in-vivo*-Ergebnisse bestätigen den in der Literatur dokumentierten antiparasitären Effekt *in vitro* von 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)-Quinolon (HDQ). Bei der Analyse der Organe mittels quantitativer PCR zeigten HDQ-behandelte Gruppen eine deutlich niedrigere Konzentration an Toxoplasma-DNA als die Kontrollgruppe. Der therapeutische Effekt war dem der Standardtherapie mit Pyrimethamin und Sulfadiazin vergleichbar. HDQ-behandelte Mäuse wiesen zudem weniger entzündliche Herde in der Leber auf als die Kontrollgruppe. Dies dürfte am ehesten durch die geringere Parasitenlast in den mit den neuen Quinolonen behandelten

Gruppen bedingt sein, da die inflammatorischen Areale, meist perivaskulär lokalisiert, am ehesten um Toxoplasma-Antigene herum angesiedelt sind.

Neben der Parasitenlast in Organen (PCR) und der histologischen Analyse zeigte auch die durchflusszytometrische Bestimmung der Prozentzahlen infizierter Zellen in der Peritonealflüssigkeit einen deutlichen antiparasitären Effekt der neuen Quinolone. HDQ war dabei in seiner antiparasitären Wirkung der Standardtherapie mit Pyrimethamin und Sulfadiazin vergleichbar, erreichte aber nicht den Wirkungsgrad von Atovaquon.

Die Inhibition der Parasiten durch Atovaquon ist bei Konzentrationen von 100 bis 1000 nM nachweisbar. Im Gegensatz dazu inhibiert HDQ die Parasitenreplikation schon bei Konzentrationen von 10 nM. Werden beide Medikamente zusammen verwendet, ist auch ein Synergismus der Kombination von HDQ mit Atovaquon *in vitro* vorhanden ¹⁰¹. *In vivo* fand sich in der vorliegenden Arbeit jedoch eine dem Atovaquon gegenüber geringere Wirksamkeit. Dieser Unterschied kann durch die erschwerte Löslichkeit des Medikaments HDQ in der hier verwendeten Formulierung als Pulver in PBS/DMSO bedingt sein; bei professioneller Zubereitung und/oder weiterer Optimierung der Substanz könnte darüber hinaus eine der Standardtherapie überlegene therapeutische Wirkung möglich sein. Die Bioverfügbarkeit der Substanz HDQ ist bisher nicht im Detail untersucht. Das Beispiel Atovaquon lehrt, dass allein durch die verbesserte Formulierung als Suspension im Vergleich zur Tablettenform eine deutlich bessere Bioverfügbarkeit erreicht werden kann ⁴. Unsere Arbeitsgruppe konnte in der Vergangenheit zeigen, dass eine verbesserte Bioverfügbarkeit auch durch die Präparation als Nanosuspension zu erreichen ist ^{4 102-103}. Auf diesen Erfahrungen aufbauend, sollten zukünftige Arbeiten auf die Verwendung von HDQ als Nanosuspension abzielen.

4.2 Zeigen 1-hydroxy-2-dodecyl-3-methyl-4(1H)-Quinolon (Substanz A) und 1-hydroxy-2-methyl-3-dodecyl-4(1H)-Quinolon (Substanz B) einen Effekt auf *T. gondii* in einem Modell der akuten Infektion mit *Toxoplasma gondii*?

Die 1-hydroxy-Quinolone Substanz A und B wiesen ebenfalls therapeutische Wirksamkeit gegen *T. gondii* in einem Mausmodell der akuten Infektion auf. Die durchflusszytometrische Untersuchung zur Bestimmung der Zahl infizierter Peritonealzellen zeigte, dass Substanz A und Substanz B eine deutlich bessere antiparasitäre Wirkung haben als die Standardtherapie mit Pyrimethamin und Sulfadiazin. Die Substanzen A und B waren ebenso effektiv wie Atovaquon. Bei der Analyse der betroffenen Organe zeigten die mit den Substanzen A und B behandelten Gruppen deutlich geringere Konzentrationen an Toxoplasma-DNA als die Kontrollgruppe. Die Substanz B war dabei ebenso effektiv wie Atovaquon und erwies sich gegenüber den Substanzen A und HDQ als überlegen. In der Histologie fanden sich in den mit Substanz A und B behandelten Gruppen signifikant weniger inflammatorische Areale als in unbehandelten Kontrollen. Atovaquon jedoch zeigte in diesen Analysen der Substanz B gegenüber eine höhere Wirksamkeit.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen somit auch darauf hin, dass die chemische Struktur der Substanzen sehr wichtig für den antiparasitären Effekt ist. Der Austausch eines einzelnen Wasserstoffatoms durch eine Methylgruppe an Position C-3 des HDQ bei Substanz A sowie der Austausch einer Dodecyl- und Methylgruppe des HDQ bei Substanz B resultierten in einer deutlich gesteigerten Wirksamkeit gegen den Parasiten im Vergleich zu HDQ; die Substanz B erschien in den vorliegenden Untersuchungen der Substanz A teilweise überlegen.

In vitro konnten wir kürzlich eine marginal bessere Wirkung der Substanz A im Vergleich zur Substanz B zeigen ¹⁰⁴.

4.3 Weisen 1-hydroxy-2-dodecyl-4-(1H)-Quinolon (HDQ), 1-hydroxy-2-dodecyl-3-methyl-4(1H)-Quinolon (Substanz A) und 1-hydroxy-2-methyl-3-dodecyl-4(1H)-Quinolon (Substanz B) eine therapeutische Wirksamkeit gegen *Toxoplasma gondii* in einem Modell der Reaktivierungstoxoplasmose auf?

Um die Wirksamkeit der neuen Quinolone in einem Modell der Reaktivierungstoxoplasmose zu testen, wurden INF-8-defiziente Mäuse verwendet. Dieses murine Modell der Reaktivierungstoxoplasmose weist viele Charakteristika der Reaktivierungstoxoplasmose bei immungeschwächten Patienten auf ⁸⁴. Es spiegelt zum einen die Reaktivierung der latenten Infektion des immunsupprimierten Patienten wider, zum anderen sind auch die histologischen Veränderungen im Gehirn der Mäuse denen im Gehirn von Patienten mit Reaktivierungstoxoplasmose sehr ähnlich. Die PCR-Analyse der Gehirne zeigte, dass nur die Atovaquon-behandelte Gruppe eine signifikant geringere Konzentration an Toxoplasma-DNA aufwies. Für die Substanz B, nicht jedoch für Substanz A und HDQ, fand sich eine Tendenz zur Wirksamkeit. Im Gegensatz dazu wiesen jedoch die Gehirne der mit Atovaquon sowie mit den Substanzen A und B behandelten Gruppen deutlich weniger fokale Entzündungsherde auf als die der Kontrollgruppe. Die nur tendenzielle Signifikanz der Substanz B und die fehlende Signifikanz der Substanzen A und HDQ in der Analyse der Parasitenkonzentrationen im Gehirn ist am ehesten aufgrund der geringen Zahl an Mäusen (n=4/Gruppe bei 3 Experimenten) und hoher Standardabweichung zu erklären. Auch bei der Analyse der Leber auf histologische Entzündungszeichen zeigten alle Substanzen signifikante Wirksamkeit, wobei die Substanzen A und B dem HDQ sogar überlegen waren.

Diese Ergebnisse unterstreichen die therapeutische Wirksamkeit der Derivate von HDQ in einem Mausmodell der Reaktivierungstoxoplasmose. Auch bestätigen sie die

bereits im akuten Modell der Toxoplasmose beobachtete große Bedeutung der Methylkette dieser Substanzen für die Wirksamkeit gegen *Toxoplasma gondii*.

Die hier gezeigten Resultate machen die neuen Quinolone, insbesondere die Substanzen A und B, sehr attraktiv für weitere Studien. Weitere Untersuchungen der Substanzen sollten durchgeführt werden, um v.a. pharmakologische Aspekte wie z.B. Toxizität, Pharmakokinetik und die Formulierung als Suspension oder Nanosuspension zu untersuchen. Auch eine genauere Analyse der antiparasitären Wirksamkeit *in vivo* ist notwendig, insbesondere die Dosisfindung, ein möglicher Synergismus mit anderen Substanzen, und der Einfluss auf die Letalität nach Infektion, bevor Rückschlüsse auf die Wirksamkeit beim Menschen gezogen werden können. Darüber hinaus sollte auch die Wirksamkeit gegen andere Pathogene und bei der Prophylaxe der Toxoplasma-Enzephalitis untersucht werden.

4.4 Zusammensetzung der Zellpopulationen in der Peritonealhöhle

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die zelluläre Zusammensetzung der Peritonealflüssigkeit von Mäusen nach intraperitonealer Infektion untersucht. Frühere Studien zeigten, dass sowohl antigenpräsentierende Zellen (CD11b⁺ und CD11c⁺) als auch Granulozyten (Gr-1⁺) und Lymphozyten (CD3⁺) eine wichtige Rolle in der Frühphase der Infektion haben^{95 105}.

Die Zellzusammensetzung der Peritonealflüssigkeit der infizierten Kontrolltiere war von Lymphozyten, Granulozyten und antigenpräsentierenden Zellen dominiert. Darüber hinaus fanden sich auch „inflammatorische“ Monozyten (Ly6c⁺/CD11b⁺). Kürzlich wiesen Dunay et al. die wichtige Rolle von „inflammatorischen“ Monozyten (Gr-1⁺/CD11b⁺/Ly6c⁺) in der akuten Phase der Infektion mit *T. gondii* nach⁹⁵. Eine effektive Kontrolle der akuten Infektion hängt von der Produktion von Interleukin-12

(IL-12) durch antigenpräsentierende Zellen wie beispielsweise dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen ab ¹⁰⁶⁻¹⁰⁷. Nach aktiver Invasion oder Phagozytose der Parasiten durch Neutrophile und Makrophagen werden durch die Sekretion von Zytokinen wie IL-12 v.a. T-Lymphozyten aktiviert. Außerdem präsentieren insbesondere dendritische Zellen und monozytäre Zellen parasitäre Antigene für T-Lymphozyten, die daraufhin v.a. Interferon-gamma (IFN- γ) produzieren, was wiederum Makrophagen und zytotoxische Lymphozyten aktiviert und ihre antiparasitäre Wirkung verstärkt. Neutrophile schleusen sich schnell in die Bauchhöhle von Mäusen nach intraperitonealer Infektion mit *T. gondii* ein. Circa 85% der Neutrophilen haben eine intrazelluläre Speicherung von IL-12 angezeigt ¹⁰⁸⁻¹⁰⁹.

4.5 Die Wirkung von Atovaquon und Pyrimethamin/Sulfadiazin auf *Toxoplasma gondii*

Die in dieser Arbeit berichtete Wirkung von Atovaquon gegen *T. gondii* ist in der Literatur belegt ^{4 74}. In einem ähnlichen *in-vivo*-Modell der akuten Infektion zeigten Araujo et al. den therapeutischen Effekt von Atovaquon gegen den Parasiten. Eine Atovaquon-Konzentration von $4,8 \times 10^{-7}$ M hemmte die intrazelluläre Replikation von Tachyzoiten und alle mit dem RH-Stamm infizierten Mäuse überlebten unter täglicher Therapie mit Atovaquon 100mg/kg 10 Tage ⁷⁴.

Andererseits war die Wirkung von Pyrimethamin/Sulfadiazin gegen *T. gondii* bei den in dieser Arbeit benutzten Modellen nicht überzeugend, was im Gegensatz zu Berichten in der Literatur steht ¹¹⁰⁻¹¹³. Dies kann daran liegen, dass es sich bei den für die Untersuchungen verwendeten Stämmen um Laborstämme handelt, die möglicherweise eine Resistenz gegen die Standardtherapie entwickelt haben oder

auch an der verschiedenen Virulenz der Stämme. Außerdem ist der Zeitpunkt des Beginns der Therapie sehr wichtig. Wird die Behandlung in den ersten 24 Stunden der Infektion begonnen, zeigt sie bessere Ergebnisse⁷⁴. Andere Gründe können die Art und Weise der Gabe (oral vs. intraperitoneal), die Dosis und die Dauer der Therapie sein. Für die Behandlung von Patienten jedoch ist die Kombination von Pyrimethamin und Sulfadiazin weiterhin die Therapie der Wahl.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass die 1-hydroxy-2-alkyl-4(1H)-Quinolon-Derivate eine vielversprechende *in-vivo*-Aktivität gegen den Parasiten *T. gondii* haben. Auf Grundlage der in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse sollten weiterführende Arbeiten zur Pharmakokinetik und Galenik der genannten Substanzen durchgeführt werden, um langfristig die Therapie der Toxoplasmose des Menschen durch effektivere und sicherere Medikamente zu verbessern.

5. Zusammenfassung

Die Prävalenz der Infektion mit *Toxoplasma gondii* steigt beim Menschen proportional mit dem Lebensalter um etwa ein Prozent pro Jahr an. In Deutschland weisen im Durchschnitt 60-70% der erwachsenen Bevölkerung Antikörper gegen *T. gondii* auf. Die Standardtherapie aller Verlaufsformen der Toxoplasmose besteht aus der Kombination von Pyrimethamin und Sulfadiazin, obwohl diese Therapie von schwerwiegenden Nebenwirkungen begleitet wird. In bis zu 50% der Fälle werden allergische Reaktionen beobachtet, die zum Absetzen bzw. Umstellen der Therapie führen. Auch die Teratogenität dieser Therapie stellt in der Frühschwangerschaft ein Problem dar. Die mitochondriale Atmungskette von Toxoplasmen weist eine Komponente auf, die in Säugerzellen nicht vorkommt und deshalb einen vielversprechenden Angriffspunkt für Antiparasitika darstellt: *T. gondii* besitzt anstelle des Komplexes I eine alternative NADH-Dehydrogenase. Die Substanz 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)-Quinolon (HDQ) wurde in Enzymassays als hoch affiner Inhibitor der alternativen NADH-Dehydrogenase des Hefepilzes *Yarrowia lipolytica* beschrieben. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Wirkungsweise von neuen Hydroxyquinolonen in verschiedenen Modellen der *T.-gondii*-Infektion zu untersuchen. Der Austausch eines einzelnen Wasserstoffatoms durch eine Methylgruppe an Position C-3 des HDQ bei Substanz A sowie der Austausch einer Dodecyl- und Methylgruppe des HDQ bei Substanz B resultierten in einer deutlich gesteigerten Wirksamkeit gegen den Parasiten im Vergleich zu HDQ in einem akuten Modell der Infektion sowie in einem Modell der Reaktivierungstoxoplasmose. Die Substanz B erschien in den vorliegenden Untersuchungen der Substanz A teilweise überlegen. Der therapeutische Effekt war dem der Standardtherapie mit Pyrimethamin und Sulfadiazin ähnlich, jedoch geringer als der des Atovaquon.

Verbesserungen der Pharmakokinetik durch modifizierte Präparationen der Substanzen könnten die Wirksamkeit weiter steigern.

Zusammenfassend verdeutlicht diese Arbeit, dass die neuen Quinolone, insbesondere Substanz A und Substanz B, effektiv gegen *T. gondii* in klinisch relevanten Mausmodellen sind.

6. Summary

The prevalence of the infection with *Toxoplasma gondii* in humans increases proportionally with age by about one percent per year. In Germany, on average, 60-70% of the adult population is positive for antibodies against *T. gondii*. The standard course of therapy of all forms of toxoplasmosis is a combination of pyrimethamine and sulfadiazine, although this therapy is accompanied by serious side effects. In up to 50% of all cases, allergic reactions are observed, leading to discontinuation or change of the therapy. The teratogenicity of this therapy in early pregnancy is also a problem. The mitochondrial respiratory chain of *T. gondii* has a component that does not occur in mammalian cells and therefore represents a promising target for anti-parasitics: *T. gondii* possess an alternative NADH dehydrogenase instead of the complex I. The substance 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)-quinolone (HDQ) was described in enzyme assays as high-affinity inhibitor of alternative NADH dehydrogenase of the yeast *Yarrowia lipolytica*.

The present study has the goal to prove the effect of new hydroxyquinolones in two different models of *T. gondii* infection. The replacement of a single hydrogen atom by a methyl group at position C-3 of HDQ by substance A and the replacement of a methyl and dodecyl group of HDQ by substance B has resulted in a significantly enhanced efficacy of these substances against the parasite in comparison to HDQ. This study demonstrates that the new quinolones, especially substance A and substance B, are effective against *T. gondii* infection, both in an acute model and in a reactivation model of the infection.

7. Literaturverzeichnis

1. Hemphill A, B. Gottstein. Grundzüge der Biologie von Parasiten. In: Hiepe T, Lucius, R., Gottstein, B., editor. *Allgemeine Parasitologie mit den Grundzügen der Immunologie, Diagnostik und Bekämpfung*. Stuttgart: Parey Verlag, 2005:100-03.
2. Liesenfeld O, S. Y. Wong and J. S. Remington. Toxoplasma in setting of AIDS. In: T. C. Merigan J, J. G. Bartlett und D. Bolognesi, editor. *Textbook of AIDS medicine*. 2. Auflage ed. Baltimore, Md.: Williams & Wilkins, 1998: 225-59.
3. Groß U. Protozoenkrankheiten. *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Stuttgart: Thieme Verlag, 2006:448-51.
4. Scholer N, Krause K, Kayser O, Muller RH, Borner K, Hahn H, et al. Atovaquone nanosuspensions show excellent therapeutic effect in a new murine model of reactivated toxoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(6):1771-9.
5. Katlama C, De Wit, S., O'Doherty, E., Van Glabeke, M., Clumeck, N. Pyrimethamine-clindamycin vs. pyrimethamine-sulfadiazine as acute and long-term therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1996;22(2):268-75.
6. Haverkos HW. Assessment of therapy for toxoplasma encephalitis. The TE Study Group. *Am J Med* 1987;82(5):907-14.
7. Araujo FG, Shepard, R. M., Remington, J. S. In vivo activity of the macrolide antibiotics azithromycin, roxithromycin and spiramycin against *Toxoplasma gondii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10(6):519-24.
8. Saleh A, Friesen, J., Baumeister, S., Gross, U., Bohne, W. Growth inhibition of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* by nanomolar concentrations of 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone, a high-affinity inhibitor of alternative (type II) NADH dehydrogenases. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(4):1217-22.
9. Lin SS, Gross, U., Bohne, W. Type II NADH dehydrogenase inhibitor 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone leads to collapse of mitochondrial inner-membrane potential and ATP depletion in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell* 2009;8(6):877-87.
10. Lin SS, Kerscher, S., Saleh, A., Brandt, U., Gross, U., Bohne, W. The *Toxoplasma gondii* type-II NADH dehydrogenase TgNDH2-I is inhibited by 1-hydroxy-2-alkyl-4(1H)quinolones. *Biochim Biophys Acta* 2008;1777(11):1455-62.
11. Remington JS, McLeod, R. Toxoplasmosis. In: Braude AI, Davis, C. E., Fierer, J. , editor. *Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2. Auflage ed. Philadelphia, London, Toronto: W. B. Saunders Company, 1986:1521-35.
12. Seitz HM. Mikrobiologie von *Toxoplasma*-Spezies. In: Shah PM, Stille, W., editor. *Infektionen durch Toxoplasma gondii*. 2. Auflage ed. Gräfelfing: Socio-medico Verlag, 1992:7-18.
13. Dubey J.P. BCP. *Toxoplasmosis of animals and man*. First Editioned ed. Florida: CRC Press, 1998.
14. Remington JS MR, Thulliez P, Desmots G. . Toxoplasmosis. In: Remington JS KJH, editor. *Infectious diseases of the fetus and newborn Infant*. 5. Auflage ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001:205-346.
15. Gross U. Prevalence and public-health-aspects of toxoplasmosis. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2004;47(7):692-7.
16. Friese K, Beichert, M., Hof, H., Weikel, W., Falke, D., Sickinger, R. und Melchert, F. Untersuchung zur Häufigkeit konnataler Infektionen. *Geburtsh. u. Frauenheilk.* 1991;51 890-96.
17. Kimball AC, Kean, B. H., Fuchs, F. Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 4,048 obstetric patients. *Am J Obstet Gynecol* 1971;111(2):211-8.
18. Ockert G. Epidemiologie der *Toxoplasma*-Infektion. In: Pohle HD, Remington, J. S. , editor. *Toxoplasmose - Erreger und Krankheit*. 2. Auflage ed. Gräfelfing: Socio-medico Verlag, 1995:30-42.
19. Stray-Pedersen B. A prospective study of acquired toxoplasmosis among 8,043 pregnant women in the Oslo area. *Am J Obstet Gynecol* 1980;136(3):399-406.

20. Stray-Pedersen B. Infants potentially at risk for congenital toxoplasmosis: a prospective study. *Am J Dis Child* 1980;134(7):638-42.
21. Papoz L, Simondon, F., Saurin, W., Sarmini, H. A simple model relevant to toxoplasmosis applied to epidemiologic results in France. *Am J Epidemiol* 1986;123(1):154-61.
22. Werner H, Janitschke, K. Aktuelle Probleme der Serodiagnostik der Toxoplasmose unter besonderer Berücksichtigung der Schwangerenvorsorge. *Bundesgesundheitsblatt* 1985;28 240.
23. Friese K, Weigel, M. und Melchert, F. Diagnostik und Therapie der konnatalen Toxoplasmose. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1993;118 1814-16.
24. AG H-LR. *Roche Lexikon Medizin*. 2. Auflage ed. München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1987.
25. Pohle HD. Toxoplasmose bei Immunsuppression. In: Pohle HD, Remington, J. S. , editor. *Toxoplasmose - Erreger und Krankheit*. 2. Auflage ed. Gräfelfing: Socio-medico Verlag, 1995:141-64.
26. Brooks RG, McCabe RE, Remington JS. Role of serology in the diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy. *Rev Infect Dis* 1987;9(5):1055-62.
27. Classen M, Diehl, V., Kochsiek, K., Schmiegel, W., Berdel, W. E., Böhm, M. Sporozoen. *Innere Medizin*. 5. Auflage ed. München: Urban & Fischer Verlag, 2004:928-30.
28. Georgiev VS. Management of toxoplasmosis. *Drugs* 1994;48(2):179-88.
29. Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol* 2009;39(8):895-901.
30. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet* 2004;363(9425):1965-76.
31. Brodt HR, Helm, E. B. und Kamps, B. S. *AIDS 1997. Diagnostik und Therapie*. 7. Auflage ed. Köln: Steinhäuser Verlag, 1997.
32. Huber W, Bautz, W., Classen, M. und Schepp, W. Pyrimethamin-Sulfadiazin-resistente zerebrale Toxoplasmose bei AIDS. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1995;120 60-64.
33. Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* 1992;15(2):211-22.
34. Eng JH. *Radiologie compact*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1999.
35. Fabricius EM. Klinische Erscheinungen der HIV-Infektion und des Vollbildes AIDS. In: Gloor B, Naumann, G. O. H., Rochels, R. , editor. *Bücherei des Augenarztes*. Stuttgart: Enke Verlag, 1992.
36. Cochereau-Massin I, LeHoang P, Lautier-Frau M, Zerdoun E, Zazoun L, Robinet M, et al. Ocular toxoplasmosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Am J Ophthalmol* 1992;114(2):130-5.
37. Petersen E, Liesenfeld O. Clinical Disease and Diagnostic. In: Weiss LM, Kim, K., editor. *Toxoplasma gondii. The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods*. London: Elsevier, 2007:81-100.
38. Couvreur J, Desmots G, Tournier G, Szusterkac M. A homogeneous series of 210 cases of congenital toxoplasmosis in 0 to 11-month-old infants detected prospectively. *Ann Pediatr (Paris)* 1984;31(10):815-9.
39. Djurkovic-Djakovic O. Toxoplasma infection and pathological outcome of pregnancy. *Gynecol Obstet Invest* 1995;40(1):36-41.
40. Rosenfeld JA. Maternal and congenital toxoplasmosis. Is prevention possible? *Postgrad Med* 1988;84(8):187-90.
41. Mittelviefhaus H, Gellrich, M. M. Augentoxoplasmose - Überblick und aktuelle Probleme der Diagnostik. *Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol.* 1996;18 49-58.
42. Montoya JG, Remington JS. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. *Clin Infect Dis* 1996;23(2):277-82.
43. Pavesio CE, Lightman S. Toxoplasma gondii and ocular toxoplasmosis: pathogenesis. *Br J Ophthalmol* 1996;80(12):1099-107.
44. Mittelviefhaus H. Ophthalmologische Manifestationen bei Toxoplasmose. In: Pohle HD, Remington, J. S. , editor. *Toxoplasmose - Erreger und Krankheit*. 2. Auflage ed. Gräfelfing: Socio-medico Verlag, 1995:184-94.
45. Mittelviefhaus H. Treatment of ocular toxoplasmosis. Part 2: Therapeutic approaches. *Kinderarztl Prax* 1993;61(4-5):154-60.
46. Engstrom RE, Jr., Holland GN, Nussenblatt RB, Jabs DA. Current practices in the management of ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* 1991;111(5):601-10.

47. Simon C. Toxoplasmose bei Neugeborenen. In: Shah PM, Stille, W. , editor. *Infektionen durch Toxoplasma gondii*. 2. Auflage ed. Gräfelting: Socio-medico Verlag, 1992:44-52.
48. Vaudaux B, Rudin C, Kind C, Schaad UB, Gnehm HE, Nadal D, et al. Congenital toxoplasmosis: pediatric approach. Consensus report of the Swiss infectious disease pediatricians. *Schweiz Med Wochenschr Suppl* 1995;65:70S-81S.
49. Thalhammer O. *Die Toxoplasmose bei Mensch und Tier*. Wien, Bonn: W. Maudrich, 1957.
50. Ruf B. Therapie und Prophylaxe der Toxoplasmose. In: Pohle HD, Remington, J. S. , editor. *Toxoplasmose - Erreger und Krankheit*. 2. Auflage ed. Gräfelting: Socio-medico Verlag, 1995:195-234.
51. Weiss LM, Kim, K. . *Toxoplasma gondii. The Model Apicomplexan – Perspectives and Methods*. London: Elsevier, 2007
52. Wong SY, Israelski, D. M., Remington, J. S. *AIDS associated toxoplasmosis*. 4. Auflage ed. Philadelphia: The W. B. Saunders Co., 1995.
53. Dunay IR. Therapie der Toxoplasma-Enzephalitis - In-vitro- und In-vivo-Modelle zur Passage von antiparasitären Substanzen durch die Blut-Hirn-Schranke. Freie Universität Berlin, 2005.
54. Israelski DM, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Infect Dis Clin North Am* 1988;2(2):429-45.
55. Kasper LH. Toxoplasma infection. In: Harrison TR, Kasper, D. L., Braunwald, E. und Fauci, A. S., editor. *Harrinson`s Principle of Internal Medicine*. New York: McGraw-Hill, 2001:1222-27.
56. Fabricius EM. Augenmanifestationen und neuroophthalmologische Symptome bei HIV-Infektion. In: Gloor B, Naumann, G. O. H., Rochels, R. , editor. *Bücherei des Augenarztes*. Stuttgart: Enke Verlag, 1992:49-202.
57. Stray-Pedersen B. Treatment of toxoplasmosis in the pregnant mother and newborn child. *Scand J Infect Dis Suppl* 1992;84:23-31.
58. Prevention) CCfDCa. Toxoplasmosis, 2008.
59. Hegab SM, Al-Mutawa SA. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. *Clin Exp Med* 2003;3(2):84-105.
60. Araujo FG, Huskinson-Mark, J., Gutteridge, W. E., Remington, J. S. In vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 566C80 against the cyst form of *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36(2):326-30.
61. Benson CA, Kaplan JE, Masur H, Pau A, Holmes KK. Treating opportunistic infections among HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association/Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep* 2004;53(RR-15):1-112.
62. Perkins ES, Schofield PB, Smith CH. Treatment of uveitis with pyrimethamine (daraprim). *Br J Ophthalmol* 1956;40(10):577-86.
63. Haile LG, Flaherty JF. Atovaquone: a review. *Ann Pharmacother* 1993;27(12):1488-94.
64. Lopez JS, de Smet MD, Masur H, Mueller BU, Pizzo PA, Nussenblatt RB. Orally administered 566C80 for treatment of ocular toxoplasmosis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Ophthalmol* 1992;113(3):331-3.
65. Huskinson-Mark J, Araujo FG, Remington JS. Evaluation of the effect of drugs on the cyst form of *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis* 1991;164(1):170-1.
66. Rolan PE, Mercer AJ, Weatherley BC, Holdich T, Meire H, Peck RW, et al. Examination of some factors responsible for a food-induced increase in absorption of atovaquone. *Br J Clin Pharmacol* 1994;37(1):13-20.
67. Schimkat M, Althaus, C., Armbrecht, C., Jablonowski, H., Sundmacher, R. Behandlung der Toxoplasmose-Retinochorioiditis mit Atovaquone bei einem AIDSPatienten. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 1995;206 173-77.
68. Hudde T, Althaus, C., Schimkat, M., Sundmacher, R. Behandlung der Toxoplasmose-Retinochorioiditis mit Atovaquon bei immunkompetenten Patienten. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 1996;209 232-36.
69. Rothova A, Meenken C, Buitenhuis HJ, Brinkman CJ, Baarsma GS, Boen-Tan TN, et al. Therapy for ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* 1993;115(4):517-23.
70. Tabbara KF, O'Connor GR. Treatment of ocular toxoplasmosis with clindamycin and sulfadiazine. *Ophthalmology* 1980;87(2):129-34.

71. Kovacs JA. Efficacy of atovaquone in treatment of toxoplasmosis in patients with AIDS. The NIAID-Clinical Center Intramural AIDS Program. *Lancet* 1992;340(8820):637-8.
72. Eschemann A, Galkin A, Oettmeier W, Brandt U, Kerscher S. HDQ (1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone), a high affinity inhibitor for mitochondrial alternative NADH dehydrogenase: evidence for a ping-pong mechanism. *J Biol Chem* 2005;280(5):3138-42.
73. Melo AM, Bandejas, T. M., Teixeira, M. New insights into type II NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68(4):603-16.
74. Araujo FG, Huskinson, J., Remington, J. S. Remarkable in vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 566C80 against tachyzoites and tissue cysts of *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35(2):293-9.
75. Shubar HM, Mayer JP, Hopfenmuller W, Liesenfeld O. A new combined flow-cytometry-based assay reveals excellent activity against *Toxoplasma gondii* and low toxicity of new bisphosphonates in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother* 2008;61(5):1110-9.
76. Gubbels MJ, Li, C., Striepen, B. High-throughput growth assay for *Toxoplasma gondii* using yellow fluorescent protein. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(1):309-16.
77. Khan AA, Slifer T, Araujo FG, Remington JS. Trovafloxacin is active against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(8):1855-9.
78. Khan AA, Nasr M, Araujo FG. Two 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones with in vitro and in vivo activities against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(9):2284-9.
79. Araujo FG, Khan, A. A., Remington, J. S., Slifer, T. L., Bryskier, A. The ketolide antibiotics HMR 3647 and HMR 3004 are active against *Toxoplasma gondii* in vitro and in murine models of infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(10):2137-40.
80. Mui EJ, Jacobus D, Milhous WK, Schiehsler G, Hsu H, Roberts CW, et al. Triazine Inhibits *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(8):3463-7.
81. Dumas JL, Pizzolato, G., Pechere, J. C. Evaluation of trimethoprim and sulphamethoxazole as monotherapy or in combination in the management of toxoplasmosis in murine models. *Int J Antimicrob Agents* 1999;13(1):35-9.
82. Dumas JL, Chang R, Mermillod B, Piguot PF, Comte R, Pechere JC. Evaluation of the efficacy of prolonged administration of azithromycin in a murine model of chronic toxoplasmosis. *J Antimicrob Chemother* 1994;34(1):111-8.
83. Djurkovic-Djakovic O, Milenkovic V, Nikolic A, Bobic B, Grujic J. Efficacy of atovaquone combined with clindamycin against murine infection with a cystogenic (Me49) strain of *Toxoplasma gondii*. *J Antimicrob Chemother* 2002;50(6):981-7.
84. Dunay IR, Heimesaat MM, Bushrab FN, Muller RH, Stocker H, Arasteh K, et al. Atovaquone maintenance therapy prevents reactivation of toxoplasmic encephalitis in a murine model of reactivated toxoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(12):4848-54.
85. Djurkovic-Djakovic O, Nikolic T, Robert-Gangneux F, Bobic B, Nikolic A. Synergistic effect of clindamycin and atovaquone in acute murine toxoplasmosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(9):2240-4.
86. Yardley V, Khan AA, Martin MB, Slifer TR, Araujo FG, Moreno SN, et al. In vivo activities of farnesyl pyrophosphate synthase inhibitors against *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(3):929-31.
87. Johnson LL. SCID mouse models of acute and relapsing chronic *Toxoplasma gondii* infections. *Infect Immun* 1992;60(9):3719-24.
88. Beaman MH, Araujo, F. G., Remington, J. S. Protective reconstitution of the SCID mouse against reactivation of toxoplasmic encephalitis. *J Infect Dis* 1994;169(2):375-83.
89. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 1995;172(6):1561-6.
90. Djurkovic-Djakovic O. Murine model of drug-induced reactivation of *Toxoplasma gondii*. *Acta Protozoologica* 2001;40:99-106.
91. Pomeroy C, Kline S, Jordan MC, Filice GA. Reactivation of *Toxoplasma gondii* by cytomegalovirus disease in mice: antimicrobial activities of macrophages. *J Infect Dis* 1989;160(2):305-11.

92. Gazzinelli R, Xu Y, Hieny S, Cheever A, Sher A. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1992;149(1):175-80.
93. Khan IA, Green WR, Kasper LH, Green KA, Schwartzman JD. Immune CD8(+) T cells prevent reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in the immunocompromised host. *Infect Immun* 1999;67(11):5869-76.
94. Suzuki Y, Orellana MA, Wong SY, Conley FK, Remington JS. Susceptibility to chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not correlate with susceptibility to acute infection in mice. *Infect Immun* 1993;61(6):2284-8.
95. Dunay IR, Damatta RA, Fux B, Presti R, Greco S, Colonna M, et al. Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 2008;29(2):306-17.
96. Israelski DM, Remington JS. Toxoplasmosis in the non-AIDS immunocompromised host. *Curr Clin Top Infect Dis* 1993;13:322-56.
97. Weller IVD, Williams I. G. Treatment of Infectious (ABC of AIDS). *BMJ* 2001;322 1350-54.
98. Srivastava IK, Rottenberg, H., Vaidya, A. B. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *J Biol Chem* 1997;272(7):3961-6.
99. Srivastava IK, Morrissey JM, Darrouzet E, Daldal F, Vaidya AB. Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites. *Mol Microbiol* 1999;33(4):704-11.
100. Baggish AL, Hill DR. Antiparasitic agent atovaquone. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(5):1163-73.
101. Naujoks B. Inhibierung der *Toxoplasma-gondii*-Replikation durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette. Zentrum Hygiene und Humangenetik der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen, 2008.
102. Müller RH, Benita, S., Böhm, B. H. L. *Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs*. Stuttgart, Germany: Medpharm Verlag GmbH, 1998.
103. Müller RH, Peters, K. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs: I. Preparation by a size-reduction technique. *Int. J. Pharm.* 1998;160:229-37.
104. Bajohr LL, Ma L, Platte C, Liesenfeld O, Tietze LF, Gross U, et al. In-vitro and in-vivo activity of 1-hydroxy-2-alkyl-4(1H)quinolone derivatives against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009.
105. Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(13):6115-9.
106. Mordue DG, Sibley LD. A novel population of Gr-1+ activated macrophages induced during acute toxoplasmosis. *J Leukoc Biol* 2003;74(6):1015-25.
107. Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1994;153(6):2533-43.
108. Suzuki Y. Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis. *J Infect Dis* 2002;186 Suppl 2:S234-40.
109. Bliss SK, Butcher, B. A., Denkers, E. Y. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. *J Immunol* 2000;165(8):4515-21.
110. Molzberger S. Untersuchungen zur Epidemiologie, Diagnose und Therapie der Toxoplasmose unter besonderer Berücksichtigung der Augenbeteiligung. Fakultät für Medizin der Technischen Universität München, 2002.
111. Thiermann E, Apt W, Atias A, Lorca M, Olguin J. A comparative study of some combined treatment regimens in acute toxoplasmosis in mice. *Am J Trop Med Hyg* 1978;27(4):747-50.
112. Seah SK. Chemotherapy in experimental toxoplasmosis: comparison of the efficacy of trimethoprim-sulfur and pyrimethamine-sulfur combinations. *J Trop Med Hyg* 1975;78(7):150-3.
113. Russo M, Galanti, B., Nardiello, S. Treatment of toxoplasmosis. present knowledge and problems (author's transl). *Ann Sclavo* 1980;22(6):877-88.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung

„Ich, Lara Liv Bajohr, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Therapeutischer Effekt von neuen Hydroxyquinolonen gegen *Toxoplasma gondii* in vivo selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift