

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

DISSERTATION

Hexadecylphosphocholin (Miltefosin) und seine antiparasitäre  
Wirkung gegen *Toxoplasma gondii* in Zellkultur und im  
Mausmodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Raoul Otto Roßmann

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. O. Liesenfeld  
2. Prof. Dr. W. Däubener  
3. Prof. Dr. R. Ignatius

Datum der Promotion: 05.06.2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINFÜHRUNG</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Toxoplasmose</b>	<b>6</b>
1.1.1 Infektion	6
1.1.2 Epidemiologie	6
1.1.3 Pathogenese	7
1.1.3 Klinik	7
1.1.4 Therapie	8
<b>1.2 Miltefosin</b>	<b>11</b>
1.2.1 Herkunft und Anwendungsgebiete	11
1.2.2 Wirkmechanismen	11
<b>1.3 Experimentelle Modelle der Infektion mit <i>T. gondii</i> zur Prüfung der Wirksamkeit von Antiparasitika</b>	<b>14</b>
<b>1.4 Zielstellung der Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>2. MATERIALIEN UND METHODIK</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Materialien</b>	<b>17</b>
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Einwegmaterialien	18
2.1.3 Software	19
2.1.4 Chemikalien	20
2.1.5 Seren und Antikörper	22
2.1.6 Puffer, Enzyme, Lösungen und Sonden	22
2.1.7 Mäuse, Zellen und Parasiten	24
2.1.7.1 Mäuse	24
2.1.7.2 Makrophagen	24
2.1.7.3 GFP-RH <i>T. gondii</i> Tachyzoiten	24

2.1.7.4 ME49 <i>T. gondii</i> Zysten	25
<b>2.2 Methodik</b>	<b>25</b>
2.2.1 Infektionen	25
2.2.1.1 Orale Infektion mit ME49 Zysten	25
2.2.1.2 Intraperitoneale Infektion mit GFP-RH Tachyzoiten	25
2.2.1.3 Intraperitoneale Infektion mit ME49 Zysten	26
2.2.2 Medikamentöse Behandlung	26
2.2.2.1 Orale Behandlung	26
2.2.2.2 Intraperitoneale Behandlung	26
2.2.3 Organentnahme	27
2.2.4 Quantifizierung von <i>T. gondii</i> -DNA mittels PCR	27
2.2.5 Histologie	29
2.2.5.1 Peroxidase-Anti-Peroxidase-Färbung	29
2.2.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	30
2.2.5.3 Quetschpräparate	31
2.2.6 In vitro-Versuche	33
2.2.7 Durchflusszytometrie	33
2.2.8 Zytotoxizitätsmessung mittels MTT-Test	34
2.2.9 Statistik	35
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Antiparasitäre und zytotoxische Effekte von Miltefosin in vitro</b>	<b>36</b>
3.1.1 Antiparasitäre Wirkung von Miltefosin gegen <i>T. gondii</i> Tachyzoiten	36
3.1.2 Zytotoxizität von Miltefosin gegenüber J774A.1-Makrophagen	41
<b>3.2 Therapeutischer Effekt von Miltefosin gegen <i>T. gondii</i> in vivo</b>	<b>43</b>
3.2.1 Modelle der akuten Toxoplasmose	43
3.2.1.1 Intraperitoneale Infektion mit GFP-RH Tachyzoiten und intraperitoneale Miltefosintherapie	43
3.2.1.1.1 <i>T. gondii</i> -DNA-Konzentrationen in Organen	43
3.2.1.1.2 Histologische Veränderungen in Organen	46
3.2.1.2 Orale Infektion mit ME49 Zysten und orale Miltefosintherapie	49
3.2.1.2.1 <i>T. gondii</i> -DNA-Konzentrationen in Lunge und Gehirn	49
3.2.1.2.2 Histologische Veränderungen in Lunge und Gehirn	50
3.2.2 Aktivität von Miltefosin gegen das Zystenstadium von <i>T. gondii</i>	51
3.2.2.1 <i>T. gondii</i> -DNA-Konzentrationen in Lunge und Gehirn	52

3.2.2.2 Histologische Veränderungen im Gehirn	53
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>56</b>
4.1 Einleitung	56
4.2 Hat Miltefosin antiparasitäre Wirkung gegen <i>T. gondii</i> in vitro?	56
4.3 Hat Miltefosin einen therapeutischen Effekt im Mausmodell der akuten Toxoplasmose?	60
4.4 Hat Miltefosin einen Effekt gegen das Zystenstadium von <i>T. gondii</i> ?	62
4.5 Limitationen der Studie	63
4.6 Schlussfolgerung und Ausblick	65
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>66</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>68</b>
<b>7. ABKÜRZUGSVERZEICHNIS</b>	<b>79</b>
<b>8. LEBENSLAUF</b>	<b>82</b>

# 1. Einführung

## 1.1 Toxoplasmose

### 1.1.1 Infektion

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) ist ein dem Phylum der Apicomplexa zugehöriges Protozoon, das ubiquitär verbreitet ist [65]. Der obligat intrazelluläre Parasit infiziert zahlreiche Säugetiere und Vögel, wobei ausschließlich die Gattung der Felidae als Endwirt fungiert [65]. Die Ansteckung des Menschen erfolgt zumeist auf oralem Wege. Zum einen scheiden Katzen etwa 3-10 Tage nach Infektion umweltresistente Oozysten mit dem Kot aus [29], welche nach Sporulation infektiös sind und beispielsweise über kontaminierte Lebensmittel vom Menschen aufgenommen werden. Zum anderen infiziert sich der Mensch über Gewebezysten, die in rohem oder ungenügend erhitztem Fleisch infizierter Zwischenwirte wie z. B. dem Schwein enthalten sind [65]. Seltener wird *T. gondii* auch über Organtransplantationen übertragen [43, 65]. Neben der horizontalen spielt auch die vertikale Transmission eine wichtige Rolle. Nach Erstkontakt der Mutter mit *T. gondii* während der Schwangerschaft kann der Parasit via Plazenta den Fötus infizieren [65]. Die Übertragungshäufigkeit einer vertikalen Transmission steigt dabei mit dem Gestationsalter bei maternaler Infektion, während das fötale Risiko für eine symptomatische Infektion mit dem Gestationsalter abnimmt [34].

### 1.1.2 Epidemiologie

Während die Infektionsrate in den letzten Jahrzehnten aufgrund besserer hygienischer Bedingungen und Aufklärungsarbeit in Industriestaaten abgenommen hat [48], erreicht die Seroprävalenz in weniger entwickelten Regionen über 75% [17]. Dabei ist ein mit dem Alter korrelierender Anstieg der Infektionshäufigkeit zu verzeichnen [17]. Unter Patienten mit dem erworbenen Immundefizienzsyndrom (AIDS) bleibt die

Reaktivierungstoxoplasmose trotz hoch aktiver antiretroviraler Therapie eine der häufigsten das Nervensystem betreffenden Infektionen [4]. Die Manifestationshäufigkeit einer Toxoplasmose unter AIDS-Patienten korreliert dabei mit der Seroprävalenz für *T. gondii* [12]. Es wird geschätzt, dass etwa 25-50% der AIDS-Patienten in Europa im Krankheitsverlauf eine Toxoplasma-Enzephalitis entwickeln, wenn sie keine antiretrovirale Therapie oder keine antiparasitäre Prophylaxe erhalten [4, 60]. Genetisch werden 3 verschiedene *T. gondii*-Stämme, Typ I, II und III, unterschieden. Die meisten humanen Isolate gehören dem Typ II an, während Typ I oder atypische Genotypen überwiegend bei besonders schwerwiegend verlaufenden Infektionen anzutreffen sind [25].

### **1.1.3 Pathogenese**

Nach oraler Ingestion invadiert der Parasit aktiv das intestinale Epithel. Aus Sporozoiten oder Bradyzoiten, die den Gewebezysten entstammen, entwickeln sich die schnell replizierenden Tachyzoiten [16]. Nach wiederholter Replikation wird die Wirtszelle lysiert und die Tachyzoiten disseminieren via Blut- oder Lymphwege in verschiedene Organe wie Gehirn, Auge, Herz- und Skelettmuskel [65]. Die Zelllyse durch Tachyzoiten sowie die Induktion einer starken Immunreaktion führen zur klinischen Manifestation der Toxoplasmose. Eine wichtige Rolle spielt dabei die zellulär vermittelte Immunreaktion über T-Zellen und proinflammatorische Zytokine wie IL-12 und IFN- $\gamma$  [16, 65]. Unter immunologischen Stressfaktoren (z.B. IFN- $\gamma$ , NO) bzw. in Gehirn- und Muskelgewebe wandeln sich Tachyzoiten in langsam replizierende Bradyzoiten um [16]. Diese können nach Zystenbildung lebenslang im Wirt persistieren (latente Infektion) [65]. Bei Immundefizienz mit defekter T-Zell-Funktion rupturieren die Zysten und durch erneute Replikation und Rekonversion in Tachyzoiten kann das klinische Bild einer Reaktivierungstoxoplasmose entstehen [16, 65].

### **1.1.3 Klinik**

Nach vertikaler Transmission kann *T. gondii* beim Kind neben Abort und Totgeburt zu Retinitiden und zu schwerwiegenden psychomotorischen Schäden führen [62]. Nicht

nur die konnatal sondern auch die postnatal erworbene Toxoplasmose kann mit einer Retinochorioiditis einhergehen, welche rekurrend auftritt und unbehandelt zu Erblindung führen kann [65, 75]. Bei immungesunden Erwachsenen bleiben akute Infektionen mit *T. gondii* meist asymptomatisch oder manifestieren sich in einer v.a. zervikal betonten Lymphadenitis. Neben Feten und Neugeborenen stellen Immungeschwächte, d.h. vor allem AIDS-Patienten, eine wichtige Risikogruppe dar [66]. Durch Reaktivierung einer latenten Infektion kann sich eine Toxoplasma-Enzephalitis entwickeln, welche die häufigste durch *T. gondii* ausgelöste Erscheinungsform bei Immunsupprimierten ist. Die Diagnostik gestaltet sich teilweise schwierig, da in der Bildgebung eine Toxoplasmose nicht immer sicher von anderen intrazerebralen Läsionen bei AIDS zu trennen ist [21]. Bei Nichtbehandlung endet die Toxoplasma-Enzephalitis letal [66].

#### **1.1.4 Therapie**

Die zur Therapie der Toxoplasmose verfügbaren Therapeutika sind in Tab. 1 zusammengefasst. Therapeutika der Wahl zur Behandlung der symptomatischen Toxoplasmose (konatale Infektion, Retinitis und Reaktivierungstoxoplasmose bei Immunsuppression) sind Pyrimethamin und Sulfadiazin (AI-Empfehlung des Center for Disease Control and Prevention (CDC) [49]). Allerdings kann die Kombinationstherapie von Pyrimethamin-Sulfadiazin schwere Nebenwirkungen wie Knochenmarksuppression oder lebensbedrohliche allergische Reaktionen hervorrufen, die unter Umständen tödlich verlaufen können. Gemeinsam mit dem Folsäureantagonisten Pyrimethamin wird Folsäure (Leucovorin) zur Reduktion der Knochenmarksuppression verabreicht [65, 69]. Zwar sprechen etwa 80% der Patienten initial auf die Standardtherapie an, doch muss diese im Verlauf wegen Nebenwirkungen in bis zu 40% wieder abgesetzt werden [59, 76, 81]. Oftmals müssen daher Pyrimethamin und Sulfadiazin durch andere, weniger wirksame Therapeutika ersetzt werden [51].



**Tab. 1:** Therapierichtlinien der Toxoplasmosetherapie, modifiziert nach Montoya et al.[65].

	Medikament	Dosierung	Dauer
<b>Akute asymptomatische Infektion</b>	Keine Behandlung empfohlen §	-	-
<b>Akute Toxoplasmose während der Schwangerschaft †</b>	Spiramycin	3 g pro Tag in 3 Einzeldosen (nüchtern)	Bis zur Geburt ‡ oder bis zum Nachweis einer fetalen Infektion
<b>Nachweis fetaler Infektion (nach der 12. oder 18 SSW.) †</b>	Pyrimethamin	Zunächst 100 mg pro Tag in 2 Einzeldosen über 2 Tage, dann 50 mg 1 x tgl.	Bis zur Geburt
	plus Sulfadiazin	Zunächst 75 mg/kg pro Tag in 2 Einzeldosen (maximal 4 g / Tag) über 2 Tage, dann 100 mg/kg pro Tag in 2 Einzeldosen (maximal 4 g / Tag)	Bis zur Geburt
	plus Leucovorin (Folinsäure)	5–20 mg 1 x tgl.	Während und eine Woche nach Pyrimethamintherapie
<b>Koninatale Infektion des Neugeborenen †</b>	Pyrimethamin	Zunächst 2 mg/kg 1 x tgl. über 2 Tage, dann 1 mg/kg 1 x tgl. über 2-6 Monate, dann selbige Dosis jeden Montag, Mittwoch und Freitag	1 Jahr
	plus Sulfadiazin	100 mg/kg pro Tag in 2 Einzeldosen	1 Jahr
	plus Leucovorin	10 mg 3 x wöchentlich	Während und eine Woche nach Pyrimethamintherapie
	Corticosteroide # (Prednison)	1 mg/kg pro Tag in 2 Einzeldosen	Bis zur Symptombefreiheit
<b>Toxoplasma-Chorioretinitis des Erwachsenen</b>	Pyrimethamin	Zunächst 200 mg 1 x tgl., dann 50–75 mg 1 x tgl.	Gewöhnlich bis zur Symptombefreiheit über 1 – 2 Wochen
	plus Sulfadiazin	Oral 1–1,5 g 1 x tgl.	"
	plus Leucovorin	5–20 mg 3 x wöchentlich	Während und eine Woche nach Pyrimethamintherapie
	Corticosteroide #	1 mg/kg pro Tag in 2 Einzeldosen	Bis zur Symptombefreiheit
<b>Akute Therapie der Toxoplasma-Enzephalitis bei AIDS-Patienten</b>	<b>Standardtherapien:</b>		
	Pyrimethamin	Zunächst oral 200 mg, dann 50–75 mg 1 x tgl.	Bis mindestens 4-6 Wochen nach Symptombefreiheit
	plus Leucovorin	Oral, i.v. oder i.m. 10–20 mg (bis zu 50 mg) 1 x tgl.	Während und eine Woche nach Pyrimethamintherapie
	plus Sulfadiazine	Oral 1–1,5 g 4 x tgl.	Bis mindestens 4-6 Wochen nach Symptombefreiheit
	oder Clindamycin	Oral oder i.v. 600 mg 4 x tgl. (bis zu 1200mg 4 x tgl.)	"
	<b>Alternative Therapiemöglichkeiten:</b>		
	Trimethoprim-Sulfamethoxazol	Oral or i.v. 5 mg (Trimethoprim-Komponente)/kg 2 x tgl. (es wurden tägliche Dosen der Trimethoprim-Komponente von 15-20 mg/kg benutzt)	"
	Pyrimethamin plus Leucovorin	Wie bei Standardtherapie	"
	plus eines der folgenden Medikamente:		
	Clarithromycin	Oral 1g 2 x tgl.	"
Atovaquon	Oral 750 mg 4 x tgl.	"	
Azithromycin	Oral 1200–1500 mg 1 x tgl.	"	
Dapson	Oral 100 mg 1 x tgl.	"	

§ Es sei denn es bestehen schwere oder persistierende Symptome oder Anzeichen, dass vitale Organe betroffen sind, dann Therapie wie bei Toxoplasma-Chorioretinitis des Erwachsenen; † Richtlinien variieren zwischen Zentren; ‡ Deutsche und Österreichische Richtlinien empfehlen Spiramycinprophylaxe bis zur 17. SSW. gefolgt von einer 4-wöchigen Pyrimethamin-Sulfadiazin-Leucovorin-Therapie; # Falls Liquorprotein über 1 g/dl oder Chorioretinitis die Makula betrifft; " Therapiedauer wie zuvor genannt.

Ebenfalls AI-Empfehlung des CDC [49] ist die Medikamentenkombination Pyrimethamin-Clindamycin, die in einer vergleichenden Studie gegenüber Pyrimethamin-Sulfadiazin zwar mit einer höheren Rezidivrate einherging, unter der es aber seltener zu Abbrüchen aufgrund von Nebenwirkungen kam [50]. Trotzdem sind Nebenwirkungen hinsichtlich des Knochenmarks wie Leukopenie, Anämie und Thrombozytopenie ebenso wie allergische Hautreaktionen häufig [81]. Ein weiteres Problem stellt die Reduktion der physiologischen Darmflora durch Clindamycin dar, welche zu einem verstärkten Wachstum von toxinbildenden *Clostridium difficile*-Stämmen und so zur Antibiotika-induzierten Diarrhö führen kann.

Auch die Kombinationstherapie Trimethoprim-Sulfamethoxazol zeigt Wirksamkeit gegen *T. gondii* [102] und kann nicht nur zur Prophylaxe (AII-Empfehlung [49]), sondern auch zur Behandlung einer Toxoplasma-Enzephalitis (BI-Empfehlung [49]) genutzt werden. Wegen der geringeren in vitro-Wirksamkeit sowie der noch geringen klinischen Erfahrungen bleibt Trimethoprim-Sulfamethoxazol bisher allerdings Therapieoption der dritten Wahl [49].

Atovaquon (BII-Empfehlung [49]), ursprünglich ein Medikament zur Behandlung der Malaria, zeigt ebenfalls einen antiparasitären Effekt gegen *T. gondii* [5]. Eine klinische Studie an AIDS-Patienten, die nicht auf die herkömmlichen Kombinationstherapien ansprachen, zeigte, dass unter Atovaquon in Tablettenform 26% der Patienten ein Rezidiv entwickelten, wobei über 95% der Patienten Atovaquon gut tolerierten [51]. In einer weiteren Studie ließ sich bei 52% bzw. 37% der Patienten klinische und radiologische Besserung unter Atovaquon nachweisen, nachdem die Standardtherapie wegen Intoleranz bzw. fehlender Besserung abgebrochen werden musste. Klinische und radiologische Besserung korrelierte dabei mit den Medianplasmakonzentrationen von Atovaquon [103]. Zu beachten bei der Therapie mit Atovaquon ist allerdings, dass die Bioverfügbarkeit stark von der Nahrungsaufnahme und der Darreichungsform des Medikamentes abhängt [82]. Um die Bioverfügbarkeit zu verbessern, ist Atovaquon mittlerweile als Lösung erhältlich (Wellvone®, GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, München).

## 1.2 Miltefosin

### 1.2.1 Herkunft und Anwendungsgebiete

Hexadecylphosphocholin (Miltefosin) ist ein ursprünglich für die Onkologie entwickeltes Phospholipid, das erstmals Ende der 80er Jahre Bedeutung in der antiparasitären Therapie erlangte [22, 104]. Miltefosin besitzt *in vitro* gute Wirksamkeit gegen *Leishmania (L.) donovani*. *L. donovani* ist wie *T. gondii* ein Protozoon und der Erreger der viszeralen Leishmaniose. Im Mausmodell zeigte Miltefosin sowohl nach transkutaner, als auch nach oraler Applikation therapeutische Wirksamkeit gegen Leishmanien [22, 23, 54]. Heute ist Miltefosin nicht nur als erstes oral verfügbares Medikament gegen die viszerale Form, sondern ebenfalls topisch für die kutane Form der Leishmaniose in Südamerika und zur Behandlung von Hautmetastasen bei Mammakarzinomata zugelassen [14, 22, 38, 56].

### 1.2.2 Wirkmechanismen

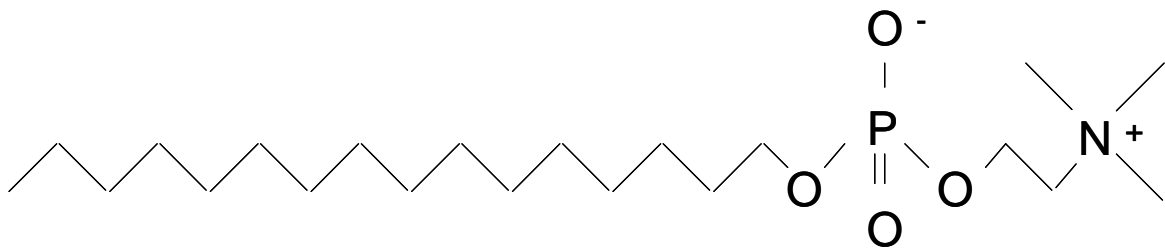
Zwar wurden zahlreiche Untersuchungen hinsichtlich des Wirkspektrums von Miltefosin gegenüber malignen und benignen Zellen durchgeführt, doch konnte kein definitiver Wirkmechanismus herausgearbeitet werden [18]. Für Miltefosin als Chemotherapeutikum werden zahlreiche mögliche Mechanismen diskutiert, die von Membraneffekten über Fettstoffwechselinteraktionen bis hin zu Effekten auf die intrazelluläre Signaltransduktion, z. B. Inhibition der Phosphokinase C, reichen [18] (Tab. 2). Ungewöhnlich für ein Chemotherapeutikum ist, dass Miltefosin keine Knochenmarksuppression induziert [105].

Auch für Miltefosin als antiparasitäres Medikament werden zahlreiche unterschiedliche Wirkmechanismen diskutiert (Tab. 2). Eine Untersuchung mittels fluoreszierenden Miltefosinanaloga ergab ein gleichmäßiges Verteilungsmuster innerhalb von *L. donovani*-Promastigoten, was diverse Wirkmechanismen wahrscheinlich macht bzw. keinen definitiv auszuschließen vermag [89].

Belegt ist, dass durch Miltefosin ein Apoptose-ähnlicher Prozess in *L. donovani*-Promastigoten ausgelöst wird [71]. Als amphiphatisches Molekül (Abb. 1) interferiert Miltefosin möglicherweise mit Zellmembranen [78]. An *L. donovani*-Promastigoten löst Miltefosin eine Reduktion des Sauerstoffverbrauchs und eine Abnahme der Adenosintriphosphat-Konzentration aus [61], zudem vermindert es die DNA- und RNA-Produktion des Parasiten [9]. Auch konnte gezeigt werden, dass der Fettstoffwechsel von *L. donovani*-Promastigoten unter Miltefosin erheblich beeinflusst wird [77]. Beispielsweise korreliert die Wachstumshemmung unter Miltefosin von *L. donovani* mit einer Abnahme der Phosphatidylcholinkonzentration (PtdCho) bzw. einem Anstieg von Phosphatidylethanolaminkonzentration (PtdEth) [77]. An Leishmanien-infizierten Makrophagen bewirkt Miltefosin außerdem eine Stimulation der antiparasitären T-

**Tab. 2:** Mögliche Wirkmechanismen für Miltefosin als Chemotherapeutikum bzw. Antiparasitikum

Wirkmechanismen/-ort	Effekte auf benigne und malignen Zellen	Effekte auf Parasiten
Membran	Osmotische, metabolische und morphologische Veränderungen [42, 52]	Interaktionen mit monomolekularen Lipidschichten [78], Unterschiede im Membranaufbau Miltefosin-resistenter <i>L. donovani</i> Promastigoten [79]
Phosphatidylmetabolismus	Inhibition der Phosphocholin-Synthese [13] PtdCho-Abnahme u PtdEth-Anstieg [41]	Inhibition der Phosphocholin-Produktion in <i>P. falciparum</i> [73] PtdCho-Abnahme und PtdEth-Anstieg in <i>L. donovani</i> [77]
Fettstoffwechsel	Inhibition der Sphingomyelinbildung und Cholesterol-Esterifikation [47]	Reduktion C24-alkylierter Sterole in <i>L. donovani</i> [77]
Intrazelluläre Signaltransduktion	Inhibition der Phosphokinase C [20, 93]	Inhibition der Na <sup>+</sup> -ATPase und Phosphokinase C in <i>T. cruzi</i> [88]
Calcium-Stoffwechsel	Anstieg der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration [42, 85, 108]	
Immunmodulation	Induktion von IFN-γ und GM-CSF [45]	Induktion von IFN-γ und Stimulation einer T-Helfer <sub>1</sub> -Zell-Antwort in <i>L. donovani</i> -infizierten Makrophagen [106] Induktion von TNF-α und NO-Radikalen in <i>T. cruzi</i> -infizierten Makrophagen [87]
Apoptose-Induktion	Caspase-Aktivierung [70]	
Nukleotidstoffwechsel		Drosselung der DNA- und RNA-Produktion in Leishmanien [9]
Atmungskette		Inhibition der Cytochrom C-Oxidase in <i>L. donovani</i> [61]



**Abb. 1:** Struktur von Hexadecylphosphocholin (Miltefosin)

Helfer<sub>1</sub>-Zell-Antwort [106], während an dendritischen Zellen eine Parasitenelimination unter Miltefosin zu beobachten ist, ohne dass immunomodulatorische Eigenschaften nachgewiesen werden konnten [37].

Interessanterweise zeigt Miltefosin ebenfalls gegen *Trypanosoma (T.) brucei*, *T. cruzi*, *Entamoeba histolytica* und gegen *Acanthamoeba spp.* antiparasitäre Aktivität [24, 53, 91, 107]. An mit *T. cruzi* infizierten Makrophagen konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg von TNF- $\alpha$  und NO nachgewiesen werden, was eine Makrophagenaktivierung durch Miltefosin wahrscheinlich macht [87]. Zudem wurde an Trypanosomen ebenfalls eine Umverteilung im Fettstoffwechsel von PtdCho hin zu PtdEth festgestellt [57].

Auch an anderen zum Phylum der Apicomplexa gehörigen Parasiten wie *Plasmodium (P.) falciparum* oder *Cryptosporidium parvum* konnte eine antiparasitäre Wirkung von Miltefosin nachgewiesen werden [73, 92]. Bereits zuvor war bekannt, dass quartäre Ammoniumverbindungen mit langer Alkylgruppe antiparasitäre Wirkung gegen *P. falciparum* besitzen [1]. Für Miltefosin als PtdCho-Analogen wurde ein negativer Feedbackmechanismus auf ein für die PtdCho-Produktion wichtiges Enzym nachgewiesen, was in vitro zu einer Wachstumshemmung von *P. falciparum* führt [73].

Da *T. gondii* überwiegend Membranen mit niedrigem Cholesterol/Phospholipid-Verhältnis besitzt, ist der Phosphatidylmetabolismus ein interessantes pharmakologisches Ziel [96]. Mittels Dimethylethanolamin, einem Cholinanalogon, konnte das Wachstum von *T. gondii* via Hemmung der PtdCho-Produktion gestoppt werden [40].

### 1.3 Experimentelle Modelle der Infektion mit *T. gondii* zur Prüfung der Wirksamkeit von Antiparasitika

Zur Testung von Antiparasitika gegen *T. gondii* finden zahlreiche in vitro- und in vivo-Modelle Verwendung. Da *T. gondii* quasi alle kernhaltigen Zellen infiziert, ist eine erfolgreiche Testung potentieller Medikamente an unterschiedlichen Zelllinien gezeigt worden [6, 32, 64, 84, 94, 95]. Die Zellen werden dabei meist mit Tachyzoiten des schnell replizierenden RH-Stammes (Typ I) bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 1:50 bis 3:1 infiziert [6, 64, 84, 94]. Nach Invasion vermehren sich die Tachyzoiten ohne Medikamentenzugabe intrazellulär mit einer Replikationszeit von 6-8 Stunden [15]. Hohe Infektionsraten haben den Vorteil, dass ein möglicher, direkt am Parasiten wirkender Effekt von Medikamenten deutlicher beim Vergleich mit unbehandelten Kontrollen zu Tage tritt. Allerdings muss bei einem hohen Parasiten/Zell-Verhältnis bedacht werden, dass sich die Wachstumskinetik des Parasiten verändert, wenn nach Replikation von *T. gondii* und Lyse infizierter Zellen keine nicht-infizierten Zellen mehr zur Verfügung stehen [64]. Um nach medikamentöser Intervention den antiparasitären bzw. parasitostatischen Effekt zu evaluieren, kommen Methoden wie Mikroskopie, radioaktiv markierte Uracil-Inkorporation, enzymgekoppelter Immunoabsorptionsansatz (ELISA) oder Durchflusszytometrie zum Einsatz [26, 46, 63, 95, 98]. Diese Methoden quantifizieren die Parasitenreplikation, die Konzentration parasitärer Antigene oder den Anteil infizierter Zellen.

Da in vitro-Modelle zahlreiche Einflussgrößen nur bedingt imitieren können, werden in vivo-Systeme benötigt, um Antiparasitika zuverlässiger hinsichtlich eines möglichen Effekts beim Menschen zu testen. An Mäusen sind in vivo-Modelle der akuten und latenten Toxoplasmose gut etabliert [27, 30]. Abhängig von Parasiten-Stamm, Wirt und Infektionsdosis variiert dabei der Verlauf einer *T. gondii*-Infektion [65]. Nach intraperitonealer (i.p.) sowie peroraler (p.o.) Gabe infektiöser Stadien disseminieren Tachyzoiten im Mausmodell über den gesamten Körper in zahlreiche Organe wie Gehirn, Lunge, Leber und Milz [29]. Während die parenterale Infektion höhere Infektionsraten erreicht [29], wird der natürliche Infektionsweg des Menschen besser imitiert, indem Bradyzoiten-enthaltende Gewebezysten oral appliziert werden. Repräsentative Vertreter von *T. gondii*-Stämmen sind der hochvirulente RH-Stamm (Typ I) und der Maus-avirulente ME49-Stamm (Typ II). Da eine Infektion mit dem RH-

Stamm im Mausmodell bereits bei einer Infektionsdosis von einem Parasiten zum Tode führt, wird dieser häufig für Mortalitätsstudien genutzt [6, 74, 83, 84, 97]. Aber auch der zystenbildende ME49-Stamm wird häufig bei in vivo-Modellen eingesetzt, da Patientenisolat von *T. gondii* überwiegend zu den Typ II-Stämmen gehören [25, 65]. Da Wirt und Infektionsdosis ebenfalls den Verlauf einer *T. gondii*-Infektion beeinflussen [7, 100], sind sie wichtige Parameter bei der Planung von Mortalitätsstudien. Neben Mortalitätsstudien können zur Testung des Erfolgs der Antiparasitika die Parasitenlast, pathologische Veränderungen in Organen oder klinische Parameter bestimmt werden. Gängige Methoden beinhalten dabei Mikroskopie, Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), Bioassays oder Gewichtsverlauf [5, 11, 31, 32]. Die Testung von Antiparasitika an Modellen der akuten Toxoplasmose ist relativ einfach und schnell durchführbar. Nach Parasitendissemination treten pathologische Veränderungen in zahlreichen Organen auf, die zum Tode des Wirtes führen können [6, 31]. Besser werden die Charakteristika der humanen Toxoplasmose allerdings in Modellen der latenten Infektion nachgestellt [5, 97]. Mittlerweile sind auch murine Modelle der Reaktivierungstoxoplasmose unter Verwendung von immunsupprimierten Mäusen entwickelt worden, die am besten die Charakteristika der Toxoplasmose bei Immunsupprimierten widerspiegeln [10, 32, 33, 90, 94].

## 1.4 Zielstellung der Arbeit

Die Infektion mit *T. gondii* kann bei Immungesunden (koninatale Infektion, Augentoxoplasmose) und bei Immunsupprimierten (Toxoplasma-Enzephalitis) zu schwerwiegenden Krankheitsbildern führen [65]. Da Medikamente der ersten Wahl wie Pyrimethamin-Sulfadiazin bzw. Pyrimethamin-Clindamycin mit schweren Nebenwirkungen assoziiert sind, welche häufig zu einem frühzeitigen Abbruch der Therapie oder Umstellen auf weniger wirksame Medikamente führen [51], besteht ein dringender Bedarf an neuen Medikamenten. Neue Therapeutika sollten die Eigenschaften antiparasitäre Wirkung, gute Bioverfügbarkeit und geringe Nebenwirkungen kombinieren. Immunmodulatorische Eigenschaften [106], Interaktionen mit dem Fettstoffwechsel [77] und vor allem die gute Wirksamkeit bei verwandten parasitären Erkrankungen [23, 24, 54] machen Miltefosin als potentiell Medikament für die Toxoplasmose-therapie interessant. In präliminären Daten konnte

zudem ein antiparasitärer Effekt von Miltefosin gegen *T. gondii* gezeigt werden (vertrauliche persönliche Kommunikation, Dr. A. Obwaller, Fa. Orphanidis, Wien).

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob Miltefosin antiparasitäre Wirkung in vitro und in vivo gegen *T. gondii* besitzt. Dazu wurden die folgenden Fragen gestellt:

1. Besitzt Miltefosin einen antiparasitären Effekt gegen *T. gondii* in vitro?
2. Hat Miltefosin einen therapeutischen Effekt im Mausmodell der akuten Toxoplasmose?
3. Besitzt Miltefosin einen antiparasitären Effekt gegen das Zystenstadium von *T. gondii*?



## 2. Materialien und Methodik

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Gerät	Produzent, Artikelnummer	Herkunft
Brutschrank	Heraeus	Hanau, Deutschland
ELISA-Reader	Tecan Spectra II, Art.-Nr.: F039002	Grödig, Österreich
Exsikkator Membranpumpe Typ MZ 2CS Saugglocke	Vacuubrand  Kartell	Wertheim, Deutschland  Italien
Durchflusszytometrie Typ BD FACSCalibur™	Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland
Kühlplatte Typ CP60	Microm	Walldorf, Deutschland
LightCycler-PCR	Roche	Mannheim, Deutschland
Mikroskop, Typ 473011-9901	Zeiss	Jena, Deutschland
Mikroskop mit Digitalkamera Typ AxioStar 1031-031	Zeiss	Jena, Deutschland
Pipetierhilfe (0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)	Eppendorf Research	Hamburg, Deutschland
Pipetierhilfe, automatisch Typ Pipetus	Hirschmann, Laborgeräte	Eberstadt, Deutschland

Photometer	Eppendorf BioPhotometer	Hamburg, Deutschland
Präparierbesteck	Aesculap	Tuttlingen, Deutschland
Rotationsmicrotom Typ HM355	Microm GmbH	Walldorf, Deutschland
Microtommesser S35	Feather	Osaka, Japan
Sterile Arbeitsbank Typ: BSK 4 MP	Heraeus	Hanau, Deutschland
Zählkammer Typ Neubauer	Brand GmbH und Co KG	Wertheim, Deutschland
Zentrifuge Typ: Varifuge RF	Heraeus	Hanau, Deutschland
Zentrifuge Typ: 5417 C	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

## 2.1.2 Einwegmaterialien

Material	Produzent, Chargennummer	Herkunft
Deckgläschen	Menzel Gläser	Braunschweig, Deutschland
Durchflusszytometrie- Röhrchen	VWR	Dresden, Deutschland
Flachbodenplatten (24 Well)	Nunc A/S, Lot: 658034	Roskilde, Dänemark
Histologiekassetten Typ: Histosette II	Simport, Lot: M493-5	Beloeil, Kanada
Knopfkanülen, gebogen 1,20 x 50 Luer	P&W Medizintechnik	Berlin, Deutschland
Mikrotiterplatten (96 Well)	Nunc A/S, Lot: 092500	Roskilde, Dänemark
Objektträger (76x26 mm)	R. Lungenbrick	Emmendingen, Deutschland

PCR-Kapillaren Polykarbonatkapillaren	Genaxxon bioscience	Biberach, Deutschland
Pipettenspitzen klein (10 µl; 100 µl; 1000 µl) groß (5 ml; 10 ml; 25 ml) für PCR (1-10 µl; 10-100 µl)	Eppendorf GmbH  Costar Sorenson, BioScience Inc.	Hamburg, Deutschland  Corning, USA Salt Lake City, USA
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Eppendorf GmbH	Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Eppendorf GmbH	Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Lot: 0613/7275010	Nümbrecht, Deutschland
Röhrchen 15 ml	Sarstedt, Lot: 7043501	Nümbrecht, Deutschland
Röhrchen 50 ml	Sarstedt, Lot: 7040801	Nümbrecht, Deutschland
Spritze 1 ml	Becton Dickinson, Lot: 0610039	Madrid, Spanien
Spritze 5 ml	Becton Dickinson, Lot: 07E055A	Madrid, Spanien

### 2.1.3 Software

Software	Version	Hersteller
LightCycler Software für LightCycler-PCR	Version 3.5	Roche
Cell Quest Pro für Durchflusszytometrie	Version 4.0.2	Becton Dickinson
EasyMeasure zur Digitalisierung lichtmikroskopischer Bilder		Inteq Informationstechnik GmbH

## 2.1.4 Chemikalien

Chemikalie	Produzent, Chargennummer	Herkunft
Aqua destillata	Abteilung Medizinische Mikrobiologie, CBF	Charité, Berlin, Deutschland
Atovaquon Suspension 150 mg/ml (Wellvone <sup>®</sup> )	GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG	München, Deutschland
DEPC, Pyrokohlensäure- Diethylester	Sigma, Lot: 80H2621	Steinheim, Deutschland
Eisessig, C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Merck KGaA, Lot: K26610563	Darmstadt, Deutschland
Entellan, Einschlussharz	Merck KGaA, Lot: 0B540325	Darmstadt, Deutschland
Ethanol, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH unvergällt	Merck KgaA, Lot: K37041886	Darmstadt, Deutschland
Ethanol, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH vergällt mit Ethylmethylketon	Herbeta-Arzneimittel	Berlin, Deutschland
Formaldehyd 4%	Herbeta-Arzneimittel	Berlin, Deutschland
Formaldehyd 37%	Herbeta-Arzneimittel	Berlin, Deutschland
HCl, Salzsäure	Merck KGaA, Lot: 37471017	Darmstadt, Deutschland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Wasserstoffperoxid	Merck KGaG, Lot: K36750797	Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Herbeta-Arzneimittel	Berlin, Deutschland
Kaliumaluminiumsulfat	Merck KgaA, Lot: A.150847001	Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat-	Sigma,	Steinheim,

Trihydrat	Lot: 47H0811	Deutschland
Kupfersulfat, CuSO <sub>4</sub>	Sigma, Lot: 27H0808	Steinheim, Deutschland
Miltefosin 10 mg/ml	Orphanidis	Wien, Österreich
MgCl, Magnesiumchlorid 25 mM	Roche GmbH, Lot: 13099100	Mannheim, Deutschland
MTT, 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2-5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid	Sigma, Lot: 66H5033	Steinheim, Deutschland
NaCl, Natriumchlorid	Merck KgaA, Lot: K73471017 726	Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck KgaA, Lot: A282346	Darmstadt, Deutschland
Natriumiodat	Merck KgaA, Lot: B293225312	Darmstadt, Deutschland
P.A.P., monoklonaler Maus-Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex	Dako, Lot: 00007307	Hamburg, Deutschland
Paraffin	Institut für Pathologie, CBF	Charité, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Lot: 0616L	Berlin, Deutschland
Poly-L-Lysin	Sigma, Lot: 113H5545	Steinheim, Deutschland
Pyrimethamin	Sigma, Lot: 10K0270	St. Louis, USA
Sulfadiazin	Sigma, Lot: 50H0447	St. Louis, USA
Tris-HCl	Bio-Rad Laboratories	Hercules, USA
Xylol	J.T.Baker, Lot: 0612904002	Deventer, Holland
Zitronensäure, C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Sigma, Lot: 79H0162	Steinheim, Deutschland

### 2.1.5 Seren und Antikörper

Serum/Antikörper	Produzent, Chargennummer	Herkunft
Fetal Calf Serum (FCS), aliquotiert und inaktiviert	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Primärantikörper, Kaninchenantikörper [33]	AG Liesenfeld, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, CBF	Charité, Berlin, Deutschland
Sekundärantikörper, Kaninchenimmunglobuline	Dako A/S, Lot: 0010848	Roskilde, Dänemark

### 2.1.6 Puffer, Enzyme, Lösungen und Sonden

Puffer/Enzym/Lösung	Produzent, Chargennummer	Herkunft
Ammoniumhydroxid (1%), NH <sub>4</sub> OH	Sigma, Lot: 71K3482	Steinheim, Deutschland
DAB-Tabletten, Diaminobenzidin 1 Tablette auf 5 ml Aqua dest.	Sigma, Lot: 11K8206	Steinheim, Deutschland
EDTA, Ethyldiamintetraessigsäure	Sigma, Lot: 17H0940	Steinheim, Deutschland
Eosin nach Mayer 1 g Eosin (+ 3 Tropfen Eisessig + 100 ml Aqua destillata)	Merck, Lot: 1345	Darmstadt, Deutschland
FastStart	Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland

LightCycler Fast Start, DNA Master HybProbe	GmbH, Lot: 13099100	
Hämatoxylin nach Mayer 1 g Hämatoxylin (+ 0,2 g Natriumiodat + 50 g Kaliumaluminiumsulfat + 50 g Chloralhydrat + 1 g Zitronensäure + 1 l Aqua destillata)	Merck, Lot: 4305	Darmstadt, Deutschland
PBS, phosphat-gepufferte Salzlösung	Biochrom AG, Lot: L182-05	Berlin, Deutschland
Primer: Tox-9 Tox-10as	TIB Molbiol Lot: 711041 Lot: 711040	Berlin, Deutschland
Proteinase K	Quiagen, Lot: 127 14743	Hilden, Deutschland
RPMI-Medium RPMI 1640 + GlutaMax – I	GIBCO, Lot: 301603	Auckland, Neuseeland
SDS, Natriumdodecylsulfat SDS 10%	GIBCO Invitrogen Corporation, Lot: 1214993	Auckland, Neuseeland
Sonden Tox-HP-1 Tox-HP-2	TIB Molbiol Lot: 567547 Lot: 567548	Berlin, Deutschland
Toluidinblau (Toluidin 0,5% 1:10 in PBS verdünnt) Toluidin 0,5% in 60% Ethanol	VWR Prolabo,  Lot: 0506760	Dresden, Deutschland

## **2.1.7 Mäuse, Zellen und Parasiten**

### **2.1.7.1 Mäuse**

NMRI-Mäuse entstammten der Zucht der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, und waren bei Infektion 6-12 Wochen alt. Es wurden bevorzugt weibliche, aus Verfügbarkeitsgründen aber auch männliche Tiere benutzt. Innerhalb der Versuche waren die Tiere gleichgeschlechtlich. Gehalten in Käfigen bis zu maximal 9 Tieren erhielten sie sterilisiertes Trockenfutter und eine Wasserflasche. Eine Genehmigung zur Durchführung des Versuchsvorhabens lag vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin vor.

### **2.1.7.2 Makrophagen**

Murine Makrophagen der Zelllinie J774A.1 (American Type Culture Collection, Manassas, USA) wurden in Kulturflaschen im Brutschrank bei 5% CO<sub>2</sub> und einer Temperatur von 37°C gehalten. Sie erhielten RPMI-Medium, das mit 10% durch Hitze inaktiviertes und aliquotiertes FCS und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt war, und mindestens alle 3 Tage gewechselt wurde. Bei Konfluenz wurden die Zellen durch Spülen und Schaben mittels Spachtels gelöst und bei 300 g zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Abnahme des Überstandes mit frischem Medium gelöst und auf mehrere Kulturflaschen verteilt.

### **2.1.7.3 GFP-RH *T. gondii* Tachyzoiten**

Tachyzoiten des Typ I RH-Stammes, die das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimierten, wurden von Dominique Soldati (Institut für Mikrobiologie und Molekularmedizin, Genf, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Die Tachyzoiten wurden mittels serieller Zellpassage in J774A.1-Makrophagen gehalten.



#### **2.1.7.4 ME49 *T. gondii* Zysten**

Der zystenbildende *T. gondii* Typ II-Stamm ME49 (Prof. Remington, Stanford, USA) wurde in NMRI-Mäusen passagiert. Dabei wurden die Tiere intraperitoneal mit 5 Zysten infiziert. Die Zysten stammen aus einem mit 1 ml PBS suspendierten Gehirn einer mindestens vier Monate zuvor infizierten Maus.

## **2.2 Methodik**

### **2.2.1 Infektionen**

#### **2.2.1.1 Orale Infektion mit ME49 Zysten**

Zur Gewinnung der Zysten wurde am Infektionstag das Gehirn einer latent infizierten NMRI-Maus entnommen. Dieses wurde mit einem Keramikmörser zerrieben und mit 1 ml PBS suspendiert. Viermal 10 µL der Lösung wurden auf Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas bedeckt. Die Zysten wurden direkt unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Mithilfe des Durchschnittswerts wurde der Gesamtgehalt an Zysten der Lösung berechnet. Entsprechend der für die Infektion benötigten Menge an Flüssigkeit wurde die Lösung mit PBS verdünnt. Pro Maus wurden 10 Zysten in 0,2 ml PBS oral per Kopfkanüle gegeben.

#### **2.2.1.2 Intraperitoneale Infektion mit GFP-RH Tachyzoiten**

In J774A.1-Makrophagen gehaltene GFP-RH Tachyzoiten wurden bei 300 g zentrifugiert, der Überstand entnommen und das Pellet mit PBS gelöst. In einem Verhältnis von 1:10 wurde mit Toluidinblau gefärbt und der durchschnittliche Gehalt an viablen Tachyzoiten mithilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt. Entsprechend wurde

der Gesamtgehalt kalkuliert. Jede Maus wurde mit  $1 \times 10^5$  GFP-RH Tachyzoiten in 0,2 ml PBS intraperitoneal infiziert.

### 2.2.1.3 Intraperitoneale Infektion mit ME49 Zysten

Wie bei der oralen Infektion beschrieben (s.o.) wurden 10 ME49 Zysten aus dem Gehirn einer latent infizierten NMRI-Maus gewonnen und pro Maus in 0,3 ml PBS intraperitoneal verabreicht (Modell der latenten Toxoplasmose).

## 2.2.2 Medikamentöse Behandlung

### 2.2.2.1 Orale Behandlung

Je eine Gruppe von Mäusen wurde ab dem 5. Tag nach Infektion für 7 Tage (Modell der akuten Toxoplasmose) bzw. ab dem 28. Tag nach Infektion für 7 oder 14 Tage (Modell der latenten Toxoplasmose) mit einer der folgenden Konzentrationen an Medikamenten mithilfe einer Knopfkanüle per os behandelt:

<b>Medikament</b>	<b>Dosis</b>
Hexadecylphosphocholin (Miltefosin)	20 mg/kg Körpergewicht/Tag
Hexadecylphosphocholin (Miltefosin)	30 mg/kg Körpergewicht/Tag
Atovaquon (Wellvone <sup>®</sup> )	100 mg/kg Körpergewicht/Tag

Dabei wurde ein Gewicht pro Maus von 20 g angenommen, die Flüssigkeitsmenge pro Einzelgabe betrug 0,2 ml (Modell der latenten Toxoplasmose) bzw. 0,3 ml (Modell der akuten Toxoplasmose).

### 2.2.2.2 Intraperitoneale Behandlung

Drei Tage nach Infektion wurden die Mäuse über 5 Tage hinweg intraperitoneal behandelt. Jeweils eine Gruppe von Mäusen erhielt eines der folgenden Medikamente:

<b>Medikament</b>	<b>Dosis</b>
Atovaquon (Wellvone®)	100 mg/kg Körpergewicht/Tag
Hexadecylphosphocholin (Miltefosin)	30 mg/kg Körpergewicht/Tag
Pyrimethamin - Sulfadiazin	0.71 mg/kg - 30 mg/kg Körpergewicht/Tag

Für 0,2 ml pro Einzelgabe wurde mit PBS verdünnt. Zur Behandlung wurden 1 ml Insulinspritzen verwendet. Im Falle der Kombinationstherapie Pyrimethamin-Sulfadiazin wurde pro Tag jeweils eines der Medikamente links, das andere rechts i.p. injiziert.

### **2.2.3 Organentnahme**

Am 8., 12., 35. bzw. 42. Tag nach Infektion wurden die NMRI-Mäuse durch CO<sub>2</sub>-Inhalation und zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden Leber, Lunge, Gehirn und Milz entnommen.

Für die PCR-Analysen wurden ein Leberlappen, ein Teil der Lunge, ein Sagittalschnitt des Gehirns, sowie ein Teil der Milz in 1,5 ml Reaktionsgefäßen für die Dauer der Sektion auf Eis gelegt und dann bei -80°C eingefroren. Für die histologische Untersuchung wurden ein Leberlappen, ein Lungenlappen, sowie ein Sagittalschnitt des Gehirns in Histologiekassetten in Formalin (4%) gelagert. Für Quetschpräparate wurden in der Medianebene geteilte Gehirnhälften verwendet, die bis zur Auswertung feucht gelagert wurden.

### **2.2.4 Quantifizierung von *T. gondii*-DNA mittels PCR**

Zur Quantifizierung von *T.gondii*-DNA wurde ein Genabschnitt des "cryptic-gene" gewählt [80]. Er besteht aus 162 Basenpaaren und liegt in 200- bis 300-facher Ausführung im *T. gondii*-Genom vor. Als Primer fungierten Tox-9 (AGG-AGA-GAT-ATC-AGG-ACT-GTA-G) und Tox-10as (GCG-TCG-TCT-CGT-CTA-GAT-CG), zudem wurden Tox-HP-1 (GAG-TCG-GAG-AGG-GAG-AAG-ATG-TT-FAM) und Tox-HP-2 (RED-640-CCG-GCT-TGG-CTG-CTT-TTC-CTG-Ph) als Hybridsonden zur FRET-Bestimmung verwendet.

Nach der Methodik von Laird [55] wurde DNA aus den Organen Gehirn, Lunge, Milz und Leber isoliert: Teilpräparate der Organe wurden in 500 µl Lysispuffer (100 mM Tris-HCl pH 8-8,5; 5 mM EDTA pH 8; 0,2% SDS; 200 mM NaCl; H<sub>2</sub>O; Proteinase K 250 µl/ml) im Thermomixer für über 1 Stunde bei 56°C homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 17.000 g über 15 Minuten zentrifugiert und 400 µl des Überstands wurde mit 400 µl Isopropanol (100%) gemischt. Durch leichtes Schütteln präzipitierte die DNA, konnte mit einer Pipettenspitze entnommen und durch mehrmaliges Eintauchen in 200 µl Ethanol (70%) gewaschen werden. Anschließend wurde das Pellet getrocknet bis der Alkohol vollständig verdampft war. Um den Prozess zu beschleunigen, wurde ein Exsikkator für 30 Minuten eingesetzt. Danach wurde das Pellet mit 200 µl, 400 µl bzw. 800 µl H<sub>2</sub>O DEPC versetzt. Die Konzentration an doppelsträngiger DNA (dsDNA) der Proben wurde in einer Verdünnung von 1:10 mit H<sub>2</sub>O DEPC mittels Photometer bei 280 nm bestimmt. Durch Verdünnung mittels H<sub>2</sub>O DEPC wurden die Proben auf eine einheitliche Gesamtmenge dsDNA von 50 ng/µl gebracht.

Anschließend wurden PCR-Kapillaren mit 5 µl MasterMix (pro Probe: 1 µl Fast Start; 1 µl Primer Mix (jeweils 10 µM Tox-9 und Tox-10as); 0,8 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,67 µl Probe Tox-HP-1; 0,67 µl Tox-HP-2; 0,87 µl H<sub>2</sub>O) und 5 µl der Probe befüllt. Als Kontrolle und zur Quantitätsbestimmung wurden Wasser, 250 pg, 25 pg und 2,5 pg *Toxoplasma*-Standard mitgeführt.

Die LightCycler-PCR wurde bei folgenden Zykluseinstellungen durchgeführt:

<b>Schritt</b>	<b>Zeit und Temperatur</b>
Präinkubationszeit:	10 Minuten bei 95°C
Amplifikation (47 Zyklen):	
Encoding	14 Sekunden bei 95°C
Annealing	14 Sekunden bei 72°C
Elongation	7 Sekunden bei 42°C
Kühlung	20 Sekunden bei 40°C

Die Auswertung erfolgte mittels LightCycler Software. Die gemessenen CT-Werte wurden mithilfe der Standardkurve umgerechnet und sind in *T. gondii*-DNA (pg) / 250 ng dsDNA angegeben.

## 2.2.5 Histologie

Die Präparate wurden mit einer Alkoholreihe im Institut für Pathologie, CBF, Charité - Universitätsmedizin Berlin, entwässert und anschließend mit flüssigem Paraffin eingebettet. Geschnitten wurde 4,5 µm dick am Microtom: Lunge und Gehirn sagittal, Leber horizontal. Alle Schnitte wurden auf Glasobjektträger gezogen, wobei die Objektträger für die polyklonale Immunoperoxidasereaktion zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtet wurden. Anschließend wurden die Objektträger über Nacht bei 60°C fixiert.

### 2.2.5.1 Peroxidase-Anti-Peroxidase-Färbung

Je Objektträgerschiffchen wurde eine Positivkontrolle mitgeführt. Schnitte wurden mithilfe zweimaligen Waschens in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (Isopropanol 100%, Ethanol 96%, Ethanol 80%, Ethanol 70%) und destilliertem Wasser entparaffinisiert. Anschließend wurden endogene Peroxidasen mittels 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geblockt. Nach zweimaligem Spülen in PBS wurden die Präparate mit Schweineserum, 1:10 in PBS verdünnt, über 30 Minuten inkubiert. Nach Abkippen des Serums wurde über Nacht mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1:2000) inkubiert. Nach mindestens 12 Stunden wurde zweimalig mit PBS gewaschen und es erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers über 30 Minuten in einer Konzentration von 1:100. Wiederum wurde zweimalig mit PBS gespült und mit dem P.A.P-Komplex 30-minütig inkubiert, ebenfalls in einer Verdünnung von 1:100. Zweimaligem Waschen in PBS folgte die Färbung mit DAB-Lösung (5 ml DAB-Lösung mit 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%), deren Intensivierung nach 5 Minuten durch mehrmaliges Spülen in destilliertem Wasser beendet wurde. Die Tönung wurde durch Kupfer-Sulfat-Lösung (0,5%) gestärkt und anschließend wurde zweimalig mit destilliertem Wasser gespült. Die Zellkerne wurden durch Hämatoxylin für 5 Sekunden gefärbt. Nach zweimaligem Spülen in Wasser wurde mit Ammoniak (1%) nachgebläut. Es wurde doppelt mit destilliertem Wasser gespült und eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 70%, Ethanol 80%, Ethanol 96%, Isopropanol 100%) zur Fixierung verwendet. Zweimal wurden die Schnitte in Xylol für jeweils 5 Minuten gewaschen bevor sie ein mit Einschlussharz (Entellan) benetztes Deckglas erhielten. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur. Zur Beurteilung wurden bräunlich gefärbte Zysten, parasitophore Vakuolen und freie Tachyzoiten sowie andere spezifische

Antikörperreaktionen an Leber und Lunge bei 200-facher Vergrößerung in 20 Gesichtsfeldern und in Hirngewebe bei 200-facher Vergrößerung in 5 Gesichtsfeldern ausgezählt (Abb. 2).

### 2.2.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Objektträger wurden mittels Objektträgerschiffchen in Glasküvetten mit den folgenden Lösungen für die angegebenen Zeiten getaucht:

2-malig Xylol	5 Minuten
Isopropanol 100%	Einige Sekunden pro Lösung, wiederholt bis keine Schlieren mehr zu sehen waren.
Ethanol 96%	
Ethanol 80%	
Ethanol 70%	
Aqua destillata	
Hämatoxylin	5 Minuten
Aqua destillata	Einige Sekunden
HCl-Alk	Einige Sekunden, Differenzierung der Kernfarbe
Spülen in Leitungswasser	5 Minuten
Aqua destillata	Kurzes Spülen
Eosin	30 Sekunden bis 1 Minute, je nach Alter des Eosins
Ethanol 70%	Kurzes Eintauchen in die jeweilige Lösung
Ethanol 80%	
Ethanol 96%	
Isopropanol 100%	
2-malig Xylol	5 Minuten

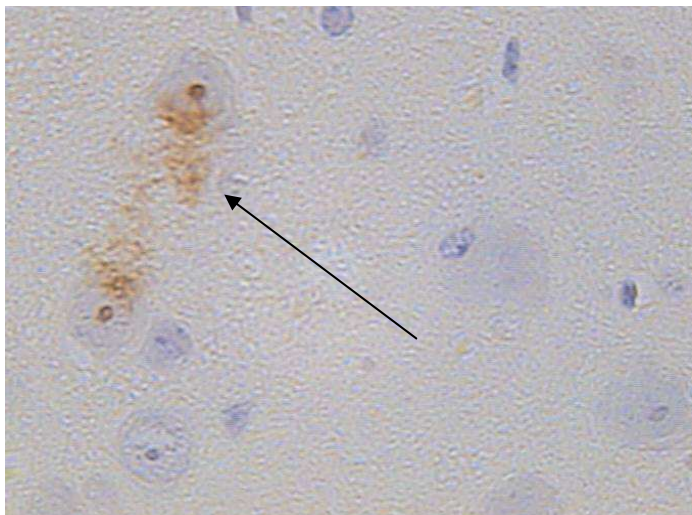
Anschließend wurde ein mit Entellan beschichtetes Deckglas zur besseren Konservierung aufgelegt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Beurteilt wurden die entzündlichen Reaktionen. Die histologische Auswertung der Leberschnitte erfolgte anhand der Auszählung entzündlicher Foci in 20 Gesichtsfeldern

mit 200-facher Vergrößerung. An horizontalen Zerebralschnitten wurde nach Durchsicht der angeschnittenen Leptomeninge sowie des Gehirngewebes die Entzündungsreaktion auf einer Skala von 1 bis 3 bestimmt, wobei 1 tadellos angeordneten Meningealzellen bei unauffälligem Hirngewebe und 3 einer mit Entzündungszellen infiltrierten Hirnhaut und zahlreichen intrazerebralen Entzündungsfoci entspricht. Auch die Lungenschnitte wurden mithilfe einer Ordinalskala von 1 (nahezu unauffälliges Alveolar- und Bronchialgewebe) bis 7 (gänzlich entzündlich infiltriertes Alveolargewebe mit Bronchiendestruktion) beurteilt (Abb. 3). Dabei wurde jeweils das Entzündungsstadium für die Beurteilung gewählt, das über 50% des angeschnittenen Organteils ausmachte.

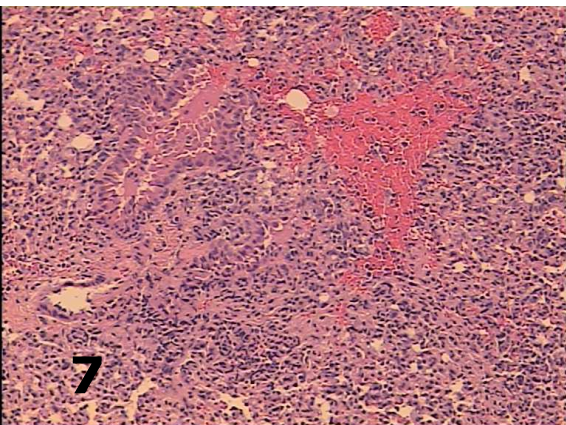
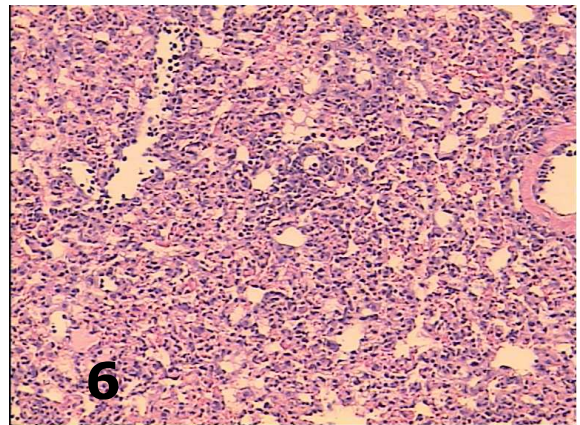
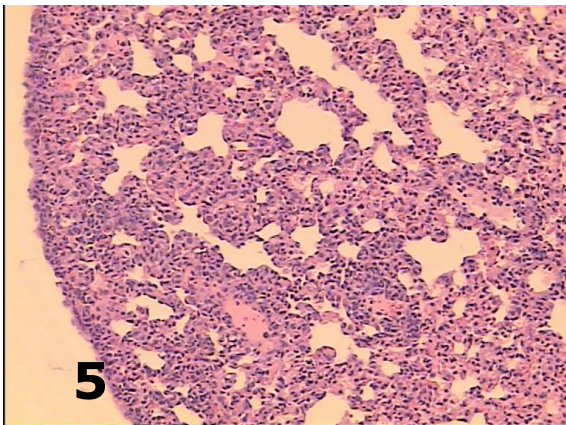
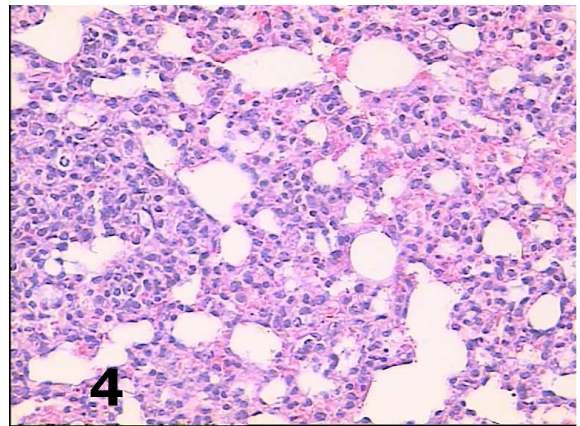
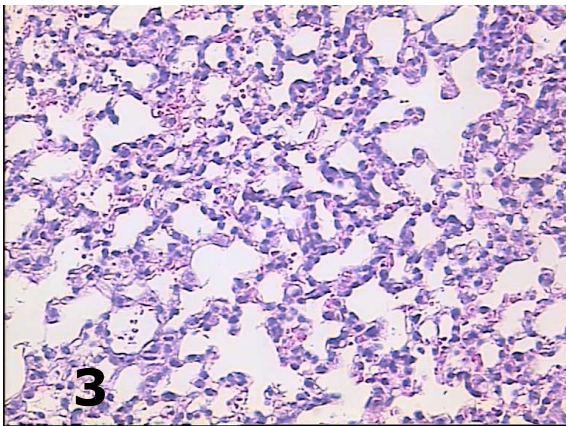
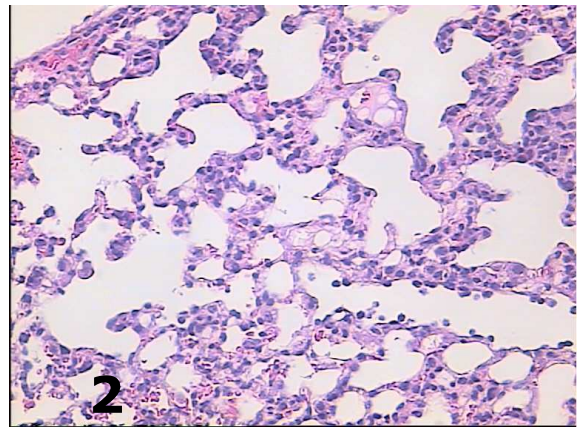
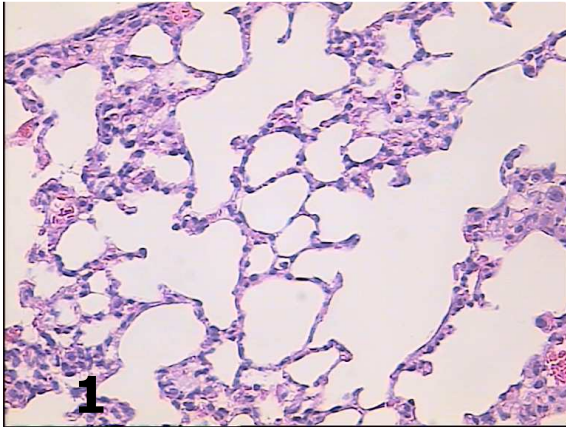
### 2.2.5.3 Quetschpräparate

Gehirnhälften von latent infizierten NMRI-Mäusen wurden nach Organentnahme bis zur Auswertung feucht auf Objektträgern gelagert. Mittels Deckgläschen wurden die Präparate flach gepresst und direkt im Anschluss wurden Zysten unter dem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung in 10 Gesichtsfeldern ausgezählt.



**Abb. 2:** Peroxidase-Anti-Peroxidase-Färbung:

Gezählt wurden Zysten, parasitophore Vakuolen, freie Tachyzoiten und spezifische Antikörperreaktionen. Der Pfeil zeigt eine spezifische Antikörperreaktion im Gehirn einer 8 Tage zuvor mit  $1 \times 10^5$  GFP-RH Tachyzoiten i.p. infizierten NMRI-Maus.



**Abb. 3:** Quantifizierung der Entzündungsreaktion in Lungen von 12 Tage zuvor mit 10 ME49 Zysten p.o. infizierten NMRI-Mäusen.

Skala von **1**) nahezu gesundes Lungengewebe bis **7**) vollständig entzündlich verändertes Alveolar- und Bronchialgewebe. Zur Beurteilung kam jeweils das Entzündungsstadium, das über 50% des Schnitts ausmachte.



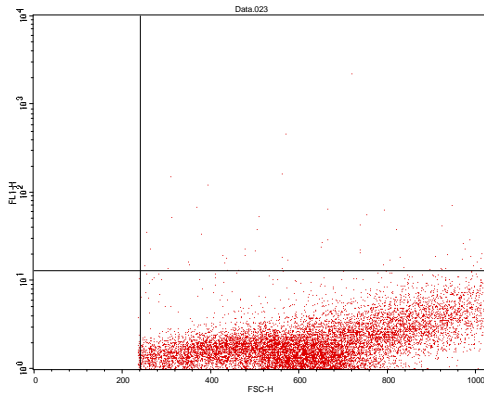
## 2.2.6 In vitro-Versuche

Viable J774A.1-Makrophagen wurden mithilfe der Neubauerzählkammer und Färbung mittels Toluidinblau ausgezählt und in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Kammer auf eine 24-Well-Flachbodenplatte ausplattiert. Über Nacht wurden sie bei  $37^\circ\text{C}$  in RPMI-Medium kultiviert, das 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin enthielt. Anschließend wurden die Zellen mit GFP-RH Tachyzoiten in einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 1:1 und 5:1, d.h. mit  $1 \times 10^5$  und  $5 \times 10^5$  Tachyzoiten pro Kammer, infiziert. Nicht-infizierte Makrophagen wurden als Kontrollen mitgeführt. Nach einer dreistündigen Inkubationszeit wurden die Kammern zweimal mit warmen PBS gewaschen, um extrazelluläre Parasiten zu entfernen. Infizierte sowie nicht-infizierte Kontrollen erhielten wiederum RPMI-Medium. Die übrigen Zylinder wurden mit Miltefosin in einer Konzentration von 10, 20 und 30  $\mu\text{g/ml}$  oder mit Atovaquon (3  $\mu\text{g/ml}$ ) für 3, 48 bzw. 72 Stunden inkubiert. Je Parasiten/Zell-Verhältnis und Konzentration wurden jeweils 2 bzw. für Kontrollen 3 Zylinder angesetzt. An den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen mit  $4^\circ\text{C}$  kaltem Facs-Wash (PBS mit 1% FCS) gewaschen. Nach Zentrifugation bei 300 g für 10 Minuten und Abnahme des Überstands wurde das Pellet in FacsFix (PBS mit 3,7% Formalin) gelöst und bis zur Facs-Analyse höchstens 5 Tage später bei  $4^\circ\text{C}$  in Dunkelheit gelagert. In vitro-Tests an Makrophagen wurden 3-malig durchgeführt.

## 2.2.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erfolgte an einem FacsCalibur™-Gerät. In Kultur gehaltene unbehandelte J774A.1-Makrophagen dienten als Kontrollpopulation, um die Makrophagenpopulation zu identifizieren (Makrophagen-Gate).

GFP-RH Tachyzoiten besitzen ein grünes Fluorochrom, welches mit einem Laser bei 488 nm Wellenlänge angeregt und dessen Lichtemission mittels Photodetektors bei 525 nm bestimmt werden kann. Die Quadranteneinteilung erfolgte so, dass nicht über 1% der naiven J774A.1-Makrophagen als lichtemittierend im FL-1-Detektor angesehen und damit zu den infizierten Zellen gerechnet wurden (Abb. 4).



Gated Events: 14187

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	100	0.70	0.50
LL	147	1.04	0.73
LR	13940	98.26	69.70

**Abb. 4:** Quadranteneinstellung anhand von naiven J774A.1-Makrophagen in Durchflusszytometrie.

X-Achse: FSC, Vorwärtsstreulicht (Zellgröße).

Y-Achse: FL-1, Photodetektor (Lichtemission bei 522 nm).

Der untere rechte Quadrant (LR, % Gated) umfasst die Prozentzahl naiver Makrophagen, der obere rechte Quadrant (UR, % Gated) die Prozentzahl *T. gondii*-infizierter Makrophagen aller mittels Makrophagen-Gate identifizierten Ereignisse.

Die Quadranteneinteilung erfolgte so, dass unter 1% der naiven Makrophagen als infiziert angesehen wurden. Gezählt wurden mindestens 10000 Ereignisse, die innerhalb des Makrophagen-Gates (100% Gated) lagen.

Vor jeder Messung wurde die entsprechende Probe gevortext. Gezählt wurden mindestens 10000 Ereignisse, die innerhalb des Gates lagen, das auf die Makrophagenpopulation ausgerichtet war. Die Ergebnisse sind in Mittelwerten mit einfacher Standardabweichung angegeben.

## 2.2.8 Zytotoxizitätsmessung mittels MTT-Test

Zur Zytotoxizitätsbestimmung von Miltefosin wurde ein MTT-Test durchgeführt [67]. 50 µl MTT-Lösung wurde auf konfluente Einzelzelllagen von J774A.1-Makrophagen gegeben, welche zuvor über 20 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit Miltefosin in einer Konzentration von 10, 20 und 30 µg/ml inkubiert wurden. Anschließend wurde die Absorption bei 550 nm in einem ELISA-Reader gemessen. Der prozentuale Anteil toter Zellen wurde aus dem Vergleich mit nicht behandelten Zellen errechnet, die als 100% lebend angesehen wurden.

Die Ergebnisse werden in Mittelwerten mit Standardabweichung angegeben, die sich aus jeweils 6 Zylindern pro getestete Konzentration Miltefosin ergeben.

## 2.2.9 Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mittels GraphPad® Prism für Macintosh, Version 5.0, gemacht. Als einheitliches Signifikanzniveau wurde  $\alpha \leq 0,05$  angesehen, zur statistischen Auswertung wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,07$  wurde als Trend angesehen.

Aufgrund der kleinen Datenmengen wurde bei der Einzelanalyse des dargestellten in vitro-Versuches der ungepaarte T-Test mit Welch-Korrektur verwendet. Dieser geht von heterogenen Varianzen aus, setzt aber eine Normalverteilung voraus, die bei kleiner Stichprobe nicht gegeben ist. Daher finden im Text ebenfalls die zusammengefassten in vitro-Daten der 3 Einzelversuche Erwähnung, die mittels Mann-Whitney-Test analysiert wurden. Um die zusammengefassten Daten auszuwerten, wurden aufgrund der unterschiedlichen Absolutzahlen der Kontrollgruppen in den Einzelversuchen die Daten auf Prozent im Vergleich zum Mittelwert der jeweiligen Kontrollgruppe umgerechnet und diese für die statistische Analyse herangezogen.

Im Modell der latenten Toxoplasmose fand wegen der kleinen Datenmenge ( $n \geq 2$  Mäuse pro Gruppe) bzw. zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen ebenfalls der Welch-Test Verwendung.

Die Abbildungen wurden mittels Microsoft®, Excel für Macintosh, Version 11.3.7, erstellt.

### **3. Ergebnisse**

Da die Therapie der Reaktivierungstoxoplasmose bei Immunsupprimierten durch das häufige Auftreten von schweren Nebenwirkungen gekennzeichnet ist, wurde in der hier vorliegenden Arbeit untersucht, ob das gegen Leishmanien wirksame Miltefosin auch gegen unterschiedliche Stadien von *T. gondii* einen antiparasitären Effekt zeigt.

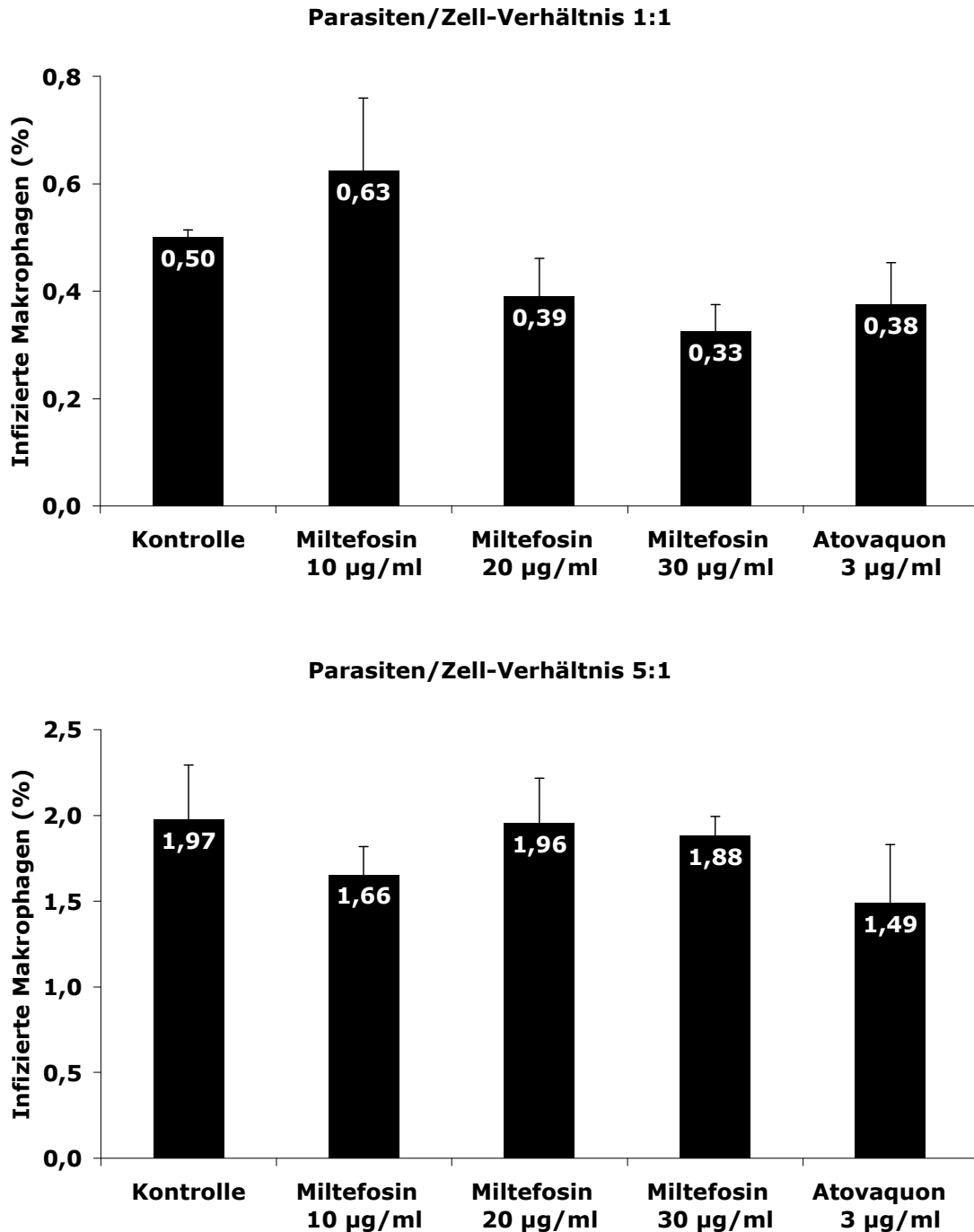
Dazu wurden in Zellkultur murine Makrophagen mit Tachyzoiten infiziert und diese mit Miltefosin behandelt. In in vivo-Modellen wurden intraperitoneal oder peroral infizierte NMRI-Mäuse mit Miltefosin behandelt (Modelle der akuten Toxoplasmose). Zuletzt wurde untersucht, ob Miltefosin antiparasitäre Wirkung gegen das Zystenstadium von *T. gondii* zeigt (Modell der latenten Toxoplasmose).

#### **3.1 Antiparasitäre und zytotoxische Effekte von Miltefosin in vitro**

##### **3.1.1 Antiparasitäre Wirkung von Miltefosin gegen *T. gondii* Tachyzoiten**

Um die Wirksamkeit von Miltefosin gegen *T. gondii* Tachyzoiten zu überprüfen, wurden J774A.1-Makrophagen in einem Parasiten/Zell-Verhältnissen von 1:1 bzw. 5:1 mit GFP-RH Tachyzoiten infiziert und mit Miltefosin in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 1:1 ergab sich nach 3 Stunden Inkubation mit Miltefosin ab einer Konzentration von 20 µg/ml eine abnehmende Zahl infizierter Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 5). Unter Miltefosin 30 µg/ml ergab sich eine Reduktion infizierter Zellen um etwa 30%, welche allerdings nicht signifikant war. Bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 5:1 zeigte Miltefosin ebenfalls in keiner Konzentration eine signifikante Reduktion infizierter Makrophagen. Nach zusammenfassender Auswertung von 3 Testreihen zeigte sich eine signifikante Reduktion infizierter Zellen unter Miltefosin 30 µg/ml bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 1:1 ( $p < 0,005$ ). Auch bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 5:1 zeigte sich in den zusammengefassten Daten eine signifikante Reduktion infizierter Zellen unter Miltefosin, unter einer Konzentration von 10 µg/ml sank der Anteil infizierter Zellen um etwa 15% im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ). Zwar ergab sich unter Atovaquon im

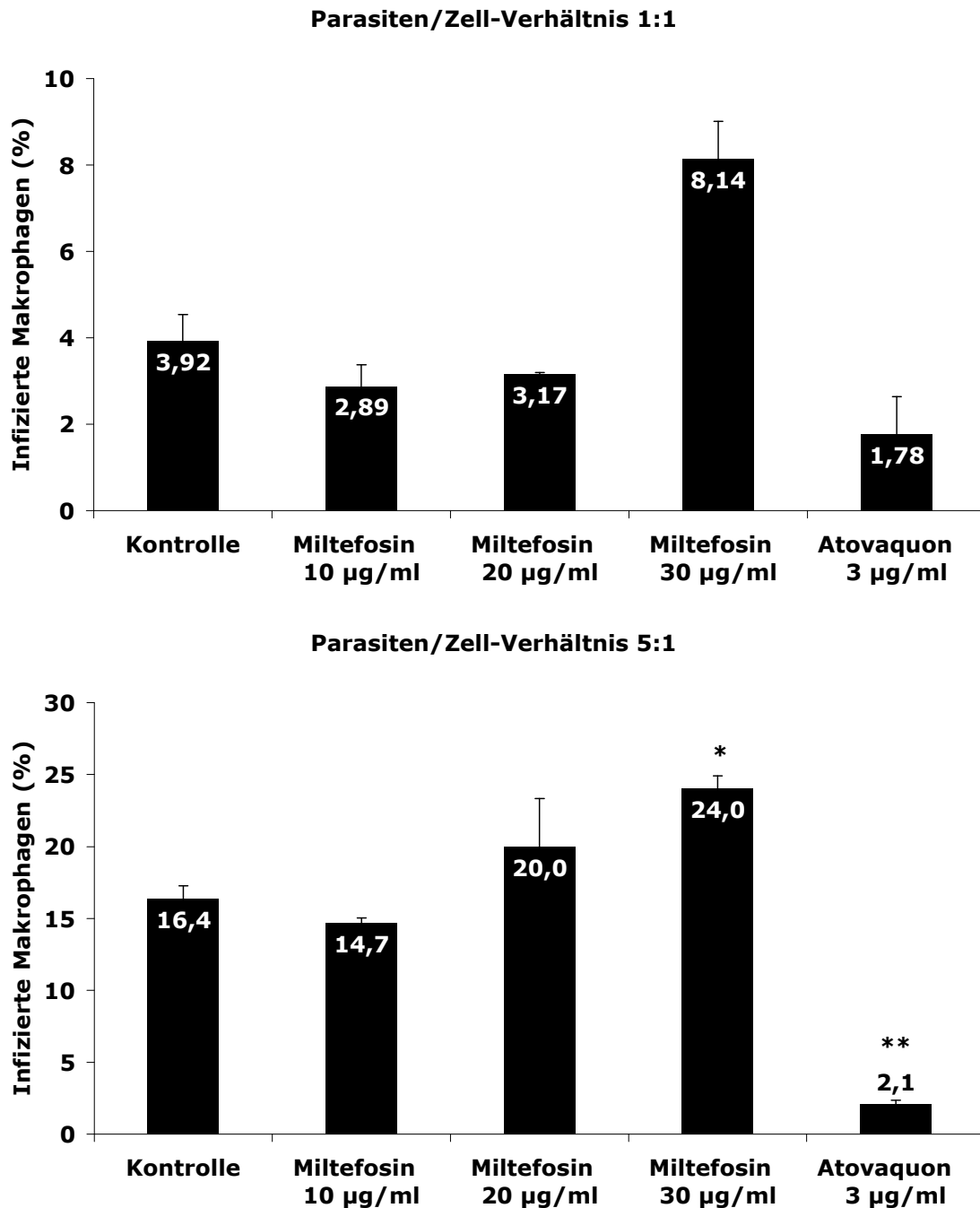
Einzelversuch nach 3 Stunden Inkubation kein antiparasitärer Effekt (Abb. 5), doch konnte in den zusammengefassten in vitro-Daten ein Trend hinsichtlich einer Reduktion infizierter Zellen unter Atovaquon im Vergleich zur Kontrollgruppe bei einem



**Abb. 5:** Prozentzahl infizierter J774A.1-Makrophagen nach 3 Stunden Inkubation mit den entsprechenden Medikamenten. Daten wurden mittels Durchflusszytometrie erhoben und entsprechen repräsentativen Einzelgergebnissen.

Parasiten/Zell-Verhältnis von 1:1 nachgewiesen werden ( $p=0,065$ ), nicht hingegen bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 5:1.

Nach 48 Stunden Inkubation fand sich für Miltefosin ebenfalls kein antiparasitärer Effekt (Abb. 6). Stattdessen konnte teilweise sogar ein Anstieg infizierter Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet werden. Bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 1:1 unter Miltefosin 30  $\mu\text{g/ml}$  war ein Anstieg infizierter Zellen um etwa das Doppelte im



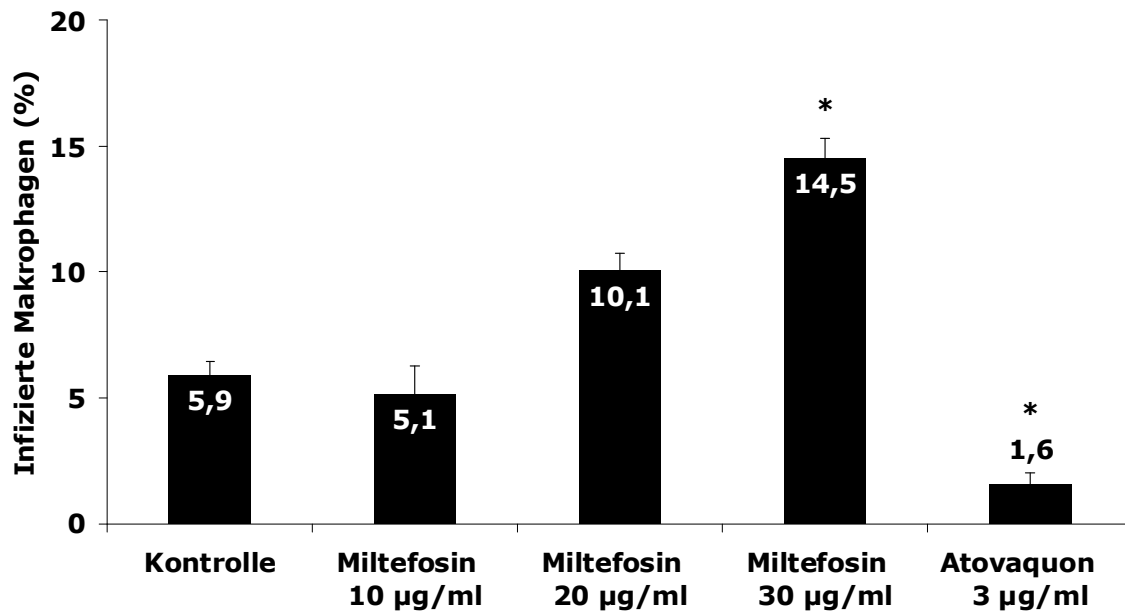
**Abb. 6:** Prozentzahl infizierter J774A.1-Makrophagen nach 48 Stunden Inkubation mit den entsprechenden Medikamenten. Daten wurden mittels Durchflusszytometrie erhoben und entsprechen repräsentativen Einzelgergebnissen. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, \*\* $p < 0,005$  vs. Kontrolle

Vergleich zu nicht-behandelten Kontrollen zu beobachten. In den zusammengefassten Daten der 3 Testreihen war der Anstieg infizierter Makrophagen unter Miltefosin 30 µg/ml bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 1:1 signifikant ( $p < 0,05$ ). Auch bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 5:1 zeigte sich unter Miltefosin 30 µg/ml ein signifikanter Anstieg infizierter Makrophagen im Vergleich zu nicht-behandelten Kontrollen ( $p < 0,05$ ). Für Atovaquon hingegen ergab sich eine deutliche Reduktion der Zahl infizierter Makrophagen unter beiden Parasiten/Zell-Verhältnissen, diese war im Einzelversuch jedoch nur bei einem Verhältnis von 5:1 signifikant (Abb. 6). Unter Berücksichtigung aller drei Läufe ergab sich für Atovaquon nach 48 Stunden Inkubation eine Reduktion von *T. gondii*-infizierten Makrophagen im Vergleich zur Kontrollgruppe von über 50%. Diese Reduktion war in den gesammelten Daten in beiden Parasiten/Zell-Verhältnis von 1:1 bzw. 5:1 signifikant ( $p < 0,005$  bzw.  $p < 0,0005$ ).

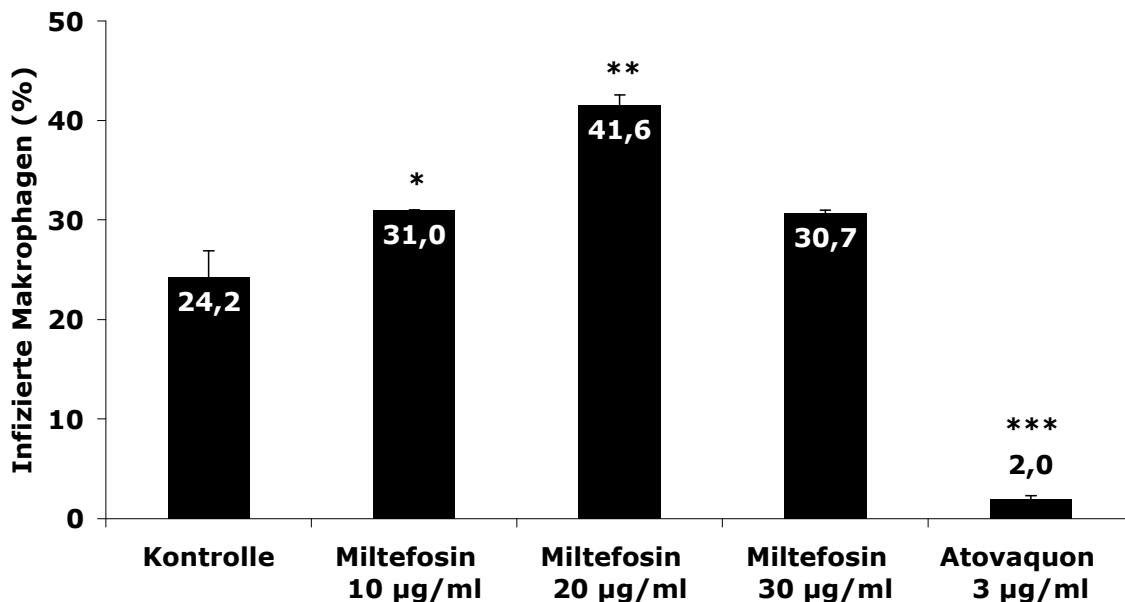
Auch in der Analyse nach 72 Stunden konnte kein antiparasitärer Effekt für Miltefosin gezeigt werden (Abb. 7). Wieder fand sich unter Miltefosinbehandlung ein Anstieg infizierter Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 5:1 war dieser unter allen Miltefosinkonzentrationen nachweisbar, wobei sich unter Miltefosin 30 µg/ml lediglich ein tendenzieller Anstieg infizierter Makrophagen im Vergleich zu nicht-behandelten Kontrollen zeigte ( $p = 0,0518$ ). In den zusammengefassten Daten wurde ein signifikanter Anstieg infizierter Makrophagen unter Miltefosin 20 µg/ml von ca. 50% im Vergleich zu nicht-behandelten Kontrollen bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 1:1 festgestellt ( $p < 0,01$ ). Im Gegensatz zu Miltefosin senkte Atovaquon die Prozentzahl infizierter Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen um bis zu 90% nach 72 Stunden Inkubation (Abb. 7). Auch nach Auswertung aller Experimente konnte nach 72 Stunden eine Reduktion infizierter Makrophagen unter Atovaquon gezeigt werden, es fand sich eine Reduktion infizierter Zellen um über 75% im Vergleich zu Kontrollen in beiden Parasiten/Zell-Verhältnissen ( $p < 0,0005$ ).

Beispielhaft sind in Abb. 8 Ergebnisse der Durchflusszytometrie nach 72 Stunden Inkubation bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 1:1 dargestellt. Neben einer Reduktion der Prozentzahl infizierter Makrophagen unter Atovaquon ist eine Abnahme absolut gemessener Zellen unter Miltefosin 30 µg/ml auffällig. Dies weist auf einen möglichen zytotoxischen Effekt von Miltefosin gegenüber J774A.1-Makrophagen hin.

### Parasiten-Zell-Verhältnis 1:1

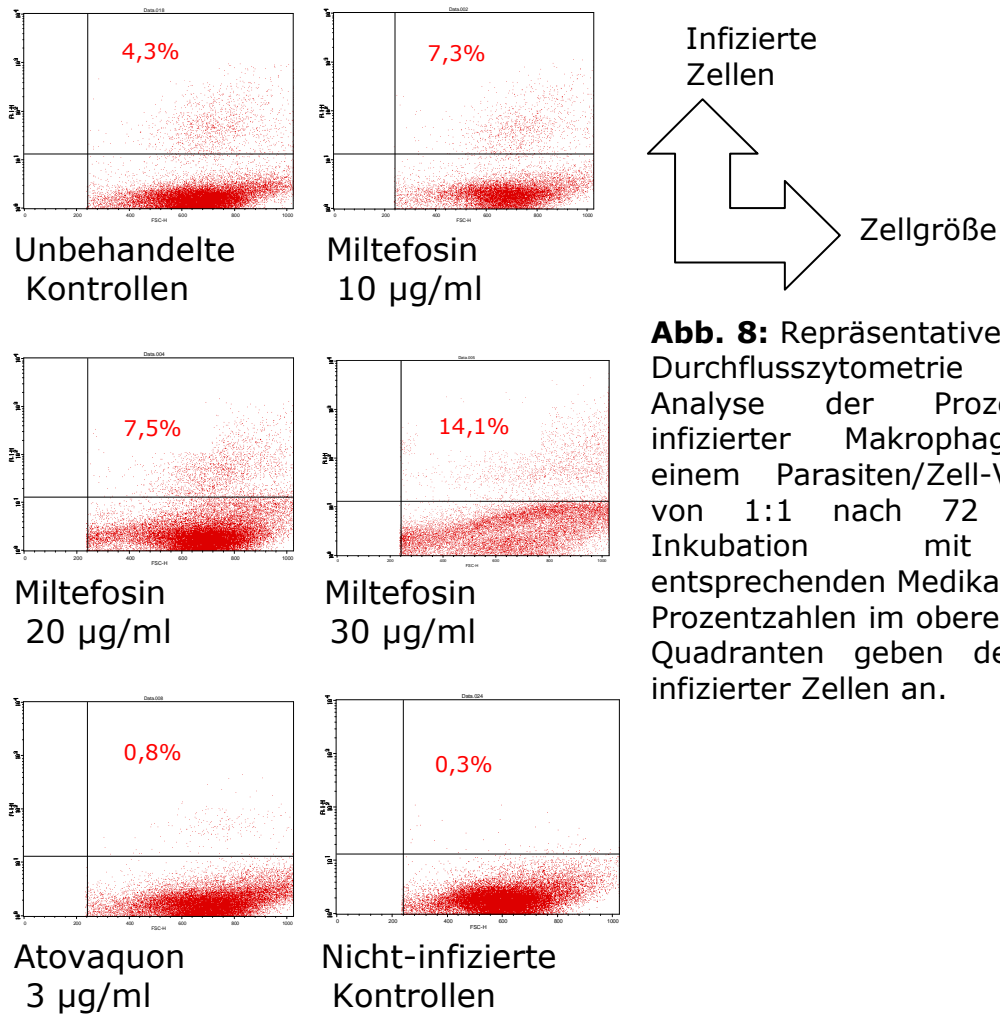


### Parasiten/Zell-Verhältnis 5:1



**Abb. 7:** Prozentzahl infizierter J774A.1-Makrophagen nach 72 Stunden Inkubation mit den entsprechenden Medikamenten. Daten wurden mittels Durchflusszytometrie erhoben und entsprechen repräsentativen Einzelgergebnissen. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, \*\* $p < 0,01$  vs. Kontrolle, \*\*\* $p < 0,005$  vs. Kontrolle



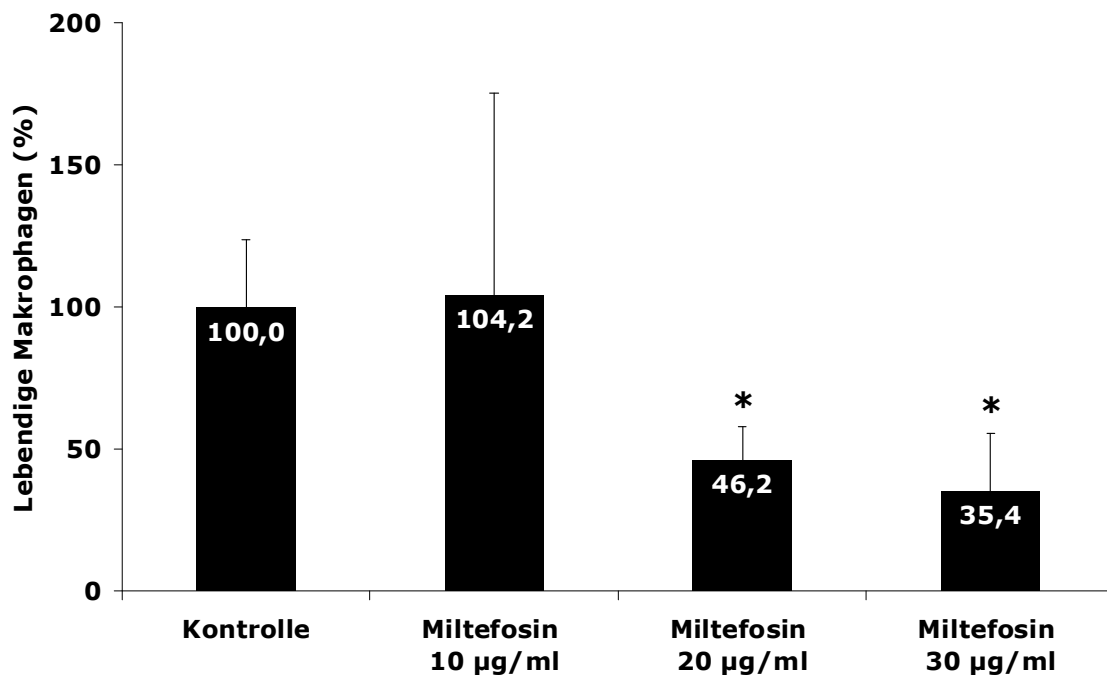


**Abb. 8:** Repräsentative Plots der Durchflusszytometrie zur Analyse der Prozentzahlen infizierter Makrophagen bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 1:1 nach 72 Stunden Inkubation mit den entsprechenden Medikamenten. Prozentzahlen im oberen rechten Quadranten geben den Anteil infizierter Zellen an.

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass Miltefosin keinen antiparasitären Effekt gegenüber *T. gondii* Tachyzoiten in J774A.1-Makrophagen aufweist. Stattdessen ergab sich eine Zunahme infizierter Zellen unter Miltefosin. Atovaquon hingegen zeigte nach Inkubationszeiten von über 48 Stunden deutliche antiparasitäre Wirkung gegenüber *T. gondii* Tachyzoiten.

### 3.1.2 Zytotoxizität von Miltefosin gegenüber J774A.1-Makrophagen

Um nachzuweisen, ob Miltefosin toxische Effekte gegenüber J774A.1-Makrophagen ausübt, wurde der MTT-Test durchgeführt. Dabei wurden naive Makrophagen mit Miltefosin in den Konzentrationen 10, 20 und 30 µg/ml über 20 Stunden inkubiert.



**Abb. 9:** Zytotoxizität von Miltefosin gegenüber J774A.1-Makrophagen (MTT-Test). Die Anzahl lebendiger Zellen ist in Prozent zu unbehandelten Kontrollen angegeben, deren Viabilität auf 100% normiert wurde. \* $p < 0,005$  vs. Kontrolle

Während bei Konzentrationen von 10 µg/ml keine Zytotoxizität nachweisbar war, fand sich ab einer Konzentration von 20 µg/ml eine signifikante Abnahme vitaler Zellen von über 50% (Abb. 9). Bei einer Konzentration von 30 µg/ml lag die Rate lebendiger Zellen bei einem Drittel im Vergleich zu nicht-behandelten Kontrollen.

Diese Daten weisen auf eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität von Miltefosin auf J774A.1-Makrophagen hin.

## **3.2 Therapeutischer Effekt von Miltefosin gegen *T. gondii* in vivo**

### **3.2.1 Modelle der akuten Toxoplasmose**

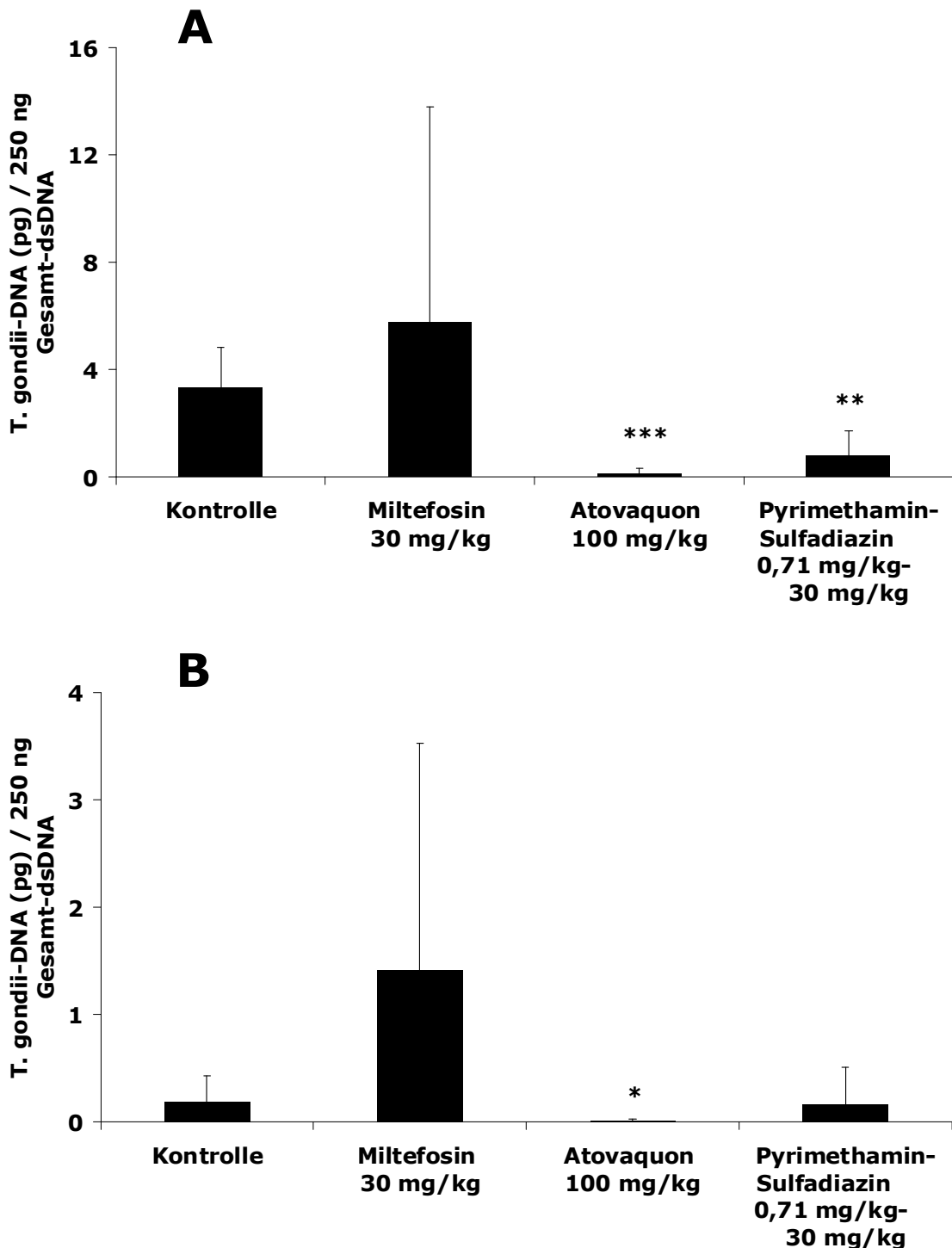
Um den therapeutischen Effekt von Miltefosin auf eine *T. gondii*-Infektion zu untersuchen, wurden 2 Mausmodelle der akuten Toxoplasmose verwendet. Dabei wurden NMRI-Mäuse mit  $1 \times 10^5$  GFP-RH Tachyzoiten i.p. oder mit 10 ME49 Zysten p.o. infiziert und dann für 5 bzw. 7 Tage mit Miltefosin behandelt.

#### **3.2.1.1 Intraperitoneale Infektion mit GFP-RH Tachyzoiten und intraperitoneale Miltefosintherapie**

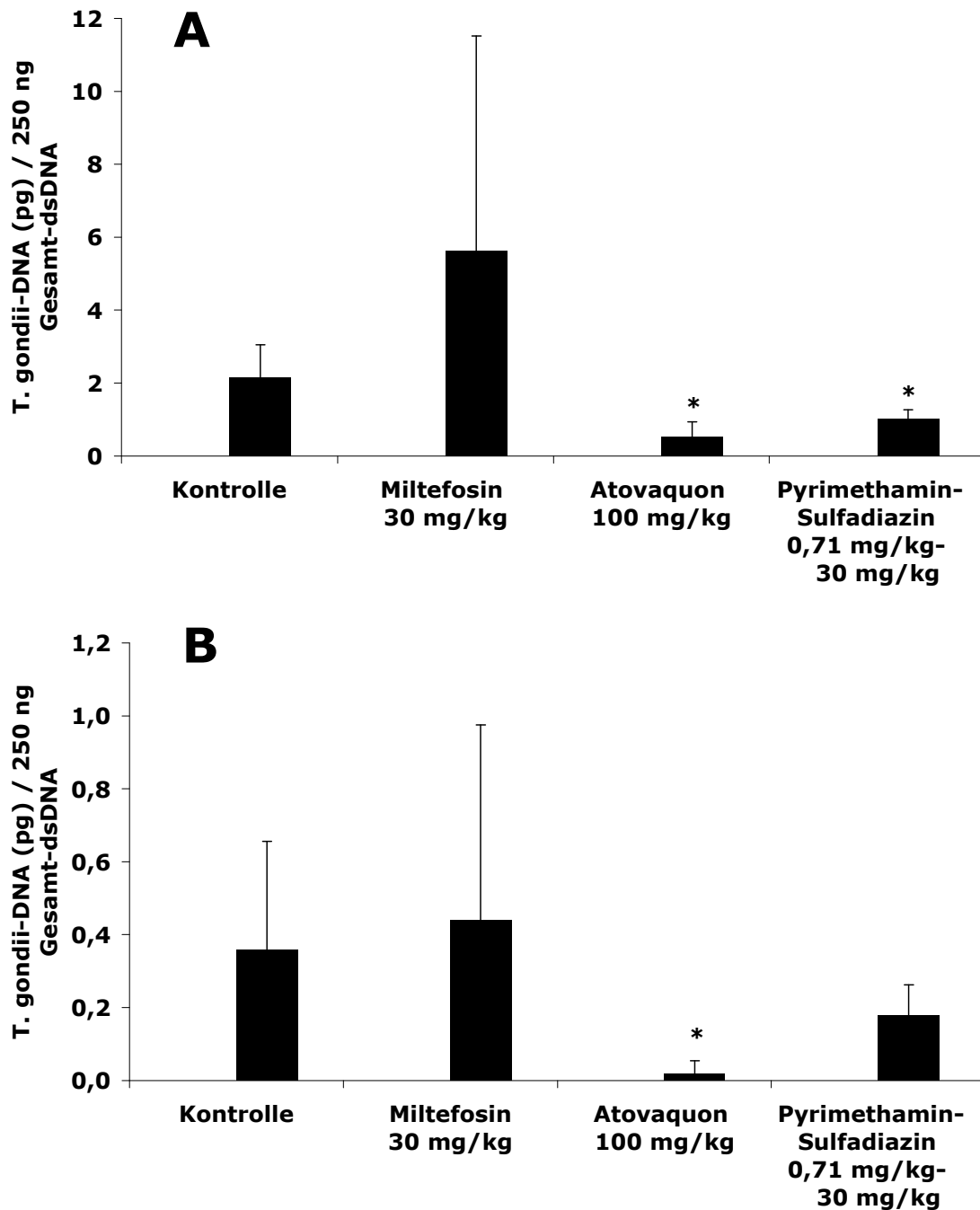
##### **3.2.1.1.1 *T. gondii*-DNA-Konzentrationen in Organen**

Nach 5-tägiger Behandlung mit Miltefosin (30 mg/kg) konnte in der Lunge intraperitoneal infizierter NMRI-Mäuse keine signifikante Senkung der Parasitenlast im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abb. 10A). Die Lunge der mit Atovaquon- bzw. Pyrimethamin-Sulfadiazin-behandelten Mäuse enthielt hingegen signifikant weniger *T. gondii*-DNA im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Abb. 10A). Zwischen Atovaquon- und Pyrimethamin-Sulfadiazin-behandelten Mäusen bestand kein signifikanter Unterschied in der Konzentration an *T. gondii*-DNA. Wie in der Lunge fand sich auch im Gehirn Miltefosin-behandelter Mäuse keine signifikante Reduktion der Parasitenlast (Abb. 10B). Gehirne der mit Atovaquon-behandelten Mäuse, nicht aber der Pyrimethamin-Sulfadiazin-behandelten Mäuse enthielten signifikant niedrigere *T. gondii*-DNA-Konzentrationen als die der Kontrollgruppe (Abb. 10B). Die Konzentrationen an *T. gondii*-DNA in Milz- und Lebergewebe waren denen in anderen Organen vergleichbar (Abb. 11A,B). Unter Miltefosin war in beiden Organen kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellbar. In Milzgewebe ergab die Behandlung mit Atovaquon bzw. Pyrimethamin-Sulfadiazin eine signifikante Reduktion der Parasitenlast (Abb. 11A), während in Lebergewebe unter Atovaquonbehandlung, nicht aber unter Pyrimethamin-Sulfadiazin-Behandlung eine

signifikante Reduktion der Parasitenlast im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellbar war (Abb. 11B).



**Abb. 10:** Konzentrationen von *T. gondii*-DNA in Lunge (**A**) und Gehirn (**B**) infizierter NMRI-Mäuse (8 Tage post infectionem), die 5 Tage mit den entsprechenden Medikamenten bzw. PBS behandelt wurden. Ergebnisse entsprechen Mittelwerten und Standardabweichungen der zusammengelegten Daten zweier Versuche mit jeweils 4 Mäusen pro Gruppe. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, \*\* $p < 0,005$  vs. Kontrolle, \*\*\* $p < 0,001$



**Abb: 11:** Konzentrationen von *T. gondii*-DNA in Milz (**A**) und Leber (**B**) von infizierten NMRI-Mäusen (8 Tage post infectionem), die über 5 Tage mit den entsprechenden Medikamenten bzw. PBS behandelt wurden. Daten entsprechen repräsentativen Einzelergebnissen von jeweils 4 Mäusen pro Gruppe. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle

Beim Vergleich der einzelnen Organe untereinander fand sich innerhalb der Kontrollgruppe im Lungengewebe durchschnittlich die höchste Konzentration an *T.*

*gondii*-DNA. Im Gehirn waren zu diesem frühen Zeitpunkt signifikant geringere Konzentrationen an *T. gondii*-DNA als in der Lunge nachweisbar ( $p < 0,001$ ).

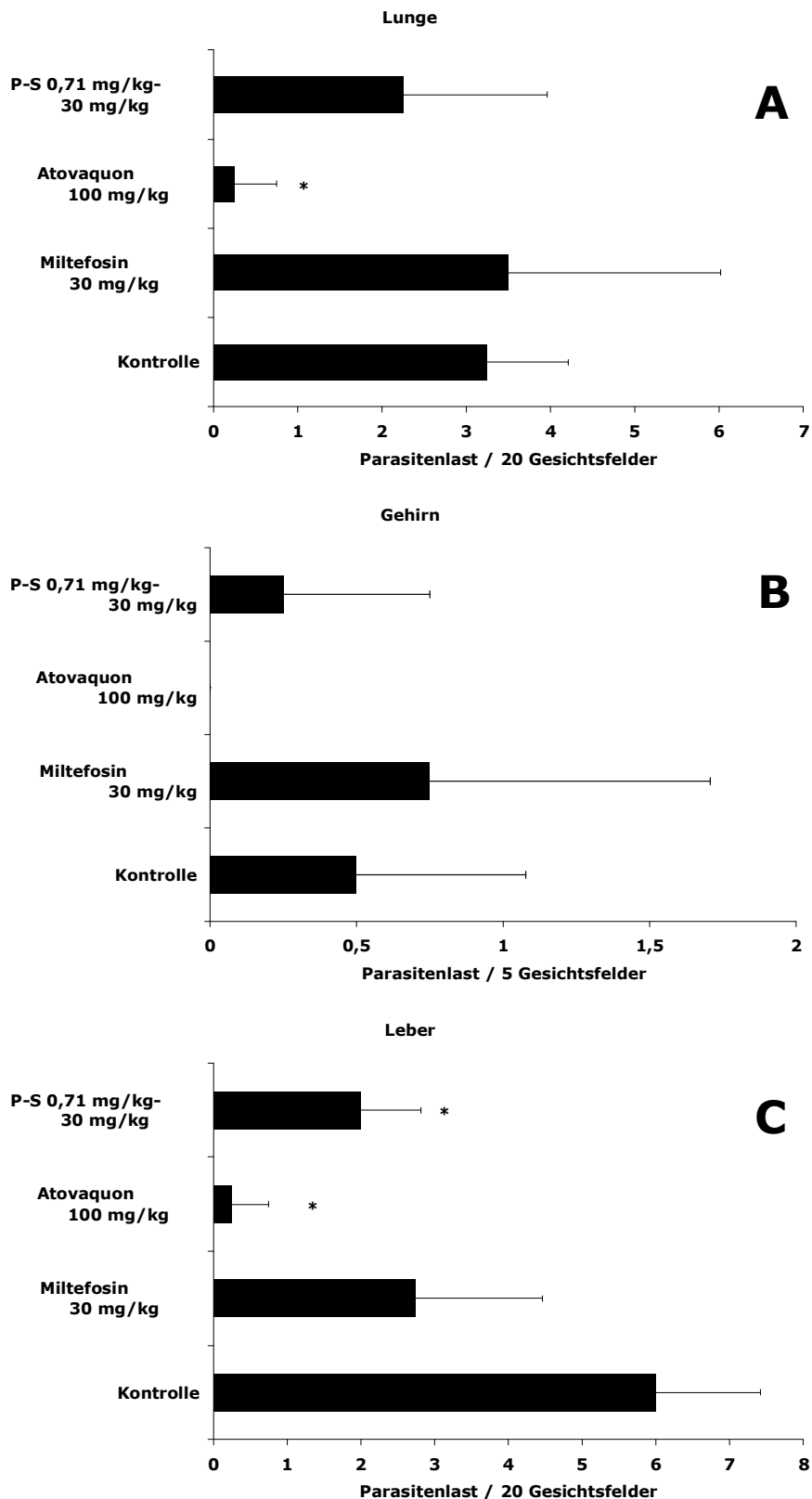
### **3.2.1.1.2 Histologische Veränderungen in Organen**

Um die Ergebnisse der mittels PCR erhobenen Parasitenlast in Organen zu bestätigen, wurde die Parasitenlast immunhistologisch bestimmt. Zudem wurden histologische Schnitte von Lunge, Gehirn und Leber mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt, um das Ausmaß der Entzündungsreaktion als zusätzlichen Parameter hinsichtlich eines therapeutischen Effektes zu bewerten.

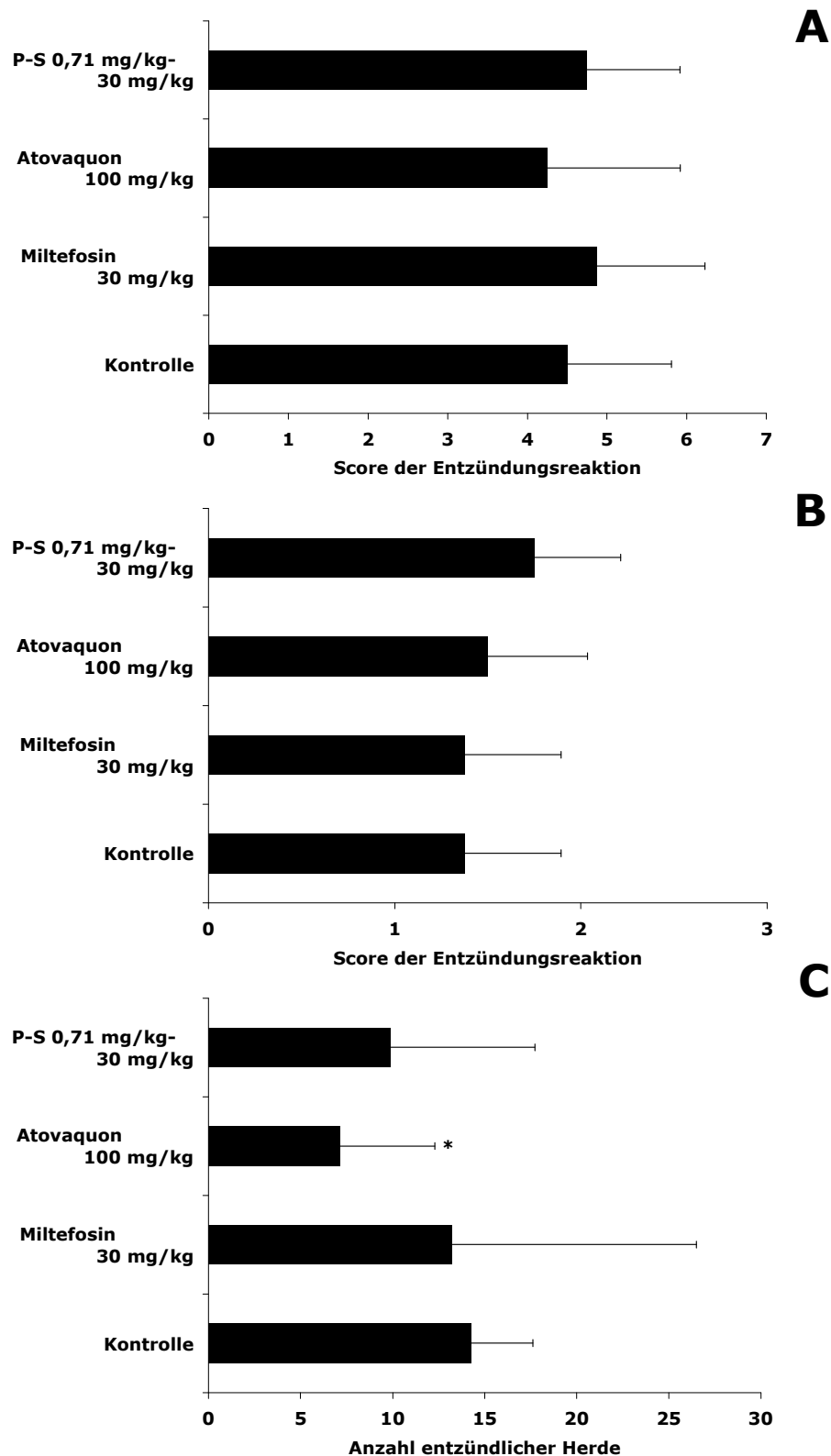
In den untersuchten Organen fand sich nach immunhistologischer Untersuchung keine signifikante Änderung der Parasitenlast unter Miltefosintherapie (Abb. 12). Analog zu den PCR-Daten konnte mittels P.A.P.-Färbung in Lungen- und Lebergewebe eine Reduktion der Parasitenlast unter Atovaquontherapie nachgewiesen werden (Abb. 12A,C). Im Gehirn fand sich in der Kontrollgruppe nur eine geringe Anzahl an Parasiten, die Abnahme der Parasitenlast unter Atovaquontherapie war aufgrund einer hohen Standardabweichung nicht signifikant (Abb. 12B). In Lebergewebe ließ sich auch für die Kombinationstherapie Pyrimethamin-Sulfadiazin eine signifikante Abnahme der Parasitenlast feststellen (Abb. 12C).

Die mittels H&E-Färbung bestimmte Entzündungsreaktion in Lunge und Hirn wies zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 13A,B). Nur in der Leber konnte für Atovaquon, nicht aber für Miltefosin eine signifikante Reduktion entzündlicher Herde nachgewiesen werden (Abb. 13C).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Miltefosin keinen therapeutischen Effekt gegen *T. gondii* in der akuten Phase der i.p.-Infektion besitzt. Im Gegensatz dazu zeigen Atovaquon und die Kombinationstherapie Pyrimethamin-Sulfadiazin antiparasitäre Effekte gegen *T. gondii* im Mausmodell der akuten Toxoplasmose nach i.p.-Infektion.



**Abb. 12:** Parasitenlast (P.A.P.-Färbung) in Lunge (A), Gehirn (B) und Leber (C) von NMRI-Mäusen nach 5 Tagen Behandlung mit den entsprechenden Medikamenten bzw. PBS. Dargestellt sind repräsentative Einzelergebnisse von jeweils 4 Mäusen pro Gruppe. P-S, Pyrimethamin-Sulfadiazin. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle



**Abb. 13:** Entzündungsreaktion (H&E-Färbung) in Lunge (**A**), Gehirn (**B**) und Leber (**C**) von *T. gondii*-infizierten NMRI-Mäusen (8 Tage post infectionem), die 5 Tage mit den entsprechenden Medikamenten bzw. PBS behandelt wurden. Dargestellt sind zusammengefasste Daten aus 2 Versuchen mit jeweils 4 Tieren pro Gruppe. P-S, Pyrimethamin-Sulfadiazin. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle

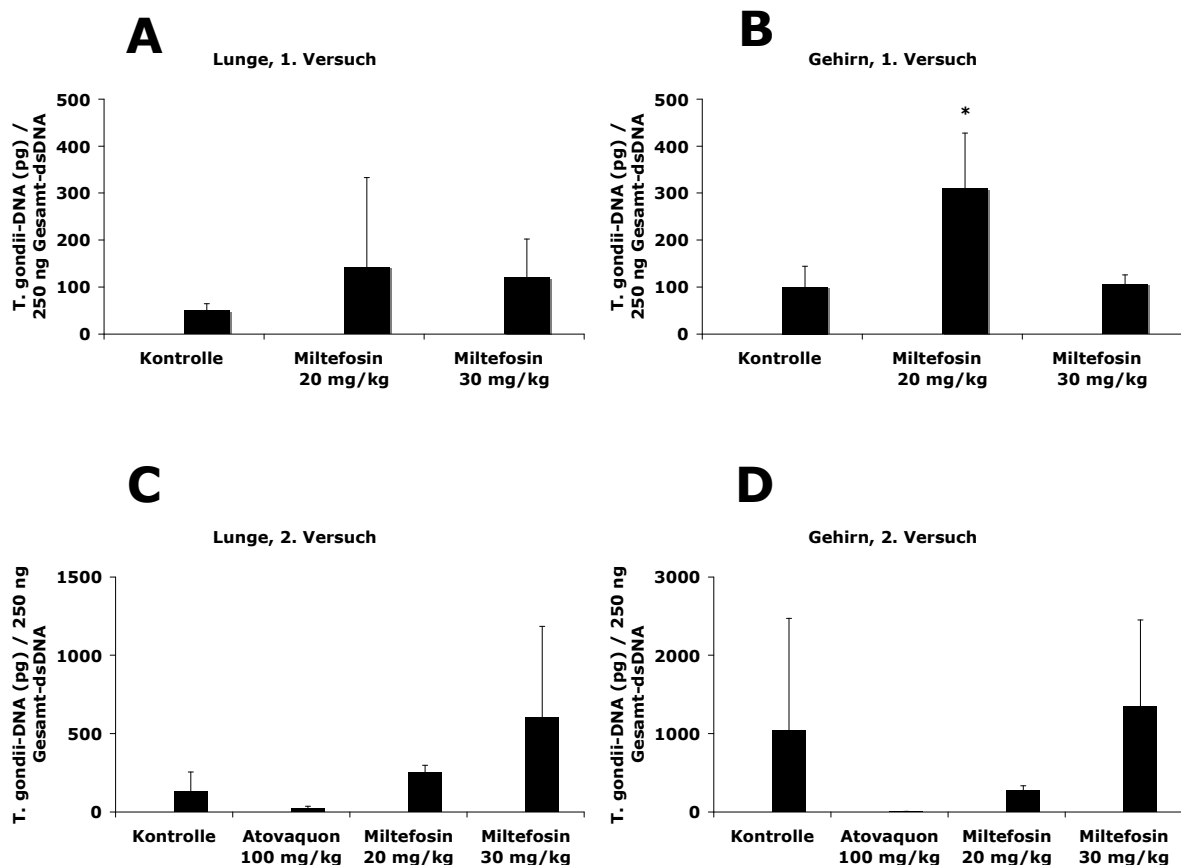


### 3.2.1.2 Orale Infektion mit ME49 Zysten und orale Miltefosintherapie

Um die Wirksamkeit von Miltefosin nach oraler Applikation zu untersuchen, wurde Miltefosin in vivo in einem Mausmodell der akuten Toxoplasmose nach oraler Infektion getestet.

#### 3.2.1.2.1 *T. gondii*-DNA-Konzentrationen in Lunge und Gehirn

Weder in der Lunge noch im Gehirn der Miltefosin-behandelten NMRI-Mäuse kam es zu einer signifikanten Reduktion von *T. gondii*-DNA im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 14A-D). Während im 1. Versuch im Gehirn der Miltefosin-



**Abb. 14:** *T. gondii*-DNA-Konzentrationen in Lunge (A,C) und Gehirn (B,D) von NMRI-Mäusen (12 Tage post infectionem), die 7 Tage mit den entsprechenden Medikamenten bzw. PBS behandelt wurden. A,B und C,D zeigen Ergebnisse von 2 separaten Experimenten mit jeweils 3-5 Mäusen pro Gruppe. \*p<0,05 vs. Kontrolle

behandelten NMRI-Mäuse signifikant höhere *T. gondii*-DNA-Konzentrationen als in der Kontrollgruppe festgestellt wurden (Abb. 14B), waren im 2. Versuch keine signifikanten Unterschiede in der Parasitenlast nachweisbar (Abb. 14D). Die im 2. Versuch zusätzlich untersuchte Gruppe von Atovaquon-behandelten NMRI-Mäusen zeigte ebenfalls keine signifikante Abnahme der Parasitenlast im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 14C,D). Im Gehirn Atovaquon-behandelter NMRI-Mäuse konnte jedoch ein Trend hinsichtlich einer Reduktion von *T. gondii*-DNA im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden ( $p=0,0571$ ).

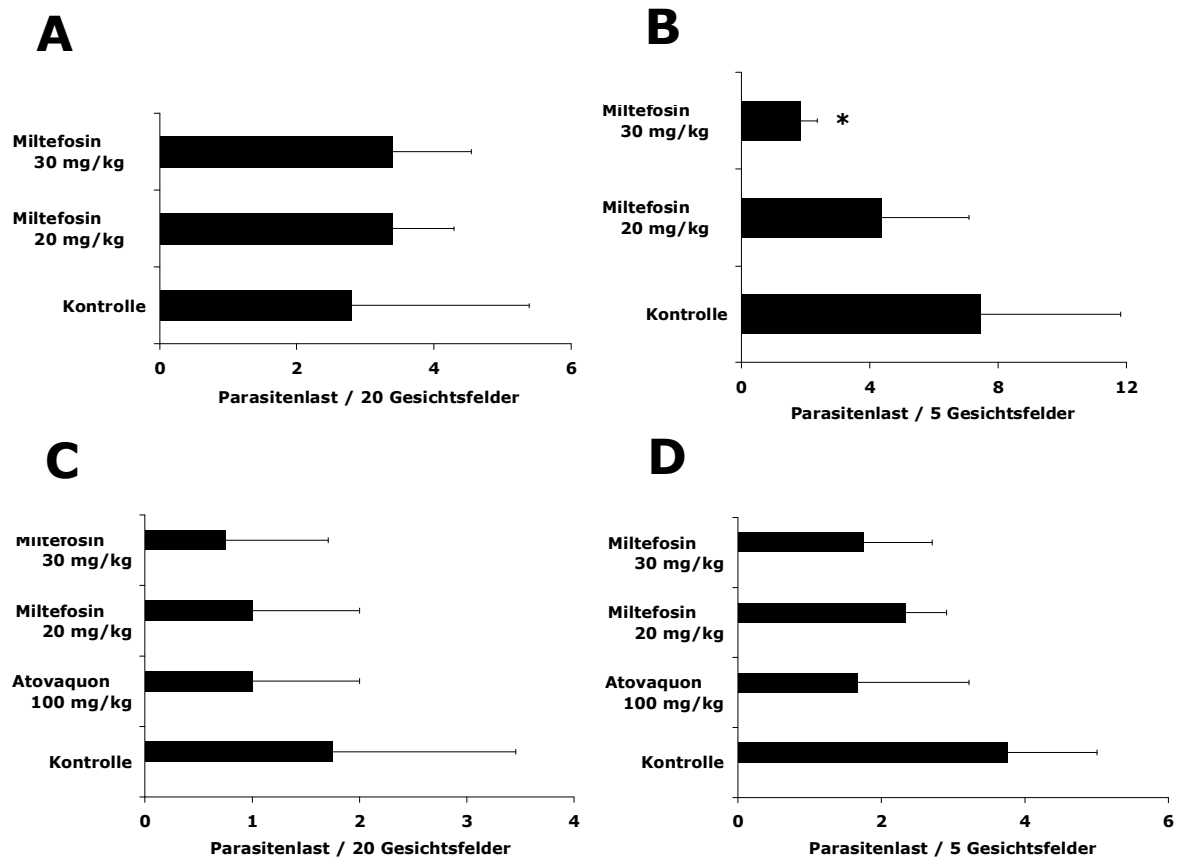
Durchschnittlich war der *T. gondii*-DNA-Gehalt im Gehirn im 2. Versuch etwa 10-fach höher als im 1. Versuch. Im Gegensatz zur intraperitonealen Infektion war die Parasitenlast in Kontrollen nach oraler Infektion im Gehirn signifikant höher als in der Lunge, was am ehesten durch den späteren Untersuchungszeitpunkt zu erklären ist (Tag 12 bei oraler Infektion vs. Tag 8 nach intraperitonealer Infektion).

#### **3.2.1.2.2 Histologische Veränderungen in Lunge und Gehirn**

Während die mittels P.A.P.-Färbung bestimmte Parasitenlast im Lungengewebe wie die PCR keine Unterschiede zwischen den Gruppen zeigte (Abb. 15A), war die Parasitenlast in Hirngewebe der Mäuse, die mit Miltefosin 30 mg/kg behandelten worden waren, im 1. Versuch im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedriger (Abb. 15B). Kein Effekt wurde hingegen für Miltefosin in der niedrigeren Dosierung von 20 mg/kg bzw. im 2. Versuch gefunden (Abb. 15C,D). Der signifikanten Senkung der Parasitenlast in der histologischen Untersuchung unter Miltefosin (30 mg/kg) steht ein fehlender antiparasitärer Effekt in der Gewebeuntersuchung mittels PCR gegenüber. Für Atovaquon ergab sich weder in Lunge, noch im Gehirn der oral behandelten NMRI-Mäuse eine signifikante Abnahme der mittels P.A.P.-Färbung bestimmten Parasitenlast (Abb. 15C,D).

In der histologischen Untersuchung H&E-gefärbter Präparate konnten keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Gruppen aufgezeigt werden (Abb. 16A-D). Weder eine Behandlung mit Miltefosin, noch mit Atovaquon resultierte in signifikanten Veränderungen im Ausmaß der Entzündungsreaktion.

Diese Daten weisen darauf hin, dass Miltefosin auch nach oraler Applikation keine signifikante Wirksamkeit gegen *T. gondii* aufweist. Allerdings konnte auch für die

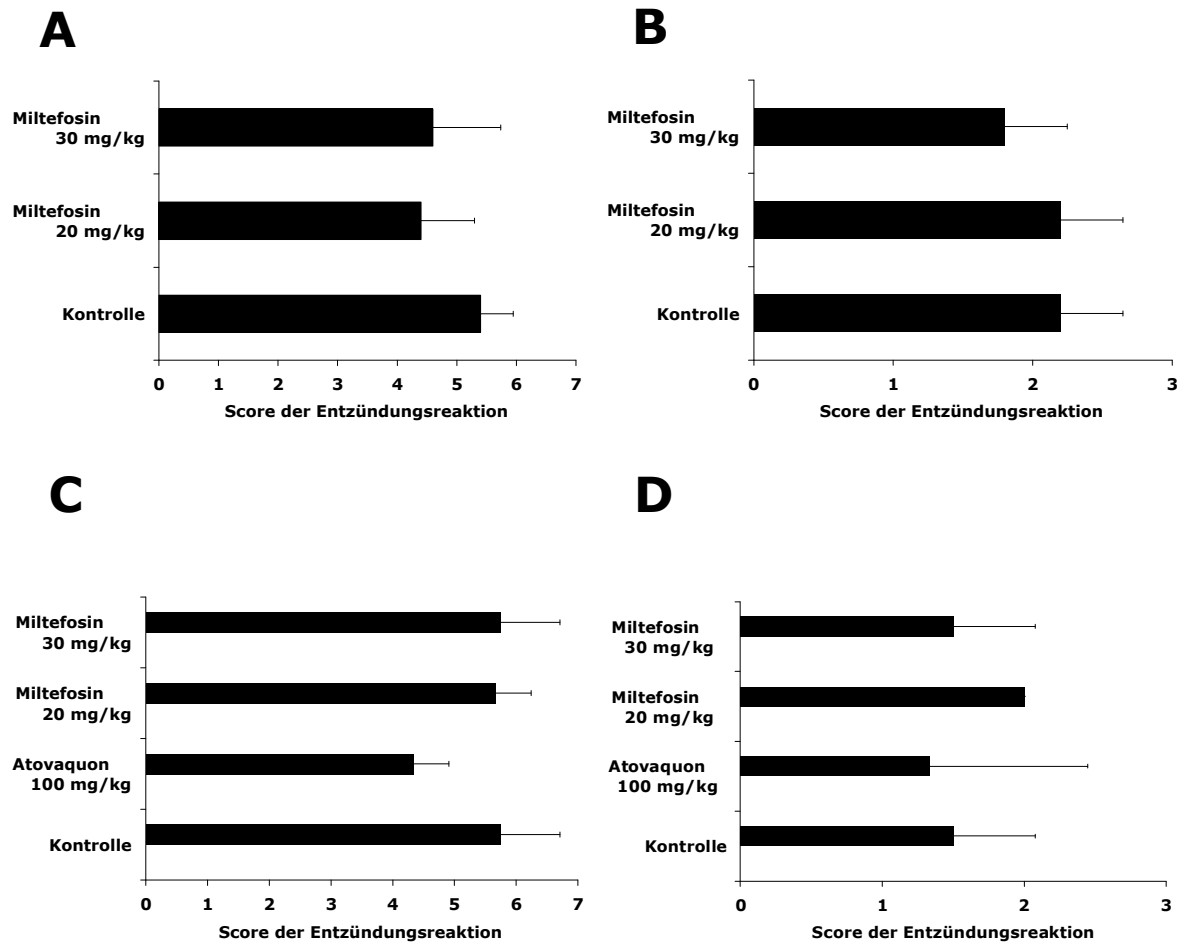


**Abb. 15:** Histologisch bestimmte Parasitenlast (P.A.P.-Färbung) in Lunge (**A,C**) und Gehirn (**B,D**) von *T. gondii*-infizierten NMRI-Mäusen (12 Tage post infectionem), die 7 Tage lang mit Miltefosin bzw. PBS behandelt wurden. **A,B** und **C,D** entsprechen Ergebnissen von 2 separaten Experimenten mit jeweils 3-5 Mäusen pro Gruppe. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle

Atovaquontherapie keine signifikante Reduktion der Parasitenlast in oral infizierten NMRI-Mäusen festgestellt werden.

### 3.2.2 Aktivität von Miltefosin gegen das Zystenstadium von *T. gondii*

Abschließend wurde der therapeutische Effekt von Miltefosin gegen das Zystenstadium von *T. gondii* in einem Mausmodell der latenten Infektion untersucht. Dazu wurden NMRI-Mäuse mit dem Maus-apathogenen ME49-Stamm infiziert und 4 Wochen später mit Atovaquon oder Miltefosin für 7 bzw. 14 Tage oral behandelt.

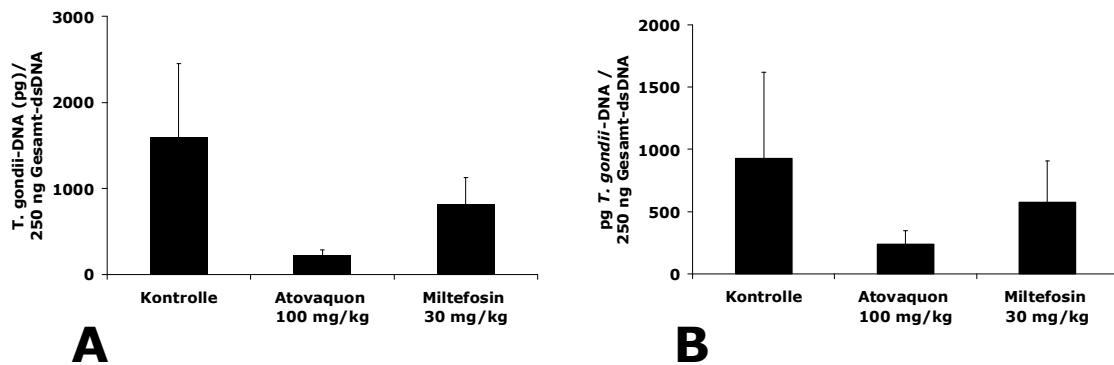


**Abb. 16:** Entzündungsreaktion (H&E-Färbung) in Lunge (**A,C**) und Gehirn (**B,D**) von *T. gondii*-infizierten NMRI-Mäusen (12 Tage post infectionem), die 7 Tage mit Miltefosin bzw. PBS behandelt wurden. **A,B** und **C,D** zeigen Ergebnisse von 2 separaten Experimenten mit jeweils 3-5 Mäusen pro Gruppe.

### 3.2.2.1 *T. gondii*-DNA-Konzentrationen in Lunge und Gehirn

Die *T. gondii*-DNA-Konzentration im Gehirn der Miltefosin-behandelten NMRI-Mäuse wies nach oraler Therapie keine signifikanten Unterschiede zur Parasitenlast der Kontrolltiere auf (Abb. 17A,B). Auch unter Atovaquonbehandlung ließ sich weder nach 7 noch nach 14 Tagen Behandlung eine signifikante Abnahme der Parasitenlast feststellen (Abb. 17A,B).

In Lungen latent infizierter NMRI-Mäuse fand sich für die Miltefosin-Gruppe weder nach 7 noch nach 14 Tagen Behandlung ein antiparasitärer Effekt (Abb. 18A,B). Wiederum war auch unter Atovaquontherapie kein signifikanter Rückgang der Parasitenlast zu beobachten (Abb. 18A,B).

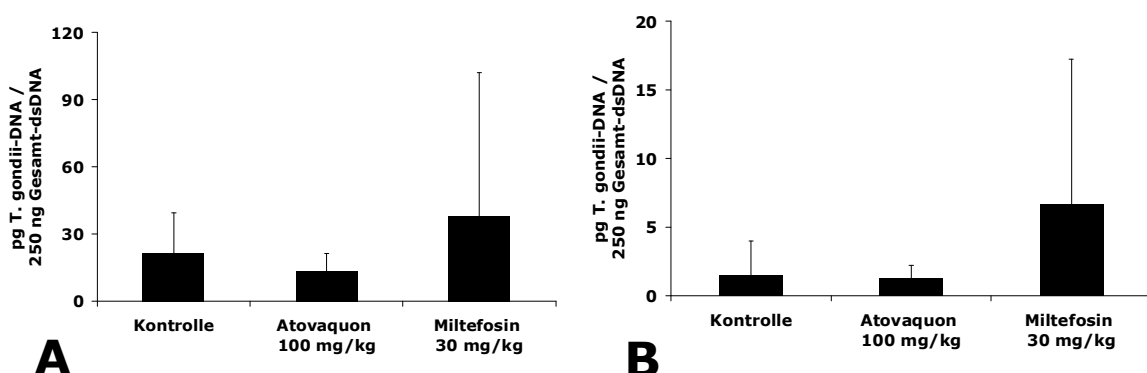


**Abb. 17:** Konzentrationen von *T. gondii*-DNA in Gehirnen von NMRI-Mäusen 35 Tage **(A)** und 42 Tage **(B)** nach Infektion mit 10 ME49 Zysten. Mäuse (2-3 pro Gruppe) wurden 7 Tage **(A)** oder 14 Tage **(B)** mit den entsprechenden Medikamenten behandelt.

### 3.2.2.2 Histologische Veränderungen im Gehirn

Um die Ergebnisse der PCR in Gehirnen histologisch zu bestätigen, wurden die Gehirne der NMRI-Mäuse mikroskopisch untersucht. Bei der Auswertung von Quetschpräparaten, die zum Zeitpunkt der Sektion angefertigt worden waren, wurden Zysten in 100-facher Vergrößerung in 10 Gesichtsfeldern ausgezählt.

Während unter Miltefosintherapie in Quetschpräparaten keine Verringerung der Zystenanzahl nach 7-tägiger Behandlung nachgewiesen werden konnte, zeigte sich, dass NMRI-Mäuse, die 7 Tage mit Atovaquon behandelt worden waren, im Vergleich zur



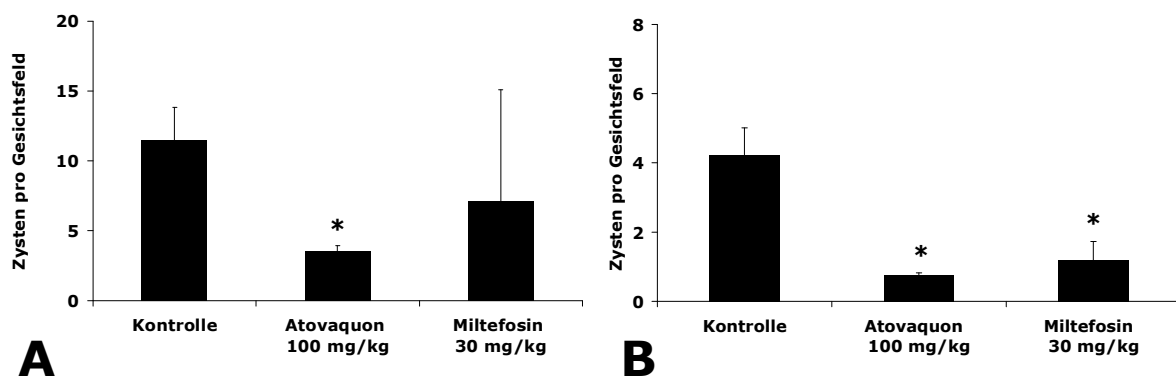
**Abb. 18:** *T. gondii*-DNA-Konzentrationen in Lungen von NMRI-Mäusen 35 Tage **(A)** und 42 Tage **(B)** nach Infektion. Mäuse (2-3 pro Gruppe) wurden 7 Tage **(A)** oder 14 Tage **(B)** mit den entsprechenden Medikamenten behandelt.

Kontrollgruppe signifikant weniger Zysten im Gehirn aufwies (Abb. 19A). Eine mit Miltefosin behandelte Maus wies gegenüber den anderen Tieren in der gleichen Gruppe eine sehr hohe Zystenanzahl auf, nach Elimination der Daten dieser Maus als Ausreißer zeigte sich auch für die Miltefosin-Gruppe nach 7 Tagen Therapie ein signifikanter Effekt gegen das Zystenstadium von *T. gondii* ( $p < 0,05$ ; Daten nicht gezeigt). Nach 14-tägiger Behandlung war sowohl unter Miltefosin-, als auch unter Atovaquonbehandlung eine signifikante Reduktion der Zystenanzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellbar (Abb. 19B).

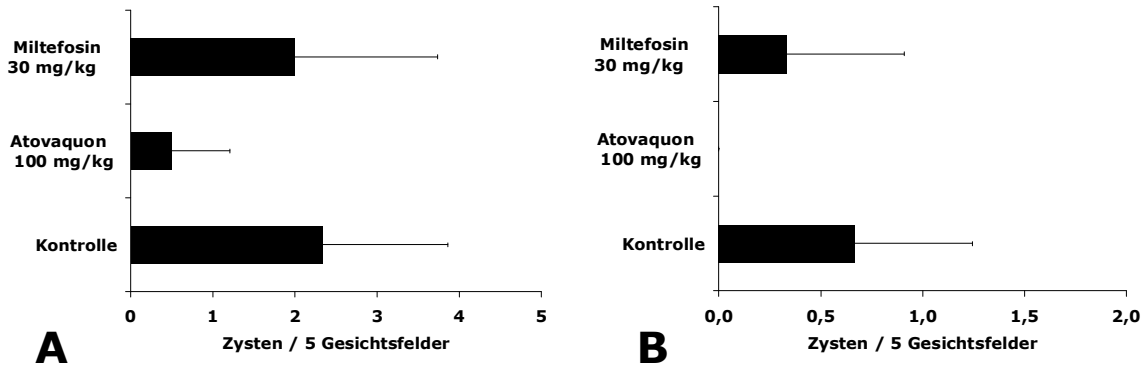
Die mittels P.A.P.-Färbung bestimmte Zystenanzahl im Gehirn 4 Wochen zuvor infizierter NMRI-Mäuse wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Abb. 20A,B). Jedoch konnte nach 14-tägiger Atovaquontherapie in Gehirnen mittels P.A.P.-Färbung keine einzige Zyste gefunden werden.

In der Versuchsauswertung zeigte sich unabhängig von der angewandten Methodik zwischen den Untersuchungszeitpunkten Tag 35 und Tag 42 nach Infektion nicht nur in den behandelten Gruppen sondern auch in der Kontrollgruppe eine Verringerung der Parasitenlast. Dies weist darauf hin, dass die Parasitenlast in dem hier angewandten Modell der latenten Toxoplasmose im natürlichen Verlauf nach primärem Anstieg nach 4 bis 5 Wochen abnimmt.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Miltefosin nicht zu einer deutlichen und reproduzierbaren Reduktion der Parasitenlast im Modell der latenten



**Abb. 19:** Durchschnittliche Anzahl an *T. gondii* Zysten pro Gesichtsfeld (Quetschpräparate) in Gehirnen von NMRI-Mäusen 35 Tage (**A**) und 42 Tage (**B**) nach Infektion mit 10 ME49 Zysten. Mäuse (2-3 pro Gruppe) wurden 7 Tage (**A**) und 14 Tage (**B**) mit den entsprechenden Medikamenten behandelt. \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle



**Abb. 20:** Parasitenlast (P.A.P.-Färbung) in Gehirnen von NMRI-Mäusen 35 Tage (**A**) und 42 Tage (**B**) nach Infektion mit 10 ME49 Zysten. Mäuse (2-3 pro Gruppe) wurden 7 (**A**) bzw. 14 (**B**) Tage mit den entsprechenden Medikamenten bzw. PBS behandelt.

Infektion führt. Allerdings zeigte sich auch unter Atovaquon kein durchgehend signifikanter antiparasitärer Effekt, dies dürfte jedoch durch die limitierte Zahl an Versuchstieren bedingt sein.

## 4. Diskussion

### 4.1 Einleitung

Symptomatische Infektionen durch den Parasiten *T. gondii* können bei immunkompetenten und immunsupprimierten Patienten auftreten. Während bei Immunkompetenten die Toxoplasma-Retinochorioiditis und die konnatale Infektion behandlungsbedürftige Krankheitsbilder darstellen, ist die Reaktivierungstoxoplasmose des immunsupprimierten Patienten meist durch eine unbehandelt tödlich verlaufende Toxoplasma-Enzephalitis gekennzeichnet. Therapie der ersten Wahl ist noch immer die Kombination der Folsäureantagonisten Pyrimethamin und Sulfadiazin. Unglücklicherweise ist diese Kombinationstherapie häufig mit schweren Nebenwirkungen wie Knochenmarkdepression und allergischen Reaktionen assoziiert. Neue Therapieoptionen werden daher dringend benötigt. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das gegen Leishmanien wirksame Miltefosin antiparasitäre Aktivität gegen das Protozoon *T. gondii* in vitro und in vivo besitzt.

### 4.2 Hat Miltefosin antiparasitäre Wirkung gegen *T. gondii* in vitro?

Nachdem eine antiparasitäre Wirkung gegen *T. gondii* in präliminären Untersuchungen gezeigt werden konnte (vertrauliche persönliche Kommunikation, Dr. A. Obwaller, Fa. Orphanidis, Wien), wurde Miltefosin auf seine Aktivität gegenüber *T. gondii* in J774A.1-Makrophagen getestet. Dabei konnte im Einzelversuch kein antiparasitärer Effekt von Miltefosin nachgewiesen werden, hingegen zeigte sich in den zusammengefassten Daten bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 1:1 unter Miltefosin 30 µg/ml und bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 5:1 unter Miltefosin 10 µg/ml nach 3 Stunden Inkubation ein antiparasitärer Effekt gegen *T. gondii*. Während die Reduktion bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 1:1 unter Miltefosin 30 µg/ml deutlich war ( $p < 0,005$ ), fiel diese bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 5:1 unter Miltefosin 10 µg/ml geringer aus und war nur grenzwertig signifikant ( $p = 0,049$ ). Zudem konnte unter höheren Miltefosinkonzentrationen bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 5:1 kein Effekt



nachgewiesen werden. Zu einem späteren Zeitpunkt zeigte sich unabhängig vom Parasiten/Zell-Verhältnis oder der Medikamentenkonzentration kein antiparasitärer Effekt für Miltefosin. Stattdessen konnte nach längerer Inkubationszeit mit Miltefosin sogar ein paradoxer Anstieg infizierter Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen dokumentiert werden.

Der nach kurzer Behandlungszeit bzw. vor allem bei niedrigem Parasiten/Zell-Verhältnis auftretende antiparasitäre Effekt macht einen direkten Wirkmechanismus von Miltefosin gegenüber *T. gondii* unwahrscheinlich. Ein direkter antiparasitärer Effekt wäre insbesondere bei hoher Parasitenzahl nachweisbar. Späte Untersuchungszeitpunkte bzw. hohe Parasiten/Zell-Verhältnisse sind jeweils Einflüsse, die mit einer hohen Parasitenzahl einhergehen, in der vorliegenden Arbeit aber nicht mit einem antiparasitären Effekt von Miltefosin assoziiert waren. Interaktionen von Miltefosin mit der Atmungskette, der RNA-Produktion oder dem Fettstoffwechsel, wie sie für andere Protozoa gezeigt werden konnten [9, 61, 77], scheinen daher nicht auf *T. gondii* übertragbar bzw. nicht relevant im Sinne einer Wachstumshemmung in vitro zu sein.

Als möglicher Wirkmechanismus für die initiale antiparasitäre Wirkung von Miltefosin insbesondere bei niedrigem Parasiten/Zell-Verhältnis ist eine Aktivierung von Makrophagen denkbar. Es wurde gezeigt, dass Miltefosin sowohl an peritonealen Mausmakrophagen [109] als auch an humanen Histiozyten [36] zu einer NO- und TNF- $\alpha$ -Induktion in der Lage ist. Auch eine Studie an mit *T. cruzi* infizierten Makrophagen zeigte, dass Miltefosin dosisabhängig die Produktion von Stickstoffmonoxid und TNF- $\alpha$  anregt, was eine Makrophagenaktivierung als indirekten antiparasitären Effekt wahrscheinlich macht [87]. Andrade et al. berichteten, dass mit *T. gondii* infizierte Makrophagen unabhängig von IFN- $\gamma$  durch TNF- $\alpha$  in ihrer Replikation gehemmt werden können [2, 3]. Der Einfluss immunmodulatorischer Eigenschaften von Miltefosin auf die Parasitenelimination wird allerdings kontrovers diskutiert. Während einige Studien immunmodulatorische Wirkmechanismen von Miltefosin betonen [43,85,103], zeigt eine kürzlich erschienene Arbeit, dass Miltefosin an dendritischen Zellen, den Hauptmediatoren der erworbenen Immunabwehr, einen antiparasitären Effekt gegen *L. major* besitzt, ohne dabei die Immunfunktion zu beeinflussen [39].

Nach längerer Inkubationszeit von 48 bzw. 72 Stunden fand sich in der vorliegenden Arbeit kein antiparasitärer Effekt für Miltefosin gegen *T. gondii*, stattdessen war jedoch ein paradoxer Anstieg infizierter Zellen unter Miltefosinbehandlung zu beobachten.

Mittels Zytotoxizitätstest konnte gezeigt werden, dass Miltefosin in Konzentrationen von über 20 µg/ml nach 20 Stunden Inkubation zytotoxisch für J774A.1-Makrophagen ist. Bei einer Konzentration von 30 µg/ml sank die Zahl lebendiger Zellen signifikant auf unter 40%. Dieses Ergebnis entspricht der maximal tolerablen Konzentration von 27 µg/ml Miltefosin gegenüber Peritonealmakrophagen einer zuvor durchgeführten Studie [23]. Die Zytotoxizität von Miltefosin erklärt die nach 72 Stunden geringere Zahl absolut messbarer Zellen in der Durchflusszytometrie. Der relative Anstieg von *T. gondii*-infizierten Makrophagen unter Miltefosin könnte auf eine erhöhte Resistenz der infizierten Makrophagen gegen Apoptose zurückzuführen sein. Nishikawa et al. berichteten, dass mit *T. gondii*-infizierte J774A.1-Makrophagen vor allem bei nicht-infizierten Makrophagen Apoptose induzieren [68]. Die Induktion des programmierten Zelltodes konnte dabei durch Inkubation der Makrophagen mit IFN-γ verstärkt werden [68]. Möglicherweise löst die Inkubation mit Miltefosin einen ähnlichen Effekt aus. In Studien an Tumorzelllinien wurde nachgewiesen, dass Miltefosin via Caspase 3-Aktivierung den Zelltod induziert [70, 86]. Interessanterweise ist *T. gondii* in der Lage über eine Inhibition von Caspase 3 die Induktion von Apoptose zu verhindern, was einen für die Etablierung der Infektion wichtigen Mechanismus darstellt [44, 58, 72]. Die Miltefosinkonzentrationen, die zum Absterben von Leishmanien und Trypanosomen führen, liegen deutlich unter denen gegen *T. gondii* wirksamen Konzentrationen. In mit *L. donovani*-Amastigoten infizierten Mausmakrophagen konnte ein antiparasitärer Effekt von Miltefosin mit einer mittleren Effektivdosis (ED50) von 5 µg/ml nach 7 Tagen Expositionszeit nachgewiesen werden, während an extrazellulären Promastigoten nach 48 Stunden Exposition durch mikroskopische Beobachtung nur ein moderater Effekt mit der Höchstdosis von 50 µg/ml gezeigt werden konnte [23]. An *T. cruzi*-infizierten Peritonealmakrophagen war in vitro bereits nach 3 Tagen Inkubation mit Miltefosin eine ED50 von nur 0,5 µM (0,2 µg/ml) zu beobachten [24], während an zwei verschiedenen Stämmen von *L. donovani* mittlere Effektivdosen von 0,2 - 3,9 µM (0,08 - 1,59 µg/ml) nach 5 Tagen Exposition gemessen wurden [24]. Zudem wurde bei Konzentrationen von 10 µM (4,08 µg/ml), welche die hier vorliegende Minimalkonzentration noch unterschreiten, sowohl an *L. donovani* als auch an *T. cruzi* eine Wachstumshemmung von über 86% gezeigt [24]. Während in einer weiteren Studie an *L. donovani* ebenfalls intrazellulär lebende Amastigoten empfindlicher gegenüber Miltefosin waren als extrazellulär lebende Promastigoten [9], beobachtete eine andere Studie an 6 verschiedenen Leishmanien-Spezies den umgekehrten Fall [35]. Die mittleren

Effektivdosen gegenüber Leishmanien befanden sich in beiden Studien zwischen 0,36  $\mu\text{M}$  und 37,37  $\mu\text{M}$  (0,15  $\mu\text{g/ml}$  und 15,23  $\mu\text{g/ml}$ ) [9,[35]. Es ist festzuhalten, dass Miltefosin in vitro an anderen Organismen in niedrigeren als den hier angewandten Konzentrationen eine deutliche und signifikante Wachstumshemmung verursacht. Sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Stadien verschiedener Erreger zeigen hohe Empfindlichkeit gegenüber Miltefosin.

Im Gegensatz zu Miltefosin war für Atovaquon ein antiparasitärer Effekt nach längerer Inkubationszeit von 48 bzw. 72 Stunden feststellbar. Bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 5:1 ergab sich unter Atovaquon (3  $\mu\text{g/ml}$ ) nach 72 Stunden eine Reduktion infizierter Zellen von über 75% im Vergleich zu Kontrollen ( $p < 0,0005$ ). Araujo et al. beschrieben Atovaquon in einer Konzentration von 4,8  $\mu\text{M}$  (1,76  $\mu\text{g/ml}$ ) in vitro als wirksam, aber nicht suffizient gegenüber dem RH *T. gondii*-Stamm im Vergleich zu anderen *T. gondii*-Stämmen [6]. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurden humane Vorhautfibroblasten maximal 16 Stunden mit Atovaquon bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 2:1 inkubiert [6]. Die Inkubation mit Atovaquon (3  $\mu\text{g/ml}$ ) von RH-infizierten MODE-K Zellen bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 3:1 über 48 Stunden führte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu einer 26%-igen Reduktion der Zahl infizierter Zellen [94]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Atovaquon bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{g/ml}$  keinen zytotoxischen Effekt auf J774A.1-Makrophagen hat [94]. Eine Studie an Fibroblasten, die mit dem RH-Stamm von *T. gondii* infiziert wurden und ebenfalls mit Atovaquon über 72 Stunden inkubiert wurden, bestätigte die hohe Aktivität von Atovaquon gegen *T. gondii*, wobei die ED50 auf 0,023  $\mu\text{g/ml}$  geschätzt wurde [84].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Miltefosin keinen relevanten antiparasitären Effekt in vitro gegen *T. gondii* besitzt. Stattdessen zeigt sich nach längerer Inkubationszeit ein paradoxer Anstieg *T. gondii*-infizierter Zellen unter Miltefosin, welcher zum einen durch zytotoxische Effekte von Miltefosin, zum anderen durch die Fähigkeit infizierter Zellen, der Apoptoseinduktion zu widerstehen, erklärt werden kann. Im Gegensatz dazu bestätigte sich der für Atovaquon nachgewiesene antiparasitäre Effekt zuvor durchgeführter Studien {Araujo, 1991 #9; Romand, 1993 #5}.

### 4.3 Hat Miltefosin einen therapeutischen Effekt im Mausmodell der akuten Toxoplasmose?

Nach intraperitonealer Infektion und 5-tägiger Behandlung mit Miltefosin konnte keine signifikante Reduktion der Parasitenlast oder der Entzündungsreaktion im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Nach oraler Infektion und 7-tägiger Behandlung zeigte sich für Miltefosin ebenfalls kein reproduzierbarer antiparasitärer Effekt. Lediglich in der immunhistologisch bestimmten Parasitenlast im Hirngewebe konnte eine signifikante Abnahme der Parasitenlast im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese korrelierte jedoch weder mit einer Abnahme der *T. gondii*-DNA-Konzentration im Gehirn, noch ließ sich das Ergebnis im Wiederholungsversuch reproduzieren. Als Limitation dieser Untersuchung ist v.a. die geringe Fallzahl (n=15 pro Versuch, n=3-5 pro Gruppe) und die damit verbundene hohe Standardabweichung zu nennen.

Studien mit Miltefosin zur biologischen Verteilung in Mäusen [19] lassen vermuten, dass auch in der vorliegenden Arbeit ausreichende Wirkspiegel in Organen erreicht worden sind, so dass der fehlende antiparasitäre Effekt keine pharmakokinetischen Ursachen haben dürfte. Zudem weisen Studien bei anderen parasitären Infektionen darauf hin, dass in der vorliegenden Arbeit Miltefosinkonzentrationen verwendet worden sind, die theoretisch antiparasitäre Wirkung in den Organen entwickeln ohne dabei toxisch auf die Mäuse zu wirken. So zeigten Untersuchungen an *L. donovani*-infizierten Mäusen, dass eine 5-tägige subkutane Miltefosintherapie in einer Dosierung von 100 mg/kg toxisch war und Miltefosin in einer Dosierung von 45 mg/kg zu einem 10%-igen Gewichtsverlust führte [23]. Die ED<sub>50</sub> nach 5 Tagen Therapie gegen *L. donovani* in BALB/c-Mäusen betrug hingegen 12,8 mg/kg [23]. Auch konnte ohne offensichtliche Nebenwirkungen ein antiparasitärer Effekt einer oraler 5-tägigen Miltefosintherapie (10 und 20 mg/kg) in *L. donovani*- und *L. infantum*-infizierten Mäusen nachgewiesen werden [54]. Während Miltefosin 30 mg/kg über 5 Tage in vivo ebenfalls Wirkung gegen *T. cruzi* zeigte, war eine 4-tägige Therapie in der gleichen Dosierung gegen *T. brucei* nicht wirksam [24].

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl für Atovaquon als auch für die Kombinationstherapie Pyrimethamin-Sulfadiazin die in der Literatur beschriebenen antiparasitären Effekte im Modell der akuten Toxoplasmose bestätigt [6, 8]. Nach

intraperitonealer Infektion und Behandlung mit Atovaquon zeigte sich eine signifikante Reduktion der *T. gondii*-DNA-Konzentration in Lunge, Gehirn, Milz und Leber ( $p < 0,05$ ). Zudem konnte die Reduktion der Parasitenlast in der Immunhistologie bestätigt werden. Die Abnahme der Parasitenlast unter Atovaquontherapie korrelierte dabei ausschließlich in der Leber, nicht aber in anderen Organen mit einer Abnahme der Entzündungsreaktion. Grund dafür ist möglicherweise, dass erst zeitversetzt nach erfolgter Parasitenelimination das Ausmaß der Entzündungsreaktion rückläufig ist. Zwar ergab sich auch für die Kombinationstherapie Pyrimethamin-Sulfadiazin Aktivität gegenüber *T. gondii*, doch erreichte diese nicht in allen Organen statistische Signifikanz. Dies könnte auf eine im Vergleich zu Atovaquon geringere Wirksamkeit im Modell der akuten Toxoplasmose hinweisen, was bereits aus Studien *in vitro* [64] und bei Reaktivierungstoxoplasmose [33] zu vermuten war. Nach oraler Infektion und Behandlung ergaben sich lediglich Hinweise für einen antiparasitären Effekt von Atovaquon, im Gehirn Atovaquon-behandelter Tiere konnte nach 7-tägiger Therapie mittels PCR eine tendenzielle Abnahme der Parasitenlast im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden ( $p = 0,057$ ).

In 2 Versuchen, in denen NMRI-Mäuse oral mit 10 ME49 Zysten infiziert wurden, konnten deutlich divergierende *T. gondii*-DNA-Konzentrationen zwischen den Kontrollgruppen festgestellt werden. In Hirngewebe überstieg die durchschnittliche *T. gondii*-DNA-Konzentration im 2. Versuch die des 1. Versuches um das 10-fache. Es ist bekannt, dass abhängig vom Parasitenstamm, Wirt und Dauer der Infektion Gewebezysten zwischen hunderten und mehr als tausend Bradyzoiten enthalten [29]. Da für die Infektion stets Zysten aus dem Gehirn latent infizierter NMRI-Mäuse verwendet wurden, die mit 5 ME49 Zysten *i.p.* infiziert wurden, können divergierende *T. gondii*-DNA-Konzentrationen im Gewebe der Kontrolltiere am ehesten durch unterschiedliche Bradyzoitenzahlen pro Zyste erklärt werden. In Abhängigkeit der Infektionsdauer können dabei 10 Zysten im Gehirn einer latent infizierten Maus unterschiedliche Bradyzoitenzahlen enthalten.

Beim Vergleich der *T. gondii*-DNA-Konzentrationen zwischen unterschiedlichen Organen stellte sich heraus, dass 8 Tage nach intraperitonealer Infektion Lungen durchschnittlich mehr *T. gondii*-DNA enthielten als Gehirne. Romand et al. berichteten, dass Lungen 4 bis 7 Tage nach intraperitonealer Infektion mit RH Tachyzoiten mehr Parasiten enthielten als Gehirne [83]. Auch nach oraler Infektion mit Gewebezysten erreicht die Parasitenlast zunächst in der Lunge und erst später im Gehirn ihr Maximum

[99]. Die in dieser Arbeit konstatierte hohe Parasitenlast im Gehirn im Vergleich zur Lunge nach oraler Infektion mit ME49 Zysten ist daher vermutlich vor allem auf den späteren Untersuchungszeitpunkt zurückzuführen (Tag 8 vs. Tag 12 nach Infektion). Zusammenfassend ist festzustellen, dass Miltefosin keinen eindeutigen antiparasitären Effekt im Modell der akuten Toxoplasmose hat. Weder nach intraperitonealer noch nach oraler Infektion ergab sich für Miltefosin ein eindeutiger therapeutischer Effekt bei akuter Toxoplasmose. Für Atovaquon und Pyrimethamin-Sulfadiazin bestätigte sich hingegen der in der Literatur [6, 8] beschriebene antiparasitäre Effekt.

#### **4.4 Hat Miltefosin einen Effekt gegen das Zystenstadium von *T. gondii*?**

Die Untersuchung der Wirksamkeit von Miltefosin im Modell der latenten Toxoplasmose ergab weder in Gehirn noch in der Lunge Miltefosin-behandelter Tiere eine eindeutige Reduktion der *T. gondii*-DNA-Konzentrationen. Dahingegen konnte in Quetschpräparaten eine signifikante Reduktion der Zystenanzahl nach 14-tägiger Therapie gezeigt werden. Als mögliche Erklärung der unveränderten Parasitenlast bei abnehmender Zystenanzahl wäre wiederum eine unterschiedliche Anzahl von Bradyzoiten pro Zyste in Betracht zu ziehen, was allerdings unwahrscheinlich angesichts der Tatsache ist, dass Wirt, Parasitenstamm und Infektionsdauer innerhalb des Versuches gleich gehalten wurden. Zudem bestätigte sich die abnehmende Zystenanzahl nach 14-tägiger Miltefosintherapie in der Immunhistologie nicht. Divergierende Ergebnisse sind am ehesten auf die unterschiedliche Sensitivität der Methoden zurückzuführen, welche unter anderem von der Quantität des untersuchten Materials abhängt. Während eine Gehirnhälfte zur Herstellung von Quetschpräparaten Verwendung fand, wurde die andere geteilt, ein Sagittalschnitt für die PCR-Untersuchung verwendet und der Rest zur Untersuchung mittels Immunhistologie paraffinisiert. In der histologischen Untersuchung der Quetschpräparate wurde daher ein deutlich größerer Organanteil untersucht als in der Immunhistologie mittels P.A.P.-Färbung. Trotzdem bleibt die Frage unbeantwortet, ob Miltefosin Wirkung gegen *T. gondii*-Zysten besitzt, da auch für Atovaquon, für das in der Literatur ein guter antiparasitärer Effekt gegen das

Zystenstadium von *T. gondii* gezeigt worden ist [5], keine reproduzierbare und signifikante Reduktion der Parasitenlast nachgewiesen werden konnte.

Es ist bekannt, dass Unterschiede in der Genexpression bzw. des Metabolismus zwischen Tachyzoiten und Bradyzoiten bestehen [101]. Ein möglicher Effekt von Miltefosin gegen das Zystenstadium - bei fehlendem Effekt gegen Tachyzoiten in vitro bzw. im Modell der akuten Toxoplasmose - könnte also durch einen Bradyzoiten-spezifischen Wirkmechanismus zu erklären sein. Auch wurden morphologische Unterschiede im Membranaufbau der Zysten im Infektionsverlauf nachgewiesen. So enthielten die Membranen von Zysten 21 Tage nach Infektion mehr Invaginationen als die 14 Tage nach Infektion [37], was auf einen verbesserten Austausch zwischen Zyste und Wirtszelle hinweisen könnte und diese so möglicherweise für Miltefosin angreifbar macht. Es gibt zudem Hinweise, dass selbst komplexe Moleküle wie D-Luciferin die Membran von Zysten passieren können [28] und diese daher nicht unerreichbar für Antiparasitika sind.

Araujo et al. zeigten im Modell der latenten Toxoplasmose, dass Atovaquon (200 mg/kg) bereits nach 5 Tagen zu einer signifikanten Reduktion der Zystenanzahl führt und nach 8 Wochen Therapie kaum noch Zysten im Gehirn nachzuweisen sind [5]. Zwar wurde auch in der vorliegenden Arbeit unter Atovaquon eine Abnahme der Zystenanzahl sowohl nach 7 als auch nach 14-tägiger Therapie festgestellt, allerdings korrelierte diese nicht mit einer signifikanten Abnahme der mittels PCR bestimmten Parasitenlast. Dies ist am ehesten auf die kleine Fallzahl (n=2-3 pro Gruppe) der Untersuchung zurückzuführen. Interessanterweise nahm die Parasitenlast sowohl in Gehirnen, als auch in Lungen der unbehandelten Kontrollgruppe von der 5. zur 6. Woche hin ab. Dies weist auf die Resistenz der NMRI-Mäuse gegenüber einer *T. gondii*-Infektion des ME49-Stammes hin.

Abschließend kann festgestellt werden, dass für Miltefosin kein signifikanter antiparasitärer Effekt im Modell der latenten Infektion zu beobachten war, der aber bei einigen Limitationen der Studie nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann.

## **4.5 Limitationen der Studie**

Während die beschriebenen in vitro- und in vivo-Experimente der vorliegenden Arbeit keinen antiparasitären Effekt von Miltefosin gegenüber *T. gondii* identifizieren konnten,

so hatte die Studie einige Limitationen. Zum einen war die Fallzahl der untersuchten Mäuse (n=15-20 pro Versuch) zu gering, um Schwankungen der Einzelergebnisse auszugleichen. Zum anderen könnte auch das Studiendesign Einfluss auf die Ergebnisse gehabt haben. Neben der Infektionsdosis ist bekanntermaßen der Behandlungsbeginn der antiparasitären Therapie von immenser Bedeutung für das Überleben von *T. gondii*-infizierten Mäusen. Vierzig Prozent der mit  $1 \times 10^3$  RH Tachyzoiten i.p. infizierten Mäuse versterben am Tag 9, wenn die Behandlung mit Atovaquon (100 mg/kg) erst 3 Tage nach Infektion begonnen wird [6]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde trotz höherer Infektionsdosis von  $1 \times 10^5$  GFP-RH Tachyzoiten unter gleichen Bedingungen bis zum Tag 8 keine Letalität beobachtet. Mögliche Gründe hierfür könnte die geringere Virulenz des GFP-exprimierenden und lange Zeit in vitro gehaltenen RH-Stammes sein oder die höhere Resistenz des Wirtes. Eine andere Studie zeigte, dass NMRI-Mäuse nach Infektion mit  $1 \times 10^5$  RH Tachyzoiten i.p. ab dem 8. Tag post infectionem zu versterben begannen [74]. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass eine geplante Mortalitätsstudie 8 Wochen nach i.p.-Infektion mit  $1 \times 10^5$  GFP-RH Tachyzoiten abgebrochen werden musste, da die NMRI-Mäuse keine Krankheitszeichen entwickelt hatten. Optimalerweise sollte zur Testung von Miltefosin bei Reaktivierungstoxoplasmose, der wichtigsten Manifestation der Infektion beim Immunsupprimierten, ein entsprechendes Modell der reaktivierten Infektion [33, 94] verwendet werden. Hierauf wurde aufgrund des fehlenden Effektes der Miltefosintherapie in den beschriebenen Experimenten allerdings verzichtet.

Interessanterweise spiegelten die Ergebnisse der Histologie in dieser Arbeit nicht immer die der PCR-Daten zur Bestimmung der Parasitenlast wider. Als mögliche Fehlerquellen kommen zum einen die ausgewertete Zahl histologischer Schnitte, zum anderen die qualitative Auswertung in Betracht. So wurde von jeder Maus nur ein histologischer Schnitt je Organ zur Bestimmung der Parasitenlast ausgewertet, was keine zuverlässige Repräsentation des Gesamtorgans darstellt. Auch die Ergebnisse H&E-gefärbter Schnitte müssen unter Berücksichtigung dieser Limitation betrachtet werden. Zudem wurden bei der Auswertung der Entzündungsreaktion Ordinalskalen von 1-3 (Gehirn) bzw. 1-7 (Lunge) verwendet, welche bei nur einem pro Organ ausgewertetem Schnitt zur Quantifizierung der Entzündungsreaktion eventuell zu wenig sensitiv sind.



## 4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Abschließend ist festzustellen, dass Miltefosin weder in vitro noch in vivo einen signifikanten antiparasitären Effekt gegen *T. gondii* zeigt. In vitro-Experimente lassen die Vermutung zu, dass immunstimulatorische Effekte von Miltefosin, nicht aber direkte antiparasitäre Effekte für die intrazelluläre Parasitenelimination von *T. gondii* eine Rolle spielen. Während Miltefosin im Mausmodell der akuten Toxoplasmose keinerlei antiparasitäre Wirkung zeigte, deutete sich im Mausmodell der latenten Toxoplasmose ein Effekt von Miltefosin an. Daher sollte in zukünftigen Studien der Effekt von Miltefosin gegen das Zystenstadium von *T. gondii* detaillierter untersucht werden. Zum einen sollte eine größere Fallzahl von Versuchstieren Verwendung finden, zum anderen sollten die Medikamentenkonzentrationen in den entsprechenden Organen bestimmt werden. Nur so können reproduzierbare Ergebnisse gewonnen und eine mögliche Dosis-Wirkungsbeziehung postuliert werden. In der vorliegenden Arbeit bestätigten sich die für Atovaquon und Pyrimethamin-Sulfadiazin in der Literatur belegten Effekte weitestgehend [6, 8]. Gemeinsam mit der nachgewiesenen Dissemination von *T. gondii* in verschiedenen Organen bestätigt dies die Validität der hier angewandten Mausmodelle der akuten und latenten Toxoplasmose.

Es besteht weiterhin ein großer Bedarf an Medikamenten für Patienten mit Augen- und Reaktivierungstoxoplasmose. Zur Testung von Medikamenten gegen Toxoplasmose sollten zukünftig vielversprechende in vitro-identifizierte Substanzen möglichst im Mausmodell der Reaktivierungstoxoplasmose untersucht werden [33, 94]. Nebenwirkungsarme und preisgünstige Medikamente gegen das Zystenstadium von *T. gondii* brächten enorme Vorteile in der Prävention der Reaktivierungstoxoplasmose. Studien zu Medikamenten, die bei Infektionen durch verwandte Erreger bereits mit Erfolg eingesetzt werden, können dabei von immenser Bedeutung sein, da Untersuchungen zur Pharmakokinetik und Pharmakodynamik oftmals bereits vorhanden sind.

## 5. Zusammenfassung

Das Protozoon *Toxoplasma gondii* ist ubiquitär verbreitet und verursacht schwerwiegende Krankheitsbilder wie die bei Immunsupprimierten unbehandelt letal verlaufende Toxoplasma-Enzephalitis. Therapie der ersten Wahl ist die Behandlung mit Pyrimethamin-Sulfadiazin bzw. Pyrimethamin-Clindamycin, die mit schweren Nebenwirkungen wie Knochenmarksuppression oder allergischen Reaktionen assoziiert ist und daher häufig wegen Unverträglichkeit abgebrochen werden muss. Neue wirksame Medikamente werden daher dringend benötigt. Für Hexadecylphosphocholin (Miltefosin), das bereits erfolgreich zur Behandlung der Leishmaniose eingesetzt wird, wurde nachgewiesen, dass es ebenfalls gegen zahlreiche verwandte Parasiten wie Trypanosomen, Entamoeben, Acanthamoeben und Cryptosporidien antiparasitäre Wirkung besitzt. In der vorliegenden Arbeit wurde nun in Zellkultur und am Mausmodell untersucht, ob Miltefosin antiparasitäre Wirkung gegen verschiedene Stadien von *T. gondii* zeigt.

In Zellkultur fand sich unter Miltefosin (30 µg/ml) bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 1:1 bzw. unter Miltefosin (10 µg/ml) bei einem Parasiten/Zell-Verhältnis von 5:1 nach 3 Stunden Inkubation von GFP-RH Tachyzoiten in J774A.1-Makrophagen eine signifikante Reduktion des Anteils infizierter Makrophagen im Vergleich zu Kontrollen ( $p < 0,005$  bzw.  $p < 0,05$ ). Nach längeren Inkubationszeiten (48 und 72 Stunden) bzw. unter anderen Konzentrationen (10 µg/ml, 20 µg/ml und 30 µg/ml) war jedoch kein antiparasitärer Effekt für Miltefosin gegen *T. gondii* nachweisbar. Stattdessen fand sich zu späteren Untersuchungszeitpunkten paradoxerweise ein Anstieg infizierter Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Nach 72 Stunden Inkubation ergab sich unter Miltefosin (20 µg/ml) in einem Parasiten-Zell-Verhältnis von 1:1 ein Anstieg infizierter Zellen um ca. 50% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen ( $p < 0,01$ ). Im Gegensatz dazu zeigte sich unter Atovaquon (3 µg/ml) nach längeren Inkubationszeiten eine Reduktion *T. gondii*-infizierter Makrophagen, nach 72 Stunden konnte eine Reduktion infizierten Makrophagen in beiden Parasiten/Zell-Verhältnissen von 1:1 und 5:1 um über 75% im Vergleich zu nicht-behandelten Kontrollen festgestellt werden ( $p < 0,0005$ ).

Im Mausmodell der akuten Toxoplasmose zeigte die 5-tägige Miltefosintherapie (30 mg/kg) nach intraperitonealer Infektion von NMRI-Mäusen mit  $1 \times 10^5$  GFP-RH Tachyzoiten keine reproduzierbare und signifikante Abnahme der Parasitenlast.

Während sich keine Reduktion der *T. gondii*-DNA-Konzentrationen in den Organen unter Miltefosintherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe fand, sanken diese signifikant unter Atovaquon in Lunge, Gehirn, Milz und Leber bzw. unter Pyrimethamin-Sulfadiazin in Lunge und Milz im Vergleich zu Kontrollen ( $p < 0,05$ ). Zwar bestätigte die Immunhistologie in den einzelnen Organen nicht immer die mittels PCR bestimmte Parasitenlast, doch ließen die immunhistologischen Daten ähnliche Rückschlüsse hinsichtlich der antiparasitären Wirkung der einzelnen Medikamente gegenüber *T. gondii* zu. Auch nach oraler Infektion von NMRI-Mäusen mit 10 ME 49 Zysten und 7-tägiger Miltefosintherapie (20 mg/kg und 30 mg/kg) fand sich kein antiparasitärer Effekt im Mausmodell der akuten Toxoplasmose.

Im Modell der latenten Toxoplasmose, in dem NMRI-Mäuse mit 10 ME 49 Zysten i.p. infiziert wurden und 4 Wochen später über 7 bzw. 14 Tage behandelt wurden, deutete sich hingegen ein antiparasitärer Effekt von Miltefosin (30 mg/kg) gegen *T. gondii* an. Während sich mittels PCR weder unter Miltefosin-, noch unter Atovaquontherapie eine Reduktion der Parasitenlast zeigte, fand sich in der mikroskopischen Untersuchung von Quetschpräparaten für Miltefosin nach 14-tägiger Therapie bzw. unter Atovaquon nach 7- und 14-tägiger Therapie eine signifikante Reduktion der Zystenanzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Miltefosin weder in vitro noch im Mausmodell der akuten Toxoplasmose einen signifikanten antiparasitären Effekt gegen *T. gondii* zeigt. Da sich im Modell der latenten Toxoplasmose ein antiparasitärer Effekt von Miltefosin andeutete, sollten zukünftige Studien daher im Detail die Wirksamkeit von Miltefosin gegenüber Zysten von *T. gondii* untersuchen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Ancelin, M.L. and H.J. Vial, *Quaternary ammonium compounds efficiently inhibit Plasmodium falciparum growth in vitro by impairment of choline transport*. Antimicrob Agents Chemother, 1986. **29**(5): p. 814-20.
2. Andrade, R.M., J.A. Portillo, M. Wessendarp, and C.S. Subauste, *CD40 signaling in macrophages induces activity against an intracellular pathogen independently of gamma interferon and reactive nitrogen intermediates*. Infect Immun, 2005. **73**(5): p. 3115-23.
3. Andrade, R.M., M. Wessendarp, and C.S. Subauste, *CD154 activates macrophage antimicrobial activity in the absence of IFN-gamma through a TNF-alpha-dependent mechanism*. J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6750-6.
4. Antinori, A., D. Larussa, A. Cingolani, et al., *Prevalence, associated factors, and prognostic determinants of AIDS-related toxoplasmic encephalitis in the era of advanced highly active antiretroviral therapy*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(11): p. 1681-91.
5. Araujo, F.G., J. Huskinson-Mark, W.E. Gutteridge, and J.S. Remington, *In vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 566C80 against the cyst form of Toxoplasma gondii*. Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(2): p. 326-30.
6. Araujo, F.G., J. Huskinson, and J.S. Remington, *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): p. 293-9.
7. Araujo, F.G., D.M. Williams, F.C. Grumet, and J.S. Remington, *Strain-dependent differences in murine susceptibility to toxoplasma*. Infect Immun, 1976. **13**(5): p. 1528-30.
8. Arribas, J.R., J.A. de Diego, C. Gamallo, and J.J. Vazquez, *A new murine model of severe acute toxoplasma encephalitis*. J Antimicrob Chemother, 1995. **36**(3): p. 503-12.
9. Azzouz, S., M. Maache, R.G. Garcia, and A. Osuna, *Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofosine*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2005. **96**(1): p. 60-5.
10. Bajohr, L.L. *Therapeutischer Effekt von neuen Hydroxyquinolonen gegen*

- Toxoplasma gondii* in vivo. Doctor medicinae. Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin. 2010
11. Bajohr, L.L., L. Ma, C. Platte, et al., *In vitro and in vivo activities of 1-hydroxy-2-alkyl-4(1H)quinolone derivatives against Toxoplasma gondii*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(1): p. 517-21.
  12. Beraud, G., S. Pierre-Francois, A. Foltzer, et al., *Cotrimoxazole for treatment of cerebral toxoplasmosis: an observational cohort study during 1994-2006*. Am J Trop Med Hyg, 2009. **80**(4): p. 583-7.
  13. Berkovic, D., S. Sievers, D. Haase, E.A. Fleer, and C. Binder, *Effects of hexadecylphosphocholine on phosphatidylcholine and phosphatidylserine metabolism in human lymphoma cells*. J Exp Ther Oncol, 2002. **2**(2): p. 85-92.
  14. Bhattacharya, S.K., P.K. Sinha, S. Sundar, et al., *Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis*. J Infect Dis, 2007. **196**(4): p. 591-8.
  15. Black, M.W. and J.C. Boothroyd, *Lytic cycle of Toxoplasma gondii*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(3): p. 607-23.
  16. Blader, I.J. and J.P. Saeij, *Communication between Toxoplasma gondii and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence*. APMIS, 2009. **117**(5-6): p. 458-76.
  17. Boia, M.N., F.A. Carvalho-Costa, F.C. Sodre, G.M. Pinto, and M.R. Amendoeira, *Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection among indian people living in Iauarete, Sao Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2008. **50**(1): p. 17-20.
  18. Brachwitz, H. and C. Vollgraf, *Analogs of alkyllysophospholipids: chemistry, effects on the molecular level and their consequences for normal and malignant cells*. Pharmacol Ther, 1995. **66**(1): p. 39-82.
  19. Breiser, A., D.J. Kim, E.A. Fleer, et al., *Distribution and metabolism of hexadecylphosphocholine in mice*. Lipids, 1987. **22**(11): p. 925-6.
  20. Civoli, F. and L.W. Daniel, *Quaternary ammonium analogs of ether lipids inhibit the activation of protein kinase C and the growth of human leukemia cell lines*. Cancer Chemother Pharmacol, 1998. **42**(4): p. 319-26.
  21. Contini, C., *Clinical and diagnostic management of toxoplasmosis in the immunocompromised patient*. Parassitologia, 2008. **50**(1-2): p. 45-50.

22. Croft, S.L. and J. Engel, *Miltefosine--discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2006. **100 Suppl 1**: p. S4-8.
23. Croft, S.L., R.A. Neal, W. Pendergast, and J.H. Chan, *The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against Leishmania donovani*. *Biochem Pharmacol*, 1987. **36**(16): p. 2633-6.
24. Croft, S.L., D. Snowdon, and V. Yardley, *The activities of four anticancer alkylsophospholipids against Leishmania donovani, Trypanosoma cruzi and Trypanosoma brucei*. *J Antimicrob Chemother*, 1996. **38**(6): p. 1041-7.
25. Darde, M.L., *Genetic analysis of the diversity in Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita*, 2004. **40**(1): p. 57-63.
26. Derouin, F. and C. Chastang, *Enzyme immunoassay to assess effect of antimicrobial agents on Toxoplasma gondii in tissue culture*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1988. **32**(3): p. 303-7.
27. Derouin, F., C. Lacroix, M.H. Sumyuen, S. Romand, and Y.J. Garin, *[Experimental models of toxoplasmosis. Pharmacological applications]*. *Parasite*, 1995. **2**(3): p. 243-56.
28. Di Cristina, M., D. Marocco, R. Galizi, et al., *Temporal and spatial distribution of Toxoplasma gondii differentiation into Bradyzoites and tissue cyst formation in vivo*. *Infect Immun*, 2008. **76**(8): p. 3491-501.
29. Dubey, J.P., *Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol*, 1997. **44**(6): p. 592-602.
30. Dubey, J.P. and J.K. Frenkel, *Experimental toxoplasma infection in mice with strains producing oocysts*. *J Parasitol*, 1973. **59**(3): p. 505-12.
31. Dumas, J.L., G. Pizzolato, and J.C. Pechere, *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): p. 35-9.
32. Dunay, I.R., W.C. Chan, R.K. Haynes, and L.D. Sibley, *Artemisone and artemiside control acute and reactivated toxoplasmosis in a murine model*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. **53**(10): p. 4450-6.
33. Dunay, I.R., M.M. Heimesaat, F.N. Bushrab, et al., *Atovaquone maintenance therapy prevents reactivation of toxoplasmic encephalitis in a murine model of*

- reactivated toxoplasmosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(12): p. 4848-54.
34. Dunn, D., M. Wallon, F. Peyron, et al., *Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling*. Lancet, 1999. **353**(9167): p. 1829-33.
  35. Escobar, P., S. Matu, C. Marques, and S.L. Croft, *Sensitivities of Leishmania species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B*. Acta Trop, 2002. **81**(2): p. 151-7.
  36. Eue, I., R. Zeisig, and D. Arndt, *Alkylphosphocholine-induced production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha by U 937 cells*. J Cancer Res Clin Oncol, 1995. **121**(6): p. 350-6.
  37. Ferguson, D.J. and W.M. Hutchison, *An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of Toxoplasma gondii in the brains of mice*. Parasitol Res, 1987. **73**(6): p. 483-91.
  38. Ganguly, N.K. *Oral Miltefosine may revolutionize treatment of visceral leishmaniasis*. 2002 [cited].
  39. Griewank, K., C. Gazeau, A. Eichhorn, and E. von Stebut, *Miltefosine efficiently eliminates L. major amastigotes from murine infected dendritic cells without altering their immune functions*. Antimicrob Agents Chemother, 2009.
  40. Gupta, N., M.M. Zahn, I. Coppens, K.A. Joiner, and D.R. Voelker, *Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite Toxoplasma gondii arrests its growth*. J Biol Chem, 2005. **280**(16): p. 16345-53.
  41. Haase, R., T. Wieder, C.C. Geilen, and W. Reutter, *The phospholipid analogue hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine biosynthesis in Madin-Darby canine kidney cells*. FEBS Lett, 1991. **288**(1-2): p. 129-32.
  42. Henke, J., J. Engelmann, B. Kutscher, et al., *Changes of intracellular calcium, fatty acids and phospholipids during miltefosine-induced apoptosis monitored by fluorescence- and 13C NMR-spectroscopy*. Anticancer Res, 1999. **19**(5B): p. 4027-32.
  43. Hill, D. and J.P. Dubey, *Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention*. Clin Microbiol Infect, 2002. **8**(10): p. 634-40.
  44. Hippe, D., A. Gais, U. Gross, and C.G. Luder, *Modulation of caspase activation by Toxoplasma gondii*. Methods Mol Biol, 2009. **470**: p. 275-88.

45. Hochhuth, C.H., K. Vehmeyer, H. Eibl, and C. Unger, *Hexadecylphosphocholine induces interferon-gamma secretion and expression of GM-CSF mRNA in human mononuclear cells*. Cell Immunol, 1992. **141**(1): p. 161-8.
46. Israelski, D.M., F.G. Araujo, J.S. Wachtel, L. Heinrichs, and J.S. Remington, *Differences in microbicidal activities of human macrophages against Toxoplasma gondii and Trypanosoma cruzi*. Infect Immun, 1990. **58**(1): p. 263-5.
47. Jimenez-Lopez, J.M., M.P. Carrasco, C. Marco, and J.L. Segovia, *Hexadecylphosphocholine disrupts cholesterol homeostasis and induces the accumulation of free cholesterol in HepG2 tumour cells*. Biochem Pharmacol, 2006. **71**(8): p. 1114-21.
48. Jones, J.L., D. Kruszon-Moran, K. Sanders-Lewis, and M. Wilson, *Toxoplasma gondii infection in the United States, 1999 2004, decline from the prior decade*. Am J Trop Med Hyg, 2007. **77**(3): p. 405-10.
49. Kaplan, J.E., C. Benson, K.H. Holmes, et al., *Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America*. MMWR Recomm Rep, 2009. **58**(RR-4): p. 1-207; quiz CE1-4.
50. Katlama, C., S. De Wit, E. O'Doherty, M. Van Glabeke, and N. Clumeck, *Pyrimethamine-clindamycin vs. pyrimethamine-sulfadiazine as acute and long-term therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS*. Clin Infect Dis, 1996. **22**(2): p. 268-75.
51. Katlama, C., B. Mouthon, D. Gourdon, D. Lapierre, and F. Rousseau, *Atovaquone as long-term suppressive therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS and multiple drug intolerance. Atovaquone Expanded Access Group*. AIDS, 1996. **10**(10): p. 1107-12.
52. Kaufmann-Kolle, P. and E.A. Flier, *Morphological changes of adherent and nonadherent cells by treatment with hexadecylphosphocholine and 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine observed by scanning electron microscopy*. Prog Exp Tumor Res, 1992. **34**: p. 47-58.
53. Konstantinov, S.M., R. Kaminsky, R. Brun, M.R. Berger, and U. Zillmann, *Efficacy of anticancer alkylphosphocholines in Trypanosoma brucei subspecies*. Acta Trop, 1997. **64**(3-4): p. 145-54.



54. Kuhlencord, A., T. Maniera, H. Eibl, and C. Unger, *Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992. **36**(8): p. 1630-4.
55. Laird, P.W., A. Zijderveld, K. Linders, et al., *Simplified mammalian DNA isolation procedure*. *Nucleic Acids Res*, 1991. **19**(15): p. 4293.
56. Leonard, R., J. Hardy, G. van Tienhoven, et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial of 6% miltefosine solution, a topical chemotherapy in cutaneous metastases from breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(21): p. 4150-9.
57. Lira, R., L.M. Contreras, R.M. Rita, and J.A. Urbina, *Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole*. *J Antimicrob Chemother*, 2001. **47**(5): p. 537-46.
58. Luder, C.G. and U. Gross, *Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005. **289**: p. 219-37.
59. Luft, B.J., R. Hafner, A.H. Korzun, et al., *Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Members of the ACTG 077p/ANRS 009 Study Team*. *N Engl J Med*, 1993. **329**(14): p. 995-1000.
60. Luft, B.J. and J.S. Remington, *Toxoplasmic encephalitis in AIDS*. *Clin Infect Dis*, 1992. **15**(2): p. 211-22.
61. Luque-Ortega, J.R. and L. Rivas, *Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(4): p. 1327-32.
62. McLeod, R., K. Boyer, T. Karrison, et al., *Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981-2004: the National Collaborative Chicago-Based, Congenital Toxoplasmosis Study*. *Clin Infect Dis*, 2006. **42**(10): p. 1383-94.
63. McLeod, R. and J.S. Remington, *A method to evaluate the capacity of monocytes and macrophages to inhibit multiplication of an intracellular pathogen*. *J Immunol Methods*, 1979. **27**(1): p. 19-29.
64. Meneceur, P., M.A. Bouldouyre, D. Aubert, et al., *In vitro susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008. **52**(4): p. 1269-77.

65. Montoya, J.G. and O. Liesenfeld, *Toxoplasmosis*. Lancet, 2004. **363**(9425): p. 1965-76.
66. Montoya, J.G., Remington, J.S., *Toxoplasma gondii*, in *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, G.L. Mandell, Bennett, J.E., Dolin, R., Editor. 2000, Churchill Livingstone: Philadelphia. p. 2858-2888.
67. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
68. Nishikawa, Y., O. Kawase, O. Vielemeyer, et al., *Toxoplasma gondii* infection induces apoptosis in noninfected macrophages: role of nitric oxide and other soluble factors. Parasite Immunol, 2007. **29**(7): p. 375-85.
69. Niyongabo, T., C. Leport, and J.L. Vilde, *[Usefulness of folinic acid in cytopenia induced by antiparasitic drugs in AIDS patients]*. Presse Med, 1991. **20**(34): p. 1677-81.
70. Paris, C., J. Bertoglio, and J. Breard, *Lysosomal and mitochondrial pathways in miltefosine-induced apoptosis in U937 cells*. Apoptosis, 2007. **12**(7): p. 1257-67.
71. Paris, C., P.M. Loiseau, C. Bories, and J. Breard, *Miltefosine induces apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(3): p. 852-9.
72. Payne, T.M., R.E. Molestina, and A.P. Sinai, *Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappaB function in the Toxoplasma gondii-mediated blockade of host apoptosis*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 21): p. 4345-58.
73. Pessi, G., G. Kociubinski, and C.B. Mamoun, *A pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in Plasmodium falciparum involving phosphoethanolamine methylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 6206-11.
74. Petersen, E., H.V. Nielsen, L. Christiansen, and J. Spenter, *Immunization with E. coli produced recombinant T. gondii SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with Toxoplasma gondii*. Vaccine, 1998. **16**(13): p. 1283-9.
75. Pleyer, U., N. Torun, and O. Liesenfeld, *[Ocular toxoplasmosis]*. Ophthalmologe, 2007. **104**(7): p. 603-15, quiz 616.
76. Porter, S.B. and M.A. Sande, *Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome*. N Engl J Med, 1992. **327**(23): p. 1643-8.

77. Rakotomanga, M., S. Blanc, K. Gaudin, P. Chaminade, and P.M. Loiseau, *Miltefosine affects lipid metabolism in Leishmania donovani promastigotes*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(4): p. 1425-30.
78. Rakotomanga, M., P.M. Loiseau, and M. Saint-Pierre-Chazalet, *Hexadecylphosphocholine interaction with lipid monolayers*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1661**(2): p. 212-8.
79. Rakotomanga, M., M. Saint-Pierre-Chazalet, and P.M. Loiseau, *Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant Leishmania donovani promastigotes and consequences for drug-membrane interactions*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(7): p. 2677-86.
80. Reischl, U., S. Bretagne, D. Kruger, P. Ernault, and J.M. Costa, *Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes*. BMC Infect Dis, 2003. **3**: p. 7.
81. Renold, C., A. Sugar, J.P. Chave, et al., *Toxoplasma encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome*. Medicine (Baltimore), 1992. **71**(4): p. 224-39.
82. Rolan, P.E., A.J. Mercer, B.C. Weatherley, et al., *Examination of some factors responsible for a food-induced increase in absorption of atovaquone*. Br J Clin Pharmacol, 1994. **37**(1): p. 13-20.
83. Romand, S., A. Bryskier, M. Moutot, and F. Derouin, *In-vitro and in-vivo activities of roxithromycin in combination with pyrimethamine or sulphadiazine against Toxoplasma gondii*. J Antimicrob Chemother, 1995. **35**(6): p. 821-32.
84. Romand, S., M. Pudney, and F. Derouin, *In vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone atovaquone alone or combined with pyrimethamine, sulfadiazine, clarithromycin, or minocycline against Toxoplasma gondii*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. **37**(11): p. 2371-8.
85. Rustenbeck, I., H. Eibl, and S. Lenzen, *Structural requirements of lysophospholipid-regulated mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1069**(1): p. 99-109.
86. Rybczynska, M., M. Spitaler, N.G. Knebel, et al., *Effects of miltefosine on various biochemical parameters in a panel of tumor cell lines with different sensitivities*. Biochem Pharmacol, 2001. **62**(6): p. 765-72.

87. Saraiva, V.B., D. Gibaldi, J.O. Previato, et al., *Proinflammatory and cytotoxic effects of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against drug-resistant strains of Trypanosoma cruzi*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(11): p. 3472-7.
88. Saraiva, V.B., M. Wengert, E. Gomes-Quintana, N. Heise, and C. Caruso-Neves, *Na(+)-ATPase and protein kinase C are targets to 1-O-hexadecylphosphocoline (miltefosine) in Trypanosoma cruzi*. Arch Biochem Biophys, 2009. **481**(1): p. 65-71.
89. Saugar, J.M., J. Delgado, V. Hornillos, et al., *Synthesis and biological evaluation of fluorescent leishmanicidal analogues of hexadecylphosphocholine (miltefosine) as probes of antiparasite mechanisms*. J Med Chem, 2007. **50**(24): p. 5994-6003.
90. Scholer, N., K. Krause, O. Kayser, et al., *Atovaquone nanosuspensions show excellent therapeutic effect in a new murine model of reactivated toxoplasmosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(6): p. 1771-9.
91. Seifert, K., M. Duchene, W.H. Wernsdorfer, et al., *Effects of miltefosine and other alkylphosphocholines on human intestinal parasite Entamoeba histolytica*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(5): p. 1505-10.
92. Shahiduzzaman, M., V. Dyachenko, A. Obwaller, S. Unglaube, and A. Dauschies, *Combination of cell culture and quantitative PCR for screening of drugs against Cryptosporidium parvum*. Vet Parasitol, 2009. **162**(3-4): p. 271-7.
93. Shoji, M., R.L. Raynor, E.A. Flier, et al., *Effects of hexadecylphosphocholine on protein kinase C and TPA-induced differentiation of HL60 cells*. Lipids, 1991. **26**(2): p. 145-9.
94. Shubar, H. *Effect of surfactants on the therapeutic efficacy of atovaquone nanosuspensions against acute and reactivated murine toxoplasmosis*. Doctor rerum naturalium. Institute of Microbiology and Hygiene, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin. 2009
95. Shubar, H.M., J.P. Mayer, W. Hopfenmuller, and O. Liesenfeld, *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): p. 1110-9.
96. Sonda, S. and A.B. Hehl, *Lipid biology of Apicomplexa: perspectives for new drug targets, particularly for Toxoplasma gondii*. Trends Parasitol, 2006. **22**(1): p. 41-7.

97. Sordet, F., Y. Aumjaud, H. Fessi, and F. Derouin, *Assessment of the activity of atovaquone-loaded nanocapsules in the treatment of acute and chronic murine toxoplasmosis*. *Parasite*, 1998. **5**(3): p. 223-9.
98. Striepen, B., C.Y. He, M. Matrajt, D. Soldati, and D.S. Roos, *Expression, selection, and organellar targeting of the green fluorescent protein in Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*, 1998. **92**(2): p. 325-38.
99. Sumyuen, M.H., Y.J. Garin, and F. Derouin, *Early kinetics of Toxoplasma gondii infection in mice infected orally with cysts of an avirulent strain*. *J Parasitol*, 1995. **81**(2): p. 327-9.
100. Suzuki, Y., M.A. Orellana, S.Y. Wong, F.K. Conley, and J.S. Remington, *Susceptibility to chronic infection with Toxoplasma gondii does not correlate with susceptibility to acute infection in mice*. *Infect Immun*, 1993. **61**(6): p. 2284-8.
101. Tomavo, S., *The differential expression of multiple isoenzyme forms during stage conversion of Toxoplasma gondii: an adaptive developmental strategy*. *Int J Parasitol*, 2001. **31**(10): p. 1023-31.
102. Torre, D., S. Casari, F. Speranza, et al., *Randomized trial of trimethoprim-sulfamethoxazole versus pyrimethamine-sulfadiazine for therapy of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. Italian Collaborative Study Group*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. **42**(6): p. 1346-9.
103. Torres, R.A., W. Weinberg, J. Stansell, et al., *Atovaquone for salvage treatment and suppression of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. Atovaquone/Toxoplasmic Encephalitis Study Group*. *Clin Infect Dis*, 1997. **24**(3): p. 422-9.
104. Unger, C., W. Damentz, E.A. Fleer, et al., *Hexadecylphosphocholine, a new ether lipid analogue. Studies on the antineoplastic activity in vitro and in vivo*. *Acta Oncol*, 1989. **28**(2): p. 213-7.
105. Vehmeyer, K., D.J. Kim, G.A. Nagel, H. Eibl, and C. Unger, *Effect of ether lipids on mouse granulocyte-macrophage progenitor cells*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1989. **24**(1): p. 58-60.
106. Wadhone, P., M. Maiti, R. Agarwal, et al., *Miltefosine promotes IFN-gamma-dominated anti-leishmanial immune response*. *J Immunol*, 2009. **182**(11): p. 7146-54.

107. Walochnik, J., M. Duchene, K. Seifert, et al., *Cytotoxic activities of alkylphosphocholines against clinical isolates of Acanthamoeba spp.* Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(3): p. 695-701.
108. Wang, Y.Z., Y.B. Chang, C. Xing, and D. Fu, *The interference effects of hexadecylphosphocholine on proliferation and membrane phospholipid metabolism in human myeloid leukemia cell lines.* Int J Tissue React, 1998. **20**(3): p. 101-7.
109. Zeisig, R., M. Rudolf, I. Eue, and D. Arndt, *Influence of hexadecylphosphocholine on the release of tumor necrosis factor and nitroxide from peritoneal macrophages in vitro.* J Cancer Res Clin Oncol, 1995. **121**(2): p. 69-75.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome – Erworbenes Immundefizienz Syndrom
Art.-Nr.	Artikelnummer
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff oder Cytosin
Cl	Chlor
CBF	Campus Benjamin-Franklin, Charité -Universitätsmedizin Berlin
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	cycle treshold
Cu	Kupfer
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destillata
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
ED50	mittlere Effektivdosis
EDTA	Ethyl diamintetraessigsäure
ELISA - Reader	Enzymgekoppeltes Immunoabsorptionsansatz – Lesegerät
et al.	et alii = und andere
evtl.	eventuell
FAM	Fluoreszenzfarbstoff
FACS	fluorescence activating cell sorting = Durchflusszytometrie
FCS	Fötales Kälber-Serum
FRET	Fluoreszenzresonanz-Energietransfer

g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G	Guanin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H	Wasserstoff
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H&E	Hämatoxylin-Eosin
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL-12	Interleukin 12
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
l	Liter
<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i>
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
LightCycler-PCR	Quantitative Polymerase Kettentreaktion mittels Hybridsonden
Lot.	Chargennummer
M	molar
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ M	mikromolar
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MTT-Lösung	3-(4,5-Dimehtylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
N	Stickstoff
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMRI	Naval Medical Research Institute



NO	Stickstoffmonoxid
O	Sauerstoff
pg	Pikogramm
P.A.P.	Peroxidase Anti-Peroxidase
PBS	phosphate buffered saline = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
pH	potentia Hydrogenii = Stärke einer Säure/Base
p.i.	post infectionem
p.o.	per os
Prof.	Professor
P-S	Pyrimethamin-Sulfadiazin
PtdCho	Phosphatidylcholin
PtdEth	Phosphatidylethanolamin
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute = Zellkulturmedium
S	Schwefel
SA	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate = Natriumlaurylsulfat
SSW.	Schwangerschaftswoche
T	Thymin
Tab.	Tabelle
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
USA	United States of America = Vereinigten Staaten von Amerika
v.a.	vor allem
vs.	versus = Statistische Auswertung zweier Stichproben

## **8. Lebenslauf**

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

## Erklärung

„Ich, Raoul Otto Roßmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Hexadecylphosphocholin (Miltefosin) und seine antiparasitäre Wirkung gegen Toxoplasma gondii in Zellkultur und im Mausmodell‘ 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