

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. M. Frosch

Der Einfluß von Chemotherapeutika
auf Replikation und Stadiendifferenzierung von
Toxoplasma gondii

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Fabian Ulrich Pohl

aus Kassel

Würzburg Mai 2002

Referent:

Prof. Dr. U. Groß

Korreferent:

Prof. Dr. M. Flentje

Dekan:

Prof. Dr. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2002

Der Promovend ist Arzt.

Gewidmet ist diese Arbeit
meiner Großmutter Anna Dietrich und meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Historie</i>	1
1.2 <i>Lebenszyklus und biologische Grundlagen</i>	2
1.3 <i>Klinik</i>	2
1.4 <i>Diagnostik</i>	3
1.5 <i>Gegenwärtige Therapie</i>	6
1.5.1 Pyrimethamin	7
1.5.2 Sulfadiazin	7
1.5.3 Spiramycin	8
1.5.4 Clindamycin	8
1.5.5 Atovaquone	9
2. Ziel der Arbeit	10
3. Material und Methoden	11
3.1 <i>Material</i>	11
3.1.1 Reagenzien	11
3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	12
3.1.3 Lösungen, Puffer und Nährmedien	13
3.1.4 Antikörper	15
3.1.5 Versuchstiere	16
3.1.6 Parasiten (<i>T. gondii</i>)	16
3.1.7 Zellen	16
3.2 <i>Methoden</i>	17
3.2.1 Zellkulturtechniken	17
3.2.1.1 Kultivierung von Parasiten	17
3.2.1.2 Kultivierung von L929-Zellen	17
3.2.1.3 Einfrieren der Parasitenstammlinien	17
3.2.1.4 Auftauen der Parasitenstammlinien	18
3.2.2 Isolierung von Knochenmarksmakrophagen	18
3.2.3 Infektion der Knochenmarksmakrophagen	19
3.2.4 Antibiotikabehandlung	20
3.2.5 Immunfluoreszenztest	21
3.2.5.1 Grundlagen	21
3.2.5.2 Durchführung	22
3.2.5.3 Auswertung unter dem Immunfluoreszenzmikroskop	23
3.2.3 ³ H-Uracil-Einbau: Bestimmung der Replikationsrate von <i>T. gondii</i>	24
3.2.3.1 Grundlagen	24
3.2.3.2 Durchführung	24
3.2.3.3 Auswertung	25

4. Ergebnisse	26
4.1 <i>Antibiotikabehandlung</i>	26
4.1.1 Stamm NTE	26
4.1.2 Stamm RH	34
4.1.3 Stamm C56	42
4.2 <i>³H-Uracil -Einbau</i>	50
4.3 <i>Stammspezifität</i>	55
5. Diskussion	57
6. Zusammenfassung	64
7. Literaturverzeichnis	65

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AIDS	„Aquired Immundeficiency Syndrome“
Ak	Antikörper
BSA	Bovines Serum Albumin
Bsa	Bradyzoiten-spezifische Antigene
bzw.	beziehungsweise
cpm	counts per minute = Zähler pro Minute
conc	Konzentration
/d	pro Tag
d.h.	das heißt
durchschnittl.	durchschnittlich
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
etc.	„et cetera“
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
griech.	griechisch
h	Stunde
I.E.	Einheiten
Ig	Immunglobulin
IFT	Immunfluoreszenztest
i. Vgl.	im Vergleich
/kg	pro Kilogramm Körpergewicht
KBR	Komplementbindungsreaktion
Konz.	Konzentration
KMM	Knochenmarksmakrophagen
max.	maximal
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MW	Mittelwert

nm	Nanometer
o.g.	oben genannt
PV	parasitophore Vakuolen
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
p.i.	“post infectionem”
s.	siehe
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
vgl.	vergleiche
z. B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Historie

Die Toxoplasmose wurde als eigenständiges Krankheitsbild erstmalig 1939 von Wolf, Cowen und Paige beschrieben, denen es gelang, *Toxoplasma gondii* aus einem Neugeborenen mit Enzephalomyelitis zu isolieren. Erstmals beschrieben wurde das Protozoon jedoch von C. Nicolle und L. Manceaux (Nicolle, Manceaux 1908), die ihre Entdeckung am 26. Oktober 1908 veröffentlichten. Den Wissenschaftlern des Pasteur Instituts in Tunis gelang es, das Protozoon aus dem Gundi (*Ctenodactylus gundi*), einem über den Eremialgürtel Nordafrikas verbreiteten Wüstennagetiers aus der Familie der Kammfinger zu isolieren. 1909 schufen sie ein eigenes Genus für ihre Entdeckung, wobei sie mit dem Begriff "Toxoplasma" (toxon aus dem griech. = Bogen, plasma = Gebilde) auf die kommaähnliche Form des Protozoons Bezug nahmen. Heute geht man allgemein davon aus, dass *T. gondii* alle Säugetiere, den Menschen und viele Vögel infizieren kann (Hubbard et al. 1996).



Abb. 1: Elektronenmikroskopische Darstellung von *Toxoplasmen*

1.2 Lebenszyklus und biologische Grundlagen

Wir unterscheiden bei Toxoplasmen drei Entwicklungsstadien. Hauptwirt von *T. gondii* sind Katzen und andere Feliden, in denen es zu einer sexuellen Reproduktion (Gamogonie) der Parasiten mit Ausscheidung von Oocysten (ca. 10-13 µm groß) kommt. In anderen Wirten, wie z.B. dem Menschen, findet dagegen eine asexuelle Reproduktion in Form einer Endodyogonie (Längsteilung des Parasiten in einer Mutterzelle) - nach zum Beispiel oraler Aufnahme durch mit Katzenkot verunreinigten Lebensmitteln - statt. Die Invasion der Wirtszelle stellt dabei einen aktiven Prozess des Parasiten dar, der nach Modifikation der Wirtszellmembran eine intrazellulär gelegene, parasitophore Vakuole bildet. In dieser Vakuole kommt es zu einer schnellen Vermehrung von acht bis zu zweiunddreißig Tachyzoiten (aktive Form, ca. 4-8 µm groß), bis die Vakuolenwand rupturiert und die Parasiten zur Invasion der umliegenden Zellen entlässt.

Bedingt durch die einsetzende Immunantwort kommt es bei dem sich schnell teilenden Tachyzoiten zu einer Konversion (Umwandlung) in das Bradyzoitenstadium. Die Bradyzoiten bilden eine Zystenwand aus, die sie der körpereigenen Abwehr durch Maskierung entzieht. Die Zysten (ca. 300 µm groß) können weit über hundert Bradyzoiten enthalten und lebenslang im Körper verbleiben. Dabei ist insbesondere das Gehirn als Zielorgan für persistierende Zysten betroffen.

1.3 Klinik

Die Toxoplasma-Infektion ist eine der häufigsten parasitischen Zoonosen. Sie ist weltweit verbreitet. Man geht von einer globalen Durchseuchung von etwa 30% aus (Mansohn-Bahr 1992). Für das Gebiet der Bundesrepublik Deutschland wird die Durchseuchungsrate mit dem Lebensalter gleichgesetzt (d.h. 30% der Dreißigjährigen (Groß 1994)). Zur klinisch manifesten Toxoplasmose kommt es jedoch nur in etwa 10% der Fälle. In der Mehrzahl zeigt sich ein entweder asymptomatischer oder grippeartiger Verlauf.

Bei einer klinisch manifesten Toxoplasmose zeigen sich akut Symptome wie zervicale und supraklavikuläre Lymphadenitis (Toxoplasmosis lymphonodosa) mit Fieber sowie Kopf- und Muskelschmerzen oder auch ein makulopapulöses Exanthem (Toxoplasmosis exanthematica). Hinzukommen können aber auch pneumonitisartige Symptome. Kann der Körper keine ausreichende Immunabwehr aufbauen, kommt es zu stärker ausgeprägten Destruktionen befallener Organe wie Lunge, Gehirn, Leber, Herz und Augen. Folgen können dann eine Toxoplasmosis cerebrospinalis (Enzephalomyelitis), Toxoplasmosis ophthalmica (Retinochorioiditis des granulomatösen Typs), Myocarditis oder interstitielle Pneumonie (Schäffler, Altekürger 1990) sein.

Die konnatale Form der Toxoplasmose (diaplazentare Übertragung der Erreger auf den Feten) hat zumeist einen Abort zur Folge, bei Überleben der Kinder können schwere ZNS- und Augenmissbildungen die Folge sein.

Alle beschriebenen Formen können in eine chronische Form übergehen, bei der Kalzifikationsherde im Hirn mit Entwicklung eines Krampfleidens sowie Veränderungen des Augenhintergrundes im Vordergrund stehen.

Aufgrund der Biologie des Erregers, der lebenslang ohne Symptomatik im Körper persistiert, ist er insbesondere bei Immunschwächeerkrankungen gefährlich. Bei der Immunschwächeerkrankung AIDS stellt die Toxoplasmosis cerebrospinalis die häufigste opportunistische Infektion des ZNS dar (Porter et Sande 1992).

1.4 Diagnostik

Der Nachweis der Erkrankung erfolgt in der Regel serologisch.

Die wichtigsten serologischen Diagnoseverfahren beruhen auf dem Nachweis von IgM- und IgA-Ak bei frischer Infektion und bei kongenitaler Toxoplasmose. IgG-Ak als Zeichen einer früher durchgemachten und persistierenden Infektion sind lebenslang nachweisbar. Als „goldener Standard“ gilt immer noch der Sabin-Feldman-Test.

Sabin-Feldman-Test (SFT)

Der SFT ist ein hochempfindlicher Test und beruht darauf, dass Toxoplasma-Antikörper enthaltenes Serum komplementabhängig die Membran lebender Toxoplasmen schädigt und deshalb deren Färbbarkeit mit Methyleneblau herabgesetzt wird.

Toxoplasmose-Immunfluoreszenztest (IFT)

Der IFT wird zum Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern bei der Toxoplasmose eingesetzt. Als Fluoreszenz wird die Umwandlung von Licht einer kürzeren Wellenlänge zu Licht einer längeren Wellenlänge durch einen Fluoreszenzfarbstoff bezeichnet. In der medizinisch-immunologischen Routinediagnostik wird heute meist der Farbstoff FITC (Fluoresceinisothiocyanat) an Sekundärantikörper gekoppelt, mit deren Hilfe der Nachweis humaner Antikörper gelingt.

Die Ergebnisse sind dem Sabin-Feldman-Test vergleichbar. Der Test wird 7 bis 14 Tage post infectionem positiv und erreicht innerhalb von 4 Monaten sein Maximum. Titer von 1:1000 und höher sprechen in Zusammenhang mit dem klinischen Befund für eine aktive Toxoplasmose. Nach durchgemachter Infektion fällt der Titer über Jahre sehr langsam ab. Im Alter finden sich noch Resttiter bis 1:64.

Toxoplasmose-Komplementbindungsreaktion (KBR)

Der Toxoplasmose-KBR wird heute nur noch selten eingesetzt und ist eine ergänzende Untersuchung zum IFT. Komplementbindende Antikörper werden ca. 2 bis 4 Wochen post infectionem nachweisbar. Titer von 1:10 und höher sprechen in Zusammenhang mit dem klinischen Befund und einem IFT-Titer von 1:1000 für eine aktive Toxoplasmose. Die Titer fallen schneller als bei dem IFT ab. Die KBR ist weniger empfindlich als der IFT und bleibt nur während des akuten Infektionsstadiums reaktiv.

Toxoplasmose -ELISA

Sämtliche Antikörperklassen lassen sich separat mit dem ELISA detektieren. IgM-Antikörper sind ca. 1 Woche post infectionem nachweisbar und in der Regel nach 6 bis 24 Monaten nur noch in niedrigen Konzentrationen vorhanden (abhängig vom Testverfahren). Wegen der in Einzelfällen langen Persistenz ist ihr alleiniger Nachweis noch kein endgültiger Beweis für eine frische Infektion. Aus diesem Grund werden oft auch IgA-Antikörper bestimmt. Der Nachweis Toxoplasma-spezifischer IgM- und IgA-Antikörper ist ein geeignetes Untersuchungsverfahren bei der Diagnostik der konnatalen Toxoplasmose, weil diese Antikörperklassen nicht diaplazentar übertragen werden.

Toxoplasma gondii IgG-Aviditäts-EIA

In Fällen, bei denen mit den konventionellen Testverfahren der Infektionszeitpunkt nicht eindeutig bestimmt werden kann, wird die Untersuchung der IgG-Avidität empfohlen. Im frühen Stadium der Infektion werden IgG-Antikörper mit niedriger Antigenbindungsstärke (Avidität) gebildet. Bei länger bestehender Immunität sind IgG-Antikörper mit hoher Bindungsstärke vorhanden.

Die Diagnose einer frischen Infektion basiert auf der Kombination klinischer und serologischer Daten (z.B. signifikanter Anstieg des *T. gondii*-IgG-Antikörpertiters in vergleichenden Seren oder das Vorhandensein eines signifikanten Titers von *T. gondii*-IgM-Antikörpern).

1.5 Gegenwärtige Therapie

Serumpositive immunkompetente Erwachsene ohne Symptome werden in der Regel nicht behandelt. Auch die Lymphadenitis heilt bei immunkompetenten Patienten zumeist spontan aus.

Indikation zur Therapie sind eine Reaktivierung der Toxoplasmose beim immuninkompetenten Patienten, die Erstinfektion während der Schwangerschaft und die kongenitale Toxoplasmose.

Standardtherapie ist die orale Gabe von Pyrimethamin 100 mg am 1. Tag, danach 25 mg/d in Kombination mit Sulfadiazin 4mal 0,5-1 g/d und zusätzlich Folsäure 10 mg/d zur Vorbeugung einer Knochenmarksschädigung. Die Therapiedauer erstreckt sich über 2-6 Wochen. Bei Retinochorioiditis mit Erblindungsgefahr erfolgt zusätzlich die Gabe von Prednisolon 1-2 mg/kg pro Tag. Die Therapie wirkt nur auf proliferierende Toxoplasmen, nicht auf ruhende Pseudozysten im Gewebe und ist deshalb nur bei akuter Infektion erfolgreich.

Eine angeborene Toxoplasmose während der ersten 6–12 Lebensmonate muss behandelt werden. Die empfohlene Dosierung beträgt für Pyrimethamin 1 mg/kg pro Tag plus Sulfadiazin 50-100 mg/kg täglich oral und zusätzlich 2mal 3 mg Folsäure pro Woche.

Bei Verdacht auf Primärinfektion während der Schwangerschaft wird bis zur 16. Schwangerschaftswoche mit Spiramycin 9 Millionen I.E./d oral therapiert, womit eine fetale Infektion verhindert werden soll. Eine eindeutige Wirksamkeit auf den Parasiten ist jedoch nicht bewiesen. Die Therapie ist aber nebenwirkungsarm (Herold 1999). Nach der 16. Schwangerschaftswoche wird auf die Standardkombination aus Pyrimethamin, Sulfadiazin und Folsäure gewechselt.

In der Therapie der Toxoplasmose stehen mittlerweile noch einige andere Antibiotika wie Atovaquone und Clindamycin zur Verfügung, die jedoch keinen Platz als Standardtherapeutika erlangt haben.

Im folgenden sollen sowohl bereits die in der Therapie der Toxoplasmose verwendeten Antibiotika als auch neue noch in der Erprobung befindliche Antibiotika in Therapie und Wirkweise erklärt werden.

1.5.1 Pyrimethamin

Pyrimethamin (Handelsname Daraprim[®]) ist als synergistische Therapie in Kombination mit Sulfadiazin derzeit am wirkungsvollsten (Simon et Stille 1993). *Wirkungsweise:* Pyrimethamin, ein Diaminopyrimidin, inhibiert die Dihydrofolatreduktase, die im Folsäurestoffwechsel die Umwandlung von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat steuert. Das Enzym gibt es bei Ein- und Mehrzellern, wenn es auch wenig Homologie besitzt. Das Antibiotikum hat eine im Vergleich zur Dihydrofolatreduktase des Menschen mehr als tausendfach so hohe Affinität zum parasitären Enzym. Es wirkt auf die proliferativen Toxoplasmen (Tachyzoiten), nicht aber auf die Zysten (Bradyzoiten) im Gewebe (Simon et Stille 1993). Die *Nebenwirkungen* von Pyrimethamin äußern sich vor allem in einer Leukozytopenie, einer Thrombozytopenie oder einer Anämie. Bei Patienten mit zentralnervösen Störungen wurde ein Absinken der Krampfschwelle beobachtet.

1.5.2 Sulfadiazin

Wirkungsweise: Bei Sulfadiazin handelt es sich um ein chemisch synthetisiertes Analogon zu Paraaminobenzoessäure. Es blockiert das Enzym, welches unter Verwendung von Paraaminobenzoessäure die Bildung von Folsäure bewirkt (kompetitiver Antagonist der p-Aminobenzoessäure). Aufgrund eines meist vorhandenen Vorrates an Folsäure tritt die Wirkung stets verzögert ein (Simon et Stille 1993). Man nimmt an, dass Sulfadiazin im wesentlichen über eine Hemmung der Replikation und nicht über einen Parasiten-abtötenden Effekt wirkt (Derouin et Chastang 1989). Die *Nebenwirkungen* bestehen ähnlich wie bei Pyrimethamin im wesentlichen in Blutbildungsstörungen (Agranulozytose), Nierenschädigungen durch Ausfällen von Kristallen in den Nierentubuli sowie eine Hyperbilirubinämie bei Früh- und Neugeborenen. Nach einer durchgeführten Dauertherapie resultiert zumeist eine Hypersensibilität auf das Medikament.

1.5.3 Spiramycin

Wirkungsweise: Es handelt sich bei Spiramycin (Handelsname Selectomycin®) um ein Makrolidantibiotikum mit einem 17gliedrigen Laktoring. Es führt zur Hemmung der ribosomalen parasitären Proteinsynthese und wirkt in hohen therapeutischen Spiegeln replikationshemmend. Spiramycin weist eine gute Gewebegängigkeit auf und lässt sich nach oraler Einnahme auch in hoher Konzentration in der Plazenta nachweisen. Daher wird es als initiale Therapie bei der Behandlung von Schwangeren mit Primärinfektion in den ersten Schwangerschaftsmonaten eingesetzt (Schoondermark-Van de Ven et al. 1994). Spiramycin verhindert wahrscheinlich eine diaplazentare Passage des Parasiten. Die *Nebenwirkungen* sind gelegentlich auftretende Magen-Darm-Störungen wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall (Simon et Stille 1993).

1.5.4 Clindamycin

Wirkungsweise: Es handelt sich bei Clindamycin um ein Lincosamid, das bei Bakterien durch Bindung an die 50 S-Ribosomeneinheit wirkt und durch die Bindung eine Hemmung der ribosomalen bakteriellen Proteinsynthese bewirkt (Beckers et al. 1995, Djurkovic-Djakovic et al. 1999) (bakteriostatische Wirkung). Es zeigt sich hingegen kein Effekt auf die RNA-Synthese von Tachyzoiten (Blais et al. 1993). Blais et al. oder auch Fichera et al. (1995) zeigten weiter, dass die Fähigkeit von Tachyzoiten zur Zellinvasion/-infektion durch Clindamycin behindert wird. Typische *Nebenwirkungen* können Allergien, ein Transaminasenanstieg oder eine sekundär induzierte pseudomembranöse Colitis sein.

Schon in früheren Arbeiten wurde die Beobachtung gemacht, dass das Antibiotikum erst nach Inkubation der Toxoplasmen über längere Zeit bzw. mehrere Entwicklungszyklen unter Einwirkung des Antibiotikums seine Wirkung zeigt (Derouin et al. 1988). Aufgrund seiner guten Fettlöslichkeit und

Penetrationsverhaltens durch das Auge ist es das Mittel der Wahl (Tabbara et O'Connor 1980) zur Behandlung der Retinochorioiditis (okuläre Toxoplasmose).

1.5.5 Atovaquone

Wirkungsweise: Bei Atovaquone handelt es sich um ein Hydroxynaphtochinon-Derivat mit Aktivität gegen Pneumocystis, Plasmodien und Toxoplasmen. Es wirkt über den mitochondrialen bc₁-Komplex der Parasiten, in dem Elektronen von Ubiquinon zu Cytochrom C transferiert werden (Haile et al. 1993). Pfefferkorn et al. zeigten an Toxoplasmastämmen, die eine Resistenz gegen Atovaquone aufwiesen, dass die „de novo“-Pyrimidinsynthese nicht den Hauptansatzpunkt des Antibiotikums darstellt (Pfefferkorn et al. 1993). Atovaquone wirkt parasitenabtötend sowohl gegen Tachyzoiten als auch gegen Bradyzoiten, obwohl es nicht in der Lage ist, den Parasiten ganz aus dem befallenen Individuum zu eliminieren (Ferguson et al. 1994).

Zu den *Nebenwirkungen* gibt es bisher nur wenig Daten, da das Antibiotikum aktuell nur in Studien bei HIV-Patienten gegen Toxoplasmose und Pneumocystis zur Anwendung kommt. Es zeigt sich jedoch trotz möglicher Allergien, Transaminasenanstieg oder einer Thrombozytopenie (Kovacs et al. 1992) eine insgesamt gute Verträglichkeit bei AIDS-Patienten (Simon et Stille 1993).

2. Ziel der Arbeit

Bei der bekannten hohen Durchseuchungsrate in der Bevölkerung und mit Zunahme der Häufigkeit immunsuppressiver Erkrankungen wie AIDS oder Karzinomerkrankungen sowie bei induzierter Immunsuppression bei Patienten mit Organtransplantation (wie z.B. auch bei Knochenmarkstransplantation, s. de Medeiros et al. 2001) besteht ausreichend Anlass, eine Therapie zu entwickeln, die zur Eliminierung der Toxoplasmen aus dem infizierten Individuum führt. Die vollständige Eliminierung der Parasiten bei Erstinfektion oder Reinfektion könnte eine gefürchtete Reaktivierung bei Immunsuppression verhindern.

Grundlage für die Entwicklung einer derartigen Therapie wäre ein einfaches Zellkulturmodell, in dem sich neue Chemotherapeutika in-vitro auf ihre Wirksamkeit hinsichtlich Verhinderung der Stadienkonversion bzw. der Inhibierung der Parasitenreplikation (somit also der Verhinderung der Erregerpersistenz) und parasitenabtötenden Wirkung vortesten lassen. Es soll daher in dieser Arbeit ein in-vitro Screening-System für Chemotherapeutika zur Therapie der Toxoplasmose etabliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden neben den schon in der Therapie eingesetzten Antibiotika Pyrimethamin, Sulfadiazin, Clindamycin und Spiramycin das neu entwickelte Antibiotikum Atovaquone verwendet.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Reagenzien

Ampuwa, H ₂ O	Fresenius AG, Bad Homburg
Atovaquone	Glaxo Wellcome
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Click`s RPMI	Biochrom, Berlin
Clindamycin	Upjohn-Welcome
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Glutamin L	Gibco BRL, Eggenstein
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Mowiol-Eindeckmedium	Calbiochem, Bad Soden
Natrium-Azid	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin (Medien)	Biochrom, Berlin
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin
Pyrimethamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
(5,6- ³ H)-Uracil (1mCi/ml)	NEN, Dupont (Bad Homburg)
Spiramycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sulfadiazin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Brutschränke	Heraeus, Osterode
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einwegspritzen (1,2,5,10,20 ml)	Braun, Melsungen
Fluoreszenzmikroskop	Leitz, Wetzlar
Kanülen	Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	Greiner, Nürtingen
Lichtmikroskop	Leica, Wetzlar
Multilochplatten	Costar, Cambridge, MA, USA
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Objektträger	Hartenstein, Würzburg
Petrischalen	Nunc, Wiesbaden
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Plastikpipetten (1,2,5,10 ml)	Greiner, Nürtingen
Reaktionsgefäße (0.5, 1.5, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Skalpelle	Bayha, Tuttlingen
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Hannover
Vortexgerät	Hartenstein, Würzburg
Zentrifugenröhrchen	Greiner, Nürtingen
Zentrifugen	Heraeus, Osterode
Szintillationszähler (Beta-Platte)	Wallac Pharmacia

3.1.3 Lösungen, Puffer und Nährmedien

Click's RPMI 1%	Click's RPMI supplementiert mit: 1% FCS 5% Glutamin L 5% Penicillin-Streptomycin
Click's RPMI 5%	Click's RPMI supplementiert mit: 5% FCS 5% Glutamin L 5% Penicillin-Streptomycin
Einfriermedium für L929-Zellen	FCS mit 1% DMSO
FCS (für Nährmedien)	Hitzeinaktivierung für 30 min/56 °C
Waschmedium	PBS 10-fach NaCl 80,0 g KCl 2,0 g Na ₂ HPO ₄ 14,7 g KH ₂ PO ₄ 2,0 g NaN ₃ 2,0 g pH auf 7,1 bis 7,5 einstellen ad 1000 ml H ₂ O bidest
Waschmedium für KMM-Isolierung	Click's RPMI supplementiert mit 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 1% Glutamin 1% Hapes

Nährmedium für Knochenmarksmakrophagen	Click's RPMI supplementiert mit 10% FCS 1% Glutamin 0.5% 2-Mercaptoethanol 20% L929-Überstand
L929-Überstand	aus Zellkultur von L929-Zellen nach jeweils 3 Tagen abgenommen, sterilfiltrieren und bei - 20 °C wegfrieren. Bei 4 °C auftauen.
PBS/BSA	PBS mit 0.1% BSA
FITC	Verdünnung 1 : 100 in PBS +1% BSA + 0.02% NaAc
TRITC	Verdünnung 1 : 200 in PBS +1% BSA + 0.02% NaAc
pAk antiToxoplasma Serum	Verdünnung 1 : 1000 in PBS +1% BSA + 0.02% NaAc
Ak 7E5 (mIgG1)	Verdünnung 1 : 100 in PBS +1% BSA + 0.02% NaAc

Stammlösungen Antibiotika

Pyrimethamin	gelöst in Methanol / Aceton 1 : 1 in Konzentration 1 mg / ml
Sulfadiazin	gelöst in Methanol / Aceton 1 : 1 in Konzentration 1 mg / ml
Atovaquone	gelöst in Ethanol in Konzentration 1 mg / ml
Clindamycin	gelöst in H ₂ O in Konzentration 50 mg / ml
Spiramycin	gelöst in Ethanol in Konzentration 50 mg / ml

3.1.4 Antikörper

Folgende Antikörper wurden im Immunfluoreszenztest gegen *T. gondii* eingesetzt:

Ak	Spezifität	Referenz/Quelle
4F8 (mIgG1)	BAG1	(Bohne et al. 1993)
6A8 (mIg)	SAG1-Ag	(L. H. Kaspar, Dartmouth, USA)
polyklonales anti-Toxoplasma serum	<i>T. gondii</i>	eigene Herstellung aus dem Kaninchen
TRITC - konjugiert	Goat-anti-mouse IgG-Fab spezifisch	Dianova, Hamburg
FITC - konjugiert	Goat-anti-mouse IgG-Fab spezifisch	Dianova, Hamburg

Tab. 1: verwendete Antikörper mit Spezifität und Quelle

3.1.5 Versuchstiere

Es wurden pathogenfreie Inzuchtstämme aus folgender Quelle verwendet:

Balb/c-Mäuse	Zentralinstitut für Versuchstierforschung, Hannover
--------------	--

3.1.6 Parasiten (*T. gondii*)

RH	Mensch, konnatal, USA
NTE	Mensch, AIDS, (Groß et al. 1991)
C56	Tier, USA

3.1.7 Zellen

L929 murine Fibroblasten	ATCC: CCL-1
Knochenmarksmakrophagen (Femur)	Balb/c-Maus

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturtechniken

3.2.1.1 Kultivierung von Parasiten

Da *Toxoplasma gondii* in drei klonalen Linien (Parmly et al. 1994) vorkommt, wurden die diese drei Linien repräsentierenden Stämme RH, NTE und C56 für die Versuche verwendet. Bei allen Stämmen wurden die Tachyzoiten in L929-Fibroblasten vermehrt. In auf- bzw. absteigendem Verhältnis wurden Wirtszellen und Parasiten in 12-Loch-Platten ausgesät und bis kurz vor Erreichen der vollständigen Ruptur der Zellen in Kultur gehalten. Dann erfolgte die Umsetzung der Tachyzoiten in neue L929-Fibroblasten. Als Nährmedium kam Click's RPMI 1% zur Anwendung. Mediumwechsel erfolgte, sobald eine Ansäuerung des Mediums (pH-Indikator) angezeigt wurde.

3.2.1.2 Kultivierung von L929-Zellen

Murine L929-Fibroblasten wurden in 6-Loch-Platten in Kultur gehalten. Ein Mediumwechsel mit Click's RPMI 5% erfolgte zweimal pro Woche. Bei Konfluenz des Zellmonolayers erfolgte das Umsetzen in sechsfacher Verdünnung auf eine neue Platte. Das Ablösen der Zellen vom Plattenboden erfolgte mit einem Zellschaber.

3.2.1.3 Einfrieren der Parasitenstammlinien

Zum Erhalt der Parasitenlinien wurden infizierte Zellen mittels Wegfrieren bei -80°C konserviert. Nach Zentrifugation bei 1360 U/min für fünf Minuten und anschließender Aufnahme in Einfriermedium (Konzentration von $5-10 \times 10^6$ Zellen / ml) erfolgte die Archivierung in Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff.

Über ein Eisbad und anschließender Umsetzung in eine Gefriertruhe wurden die Zellen dabei innerhalb von zwei Tagen langsam bis auf -80°C abgekühlt, bevor sie zur endgültigen Lagerung in den Stickstoffbehälter überführt wurden.

3.2.1.4 Auftauen der Parasitenstammlinien

Die Kryoröhrchen mit den Zellen wurden aus dem Stickstoff entnommen und bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Nach Überführen in ein 10 ml-Röhrchen wurde 9 ml kaltes Nährmedium unter stetem Schütteln tropfenweise hinzupipettiert. Die Zellen wurden dann bei 1360 U/min für 5 Minuten abzentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen.

3.2.2 Isolierung von Knochenmarksmakrophagen

Eine vier bis sechs Wochen alte Balb/c-Maus wurde mittels cervicaler Dislokation oder Kohlenmonoxidinhalation getötet. Im Anschluss erfolgte die Fixation der Maus (Kanülen) auf einem Styroporbrett, das zuvor mit sterilen Tüchern ausgelegt wurde. Corpus und Umgebung wurden mit 80%igem Alkohol abgesprüht. Das Fell wurde entlang der Hinterläufe mit einer Pinzette angehoben, aufgeschnitten und entfernt. Der Muskelmantel des Oberschenkels wurde an den Ansätzen ober- und unterhalb des Femur sorgfältig mit dem Skalpell abgetrennt. Nachdem der Femur vollständig vom Muskelmantel befreit war, wurde der Knochen kurz vor dem Ansatz des Hüftgelenks und des Kniegelenks mit einer Schere durchtrennt und in einer Petrischale auf Eis gelegt. In gleicher Weise wurde mit dem Hinterlauf der Gegenseite verfahren. Unter dem Flow wurde das Knochenmark mit einer Spritze mit Kanüle (Durchmesser $0.45 \times 10\text{mm}$) und Waschmedium aus den Femura in eine zweite Petrischale herausgespült. Das Knochenmark zeigte sich als roter Tropfen. Mehrmalig wurde die Knochenmarkshöhle durchspritzt. Das Knochenmark wurde im Anschluss in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und die Petrischale

mit 5 ml Waschmedium gespült. Der Röhreninhalt wurde so oft resuspendiert, bis keine Zellklumpen mehr zu sehen waren. Anschließend wurde das Röhren fünf Minuten stehen gelassen, damit sich Fett-, Muskel- und Knochengewebe absetzen konnten. Der Überstand wurde mit einer 10 ml-Pipette vorsichtig abgenommen und in ein neues 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde bei 1360 U/min für 5 Minuten bei 20°C abzentrifugiert. Nach Abnahme und Verwurf des Überstandes wurde das verbliebene Pellet in 10 ml Kultivierungsmedium, beginnend mit 0,5 ml Medium, resuspendiert.

10 µl der Resuspension wurden mit einer Pipette entnommen und mit einer Zählkammer nach Neubauer die Zellzahl pro Milliliter errechnet. Je nach Zellzahl erfolgte die Verdünnung der Zellen und das Aussetzen der Knochenmarksmakrophagen in einer Konzentration von 2×10^5 pro Loch und einem Milliliter Kultivierungsmedium in 24-Loch-Platten.

3.2.3 Infektion der Knochenmarksmakrophagen

Die verwendeten 24-Loch-Platten wurden pro Vertiefung mit einem 13 mm Glasplättchen ergänzt. Die Platten wurden dann mit 2×10^5 Knochenmarksmakrophagen pro Loch aus der vier bis sechs Wochen alten Maus (Balb/c-Stamm) beimpft. Am Tag 3 erfolgte ein 50%iger Mediumwechsel, am Tag 6 ein vollständiger Mediumwechsel. Das Kultivierungsmedium für die Knochenmarksmakrophagen war so zusammengesetzt, dass es die notwendigen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren enthielt, damit die Vorläuferzellen die Differenzierung zu den Knochenmarksmakrophagen vollziehen konnten. Nach sieben Tagen waren die Vorläuferzellen konfluent gewachsen und die Differenzierung zum Knochenmarksmakrophagen abgeschlossen.

Die Knochenmarksmakrophagen wurden nun pro Loch mit je 10^5 frisch geernteten Toxoplasmen (Stamm RH, NTE, C56) infiziert. Die Kontrollzelle ohne Antibiotika wurde nur mit 10^4 frisch geernteten Toxoplasmen pro Loch

infiziert, um eine vorzeitige Zellruptur zu vermeiden. Das Medium wurde mit den zu testenden Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen versetzt. Am Tag 3 post infectionem erfolgte ein Mediumwechsel (mit jeweiligem Antibiotikum). An den folgenden fünf Tagen wurde jeden Tag ein Glasplättchen herausgenommen, fünf Minuten mit Methanol fixiert und nach dem Trocknen unter dem Flow bei -20°C weggefroren. Die Glasplättchen wurden bis zur weiteren Analyse in einer 24-Loch-Platte gesammelt und aufbewahrt (ein Glasplättchen pro Loch).

3.2.4 Antibiotikabehandlung

Die verwendeten Antibiotika wurden in Form von Stammlösungen aufbewahrt und in der in der Literatur verwendeten Konzentration mit dem Kultivierungsmedium (Click's + 20% L929-Überstand) versetzt. Die Konzentrationen der Antibiotika waren so gewählt, dass der Konzentrationsbereich bis zur maximalen Stadieninduktion von *T. gondii* reichte.

Im einzelnen wurden folgende Konzentrationen verwendet:

Einzelversuche:

Pyrimethamin	Konzentrationen: 0.08, 0.06, 0.04, 0.02, 0.01 µg/ml
Sulfadiazin	Konzentrationen: 1, 0.2, 0.05, 0.01 µg/ml
Atovaquone	Konzentrationen: 0.2, 0.1, 0.08, 0.05, 0.02 µg/ml
Clindamycin	Konzentrationen: 10, 1, 0.1, 0.02 µg/ml
Spiramycin	Konzentrationen: 40, 30, 22, 20 18, 10, 1 µg/ml

Bei Clindamycin wurde mit den oben angegebenen Konzentrationen direkt die Stadienkonversion von *T. gondii* induziert. In einem zweiten Versuch wurden die zur Infektion verwendeten Toxoplasmen zunächst für einen

Replikationsschritt in Clindamycinhaltigen Medium (Konzentration 1 µg/ml) gehalten, bevor Clindamycin in den oben genannten Konzentrationen direkt zur Stadiendifferenzierung des Parasiten eingesetzt wurde.

Kombinationsversuche:

Pyrimethamin + Sulfadiazin	Konzentrationen: 0.06+0.2, 0.04+0.05, 0.02+0.02, 0.01+0.01 µg/ml
Pyrimethamin + Atovaquone	Konzentrationen: 0.08+0.2, 0.06+0.1, 0.04+0.08, 0.02+ 0.05, 0.01+0.02 µg/ml

3.2.5 Immunfluoreszenztest

3.2.5.1 Grundlagen

Antigene sind mittels Immunfluoreszenz optisch nachweisbar. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Kopplung fluoreszierender Verbindungen an Antikörper, wobei die Antikörperaktivität nicht gestört wird. Als fluoreszierende Marker werden Stoffe wie Fluoreszein und Rhodamin B verwendet. Im folgenden Versuch handelt es sich um die indirekte Immunfluoreszenz. Dabei lagern sich die konjugierten anti-Maus IgG Antikörper an den zuvor an das Antigen gebundenen Primärantikörper (hier z.B. monoklonaler Ak 4F8) an. Anschließend können die Ag-Ak-Reaktionen dann unter dem Immunfluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden (Schäffler und Altekörper 1990).

3.2.5.2 Durchführung

Nach Beendigung der Antibiotikabehandlung wurden die infizierten Zellen fünf Minuten mit Methanol auf den Glasplättchen fixiert und in 24-Loch-Platten gelagert, in denen später die Immunfärbung durchgeführt wurde. Die Platten wurden während der Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zwischen den im folgenden beschriebenen Inkubationsschritten erfolgten jeweils drei Waschgänge mit PBS. Bei den Inkubationsschritten wurden jeweils 200 µl Lösung verwendet (Konzentrationen siehe Kap. 3.1.4). Die Antikörperlösungen wurden mehrfach verwendet. Zur Vermeidung von Kontamination mit Pilzen und Bakterien wurde den Antikörperlösungen 0.1% BSA und 0.02% NaAzid hinzugefügt, die Aufbewahrung erfolgte bei 4 °C.

Zunächst wurden für 60 Minuten mit Hilfe von PBS+1% BSA freie Bindungsstellen blockiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Für 40 Minuten erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper 4F8, der als bradyzoitenspezifischer Antikörper jene Parasiten der Gesamtpopulation markiert, die bradyzoitenspezifische Antigene exprimieren. In einem nächsten Inkubationsschritt erfolgte nun für 40 Minuten die Markierung des Mak mit Fluoreszein-markierten anti-Maus IgG-Antikörpern. Mittels des polyklonalen Anti-Toxoplasma-Antiserum (pAk) erfolgte anschließend für 40 Minuten die Markierung der Gesamtpopulation der Toxoplasmen.

In einem letzten Schritt wurden für 40 Minuten die pAk mit Rhodamin-markiertem anti-Maus IgG markiert.

Die Glasplättchen wurden aus den Löchern entnommen und zum Trocknen mit der Unterseite auf Zellstoff abgelegt. Nach dem Trocknen wurden die Glasplättchen mit Fluoprep betropft und umgekehrt auf einen Objektträger fixiert.

3.2.5.3 Auswertung unter dem Immunfluoreszenzmikroskop

Zur Auswertung kam bei allen Versuchen der Tag 4 post infectionem. Unter dem Immunfluoreszenzmikroskop (Vergrößerung 50/1000 Öl) wurden für jeden Konzentrationsansatz der Antibiotika 200 infizierte Zellen ausgezählt und durch Filterwechsel der relative Anteil an MAk 4F8-reaktiven parasitophoren Vakuolen (PV) bestimmt. Durch Auszählung der Parasitenanzahl pro parasitophorer Vakuole wurde semiquantitativ die Replikationsrate der Toxoplasmen bestimmt.

Auswertebogen:

Konz. in µg/ml des Antibiotikums	% Mak 4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
-------------------------------------	--------------------------	---

3.2.3 ^3H -Uracil-Einbau: Bestimmung der Replikationsrate von *T. gondii*

3.2.3.1 Grundlagen

Knochenmarksmakrophagen benötigen kein Uracil für ihren Nucleinsäurestoffwechsel. *T. gondii* hingegen ist auf Uracil für seinen Nucleinsäurestoffwechsel angewiesen und nimmt daher radioaktiv markiertes Uracil auf. Die Menge an eingelagertem Uracil korreliert dabei linear mit der Replikationsrate des Parasiten. Somit kann mittels spezifischer Markierung durch den Einbau von ^3H -Uracil direkt die Replikationsrate von *T. gondii* gemessen werden (Pfefferkorn et al. 1977).

3.2.3.2 Durchführung

Knochenmarksmakrophagen der Balb/c-Maus wurden in einer Konzentration von 2×10^4 Zellen pro Loch in 96er- Mikrotiterplatten mit flachem Boden ausgesät. Am Tag 3 erfolgte ein 50%iger Mediumwechsel, am Tag 6 ein vollständiger Mediumwechsel.

Am Tag 7 erfolgte die Infektion der Wirtszellen mit frisch geernteten Tachyzoiten des *T. gondii*-Stammes NTE. Dabei wurden vier linear unterschiedliche Konzentrationen von *T. gondii* eingesetzt, um eine interne Standardisierung zu gewährleisten.

- A. 1×10^5 Toxoplasmen pro Loch
- B. $3,3 \times 10^4$ Toxoplasmen pro Loch
- C. $1,1 \times 10^4$ Toxoplasmen pro Loch
- D. $0,37 \times 10^4$ Toxoplasmen pro Loch

Für den Einbau von ^3H -Uracil erfolgte die Inkubation der infizierten Zellen mit 4 $\mu\text{Ci/ml}$ für 24 h. Jeder Ansatz wurde über drei Zeitintervalle markiert:

(T₁) 0-24 h p.i.

(T₂) 24-48 h p.i.

(T₃) 48-72 h p.i.

Im Anschluss wurden die Proben bis zur Auswertung eingefroren.

3.2.3.3 Auswertung

Nach dem Auftauen wurden die Proben auf Filterpapier aufgetragen, nach dem Trocknen mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und in Folie eingeschweißt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Szintillationszählers (Beta-Plate).

Letztlich wurden für die Bestimmung der Replikationsraten nur jene Proben verwendet, die sich in den aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen (s.o.) um den Faktor drei in der ^3H -Uracil Einbaurate unterschieden. Da in einer stark infizierten Zellkultur keine optimalen Replikationsbedingungen für die Parasiten vorliegen, konnten durch dieses Vorgehen Sättigungseffekte im ^3H -Uracil-Einbau ausgeschlossen werden.

4. Ergebnisse

4.1 Antibiotikabehandlung

4.1.1 Stamm NTE

4.1.1.1 Spontanexpression bradyzoitenspezifischer Antigene

Bei allen Induktionsversuchen wurde als Kontrolle die Spontanexpression bradyzoitenspezifischer Antigene in einer Tachyzoitenpopulation vom jeweiligen Stamm im gleichen Zeitintervall (also an den Tagen 4 bis 8 post infectionem) ausgezählt. Zur Auswertung kam bei jeweils drei Versuchen Tag 4 post infectionem. Bradyzoiten sind definiert als SAG1-negativ und 4F8-positiv,

	% MAk 4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen / PV
Spontanexpression Stamm NTE	<4%	4-35

Tab. 2: Stamm NTE: Spontanexpression

Zwischenstadien und reine Tachyzoiten zeigen den Phänotyp SAG1- und/oder 4F8-positiv. Bei dem Stamm NTE besaßen weniger als 1% den Phänotyp SAG1- und/oder 4F8-positiv. Der Anteil reiner Bradyzoiten betrug also maximal 1%.

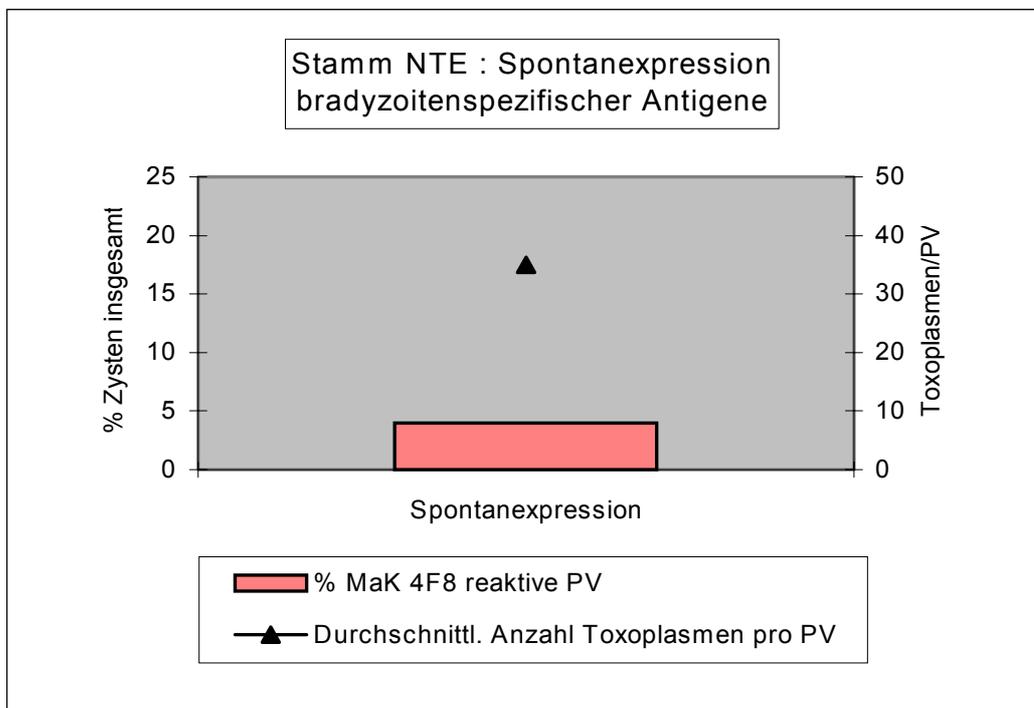


Abb. 2: Stamm NTE: Spontanexpression bradyzoitenspezifische Antigene

4.1.1.2 Stadieninduktion mit Pyrimethamin

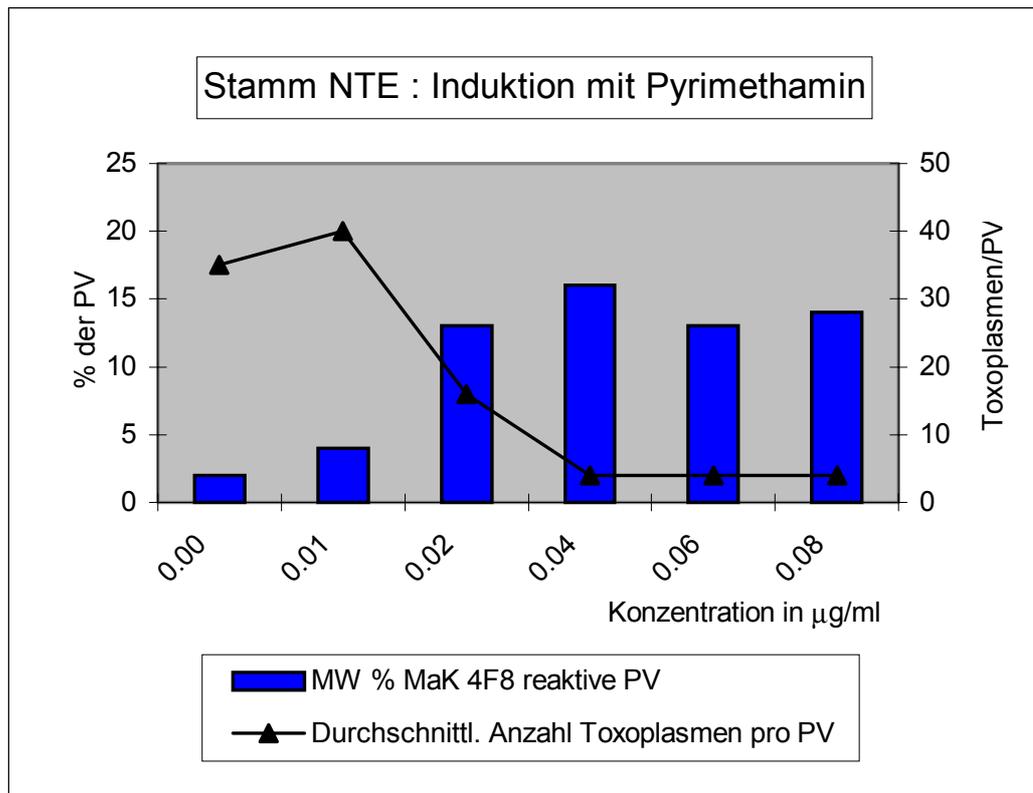


Abb. 3: Stamm NTE: Pyrimethamin

Konzentration in µg/ml	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
0,08	14%	1-4
0,06	13%	1-4
0,04	16%	1-4
0,02	12%	4-16
0,01	4%	4-40
0,00	< 4%	4-35

Tab. 3: Stamm NTE: Pyrimethamin

Zur Auswertung kam Tag 4 post infectionem. Der Versuch wurde dreimal wiederholt. Pyrimethamin wurde in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Dabei ergab sich eine maximale Induktion der Stadienkonversion bei einer Pyrimethaminkonzentration von 0,04 µg/ml. Gleichzeitig war hier die Replikation des Parasiten maximal inhibiert. Eine weitere Konzentrationssteigerung des Antibiotikums zeigte keine gesteigerte Induktion der Stadienkonversion. Eine vollständige Eradikation des Erregers war nicht zu beobachten.

4.1.1.3 Stadieninduktion mit Sulfadiazin

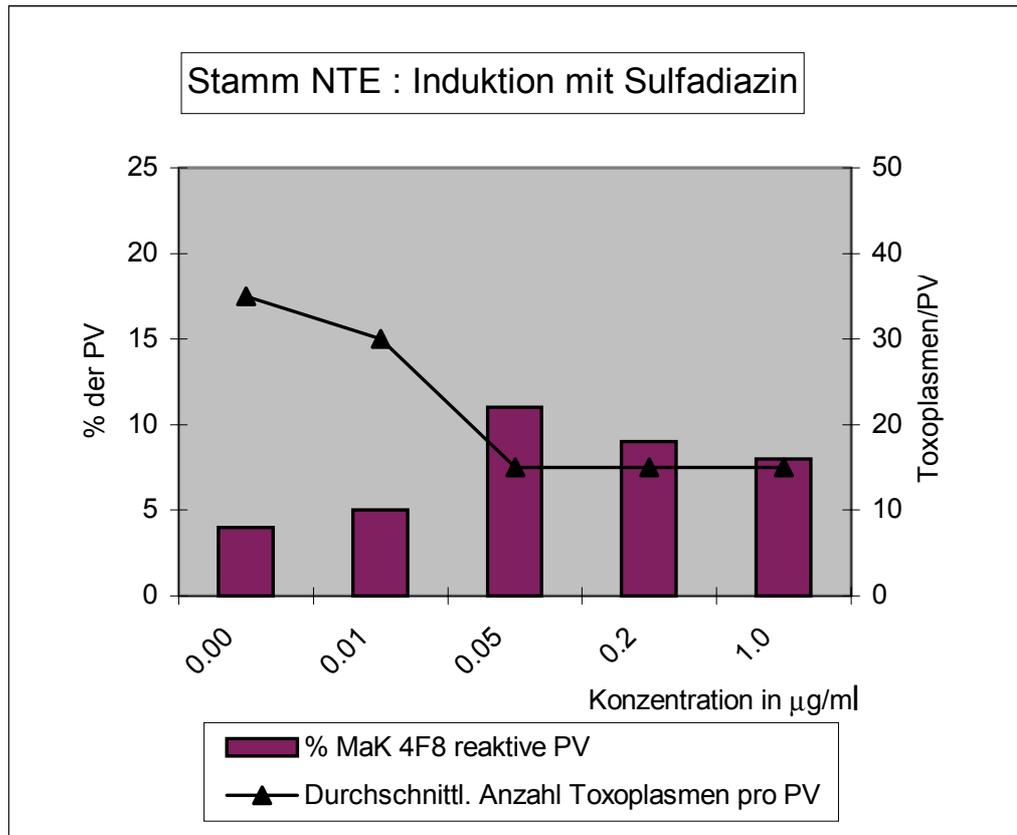


Abb. 4: Stamm NTE: Sulfadiazin

Konzentration in $\mu\text{g/ml}$	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
1	8%	4-15
0,2	9%	4-15
0,05	11%	4-15
0,01	< 5%	4-30
0,00	< 4%	4-35

Tab. 4: Stamm NTE: Sulfadiazin

Im Vergleich mit den zuvor gezeigten Ergebnissen von Pyrimethamin betrug die durchschnittliche Anzahl von Toxoplasmen pro PV bei dem Einsatz von Sulfadiazin 4-15 Toxoplasmen pro PV. Die Hemmung der Replikation durch Sulfadiazin war im Vergleich mit Pyrimethamin somit geringer. Es ergab sich eine maximale Induktion der Stadienkonversion bei einer Sulfadiazinkonzentration von 0,05 $\mu\text{g/ml}$. Es ließ sich keine vollständige Eradikation des Erregers erzielen.

4.1.1.4 Stadieninduktion mit Spiramycin

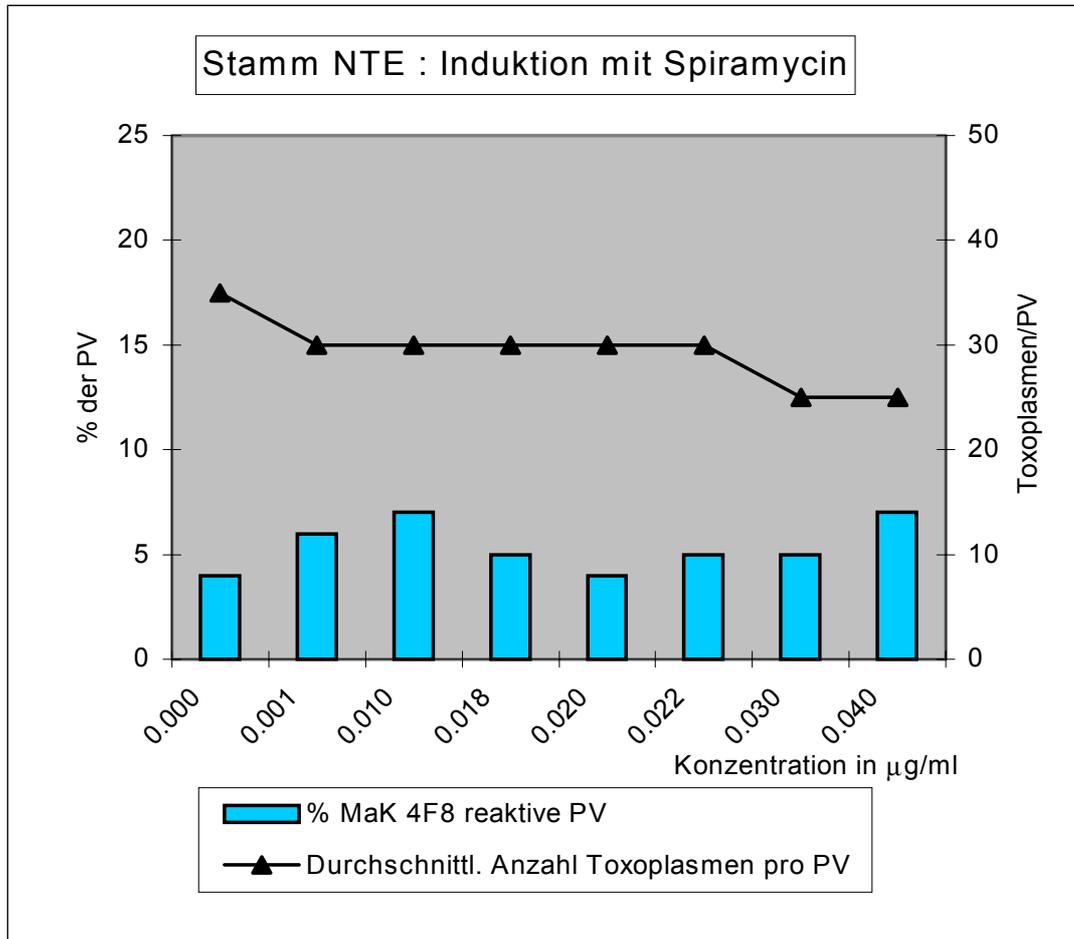


Abb. 5: Stamm NTE: Spiramycin

Konzentration in µg/ml	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
40	7%	4-25
30	5%	4-25
22	5%	4-30
20	4%	4-30
18	5%	4-30
10	7%	4-30
1	6%	4-30
0	< 4%	4-35

Tab. 5: Stamm NTE: Spiramycin

Im Vergleich zu z.B. Pyrimethamin ließ sich trotz Steigerung der Konzentration von Spiramycin bis auf 40 µg/ml kaum ein Effekt auf die Stadienkonversion und Replikationsrate des Parasiten zeigen. Bei einer Konzentration von 40 µg/ml betrug die durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV 4-25 Toxoplasmen/PV bei nur 7% MaK 4F8-reaktiven PV.

4.1.1.5 Stadieninduktion mit Clindamycin

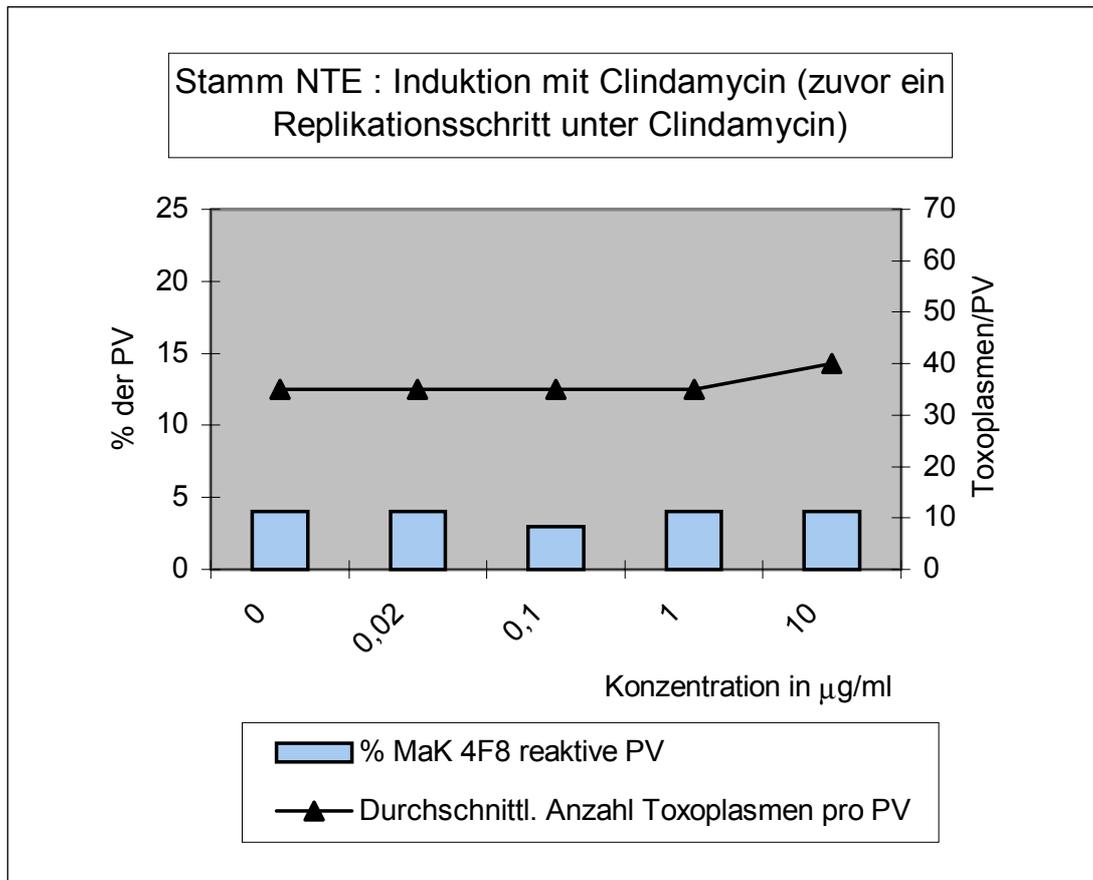


Abb. 6: Stamm NTE: Clindamycin

Konzentration in µg/ml	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
10	4%	1-40
1	4%	1-35
0,1	3%	1-35
0,02	4%	1-35
0	< 4%	1-32

Tab: 5: Stamm NTE: Clindamycin

Die zur Infektion verwendeten Toxoplasmen wurden vor Infektion für einen Replikationsschritt unter Clindamycin geführt, wie von Fichera et Roos (1995) vorgegeben. Diese Autoren hatten bei in-vitro Versuchen bei Führen der Parasiten unter Clindamycin länger als 25 Stunden einen parasiziden Effekt beobachtet. Dieser Effekt konnte trotz fünfmaliger Wiederholung des Versuchs nicht beobachtet werden. Es zeigte sich kein Effekt des Chemotherapeutikums auf Stadienkonversion und Replikation des Parasiten.

4.1.1.6 Stadieninduktion mit Atovaquone

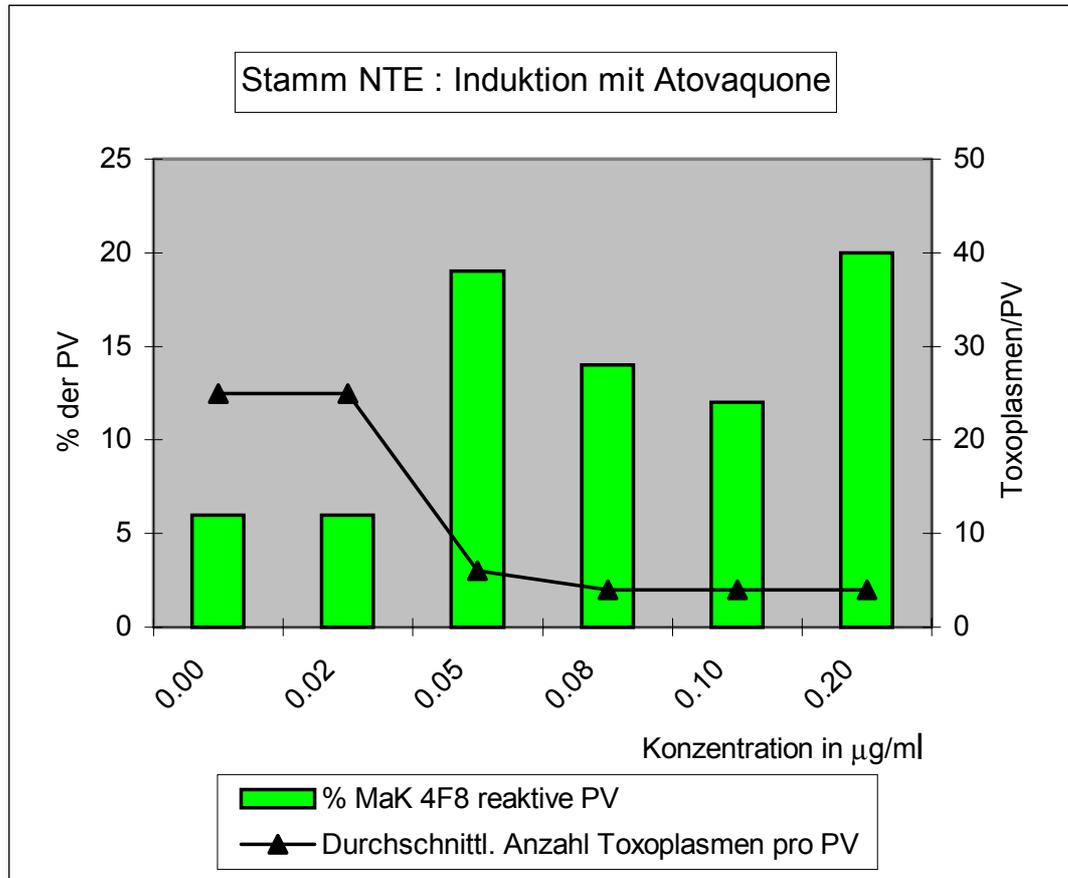


Abb. 7: Stamm NTE: Atovaquone

Konzentration in µg/ml	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
0,2	20%	1-4
0,1	12%	1-4
0,08	14%	1-4
0,05	19%	1-6
0,02	< 6%	4-25
0,00	< 6%	4-25

Tab. 6: Stamm NTE: Atovaquone

Bei Einsatz von Atovaquone ergab sich eine maximale Induktion der Stadienkonversion und Hemmung der Replikation bei einer Konzentration von 0,2 µg/ml. Im Vergleich zu Pyrimethamin und Spiramycin zeigte sich eine etwas stärkere Induktion der Stadienkonversion. Während bei allen anderen Antibiotika jedoch stets 200 Zysten ausgezählt wurden, waren bei Atovaquone nur maximal 250 Zysten auswertbar, d.h. bei Verwendung von Atovaquone war eine deutliche und auffällige Reduktion der Zysten zu beobachten.

4.1.1.7 Stadieninduktion mit Pyrimethamin + Sulfadiazin in Komb.

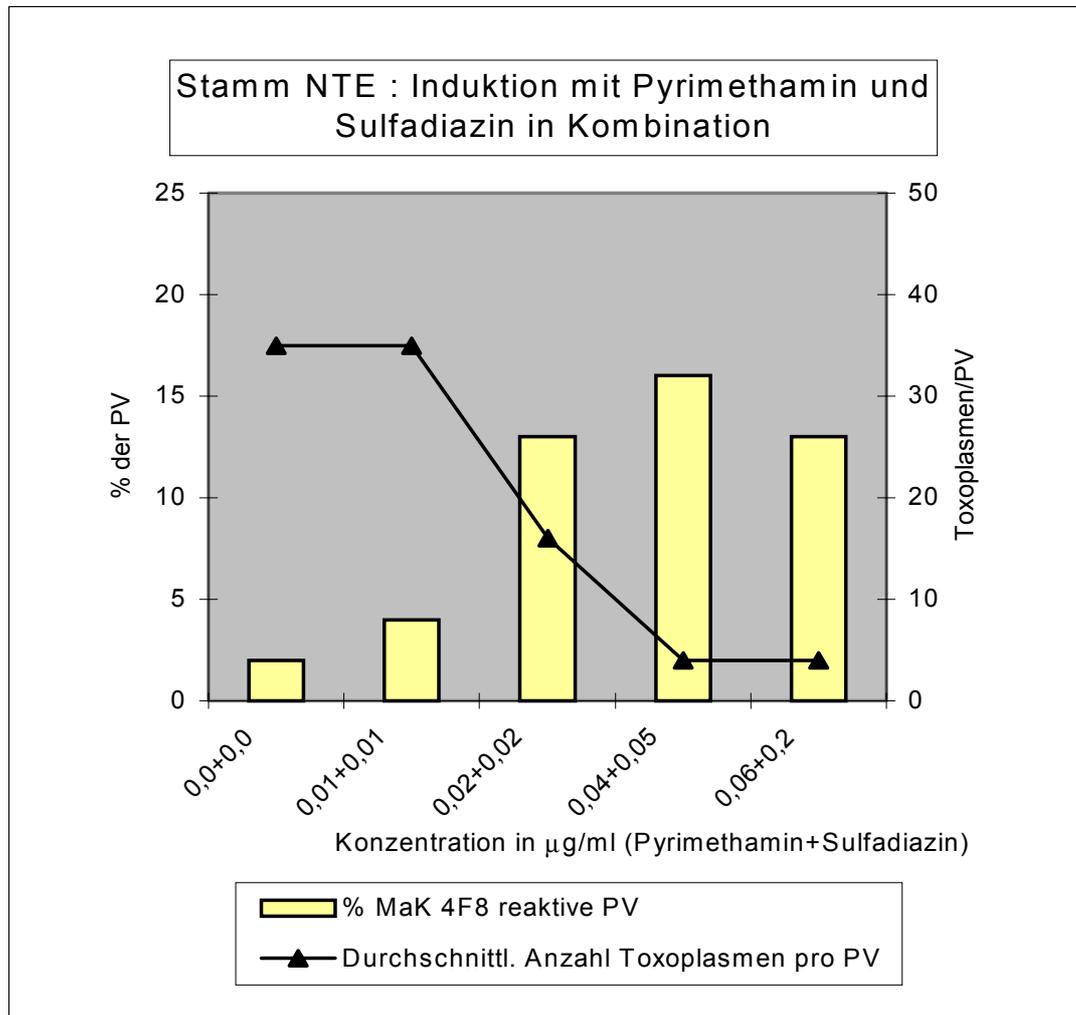


Abb. 8: Stamm NTE: Pyrimethamin und Sulfadiazin in Kombination

Konzentration in µg/ml Pyrimethamin + Sulfadiazin	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
0,06 + 0,2	14%	1-4
0,04 + 0,05	15%	1-4
0,02 + 0,02	13%	4-16
0,01 + 0,01	4%	4-35
0,0 + 0,0	< 4%	4-35

Tab. 7: Stamm NTE: Pyrimethamin und Sulfadiazin in Kombination

Die verwendete Kombination entspricht der Standardtherapie des Menschen. Die max. Induktion der Stadienkonversion und Replikation zeigte sich bei einer Konzentration von 0,04 µg/ml Pyrimethamin mit 0,05 µg/ml Sulfadiazin. Damit ergab sich im Vgl. zur alleinigen Gabe von Pyrimethamin kein synergistischer Effekt, im Vgl. zur alleinigen Gabe von Sulfadiazin konnte durch zusätzliche Pyrimethamingabe der Effekt jedoch verstärkt werden (s. 4.1.1.3).

4.1.1.8 Stadieninduktion mit Pyrimethamin + Atovaquone in Komb.

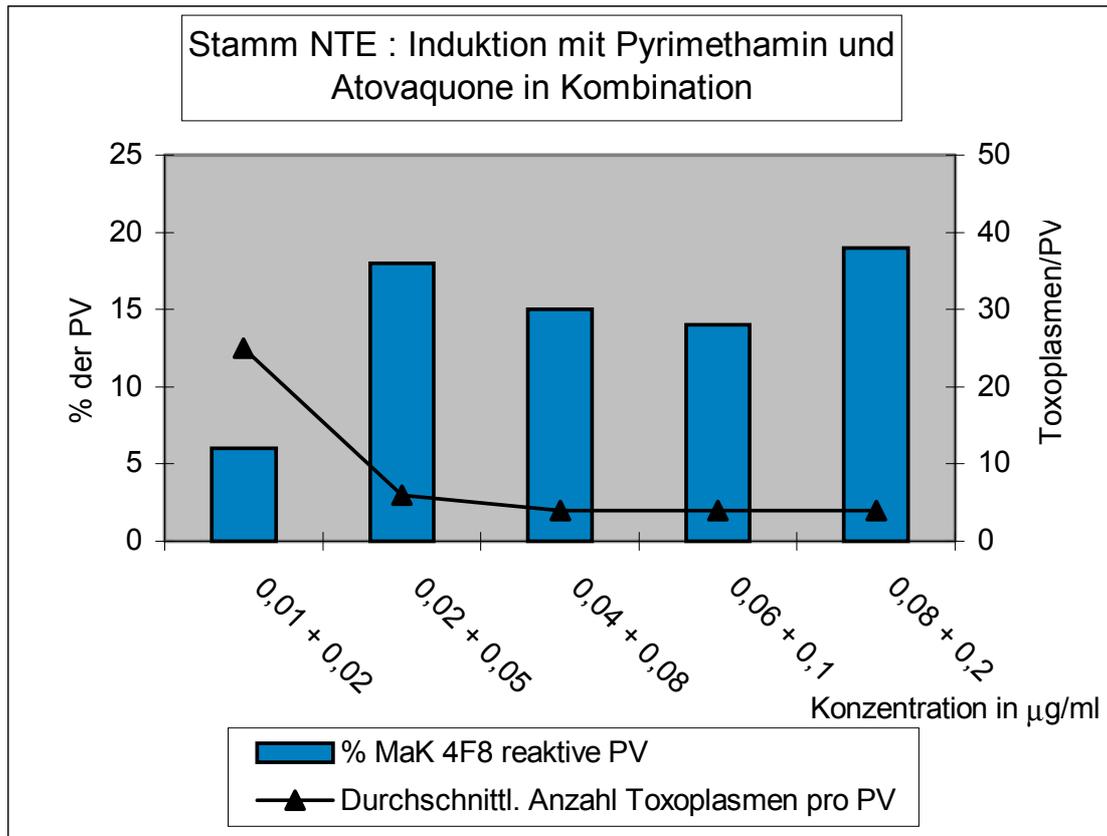


Abb. 9: Stamm NTE: Pyrimethamin und Atovaquone in Kombination

Konzentration in µg/ml Pyrimethamin + Atovaquone	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
0,08 + 0,2	19%	1-4
0,06 + 0,1	14%	1-4
0,04 + 0,08	15%	1-4
0,02 + 0,05	18%	1-6
0,01 + 0,02	< 6%	4-25

Tab. 9: Stamm NTE : Pyrimethamin und Atovaquone in Kombination

Bei der Kombination von Pyrimethamin mit Atovaquone zeigte sich eine maximale Induktion der Stadienkonversion bei einer Pyrimethamin-/Atovaquonekonzentration von 0,08/0,2 µg/ml. Gleichzeitig war hier die Replikation des Parasiten maximal inhibiert. Es war kein synergistischer Effekt der beiden Chemotherapeutika betreffend der Stärke der Induktion der Stadienkonversion und der Hemmung der Replikation zu beobachten. Die maximal erreichbare Wirkung der Kombination trat bei gleicher Konzentration von Atovaquone allein ebenfalls auf.

4.1.2 Stamm RH

4.1.2.1 Spontanexpression bradyzoitenspezifischer Antigene

Vor Beginn der Induktionsversuche wurde als Kontrolle die Spontanexpression bradyzoitenspezifischer Antigene in einer Tachyzoitenpopulation bei dem Stamm RH ausgezählt. An Tag 4 post infectionem wurden alle Ansätze ausgewertet.

	% MAk 4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
Spontanexpression Stamm RH	<3%	4-45

Tab. 10: Stamm RH: Spontanexpression

Zwischenstadien und reine Tachyzoiten zeigen den Phänotyp SAG1- und/oder 4F8-positiv während Bradyzoiten als SAG1-negativ und 4F8-positiv definiert sind. Der Anteil der Bradyzoiten betrug beim Stamm RH weniger als 3%.

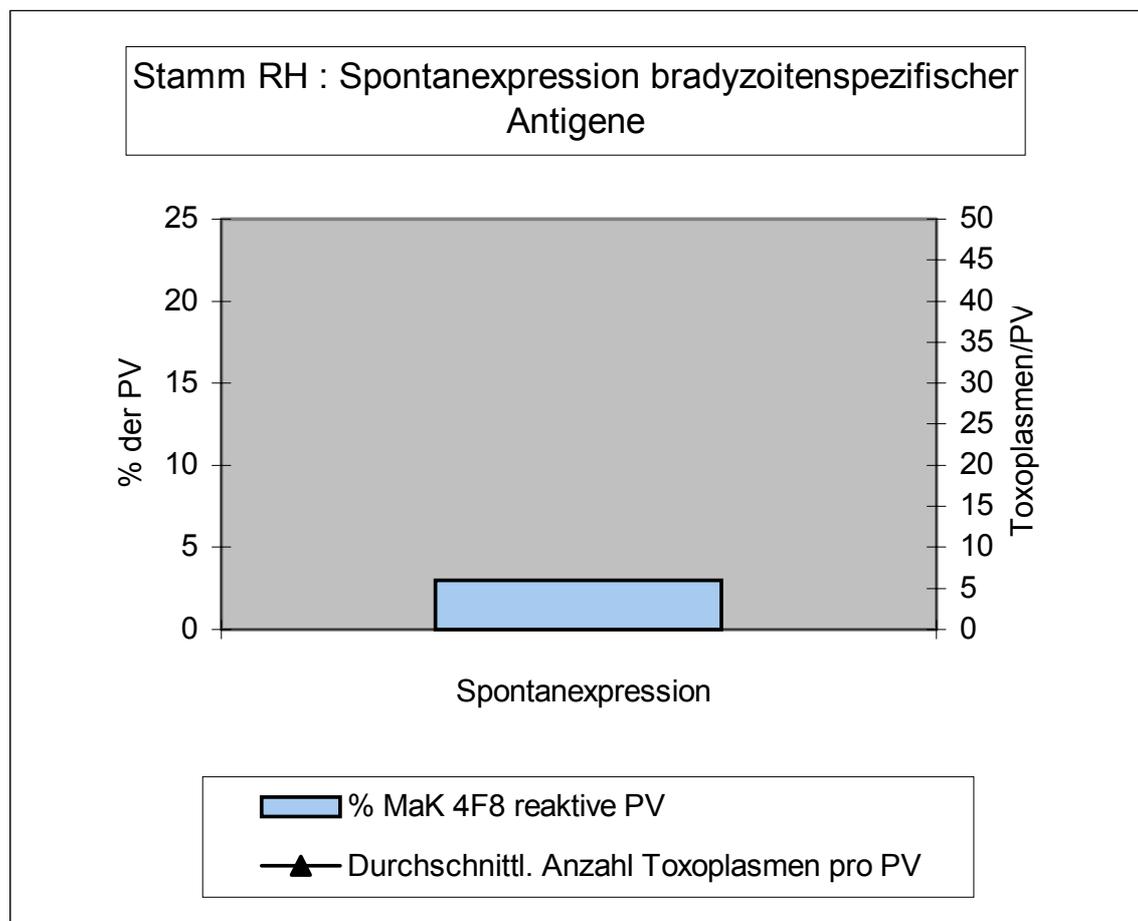


Abb. 10: Stamm NTE: Spontanexpression bradyzoitenspezifischer Antigene

4.1.2.2 Stadieninduktion mit Pyrimethamin

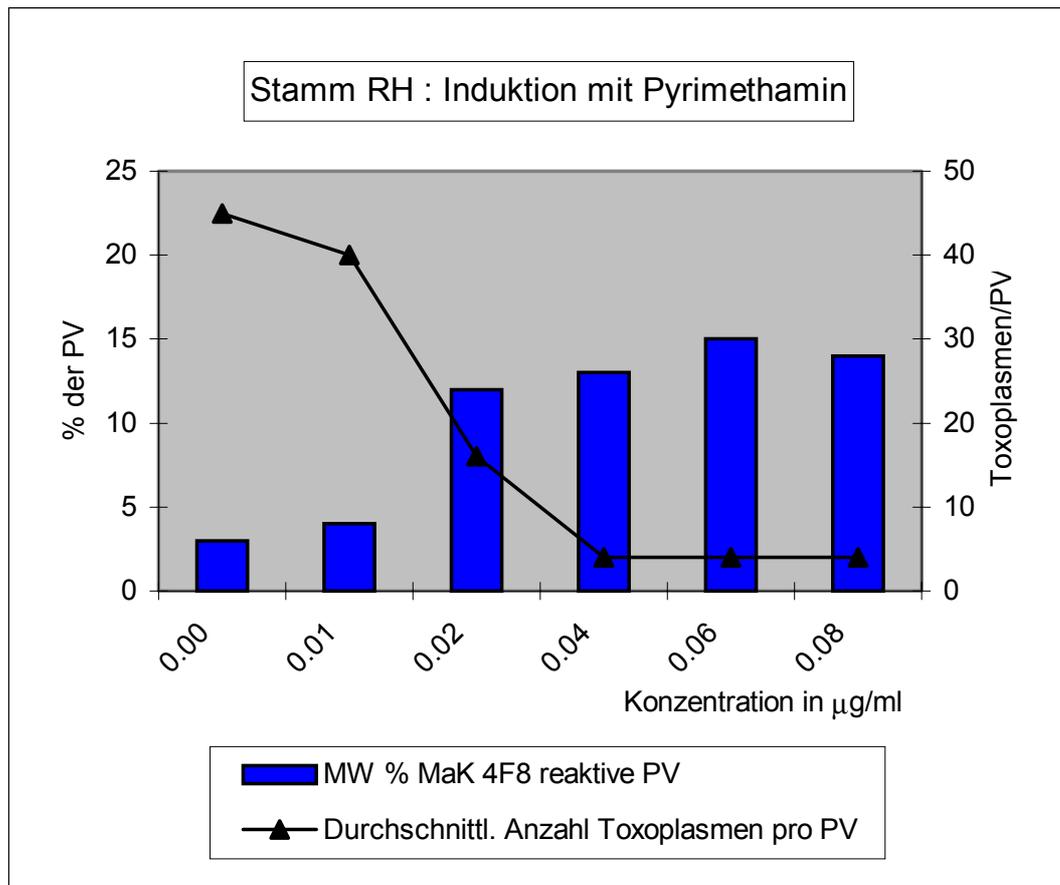


Abb. 11: Stamm RH: Pyrimethamin

Konzentration in $\mu\text{g/ml}$	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
0,08	14%	1-4
0,06	15%	1-4
0,04	13%	1-4
0,02	12%	4-16
0,01	4%	4-40
0,00	<math>< 3\%</math>	4-45

Tab. 11: Stamm RH: Pyrimethamin

Bei Verwendung von Pyrimethamin beim Stamm RH ergab sich eine max. Induktion der Stadienkonversion bei einer Konzentration von 0,06 $\mu\text{g/ml}$ und eine max. Hemmung der Replikation bei 0,04 $\mu\text{g/ml}$. Eine weitere Konzentrationssteigerung des Antibiotikums zeigte keine gesteigerte Induktion der Stadienkonversion. Eine vollständige Eradikation des Erregers war nicht zu beobachten. Es zeigen sich keine Unterschiede im Vergleich zum Stamm NTE und C56.

4.1.2.3 Stadieninduktion mit Sulfadiazin

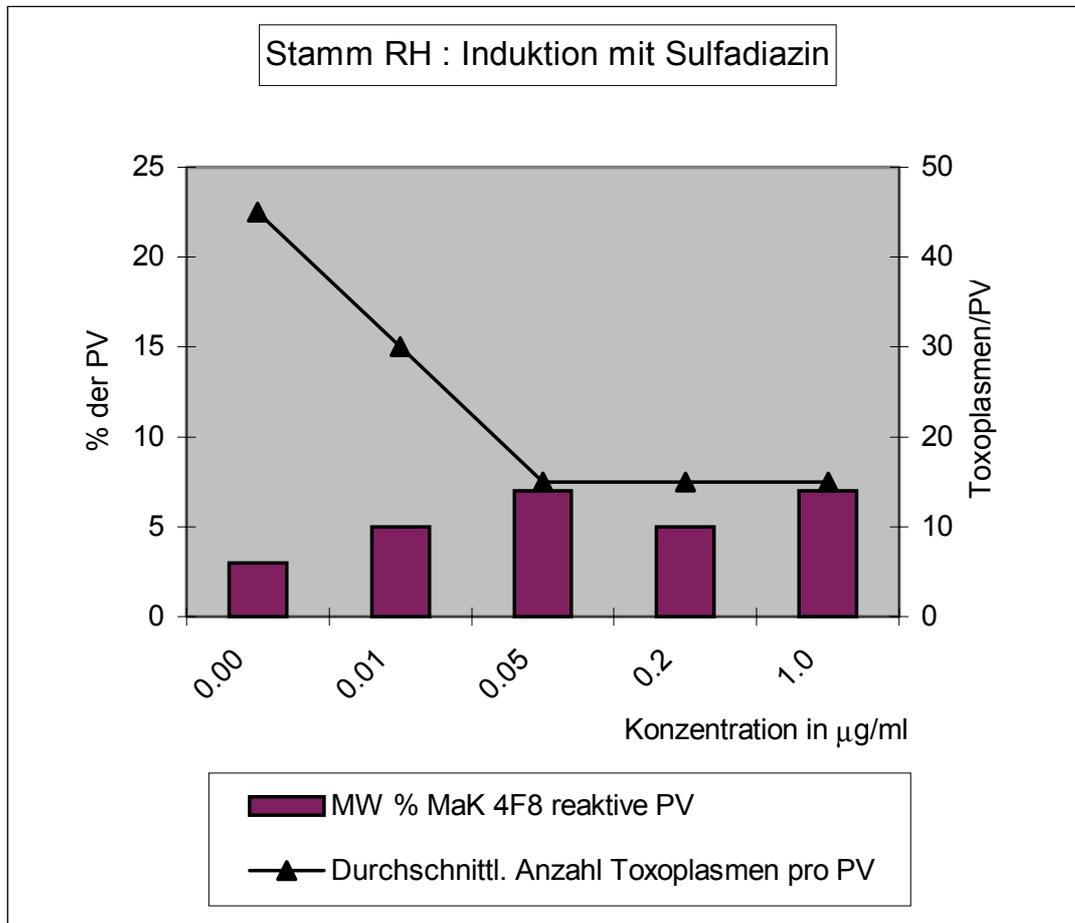


Abb. 12: Stamm RH: Sulfadiazin

Konzentration in $\mu\text{g/ml}$	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
1	7%	4-15
0,2	5%	4-15
0,05	7%	4-15
0,01	< 5%	4-30
0,00	< 3%	4-4

Tab. 12: Stamm RH: Sulfadiazin

Eine max. Induktion der Stadienkonversion zeigte sich bei Verwendung von Sulfadiazin bei einer Konzentration von 0,05 $\mu\text{g/ml}$. Auch die Replikation des Parasiten war bei dieser Konzentration maximal inhibiert. Im Vergleich ist die Inhibierung der Replikation bei Einsatz von Pyrimethamin stärker reduziert. Während sich bei Einsatz von Sulfadiazin noch bis zu 16 Toxoplasmen/PV beobachten ließen, waren es bei Pyrimethamin nur max. 4 Toxoplasmen/PV. Stammunterschiede zu den Stämmen NTE und C56 bestanden nicht.

4.1.2.4 Stadieninduktion mit Spiramycin

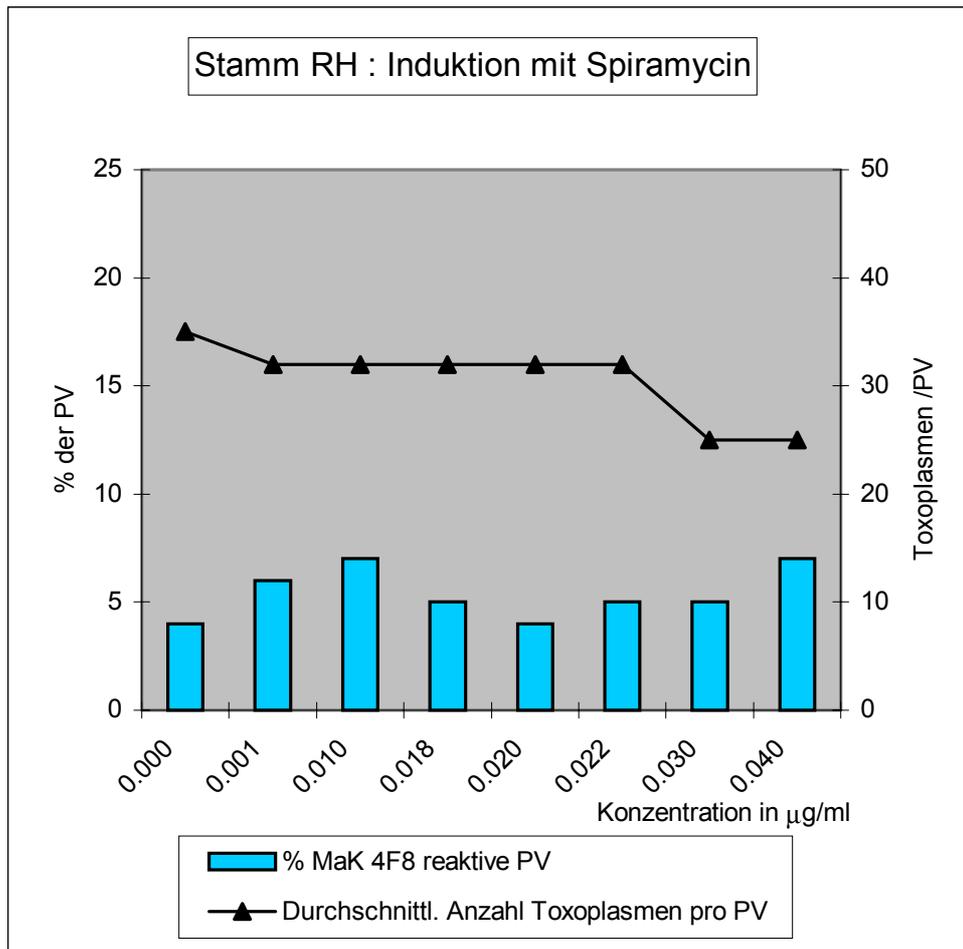


Abb. 13: Stamm RH: Spiramycin

Konzentration in µg/ml	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
40	7%	4-25
30	5%	4-25
22	5%	4-32
20	4%	4-32
18	5%	4-32
10	7%	4-32
1	6%	4-32
0	< 4%	4-35

Tab. 13: Stamm NTE: Spiramycin

Bei Spiramycin zeigte sich im Vergleich zu z.B. Pyrimethamin kein signifikanter Effekt auf die Stadienkonversion und Replikationsrate des Parasiten. Die gezeigten Ergebnisse für den Stamm RH unter Induktion mit Spiramycin unterscheiden sich nicht von denen der Stämme NTE und C56.

4.1.2.5 Stadieninduktion mit Clindamycin

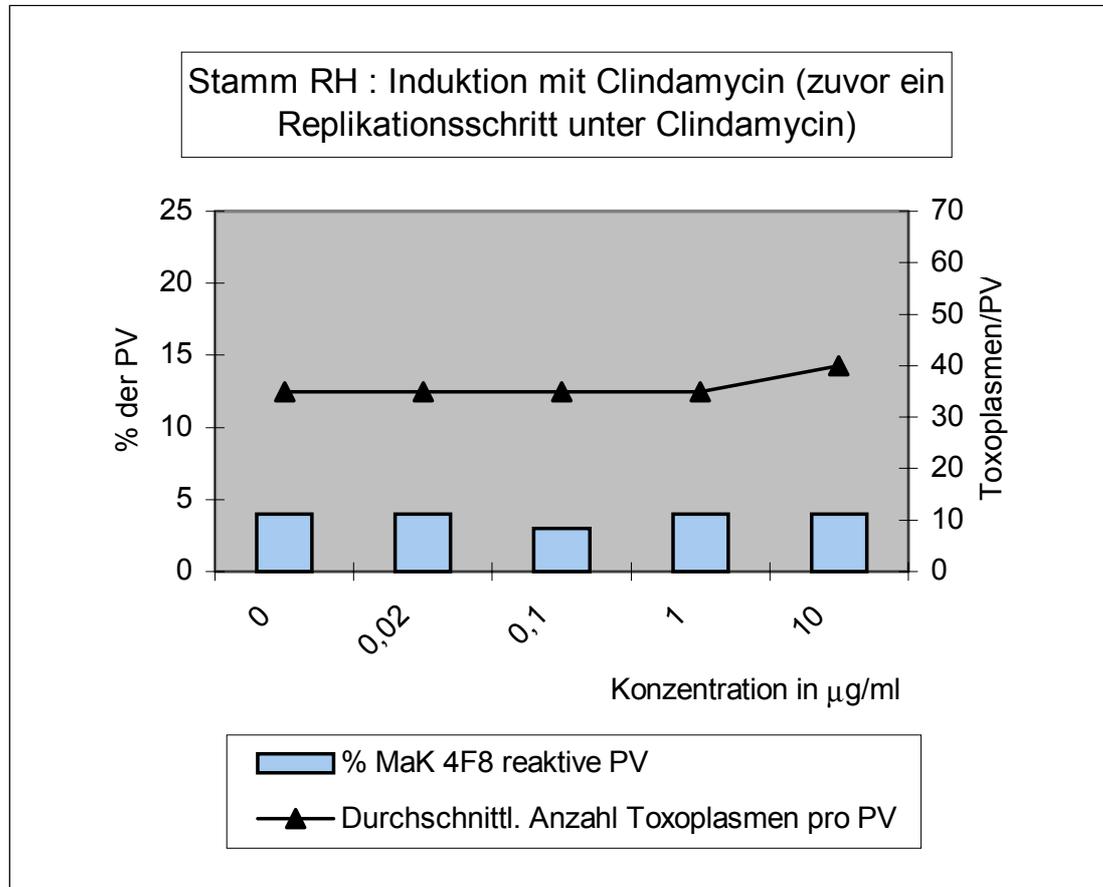


Abb. 14: Stamm RH: Clindamycin

Konzentration in $\mu\text{g/ml}$	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
10	4%	1-40
1	4%	1-35
0,1	3%	1-35
0,02	4%	1-35
0	< 4%	1-35

Tab. 14: StammRH: Clindamycin

Die Ergebnisse bei Einsatz von Clindamycin beim Stamm RH unterschieden sich nicht von den zuvor gezeigten Ergebnissen beim Stamm NTE. Trotz Vorgehen, wie von Fichera et Roos (1995) beschrieben (d.h. Führen der Parasiten unter Clindamycin länger als 25 Stunden), war kein Effekt des Chemotherapeutikums auf Stadienkonversion und Replikation des Parasiten vom Stamm RH zu beobachten.

4.1.2.6 Stadieninduktion mit Atovaquone

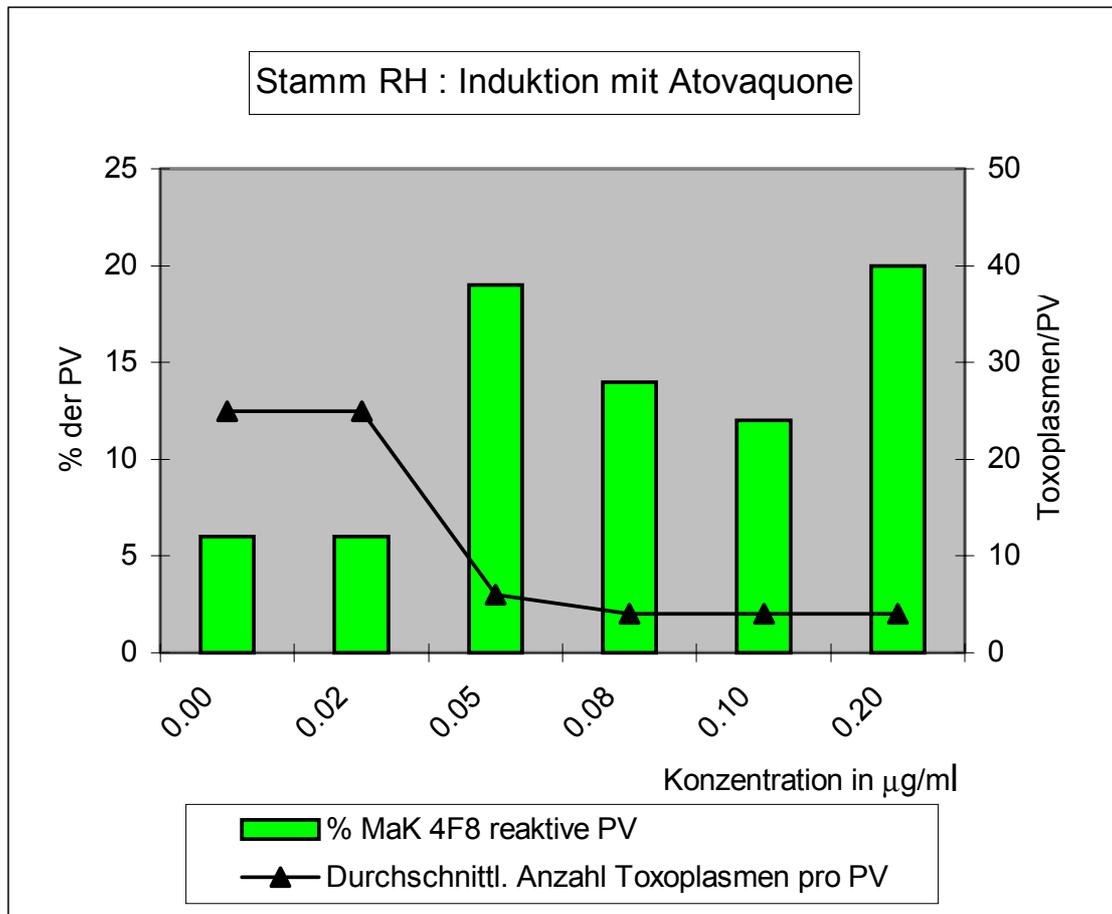


Abb. 15: Stamm RH: Atovaquone

Konzentration in $\mu\text{g/ml}$	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
0,2	20%	1-4
0,1	12%	1-4
0,08	14%	1-4
0,05	19%	1-6
0,02	< 6%	4-25
0,02	< 6%	4-25

Tab. 15: Stamm RH: Atovaquone

Bei Einsatz von Atovaquone beim Stamm RH konnte wie schon beim Stamm NTE eine deutliche und auffällige Reduktion der Zysten beobachtet werden. Die maximale Induktion der Stadienkonversion und Hemmung der Replikation wurde ebenfalls bei einer Konzentration von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Atovaquone erreicht. Es zeigten sich somit keine Stammunterschiede zum Stamm NTE.

4.1.2.7 Stadieninduktion Pyrimethamin + Sulfadiazin in Komb.

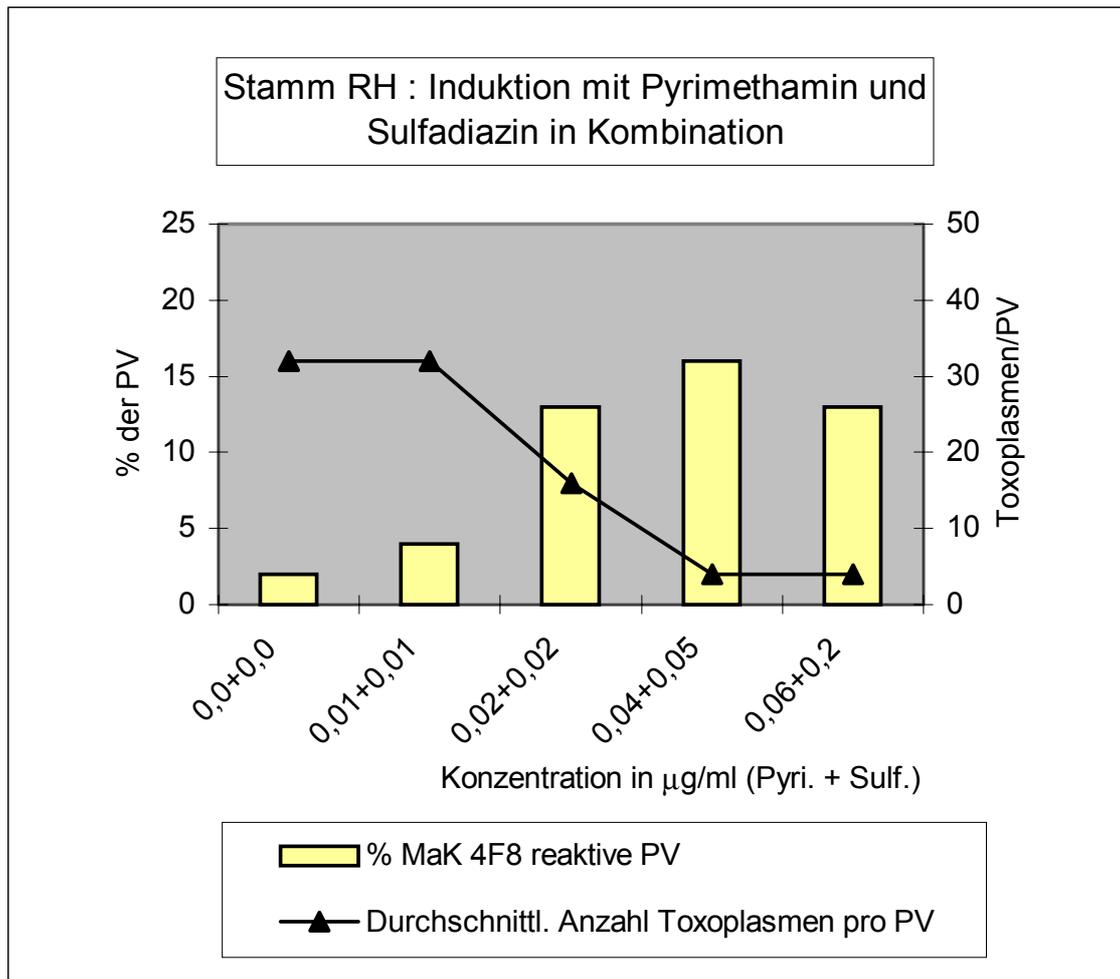


Abb. 16: Stamm RH: Pyrimethamin und Sulfadiazin in Kombination

Konzentration in µg/ml Pyrimethamin + Sulfadiazin	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
0,06 + 0,2	14%	1-4
0,04 + 0,05	15%	1-4
0,02 + 0,02	13%	4-16
0,01 + 0,01	4%	4-32
0,0 + 0,0	< 4%	4-32

Tab. 16: Stamm RH : Pyrimethamin und Sulfadiazin in Kombination

Bei der Kombination aus Pyrimethamin und Sulfadiazin wurde die max. Induktion der Stadienkonversion und Replikation bei einer Konzentration von 0,04 µg/ml Pyrimethamin mit 0,05 µg/ml Sulfadiazin beobachtet. Es zeigte sich nur im Vgl. mit einer alleinigen Gabe von Sulfadiazin durch zusätzliche Pyrimethamingabe ein synergistischer Effekt (s. 4.1.1.3).

4.1.2.8 Stadieninduktion Pyrimethamin + Atovaquone in Komb.

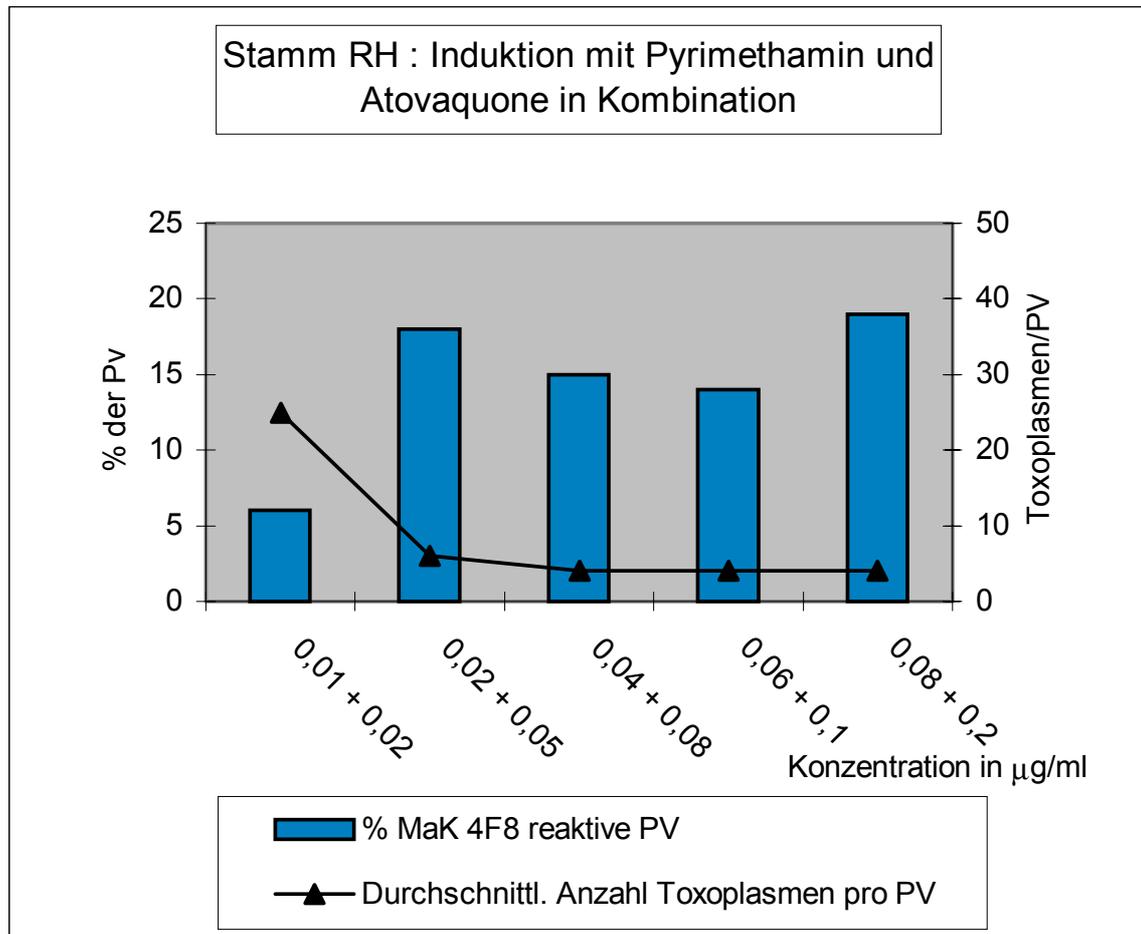


Abb. 17: Stamm RH : Pyrimethamin und Atovaquone in Kombination

Konzentration in µg/ml Pyrimethamin + Atovaquone	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
0,08 + 0,2	19%	1-4
0,06 + 0,1	14%	1-4
0,04 + 0,08	15%	1-4
0,02 + 0,05	18%	1-6
0,01 + 0,02	< 6%	4-25

Tab. 17: Stamm RH: Pyrimethamin und Atovaquone in Kombination

Bei der Kombination von Pyrimethamin mit Atovaquone zeigten sich hinsichtlich der maximalen Induktion der Stadienkonversion und Hemmung der Stadienkonversion keine Unterschiede zum Stamm NTE. Max. Werte finden sich bei einer Pyrimethamin-/Atovaquonekonzentration von 0,08/0,2 µg/ml. Ein synergistischer Effekt der beiden Chemotherapeutika ließ sich nicht nachweisen.

4.1.3 Stamm C56

4.1.3.1 Spontanexpression bradyzoitenspezifischer Antigene

Die Auswertung erfolgte wie bei den beiden anderen Stämmen an Tag 4 post infectionem. Der Anteil der Spontanexpression bradyzoitenspezifischer Antigene in einer Tachyzoitenpopulation vom Stamm C56 wurde vor Beginn der Induktionsversuche mit einem Anteil von kleiner 3 % ausgezählt.

	% MAk 4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
Spontanexpression Stamm C56	<3%	4-45

Tab. 18: Stamm C56: Spontanexpression

Reine Bradyzoiten sind dabei definiert als SAG1-negativ und 4F8-positiv, Zwischenstadien und reine Tachyzoiten zeigen den Phänotyp SAG1- und/oder 4F8-positiv. Bei dem Stamm C56 besaßen weniger als 3% den Phänotyp SAG1-negativ und 4F8-positiv.

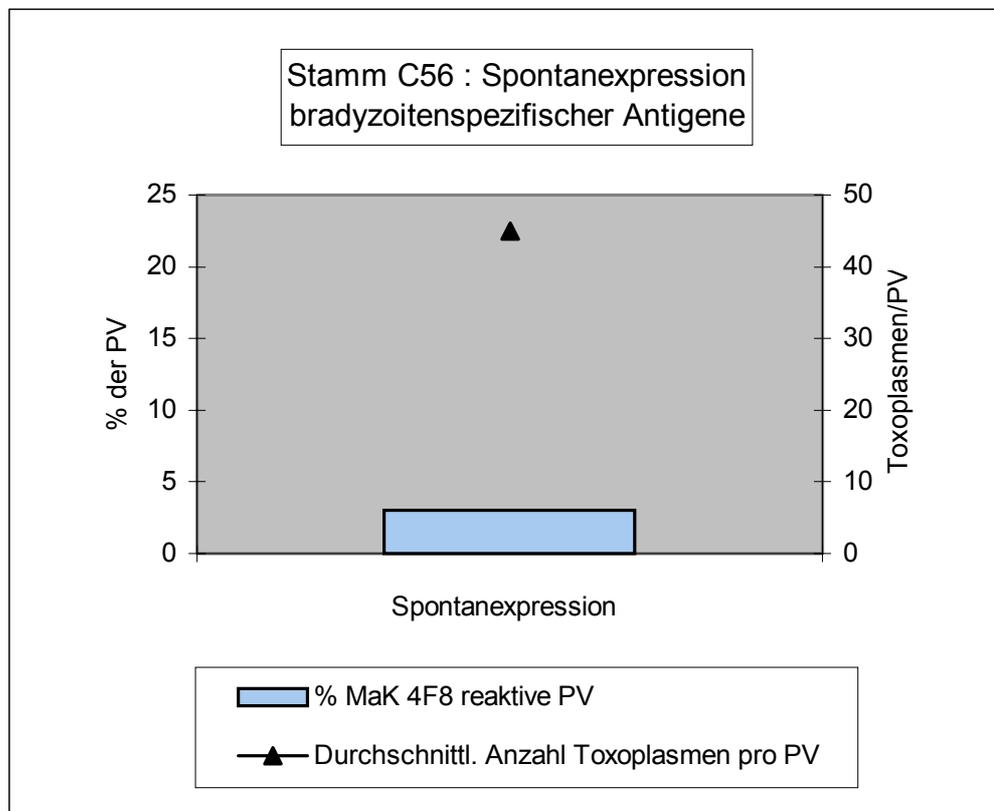


Abb. 18: Stamm C56: Spontanexpression

4.1.3.2 Stadieninduktion mit Pyrimethamin

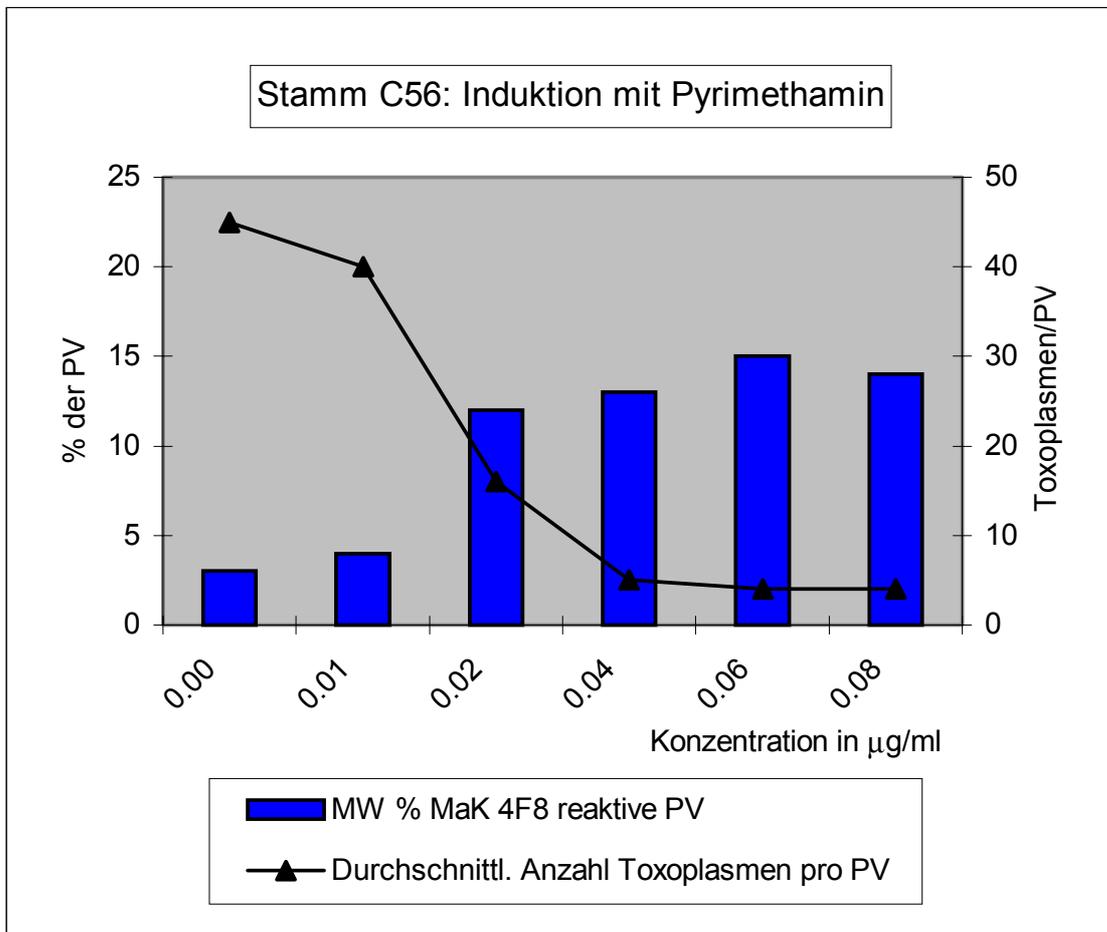


Abb. 19: Stamm C56: Pyrimethamin

Konzentration in µg/ml	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
0,08	14%	1-4
0,06	15%	1-4
0,04	13%	1-5
0,02	12%	4-16
0,01	4%	4-40
0,00	< 3%	4-45

Tab. 19: Stamm C56: Pyrimethamin

Pyrimethamin wurde in drei Versuchen in unterschiedlichen Konzentrationen wie in Tab. 19 gezeigt, eingesetzt. Bezogen auf die Pyrimethaminkonzentration (0,06 µg/ml), bei der eine maximale Induktion der Stadienkonversion und Hemmung der Replikation des Parasiten zu beobachten war, ergab sich kein Unterschied zwischen den verwendeten Stämmen NTE, RH und C56.

4.1.3.3 Stadieninduktion mit Sulfadiazin

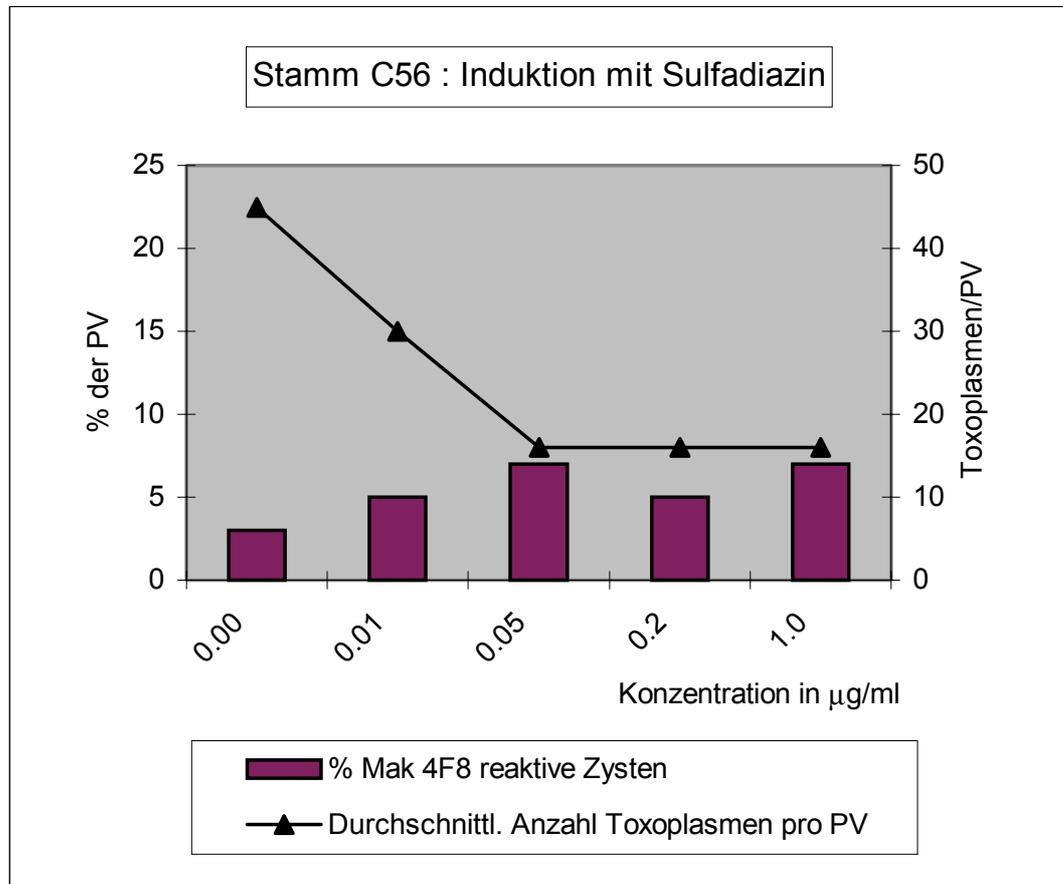


Abb. 20: Stamm C56: Sulfadiazin

Konzentration in µg/ml	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
1	7%	4-16
0,2	5%	4-16
0,05	7%	4-16
0,01	< 5%	4-30
0,00	< 3%	4-45

Tab. 20: Stamm C56: Sulfadiazin

Im Vergleich mit den beiden anderen verwendeten Stämmen NTE und RH zeigte sich beim Stamm C56 bei Induktion mit Sulfadiazin kein Unterschied in der Stärke der max. Induktion der Stadienkonversion sowie Hemmung der Replikation. Bei einer Sulfadiazinkonzentration von 0,05 µg/ml ließen sich bei allen drei Stämmen eine max. Induktion der Stadienkonversion sowie Hemmung der Replikation beobachten, die durch Konzentrationssteigerung nicht verbessert werden konnten. Sulfadiazin zeigte im Vergleich zu z.B. Pyrimethamin eine schlechtere Wirkung.

4.1.3.4 Stadieninduktion mit Spiramycin

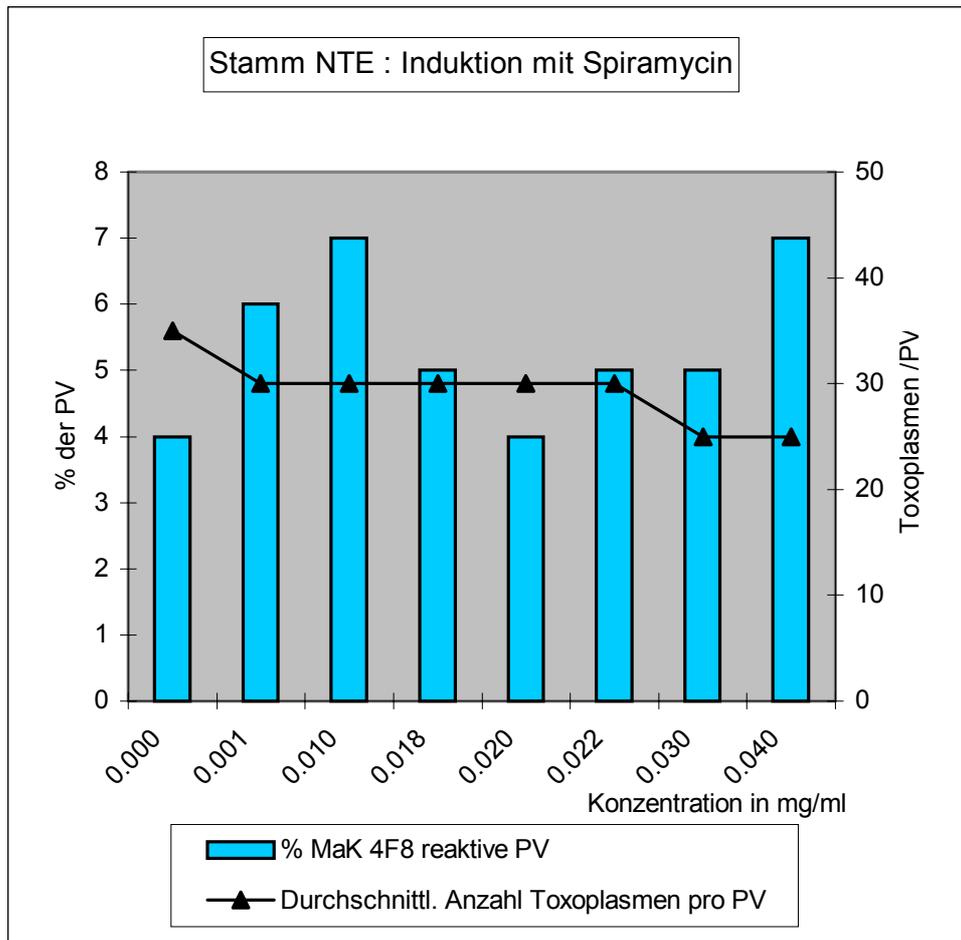


Abb. 21: Stamm C56: Spiramycin

Konzentration in mg/ml	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
40	7%	4-25
30	5%	4-25
22	5%	4-30
20	4%	4-30
18	5%	4-30
10	7%	4-30
1	6%	4-30
0	< 4%	4-35

Tab. 21: Stamm C56: Spiramycin

Auch beim Stamm C56 war wie bei den beiden anderen verwendeten Stämmen bei der Induktion mit Spiramycin kein signifikanter Effekt zu beobachten. Es zeigte sich, i. Vgl. zu ohne Induktion, mit der Reduktion der durchschnittl. Anzahl der Toxoplasmen pro PV auf 4-25 und einer Steigerung der Prozentzahl der Rate der Mak 4F8-reaktiven PV auf 7 % nur ein schwacher Effekt.

4.1.3.5 Stadieninduktion mit Clindamycin

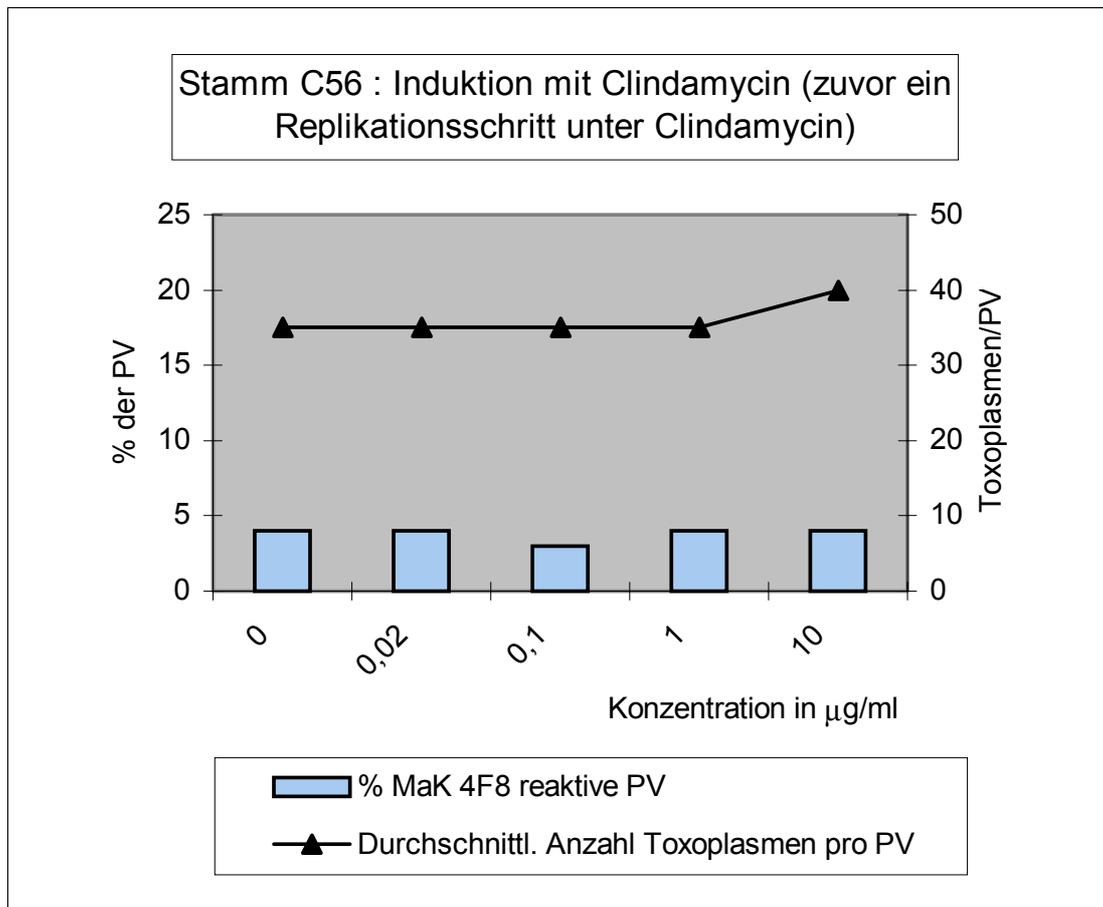


Abb. 22: Stamm C56: Clindamycin

Konzentration in µg/ml	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
10	4%	1-40
1	4%	1-35
0,1	3%	1-35
0,02	4%	1-35
0	< 4%	1-35

Tab. 22: Stamm C56: Clindamycin

Bei Verwendung von Clindamycin beim Stamm C56 ließ sich keine Wirkung auf die Induktion der Stadienkonversion beobachten. Die Hemmung der Replikation wurde mit einer Reduktion der durchschnittl. Anzahl der Toxoplasmen pro PV auf 1-35 nur schwach beeinflusst. Die Ergebnisse bei Einsatz von Clindamycin beim Stamm C56 unterschieden sich trotz Vorgehen, wie von Fichera et Roos (1995) beschrieben, nicht von den zuvor gezeigten Ergebnissen bei den Stämmen NTE und RH.

4.1.3.6 Stadieninduktion mit Atovaquone

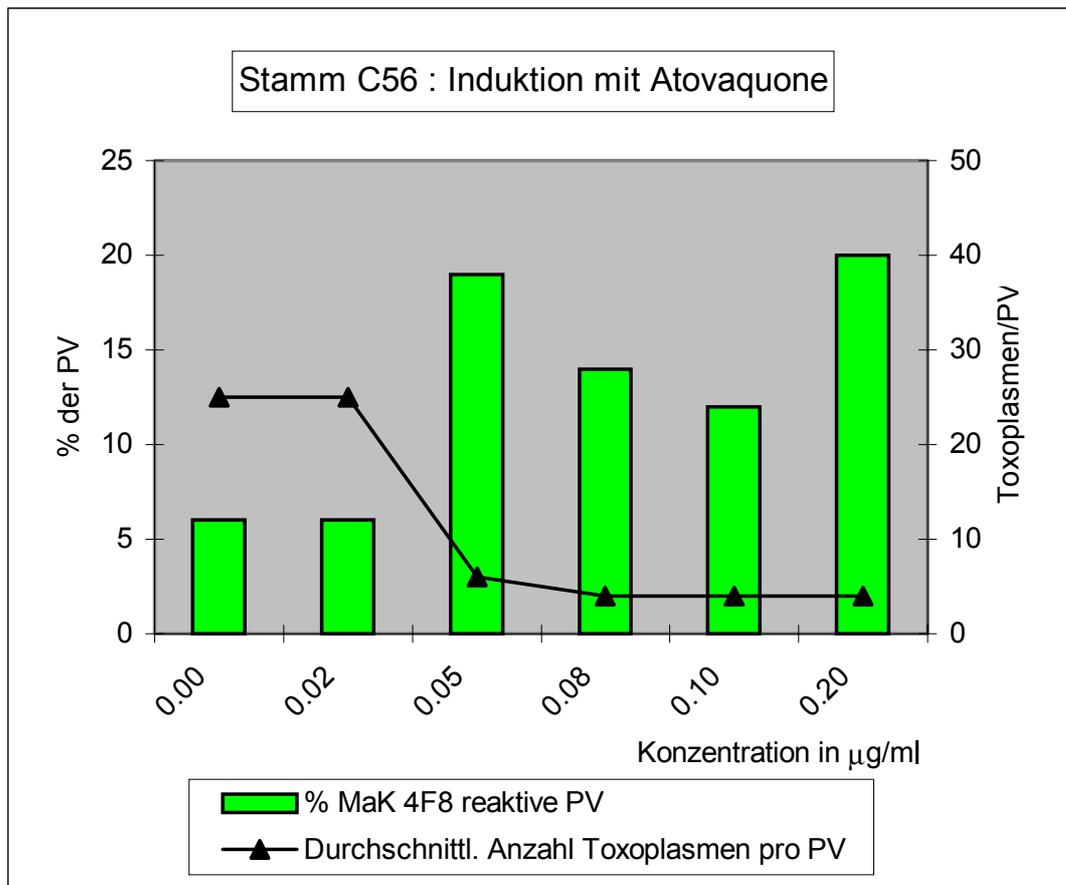


Abb. 23: Stamm C56: Atovaquone

Konzentration in $\mu\text{g/ml}$	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
0,2	20%	1-4
0,1	12%	1-4
0,08	14%	1-4
0,05	19%	1-6
0,02	< 6%	4-25
0,00	< 6%	4-25

Tab. 23: Stamm C56: Atovaquone

Die maximale Induktion der Stadienkonversion und Hemmung der Replikation bei Verwendung von Atovaquone beim Stamm C56 wurde bei einer Konzentration von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Atovaquone erreicht. Stammunterschiede zu den Stämmen NTE und RH ließen sich nicht beobachten. Auch beim Stamm C56 zeigte sich die deutliche und auffällige Reduktion der Zysten, die auch schon bei Untersuchung der Stämme NTE und RH auffällig gewesen war.

4.1.3.7 Stadieninduktion Pyrimethamin + Sulfadiazin in Komb.

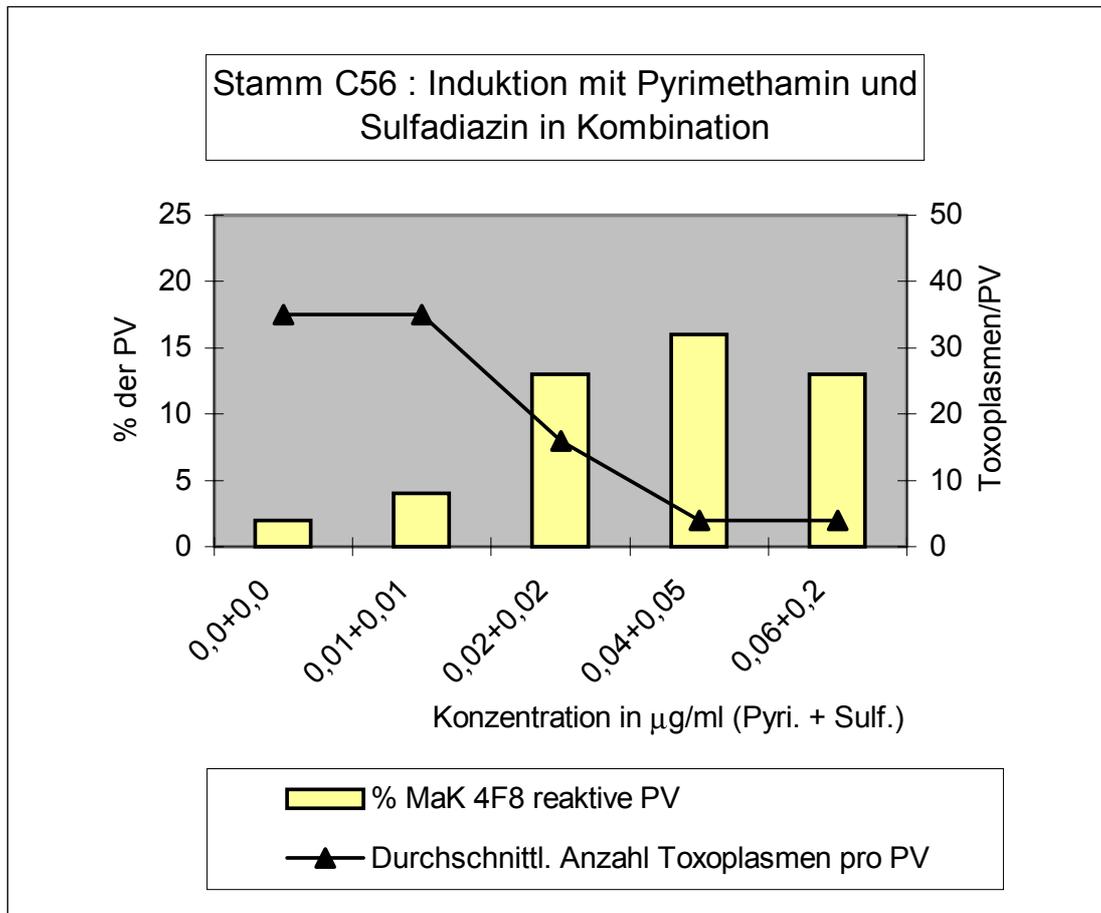


Abb. 24: Stamm C56: Pyrimethamin und Sulfadiazin in Kombination

Konzentration in µg/ml Pyrimethamin + Sulfadiazin	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
0,06 + 0,2	14%	1-4
0,04 + 0,05	15%	1-4
0,02 + 0,02	13%	4-16
0,01 + 0,01	4%	4-35
0,0 + 0,0	< 4%	4-35

Tab. 24: Stamm C56 : Pyrimethamin und Sulfadiazin in Kombination

Bei der Verwendung der Kombination aus Pyrimethamin und Sulfadiazin beim Stamm C56 wurden identische Ergebnisse zu den Stämmen NTE und RH beobachtet. Bei allen drei Stämmen zeigte sich die max. Induktion der Stadienkonversion und Replikation bei einer Konzentration von 0,04 µg/ml Pyrimethamin mit 0,05 µg/ml Sulfadiazin. Ein synergistischer Effekt ließ sich auch beim Stamm C56 in-vitro nur im Vgl. zur alleinigen Gabe von Sulfadiazin beweisen. Im Vgl. zur alleinigen Gabe von Pyrimethamin zeigte sich hingegen kein synergistischer Effekt.

4.1.3.8 Stadieninduktion Pyrimethamin + Atovaquone in Komb.

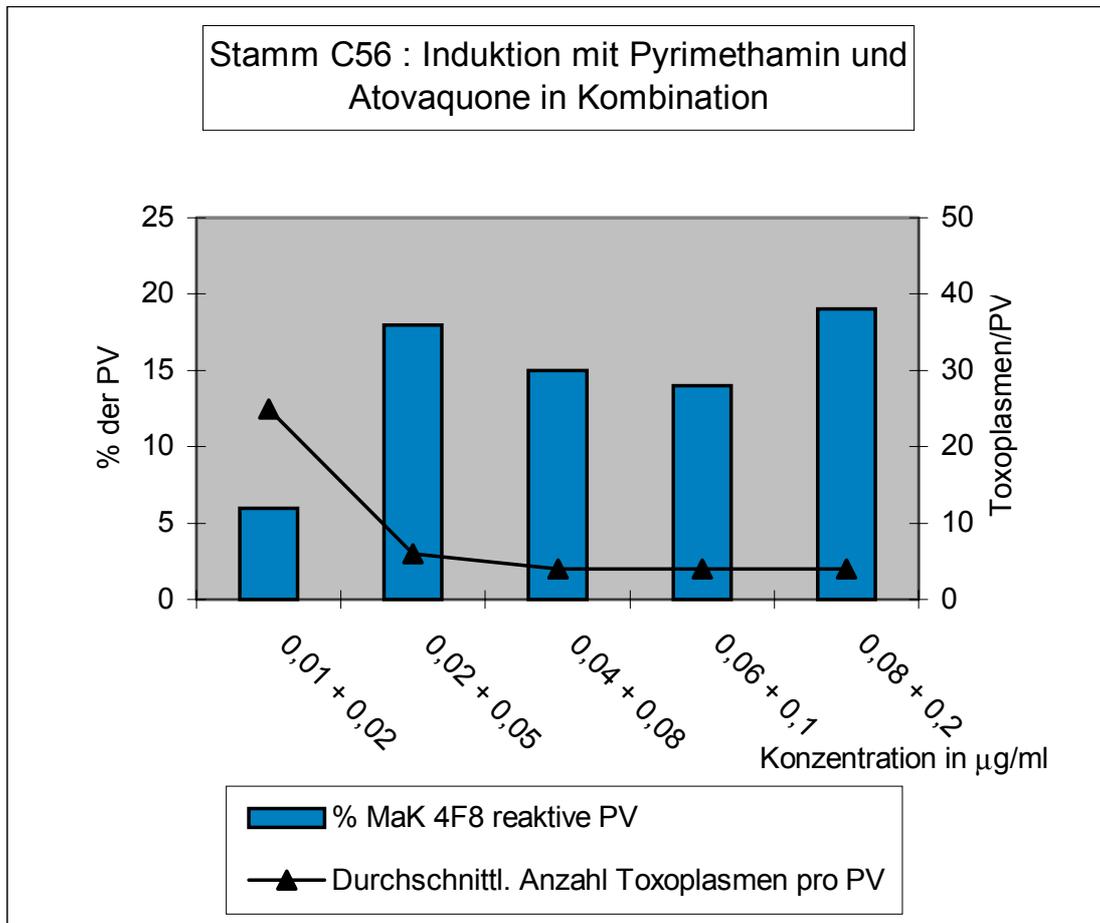


Abb. 25: Stamm C56 : Pyrimethamin und Atovaquone in Kombination

Konzentration in µg/ml Pyrimethamin + Atovaquone	% Mak.4F8-reaktive PV	Durchschnittl. Anzahl Toxoplasmen pro PV
0,08 + 0,2	19%	1-4
0,06 + 0,1	14%	1-4
0,04 + 0,08	15%	1-4
0,02 + 0,05	18%	1-6
0,01 + 0,02	< 6%	4-25

Tab. 25: Stamm C56: Pyrimethamin und Atovaquone in Kombination

Die max. Induktion der Stadienkonversion sowie Hemmung der Replikation von *T. gondii* ließ sich beim Stamm C56 bei einer Pyrimethamin-/Atovaquonekonzentration von 0,08/0,2 µg/ml darstellen. Ein synergistischer Effekt der beiden Chemotherapeutika zeigte sich, wie schon bei den Stämmen NTE und RH gezeigt, nicht. So war die maximal erreichbare Wirkung der Kombination bei gleicher Konzentration von Atovaquone allein ebenfalls zu beobachten.

4.2 ³H-Uracil -Einbau

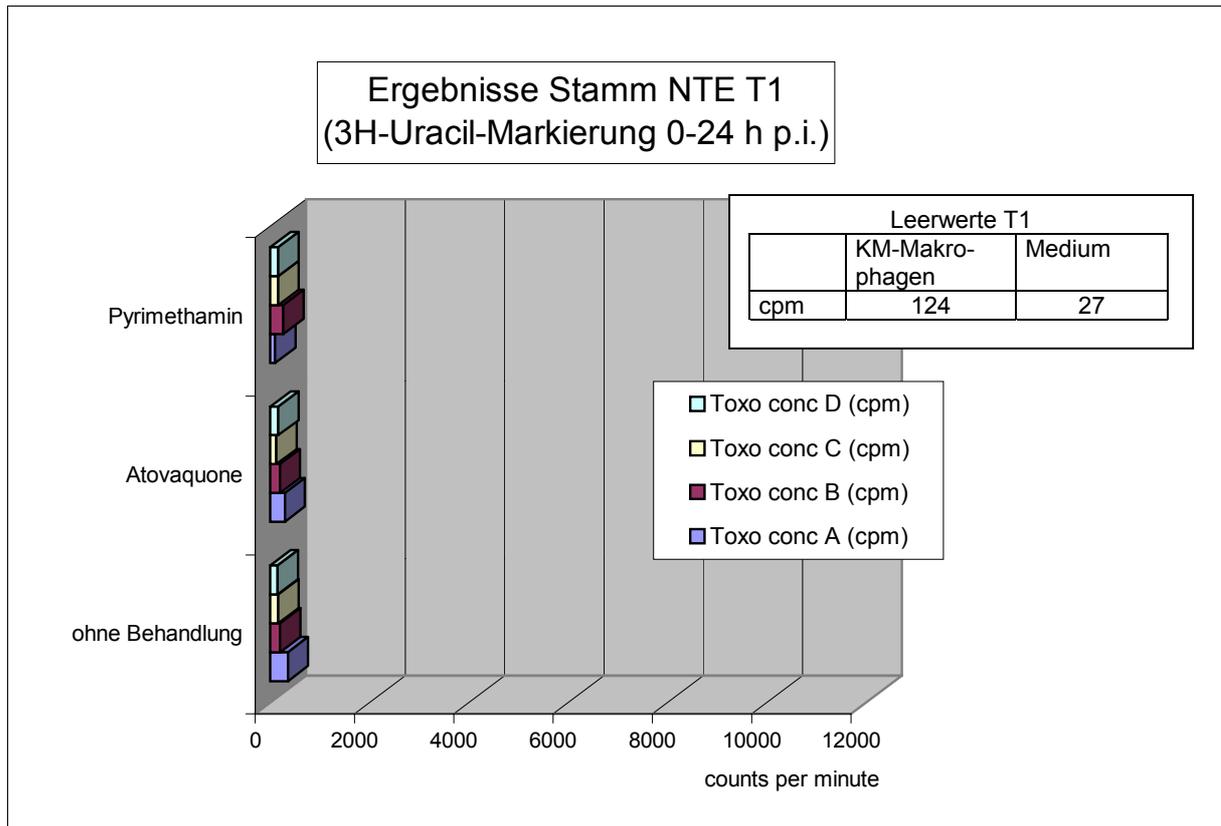
Die nachfolgenden Abbildungen und Tabellen geben die Ergebnisse der drei Auswertungszeitpunkte T1 bis T3 wieder. Dabei entspricht der Wert für jeden Balken dem Durchschnittswert aus sechs Parallelansätzen sowie zwei Versuchsdurchführungen.

In einer stark infizierten Zellkultur treten typischerweise Sättigungseffekte auf, wenn für die Parasiten keine optimalen Replikationsbedingungen mehr vorliegen. Für die Bestimmung der Proliferationsraten wurden nur Proben verwendet, die sich in aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen um den Faktor drei in der ³H-Uracil Einbaurate unterschieden.

Zu den Zeitpunkten T1 (0-24 h p.i.) und T2 (24-48 h p.i.) nahmen die Unterschiede der ³H-Uracil Einbaurate langsam zu. Zog man zur Auswertung den Zeitpunkt T3, d.h. 48-72 Stunden nach Infektion heran, zeigte sich deutlich, dass im Vergleich Toxoplasmen mit und ohne Induktion ein deutlicher Unterschied der Proliferationsrate auftrat: Während bei einer Konzentration von 1×10^5 Toxoplasmen pro Loch (conc A) 48-72 Stunden post infectionem ohne Antiinfektiva 11632 Zähler pro Minute gemessen werden konnten, wurde für die Induktion mit Pyrimethamin (0.08 µg/ml) 1283 Zähler pro Minute und für die Induktion mit Atovaquone (0.08 µg/ml) 568 Zähler pro Minute gemessen. Die Proliferationsrate sank unter Induktion mit Pyrimethamin um den Faktor 10, unter Induktion mit Atovaquone sogar um den Faktor 20. Die Ergebnisse bestätigten die Ergebnisse des Immunfluoreszenztests. Atovaquone zeigte die stärkste Hemmung der Proliferation.

Nachdem sich der ³H-Uracil-Einbau jedoch als sehr aufwendig darstellte und mit radioaktiven Stoffen gearbeitet werden musste, wurde für alle Antibiotikatestungen der Immunfluoreszenztest eingesetzt.

Die Ergebnisse der einzelnen Zeitpunkte sind in den folgenden Abbildungen und Tabellen einzusehen.

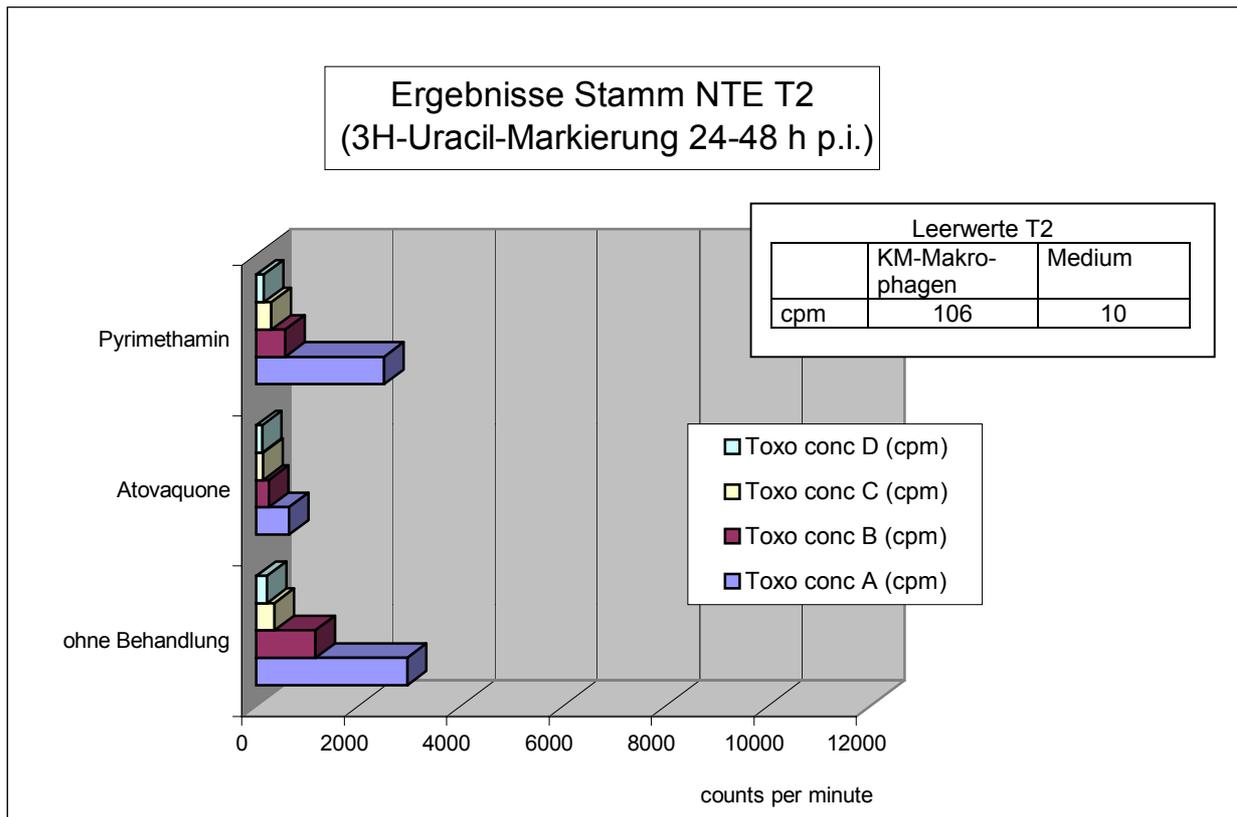
Abb. 26: Stamm NTE: ³H-Uracil Einbau im Zeitintervall T1

Toxoplasmen/Loch Stamm NTE T1	ohne Induktion	Indukt. mit Atova- quone (0.08 ug/ml)	Indukt. mit Pyri- methamin (0.08 ug/ml)
conc A : 1 x 10 ⁵	354	292	98
conc B : 3,3 x 10 ⁴	199	191	257
conc C : 1,1 x 10 ⁴	158	120	161
conc D : 0,37 x 10 ⁴	144	157	156

Tab. 26: Stamm NTE: ³H-Uracil Einbau im Zeitintervall T1

Zum Zeitpunkt T1 (0-24 h p.i.) ließ sich bei der Induktion mit Atovaquone und Pyrimethamin zunächst kein Unterschied in der ³H-Uracil Einbaurrate beobachten.

Bei Konzentration C (conc C, siehe Tab. 26, Abb. 26) zeigten sich nahezu gleiche Werte für die Zähler pro Minute ohne Antibiotika sowie mit Atovaquone oder Pyrimethamin.

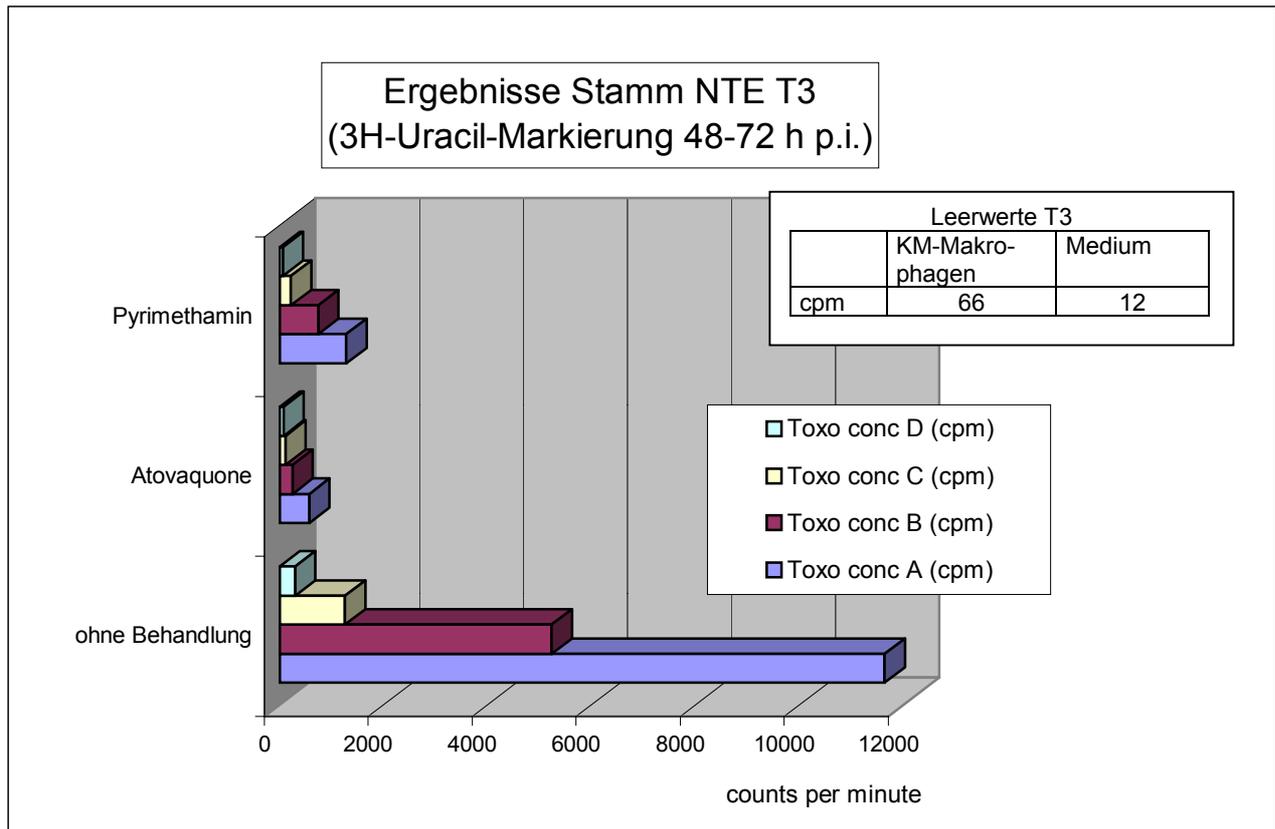
Abb. 27: Stamm NTE: ³H-Uracil Einbau im Zeitintervall T2

Toxoplasmen/Loch Stamm NTE T2	ohne Induktion	Indukt. mit Atova- quone (0.08 ug/ml)	Indukt. mit Pyri- methamin (0.08 ug/ml)
conc A : 1 x 10 ⁵	2950	638	2499
conc B : 3,3 x 10 ⁴	1155	247	568
conc C : 1,1 x 10 ⁴	357	135	293
conc D : 0,37 x 10 ⁴	210	114	150

Tab. 27: Stamm NTE: ³H-Uracil Einbau im Zeitintervall T2

Zum Zeitpunkt T2 (24-48 h p.i.) nahmen die Unterschiede der ³H-Uracil Einbauraten langsam zu.

Bei Konzentration C (conc C, siehe Tab. 27, Abb. 27) zeigten sich zum Zeitpunkt T2 ohne Induktion 357 Zähler pro Minute verglichen mit 135 Zählern pro Minute für Induktion mit Atovaquone und 293 Zählern pro Minute für Pyrimethamin. Die Einbauraten für ³H-Uracil wurden bei Induktion mit den Substanzen Atovaquone und Pyrimethamin demnach deutlich reduziert.

Abb. 28: Stamm NTE: ³H-Uracil Einbau im Zeitintervall T3

Toxoplasmen/Loch Stamm NTE T3	ohne Induktion	Indukt. mit Atova- quone (0.08 ug/ml)	Indukt. mit Pyri- methamin (0.08 ug/ml)
conc A : 1 x 10 ⁵	11632	568	1283
conc B : 3,3 x 10 ⁴	5230	247	743
conc C : 1,1 x 10 ⁴	1256	113	216
conc D : 0,37 x 10 ⁴	297	76	60

Tab. 28: Stamm NTE: ³H-Uracil Einbau im Zeitintervall T3

Zum Zeitpunkt T3 (48-72 h p.i.) war der Unterschied der ³H-Uracil Einbauraten am deutlichsten.

Zieht man zum Vergleich die Ergebnisse für die Konzentration C (conc C, siehe Tab. 28, Abb. 28) heran, zeigten sich zum Zeitpunkt T3 ohne Induktion 1256 Zähler pro Minute verglichen mit 113 Zähler pro Minute für Induktion mit Atovaquone und 216 Zählern pro Minute für Pyrimethamin. Die Einbauraten für ³H-Uracil wurden bei Induktion mit Atovaquone um den Faktor 11,2 und bei

Induktion mit Pyrimethamin um den Faktor 5,8 reduziert. Bei Konzentration A (conc A, siehe Tab. 28, Abb. 28) war der Unterschied noch deutlicher.

Sowohl Atovaquone als auch Pyrimethamin führten zu einer Hemmung der Proliferation von *T. gondii*. Die Hemmung der Proliferation bei Verwendung von Atovaquone lag 100% über den Ergebnissen für Pyrimethamin. Dieses Ergebnis ließ sich auch im Immunfluoreszenztest darstellen.

4.3 Stammspezifität

Die verwendeten Toxoplasmastämme RH, NTE, und C56 repräsentieren jeweils einen Vertreter der Einteilung aller bekannten Toxoplasmastämme in drei Gruppen mit der Bezeichnung A (RH), B (NTE) und C (C56). Es wurden keine stammspezifische Unterschiede hinsichtlich Stadienkonversion und Verringerung der Anzahl der Erreger pro PV bei Verwendung der untersuchten Antibiotika beobachtet.

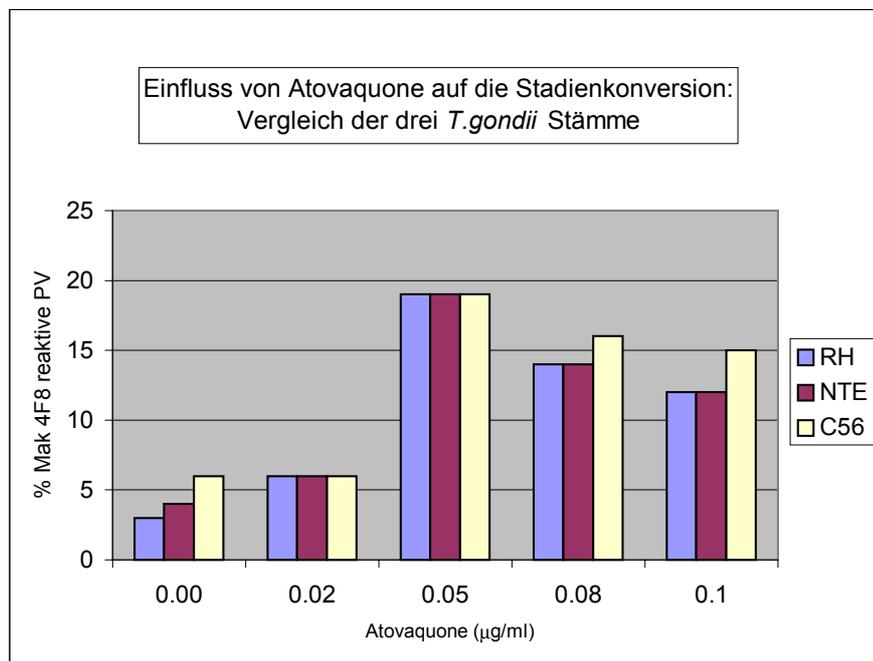


Abb. 29: Einfluss von Atovaquone auf Stadienkonversion: Stamm RH, NTE, C56

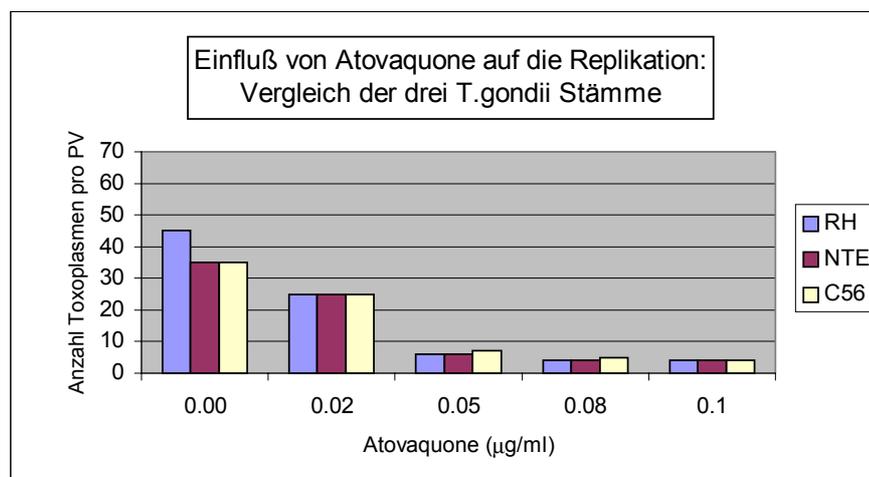


Abb. 30: Einfluss von Atovaquone auf Replikation: Stamm RH, NTE, C56

Die Abbildungen 29 und 30 zeigen die Ergebnisse für Stadienkonversion und Replikation im Vergleich der drei Stämme RH, NTE und C56 stellvertretend am Beispiel des Antibiotikums Atovaquone. Eine stammspezifische Wirksamkeit bestand nicht.

5. Diskussion

Im folgenden sollen die im vorigen Abschnitt aufgeführten in-vitro Ergebnisse mit den in-vivo erhobenen Daten anderer Arbeitsgruppen verglichen werden.

Pyrimethamin (Handelsname Daraprim) wird in Kombination mit Sulfadiazin am häufigsten zur Behandlung der Toxoplasmose eingesetzt und ist als synergistisches Therapeutikum derzeit am wirkungsvollsten.

Pyrimethamin zeigte in dieser Arbeit im Zellkulturexperiment hinsichtlich der Stadienkonversion eine signifikant verstärkte Konversion des Erregers vom Tachyzoiten- in das Bradyzoitenstadium von 4% (Spontanexpression) auf maximal 16%. Zudem nimmt die Anzahl der Erreger pro PV von bis zu 35 pro PV ohne Induktion auf durchschnittlich 1-4 Toxoplasmen pro PV (als Maß für die Verringerung der Replikation) unter Induktion mit Pyrimethamin ab. Eine vollständige Eradikation des Erregers war nicht zu beobachten. Dies steht auch im Einklang damit, dass eine andere Arbeitsgruppe gegen das Zystenstadium von *T. gondii* bei einer Konzentration von 5 µg/ml Pyrimethamin und einer Therapiedauer von 4-8 Tagen in-vitro keine eliminierende Wirkung zeigen konnte (Huskinson-Mark et al. 1991).

Zieht man die Ergebnisse der Bestimmung der Replikationsrate von *T. gondii* mittels ³H-Uracil Einbau hinzu, beeinflusste Pyrimethamin die Proliferationsrate um den Faktor 10 und führte damit zu einer guten Hemmung der Replikation ohne vollständige Eradikation des Parasiten.

Es zeigten sich im Zellkulturmodell keine Unterschiede hinsichtlich Stadienkonversion und Anzahl der Toxoplasmen pro PV nach Behandlung mit Pyrimethamin bei den drei verwendeten Toxoplasmenstämmen NTE, RH und C56. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe einer alleinigen Pyrimethamintherapie 60% der infizierten Mäuse überleben (de Diego et al. 1996).

Sowohl Tiermodell als auch die hier dargestellten Ergebnisse bestätigen somit die Wirkung des Antibiotikums Pyrimethamin. Das Zellkulturmodell wies darauf hin, daß zwar die Replikation des Parasiten gehemmt und die Konversion in das

Zystenstadium durch Pyrimethamin gefördert wurde, ein vollständiges Abtöten bzw. eine Eradikation von *T. gondii* aus dem infizierten Individuum schien unter Therapie mit Pyrimethamin jedoch nicht zu gelingen. Somit ist eine spätere Reaktivierung bei Auftreten einer eventuellen Immunschwäche möglich.

Im Zellkulturmodell wurde eine maximale Induktion des Bradyzoitenstadiums (11%) bei einer Konzentration von **Sulfadiazin** von 0.05 µg/ml erreicht. Die Hemmung der Parasitenreplikation konnte dadurch belegt werden, dass die Anzahl der Parasiten pro PV von bis zu 35 Parasiten auf durchschnittlich 4-15 Parasiten pro PV abnahm. Eine vollständige Eradikation des Erregers war nicht zu beobachten. Unterschiede hinsichtlich Stadienkonversion und Anzahl der Toxoplasmen pro PV nach Behandlung mit Sulfadiazin zeigten sich im Zellkulturmodell bei den drei verwendeten Toxoplasmenstämmen nicht.

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe einer alleinigen Sulfadiazintherapie wie schon bei Pyrimethamin gesehen (intraperitoneale Infektion mit 10^4 Tachyzoiten vom Stamm RH) 60% der infizierten Mäuse überlebten (de Diego et al. 1996). Eine vollständige Eliminierung der Parasiten bei den überlebenden Mäusen war jedoch nicht zu beobachten. In der unbehandelten Kontrollgruppe erfolgte bei allen Mäusen eine frühe Infektion der Lunge mit letalem Ausgang. Gegenüber Toxoplasma-Zysten scheint Sulfadiazin in-vitro bei einer Konzentration von 100 µg/ml und einer Therapiedauer von 4-8 Tagen nur eine limitierende und keine eliminierende Wirkung zu haben (Huskinson-Mark et al. 1991).

Sulfadiazin führte im Tiermodell zum Überleben der Mehrzahl der infizierten Mäuse, obwohl *T. gondii* jedoch weiterhin in den behandelten Tieren nachweisbar war. Die Ergebnisse des Zellkulturexperimentes bestätigten diese Ergebnisse, eine spätere Reaktivierung bei eventuellem Auftreten einer Immunschwäche ist demnach auch nach Therapie mit Sulfadiazin möglich.

Im Zellkulturmodell konnte bei einer Konzentration von **Spiramycin** von 10 µg/ml eine Induktion des Bradyzoitenstadiums auf maximal 7% beobachtet werden. Eine weitere Steigerung der Antibiotikakonzentration zeigte keinen wirkungssteigernden Effekt. Die Anzahl der Parasiten pro PV wurde durch Spiramycin nicht signifikant beeinflusst. Die Wirkung war somit sowohl hinsichtlich Stadienkonversion und Eliminierung der Parasiten auch im Vergleich der verschiedenen Toxoplasmasträmme nicht zufriedenstellend. Unterschiede hinsichtlich Stadienkonversion und Anzahl der Toxoplasmen pro PV nach Behandlung mit Spiramycin zeigten sich im Zellkulturmodell bei den drei verwendeten Toxoplasmenstämmen nicht.

Im Tiermodell mit Rhesusaffen und kongenitaler Toxoplasmose war Spiramycin im Hinblick auf die Transmissionsblockade in der Plazenta gut wirksam. In den Organen des Neugeborenen fand sich kein Nachweis von Parasiten. Spiramycin akkumulierte dabei insbesondere im mütterlichen Gewebe, im Gegensatz zu Pyrimethamin war es im Gehirn der Feten nicht nachweisbar (Schoondermark-van de Ven et al. 1994). Spiramycin verhindert die diaplazentare Passage des Parasiten durch Anreicherung in der Plazenta.

Im Tierexperiment zeigte sich keine Liquorgängigkeit des Antibiotikums, in den in-vitro Versuchen war nur ein begrenzter Effekt hinsichtlich Induktion der Stadienkonversion sowie Reduktion der Anzahl der Parasiten pro parasitophorer Vakuole zu beobachten. Auch bei der Therapie mit Spiramycin ist daher eine spätere Reaktivierung bei eventuellem Auftreten einer Immunschwäche möglich.

Bei den in-vitro Versuchen erbrachte die Behandlung mit **Atovaquone** bei einer Konzentration von 0,2 µg/ml eine Bsa-Expression (d.h. Expression Bradyzoiten-spezifischer Antigene, hier Mak 4F8) von 20%, die Anzahl der Toxoplasmen reduzierte sich unter Therapie auf durchschnittlich 1-4 Parasiten pro PV. Es zeigten sich im Zellkulturmodell keine Unterschiede hinsichtlich Stadienkonversion und Anzahl der Toxoplasmen pro PV nach Behandlung mit

Atovaquone bei den drei verwendeten Toxoplasmenstämmen NTE, RH und C56. Während bei den anderen verwendeten Antibiotika stets 200 PV problemlos ausgezählt werden konnten, zeigte sich unter der Therapie mit Atovaquone eine deutliche Reduktion der parasitophoren Vakuolen, so dass bei einigen Versuchen weniger als 200 parasitophore Vakuolen zur Verfügung standen. Dieser Beobachtung konnte bei allen drei verwendeten Stämmen NTE, RH und C56 gemacht werden.

Vergleicht man diesen auffälligen Befund mit in-vivo Versuchen aus der Literatur, zeigen sich Parallelen. Bei Mäusen, die mit 10-20 parasitophoren Vakuolen des *T.gondii*-Stamms ME49 intraperitoneal infiziert wurden, führte eine Therapie mit Atovaquone zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl von Zysten im Gehirn (Araujo et al. 1992). Inkubierte man Toxoplasma-Zysten in-vitro mit einer Konzentration von 100 µg Atovaquone pro Milliliter für 72 Stunden ergab sich eine deutliche Instabilität der Zysten. Nach Infektion von Mäusen mit diesen vorbehandelten Zysten überlebten alle infizierten Mäuse die Infektion (Araujo et al. 1992). Eine weitere Arbeit zeigte abhängig von der verwendeten Konzentration von Atovaquone einen vollständigen Schutz aller infizierten Mäuse (fünf verwendete Stämme, eingeschlossen den hochvirulenten RH-Stamm). Bei einer Konzentration von 50 mg/kg/Tag Atovaquone für eine Therapiedauer von dreißig Tagen ließen sich bei vier der verwendeten Toxoplasma-Stämme eine Eradikation des Parasiten aus den infizierten Tieren erreichen (Araujo et al. 1991).

Zieht man die Ergebnisse der Bestimmung der Replikationsrate von *T.gondii* mittels ³H-Uracil Einbau hinzu und vergleicht die gewonnenen Ergebnisse mit der schon sehr guten Hemmung von Pyrimethamin (Faktor 10), beeinflusste Atovaquone die Proliferationsrate sogar um den Faktor 20.

Die geschilderten Ergebnisse zeigten Atovaquone sowohl in-vitro als auch in-vivo im Vergleich mit den weiteren getesteten Antibiotika als am besten wirksames Medikament, da es sowohl die akute Infektion therapierte als auch gegen Zysten wirksam war. Trotzdem induziert Atovaquone die Bsa-Expression und

fördert vermutlich auch die Parasitenpersistenz. Eine spätere Reaktivierung bei eventueller Immunschwäche bleibt somit ebenfalls möglich.

Schon in früheren Arbeiten, wie von Derouin et al. (1988) und Pfefferkorn et Borotz (1994) beschrieben, wurde die Beobachtung gemacht, daß **Clindamycin** erst wirksam wurde, nachdem die Toxoplasmen über längere Zeit bzw. mehrere Entwicklungszyklen mit dem Antibiotikum inkubiert wurden. Im Zellkulturexperiment gelang es trotz Inkubation der Parasiten mit Clindamycin über mehrere Entwicklungszyklen vor eigentlicher Induktion mit Clindamycin nicht, eine Wirkung von Clindamycin nachzuweisen. Stadienkonversion und Anzahl der Toxoplasmen pro PV unterschieden sich nicht zwischen untherapiertem Kontrollansatz und Therapieansatz.

Im Tierexperiment konnten Piketty et al. (1990) nach intraperitonealer Infektion von Mäusen mit 10^4 Tachyzoiten vom Stamm RH ebenfalls keinen protektiven Effekt zeigen. Fichera, Bhopale und Roos (1995) berichten dagegen aus ihren in-vitro Versuchen bei Inkubation der Parasiten länger als 25 Stunden unter Clindamycin über einen parasitiziden Effekt. Gegen das Zysten-Stadium zeigte sich in-vitro bei einer Konzentration von 100 µg/ml und einer Therapiedauer von 4-8 Tagen hingegen keine Wirkung (Huskinson-Mark et al. 1991).

Eine Aktivität des Antibiotikums gegen *T. gondii* konnte somit im Tiermodell und in dem hier gezeigten in-vitro Ansatz nicht nachweisen.

Die **Kombination von Pyrimethamin und Sulfadiazin** sollte aufgrund der ähnlichen Wirkungsweise beider Substanzen zu einem synergistischen Effekt führen. Die Kombination ist momentan die effektivste Therapie gegen das Tachyzoitenstadium von *T. gondii* (Groß et al. 1992, Schrod et al. 1991). Die Effektivität beruht auf der Hemmung des Folsäurestoffwechsels mit Blockierung der Folsäurebildung und deren Umwandlung zu Folinsäure (Luft et Remington 1989). Folinsäure wird im Nukleinsäurestoffwechsel als Überträger von Kohlenstoffgruppen benötigt. Die synergistische Wirkung der beiden Antibiotika wird

dadurch bedingt, dass die Dihydrofolatreduktase durch Pyrimethamin, die Dihydrofolatsynthetase durch Sulfadiazin gehemmt wird.

In-vitro zeigte die Kombinationsbehandlung hinsichtlich der Stadienkonversion eine vermehrte Konversion des Erregers in das Bradyzoitenstadium von 4% (Spontanexpression) auf 15%. Zudem nahm die Anzahl der Erreger pro PV von bis zu 35 ohne Induktion auf durchschnittl. 1-4 Toxoplasmen pro PV ab. Im Vergleich zur Induktion mit Pyrimethamin allein waren keine Unterschiede (16 % Mak F8 reaktive PV, 1-4 Toxoplasmen pro PV) zu sehen. Ein synergistischer Effekt ließ sich somit i. Vgl. zur alleinigen Gabe von Pyrimethamin in-vitro nicht darstellen. Im Vgl. zur alleinigen Gabe von Sulfadiazin konnte durch zusätzliche Pyrimethamingabe der Effekt der Replikationshemmung jedoch verstärkt werden. Während bei Verwendung von Sulfadiazin allein (ab 0,05 µg/ml) noch durchschnittlich 4-15 Toxoplasmen pro PV gezählt wurden, reduzierte sich die durchschnittliche Anzahl Toxoplasmen pro PV bei zusätzlicher Gabe von Pyrimethamin (0,04 µg/ml) auf 1-4 Toxoplasmen pro PV.

Es zeigte sich kein Unterschied im Vergleich der drei untersuchten Stämme RH, NTE und C56.

Die klinische Bedeutung der Kombinationsbehandlung mit Pyrimethamin und Sulfadiazin ist unbestritten hoch, trotzdem führte auch die Kombinationsbehandlung mit Pyrimethamin und Sulfadiazin zur Stadienkonversion und begünstigt so die Zystenbildung. Dies bedeutet aber, dass sich der Parasit der körpereigenen Abwehr entziehen kann und damit eine spätere Reaktivierung von Zysten im Gehirn möglich ist.

Die **Kombinationsbehandlung aus Pyrimethamin und Atovaquone** wird in-vivo nicht eingesetzt. In-vitro zeigte die Kombination der beiden Substanzen mit einer Bsa-Expression von 19% und einer Verringerung der Anzahl der Erreger auf durchschnittlich 1-4 Toxoplasmen pro PV keinen Unterschied zur Therapie mit Atovaquone allein. Zusätzlich war jedoch eine signifikante Zystenreduktion

zu beobachten. Ein Synergismus der Kombinationsbehandlung aus Pyrimethamin und Atovaquone konnte nicht gezeigt werden. Unterschiede hinsichtlich Stadienkonversion und Anzahl der Toxoplasmen pro PV nach Antibiotikabehandlung zeigten sich im Zellkulturmodell bei den drei verwendeten Toxoplasmenstämmen nicht.

Bei den drei untersuchten Stämmen RH, NTE und C56 bestand hinsichtlich Stadienkonversion und Anzahl der Toxoplasmen pro PV bei Behandlung mit der Kombination aus Pyrimethamin und Atovaquone kein Unterschied.

Romand et al. (1993) beschrieben einen signifikanten antagonistischen Effekt der Kombination von Atovaquone und Pyrimethamin, der in dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden konnte.

Auch die Kombinationsbehandlung aus Pyrimethamin und Atovaquone führte zu einer vermehrten Konversion von *T. gondii* in das Bradyzoitenstadium. Nachdem eine vollständige Eliminierung des Parasiten ausblieb, ist eine spätere Reaktivierung somit ebenfalls wahrscheinlich.

6. Zusammenfassung

Bedingt durch die Zunahme immungeschwächter Patienten (AIDS, Transplantationspatienten u. a.) wird die Therapie der Toxoplasmose wichtiger. Besonders die Prophylaxe der Reaktivierung einer latenten Toxoplasmose durch vollständige Eradikation des Parasiten bei der Erstinfektion ist hier von zentraler Bedeutung.

Gesucht werden Substanzen, die neben einer Abtötung der Tachyzoiten und damit einer wirksamen Therapie der Akutinfektion entsprechen, auch Substanzen, die die Stadienkonversion des Parasiten in das Bradyzoitenstadium mit Zystenbildung verhindern. Nur so kann eine Reaktivierung einer latenten Toxoplasmose bei Immunschwächeerkrankungen unterbunden werden.

Die in-vitro Versuche zeigten bei fast allen verwendeten Antibiotika eine Aktivität. Das hier beschriebene Testsystem ist geeignet, neue Chemotherapeutika auf ihre Wirkung hinsichtlich Induktion der Stadienkonversion von *T. gondii* sowie hinsichtlich eines parasitiziden Effektes zu untersuchen. Die aufwendige Messung der Proliferationsrate mittels spezifischer Markierung durch den Einbau von ^3H -Uracil bewies die Richtigkeit der Ergebnisse und kann als zusätzliche Bestätigung herangezogen werden.

In dieser Arbeit konnte die in der Routine eingesetzte Therapie mit einer Kombination aus Pyrimethamin und Sulfadiazin als wirksamste Kombination bestätigt werden. Die Kombination zeigte eine gute Eliminierung der Toxoplasmen im Tachyzoitenstadium, bewirkte aber auch eine Stadienkonversion. Das neu entwickelte Antibiotikum Atovaquone konnte die Replikation von Tachyzoiten am stärksten inhibieren. Alle untersuchten Substanzen führten jedoch zu einer Induktion der Stadienkonversion und somit letztlich zur Ausbildung von Zysten, mit der sich der Parasit der Immunabwehr entziehen kann. Keines der verwendeten Antibiotika kann die Erregerpersistenz also vollständig unterbinden.

7. Literaturverzeichnis

Araujo FG, Huskinson-Mark J, Remington JS: Remarkable in-vitro and in-vivo Activities of Hydroxynaphtoquinone 566C80 against Tachyzoites and Tissue Cysts of *T. gondii*. Agents and Chemotherapy, Feb 1991, 293-299

Araujo FG, Huskinson-Mark J, Gutteridge WE, Remington JS: In-vitro and in-vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 566C80 against the cyst form of *Toxoplasma gondii*. Antimicrob Agents Chemother 1992 Feb;36(2):326-30

Araujo FG, Lin T, Remington JS: The activity of atovaquone (566C80) in murine toxoplasmosis is markedly augmented when used in combination with pyrimethamine or sulfadiazine. J Infect Dis 1993 Feb;167(2):494-7

Beckers CJ, Roos DS, Donald RG, Luft BJ, Schwab JC, Cao Y, Joiner KA: Inhibition of cytoplasmic and organellar protein synthesis in *Toxoplasma gondii*. Implications for the target of macrolide antibiotics. J Clin Invest 1995 Jan;95(1):367-76

Bohne W, Heesemann J, Groß U: Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon treated mouse macrophages. Infect Immun 61(1993): 1141-45

Blais J, Tardif C, Chamberland S: Effect of clindamycin on intracellular replication, protein synthesis, and infectivity of *Toxoplasma*. Antimicrob Agents Chemother 1993 Dec;37(12):2571-7

Derouin F, Nalpas J, Chastang C: In-vitro measurement of the inhibitory effect of macrolides, lincosamides and synergestines on the growth of *Toxoplasma gondii*. Pathol Biol (Paris) 1988 Dec;36(10):1204-10

Derouin F, Chastang C: In-vitro effects of folate inhibitors on *Toxoplasma gondii*. Antimicrob Agents Chemother 1989 Oct;33(10):1753-9

de Medeiros BC, de Medeiros CR, Werner B, Loddo G, Pasquini R, Bleggi-Torres LF: Disseminated toxoplasmosis after bone marrow transplantation: report of 9 cases. Transpl Infect Dis 2001 Mar;3(1):24-8

de Diego JA, Penin P, Arribas JR, Vazquez E, Vazquez JJ: A clinical-parasitological monotherapy cure in the treatment of experimental infection by a highly virulent strain of *Toxoplasma gondii*. Folia Microbiol (Praha)1996;41(6):513-6

Djurkovic-Djakovic O, Nikolic T, Robert-Gangneux F, Bobic B, Nikolic A: Synergistic effect of clindamycin and atovaquone in acute murine toxoplasmosis. Antimicrob Agents Chemother 1999 Sep;43(9):2240-4

Ferguson DJ, Huskinson-Mark J, Araujo FG, Remington JS: An ultrastructural study of the effect of treatment with atovaquone in brains of mice chronically infected with the ME49 strain of *Toxoplasma gondii*. Int J Exp Pathol 1994 Apr;75(2):111-6

Fichera ME, Bhopale MK, Roos DS: In-vitro assays elucidate peculiar kinetics of clindamycin action against *Toxoplasma gondii*. Antimicrob Agents Chemother 1995 Jul;39(7):1530-7

Groß U, Müller WA, Knapp S and Heesemann J: Identification of a virulence-associated antigen of *Toxoplasma gondii* by a mouse monoklonal antibody. Infect. Immun. 59 (1991): 4511-4516

Groß U: Klinik, Diagnostik und Therapie von Infektionen mit *Toxoplasma gondii*. mta 7 (1992) 1117-26

Groß U, Bohne W: *Toxoplasma gondii*: strain- and host cell-dependent induction of stage differentiation. J Eukaryot Microbiol 1994 Sep-Oct;41(5):10-11

Gross U., Bohne W, Luder CG, Lugert R, Seeber F, Dittrich C, Pohl F, Ferguson DJ: Regulation of developmental differentiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. J Eukaryot Microbiol 1996 Sep-Oct;43(5):114-116

Gross U, Pohl F: Influence of antimicrobial agents on replication and stage conversion of *Toxoplasma gondii*. Curr Top Microbiol Immunol 1996;219:235-45

Haile LG, Flaherty JF: Atovaquone: a review. Ann Pharmacother 1993 Dec;27(12):1488-94

Herold H: Toxoplasmose. Innere Medizin, Lehrbuch Ausgabe 1999: 702

Hubbard G, Witt W, Healy M, Schmidt R: An outbreak of toxoplasmosis in zoo birds. Vet Pathol 1986 Sep;23(5):639-41

Huskinson-Mark J, Araujo FG, Remington JS: Evaluation of the effect of drugs on the cyst form of *Toxoplasma gondii*. J Infect Dis 1991 Jul;164(1):170-1

Kovacs et al. Efficacy of atovaquone in treatment of toxoplasmosis in patients with AIDS; Short report; The Lancet; Vol 340; Sept. 1992, S. 637

Luft BJ, Remington JS: Toxoplasmosis. In: P.D. Hoeprich, M.C. Jordan (eds): Infectious Diseases. J.B. Lippincott Company, Philadelphia (1989) 1199

Manson-Bahr PEC: Communicable Disease Report. Vol 2, Number 10, March 1992 : 43-46

Mittelviehhaus H: Behandlung der okulären Toxoplasmose. Aktuelle Augenheilkunde 17 (1992) 225

Nicolle D, Manceaux L: Sur une infection a corps de Leishman du gondii. Compt. Rend. de l'Acad. Sci. (Paris) 147 (1908) 763

Parmley SF, Gross U, Sucharczuk A, Windeck T, Sgarlato GD, Remington JS: Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol 1994 Apr;80(2):293-301

Pfefferkorn ER, Pfefferkorn LC: *Toxoplasma gondii*: Specific Labeling of Nucleic Acids of Intracellular Parasites in Lesch-Nyhan Cells. Experimental Parasitology 41, 95-104 (1977)

Pfefferkorn ER, Borotz SE, Nothnagel RF: Mutants of *Toxoplasma gondii* resistant to atovaquone (566C80) or decoquinate. J Parasitol 1993 Aug;79(4):559-64

Pfefferkorn ER, Borotz SE: Comparison of mutants of *Toxoplasma gondii* selected for resistance to azithromycin, spiramycin, or clindamycin. Antimicrob Agents Chemother 1994 Jan;38(1):31-7

Piketty C, Derouin F, Rouveix B, Pocard JJ: In-vivo assessment of antimicrobial agents against *Toxoplasma gondii* by quantification of parasites in the blood, lungs, and brain of infected mice. Antimicrob Agents Chemother 1990 Aug;34(8):1467-72

Porter SB, Sande MA: Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med. 1992 Dec 3;327(23):1643-8

Romand S, Pudney M, Derouin F: 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 Nov;37(11):2371-8

Schäffler A, Altekrüger I: Toxoplasmose. Mikrobiologie und Immunologie. Jungjohann Verlag 1990, 123

Schoondermark-Van de Ven E, Melchers W, Camps W, Eskes T, Meuwissen J, Galama J: Effectiveness of spiramycin for treatment of congenital *Toxoplasma gondii* infection in rhesus monkeys. Antimicrob Agents Chemother 1994 Sep;38(9):1930-6

Schoondermark-Van de Ven E, Galama J, Camps W, Vree T, Russel F, Meuwissen J, Melchers W: Pharmacokinetics of spiramycin in the rhesus monkey: transplacental passage and distribution in tissue in the fetus. Antimicrob Agents Chemother 1994 Sep;38(9):1922-9

Schrod L, Roos T, Groß U, Müller JG: Konnatale Toxoplasmose – Probleme der Diagnostik und Therapie. Pädiat. Prax. 43 (1991) 3-13

Simon, Stille: Antibiotikatherapie in Klinik und Praxis, 8.Auflage 1993, Schattauerverlag, 168-187

Tabbara KF, O'Connor GR: Treatment of ocular toxoplasmosis with clindamycin and sulfadiazine. Ophthalmology 1980 Feb;87(2):129-34

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Uwe Groß für die freundliche Überlassung des Themas und herzlich für seine Geduld und Hilfe. Speziell möchte ich mich bei Anne Wirsing und Karoline Kohler für die vielen praktischen Anleitungen und Tips im und ums Labor bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Flentje für die Übernahme des Korreferats und Herrn Priv.-Doz. Dr. Kristen, der sich zum Rigorosum als Zweitprüfer bereitgefunden hat.

Lebenslauf

Fabian Ulrich Pohl

Geburtsdatum 10. Juli 1969
Geburtsort Kassel
Nationalität deutsch
Familienstand ledig

Schulbildung

1975 - 1979 Grundschule Harleshausen in Kassel
1979 - 1988 Engelsburggymnasium in Kassel; Abschluß: Abitur
1988 - 1989 Wehrdienst

Hochschulbildung

1989 - 1996 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

Berufsausbildung

1996 - 1997 Arzt im Praktikum in der Klinik für Strahlentherapie der Universitätsklinik Würzburg
01. Januar 1998 Approbation als Arzt
1998 - 2002 Assistent in der Klinik für Strahlentherapie der Universitätsklinik Würzburg in der Ausbildung zum Facharzt