

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und
Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

Identifikation neuer Wirkstoffe für die Inhibition von *Toxoplasma gondii*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sarah Schmidt

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Pfeffer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Jörg Timm

Zusammenfassung

T. gondii ist als ein weltweit verbreiteter Parasit für zahlreiche Erkrankungen verantwortlich. Durch seine Bedeutung als humanpathogener Erreger ist er sowohl Verursacher von Embryo- sowie Fetopathien, als auch für eine Vielzahl von Todesfällen bei Patienten/-innen ursächlich, deren Immunsystem sich in einem supprimierten oder defizienten Zustand befindet. Ähnlich wie in der antibakteriellen Therapie, treten bei der antiinfektiven Behandlung von *T. gondii* zunehmende Resistenzentwicklungen auf, die eine Eradikation des Parasiten erschweren. Hinzu kommt die Problematik, dass die bisher im klinischen Bereich eingesetzten Wirkstoffe lediglich auf parasitostatischer Ebene wirken. Aus diesem Grund ist die Identifikation neuer Wirkstoffe gegen *T. gondii* notwendig.

In dieser Arbeit konnten mehrere aussichtsreiche Wirkstoffe identifiziert werden, die das Wachstum von *T. gondii* inhibieren. Dabei ließ sich in der Zellkultur mittels Toxoplasmen-Proliferationstests nicht nur eine Hemmung auf den intermediär virulenten *T. gondii* Stamm ME49 (Typ II) feststellen, sondern auch eine vergleichbare Inhibition auf den hochvirulenten *T. gondii* Stamm BK (Typ I) nachweisen. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse konnte in weiteren Untersuchungen durch mindestens dreimaliges Wiederholen des Toxoplasmen-Proliferationstests unter gleichen Versuchsbedingungen geprüft werden.

Des Weiteren wurde die Potenz der neuen Wirkstoffe mit denen der klinisch bereits etablierten antiparasitären Wirkstoffe verglichen. Dafür herangezogen wurden die Antibiotika Cotrimoxazol, bestehend aus Trimethoprim und Sulfamethoxazol, sowie Clindamycin.

Die in dieser Arbeit getesteten Wirkstoffe sind Sekundärmetabolite aus marinen Schwämmen, Pflanzen und endophytischen Pilzen. Von insgesamt 151 getesteten Wirkstoffen und deren Derivaten konnten nun 13 identifiziert werden, die mit einem ähnlichen EC_{50} -Wert inhibierend auf *T. gondii* wirken wie bereits klinisch eingesetzte Antibiotika.

Als Substanzen mit einer guten inhibitorischen Aktivität wurden diejenigen definiert, deren durchschnittlicher EC_{50} -Wert kleiner gleich $10 \mu\text{M}$ ist. Diese konnten folglich als potentiell wirksame Kandidaten für die Inhibition von *T. gondii* in Betracht gezogen werden.

Im Hinblick auf die gleichzeitige Hemmung beider *T. gondii* Stämme ließen sich drei der neu getesteten Wirkstoffe mit guter inhibitorischer Potenz von kleiner gleich $10 \mu\text{M}$ identifizieren. Diese sind 3-O-Methylgallic acid butyl ester, BrPhenethylamide und Hexylamide. Eine gute inhibitorische Aktivität gegen den *T. gondii* Stamm ME49 besaßen weiterhin noch (+) Avarol, Alternariol, Neobavaisoflavone und Piperin. Betrachtete man die Potenz der Wirkstoffe gegen den *T. gondii* Stamm BK, so ließ sich darüber hinaus die Wirkung von Berberin hemisulfat als vielversprechend beurteilen.

Demzufolge konnten in dieser Arbeit von den 13 auserwählten Wirkstoffen insgesamt acht identifiziert werden, deren inhibitorische Potenz neben der bereits in der Klinik verwendeter Antibiotika als gut bezeichnet werden kann und die somit vielversprechende Kandidaten in der Entwicklung neuer Substanzen zur Behandlung der von *T. gondii* verursachten Infektionskrankheit Toxoplasmose darstellen.

Abstract

As a globally prevalent parasite, *T. gondii* is responsible for numerous diseases. Due to its importance as a human pathogenic agent, it not only causes embryo- and fetopathies but also a large number of deaths in patients whose immune system is in a suppressed or deficient state. Similar to antibacterial therapy, the anti-infective treatment of *T. gondii* is affected by the increasing development of resistance, which complicates eradication of the parasite. Additionally, there is the problem that the active substances currently used in the clinical practice only act on a parasitostatic level. For this reason, the identification of novel substances against *T. gondii* is urgent.

In this work several promising substances could be identified which inhibit the growth of *T. gondii*. Thus, in cell culture by means of toxoplasma proliferation tests not only an inhibition on the intermediate virulent *T. gondii* strain ME49 (type II) was determined, but also a comparable effect on the highly virulent *T. gondii* strain BK (type I) could be observed. The reproducibility of the results could be tested in corroborating investigations by repeating the toxoplasma proliferation tests at least three times under the same experimental conditions.

Furthermore, the potency of this new natural products was compared with those of clinically established antibiotic agents. For this purpose, the antibiotics Cotrimoxazole, consisting of Trimethoprim and Sulfamethoxazole, and Clindamycin were used.

The substances tested in this work are secondary metabolites of marine sponges, plants and endophytic fungi. Of a total of 151 tested natural products and derivatives thereof, 13 substances have been identified which inhibit the proliferation of *T. gondii* with a comparable EC₅₀ value as established antibiotics.

Defined as substances with a good inhibitory activity were those, whose EC₅₀ value average less than or equal to 10 µM. These were considered as potentially potent candidates for the inhibition of *T. gondii*.

With regard to the simultaneous inhibition on both *T. gondii* strains, three of the newly tested active products with good inhibitory potency of less than 10 µM could be identified. In particular, these encompass 3-O-Methylgallic acid butyl ester, BrPhenethylamide and Hexylamide. Furthermore, a good inhibitory activity against *T. gondii* strain ME49 also was shown by (+) Avarol, Alternariol, Neobavaisoflavone and Piperine. Considering the potency of the substances against the *T. gondii* strain BK, the effect of Berberin hemisulfate could be assessed as promising.

Taken together, out of these 13 selected active products, eight of them were identified whose inhibitory potency can be considered as good besides the antibiotics already used in clinical practice. Therefore, they represent promising candidates in the development of new substances in the treatment of toxoplasmosis, the infectious disease caused by *T. gondii*.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abstract.....	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Der Parasit <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Übertragungswege und globale Verbreitung von <i>T. gondii</i>	1
1.1.3 Lebenszyklus.....	2
1.2 <i>T. gondii</i> Stämme.....	5
1.2.1 Typische <i>T. gondii</i> Stämme.....	5
1.2.2 Atypische <i>T. gondii</i> Stämme.....	5
1.3 Humane Toxoplasmose.....	5
1.3.1 Postnatale Toxoplasmose.....	6
1.3.2 Pränatale (kongenitale) Toxoplasmose.....	6
1.4 Diagnose der Infektion mit <i>T. gondii</i>	8
1.5 Bisherige Therapiemöglichkeiten.....	8
1.6 Neue Wirkstoffe gegen <i>T. gondii</i>	10
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	12
2 Material.....	14
2.1 Verbrauchsmaterial.....	14
2.2 Chemikalien.....	14
2.3 Medien.....	15
2.4 Zytokine.....	15
2.5 Zelllinien.....	15
2.6 Parasitenstämme.....	15

2.7 Antibiotika	15
2.8. Wirkstoffe	16
2.9 Geräte	23
2.10 Software.....	24
3 Methoden	25
3.1 Zellkultur	25
3.1.1 Kultivierung von Zelllinien.....	25
3.1.1.1 Kultivierung von HS27 Fibroblasten	25
3.1.1.2 Kultivierung von A2 Glioblastomzellen	25
3.1.2 Kultivierung von <i>T. gondii</i>	26
3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen und Parasiten	26
3.2 Toxoplasmen-Proliferationstests.....	27
3.2.1 Vorbereitung der Zelllinien und anschließende <i>T. gondii</i> Infektion unter Zugabe der Wirkstoffe	27
3.2.2 Quantitativer Nachweis der <i>T. gondii</i> Proliferation.....	28
3.2.3 Ermitteln der mittleren effektiven Wirk-Konzentration EC ₅₀	29
4 Ergebnisse.....	30
4.1 Identifikation von Substanzen mit Hemmung auf <i>T. gondii</i>	30
4.2 Toxoplasmen-Proliferationstests.....	37
4.2.1 Ergebnisse für den <i>T. gondii</i> Typ II Stamm ME49	37
4.2.1.1 Wirkung der Naturstoffe auf den <i>T. gondii</i> Stamm ME49	37
4.2.1.2 Wirkung bekannter Antibiotika auf den <i>T. gondii</i> Stamm ME49.....	45
4.2.2 Ergebnisse für den <i>T. gondii</i> Typ I Stamm BK.....	47
4.2.2.1 Wirkung der Naturstoffe auf den <i>T. gondii</i> Stamm BK.....	47
4.2.2.2 Wirkung bekannter Antibiotika auf den <i>T. gondii</i> Stamm BK.....	55
4.2.3 Tabellarische Darstellung der ermittelten EC ₅₀ -Werte für die <i>T. gondii</i> Stämme ME49 und BK	57
5 Diskussion und Schlussfolgerungen	59
5.1 <i>T. gondii</i> und neue Wirkstoffe	59
5.2 Eigenschaften der identifizierten Wirkstoffe.....	59
5.2.1 (-) Matairesinol.....	59

5.2.2 (+) Avarol	60
5.2.3 3-O-Methylgallic acid butyl ester	61
5.2.4 Alternariol.....	62
5.2.5 Berberin hemisulfat.....	63
5.2.6 Br ₂ Hexylamide.....	64
5.2.7 BrPhenethylamide	64
5.2.8 Corynesidone A	65
5.2.9 Hexylamide.....	65
5.2.10 Neobavaisoflavone.....	65
5.2.11 Piperin.....	66
5.2.12 Roquefortin C	66
5.2.13 Tetrahydroxybostricin.....	67
5.3 Beurteilung der inhibitorischen Potenz der Wirkstoffe auf <i>T. gondii</i>	67
5.4 Ausblick auf weiterführende Untersuchungen der Wirkstoffe	68
6 Literatur- und Quellenverzeichnis	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lebenszyklus von <i>T. gondii</i>	4
Abbildung 4.1: Wirkung steigender Konzentrationen von (-) Matairesinol auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes ME49.	37
Abbildung 4.2: Wirkung steigender Konzentrationen von (+) Avarol auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes ME49.	38
Abbildung 4.3: Wirkung steigender Konzentrationen von 3-O-Methylgallic acid butyl ester auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes ME49.....	38
Abbildung 4.4: Wirkung steigender Konzentrationen von Alternariol auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes ME49.	39
Abbildung 4.5: Wirkung steigender Konzentrationen von Berberin hemisulfat auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes ME49.	39
Abbildung 4.6: Wirkung steigender Konzentrationen von Br ₂ Hexylamide auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes ME49.	40
Abbildung 4.7: Wirkung steigender Konzentrationen von BrPhenethylamide auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes ME49.	40
Abbildung 4.8: Wirkung steigender Konzentrationen von Corynesidone A auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes ME49.	41
Abbildung 4.9: Wirkung steigender Konzentrationen von Hexylamide auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes ME49.	41
Abbildung 4.10: Wirkung steigender Konzentrationen von Neobavaisoflavone auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes ME49.	42
Abbildung 4.11: Wirkung steigender Konzentrationen von Piperin auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes ME49.	42
Abbildung 4.12: Wirkung steigender Konzentrationen von Roquefortin C auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes ME49.	43
Abbildung 4.13: Wirkung steigender Konzentrationen von Tetrahydroxybostricin auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes ME49.	43
Abbildung 4.14: Wirkung steigender Konzentrationen von Cotrimoxazol auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes ME49.	45
Abbildung 4.15: Wirkung steigender Konzentrationen von Clindamycin auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes ME49.	45
Abbildung 4.16: Wirkung steigender Konzentrationen von (-) Matairesinol auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes BK.	47

Abbildung 4.17: Wirkung steigender Konzentrationen von (+) Avarol auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes BK.....	48
Abbildung 4.18: Wirkung steigender Konzentrationen von 3-O-Methylgallic acid butyl ester auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes BK.	48
Abbildung 4.19: Wirkung steigender Konzentrationen von Alternariol auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes BK.....	49
Abbildung 4.20: Wirkung steigender Konzentrationen von Berberin hemisulfat auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes BK.....	49
Abbildung 4.21: Wirkung steigender Konzentrationen von Br ₂ Hexylamide auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes BK.....	50
Abbildung 4.22: Wirkung steigender Konzentrationen von BrPhenethylamide auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes BK.....	50
Abbildung 4.23: Wirkung steigender Konzentrationen von Corynesidone A auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes BK.....	51
Abbildung 4.24: Wirkung steigender Konzentrationen von Hexylamide auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes BK.....	51
Abbildung 4.25: Wirkung steigender Konzentrationen von Neobavaisoflavone auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes BK.....	52
Abbildung 4.26: Wirkung steigender Konzentrationen von Piperin auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes BK.....	52
Abbildung 4.27: Wirkung steigender Konzentrationen von Roquefortin C auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes BK.....	53
Abbildung 4.28: Wirkung steigender Konzentrationen von Tetrahydroxybostricin auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes BK.....	53
Abbildung 4.29: Wirkung steigender Konzentrationen von Cotrimoxazol auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes BK.....	55
Abbildung 4.30: Wirkung steigender Konzentrationen von Clindamycin auf die Proliferation des <i>T. gondii</i> Stammes BK.....	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Vollständige alphabetische Auflistung der getesteten Wirkstoffe.....	16
Tabelle 2.2: Auflistung der Wirkstoffe mit inhibitorischer Aktivität auf <i>T. gondii</i>	21
Tabelle 4.1: Effekt der Wirkstoffe auf den <i>T. gondii</i> Stamm ME49 in Vorversuchen.	30
Tabelle 4.2: Übersicht der EC ₅₀ -Werte der Wirkstoffe für den <i>T. gondii</i> Stamm ME49.....	44
Tabelle 4.3: Übersicht der EC ₅₀ -Werte der Wirkstoffe für den <i>T. gondii</i> Stamm BK.	54
Tabelle 4.4: Gegenüberstellung der mittleren EC ₅₀ -Werte der Wirkstoffe für die <i>T. gondii</i> Stämme ME49 und BK.	57

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
∅	Mittelwert
³ HU	³ H-Uracil: Tritium-markiertes Uracil
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cpm	<i>counts per minute</i> (Zählschritte pro Minute)
d	<i>day</i> (Tag)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
griech.	griechisch
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i> (Hepatozyten-Wachstumsfaktor)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
i.v.	intravenös
IFN _γ	Interferon gamma
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>

iNO	Induzierbares Stickoxid
Interleukin-1 β	Interleukin-1 beta
kg	Kilogramm
LD ₁₀₀	letale Dosis, an der 100 % der Tiere versterben
log	Logarithmus
MANF	<i>Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor</i>
MAO	Monoaminoxidase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MtpB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Protein-Tyrosin-Phosphatase
mROS	Mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies
NF- κ B	Nukleärer Faktor kappa B
NFATc1	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
p.o.	per os, oral
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PPAR- γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SCA17	Spinozerebelläre Ataxie 17
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TGF- β 1	<i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAIL	<i>Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand</i>

U

units (Einheiten)

x *g*

Mehrfaches der Erdbeschleunigung

z.B.

zum Beispiel

μl

Mikroliter

μM

Mikromolar

1 Einleitung

1.1 Der Parasit *Toxoplasma gondii*

1.1.1 Definition

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der erstmals 1908 durch Nicolle und Manceaux beschrieben wurde. Seinen Namen erhielt er aufgrund der typisch bogenförmigen Morphologie (*toxon*, griech. = Bogen, *plasma*, griech. = Form) sowie durch das nordafrikanische Nagetier *Ctenodactylus gundi*, auch *Eigentliche Gundi* genannt, in dem *T. gondii* zum ersten Mal entdeckt wurde [1].

Taxonomisch zugeordnet wird *T. gondii* als eukaryontischer, einzelliger Parasit den Protozoen. Hier gehört er dem Stamm der Apicomplexa an, weiter unterteilt in die Unterklasse der zystenbildenden Coccidia [2]. Als weitere Vertreter des Stammes der Apicomplexa lassen sich bspw. die ebenfalls humanpathogenen Parasiten *Plasmodium falciparum*, welche die Erreger der Malaria darstellen, wie auch *Cryptosporidium parvum*, die die sogenannte Kryptosporidiose hervorrufen, nennen. Namensgebend und somit gemeinsam ist allen Vertretern dieses Phylums der Apikalkomplex. Dies ist eine Struktur aus Elementen des mikrotubulären Zytoskeletts, dem Conoid, und verschiedenen sekretorischen Organellen. Beispiele für letztere sind Rhoptrien, Mikronemen sowie „Dichte Granula“-Proteine. Diese Organellen übernehmen einen entscheidenden Anteil bei der Wirtszellinvasion, wo sie die Entstehung einer parasitophoren Vakuole für die Entwicklung und Vermehrung von *T. gondii* ermöglichen [3].

1.1.2 Übertragungswege und globale Verbreitung von *T. gondii*

T. gondii zeigt eine geringe Spezifität bezüglich seiner Wirtszellen, sodass mithilfe dieses breiten Spektrums an Zelltypen, in die der Parasit eindringen kann, eine Infektion beinahe jedes Lebewesens mit einem warmblütigen Stoffwechsel möglich ist. Die globale Durchseuchung mit dem Erreger ist sowohl in Menschen als auch in Tieren hoch. Vor allem Katzen sowie katzenartige Raubtiere (*Felidae*), die die Endwirte einer Infektion mit Toxoplasmen darstellen (s.u.), weisen unter den wild lebenden Tieren eine Infektionsrate von nahezu 100 % auf, während die weltweite Prävalenz von *T. gondii* in Hauskatzen lediglich um die 30 - 40 % beträgt [4].

Insbesondere im Bezug auf die humane Bevölkerung ist *T. gondii* als Erreger der Toxoplasmose global einer der am häufigsten vorkommenden Parasiten mit einer durchschnittlichen Durchseuchung von bis zu 30 % der Weltbevölkerung, wobei die Verbreitung dieser chronischen Infektion innerhalb geographischer sowie ethnischer Grenzen variabel ist. In wärmeren Klimaregionen ist die Prävalenz höher als in denen mit kälteren Temperaturen: während bspw. die Anzahl seropositiver Menschen in Afrika und Südamerika bei schätzungsweise 80 % liegt, beträgt die Infektionsrate in Zonen gemäßigten Klimas, zu denen Zentraleuropa und damit auch Deutschland gehört, ca. 40 - 60 %. Skandinavien, ein Gebiet mit kälterem Klima, weist dabei nur etwa 30 % mit *T. gondii*

infizierte Einwohner auf [5]. Ebenso ist die Anzahl infizierter Menschen in Entwicklungsländern deutlich erhöht im Vergleich zu Industrieländern [6]. Ein weiterer Risikofaktor für eine Infektion ist das zunehmende Lebensalter. Grundsätzlich zählt die Toxoplasmose damit zu den häufigsten Krankheiten der Weltbevölkerung [7] und stellt allein in den USA die dritthäufigste Todesursache im Hinblick auf durch Lebensmittel übertragene Erreger dar [8].

Es gibt verschiedene Wege, die beim Menschen zu einer Toxoplasmen-Infektion führen können. Zum einen kann dies über die orale Aufnahme von sogenannten Oozysten (s.u.) aus der Umwelt geschehen. Die Aufnahme von Oozysten über den Kontakt mit Katzenkot spielt dabei eine wesentliche Rolle. Bei der fäkal-oralen Infektion findet die Übertragung der *T. gondii* Oozysten z.B. durch das Trinken von kontaminiertem Wasser [9] oder den Konsum von verunreinigtem Obst und Gemüse [10] statt. Eine der wichtigsten Infektionsquellen repräsentiert der Verzehr von *T. gondii* Zysten in Fleisch, das entweder roh ist oder aber nicht genügend durchgegart wurde (karnivore Infektion) [6]. Das unterschiedliche Ernährungsverhalten in den verschiedenen Gebieten der Erde stellt demnach einen wichtigen Beeinflussungsfaktor der Infektionsprävalenz dar, wobei hier vor allem die Häufigkeit des Fleischverzehrs zu nennen ist [11]. In Deutschland ist insbesondere im Fleisch von Geflügel eine Prävalenz der parasitären Gewebezysten von bis zu 20 % zu beobachten [12], während sowohl im Schweine- als auch im Schafsfleisch mittlerweile ein rückläufiger Durchseuchungsgrad festzustellen ist [13; 14]. Neben den bereits genannten Infektionswegen ist zum anderen aber auch eine kongenitale Übertragung der Parasiten von der Mutter auf ihr ungeborenes Kind möglich, sofern diese sich während der Schwangerschaft erstmalig mit *T. gondii* infiziert [5]. Darüber hinaus ist eine Übertragung durch Organtransplantationen [15] sowie Bluttransfusionen [16] möglich, aufgrund der hohen medizinischen Sicherheitsstandards heutzutage allerdings sehr selten.

1.1.3 Lebenszyklus

Während seines Lebenszyklus lassen sich mehrere Stadien unterscheiden, die *T. gondii* durchläuft. Diese Stadien werden durch drei unterschiedlich infektiöse Formen des Parasiten, den sogenannten Sporozoiten, Tachyzoiten und Bradyzoiten, repräsentiert. Die Vermehrung von *T. gondii* findet sowohl sexuell in seinem Endwirt als auch asexuell in den verschiedenen Zwischenwirten statt [17].

Der Endwirt und damit Ort der sexuellen Vermehrung von *T. gondii* ist die Hauskatze bzw. andere katzenartige Tiere der Gattung der *Felidae* [1]. Diese nehmen *T. gondii* Gewebezysten mit Bradyzoiten in Form infizierter Beutetiere auf. Im Magen und Dünndarm der Katze wird die Hülle der Gewebezysten durch die proteolytischen Enzyme des Verdauungstraktes, wie bspw. Pepsin, aufgelöst, sodass die darin befindlichen Bradyzoiten in den Magen-Darm-Trakt freigesetzt werden, ohne dabei aber selbst von den Verdauungsenzymen beschädigt zu werden. Von dort aus können sie in die Epithelzellen des Dünndarms eindringen, wo sie sich vorerst im Rahmen der Schizogonie asexuell teilen und so fünf morphologische Stadien ausbilden, die sogenannten Typ A bis E Schizonten [18]. Nach der Replikation (Merogonie) und somit ca. zwei Tage nach *T. gondii* Zysten-Aufnahme wird der sexuelle Vermehrungszyklus initiiert. Dabei differenzieren sich Schizonten vom Typ

D und E in weibliche und männliche Gameten (Gametogonie). Maximal zwei Wochen nach Aufnahme befinden sich im gesamten Dünndarm, insbesondere im Ileum, weibliche Makrogameten und männliche Mikrogameten, welche miteinander verschmelzen und auf diese Weise eine diploide Oozyste bilden. Nachdem die infizierten Dünndarmepithelzellen rupturiert sind, gelangen diese unsporulierten Oozysten in das Darmlumen der Katze und werden nachfolgend mit dem Faeces in die Umwelt ausgeschieden [19].

Die Oozysten besitzen eine fünfflagige und damit sehr widerstandsfähige Zellwand, sodass eine feuchte Umgebung mit Temperaturen von 0 bis 45 °C auch über einen längeren Zeitraum keine Beeinträchtigung der Infektiosität darstellt. In einem feuchten bis tropischen Klima kann die Infektiosität sogar Monate bis Jahre anhalten [19]. Je nach äußerer Temperatur sowie lokaler Sauerstoffsättigung erfolgt die Sporulation ein bis fünf Tage nach Ausscheidung der unsporulierten Oozysten durch meiotische Reduktionsteilung. Dabei entwickeln sich zwei Sporoblasten mit je vier haploiden Sporozoiten, die hochinfektiös sind [20]. Die sporulierten Oozysten wiederum können von ihren Zwischenwirten, wie z.B. Menschen oder Tieren, oral aufgenommen werden und gelangen so in den Darm. Dort werden die insgesamt acht Sporozoiten aus der jeweiligen Oozyste freigesetzt, um sich zu Tachyzoiten zu entwickeln. Tachyzoiten stellen die sich schnell replizierende Form der Toxoplasmen dar und sind im Stande, aktiv in die Zellen des Darmepithels des Zwischenwirts einzudringen [21].

Innerhalb der Wirtszellen ist *T. gondii* von einer parasitophoren Vakuole umgeben, die hauptsächlich aus Komponenten der Wirtszellmembran besteht und es vor einer Schädigung durch das endolysosomale System des Wirtes beschützt [22]. In der akuten Phase der Infektion vermehren sich die Tachyzoiten mittels Endodyogenie rapide innerhalb der parasitophoren Vakuole bishin zur Ruptur der Wirtszelle, sobald diese die große Zahl der Tachyzoiten nach mehreren Teilungszyklen nicht mehr fassen kann [23]. Die Parasiten, die dabei freigesetzt werden, durchdringen das Darmepithel des Zwischenwirts und gelangen hämatogen wie auch lymphogen in den gesamten Organismus. Bei der akuten Infektion, in der die frei gewordenen Tachyzoiten erneut benachbarte Zellen infizieren, sind bevorzugt viszerale Organe wie Lunge und Leber befallen [24]. Diese Phase wird durch die stark einsetzende Immunantwort begrenzt. Um dieser zu entgehen, kommt es zu einer Stadienkonversion von *T. gondii*, bei der sich die Tachyzoiten zu Bradyzoiten differenzieren. Letztere befinden sich in Gewebezysten und sind charakterisiert durch eine nur langsame Replikation einschließlich einem verringerten Metabolismus. Die Zystenhülle ist hierbei verantwortlich für die Phase der chronischen Infektion, in der die Zyste durch Teilung der Bradyzoiten wächst und so Hunderte von Parasiten fassen kann [17]. Auf diese Weise wird keine inflammatorische Immunantwort und daher auch keine klinische Symptomatik im Rahmen einer latenten Toxoplasmeninfektion ausgelöst [25].

Gewebezysten persistieren vor allem in Gehirn, Herz und Skelettmuskulatur sowie im Auge, wo sie lebenslang asymptomatisch verbleiben können [26]. Lediglich durch eine Immunsuppression, wie bspw. aufgrund des *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS), durch Chemotherapie oder den immunsupprimierten Zustand bei Organtransplantationen, ist es möglich, dass sich Bradyzoiten zurück zu Tachyzoiten differenzieren und so eine erneute

akute Infektion hervorrufen können. Eine kongenitale Übertragung der Toxoplasmen von der Mutter auf den Fötus ist nur in Form von Tachyzoiten möglich.

Der Kreislauf des Lebenszyklus von *T. gondii* schließt sich, sobald der Endwirt oral Gewebezysten mit dem Fleisch seiner Beute aufnimmt und dadurch ein erneuter Infektionskreislauf ausgelöst wird [20].

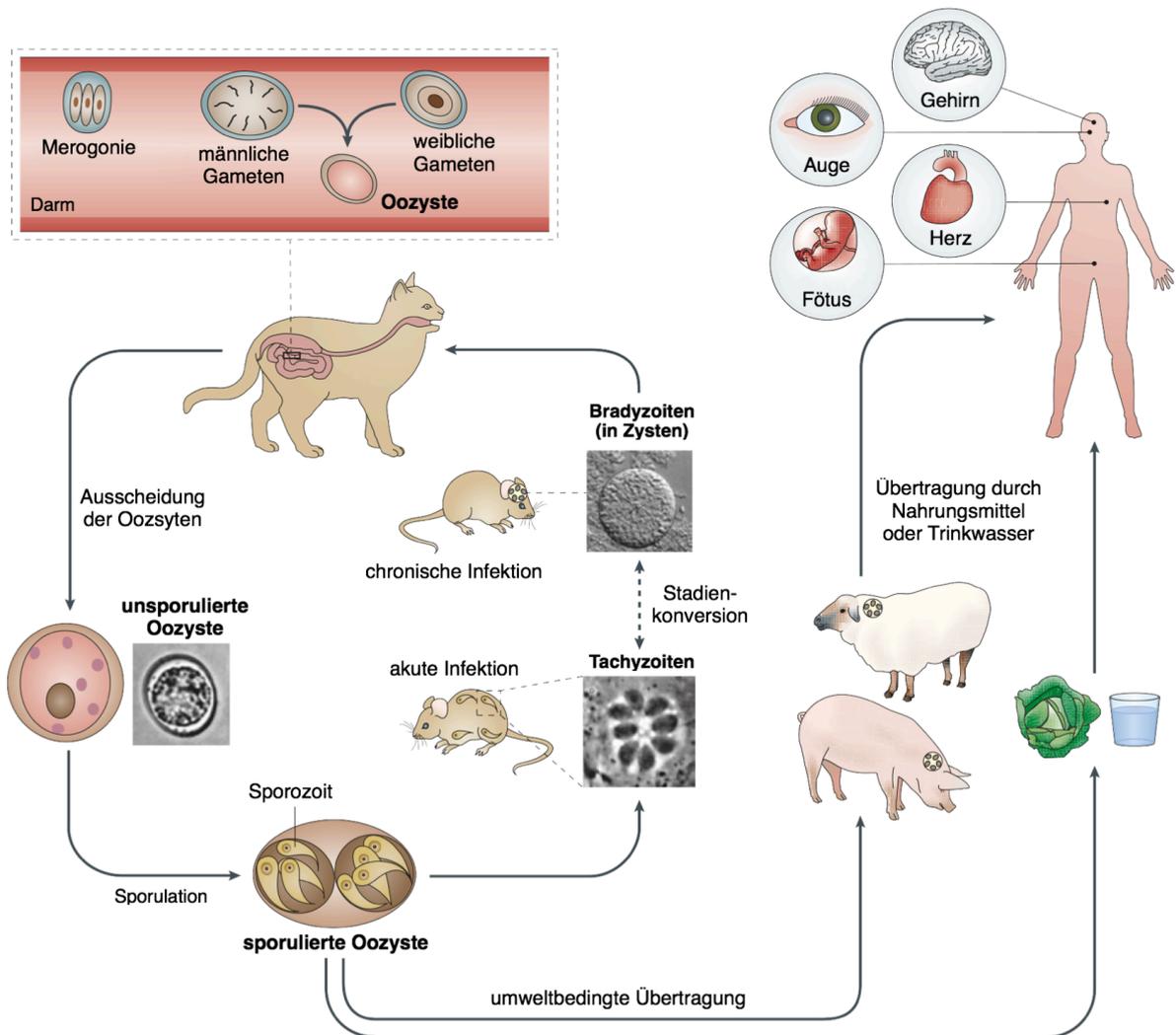


Abbildung 1: Lebenszyklus von *T. gondii*.

Die sexuelle Replikation von *T. gondii* findet im Darm des Endwirts, der Katze, statt. Hierbei entstehende Oozysten werden von der Katze mit dem Fäzes ausgeschieden. Die unsporulierten Oozysten entwickeln sich durch Sporulation zu sporulierten Oozysten, welche mittels kontaminierter Nahrungsmittel bzw. Trinkwasser von ihren Zwischenwirten aufgenommen werden können. In den Zwischenwirten konvertieren die Sporozoiten der Oozysten zu Tachyzoiten, der sich schnell replizierenden Form von *T. gondii*. Die Tachyzoiten vermehren sich asexuell und stellen die Phase der akuten Infektion dar. Durch Stadienkonversion zu Bradyzoiten, der zystenbildenden Form, ist die chronische Infektion charakterisiert. Der Zyklus schließt sich durch die Katze, die mit *T. gondii* infizierte Beutetiere frisst. Die Infektion des Menschen ist sowohl durch den Verzehr von nicht ausreichend

gegartem bzw. rohem Fleisch mit enthaltenden Gewebezysten möglich als auch durch das Vorhandensein sporulierter Oozysten in Trinkwasser, Nahrung (vor allem Gemüse) oder Umwelt. Immunsupprimierte Patienten/-innen können im Rahmen einer reaktivierten Toxoplasmose durch Zysten von einer Enzephalitis, Myokarditis, Pneumonie oder okulären Toxoplasmose betroffen sein. In der Schwangerschaft kann eine Erstinfektion zur kongenitalen Übertragung auf den Fötus führen und damit Fehlbildungen sowie Fehlgeburten hervorrufen. Abbildung modifiziert nach [20].

1.2 *T. gondii* Stämme

T. gondii lässt sich grundsätzlich in verschiedene Genotypen unterteilen. Unterschieden werden vor allem die drei klonalen Stämme, Typ I, Typ II sowie Typ III, die auch als typische *T. gondii* Stämme bezeichnet werden, von den sogenannten atypischen Stämmen [27]. Letztere sind keiner speziellen Gruppe zuzuordnen.

1.2.1 Typische *T. gondii* Stämme

Die meisten Stämme von *T. gondii* können einem der drei Hauptgenotypen, bestehend aus Typ I, Typ II oder Typ III, zugeordnet werden [27]. Der Genotyp I, dem die Stämme RH und BK angehören, weist eine sehr hohe Virulenz auf. Hier reichen im Mausmodell bereits weniger als zehn Typ I Parasiten aus, um eine Mortalität von 100 % zu erreichen ($LD_{100} < 10$) [28]. *T. gondii* Typ II, einer dessen Vertreter der Stamm ME49 darstellt, gilt als mittelmäßig virulent mit einer Anzahl von mehr als 10^3 Parasiten, die nötig sind, um den Tod infizierter Mäuse zu erreichen ($LD_{100} > 10^3$) [29]. Im Gegensatz dazu ist der Genotyp III, zu dem bspw. der Stamm NED gehört, so niedrig virulent, dass eine Mortalität von 100 % erst ab 10^5 Toxoplasmen eintritt ($LD_{100} > 10^5$) [30].

Die Mehrheit der klinischen Isolate, die sich im Menschen finden, lassen sich dem Typ II zuordnen. Dem gegenüber steht der Genotyp III, welcher sich vor allem in Tieren und nur sehr selten im Menschen finden lässt [31].

1.2.2 Atypische *T. gondii* Stämme

Von den drei klonalen *T. gondii* Genotypen lassen sich die sogenannten atypischen Genotypen unterscheiden [32]. Diese entstehen durch die sexuelle Rekombination verschiedener *T. gondii* Stämme, welche wiederum bei einer Infektion des Endwirts mit mehreren Parasitenstämmen gleichzeitig erfolgt. Während in Europa und Nordamerika vor allem die typischen, d.h. die klonalen Stämme verbreitet sind, findet man bspw. in der mittel- sowie südamerikanischen Bevölkerung hauptsächlich atypische *T. gondii* Stämme vor [33-35].

1.3 Humane Toxoplasmose

T. gondii ist der Erreger der Toxoplasmose, bei der eine pränatale (kongenitale) von einer postnatalen Form unterschieden werden kann. Trotz der großen Verbreitung einer Infektion mit dem Parasit (s.o.) werden klinisch manifeste Krankheitssymptome nur selten und nahezu ausschließlich in bestimmten Risikogruppen beobachtet.

1.3.1 Postnatale Toxoplasmose

In den meisten Fällen (> 95 %) nimmt die Erstinfektion mit *T. gondii* einen klinisch inapparenten Verlauf [36]. In weniger als 1 % der Fälle kommt es zu einer Vergrößerung der Lymphknoten im Rahmen einer subakuten Lymphadenopathie [37]. Weiterhin selten kommt es zu schwach auftretenden grippeähnlichen Symptomen mit Fieber sowie Kopf- und Gliederschmerzen. Die Inkubationszeit beträgt hier ein bis drei Wochen. In der Regel heilen die Symptome bei immunkompetenten Erwachsenen spontan aus.

Als eher schwerwiegende Manifestationen sind bspw. Enzephalitis, Myokarditis oder eine interstitielle Pneumonie zu nennen, die bei immunkompetenten Menschen allerdings nur vereinzelt im Rahmen einer Erstinfektion mit *T. gondii* auftreten. Weitaus häufiger bildet sich die sogenannte okuläre Toxoplasmose in Form einer Chorioretinitis aus [38]. Die Chorioretinitis ist eine Entzündung der Chorioidea (Aderhaut) und Retina (Netzhaut), deren Ausprägung sich nach der Lokalisation der retinalen Schädigung sowie dem Ausmaß der Entzündung richtet [39]. Auch bei der okulären Toxoplasmose lässt sich ein meist asymptomatischer Verlauf bei immunkompetenten Patienten/-innen feststellen, da die Läsionen der Retina hier eher geringfügig ausfallen und so innerhalb weniger Monate bis auf kleinere Narben verheilen [40]. Schwere Verläufe, vor allem bezüglich der okulären Toxoplasmose, können bei Patienten/-innen durch eine Infektion mit einem atypischen Stamm von *T. gondii* hervorgerufen werden [41-43].

Die Erstinfektion mit *T. gondii* führt, wie bereits beschrieben, unter der Kontrolle des Immunsystems des Zwischenwirts zur Ausbildung langlebiger Gewebezysten, insbesondere in neuronalen Geweben, wie z.B. im Auge oder Gehirn [25]. Aus diesem Grund wird vermutet, dass eine latente Infektion mit *T. gondii* im zentralen Nervensystem Einfluss auf das menschliche Verhalten haben kann. Zur Diskussion steht, dass bei verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen, bspw. Depressionen, Schizophrenie oder Morbus Parkinson [44; 45], wie auch Persönlichkeitsstörungen und diversen Verhaltensänderungen [46; 47] eine Toxoplasmeninfektion ursächlich sein könnte.

Bei immunsupprimierten Menschen hingegen ist sowohl eine Erstinfektion gefährlich als auch eine endogene Reaktivierung der Infektion möglich. Letztere tritt vor allem im Falle einer erworbenen Immundefizienz auf, z.B. bei Patienten/-innen mit AIDS [48], bei denen eine Reaktivierung der zerebellären *T. gondii* Gewebezysten zur Enzephalitis führt [49]. Bis zu 40 % der AIDS-Patienten/-innen sind davon global betroffen [5]. Aber auch Patienten/-innen mit Tumorerkrankungen bzw. Transplantat-Empfänger/-innen sind besonders gefährdet, sodass diese häufig eine klinisch schwerere Manifestation der okulären Toxoplasmose bishin zur Erblindung erleiden können [50]. Weitere schwerwiegende Komplikationen bei Menschen mit einer Immunsuppression sind, wie bereits erwähnt, Myokarditis und Pneumonie, die durch eine Reaktivierung der Toxoplasmeninfektion ausgelöst werden und dadurch sogar bis zum Tode der Individuen führen können [51].

1.3.2 Pränatale (kongenitale) Toxoplasmose

Sowohl kurz vor als auch während einer bestehenden Schwangerschaft ist eine vertikale Übertragung von *T. gondii* seitens der Mutter auf ihren Fötus möglich, sofern es sich zu

diesen Zeitpunkten um die mütterliche Erstinfektion handelt. Hierbei gibt es unterschiedliche Wege, auf denen sich die kongenitale Toxoplasmose manifestieren kann.

Erfolgt die Erstinfektion der Mutter im Falle einer bereits bestehend Schwangerschaft, steigt die Wahrscheinlichkeit der diaplazentaren Parasitenübertragung auf das ungeborene Kind im zeitlichen Verlauf dieser Schwangerschaft an, während das Ausmaß der Schädigung des Fötus dabei kontinuierlich sinkt [52; 53]. Findet die vertikale Übertragung also während des ersten Trimenons statt, führt dies in der Regel zu schwerwiegenden Schädigungen des Kindes. Eine Infektion im dritten Trimenon dagegen bringt nur leichte klinische Symptome mit sich. Zudem lässt sich zur kongenitalen Toxoplasmose durch atypische *T. gondii* Stämme sagen, dass diese zum einen schwerere Konsequenzen für den Fetus hat als die durch typische Genotypen [54], zum anderen aber auch selbst gegen Ende der Schwangerschaft gravierende klinische Schädigungen entstehen können [55]. Letzteres wird, wie bereits erwähnt, bei typischen Stämmen von *T. gondii* im Normalfall nicht beobachtet.

Wenn die Erstinfektion einer immunkompetenten Schwangeren mit *T. gondii* bereits wenige Wochen vor der Schwangerschaft stattfindet, ist eine vertikale Transmission der Toxoplasmen ebenfalls möglich, sofern die Parasitämie noch während Empfängnis bzw. Etablierung der Schwangerschaft besteht [56; 57]. Eine Parasitämie beschreibt einen Zustand, bei dem die Parasiten, in diesem Fall *T. gondii* Parasiten, im Blut persistieren. Weder über die Dauer einer solchen Parasitämie noch über dessen Rolle bezüglich der kongenitalen Toxoplasmose gibt es bis zum aktuellen Zeitpunkt genaue Kenntnisse.

Eine weitere Möglichkeit der vertikalen *T. gondii* Übertragung stellt die Gefahr der Reaktivierung der Toxoplasmose in Schwangeren dar, deren Immunsystem stark beeinträchtigt ist. Hierzu zählen Frauen, die eine HIV-Infektion aufweisen [58-60], wie auch diejenigen, die an hämatologischen Tumoren oder diversen Autoimmunerkrankungen leiden [53].

Mögliche Konsequenzen der kongenitalen Toxoplasmose sind weitreichend von milden bis hin zu schwerwiegenden Symptomen. Zu letzteren zählen der direkte Abort bei intrauteriner Infektion des Kindes, aber auch Totgeburten oder erhöhte neonatale Letalität [5]. Grund dafür ist eine Erstinfektion im ersten Trimenon, in dem hauptsächlich die Organogenese stattfindet. Demzufolge kann sich eine Infektion in diesem Abschnitt der Entwicklung klinisch auch mit einer Hepato- bzw. Splenomegalie, Myokarditis, Pneumonie und Ikterus manifestieren. Weiterhin sind das Vorliegen einer Enzephalitis mit Hydrozephalus beim Neugeborenen [52] ebenso häufig wie intrazerebrale Verkalkungen, meist einhergehend mit geistiger Retardierung. Zusätzlich kann eine Chorioretinitis mit drohender Erblindung sowie gegebenenfalls eine Taubheit Folge sein [61]. Die Trias aus Enzephalitis, intrazerebralen Verkalkungen und Chorioretinitis tritt in erster Linie bei Infektion des Fötus im dritten Trimenon auf wegen der hier erhöhten Durchgängigkeit der Plazenta für pathogene Erreger sowie der Reifung des kindlichen ZNS während dieses Zeitraums [62].

Im Falle dessen, dass eine Frau bereits einige Zeit vor ihrer Schwangerschaft eine *T. gondii* Infektion durchlaufen hat und keine noch bestehende Parasitämie diagnostizierbar ist, lassen

sich eine erneute Infektion und somit auch eine diaplazentare Übertragung nahezu ausschließen, weil zu diesem Zeitpunkt seitens der werdenden Mutter bereits eine Immunität gegen *T. gondii* besteht [5]. Die Toxoplasmenserologie gehört in Deutschland noch nicht zu der durch die Mutterschafts-Richtlinie vorgesehenen Schwangerschaftsvorsorge, während ein solches Screening in Österreich bereits seit Mitte der 70er Jahre etabliert ist [63]. Eine Empfehlung bei auffälliger Sonographie ist gegeben.

1.4 Diagnose der Infektion mit *T. gondii*

Eine Infektion mit *T. gondii* kann mittels serologischer Tests wie dem Immunfluoreszenztest (IFT), dem *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) und dem *Western Blot* nachgewiesen werden. Mit deren Hilfe lassen sich für Toxoplasmen spezifische Immunglobulin G (IgG)- und Immunglobulin M (IgM)-Antikörper sowie weiterhin Immunglobulin A (IgA)- und Immunglobulin E (IgE)-Antikörper bestimmen [64; 65]. Lassen sich ausschließlich *T. gondii* spezifische IgG-Antikörper nachweisen, handelt es sich um eine latente oder chronische Infektion. Die zusätzliche Präsenz spezifischer IgM-Antikörper hingegen spricht für eine akute oder reaktivierte Infektion, ebenso wie spezifische IgA- und IgE-Antikörper [66; 67].

Sowohl bei Neugeborenen als auch bei AIDS-Patienten/-innen bzw. immunsupprimierten Menschen ist der Nachweis *T. gondii* spezifischer Antikörper, insbesondere der IgM-Antikörper, häufig aufgrund der besonderen Abwehrlage (bspw. wegen des noch nicht ausgereiften Immunsystems oder aufgrund des kindlichen Nestschutzes durch plazentagängige Antikörper der Mutter) nicht möglich. Aus diesem Grund gelten serologische Tests hier als eher ungeeignet zur Detektion einer Toxoplasmeninfektion. Zur Diagnosestellung bietet daher die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) als eine hoch spezifische und sensitive Methode eine gute Alternative für die Erregerdiagnostik, da durch diese der direkte DNA-Nachweis von *T. gondii* möglich ist [68].

1.5 Bisherige Therapiemöglichkeiten

Bei immunkompetenten Menschen mit einer *T. gondii* Infektion ist in der Regel keine bzw. lediglich eine rein symptomatische Therapie ausreichend. Erst im Falle einer Immunsuppression bzw. bei Erstinfektion von Schwangeren und kongenital infizierten Neugeborenen liegt die Indikation zur Therapie der Toxoplasmose vor, wofür verschiedene Chemotherapeutika zur Verfügung stehen [69; 70].

Das hauptsächliche Ziel der Therapie liegt darin, die *T. gondii* Vermehrung in der akuten Infektion zu hemmen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind nur die sogenannten Tachyzoiten, die schnell replizierende Form der Toxoplasmen, Angriffspunkt der bisherigen Wirkstoffe, nicht aber die langsamen, sich in Gewebezysten befindenden Bradyzoiten [69]. Somit lässt sich also feststellen, dass derzeitige Wirkstoffe nur parasitostatisch, jedoch nicht parasitizid wirken.

Die wirkungsvollste Therapie der Toxoplasmose stellt derzeit die Behandlung mit Pyrimethamin in Kombination mit Sulfadiazin und Folinsäure dar. Pyrimethamin und Sulfadiazin wirken dabei beide als Folsäureantagonisten. Während Pyrimethamin die Dehydrofolatreduktase hemmt, antagonisiert Sulfadiazin die Dehydrofolatsynthetase. Daraus resultiert ein Folsäuremangel im Parasiten. Dieser wird bei den Patienten/-innen präventiv durch die Gabe von Folinsäure, dem aktiven Metaboliten der Folsäure, vermieden [71]. Zur Verabreichung wird in Deutschland die Zusammensetzung aus Pyrimethamin (50 - 100 mg/d p.o.) plus Sulfadiazin (3 - 4 x 2 g/d p.o.) plus Folinsäure (15 - 30 mg/d p.o.) für ca. 4 - 6 Wochen empfohlen [72]. Besteht eine Unverträglichkeit gegen Sulfadiazin, z.B. aufgrund einer allergischen Reaktion, ist alternativ die Gabe von Clindamycin (4 x 600 - 900 mg/d p.o.) möglich [73]. Zur Behandlung der akuten Toxoplasmose entspricht diese Kombination der Standardtherapie und ist insbesondere bei immunkompetenten Erwachsenen mit einer durch *T. gondii* bedingten Chorioretinitis wirksam. Zusätzlich werden hier bei ausgedehnten Entzündungsreaktionen am Auge systemisch Kortikosteroide verabreicht, um eine Erblindung zu vermeiden [69]. Darüber hinaus wird die Gabe von Pyrimethamin plus Sulfadiazin plus Folinsäure bei immunsupprimierten Patienten/-innen (z.B. aufgrund einer HIV-Erkrankung, s.u.) als Sekundärprophylaxe, d.h. nach bereits erfolgreich behandelte akuter Toxoplasmose, empfohlen [74]. In der Regel sind täglich 25 - 50 % der Dosis, die bei der akuten Infektion verwendet wird, ausreichend [75]. Im Rahmen einer Schwangerschaft ist die Einnahme von Pyrimethamin wegen der teratogenen Wirkung innerhalb des ersten Trimenons kontraindiziert [76]. Die hohe Anzahl der Nebenwirkungen, die von Myelotoxizität mit Hämatopoesestörungen über Leber- und Nierenschäden bzw. gastrointestinale Störungen oder diverse Neuropathien bis hin zu allergisch-toxischen Reaktionen wie Exanthenen, Fieber und Kopfschmerzen reichen, führt oft zum Abbrechen der Therapie mit Pyrimethamin plus Sulfadiazin plus Folinsäure [76].

Im Falle einer Schwangerschaft, insbesondere während des ersten Trimenons, kann Spiramycin als Monotherapie zur Behandlung der akuten *T. gondii* Infektion unbedenklich genutzt werden [72]. Bei dem Wirkstoff handelt es sich um ein Makrolid-Antibiotikum, das die Proteinsynthese hemmt. Weiterhin kommt Spiramycin bei infizierten Neugeborenen in den ersten 14 Tagen nach der Geburt sowie gegebenenfalls bei Sulfonamidallergie zum Einsatz [77]. Neugeborene erhalten eine tägliche Dosis von 50 - 100 mg/kg, während bei Erwachsenen wie auch Schwangeren höhere Dosen (2 - 4 x 1 g/d p.o.) verabreicht werden [78]. Während bei Erwachsenen die Wirkung von Spiramycin erwiesen ist [79], wird im Hinblick auf die Infektionsübertragung auf den Feten bisher nur die Senkung der Inzidenz kongenitaler Infektionen beschrieben [80]. Der Grund dafür, dass nach bereits erfolgter Infektion des Fötus kein nennenswerter Therapieerfolg mehr verzeichnet werden kann, liegt in der Tatsache, dass sich Spiramycin lediglich in der Plazenta anreichert ohne sie jedoch in größeren Mengen zu überwinden, sodass dessen Konzentration im fetalen Kreislauf maximal der Hälfte derer im mütterlichen Blut entspricht [81]. Nebenwirkungen werden selten beobachtet und treten nur in Form gastrointestinaler Störungen auf [81].

Insbesondere im Hinblick auf AIDS-Patienten/-innen gilt Cotrimoxazol, eine Kombination aus den beiden Wirkstoffen Trimethoprim und Sulfamethoxazol, als eine weitere Therapiemöglichkeit der Infektion mit *T. gondii*. Es hemmt einen essentiellen Schritt bei der

Synthese von Tetrahydrofolsäure und damit eine Synthesevorstufe des Purins, indem Trimethoprim (wie auch Pyrimethamin) als Inhibitor der Dihydrofolatreduktase wirkt und gleichzeitig Sulfamethoxazol (analog dem Sulfadiazin) die Dehydrofolatsynthetase in ihrer Funktion hemmt. Eine Substitution der Folsäure ist bei dieser Behandlungsmethode allerdings nicht notwendig [82]. Eingesetzt wird Cotrimoxazol (960 mg/d) bei HIV-Infizierten sowohl als Primärprophylaxe zur Vermeidung einer Toxoplasmose bei niedriger CD4-Zellzahl ($< 150 \mu\text{l}$) als auch im Rahmen einer akuten Infektion [83]. Insbesondere bei der Toxoplasmose-Enzephalitis ist Cotrimoxazol das Mittel der ersten Wahl. Handelt es sich dagegen um die Sekundärprophylaxe immunsupprimierter Patienten/-innen (nach einer behandelten akuten Toxoplasmose), wird bevorzugt zur Kombination von Pyrimethamin plus Sulfadiazin plus Folinsäure gegriffen (s.o.). Der therapeutische Effekt von Cotrimoxazol wird geringer eingestuft als der der Standardtherapie mit Pyrimethamin [84], jedoch sind die Nebenwirkungen vergleichsweise ebenfalls deutlich geringer. Letztere manifestieren sich in Hautrötungen und latenter Diarrhoe sowie in seltenen Fällen im Auftreten von allergisch-toxischen Reaktionen oder Blutbildveränderungen [82].

Des Weiteren ist Clindamycin ein Antibiotikum, das sich vor allem in der Retina anreichert und so bevorzugt bei toxoplasmosebedingter Chorioretinitis eingesetzt wird. Isoliert aus einer Streptomyces-Art, hemmt Clindamycin (ähnlich wie Spiramycin) die Proteinsynthese [85]. Andere denkbare Indikationen für Clindamycin sind eine Sulfonamidallergie (s.o.) und an AIDS erkrankte Patienten/-innen mit einer Toxoplasmose-Enzephalitis, die alternativ zu Cotrimoxazol auch mit Clindamycin in Kombination mit Pyrimethamin therapiert werden können [73; 86]. Die Einnahme von Clindamycin (4 x 300 mg/d) über 4 - 6 Woche ist in den meisten Fällen ausreichend zur erfolgreichen Behandlung der Symptome [87; 88]. Zur Prophylaxe hingegen ist dieses Antibiotikum nicht geeignet, ebenso wenig wie zur Therapie infizierter Feten, da Clindamycin nicht die Eigenschaft besitzt, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, und das Gehirn daher lediglich über Gefäße in entzündlich verändertem Zustand erreichen kann. Auch die Anzahl der Rezidive im Hinblick auf die durch *T. gondii* ausgelöste Chorioretinitis bleibt durch die Einnahme von Clindamycin unverändert [85; 89]. Gravierende Nebenwirkungen treten unter der Behandlung sehr selten auf. Nur in Einzelfällen wurde eine pseudomembranöse Colitis als komplikationsreiche unerwünschte Wirkung beschrieben. Öfters beobachtet als bei der Standardtherapie werden dagegen gastrointestinale Störungen und allergische Hautreaktionen [89].

1.6 Neue Wirkstoffe gegen *T. gondii*

Etwa 80 % der bisher in der pharmakologischen Therapie eingesetzten Wirkstoffe gegen *T. gondii* entstammen der Natur. Diese lassen sich entweder aus den Naturstoffen selbst isolieren oder aber auf deren Basis entwickeln. Aus diesem Grund stellt die Natur eine bedeutende Herkunft bewährter Wirkstoffe nicht nur gegen *T. gondii*, sondern auch in der Therapie vieler anderer verschiedener Erkrankungen, wie bspw. anderer Infektionen oder Tumore, dar [90].

Die in dieser Arbeit getesteten Wirkstoffe haben unterschiedliche Herkünfte, entstammen jedoch grundsätzlich aus Pflanzen, marinen Schwämmen sowie endophytischen Pilzen. Sie sind Teil einer sogenannten „Wirkstoff-Bibliothek“ von Prof. Proksch und seiner Arbeitsgruppe

aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Universität Düsseldorf, die bereits eine Sammlung von über 500 Wirkstoffen umfasst.

In erster Linie wurden neue Wirkstoffe bisher aus Pflanzen bzw. Organismen aus dem Boden isoliert. So ist als Beispiel Artemisinin zu nennen, ein in der Medizin bedeutendes Stoffwechselprodukt, das durch glanduläre Trichome der Pflanze *Artemisia annua* produziert wird und als Wirkstoff vor allem in der Behandlung von Malaria relevant ist [91]. Darüber hinaus wird Artemisinin aufgrund seiner inhibierenden Wirksamkeit ebenfalls vermehrt bei Toxoplasmose eingesetzt [92].

Im Verlauf der Forschung sollen sich weitere potentielle Wirkstoffe auch aus anderen Bereichen der Umwelt gewinnen lassen.

Wichtige Vertreter sind hier Substanzen aus Schwämmen und anderen Lebewesen, deren Lebensraum das Meer ist [93-95]. Die Produktion der chemisch-toxischen Verbindungen durch marine Schwämme dient in der Natur vor allem der Verteidigung vor Feinden, da sie aufgrund ihres morphologischen Aufbaus keinen anderweitigen Schutz vor Konkurrenten haben. Während die meisten Schwämme die toxischen Substanzen bereits in ihrem Gewebe tragen, gibt es auch Arten, die erst bei Verletzung ihres Gewebes entsprechende Wirkstoffe (z.B. Dienone) durch enzymatische Spaltung freisetzen. Diese wirken zum Teil nicht nur toxisch, sondern auch stark antibiotisch, und geben bei verletztem Schwammgewebe so einen Schutz vor marinen Bakterien und anderen Infektionen verursachenden Krankheitserregern [96]. Sogenannte Fouling-Organismen, bspw. Muscheln, verhindern den Wassereinstrom und -durchfluss von Schwämmen, welcher für letztere jedoch durch kontinuierliche Filtrierung des Wassers Grundlage der Nahrungsaufnahme und somit überlebenswichtig ist. Einige Schwämme nutzen daher Verbindungen, die Brom beinhalten, wie z.B. Bastadine, um Fouling zu verhindern und eine saubere Gewebeoberfläche zu erhalten [97]. Ein synthetisch hergestelltes Analogon stellt das Dibromhemibastadin (DBHB) dar, das in Anti-Fouling Farben der Schiffsindustrie eine wichtige Rolle einnimmt [98]. Metabolite mariner Schwämme werden aufgrund ihrer antimikrobiellen Eigenschaften derzeit vermehrt als potente Wirkstoffe diskutiert. Als bekanntes Beispiel aus dem klinischen Gebrauch lässt sich Eribulin (Halaven®) nennen, das auf der Grundlage des Schwammmetaboliten Halichondrin B synthetisch hergestellt wird und therapeutisch im Rahmen des metastasierten Mammakarzinoms bereits seit 2010 zugelassen ist [99].

Neben Pflanzen und marinen Schwämmen stellen Pilze eine weitere bedeutende Ressource für neue, biologisch aktive Verbindungen dar. Hier kann beispielhaft das Antibiotikum Penicillin genannt werden, welches aus dem Pilz *Penicillium chrysogenum* gewonnen wird [100]. Pilze lassen sich teils aus Schwämmen extrahieren, andere Arten nutzen jedoch auch Pflanzen als Wirt, in denen sie symbiotisch als sogenannte Endophyten leben [101]. Auch Pilze produzieren chemisch-toxische Wirkstoffe, mit denen sie im Rahmen dieser Symbiose ihre Wirtspflanze vor Angriffen durch Feinde sowie mikrobielle Krankheitserreger schützen. Teilweise sind die der endophytischen Pilze produzierten Substanzen identisch mit solchen, die zuvor bereits auch in Pflanzen entdeckt wurden. Ein Beispiel für einen solchen Wirkstoff ist Paclitaxel (Abraxane®), ein Zytostatikum, das sowohl aus der pazifischen Eibe als auch aus diversen endophytischen Pilzen hervorgeht [102]. Auch weitere Naturstoffe aus Pilzen, die eine Aktivität gegen Tumorzellen aufweisen, konnten bereits nachgewiesen werden. Dazu gehören bspw. Inhibitoren des Apoptose auslösenden Transkriptionsfaktors, namentlich nukleärer Faktor κ B (NF- κ B) [103], sowie Aktivatoren von Immunzellen [104].

Darüber hinaus ließen sich bisher bereits erfolgreich einige Wirkstoffe mit einem antibiotischen Effekt gegen pathogene Bakterien detektieren. Dazu gehören beispielsweise die beiden Dihydroanthracenone Flavomannin A und Flavomannin B, welche aus *Talaromyces wortmannii*, einem Endophyt der *Aloe vera*, isoliert werden und eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum des multiresistenten *Staphylococcus aureus* besitzen [105].

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Mit der Entwicklung der antimikrobiellen Therapie gelang der vielversprechende Beginn der Bekämpfung von Infektionen. Dieser ermöglichte nicht nur die Behandlung und Prophylaxe infektiöser Erkrankungen, sondern zudem auch vielzählige invasive und zytostatische Therapien, wie bspw. Chemotherapien, Knochenmark- oder Organtransplantationen. Ohne eine effektive Infektionskontrolle mithilfe der heutzutage zur Verfügung stehenden Antibiotika gingen solche invasiven Therapien mit dem Tod der immunsupprimierten Patienten/-innen einher. Diesem Erfolg stehen jedoch die zunehmenden hochgradigen Resistenzen entgegen, die Infektionserreger gegen die antibiotischen Wirkstoffe entwickeln. Aus dem Auftreten solcher teils bereits multiresistenter Erreger resultieren nicht nur signifikant begrenzte antiinfektive Therapiemöglichkeiten, sondern folglich auch einer Erhöhung von Letalität und Morbidität bei Infektionspatienten/-innen [106; 107].

Nicht nur im Bereich der antibakteriellen Therapie treten solche Resistenzentwicklungen auf. Vergleichbares lässt sich auch vermehrt in der antiinfektiven Therapie von Parasiten beobachten. Das zur Gattung der Apicomplexa gehörende *Plasmodium falciparum*, das der Erreger der tropischen Form der Malaria ist, entzieht sich der Therapie der Malaria durch seine neu aufgetretenen Resistenzen zunehmend [108]. Neben den Plasmodien ist auch *T. gondii* ein weiteres Mitglied der Gattung Apicomplexa, das als ein weltweit verbreiteter Erreger nicht nur für eine große Anzahl von Embryo- und Fetopathien, sondern auch für Todesfälle bei Patienten/-innen mit einem supprimierten bzw. defizienten Immunsystem verantwortlich ist. Darüber hinaus hat *T. gondii* die Rolle des zweitwichtigsten Pathogens in Lebensmitteln hinsichtlich der Faktoren „jährliche Krankheitskosten“ sowie „Einschränkungen der Lebensqualität“ eingenommen [109].

Bisher sind in der Behandlung von *T. gondii* ausschließlich parasitostatische Wirkstoffe bekannt, die jedoch aufgrund der zunehmenden Resistenzen an Wirkung verlieren. Eine Substanz, die zur vollständigen Eradikation des Parasiten führt, ist bislang noch nicht bekannt. Die Identifikation neuer Wirkstoffe ist daher von großer Bedeutung, um *T. gondii* weiterhin kontrollieren zu können und um antiinfektiöse Therapien zu optimieren. Im Rahmen dieses Projekts sollen aus einer Reihe von Sekundärmetaboliten aus marinen Schwämmen, Pflanzen und endophytischen Pilzen Wirkstoffe erforscht werden, die den Erreger *T. gondii* inhibieren können bzw. eventuell sogar einen parasitiziden Effekt aufweisen.

In Vorversuchen sollen als erstes in der Zellkultur mithilfe eines Toxoplasmen-Proliferationstests aussichtsreiche Substanzen ermittelt werden, die zunächst den intermediär virulenten *T. gondii* Stamm ME49 (Typ II) inhibieren. In weiteren Untersuchungen

soll anschließend durch mehrmaliges Wiederholen der Assays unter gleichen Versuchsbedingungen die Reproduzierbarkeit des Effekts der Wirkstoffe auf den *T. gondii* Stamm ME49 geprüft werden. Darüber hinaus soll die Frage geklärt werden, ob die potentiell inhibitorisch wirkenden Substanzen nicht nur bei Typ II Toxoplasmen, sondern auch bei den stark virulenten Typ I Stämmen (z.B. Stamm BK) eine Wirkung aufweisen. Anschließend soll die Potenz bereits in der Klinik verwendeter Antibiotika mit der der o.g. Wirkstoffe verglichen werden. Dafür herangezogen werden die Antibiotika Cotrimoxazol, bestehend aus Trimethoprim und Sulfamethoxazol, sowie Clindamycin.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterial

Material	Bezugsquelle
Combitips advanced®	Eppendorf, Hamburg, D
Deckgläser (∅ 13 mm)	VWR International, West Chester, USA
Einfrierröhrchen	NUNC GmbH, Wiesbaden, D
Einwegpipetten (5 / 10 / 25 / 50 ml)	Corning Incorporated, Tewksbury, USA
Glasfaserfilter	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, D
Glas-Pasteurpipetten	Hirschmann Techcolor, Eberstadt, D
Mikrotiterplatten (12 / 96 Well)	Corning Incorporated, Tewksbury, USA
Neubauer-Zählkammer improved	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
Objekträger	Engelbrecht, Edermünde, D
Pipettenspitzen TipOne®	StarLab, Hamburg, D
Plastikhüllen	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, D
Reaktionsgefäße (1,5 / 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Zellkulturflaschen (25 / 75 cm ²)	Corning Incorporated, Tewksbury, USA
Zentrifugenröhrchen (15 / 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D

2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien besitzen, sofern nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad *pro analysis*. Zum Ansetzen der Lösungen wird hochreines Wasser verwendet, hier nachfolgend als Aqua dest. bezeichnet.

Chemikalie	Bezugsquelle
[5,6- ³ H]-Uracil 5 mCi/5 ml H ₂ O-Lösung steril	Amersham, Braunschweig, D
Aqua dest. 0,5 l steril	Invitrogen, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Lonza, Rockland, USA
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Lonza, Rockland, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS) 0,5 l steril	Invitrogen, Karlsruhe, D
Szintillationsflüssigkeit	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, D

2.3 Medien

Medium	Bestandteile
Einfriermedium	FCS 10 % DMSO
Zellkulturmedium	IMDM 10 % FCS

2.4 Zytokine

Bezeichnung	Bezugsquelle
Humanes Interferon γ (IFN γ)	R&D Systems, Minnesota, USA

2.5 Zelllinien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Humane Vorhautfibroblasten (HS27)	ATTC, Wesel, D
Murine Fibroblasten (L929)	ATTC, Wesel, D
Humane Glioblastomzellen (A2)	freundl. Gabe von Prof. Däubener, Institut für Med. Mikrobiologie, Univ. Düsseldorf, D

2.6 Parasitenstämme

Bezeichnung	Bezugsquelle
<i>Toxoplasma gondii</i> Stamm ME49	ATTC, Wesel, D
<i>Toxoplasma gondii</i> Stamm BK	ATTC, Wesel, D

2.7 Antibiotika

Bezeichnung	Bezugsquelle
Cotrim-ratiopharm® Ampullen SF 480 mg/5 ml	ratiopharm GmbH, Ulm, D
Clindamycin Hikma 150 mg/ml Ampullen	Hikma Pharma GmbH, Gräfelfing, D

2.8. Wirkstoffe

Die getesteten Wirkstoffe wurden freundlicherweise in einer Kooperation von Prof. Proksch und seiner Arbeitsgruppe aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

Im Laufe der Arbeit wurden 151 Wirkstoffe ausgetestet, wovon die 13 Wirkstoffe mit hoher Aktivität gegen *T. gondii* hier genauer dargestellt werden. Anschließend erfolgt eine alphabetische Auflistung der getesteten Wirkstoffe.

Tabelle 2.1: Vollständige alphabetische Auflistung der getesteten Wirkstoffe.

Diese Tabelle entspricht einer vollständigen namentlichen Auflistung aller in dieser Arbeit getesteten Wirkstoffe in alphabetischer Reihenfolge sowie deren ursprünglicher Herkunft.

Substanzname	Herkunft
(-) Ageloxime D	<i>Agelas nsp.</i>
(-) Arctigenin	<i>Aglaia duppereana</i>
(-) Matairesinol	<i>Dianthus versicolor</i>
(-) α -Bisabolol	<i>Matricaria chamomilla</i>
(+) Aeroplysinin-1	<i>Pseudoceratina purpurea, Aplysina aerophoba</i>
(+) Agelasidine C	<i>Agelas nakamurai</i>
(+) Avarol	<i>Dysidea avara</i>
(E)-Methyl-3-(4-methoxyphenoxy) propenoat	<i>Xylaria sp.</i>
18-Dehydroxycytochalasin H	<i>Hypoxylon fragiforme</i>
2,2-Dimethylchroman-3,6-diol	<i>Gliomastix sp. (Rice culture)</i>
2,6-dibromo-4-hydroxy-4-methoxycarbonylmethylcyclohexa-2,5-dien-1-one	synthetisiert
24-Ethylcholesta-5-en-3 β -ol	<i>Petrosia nigricans</i>
3-O-Methylgallic acid butyl ester	synthetisiert
3,4,5-Tri-O-Methylgallic acid butyl ester	synthetisiert
3,4,6-Tribromo-2-(2',4'-dibromophenoxy) phenol	<i>Dysidea granulosa</i>
3,5-Dibromo-1H-pyrrole-2-carboxylic acid	<i>Acanthostylotella sp.</i>
3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxyphenylacetonitril	synthetisiert
3,5-Dibromo-4-hydroxyphenylacetic acid	synthetisiert
3,5-Dibromo-4-hydroxyphenylacetic acidmethyl ester	synthetisiert

Substanzname	Herkunft
4-(4,5-Dibromo-1-methyl-1H-pyrrole-2-carboxamido) butanoic acid	<i>Agelas nsp.</i>
4,5-Dibromo-1H-pyrrol-2-carbonsäureethylester	<i>Agelas oroides</i>
4,5-Dibromo-1H-pyrrol-2-carboxamide	<i>Agelas sp.</i>
4,6-Dibromo-2-(2',4'-dibromophenoxy) phenol	<i>Dysidea granulosa</i>
4'-O-Methyl norhomosekikaic acid	<i>Ramalina farinacea</i>
4',5,7-Trimethoxydihydroflavonol	<i>Aglaia ologophylla</i>
5,5'-Dibromohemibastadin-1	synthetisiert
6-nonyl salicylic acid + 6-nonyl salicylic acid (equal mixture)	<i>Paeonia lactiflora</i>
7-O-Methylaloeresin A	<i>Aloe Perryi</i>
Aeroplysinin	<i>Pseudoceratina purpurea</i>
Aerolithionin	<i>Aplysina cavernicola</i>
Agelanin B	<i>Agelas nsp.</i>
Agelazine D	<i>Agelas nakamurai</i>
Ageloxime-D	<i>Agelas nakamurai</i>
Aloeemodin	<i>Aloe Perryi</i>
Aloeresin A	<i>Aloe Perryi</i>
Aloesin	<i>Aloe Perryi</i>
Alternarienoic acid	<i>Alternaria sp.</i>
Alternariol	<i>Alternaria sp.</i>
Alternariol monomethyl ether	<i>Alternaria sp.</i>
Altersolanol A	<i>Pleosora sp.</i>
Anomalin A	<i>Arthrinium sp.</i>
Aranorosin	<i>Gymnascella dankaliensis</i>
Aranorosinol B	<i>Gymnascella dankaliensis</i>
Avaron	<i>Dysidea avara</i>
Bakuchiol	<i>Psoralea corylifolia</i>
Benzylnitrile	synthetisiert
Berberin hemisulfat	<i>Berberis sp.</i>
Br ₂ Cyclohexylamide	synthetisiert
Br ₂ Hexylamide	synthetisiert

Substanzname	Herkunft
Br ₂ Histamide	synthetisiert
Br ₂ Hydroxyethylamide	synthetisiert
Br ₂ Isobutylamide	synthetisiert
Br ₂ Oxime ester	synthetisiert
Br ₂ Phenethylamide	synthetisiert
Br ₂ Tryptamide	synthetisiert
Br ₂ Tyrosin	synthetisiert
Br ₃ Histamide	synthetisiert
BrCyclohexylamide	synthetisiert
BrHexylamide	synthetisiert
BrHistamide	synthetisiert
BrIsobutylamide	synthetisiert
BrPhenethylamide	synthetisiert
Callyaerin A	<i>Callyspongia aerizusa</i>
Callyaerin B	<i>Callyspongia aerizusa</i>
Callyaerin C	<i>Callyspongia aerizusa</i>
Callyaerin D	<i>Callyspongia aerizusa</i>
Callyaerin E	<i>Callyspongia aerizusa</i>
Callyaerin F	<i>Callyspongia aerizusa</i>
Catechin	u.a. <i>Aglaia duppereana</i> , <i>Loranthus micranthus</i>
Chlorogenic acid	u.a. <i>Scorzonera radiata</i> , <i>Solanum melongena</i>
Cholest-5-en-3 β -ol-(22E,24S)-24-Methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol	<i>Crella cyathophora</i>
Cinnamic acid	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
Citrinin	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>
Corynesidone A	<i>Corynespora cassiicola</i>
Cyclophenol	<i>Cladosporium sp.</i>
Cytochalasin D derv.	<i>Botryosphaeria australis</i>
Dammarenolsäure	<i>Aglaia ignea</i>
Dasyclamide	<i>Aglaia sp.</i>
DBHB	synthetisiert

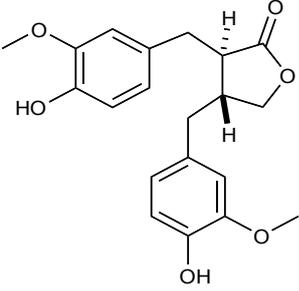
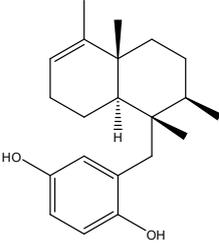
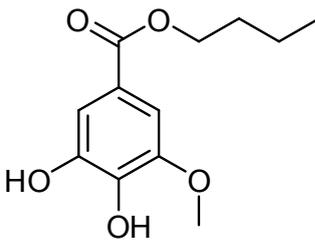
Substanzname	Herkunft
Debromhymenialdisin	<i>Stylissa massa</i>
Debromsceptrin	<i>Stylissa sp.</i>
Demethoxyencecalin	<i>Encelia sp.</i>
Dibromhemibastadin-1	synthetisiert
Dibromhydroxyphakellin	<i>Agelas nsp.</i>
Dibromophakellin HCl	<i>Stylissa massa</i>
Dicarnoxide	<i>Diacarnus erythraeanus</i>
Dienon	u.a. <i>Suberea sp.</i> , <i>Aplysina aerophoba</i>
Dihydrogeodin	<i>Aspergillus terreus</i>
Emb-peptide = WLIP	<i>Embellisia eureka</i>
Embeurekol B	<i>Embellisia eureka</i>
Enniatin A1	<i>Fusarium tricinctum</i>
Enniatin B	<i>Fusarium tricinctum</i>
Ergosterol	u.a. <i>Arthrinium sp.</i> , <i>Ampelomyces sp.</i>
Ester-Br ₂	synthetisiert
Euparin	<i>Encelia sp.</i>
Flavomannin A	<i>Talaromyces wortmannii</i>
Helenalin	<i>Arnica montana</i>
Hexylamide	synthetisch
Histamide	synthetisch
Homosekikaic Acid	<i>Ramalina farinacea</i>
Hydroxydienonsäure	synthetisiert
Hydroxysydonsäure	<i>Aspergillus sydowii</i>
Hymenidin	<i>Stylissa carteri</i>
Ilimaquinone = Ilimachinon	<i>Dactylosporgia elegans</i>
Indole-3-carboxylic acid	<i>Diacarnus megaspinorhabdosa</i>
Isobavachalcone	<i>Psoralea corylifolia</i>
Isofistularin 3	<i>Aplysina aerophoba</i>
Isovitexin	<i>Vicia faba</i>
Kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnopyranoside = Kaempferitrin	<i>Olex manni</i>
Kahalalide F	<i>Elysia rufescens</i>

Substanzname	Herkunft
Kojic acid	<i>Lecytophora sp.</i>
Kuanoniamin D	<i>Cystodytes sp.</i>
Lutein	<i>Aglaia ologophylla</i>
Macrosporin	<i>Stemphylium globuliferum</i>
Manzamine A	<i>Acanthostrongylophora ingens</i>
Mauritamide B	<i>Agelas nsp.</i>
Mauritamide C	<i>Agelas nsp.</i>
Meleagrín	<i>Penicillium sp.</i>
Midpacamide	<i>Agelas nsp.</i>
N-methyl-4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid	<i>Agelas nsp.</i>
Neobavaisoflavone	<i>Psoralea corylifolia</i>
Nor-Bromhemibastadin	synthetisiert
Orientin	<i>Stellaria holostea</i>
Oxime acid	synthetisiert
Oxime ester	synthetisiert
Phenethylamide	synthetisiert
Phenol A acid	<i>Aspergillus sp.</i>
Phomoxanthon A	<i>Phomopsis longicolla</i>
Piperin	<i>Piper retrofractum</i>
Prianicin	<i>Diacarnus erythraeanus</i>
Roquefortin C	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Sceptrin	<i>Agelas sp.</i>
Sclerotiorin	<i>Chaetomium aureum</i>
Scorzodihydrostilbene B	<i>Scorzonera radiata</i>
Sekikaic acid	<i>Ramalina farinacea</i>
Skyrin	<i>Talaromyces wortmannii</i>
Stemphyperylenol	<i>Pleosora sp.</i>
Talaromin B	<i>Talaromyces wortmannii</i>
Tetrahydroxybostricin	<i>Nigrospora sp.</i>
Tetrahydroxystilbeneglucoside	<i>Polygonatum multiflorum</i>
Theonellapeptolide Ie	<i>Theonella swinhoei</i>
Tilirosid	<i>Tilia cordata</i>

Substanzname	Herkunft
Tryptamide	synthetisiert
Viridicatin	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Visnagin	<i>Ammi visnaga</i>
W493 B	<i>Fusarium sp.</i>
Waolsäure	<i>Acremonium strictum</i>
WLIP	<i>Embellisia eureka</i>
Wortmannin	<i>Talaromyces wortmannii</i>
Wortmannin A	<i>Talaromyces wortmannii</i>
Xanthorrhizol	<i>Curcuma xanthorrhiza</i>

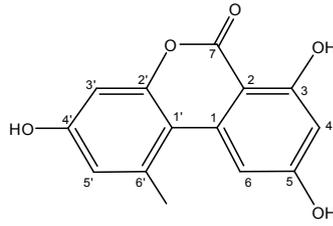
Tabelle 2.2: Auflistung der Wirkstoffe mit inhibitorischer Aktivität auf *T. gondii*.

Die folgende Tabelle beinhaltet eine alphabetische Auflistung der 13 Wirkstoffe, die in den Versuchen eine hohe Aktivität gegen *T. gondii* aufweisen. Zusätzlich werden deren chemische Strukturformeln dargestellt.

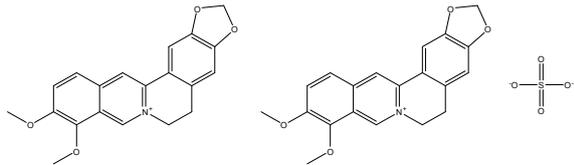
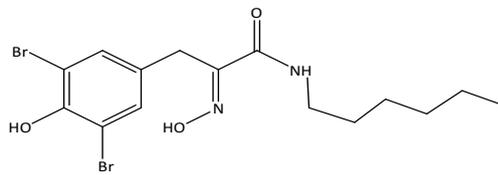
Substanzname	Strukturformel
(-) Matairesinol	
(+) Avarol	
3-O-Methylgallic acid butyl ester	

Substanzname**Strukturformel**

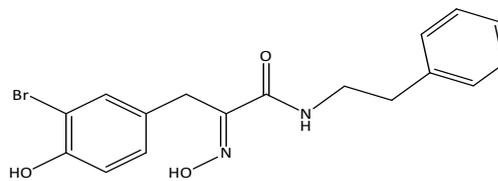
Alternariol



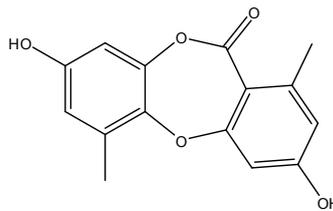
Berberin hemisulfat

Br₂Hexylamide

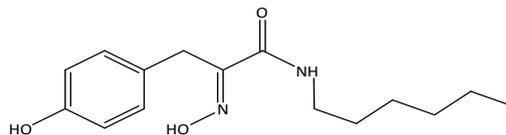
BrPhenethylamide

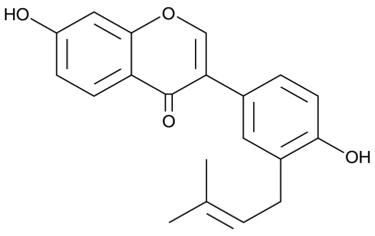
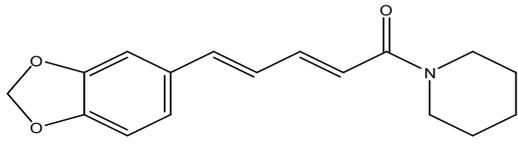
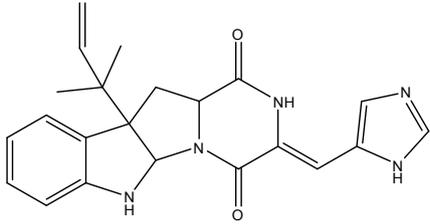
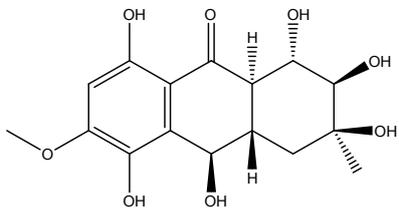


Corynesidone A



Hexylamide



Substanzname	Strukturformel
Neobavaisoflavone	
Piperin	
Roquefortin C	
Tetrahydroxybostricin	

2.9 Geräte

Gerät	Hersteller
Beta-Counter, 1205 Betaplate	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, D
Binokular Leica MZ 16	Leica, Wetzlar, D
Ein- und Multikanalpipetten (Finnpipetten)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Gefrierschrank (- 20 °C)	Robert Bosch GmbH, Gerlingen, D
Gefrierschrank (- 80 °C)	Revco, Asheville, USA
Inkubator BBD 6220	Thermo Scientific, Waltham, USA
Inkubator Hera cell 240	Heraeus, Hanau, D
Kühlschrank	Robert Bosch GmbH, Gerlingen, D

Gerät	Hersteller
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen, D
Multipette®	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences AG, Zizers, CH
Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Hanau, D
Tischmikroskop	Zeiss, Oberkochen, D
Trockenschrank	Binder, Tuttlingen, D
Zellerntegerät Basic 96 Harvester	Zinser Analytic Skatron, Frankfurt, D
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau, D

2.10 Software

Bezeichnung	Hersteller
EndNote X7	Thomson Reuters
Excel (Microsoft Office)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Numbers	Apple Inc., Kalifornien, USA
Pages	Apple Inc., Kalifornien, USA
Prism 5	GraphPad Software Inc., San Diego, USA

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle Zellen wurden in IMDM-Medium mit 10 % FCS in entsprechenden Zellkulturflaschen kultiviert und im Brutschrank bei 37 °C in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre mit 10 % CO₂ inkubiert. Die Durchführung der Arbeit mit Zellkulturen fand an einer Laminar Flow Werkbank statt, wobei ausschließlich sterile Materialien verwendet wurden.

3.1.1.1 Kultivierung von HS27 Fibroblasten

Die humanen Vorhautfibroblasten HS27 dienen vor allem den avirulenten Typ II Stämmen von *T. gondii*, wie z.B. ME49, als Wirtszelle. Sie wachsen kontaktinhibiert und stark adhärent und bilden so einen stabilen Monolayer aus.

HS27 Fibroblasten wurden in Medium in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² im Brutschrank kultiviert. Bei einem Gesamtvolumen von 24 ml bildeten die Zellen innerhalb von ca. sieben Tagen einen konfluenten Monolayer und konnten passagiert werden. Dazu wurden die Fibroblasten mithilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und mittels einer Einwegpipette (5 oder 10 ml) mehrmals resuspendiert, um die Zellen zu vereinzeln. Anschließend wurden 12 ml der Zellsuspension, d.h. die Hälfte der Zellen, mit einer Pipette entnommen und mit Medium in einem Verhältnis von 1:4 auf sechs kleine Kulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm² verteilt (Gesamtvolumen pro Flasche 8 ml), um diese zur Anzucht der Parasiten (s.u.) oder für Versuche einzusetzen. Die restlichen 12 ml der HS27 Fibroblasten verblieben in der ursprünglichen Kulturflasche und wurden zur weiteren Kultivierung mit 12 ml Medium aufgefüllt.

3.1.1.2 Kultivierung von A2 Glioblastomzellen

Die sogenannten A2 Zellen entstammen der humanen Glioblastom-Zelllinie 86HG39. Sie zeichnen sich durch schnelles Wachstum mit gleichzeitiger Kontaktinhibition aus und dienen daher den virulenten Typ I *T. gondii* Stämmen, bspw. BK, als Wirtszelle.

A2 Glioblastomzellen wurden ebenfalls in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² kultiviert. Aufgrund des schnelleren Wachstumsverhaltens als HS27 waren die Kulturflaschen mit einem Gesamtvolumen von je etwa 24 ml bereits nach drei bis vier Tagen dicht genug bewachsen. Anschließend wurden die A2 Glioblastomzellen auf dieselbe Weise wie die HS27 Fibroblasten mittels Zellschaber sowie mehrmaliger Resuspension geerntet. Weiterhin wurde die Hälfte der Zellsuspension wie oben bereits beschrieben passagiert, d.h. im Verhältnis von 1:4 auf sechs Kulturflaschen mit je 25 cm² Fläche verteilt, um für entsprechende Versuche verwendet zu werden. Die verbliebene zweite Hälfte der A2 Zellen erhielt neues Nährmedium und wurde weiter kultiviert.

3.1.2 Kultivierung von *T. gondii*

Im Stadium der Tachyzoiten wurden alle verwendeten *T. gondii* Stämme, also Typ I (BK) sowie Typ II (ME49), in HS27 Fibroblasten als Wirtszellen in IMDM-Medium mit 10 % FCS kultiviert. Dazu wurden 25 cm² Zellkulturflaschen, in denen sich ein konfluenten Monolayer mit HS27 Zellen gebildet hatte, nach einem Mediumwechsel mit jeweils ca. 5×10^6 *T. gondii* Tachyzoiten infiziert. Zur weiteren Vermehrung wurden diese für drei bis vier Tage im Brutschrank aufbewahrt. Während dieser Zeit lysierten die Tachyzoiten ihre Wirtszellen nahezu vollständig und konnten dann sowohl zur weiteren Kultivierung als auch für Versuche eingesetzt werden. Zum Ernten der Toxoplasmen wurde der vollständige Inhalt der Zellkulturflasche mit einer Einwegpipette entnommen. Gegebenenfalls mussten dafür noch am Boden der Kulturflasche anhaftende Zellen mit einem Zellschaber gelöst werden. Das Zellgemisch wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min mit einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (RZB) von $700 \times g$ bei 4 °C zentrifugiert. Dadurch trennten sich die Bestandteile in ihrer Dichte, sodass sich die verbliebenen HS27 Wirtszellen aufgrund ihrer höheren Dichte als Pellet am Boden des Röhrchen ansammelten. Die Toxoplasmen befanden sich aufgrund ihrer geringeren Dichte nach der Zentrifugation im Überstand. Dieser Überstand wurde erneut in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und anschließend für weitere 5 min mit einer RZB von $1400 \times g$ bei 4 °C zentrifugiert, um so die *T. gondii* Tachyzoiten zu sedimentieren. Das sich im Überstand befindende Zellmedium wurde abgesaugt und die Parasiten im Pellet in 10 ml Medium aufgenommen und durch mehrmalige Resuspension vereinzelt. Dann wurden sie mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und entsprechend der gewünschten Anzahl weiter verwendet.

3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen und Parasiten

Wie vorausgehend beschrieben, wurden die verschiedenen Feederzellen und *T. gondii* Stämme geerntet und sedimentiert, um dann im Verhältnis von 2×10^6 Feederzellen sowie 10×10^6 *T. gondii* Tachyzoiten in etwa 1 ml Einfriermedium, bestehend aus FCS mit 10 % DMSO, aufgenommen zu werden. In entsprechenden Einfrierröhrchen wurde die Suspension zunächst 30 min bei - 20 °C und anschließend für einen Tag bei - 80 °C gelagert. Zur dauerhaften Aufbewahrung über mehrere Jahre folgte dann eine Überführung der Einfrierröhrchen in flüssigen Stickstoff (- 196 °C).

Um die Feederzellen bzw. Parasiten aufzutauen, wurden die Einfrierröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff genommen und bei Raumtemperatur angetaut. Nach Zugabe von IMDM-Medium mit 10 % FCS wurden die angetauten Zellen mehrmals resuspendiert, um den Vorgang des Auftauens zu beschleunigen. Im Anschluss wurden sie in 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml vorgelegtem Medium pipettiert, um nach erfolgter Sedimentierung auf entsprechende Zellkulturflaschen mit Medium bzw. HS27 Fibroblasten verteilt zu werden.

3.2 Toxoplasmen-Proliferationstests

3.2.1 Vorbereitung der Zelllinien und anschließende *T. gondii* Infektion unter Zugabe der Wirkstoffe

Der im folgenden beschriebene Assay diente dem Nachweis der intrazellulären Proliferation von *T. gondii*. Gemessen werden sollte diese Proliferation nach Zugabe der potentiell hemmenden Wirkstoffe. Zum Vergleich wurde der Assay parallel mit den in der Klinik bereits etablierten Medikamenten Cotrimoxazol und Clindamycin durchgeführt sowie unter Zugabe von Interferon γ (IFN γ), welches die Positivkontrolle der Wachstumsinhibition darstellte. Als weitere Kontrolle wurde das Wachstum der Toxoplasmen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) sowie ohne Zugabe hemmender Stoffe genutzt.

Ziel dieses Assays war, eine Aussage zur inhibierenden Potenz der zu untersuchenden Wirkstoffe treffen zu können im Vergleich zum ungehemmten Wachstumsverhalten von *T. gondii*.

Für den Assay wurden Mikrotiterplatten mit insgesamt 96 Vertiefungen (Well) und einem Gesamtvolumen von 200 μ l pro Well genutzt. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die Platten im Brutschrank bei 37 °C in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre mit 10 % CO₂ aufbewahrt.

Am ersten Tag wurden die Feederzellen ausgesät. Diese wurden zunächst geerntet und in Zentrifugenröhrchen überführt, um anschließend mithilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt zu werden. Die HS27 Fibroblasten wurden mit einer Anzahl von 2×10^4 pro Well für den *T. gondii* Stamm ME49 eingesetzt. Für die BK Toxoplasmen benötigte man A2 Astrozyten mit je 3×10^4 Zellen pro Well.

Des Weiteren wurden die Fibroblasten der Interferon-Kontrolle bereits zu diesem Zeitpunkt, d.h. 24 Stunden vor der Infektion mit *T. gondii*, mit IFN γ vorstimuliert. Für diese Kontrolle waren in der Regel acht Well vorgesehen.

Der Einsatz des IFN γ in diesem Assay erfolgte in einer Konzentration von 300 U pro ml. Dabei wurden für die Interferon-Kontrolle pro Well 100 μ l dieser Verdünnung benötigt.

Am zweiten Tag, d.h. nach 24 h, wurden die zu untersuchenden Wirkstoffe sowie erneut IFN γ hinzugegeben und anschließend die Zellen mit *T. gondii* infiziert.

Zunächst wurde das Medium vom Vortag vollständig von der Mikrotiterplatte abgesaugt, während die Feederzellen weiterhin am Boden der Platte haften blieben. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von neuem Zellmedium mit einem Volumen von 100 μ l.

Die zu testenden Wirkstoffe waren bereits in DMSO gelöst und wurden im Assay in einer Verdünnung von 1:100, entsprechend einer Konzentration von 100 μ M, eingesetzt. Aufgrund der bereits vorgelegten 100 μ l Medium pro Well mussten dementsprechend 2 μ l der jeweiligen Substanz in 100 μ l Medium gelöst werden, d.h. eine 1:50 Verdünnung, um die gewünschte Wirkstoff-Konzentration von 100 μ M zu erhalten.

Die verdünnten Wirkstoffe mit Medium wurden daraufhin in die einzelnen Wells überführt und auf der Mikrotiterplatte im Verhältnis von 1:2 heruntertitriert, um später deren inhibierende Wirkung im Verlauf der Konzentrationsstufen bestimmen zu können. Pro Konzentrationsstufe wurden Dreierwerte für jede Substanz angesetzt.

Des Weiteren wurden den Interferon-Kontrollen erneut 100 µl IFN γ , entsprechend einer Konzentration von 300 U pro ml, hinzugegeben.

Vergleichend dazu ließen sich die beiden Antibiotika Cotrimoxazol i.v. und Clindamycin i.v. einsetzen, welche im klinischen Alltag regelmäßig bei Patienten/-innen mit Toxoplasmose angewendet werden. Die einzusetzende maximale Konzentration wurde dabei anhand der in der Packungsbeilage empfohlenen Werte berechnet. Die Verdünnung von Cotrimoxazol lag bei 5 ml (480 mg) Konzentrat auf 125 ml Medium, umgerechnet 40 µl (3,84 mg) auf 1 ml Medium. Für Clindamycin wurden 4 ml (600 mg) Konzentrat auf 50 ml Medium empfohlen, was 80 µl (12 mg) auf 1 ml Medium entsprach. Die weiteren Arbeitsschritte entsprachen hierbei denselben, wie bereits für die anderen Wirkstoffe beschrieben.

Im letzten Schritt erfolgte die Zugabe der Toxoplasmen. Dafür wurden die Parasiten, wie in 3.1.2. *Kultivierung von T. gondii* beschrieben, geerntet und im Anschluss in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die verschiedenen *T. gondii* Typen wurden dabei in unterschiedlicher Anzahl eingesetzt. Während die HS27 Fibroblasten mit je 2×10^4 ME49 pro Well infiziert wurden, benötigte man bei dem BK Stamm mit 3×10^4 Zellen pro Well dieselbe Anzahl Parasiten wie Astrozyten.

Als Positivkontrolle des Assays dienten Toxoplasmenkulturen der jeweilig eingesetzten Stämme ohne Zusatz von Wirkstoffen sowie Fibroblasten in Zellmedium ohne Zugabe von *T. gondii*. Für beide Kontrollen waren jeweils acht Well auf der Mikrotiterplatte vorgesehen.

Nach weiteren 48 h wurden die proliferierenden Toxoplasmen mit Tritium-markiertem Uracil (^3H -Uracil) radioaktiv gekennzeichnet. In der *T. gondii* Positivkontrolle konnte man zu diesem Zeitpunkt mikroskopisch die beginnende Lyse der Fibroblasten als Wirtszellen durch die Parasiten erkennen.

Pro Well wurden 10 µl ^3H -Uracil in einer Konzentration von 5 mCi pro 5 ml hinzugeführt, um später die Proliferation von *T. gondii*, welches das ^3H -Uracil während der Vermehrung in die RNA einbaut (s.u.), messen zu können.

Die Inkubationszeit des ^3H -Uracil für diesen Assay betrug ca. 16 bis 24 Stunden je nach fortgeschrittener Lyse der Wirtszellen.

Im daran anschließenden letzten Schritt wurde der Assay bei - 20 °C eingefroren. Zu diesem Zeitpunkt ließ sich in der Positivkontrolle mit *T. gondii* ohne Inhibition ein deutliches Wachstum feststellen, da die Parasiten ihre Wirtszellen nahezu vollständig lysiert hatten.

3.2.2 Quantitativer Nachweis der *T. gondii* Proliferation

Zur Auswertung des Assays wurden die markierten Mikrotiterplatten bei Raumtemperatur aufgetaut.

Die Messung der Proliferation von *T. gondii* erfolgte über den Einbau von ^3H -Uracil [110]. Dieses wurde von *T. gondii* bei Vermehrung der Zellen mithilfe des Enzyms Uracil-Phosphoribosyl-Transferase in die RNA eingebaut. Dadurch konnte anschließend die Häufigkeit des Einbaus mit einem Beta-Counter gemessen werden und diente so der Quantifizierung des Parasitenwachstums.

Nach dem Auftauen der Mikrotiterplatten wurden die Zellen mittels eines Zellerntegeräts auf Glasfaserfilter übertragen. Letztere trockneten 20 min bei 100 °C im Trockenschrank, um danach in 10 ml Szintillationsflüssigkeit getränkt und in Plastikhüllen eingeschweißt zu werden. Anschließend wurden die Filter in dafür vorgesehene Kassetten eingespannt und in einem Beta-Counter ausgewertet, wobei die sogenannte Cerenkow-Strahlung gemessen wurde. Diese entsteht beim Zerfall des Tritiums (^3H -Uracil) in der Szintillationsflüssigkeit und wird als *counts per minute* (cpm) angegeben.

3.2.3 Ermitteln der mittleren effektiven Wirk-Konzentration EC_{50}

Die getesteten Substanzen wurden bezüglich ihres Effektes in drei Gruppen unterteilt. Dazu gehörte zunächst die Gruppe der Substanzen, die inhibitorisch auf *T. gondii* wirkten. Weiterhin zeigten viele Wirkstoffe keinen Effekt auf die *T. gondii* Proliferation, sodass diese ebenfalls als eine Gruppe definiert wurden. Eine weitere Gruppe waren die Substanzen, welche zytotoxisch auf die Wirtszellen wirkten. Die Zytotoxizität der Substanzen auf die Feederzellen wurde mittels Phasenkontrastmikroskop geprüft.

Die Proliferation von *T. gondii* wurde graphisch dargestellt. Dabei wurde in Abhängigkeit der auf der Abszissenachse dargestellten Wirkstoffkonzentrationen in μM die gemessene Cerenkow-Strahlung beim Zerfall von ^3H -Uracil in cpm auf der Ordinatenachse angegeben.

Als Maß für die inhibitorische Effektivität der Substanzen auf *T. gondii* wurde für jede einzelne der jeweilige EC_{50} -Wert berechnet, welcher die mittlere effektive Konzentration in μM angibt und in der Pharmakologie der effektiven Konzentration entspricht, bei der sich ein halbmaximaler Effekt beobachten lässt. Dessen Bestimmung erfolgte mithilfe der Konzentrationsgraphen, wie in der jeweiligen Abbildung dargestellt. Nach dem Ermitteln der halbmaximalen *T. gondii* Proliferation wurde von der Ordinatenachse aus eine zur Abszissenachse verlaufende Parallele gezogen, bis sich diese mit der Kurve der Datenpunkte schnitt. Die entsprechend abgeleitete Wirkstoffkonzentration in μM auf der Abszissenachse ist die mittlere effektive Konzentration EC_{50} .

4 Ergebnisse

4.1 Identifikation von Substanzen mit Hemmung auf *T. gondii*

In den Vorversuchen wurden alle 151 Substanzen zunächst mittels des Toxoplasmen-Proliferationstests auf deren Wirkung auf *T. gondii* Stamm ME49 (Typ II) ausgetestet.

Von diesen wirkten 56 Substanzen zytotoxisch auf die Wirtszellen und wurden somit nicht weiter verfolgt, da aufgrund der lysierten Wirtszellen keine Aussage mehr bezüglich der Wirksamkeit auf die Toxoplasmen selbst gemacht werden konnte. Die Zytotoxizität auf die Feederzellen wurden optisch anhand ihrer Lyse unter dem Phasenkontrastmikroskop ermittelt.

Weiterhin zeigten 61 Wirkstoffe keinen Effekt auf die Proliferation, sodass auch diese nicht weiter betrachtet wurden.

Als inhibierend auf das *T. gondii* Wachstum erwiesen sich 34 Wirkstoffe. Diese konnten in verschiedenen Konzentrationen im Toxoplasmen-Proliferationstest bei anschließender Markierung mit ³H-Uracil detektiert werden. Die 13 Wirkstoffe mit den besten Inhibitionswerten waren Bestandteil der weiteren Austestung (s. 4.2 Toxoplasmen-Proliferationstests).

Die Ergebnisse der Vorversuche sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Effekt der Wirkstoffe auf den *T. gondii* Stamm ME49 in Vorversuchen.

In der nachfolgenden Tabelle sind alle in den Vorversuchen getesteten Wirkstoffe in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet. Der Effekt bezieht sich auf den *T. gondii* Stamm ME49 sowie dessen Feederzellen, den HS27 Fibroblasten. Es lässt sich zwischen einer Hemmung von *T. gondii* (grün markiert) sowie keinem Effekt auf die Proliferation von *T. gondii* (grau markiert) unterscheiden. Bei zytotoxischer Wirkung auf die Feederzellen (rot markiert) wurden die Wirkstoffe nicht weiter verfolgt.

Substanzname	<i>T. gondii</i> Hemmung	<i>T. gondii</i> Proliferation	Feederzell- Zytotoxizität
(-) Ageloxime D			×
(-) Arctigenin			×
(-) Matairesinol	×		
(-) α-Bisabolol		×	
(+) Aeroplysinin-1			×
(+) Agelasidine C			×
(+) Avarol	×		
(E)-Methyl-3-(4-methoxyphenoxy) propenoat			×
18-Dehydroxycytochalasin H			×
2,2-Dimethylchroman-3,6-diol		×	

Substanzname	<i>T. gondii</i> Hemmung	<i>T. gondii</i> Proliferation	Feederzell- Zytotoxizität
2,6-dibromo-4-hydroxy-4-methoxycarbonylmethylcyclohexa-2,5-dien-1-one	×		
24-Ethylcholesta-5-en-3β-ol		×	
3-O-Methylgallic acid butyl ester	×		
3,4,5-Tri-O-Methylgallic acid butyl ester			×
3,4,6-Tribromo-2-(2',4'-dibromophenoxy) phenol			×
3,5-Dibromo-1H-pyrrole-2-carboxylic acid		×	
3,5-Dibromo-2-hydroxy-4-methoxyphenylacetonitril		×	
3,5-Dibromo-4-hydroxyphenylacetic acid			×
3,5-Dibromo-4-hydroxyphenylacetic acidmethyl ester			×
4-(4,5-Dibromo-1-methyl-1H-pyrrole-2-carboxamido) butanoic acid		×	
4,5-Dibromo-1H-pyrrol-2-carbonsäureethylester	×		
4,5-Dibromo-1H-pyrrol-2-carboxyamide		×	
4,6-Dibromo-2-(2',4'-dibromophenoxy) phenol			×
4'-O-Methyl norhomosekikaic acid			×
4',5,7-Trimethoxydihydroflavonol			×
5,5'-Dibromohemibastadin-1			×
6-nonyl salicylic acid + 6-noneyl salicylic acid (equal mixture)	×		
7-O-Methylaloeresin A		×	
Aeropylsinin		×	
Aerotionin	×		
Agelanin B		×	
Agelasine D			×
Ageloxime-D			×

Substanzname	<i>T. gondii</i> Hemmung	<i>T. gondii</i> Proliferation	Feederzell- Zytotoxizität
Aloeemodin		×	
Aloeresin A		×	
Aloesin		×	
Alternarienoic acid		×	
Alternariol	×		
Alternariol monomethyl ether	×		
Altersolanol A			×
Anomalin A	×		
Aranorosin			×
Aranorosinol B			×
Avaron			×
Bakuchiol			×
Benzylnitrile		×	
Berberin hemisulfat	×		
Br ₂ Cyclohexylamide		×	
Br ₂ Hexylamide	×		
Br ₂ Histamide		×	
Br ₂ Hydroxyethylamide		×	
Br ₂ Isobutylamide	×		
Br ₂ Oxime ester		×	
Br ₂ Phenethylamide	×		
Br ₂ Tryptamide			×
Br ₂ Tyrosin		×	
Br ₃ Histamide		×	
BrCyclohexylamide	×		
BrHexylamide			×
BrHistamide			×
BrIsobutylamide		×	

Substanzname	<i>T. gondii</i> Hemmung	<i>T. gondii</i> Proliferation	Feederzell- Zytotoxizität
BrPhenethylamide	×		
Callyaerin A	×		
Callyaerin B			×
Callyaerin C		×	
Callyaerin D			×
Callyaerin E		×	
Callyaerin F	×		
Catechin		×	
Chlorogenic acid		×	
Cholest-5-en-3 β -ol-(22E,24S)-24-Methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol	×		
Cinnamic acid		×	
Citrinin		×	
Corynesidone A	×		
Cyclophenol		×	
Cytochalasin D derv.			×
Dammarenolsäure	×		
Dasyclamide		×	
DBHB			×
Debromhymenialdisin		×	
Debromsceptrin		×	
Demethoxyencecalin		×	
Dibromhemibastadin-1			×
Dibromhydroxyphakellin		×	
Dibromophakellin HCl		×	
Dicarnoxide			×
Dienon			×
Dihydrogeodin	×		

Substanzname	<i>T. gondii</i> Hemmung	<i>T. gondii</i> Proliferation	Feederzell- Zytotoxizität
Emb-peptide = WLIP			×
Embeurekol B		×	
Enniatin A1			×
Enniatin B			×
Ergosterol			×
Ester-Br ₂			×
Euparin		×	
Flavomannin A		×	
Helenalin			×
Hexylamide	×		
Histamide	×		
Homosekikaic Acid			×
Hydroxydienonsäure		×	
Hydroxysydonsäure		×	
Hymenidin			×
Ilimaquinone = Ilimachinon			×
Indole-3-carboxylic acid		×	
Isobavachalcone			×
Isofistularin 3			×
Isovitexin			×
Kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnopyranoside = Kaempferitrin		×	
Kahalalide F			×
Kojic acid		×	
Kuanoniamin D			×
Lutein		×	
Macrosporin		×	
Manzamine A			×

Substanzname	<i>T. gondii</i> Hemmung	<i>T. gondii</i> Proliferation	Feederzell- Zytotoxizität
Mauritamide B		×	
Mauritamide C		×	
Meleagrín			×
Midpacamide		×	
N-methyl-4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid	×		
Neobavaisoflavone	×		
Nor-Bromhemibastadin		×	
Orientin		×	
Oxime acid		×	
Oxime ester		×	
Phenethylamide		×	
Phenol A acid		×	
Phomoxanthon A			×
Piperin	×		
Prianicin			×
Roquefortin C	×		
Sceptrin		×	
Sclerotiorin			×
Scorzodihydrostilbene B		×	
Sekikaic acid	×		
Skyrin			×
Stemphyperlenol			×
Talaromin B		×	
Tetrahydroxybostricin	×		
Tetrahydroxystilbeneglucoside		×	
Theonellapeptolide Ie			×
Tilirosid		×	
Tryptamide	×		

Substanzname	<i>T. gondii</i> Hemmung	<i>T. gondii</i> Proliferation	Feederzell- Zytotoxizität
Viridicatin			×
Visnagin		×	
W493 B	×		
Waolsäure		×	
WLIP			×
Wortmannin	×		
Wortmannin A	×		
Xanthorrhizol			×

4.2 Toxoplasmen-Proliferationstests

4.2.1 Ergebnisse für den *T. gondii* Typ II Stamm ME49

4.2.1.1 Wirkung der Naturstoffe auf den *T. gondii* Stamm ME49

Von den 151 Wirkstoffen wurden diejenigen aus den Vorversuchen ausgewählt, die den größten inhibitorischen Effekt auf den *T. gondii* Stamm ME49 bei möglichst gering eingesetzter Hemmkonzentration zeigten. Die 13 dabei ausgewählten Wirkstoffe wurden anschließend in Toxoplasmen-Proliferationstests ausgetestet, um zu untersuchen, wie effektiv diese Wirkstoffe in verschiedenen Titrationsstufen den *T. gondii* Stamm ME49 hemmen. Dies geschah in mindestens drei voneinander unabhängigen Tests unter gleichen Versuchsbedingungen, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nachzuweisen. Als Maß dafür wurde für jede Substanz der jeweilige EC_{50} -Wert berechnet. Dieser gibt die mittlere effektive Konzentration in μM an und entspricht in der Pharmakologie der effektiven Konzentration, bei der sich ein halbmaximaler Effekt beobachten lässt.

In den folgenden Abbildungen 4.1 bis 4.13 sind für jeden Wirkstoff die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Versuchen für den *T. gondii* Stamm ME49 graphisch dargestellt.

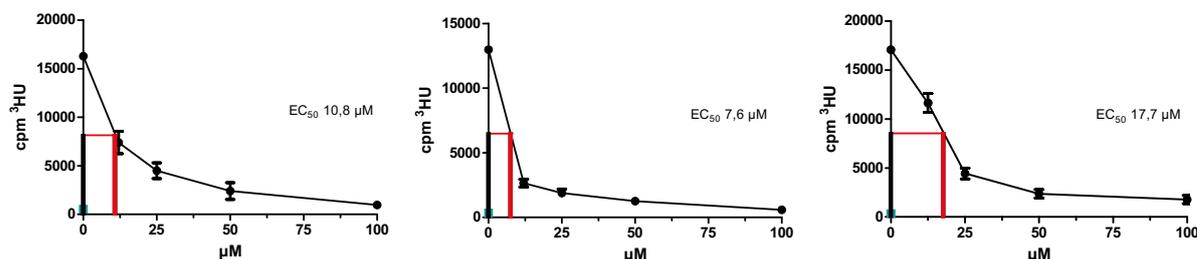


Abbildung 4.1: Wirkung steigender Konzentrationen von (-) Matairesinol auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes ME49.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49 wurde von (-) Matairesinol dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 μM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ^3H -Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 μM) wurde durchgeführt.

(-) Matairesinol reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49. Der mittlere EC_{50} -Wert von (-) Matairesinol lag bei 12,0 μM mit einer Standardabweichung von $\pm 4,21$ μM .

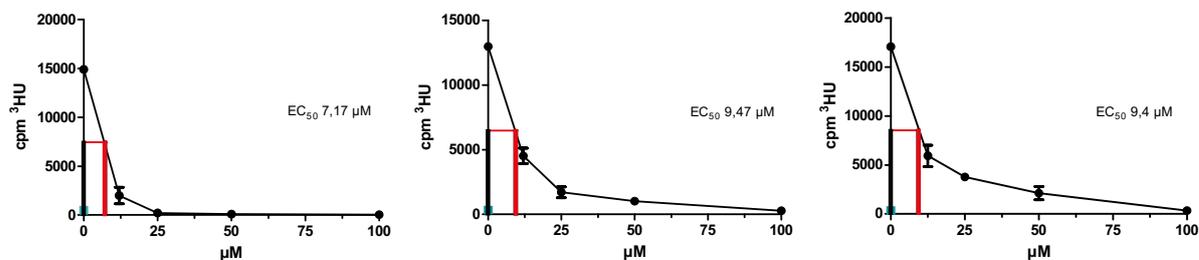


Abbildung 4.2: Wirkung steigender Konzentrationen von (+) Avarol auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes ME49.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49 wurde von (+) Avarol dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 μM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ^3H -Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 μM) wurde durchgeführt.

(+) Avarol reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49. Der mittlere EC_{50} -Wert von (+) Avarol lag bei 8,68 μM mit einer Standardabweichung von $\pm 1,07 \mu\text{M}$.

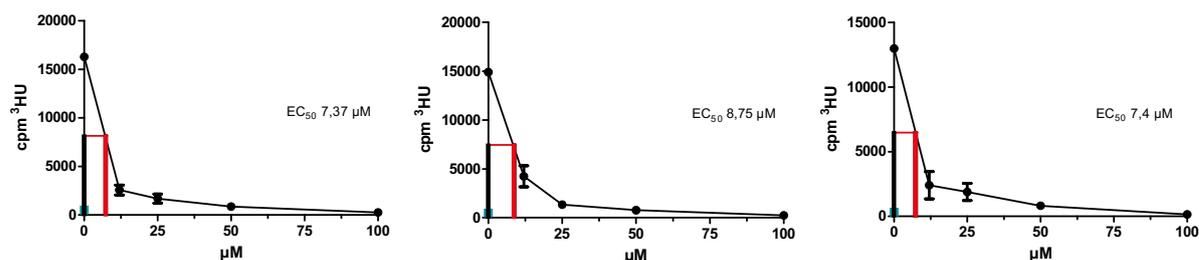


Abbildung 4.3: Wirkung steigender Konzentrationen von 3-O-Methylgallic acid butyl ester auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes ME49.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49 wurde von 3-O-Methylgallic acid butyl ester dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 μM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ^3H -Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 μM) wurde durchgeführt.

3-O-Methylgallic acid butyl ester reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49. Der mittlere EC_{50} -Wert von 3-O-Methylgallic acid butyl ester lag bei 7,84 μM mit einer Standardabweichung von $\pm 0,64 \mu\text{M}$.

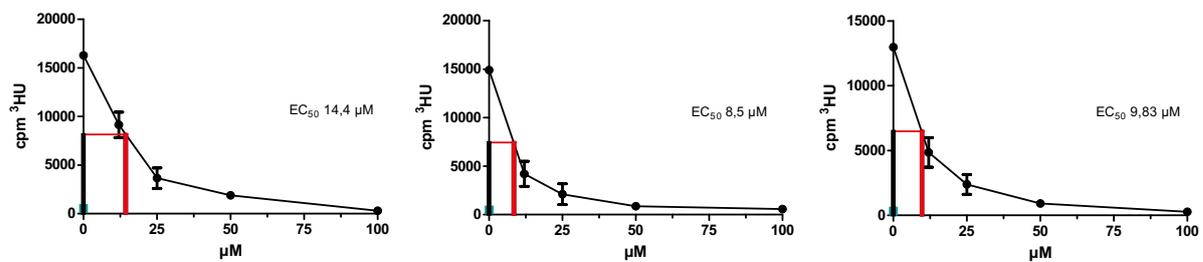


Abbildung 4.4: Wirkung steigender Konzentrationen von Alternariol auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes ME49.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49 wurde von Alternariol dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 μM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 μM) wurde durchgeführt.

Alternariol reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49. Der mittlere EC₅₀-Wert von Alternariol lag bei 10,9 μM mit einer Standardabweichung von $\pm 2,53$ μM.

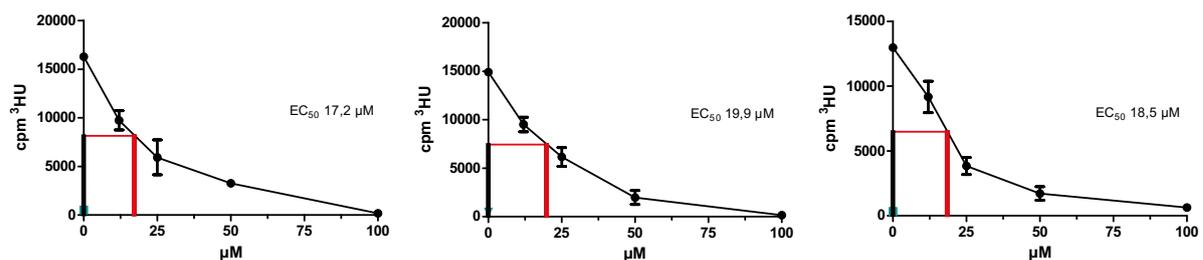


Abbildung 4.5: Wirkung steigender Konzentrationen von Berberin hemisulfat auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes ME49.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49 wurde von Berberin hemisulfat dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 μM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 μM) wurde durchgeführt.

Berberin hemisulfat reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49. Der mittlere EC₅₀-Wert von Berberin hemisulfat lag bei 18,5 μM mit einer Standardabweichung von $\pm 1,10$ μM.

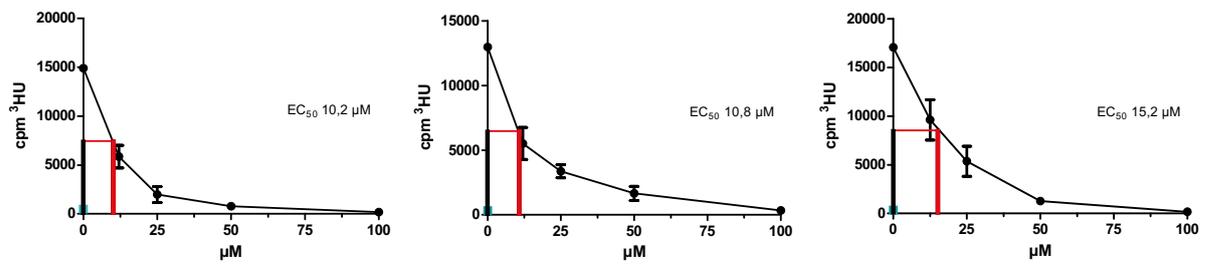


Abbildung 4.6: Wirkung steigender Konzentrationen von Br₂Hexylamide auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes ME49.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49 wurde von Br₂Hexylamide dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 µM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 µM) wurde durchgeführt.

Br₂Hexylamide reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49. Der mittlere EC₅₀-Wert von Br₂Hexylamide lag bei 12,1 µM mit einer Standardabweichung von $\pm 2,23$ µM.

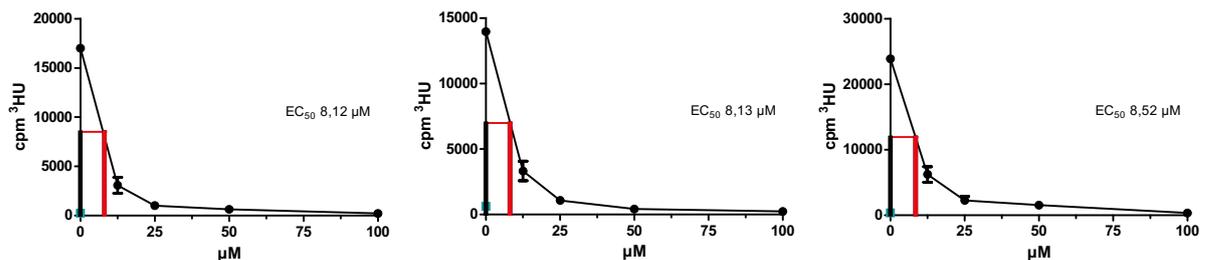


Abbildung 4.7: Wirkung steigender Konzentrationen von BrPhenethylamide auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes ME49.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49 wurde von BrPhenethylamide dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 µM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 µM) wurde durchgeführt.

BrPhenethylamide reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49. Der mittlere EC₅₀-Wert von BrPhenethylamide lag bei 8,26 µM mit einer Standardabweichung von $\pm 0,19$ µM.

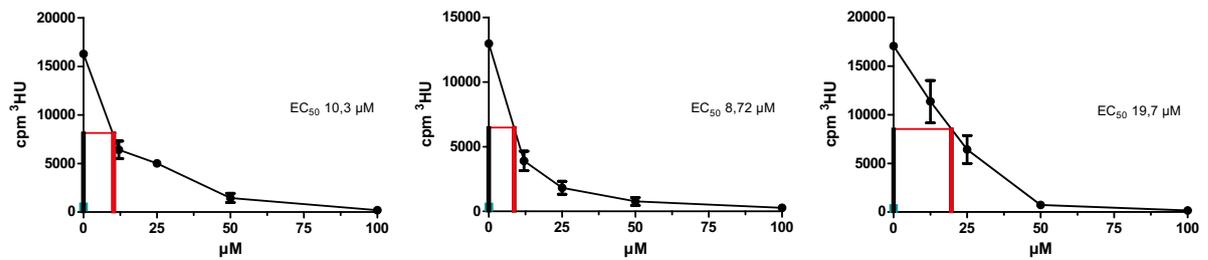


Abbildung 4.8: Wirkung steigender Konzentrationen von Corynesidone A auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes ME49.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49 wurde von Corynesidone A dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 µM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 µM) wurde durchgeführt.

Corynesidone A reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49. Der mittlere EC₅₀-Wert von Corynesidone A lag bei 12,9 µM mit einer Standardabweichung von $\pm 4,85$ µM.

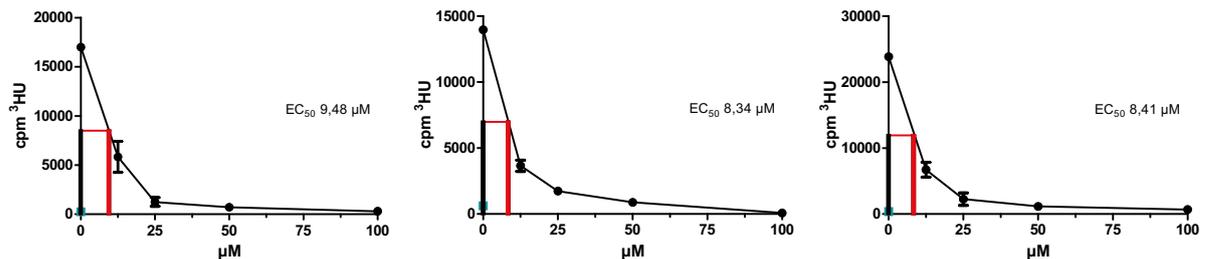


Abbildung 4.9: Wirkung steigender Konzentrationen von Hexylamide auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes ME49.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49 wurde von Hexylamide dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 µM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 µM) wurde durchgeführt.

Hexylamide reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49. Der mittlere EC₅₀-Wert von Hexylamide lag bei 8,74 µM mit einer Standardabweichung von $\pm 0,52$ µM.

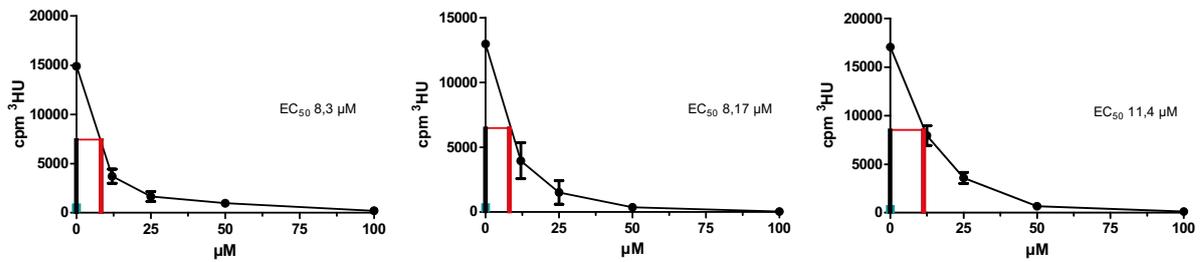


Abbildung 4.10: Wirkung steigender Konzentrationen von Neobavaisoflavone auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes ME49.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49 wurde von Neobavaisoflavone dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 µM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 µM) wurde durchgeführt.

Neobavaisoflavone reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49. Der mittlere EC₅₀-Wert von Neobavaisoflavone lag bei 9,29 µM mit einer Standardabweichung von $\pm 1,49$ µM.

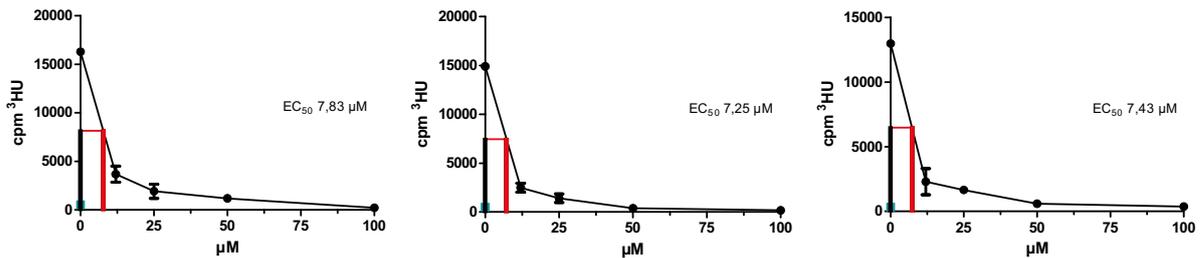


Abbildung 4.11: Wirkung steigender Konzentrationen von Piperin auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes ME49.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49 wurde von Piperin dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 µM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 µM) wurde durchgeführt.

Piperin reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49. Der mittlere EC₅₀-Wert von Piperin lag bei 7,50 µM mit einer Standardabweichung von $\pm 0,24$ µM.

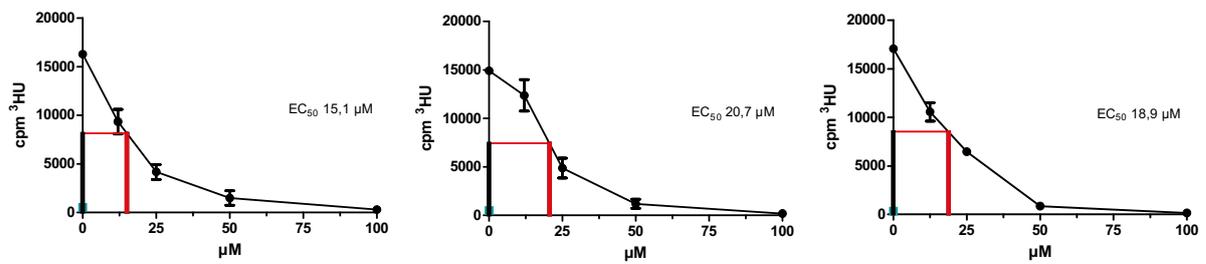


Abbildung 4.12: Wirkung steigender Konzentrationen von Roquefortin C auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes ME49.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49 wurde von Roquefortin C dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 μM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ^3H -Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 μM) wurde durchgeführt.

Roquefortin C reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49. Der mittlere EC₅₀-Wert von Roquefortin C lag bei 18,2 μM mit einer Standardabweichung von $\pm 2,33 \mu\text{M}$.

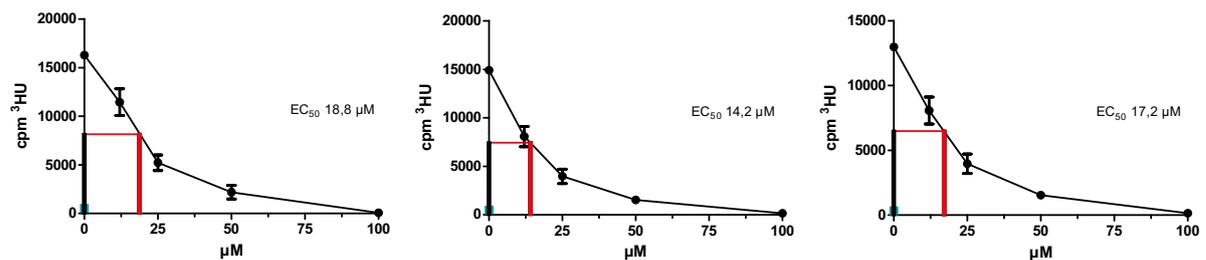


Abbildung 4.13: Wirkung steigender Konzentrationen von Tetrahydroxybostricin auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes ME49.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49 wurde von Tetrahydroxybostricin dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 μM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ^3H -Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 μM) wurde durchgeführt.

Tetrahydroxybostricin reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49. Der mittlere EC₅₀-Wert von Tetrahydroxybostricin lag bei 16,7 μM mit einer Standardabweichung von $\pm 1,91 \mu\text{M}$.

Die in den Abbildungen 4.1 bis 4.13 graphisch dargestellten Werte sind der besseren Übersicht wegen in Tabelle 4.2 zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 4.2: Übersicht der EC₅₀-Werte der Wirkstoffe für den *T. gondii* Stamm ME49.

Die folgende Tabelle fasst für den *T. gondii* Stamm ME49 zur verbesserten Übersicht die drei jeweiligen EC₅₀-Werte der entsprechenden Wirkstoffe aus den dargestellten Versuchsreihen einschließlich deren Mittelwerte (\bar{x}) mit der entsprechenden Standardabweichung (SD) zusammen. Die EC₅₀-Werte, angegeben in μM , wurden je aus drei voneinander unabhängigen Toxoplasmen-Proliferationsassays (1 - 3) ermittelt.

Substanzname	EC ₅₀ (μM)			
	1	2	3	$\bar{x} \pm \text{SD}$
(-) Matairesinol	10,8	7,60	17,7	12,0 \pm 4,21
(+) Avarol	7,17	9,47	9,40	8,68 \pm 1,07
3-O-Methylgallic acid butyl ester	7,37	8,75	7,40	7,84 \pm 0,64
Alternariol	14,4	8,50	9,83	10,9 \pm 2,53
Berberin hemisulfat	17,2	19,9	18,5	18,5 \pm 1,10
Br ₂ Hexylamide	10,2	10,8	15,2	12,1 \pm 2,23
BrPhenethylamide	8,12	8,13	8,52	8,26 \pm 0,19
Corynesidone A	10,3	8,72	19,7	12,9 \pm 4,85
Hexylamide	9,48	8,34	8,41	8,74 \pm 0,52
Neobavaisoflavone	8,30	8,17	11,4	9,29 \pm 1,49
Piperin	7,83	7,25	7,43	7,50 \pm 0,24
Roquefortin C	15,1	20,7	18,9	18,2 \pm 2,33
Tetrahydroxybostricin	18,8	14,2	17,2	16,7 \pm 1,91

Den niedrigsten EC₅₀-Wert im Bezug auf die Inhibition des Wachstums von *T. gondii* Stamm ME49 wies hierbei Piperin (7,50 \pm 0,24 μM) auf. Den zweitniedrigsten EC₅₀-Wert konnte 3-O-Methylgallic acid butyl ester (7,84 \pm 0,64 μM) erreichen, gefolgt von BrPhenethylamide (8,26 \pm 0,19 μM).

4.2.1.2 Wirkung bekannter Antibiotika auf den *T. gondii* Stamm ME49

Um die getesteten Wirkstoffe in ihrer Potenz zu beurteilen, wurden vergleichend dazu die für die derzeitige Behandlung der Toxoplasmose etablierten Antibiotika Cotrimoxazol und Clindamycin eingesetzt. Dafür wurde der Toxoplasmen-Proliferationstest unter gleichen Versuchsbedingungen wie bei den anderen Wirkstoffen eingesetzt, beginnend mit den im klinischen Gebrauch empfohlenen Konzentrationen.

Die Ergebnisse der Testung der Antibiotika Cotrimoxazol und Clindamycin aus je drei aufeinanderfolgenden Assays mit dem *T. gondii* Stamm ME49 ist in den Abbildungen 4.14 und 4.15 graphisch dargestellt.

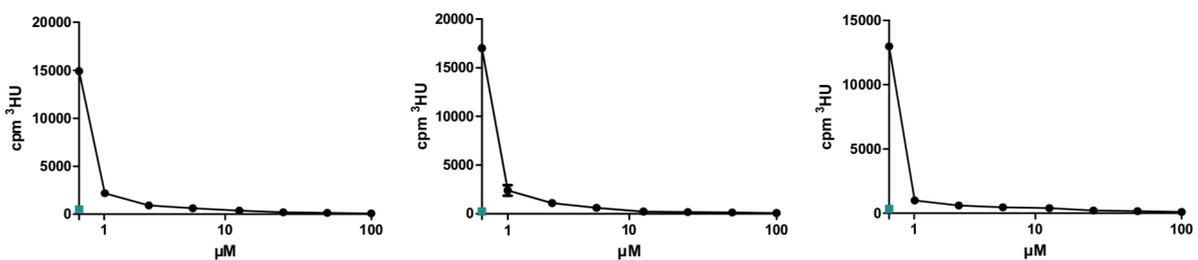


Abbildung 4.14: Wirkung steigender Konzentrationen von Cotrimoxazol auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes ME49.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49 wurde von Cotrimoxazol durch eine starke Inhibition dosisabhängig reduziert. Der Übersicht wegen wurden die Konzentrationen in Log-Stufen angegeben. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 1, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 und 100 μM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 μM) wurde durchgeführt.

Cotrimoxazol reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49. Der mittlere EC₅₀-Wert von Cotrimoxazol lag bei kleiner 1 μM.

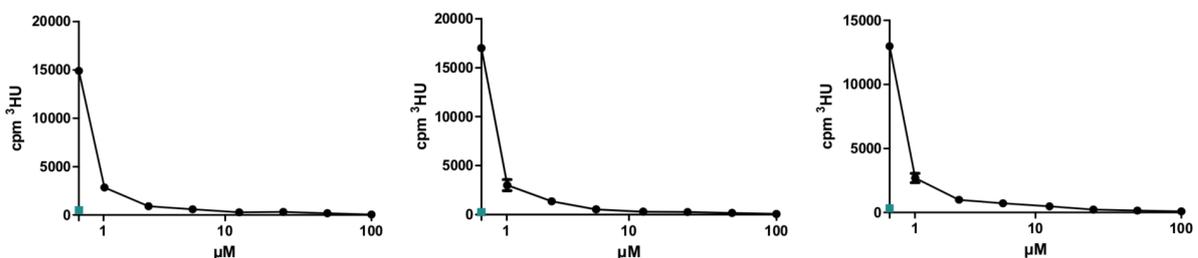


Abbildung 4.15: Wirkung steigender Konzentrationen von Clindamycin auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes ME49.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49 wurde von Clindamycin durch eine starke Inhibition dosisabhängig reduziert. Der Übersicht wegen wurden die Konzentrationen in Log-Stufen angegeben.

Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 1, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 und 100 μM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ^3H -Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 μM) wurde durchgeführt.

Clindamycin reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes ME49. Der mittlere EC₅₀-Wert von Clindamycin lag bei kleiner 1 μM .

4.2.2 Ergebnisse für den *T. gondii* Typ I Stamm BK

4.2.2.1 Wirkung der Naturstoffe auf den *T. gondii* Stamm BK

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die 13 ausgesuchten Wirkstoffe mit nachgewiesener Inhibition auf den *T. gondii* Stamm ME49 ebenfalls eine hemmende Wirkung auf den virulenten Typ I *T. gondii* Stamm BK ausüben. Um einen Effekt auf den Stamm BK festzustellen, wurden die Wirkstoffe erneut in unterschiedlichen Konzentrationen in mindestens drei voneinander unabhängigen, unter gleichen Bedingungen durchgeführten Toxoplasmen-Proliferationstests ausgetestet. Zur Beurteilung dafür diente für jede Substanz wiederum die Berechnung des jeweiligen EC₅₀-Wertes.

In den folgenden Abbildungen 4.16 bis 4.28 sind für jeden Wirkstoff die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Versuchen für den *T. gondii* Stamm BK graphisch dargestellt.

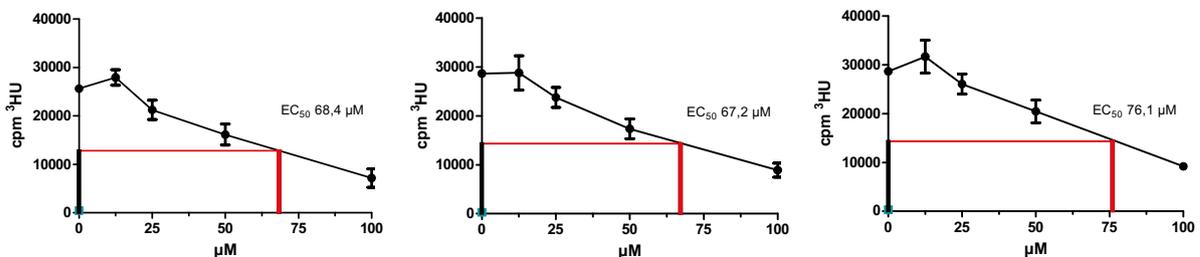


Abbildung 4.16: Wirkung steigender Konzentrationen von (-) Matairesinol auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes BK.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK wurde von (-) Matairesinol dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 µM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 µM) wurde durchgeführt.

(-) Matairesinol reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK. Der mittlere EC₅₀-Wert von (-) Matairesinol lag bei 70,6 µM mit einer Standardabweichung von $\pm 3,94$ µM.

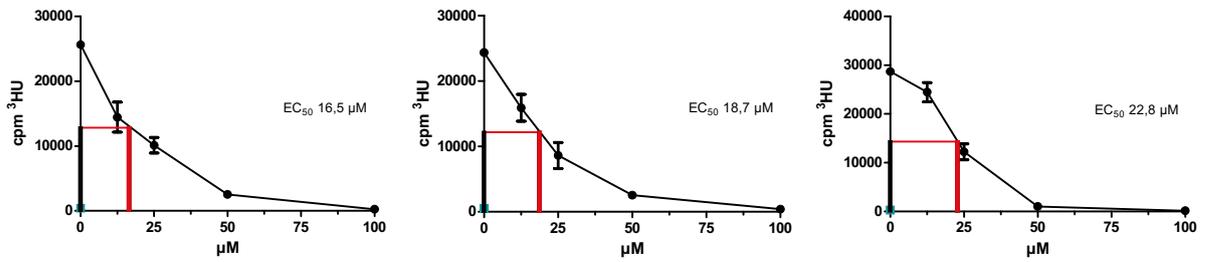


Abbildung 4.17: Wirkung steigender Konzentrationen von (+) Avarol auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes BK.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK wurde von (+) Avarol dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 µM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 µM) wurde durchgeführt.

(+) Avarol reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK. Der mittlere EC₅₀-Wert von (+) Avarol lag bei 19,3 µM mit einer Standardabweichung von \pm 2,61 µM.

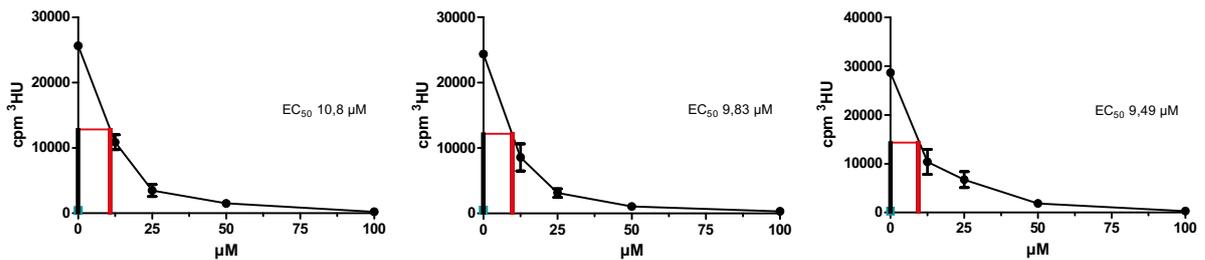


Abbildung 4.18: Wirkung steigender Konzentrationen von 3-O-Methylgallic acid butyl ester auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes BK.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK wurde von 3-O-Methylgallic acid butyl ester dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 µM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 µM) wurde durchgeführt.

3-O-Methylgallic acid butyl ester reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK. Der mittlere EC₅₀-Wert von 3-O-Methylgallic acid butyl ester lag bei 10,0 µM mit einer Standardabweichung von \pm 0,56 µM.

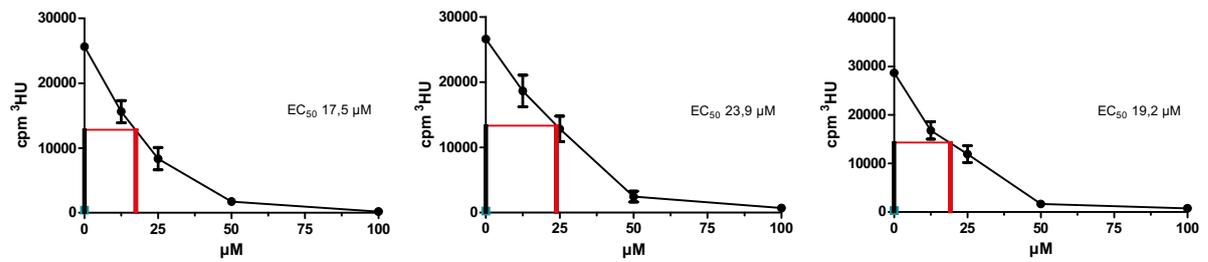


Abbildung 4.19: Wirkung steigender Konzentrationen von Alternariol auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes BK.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK wurde von Alternariol dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 µM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 µM) wurde durchgeführt.

Alternariol reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK. Der mittlere EC₅₀-Wert von Alternariol lag bei 20,2 µM mit einer Standardabweichung von \pm 2,71 µM.

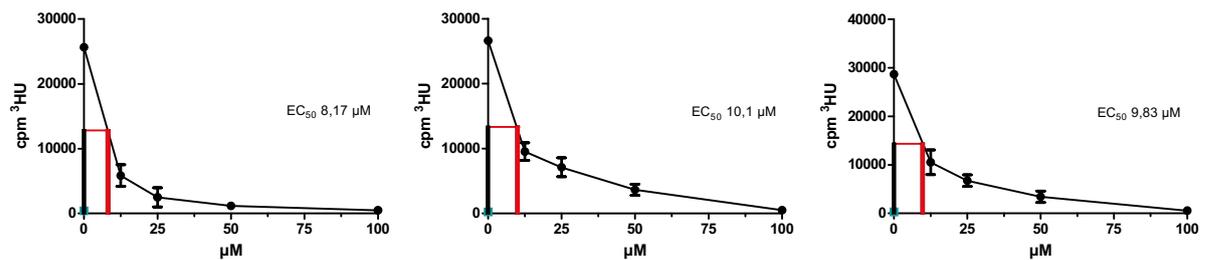


Abbildung 4.20: Wirkung steigender Konzentrationen von Berberin hemisulfat auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes BK.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK wurde von Berberin hemisulfat dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 µM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 µM) wurde durchgeführt.

Berberin hemisulfat reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK. Der mittlere EC₅₀-Wert von Berberin hemisulfat lag bei 9,37 µM mit einer Standardabweichung von \pm 0,85 µM.

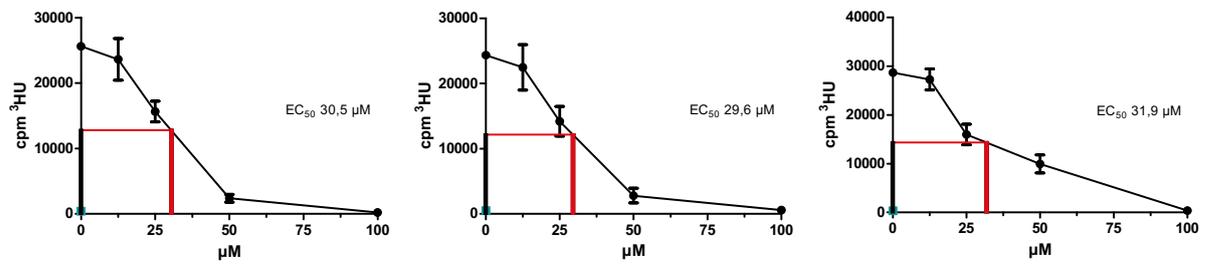


Abbildung 4.21: Wirkung steigender Konzentrationen von Br₂Hexylamide auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes BK.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK wurde von Br₂Hexylamide dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 μM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 μM) wurde durchgeführt.

Br₂Hexylamide reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK. Der mittlere EC₅₀-Wert von Br₂Hexylamide lag bei 30,7 μM mit einer Standardabweichung von ± 0,95 μM.

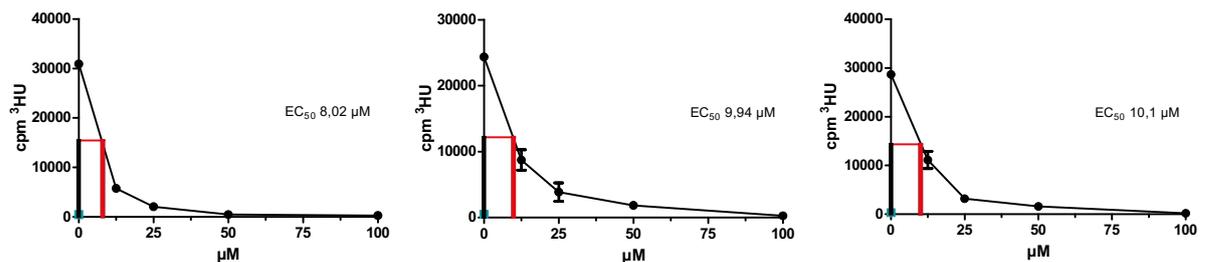


Abbildung 4.22: Wirkung steigender Konzentrationen von BrPhenethylamide auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes BK.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK wurde von BrPhenethylamide dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 μM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 μM) wurde durchgeführt.

BrPhenethylamide reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK. Der mittlere EC₅₀-Wert von BrPhenethylamide lag bei 9,35 μM mit einer Standardabweichung von ± 0,95 μM.

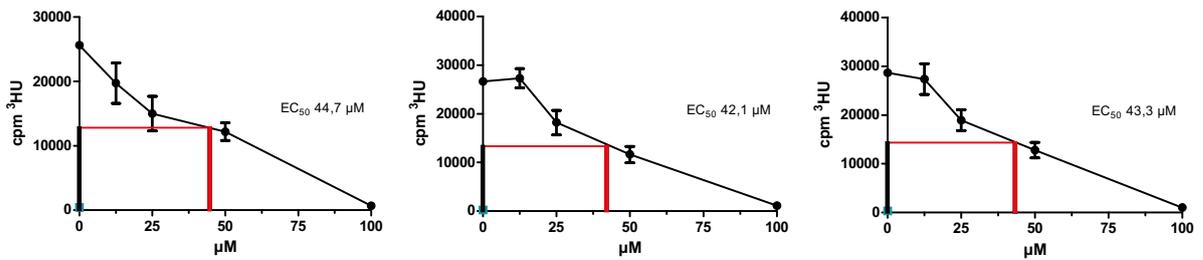


Abbildung 4.23: Wirkung steigender Konzentrationen von Corynesidone A auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes BK.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK wurde von Corynesidone A dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 µM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 µM) wurde durchgeführt.

Corynesidone A reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK. Der mittlere EC₅₀-Wert von Corynesidone A lag bei 43,4 µM mit einer Standardabweichung von $\pm 1,06$ µM.

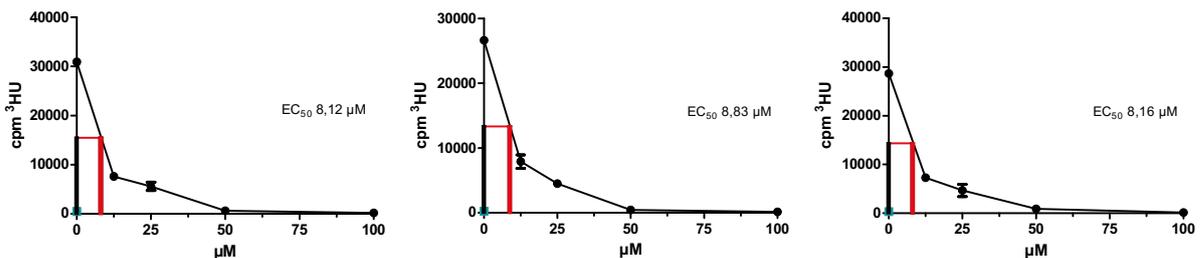


Abbildung 4.24: Wirkung steigender Konzentrationen von Hexylamide auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes BK.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK wurde von Hexylamide dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 µM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 µM) wurde durchgeführt.

Hexylamide reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK. Der mittlere EC₅₀-Wert von Hexylamide lag bei 8,37 µM mit einer Standardabweichung von $\pm 0,33$ µM.

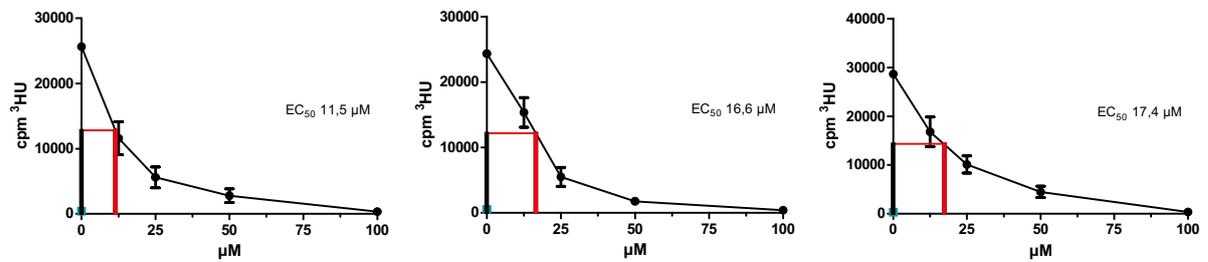


Abbildung 4.25: Wirkung steigender Konzentrationen von Neobavaisoflavone auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes BK.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK wurde von Neobavaisoflavone dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 µM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 µM) wurde durchgeführt.

Neobavaisoflavone reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK. Der mittlere EC₅₀-Wert von Neobavaisoflavone lag bei 15,2 µM mit einer Standardabweichung von $\pm 2,61$ µM.

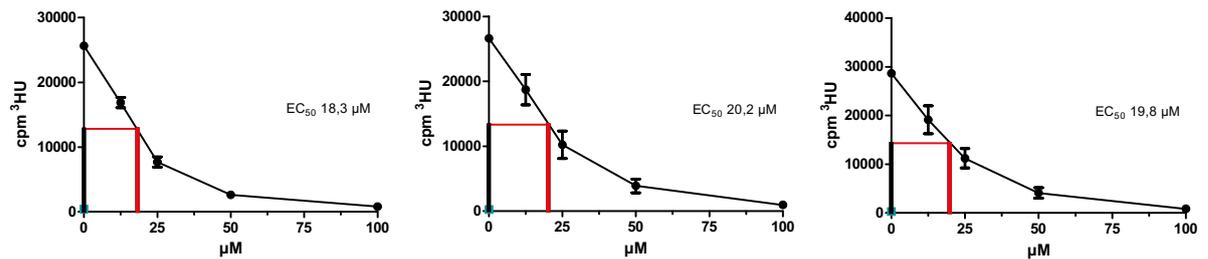


Abbildung 4.26: Wirkung steigender Konzentrationen von Piperin auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes BK.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK wurde von Piperin dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 µM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 µM) wurde durchgeführt.

Piperin reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK. Der mittlere EC₅₀-Wert von Piperin lag bei 19,4 µM mit einer Standardabweichung von $\pm 0,82$ µM.

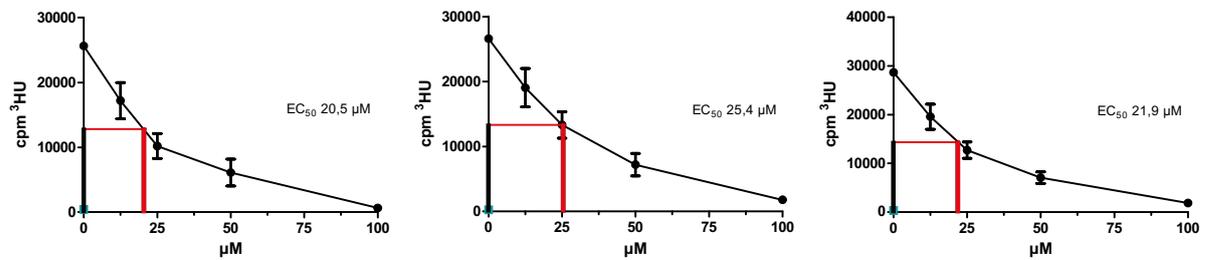


Abbildung 4.27: Wirkung steigender Konzentrationen von Roquefortin C auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes BK.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK wurde von Roquefortin C dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 μM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 μM) wurde durchgeführt.

Roquefortin C reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK. Der mittlere EC₅₀-Wert von Roquefortin C lag bei 22,6 μM mit einer Standardabweichung von \pm 2,06 μM.

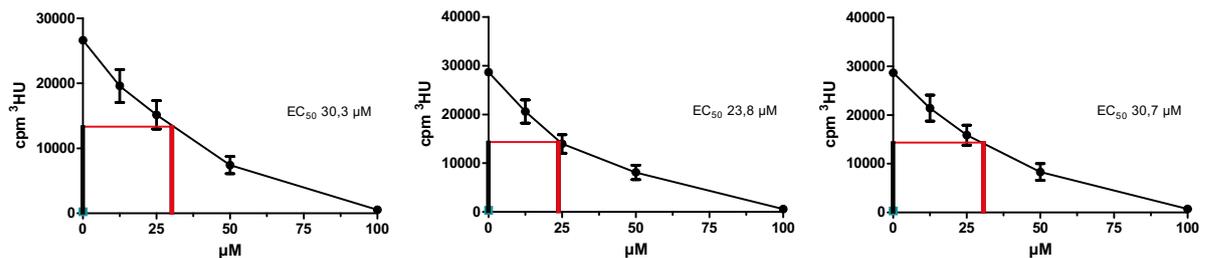


Abbildung 4.28: Wirkung steigender Konzentrationen von Tetrahydroxybostricin auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes BK.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK wurde von Tetrahydroxybostricin dosisabhängig reduziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 12,5, 25, 50 und 100 μM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 μM) wurde durchgeführt.

Tetrahydroxybostricin reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK. Der mittlere EC₅₀-Wert von Tetrahydroxybostricin lag bei 28,3 μM mit einer Standardabweichung von \pm 3,16 μM.

Die in den Abbildungen 4.16 bis 4.28 graphisch dargestellten Werte sind der besseren Übersicht wegen in Tabelle 4.3 zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 4.3: Übersicht der EC₅₀-Werte der Wirkstoffe für den *T. gondii* Stamm BK.

Die folgende Tabelle fasst für den *T. gondii* Stamm BK zur verbesserten Übersicht die drei jeweiligen EC₅₀-Werte der entsprechenden Wirkstoffe aus den dargestellten Versuchsreihen einschließlich deren Mittelwerte (\bar{x}) mit der entsprechenden Standardabweichung (SD) zusammen. Die EC₅₀-Werte, angegeben in μM , wurden je aus drei voneinander unabhängigen Toxoplasmen-Proliferationsassays (1 - 3) ermittelt.

Substanzname	EC ₅₀ (μM)			
	1	2	3	$\bar{x} \pm \text{SD}$
(-) Matairesinol	68,4	67,2	76,1	70,6 \pm 3,94
(+) Avarol	16,5	18,7	22,8	19,3 \pm 2,61
3-O-Methylgallic acid butyl ester	10,8	9,83	9,49	10,0 \pm 0,56
Alternariol	17,5	23,9	19,2	20,2 \pm 2,71
Berberin hemisulfat	8,17	10,1	9,83	9,37 \pm 0,85
Br ₂ Hexylamide	30,5	29,6	31,9	30,7 \pm 0,95
BrPhenethylamide	8,02	9,94	10,1	9,35 \pm 0,95
Corynesidone A	44,7	42,1	43,3	43,4 \pm 1,06
Hexylamide	8,12	8,83	8,16	8,37 \pm 0,33
Neobavaisoflavone	11,5	16,6	17,4	15,2 \pm 2,61
Piperin	18,3	20,2	19,8	19,4 \pm 0,82
Roquefortin C	20,5	25,4	21,9	22,6 \pm 2,06
Tetrahydroxybostricin	30,3	23,8	30,7	28,3 \pm 3,16

Den niedrigsten EC₅₀-Wert im Bezug auf die Inhibition des Wachstums von *T. gondii* Stamm BK wies hierbei Hexylamide (8,37 \pm 0,33 μM) auf. Den zweitniedrigsten EC₅₀-Wert konnte BrPhenethylamide (9,35 \pm 0,95 μM) erreichen, gefolgt von Berberin hemisulfat (9,37 \pm 0,85 μM).

4.2.2.2 Wirkung bekannter Antibiotika auf den *T. gondii* Stamm BK

Um die getesteten Wirkstoffe in ihrer Potenz zu beurteilen, wurden vergleichend dazu die für die derzeitige Behandlung der Toxoplasmose etablierten Antibiotika Cotrimoxazol und Clindamycin eingesetzt. Dafür wurde der Toxoplasmen-Proliferationstest unter gleichen Versuchsbedingungen wie bei den anderen Wirkstoffen eingesetzt, beginnend mit den im klinischen Gebrauch empfohlenen Konzentrationen.

Die Ergebnisse der Testung der Antibiotika Cotrimoxazol und Clindamycin aus je drei aufeinanderfolgenden Assays mit dem *T. gondii* Stamm BK wird in den Abbildungen 4.29 und 4.30 graphisch dargestellt.

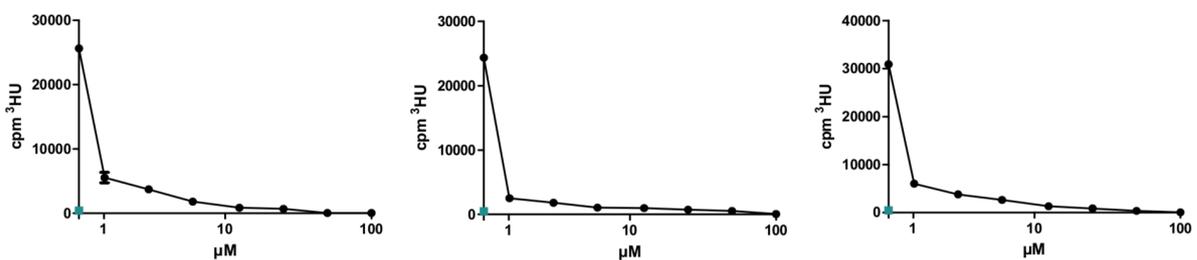


Abbildung 4.29: Wirkung steigender Konzentrationen von Cotrimoxazol auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes BK.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK wurde von Cotrimoxazol durch eine starke Inhibition dosisabhängig reduziert. Der Übersicht wegen wurden die Konzentrationen in Log-Stufen angegeben. Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 1, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 und 100 μM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ³H-Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFNγ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 μM) wurde durchgeführt.

Cotrimoxazol reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK. Der mittlere EC₅₀-Wert von Cotrimoxazol lag bei kleiner 1 μM.

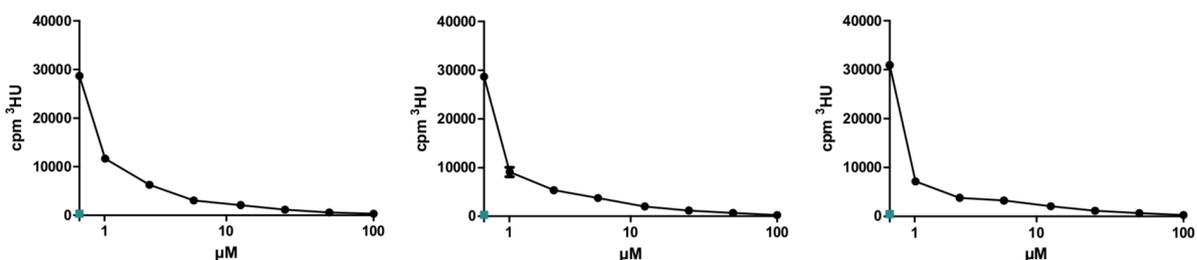


Abbildung 4.30: Wirkung steigender Konzentrationen von Clindamycin auf die Proliferation des *T. gondii* Stammes BK.

Das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK wurde von Clindamycin durch eine starke Inhibition dosisabhängig reduziert. Der Übersicht wegen wurden die Konzentrationen in Log-Stufen angegeben.

Die Proliferation von *T. gondii* wurde bei den Wirkstoffkonzentrationen 1, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 und 100 μM mithilfe der Cerenkow-Strahlung gemessen, welche beim Zerfall von ^3H -Uracil in einem Szintillator entsteht und als cpm angegeben wird. Eine Positivkontrolle mit IFN γ (grüner Punkt) sowie eine Negativkontrolle mit DMSO (*T. gondii* Proliferation bei 0 μM) wurde durchgeführt.

Clindamycin reduzierte das Zellwachstum des *T. gondii* Stammes BK. Der mittlere EC₅₀-Wert von Clindamycin lag bei kleiner 1 μM .

4.2.3 Tabellarische Darstellung der ermittelten EC₅₀-Werte für die *T. gondii* Stämme ME49 und BK

Nachfolgend sind in Tabelle 4.4 die mittleren EC₅₀-Werte der getesteten Wirkstoffe für die *T. gondii* Stämme ME49 und BK zur besseren Übersicht gegenübergestellt. Die Tabelle 4.4 beinhaltet zusammengefasst die in Kapitel 4.2.1 und 4.2.2 erhobenen Werte.

Tabelle 4.4: Gegenüberstellung der mittleren EC₅₀-Werte der Wirkstoffe für die *T. gondii* Stämme ME49 und BK.

Die folgende Tabelle fasst die mittleren EC₅₀-Werte (̄) einschließlich deren Standardabweichung (SD), angegeben in µM, der getesteten Wirkstoffe aus den durchgeführten Versuchsreihen zusammen. Gleichzeitig stellt sie die einzelnen EC₅₀-Werte des *T. gondii* Stammes ME49 denen des *T. gondii* Stammes BK gegenüber.

Substanzname	EC ₅₀ (µM): ̄ ± SD	
	ME49	BK
(-) Matairesinol	12,0 ± 4,21	70,6 ± 3,94
(+) Avarol	8,68 ± 1,07	19,3 ± 2,61
3-O-Methylgallic acid butyl ester	7,84 ± 0,64	10,0 ± 0,56
Alternariol	10,9 ± 2,53	20,2 ± 2,71
Berberin hemisulfat	18,5 ± 1,10	9,37 ± 0,85
Br ₂ Hexylamide	12,1 ± 2,23	30,7 ± 0,95
BrPhenethylamide	8,26 ± 0,19	9,35 ± 0,95
Corynesidone A	12,9 ± 4,85	43,4 ± 1,06
Hexylamide	8,74 ± 0,52	8,37 ± 0,33
Neobavaisoflavone	9,29 ± 1,49	15,2 ± 2,61
Piperin	7,50 ± 0,24	19,4 ± 0,82
Roquefortin C	18,2 ± 2,33	22,6 ± 2,06
Tetrahydroxybostricin	16,7 ± 1,91	28,3 ± 3,16

Abschließend lässt sich zunächst allgemein sagen, dass die EC₅₀-Werte des virulenteren *T. gondii* Stammes BK in der Regel höher liegen als die des weniger virulenten *T. gondii* Stammes ME49. Eine Ausnahme bilden hierbei Berberin hemisulfat und Hexylamide, die eine bessere Inhibition des Wachstums des BK-Stammes aufweisen.

Die drei niedrigsten EC₅₀-Werte bezüglich der Inhibition des Stammes ME49 erzielen Piperin (7,50 ± 0,24 µM), 3-O-Methylgallic acid butyl ester (7,84 ± 0,64 µM) sowie BrPhenethylamide (8,26 ± 0,19 µM), während die beste Hemmung des BK-Stammes von Hexylamide (8,37 ± 0,33 µM), BrPhenethylamide (9,35 ± 0,95 µM) und Berberin hemisulfat (9,37 ± 0,85 µM) erreicht wird.

Als Substanzen mit wirksamer inhibitorischer Aktivität werden diejenigen definiert, deren EC_{50} -Werte vergleichbar mit denen der klinisch bereits etablierten antibiotischen Wirkstoffe sind. In den Versuchen dieser Arbeit zeigen sich für die getesteten Antibiotika Cotrimoxazol und Clindamycin EC_{50} -Werte von kleiner 1 μM , sodass somit insbesondere Wirkstoffe mit einem durchschnittlichen EC_{50} -Wert von kleiner gleich 10 μM als potentiell wirksame Kandidaten betrachtet werden können.

Im Hinblick darauf befinden sich unter den Wirkstoffen mit guter inhibitorischer Aktivität auf beide *T. gondii* Stämme die Substanzen 3-O-Methylgallic acid butyl ester, BrPhenethylamide und Hexylamide. Insbesondere BrPhenethylamide lässt sich bei beiden *T. gondii* Stämmen sogar unter den drei wirksamsten potentiellen Kandidaten wiederfinden. Weiterhin inhibieren (+) Avarol, Alternariol, Neobavaisoflavone und Piperin lediglich den *T. gondii* Stamm ME49 mit einem EC_{50} kleiner gleich 10 μM . Eine ähnlich gute Wirkung auf den *T. gondii* Stamm BK hat Berberin hemisulfat.

Die EC_{50} -Werte einiger Wirkstoffe liegen für die Stämme ME49 und BK etwa im gleichen Bereich. Dazu gehören Roquefortin C (ME49: $18,2 \pm 2,33 \mu\text{M}$, BK: $22,6 \pm 2,06 \mu\text{M}$), Hexylamide (ME49: $8,74 \pm 0,52 \mu\text{M}$, BK: $8,37 \pm 0,33 \mu\text{M}$), BrPhenethylamide (ME49: $8,26 \pm 0,19 \mu\text{M}$, BK: $9,35 \pm 0,95 \mu\text{M}$) sowie 3-O-Methylgallic acid butyl ester (ME49: $7,84 \pm 0,64 \mu\text{M}$, BK: $10,0 \pm 0,56 \mu\text{M}$).

5 Diskussion und Schlussfolgerungen

5.1 *T. gondii* und neue Wirkstoffe

T. gondii ist ein weltweit verbreiteter Parasit und verursacht zahlreiche Erkrankungsfälle. Durch seine Bedeutung als humanpathogener Erreger ist er sowohl Verursacher von Embryo- sowie Fetopathien, als auch für eine Vielzahl von Todesfällen bei Patienten/-innen, deren Immunsystem in einem supprimierten oder defizienten Zustand ist, ursächlich. Ähnlich wie in der antibakteriellen Therapie treten bei der antiinfektiven Behandlung von *T. gondii* zunehmende Resistenzentwicklungen auf, die eine Eradikation des Parasiten erschweren. Hinzu kommt die Problematik, dass die bisher im klinischen Bereich eingesetzten Wirkstoffe lediglich auf parasitostatischer Ebene wirken. Aus diesem Grund ist die Identifikation neuer Wirkstoffe gegen *T. gondii* relevant.

In dieser Arbeit konnten mehrere aussichtsreiche Wirkstoffe identifiziert werden, die das Wachstum von *T. gondii* inhibieren. Dabei ließ sich in der Zellkultur mittels Toxoplasmen-Proliferationstests nicht nur eine Hemmung auf den intermediär virulenten *T. gondii* Stamm ME49 (Typ II) feststellen, sondern auch ein ähnlicher Effekt auf den stark virulenten *T. gondii* Stamm BK (Typ I) nachweisen. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse konnte in weiteren Untersuchungen durch mindestens dreimaliges Wiederholen des Toxoplasmen-Proliferationstests unter gleichen Versuchsbedingungen geprüft werden.

Des Weiteren sollte die Potenz der neuen pflanzlichen Wirkstoffe mit denen der klinisch bereits etablierten antibiotischen Wirkstoffe verglichen werden. Dafür wurden die Antibiotika Cotrimoxazol, bestehend aus Trimethoprim und Sulfamethoxazol, sowie Clindamycin herangezogen. Da Pyrimethamin nicht in einer löslichen Applikationsform vorlag, konnte dieses Antibiotika in dem in dieser Arbeit verwendeten Toxoplasmen-Proliferationstest nicht ausgetestet werden.

Die getesteten Wirkstoffe sind Sekundärmetabolite aus marinen Schwämmen, Pflanzen und endophytischen Pilzen. Von insgesamt 151 Wirkstoffen wurden nun 13 detektiert, die mit einem ähnlichen EC_{50} -Wert inhibierend auf *T. gondii* wirken wie bereits bestehende Antibiotika. Ohne zytotoxisch auf Fibroblasten zu wirken, translozieren diese Wirkstoffe in ausreichenden Hemmkonzentrationen über die Zellmembran, um *T. gondii* intrazellulär in der parasitophoren Vakuole zu hemmen.

5.2 Eigenschaften der identifizierten Wirkstoffe

5.2.1 (-) Matairesinol

Matairesinol ist ein Wirkstoff mit antiangiogenetischen, antioxidativen, antikanzerogenen sowie antimykotischen Aktivitäten und lässt sich aus verschiedenen Pflanzen, wie *Forsythia koreana* [111] und *Forsythia suspensa* [112], isolieren.

Forsythia suspensa wird in der traditionellen chinesischen Medizin bereits zur Behandlung von Entzündungen eingesetzt. Ihr Bestandteil Matairesinol bedingt eine Inhibition der Histaminfreisetzung aus MC/9-Mastzellen und könnte aus diesem Grund für die Behandlung von allergisch-entzündlichen Erkrankungen, wie die atopische Dermatitis, von Bedeutung sein [112].

Mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies (mROS) sind an der Entstehung und Progression von Tumoren beteiligt und fungieren als Signalmoleküle in der Hypoxie- und Wachstumsfaktor-vermittelten Signalgebung. Eine Studie zeigt hier, dass Matairesinol in nicht toxischen Konzentration die mROS-Erzeugung unterdrückt, was zur Inhibition der Angiogenese sowie zur Hemmung der Proliferation von Endothelzellen führt [113].

Darüber hinaus hat Matairesinol Potential im Hinblick auf die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen T-Zell-Lymphome, da eine signifikante antiproliferative Aktivität gegen die T-Zell-Lymphom-Zelllinie CCRF-CEM sowie die Induktion einer konzentrations- und zeitabhängigen Apoptose in CCRF-CEM-Zellen nachgewiesen werden konnte [114].

Weiterhin kann Matairesinol im proximalen Kolon von Säugetieren in Enterolacton bzw. Enterodiol umgewandelt werden und so jeweils das Risiko von Kolonkarzinomen bzw. als Phytoöstrogen wirkend das Risiko von Mammakarzinomen verringern [115].

Die chronische Neuroinflammation ist ein Merkmal neurodegenerativer Erkrankungen. In diesem Zusammenhang wurden in einer Studie die antineuroinflammatorischen Effekte von Matairesinol auf Lipopolysaccharid-induzierte BV2-Mikrogliazellen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass Matairesinol die Aktivierung dieser Mikroglia hemmt, indem es die Produktion von Stickstoffmonoxid sowie die Expression von induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase und Cyclooxygenase-2 konzentrationsabhängig reduziert. Die Mechanismen können mit einer Aktivierung des NF- κ B und einer Modulation des Src-Wegs assoziiert sein [116].

Auch weist Matairesinol eine antiosteoporotische Aktivität auf. Diese Wirkung steht im Zusammenhang mit dem *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL), indem Matairesinol dosisabhängig die RANKL-induzierte Differenzierung von Knochenmarksmakrophagen in Osteoklasten inhibiert. Letzteres lässt sich dadurch erklären, dass Matairesinol die RANKL-induzierte Expression und Aktivität von NFATc1, dem nukleären Faktor aktivierter T-Zellen, herunterreguliert [117].

5.2.2 (+) Avarol

Avarol ist ein mariner Naturstoff, der sich aus dem mediterranen Schwamm *Dysidea avara* isolieren lässt [118]. Es sind bereits entzündungshemmende, antikanzerogene, antioxidative, thrombozytenaggregationshemmende, anti-HIV- und antipsoriatische Wirkungen bekannt [119].

Die antimikrobielle Aktivität wurde bereits in verschiedenen Mikroverdünnungsstufen gegen ausgewählte Bakterien- und Pilzstämmen bewertet, wobei sich insbesondere eine Aktivität gegen gramnegative Bakterien zeigt [118]. Ebenso weist Avarol eine Wirksamkeit gegen acht ausgetestete *Candida*-Stämme auf [120].

Darüber hinaus hemmen einige Thioavarolderivate die Acetylcholinesterase und bringen neuroprotektive Wirkungen mit sich. Aus diesem Grund wird untersucht, ob sich diese neuen, nicht-hepatotoxischen Derivate in Zukunft bei der Alzheimer-Krankheit einsetzen lassen könnten [119].

Insbesondere die Wirksamkeit von Avarol gegen verschiedene Tumore konnte bisher nachgewiesen werden.

In vitro untersuchte man die Antitumoraktivität von Avarol gegen die humane maligne Gliom-Zelllinie U-251 MG und verglich diese mit den Positivkontrollen Temozolomid und Doxorubicin. Dabei stellte sich Avarol mit einem EC₅₀-Wert kleiner als 1 µM als eine vielversprechende Leitverbindung bei der Entwicklung neuer Chemotherapeutika heraus [121].

Weiterhin induziert Avarol den selektiven Zelltod im duktalem Adenokarzinom des Pankreas, das bisher wegen der Verfügbarkeit nur weniger Chemotherapeutika schwer zu behandeln ist. Analysen der molekularen Mechanismen der Avarol-induzierten Apoptose ergaben die Aktivierung des PERK-eIF2α-CHOP-Signalweges, was die Rolle von Avarol als potentiellen Kandidaten als Chemotherapeutikum für das duktales Pankreasadenokarzinom unterstreicht [122].

Ein anderes Beispiel für die Antikanzerogenität lässt sich im Zusammenhang des Mammakarzinoms nennen. Hier ist die Zytotoxizität von Avarol auf die humane Mammakarzinom-Zelllinie T-47D nachgewiesen [123].

Auch die Zahl der DNA-Schäden in Zellen ist bei der Behandlung mit Avarol vermindert. So wurde der Naturstoff in einer Studie untersucht und mit den üblicherweise in Chemotherapien verwendeten Zytostatika 5-Fluoruracil, Etoposid und Cisplatin verglichen. Für Avarol konnte kein mutagenes bzw. genotoxisches Potential nachgewiesen werden [124].

In einer weiteren Studie wurde die entzündungshemmende und antipsoriatische Wirkung von Avarol untersucht. Durch die Inhibition der Bildung von Tumornekrosefaktor α (TNF-α) in stimulierten humanen Monozyten sowie daraus folgender Unterdrückung der TNF-α-induzierten Aktivierung des NF-κB in Keratinozyten, reduziert Avarol in topischer Verabreichung Ödeme und den Spiegel von Interleukin-1β, Interleukin-2 und Eicosanoid in der Haut. Eine histopathologische Studie bestätigt in dem Zusammenhang die Hemmung der epidermalen Hyperplasie wie auch der Leukozyteninfiltration durch Avarol. Durch die Reduktion von kutanem TNF-α und der Unterdrückung der nukleären Translokation von NF-κB könnte Avarol somit antipsoriatische Eigenschaften durch die Herunterregulation von mehreren entzündlichen Biomarkern (TNF-α, NF-κB) in psoriatischer Haut vermitteln [125].

Aufgrund der Fähigkeit, die NF-κB-Aktivierung und die TNF-α-Erzeugung in menschlichen Neutrophilen zu inhibieren, kann der Naturstoff darüber hinaus als vielversprechendes UVB-Lichtschutzmittel mit einem milden antioxidativen pharmakologischen Profil angesehen werden [126].

5.2.3 3-O-Methylgallic acid butyl ester

3-O-Methylgallic acid butyl ester wird synthetisch aus Gallussäure hergestellt. Während 3-O-Methylgallic acid butyl ester bisher noch nicht weiter bekannt ist, sind Gallussäuren jedoch bereits gut untersucht.

Gallussäure ist eine Phenolsäure, die natürlicherweise in verschiedenen Nahrungsmitteln vorhanden ist. In einer Studie wurde deren Wirksamkeit in vitro gegen *Pseudomonas* spp. nachgewiesen [127]. Weiterhin zeigt sich eine inhibitorische Wirkung von Gallussäure gegen *Escherichia coli* (*E. coli*), indem sie die Bildung lebensfähiger *E. coli* und deren Biofilmbildung hemmt. Dies stellt einen neuen Ansatz zur Prävention und Behandlung von Infektionen durch *E. coli* in der Lebensmittelindustrie dar [128].

Ferner ist die Gallussäure ein wichtiges Antioxidans, das entzündungshemmend wirkt und als Radikalfänger fungiert [129].

Gallussäure und Gallatester werden häufig als Nahrungsergänzungsmittel oder Zusatzstoffe mit klinischer Bedeutung verwendet. Neben den antioxidativen werden ihnen weiterhin kardio- und neuroprotektive sowie antikanzerogene Eigenschaften zugesprochen. So werden Mitochondrien, welche für die Erzeugung von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verantwortlich sind, als Ziel der Gallussäuren diskutiert. Sie stellen die wichtigsten Signalwege und Moleküle dar, auf die die Gallussäure und ihre Derivate zielen [130].

Bezüglich der antikanzerogenen Eigenschaften weist Gallussäure bisher eine starke Zytotoxizität gegen die Bronchialkarzinom-Zelllinie H1299 auf [131].

Darüber hinaus inhibieren die Gallussäure und die 3-O-Methylgallussäure die Zellproliferation von Kolonkarzinomen und induzieren deren Apoptose [132]. Die Darmflora metabolisiert Anthocyane zu Phenolsäuren und Aldehyden. Diese Metaboliten können die Beziehung zwischen dem Anthocyanverbrauch und der reduzierten Inzidenz von Kolonkarzinom erklären. Es zeigte sich, dass Gallussäuren und ihre Derivate die Zellproliferation in Caco-2-Zellen sogar wirksamer reduzieren als Anthocyane und daher nach ihrer Bildung im Darm einen Schutz vor Kolonkarzinomen bieten können [133].

Auch das Krankheitsbild der diabetischen Nephropathie, welche eine der wichtigsten Komplikationen des Diabetes mellitus darstellt, kann die Gallussäure verbessern, indem sie den *Transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1), der eine zentrale Rolle bei der Progression der Krankheit spielt, herunterreguliert. Durch fortgeschrittene glykosylierungshemmende Aktivität sowie inhibitorische Wirkungen auf das Angiotensin-Converting-Enzym hemmt der Naturstoff die TGF- β 1-Überexpression [134].

Weiterhin werden durch die Behandlung mit Gallussäure signifikant die Plasmaspiegel von Kreatinin und Blut-Harnstoff-Stickstoff gesenkt und so eine Verbesserung der Kreatinin-Clearance gewährleistet [134].

5.2.4 Alternariol

Alternariol ist eine bioaktive Verbindung aus dem Rohextrakt des endophytischen Pilzes *Alternaria* sp., der in den Wurzeln von *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Rotwurz-Salbei Bunge) zu finden ist [135].

Diese natürlich vorkommende Verbindung besitzt eine hohe potenzielle Bioaktivität gegen pflanzenpathogene Mikroorganismen. So ist sie gegen einige Bakterien mit minimalen Hemmkonzentrationswerten im Bereich von 25 bis 75 $\mu\text{g/ml}$ und EC_{50} -Werten im Bereich von 16 bis 38,27 $\mu\text{g/ml}$ wirksam. Zu diesen Bakterienspezies gehören namentlich *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas lachrymans*, *Ralstonia solanacearum*, *Streptococcus haemolyticus*, *Xanthomons vesicatoria*, *Methylobacterium oryzae*, *Bursaphelenchus xylophilus* sowie *Caenorhabditis elegans* [135].

Alternariol ist jedoch auch ein toxischer Metabolit und für Verunreinigungen von Agrarrohstoffen verantwortlich [136].

Studien zufolge kann Alternariol das endokrine System von Mensch und Tier modulieren, da es Auswirkungen auf die Signaltransduktion des humanen Östrogenrezeptors (hER α) und Androgenrezeptors (hAR) unter Verwendung von Bioassays gezeigt hat [137].

Darüber hinaus besitzt das Mykotoxin Alternariol genotoxische wie auch zytotoxische Eigenschaften. Es ist fähig, die angeborene Immunität zu modulieren, was anhand einer

humanen bronchialen Epithel-Zelllinie (BEAS-2B) nachgewiesen werden konnte, bei der Alternariol in geringem Ausmaß dosisabhängig zur Unterdrückung der Lipopolysaccharid-induzierten angeborenen Immunantworten führte [138]. Weiterhin kann Alternariol einen Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase verursachen [138].

In einer anderen Studie wurde die inhibitorische Aktivität auf die Monoaminoxidase (MAO), welche die Neurotransmitter-Monoamine katalysiert, untersucht. Dabei erwies sich das Alternariol-Monomethylether als ein hochpotenter und selektiver Inhibitor der humanen MAO-A mit einem EC₅₀-Wert von 1,71 µg/ml. Im Hinblick auf die MAO-B-Hemmung zeigte sich jedoch kein Effekt. So könnte sich Alternariol-Monomethylether als eine nützliche Leitverbindung für die Entwicklung von reversiblen MAO-A-Inhibitoren zur Behandlung von Depressionen, Parkinson und Alzheimer etablieren [139].

Ferner stellt Alternariol ein Substrat für Cytochrom-P450-Enzyme dar, die hydroxylierte Metaboliten erzeugen. Die Aktivitäten dieser Phase-I-Metaboliten mit Bezug auf die Genotoxizität bleibt jedoch bisher unbekannt [140].

5.2.5 Berberin hemisulfat

Berberin hemisulfat wird synthetisch aus Berberin hergestellt und ist kommerziell erhältlich. Berberin ist ein natürliches Alkaloid, das aus Pflanzen der Berberis-Art gewonnen wird und für seine schützende Wirkung gegen verschiedene Krankheiten bekannt ist.

So weist Berberrubin unter den primären Berberin-Metaboliten den größten Effekt im Hinblick auf die Behandlung der endothelialen Dysfunktion (Artherosklerose) auf [141]. Die signifikanten antiatherosklerotischen Eigenschaften können durch eine Herunterregulierung der Visfatin- (Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase-) Expression erklärt werden, welche mit der Inhibierung von p38-MAPK- und JNK-Signalwegen zusammenhängt und dadurch letztlich zur Unterdrückung der Visfatin-induzierten Atherosklerose führt [142].

Eine Studie zeigt, dass neue halbsynthetische Berberinanaloga eine Potenz gegen In-vitro-Modelle von Leishmaniose, Malaria und Trypanosomiasis aufweisen. Insbesondere im Hinblick auf zunehmende Resistenzen gegen aktuelle Chemotherapeutika sind neue antiprotozoale Verbindungen von großer Bedeutung und Berberin stellt somit einen potentiellen Kandidaten dar [143].

Auch *Pseudomonas aeruginosa* ist zunehmend resistent gegenüber verschiedenen Carbapenemen, sodass neuartige Arzneimittel mit verbesserten antibakteriellen Aktivitäten im Vergleich zu denen herkömmlicher Antibiotika erforderlich sind. In einer Studie wurde Berberin in Kombination mit Imipenem, einem häufig verwendeten Carbapenem, verwendet, um den Naturstoff auf antibakterielle Aktivität gegen das klinische *Pseudomonas aeruginosa*-Isolat PA012 zu untersuchen. Dabei zeigte die Kombination von Berberin und Imipenem eine synergistische Wirkung im Sinne einer konzentrationsabhängigen fördernden Wirkung von Imipenem auf die intrazelluläre Akkumulation von Berberin. Der beobachtete Effekt, eine Hemmung der bakteriellen Adhäsion, steht im Zusammenhang mit der Hemmung der MexXY-OprM-Efflux-Pumpe der Pseudomonaden [144].

Des Weiteren stellt Berberin einen Ansatz für ein vielversprechendes Medikament in der Behandlung von triple-negativen Mammakarzinomen dar. TGF-βs sind multifunktionale Wachstumsfaktoren und leistungsfähige Modulatoren des epithelialen-mesenchymalen Übergangs in einer Vielzahl von Tumorarten, einschließlich den Mamma- und Bronchialkarzinomzellen. Berberin hemmt über die Unterdrückung der TGF-β1-Expression

sowohl das Tumorwachstum als auch die Metastasierung von triple-negativen Mammakarzinomzellen [145].

Weiterhin hat Berberin positive Wirkungen auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

Bei myokardialen Ischämie-Reperfusionen kommt es zur Apoptose von Myokardzellen. Berberin hemmt entzündliche Reaktionen über den NF- κ B-Signalweg und inhibiert in einem Mausmodell der Ischämie-Reperfusionen so die Apoptose von Myokardzellen über den PI3K/AKT-Signalweg [146].

Zusätzlich wurde der Wirkstoff in der Behandlung von Patienten/-innen mit paroxysmalem Vorhofflimmern getestet. Dabei zeigte sich in einer Studie im Vergleich mit Amiodaron eine gleichermaßen gute Wirksamkeit im Hinblick auf die Behandlung des Vorhofflimmerns sowie der Aufrechterhaltung des Sinusrhythmus [147].

Oral verabreichtes Berberin verbesserte in einer anderen Studie außerdem die Bleomycin-induzierte Lungenfibrose bei Mäusen durch Förderung der Aktivierung des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors γ (PPAR- γ) und anschließender Expression des Hepatozyten-Wachstumsfaktors (HGF) im Kolon. Hochreguliertes HGF gelangt über die Blutzirkulation in das Lungengewebe, um Lungenfibrosen zu lindern. Berberin lindert nachgewiesen bei oraler Verabreichung trotz seiner niedrigen Bioverfügbarkeit Fibrosen von Niereninterstitium, Leber und Myokard [148].

Auch bezüglich verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen scheint Berberin eine vorteilhafte Wirkung aufzuweisen. Berberinchlorid hatte in Studien potentielle neuroprotektive Wirkungen auf die vaskuläre Demenz und kann als mögliche Behandlung für kognitive Defizite und neuronale Schädigungen durch chronisch zerebrale Hypoperfusion im hippokampalen CA1-Bereich angesehen werden [149].

In der traditionellen chinesischen Medizin wird Berberin bereits aufgrund seiner hypoglykämischen Wirkungen zur unterstützenden Therapie bei Diabetes mellitus eingesetzt [150].

5.2.6 Br₂Hexylamide

Br₂Hexylamide ist ein von der Arbeitsgruppe Proksch synthetisch hergestelltes, zweifach bromiertes Hexylamide, zu dessen Wirkmechanismus sowie Indikationen bisher noch keine Literatur vorhanden ist.

5.2.7 BrPhenethylamide

BrPhenethylamide ist ein von der Arbeitsgruppe Proksch synthetisch hergestelltes, bromiertes Phenethylamide.

Nicht bromierte Phenethylamide wurden bereits als neue, reversible und kompetitive Inhibitoren der NS3/4A-Serinprotease des Hepatitis-C-Virus beschrieben. Sie sind durch die Anwesenheit einer C-terminalen Phenethylamidgruppe gekennzeichnet, welche sich in die Hauptseite des Virusenzym erstreckt [151].

Weiterhin ist zu dem Wirkmechanismus sowie anderen Indikationen bisher noch keine Literatur vorhanden.

5.2.8 Corynesidone A

Corynesidone A ist ein aus dem endophytischen Pilz *Corynespora cassiicola* isolierter Naturstoff [152].

Neben verschiedenen weiteren daraus isolierten Depsidonen und Diarylether-Derivaten wurde Corynesidone A bisher auf seine entzündungshemmenden und antioxidativen Potentiale untersucht. Eine Studie zeigt eine konzentrationsabhängige Inhibition der TNF- α Sekretion, die Hemmung der Produktion von induzierbarem Stickoxid (iNO) sowie eine signifikante Suppression der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiver Stickstoffspezies (RNS). Demzufolge könnte Corynesidone A als geeignetes Leitmolekül für die weitere Entwicklung neuer entzündungshemmender Wirkstoffe dienen [152].

Des Weiteren lässt sich Corynesidone A gegenüber Tumorzellen als relativ inaktiv beschreiben [153]. Lediglich gegen die humane promyeloische Leukämie-HL-60-Zelllinie und die humane Zervixkarzinom-HeLa-Zelllinie besteht Studien zufolge eine Zytotoxizität [154]. Im Hinblick auf die Wirkung gegen Zervixkarzinome lässt sich hinzufügen, dass Corynesidone A die Aktivität der Aromatase mit einem EC₅₀-Wert von 5,30 μ M hemmt [153].

5.2.9 Hexylamide

Hexylamide ist ein von der Arbeitsgruppe Proksch synthetisch hergestellter Wirkstoff, zu dessen Wirkmechanismus sowie Indikationen bisher noch keine Literatur vorhanden ist.

5.2.10 Neobavaisoflavone

Neobavaisoflavone ist ein Isoflavon, das aus *Psoralea corylifolia* isoliert wird und dem antibakterielle, antioxidative und immunmodulatorische Eigenschaften zugesprochen werden.

In vitro wurde die entzündungshemmende Aktivität von Neobavaisoflavone untersucht. Makrophagen übernehmen eine wichtige Rolle bei Entzündungen durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, die an der Immunantwort beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass Neobavaisoflavone diese Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren in stimulierten RAW264.7 Makrophagen signifikant hemmte [155].

Auch die Inhibition des Wachstums von Tumoren gehört zu den Wirkungsspektren von Neobavaisoflavone.

Der *Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand* (TRAIL) ist ein endogenes Schlüsselmolekül, das in Tumorzellen selektiv Apoptose mit geringer oder gar keiner Toxizität in normalen Zellen induziert. Einige Tumorzellen, z.B. humane U373MG-Gliomzellen, sind jedoch gegen die durch TRAIL vermittelte Apoptose resistent. In einer Studie wurde festgestellt, dass Neobavaisoflavone humane U373MG-Gliomzellen für die TRAIL-vermittelte Apoptose sensibilisiert. Durch diese Reduktion der Resistenzen von Tumorzellen gegen TRAIL stellt die Kombination von Neobavaisoflavone und TRAIL eine neue therapeutische Strategie zur Behandlung von TRAIL-resistenten Gliomzellen dar [156].

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch LNCaP-Prostatatumorzellen auf Neobavaisoflavone in Kombination mit TRAIL ansprechen und dadurch sensibel für die TRAIL-induzierte Apoptose werden [157].

Weiterhin stimuliert Neobavaisoflavone die Osteogenese über p38-vermittelte Hochregulierung von Transkriptionsfaktoren und Osteoidgenexpression in MC3T3-E1-Zellen. Die positive Wirkung von Neobavaisoflavone auf die Mineralisierung zeigt, dass

Neobavaisoflavone als aktive Komponente möglicherweise ein anaboles Mittel zur Behandlung von Knochenschwund-assoziierten Erkrankungen sein könnte [158].

5.2.11 Piperin

Piperin ist als Hauptalkaloid des schwarzen Pfeffers *Piper nigrum* L. für dessen Schärfe verantwortlich [159].

Piperin hat verschiedene pharmakologische Wirkungen und kann die funktionelle Aktivität von metabolischen Enzymen und Arzneimitteltransportern modulieren. Folglich besteht derzeit ein großes Interesse an der Anwendung von Piperin als Alternativmedizin oder als Bioverfügbarkeitsverstärker [160]. Ein Beispiel für die Verbesserung der Bioverfügbarkeit durch die Hemmung von Cytochrom-P540- und P-Glykoprotein-Aktivitäten anderer Medikamente bietet die Kombination von Docetaxel und Piperin, bei der ein positiver Effekt auf die Wirksamkeit gegen das Taxan-resistente Prostatakarzinom festgestellt werden kann [161].

Ferner verstärkt Piperin die Mitomycin-C-Therapie von Zervixkarzinomen durch die Unterdrückung des Bcl-2-Signalweges durch Inaktivierung von STAT3/NF- κ B. Durch die wachstumshemmende Wirkung von Piperin auf Zervixkarzinomzellen, die gegen Mitomycin-C resistent sind, führt die gleichzeitige Behandlung mit Piperin und Mitomycin-C zur dosisabhängigen Unterdrückung der Zellproliferation [162].

Piperin inhibiert zudem das In-vitro-Wachstum von triple-negativen Mammakarzinomzellen ohne das normale Wachstum der Brustepithelzellen zu beeinträchtigen [163].

Neben seiner krampflösenden Wirkungen stellt sich Piperin als potentielleres Arzneimittel zur Behandlung von Durchfallerkrankungen dar, welche durch intestinale Hypersekretion von Chlorid verursacht werden. Piperin hemmt die durch das cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP) vermittelte intestinale Chloridsekretion in intestinalen Epithelzellen und wirkt somit antisekretorisch [159].

Die spinozerebelläre Ataxie 17 (SCA17) gehört zur Familie der neurodegenerativen Erkrankungen, die durch eine Polyglutamin-Expansion verursacht wird und zu Proteinfehlfaltungen und Degenerationen in Purkinje-Neuronen des Kleinhirns führt. Der *Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor* (MANF) ist hierbei ein kürzlich identifizierter neurotropher Faktor, dessen Expression die SCA17-Neuropathologie verbessert. In Studien konnte herausgefunden werden, dass Piperin die MANF-Expression induziert und so als Therapeutikum für die Neuropathologie der SCA17 einsetzbar sein könnte [164].

Es ist bekannt, dass Piperin mehrere Neurotransmittersysteme wie Serotonin, Norepinephrin und γ -Aminobuttersäure (GABA) moduliert. Durch die inhibitorische Wirkung auf Natrium-Kanäle lässt sich Piperin ebenfalls eine antikonvulsive Wirkung zusprechen [165].

5.2.12 Roquefortin C

Das Mykotoxin Roquefortin C wird in *Penicillium chrysogenum* biosynthetisiert [166]. Aus letzterem wurde ebenfalls Penicillin isoliert [100].

Roquefortin C ist hauptsächlich bekannt in der Verwendung zur Produktion von Blauschimmelkäse. Hierbei machen die niedrigen Konzentrationen sowie die relativ geringe Toxizität von Roquefortin den Verzehr von Blauschimmelkäse für Verbraucher sicher [167].

Roquefortin, ein Sekundärmetabolit von *Penicillium roqueforti*, hat ebenso eine antimikrobielle Wirkung. In Studien konnte gezeigt werden, dass das Wachstum grampositiver Bakterien (*Corynebacterium flaccumfaciens*) durch Roquefortin gehemmt wird, während gramnegative Bakterien in keiner Weise beeinflusst werden. Der EC₅₀-Wert für grampositive Organismen beträgt dabei durchschnittlich ca. 80 µg/ml [168].

Darüber hinaus besitzt Roquefortin die Eigenschaft, verschiedene humane Cytochrom-P450-Aktivitäten (1A1, 1A2, 2D6 und 3A4) zu hemmen [169].

5.2.13 Tetrahydroxybostricin

Tetrahydroxybostricin ist ein modifiziertes Bostricin, das ursprünglich aus dem endophytischen Mangrovenpilz *Nigrospora* sp. isoliert wird und eine moderate antikanzerogene sowie antimikrobielle Aktivität hat [170].

Bostricin mit seiner Tetrahydroanthrachinon-Struktur ist ein vielversprechender Kopplungswirkstoff für die Oberflächenmodifikation auf der Matrix mit möglichen Anwendungen bei der Proteinimmobilisierung sowie Biomaterial-zentrierten Infektionen [171].

Tetrahydroxybostricin aus dem marinem Pilz *Aspergillus* sp. Stamm 05F16 besitzt eine schwache antibakterielle Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* und *E. coli* [172].

Weiterhin werden Bostricin-Derivate als potentielle Inhibitoren der *Mycobacterium tuberculosis* Protein-Tyrosin-Phosphatase (MtpB) diskutiert. Als Virulenzfaktor, der in seine Wirtszellen sezerniert wird, vermittelt MtpB das intrazelluläre Überleben von *Mycobacterium tuberculosis*. Demzufolge ist MtpB als Ziel für die Entwicklung neuer Medikamente gegen Tuberkulose anzusehen. Einige Bostricin-Derivate weisen als nicht-kompetitiver Inhibitor der MtpB eine hemmende Aktivität auf und haben dadurch Potential als neuer Wirkstoff gegen Tuberkulose [173].

Im Modell der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* induzierte Bostricin in Versuchen eine mitochondriale Apoptose, indem es den Zellzyklus in der G1-Phase blockierte, schließlich zeit- und dosisabhängig zum Zelltod führte und somit die Zellproliferation stoppte. Ursache dafür ist die Senkung des elektrischen Potentials der mitochondrialen Membran durch Bostricin, was eine mitochondriale Zerstörung und in Folge dessen eine Apoptose verursacht [174].

Auf diese Weise ist Bostricin eine neuartige Verbindung, die die Proliferation vieler Tumorzellen hemmt. Sie inhibiert die Proliferation von menschlichen A549-Bronchialkarzinomzellen durch einen Stillstand des Zellzyklus in der G0/G1-Phase. Eine Studie zeigte, dass möglicherweise die Hochregulation von microRNA-638 und microRNA-923 sowie die Herunterregulation der PI3K/Akt-Signalweg-Proteine eine Rolle bei der Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose in Bostricin-behandelten Zellen spielen [175].

5.3 Beurteilung der inhibitorischen Potenz der Wirkstoffe auf *T. gondii*

Die inhibitorische Potenz der in dieser Arbeit getesteten Wirkstoffe lässt sich anhand des Vergleichs der EC₅₀-Werte mit denen der klinisch bereits etablierten antibiotischen Wirkstoffe beurteilen. Dazu wurden Cotrimoxazol und Clindamycin herangezogen. In den Toxoplasmen-Proliferationstests weisen Cotrimoxazol und Clindamycin einen EC₅₀-Wert von kleiner 1 µM

auf. Als eine gute inhibitorische Aktivität besitzend werden nun diejenigen Substanzen definiert, deren EC_{50} -Werte kleiner gleich $10 \mu\text{M}$ sind. Demzufolge können diese Wirkstoffe als potentiell wirksame Kandidaten für die Inhibition von *T. gondii* betrachtet werden.

Im Hinblick auf die gleichzeitige Hemmung beider *T. gondii* Stämme, also sowohl von Stamm ME49 als auch von Stamm BK, lassen sich drei der neu getesteten Wirkstoffe mit guter inhibitorischer Potenz von kleiner gleich $10 \mu\text{M}$ identifizieren. Namentlich gehören dazu 3-O-Methylgallic acid butyl ester, BrPhenethylamide und Hexylamide.

Eine gute inhibitorische Aktivität gegen den *T. gondii* Stamm ME49 besitzen weiterhin noch (+) Avarol, Alternariol, Neobavaisoflavone und Piperin. Betrachtet man die Potenz der Wirkstoffe gegen den *T. gondii* Stamm BK, so lässt sich noch die Wirkung von Berberin hemisulfat als erfolgversprechend beurteilen.

Demzufolge konnten in dieser Arbeit von den 13 auserwählten Wirkstoffen insgesamt acht identifiziert werden, deren inhibitorische Potenz neben der bereits etablierter Antibiotika sogar als gut bezeichnet werden kann und die somit vielversprechende Kandidaten in der Entwicklung neuer Substanzen zur Behandlung von *T. gondii* und der damit verbundenen Toxoplasmose darstellen.

5.4 Ausblick auf weiterführende Untersuchungen der Wirkstoffe

In Folgeprojekten muss nun untersucht werden, welcher Wirkmechanismus der Inhibition der Wirkstoffe auf *T. gondii* zugrunde liegt. Dafür stehen verschiedene Ansätze zur Verfügung. Zum einen lässt sich das Target der Wirkstoffe biochemisch ermitteln. Zum anderen ist die Züchtung resistenter *T. gondii* Stämme denkbar, welche anschließend sequenziert werden müssen, um auf diese Weise die Mutation und somit das Target zu finden. Eine Alternative hierzu bietet der Einsatz der Wirkstoffe bei der Inhibition von Bakterien. Da sich resistente *T. gondii* Parasiten nur schwer züchten lassen, kann es hilfreich sein, mithilfe der Wirkstoffe das Target zunächst in Bakterien zu finden und dann in *T. gondii* nach Orthologen zu suchen. Diese Gene könnten dann mittels CRISPR/Cas Mutagenese als Targets verifiziert werden.

In dem Zusammenhang kann im Hinblick auf die stets weiter fortschreitenden Antibiotikaresistenzen die Wirkung der neu entdeckten Wirkstoffe auf andere Erreger, wie z.B. Bakterien oder andere Erreger der Gattung Apicomplexa, getestet werden.

Des Weiteren besteht das Problem, dass bis zum jetzigen Zeitpunkt in der Behandlung der Toxoplasmose nur Substanzen bekannt sind, die parasitostatisch wirken, d.h. durch ihre hemmende Wirkung Tachyzoiten, die schnell replizierende Form von *T. gondii*, zu Bradyzoiten, der Zysten-bildenden Form, konvertieren. Wirkstoffe, welche jedoch parasitozid sind und somit auch Bradyzoiten abtöten können, sind dagegen bisher noch nicht bekannt. Um nun herauszufinden, wie die in dieser Arbeit neu entdeckten Wirkstoffe auf *T. gondii* wirken, muss zukünftig ein Assay entwickelt werden, mit welchem sich eine Abtötung der Bradyzoiten detektieren lässt.

Die Wirkstoffe wurden bisher ausschließlich in vitro in der Zellkultur angewendet. In weiteren Schritten muss daher die Hemmung von *T. gondii* durch die Wirkstoffe auch in vivo mithilfe von Tierversuchen getestet werden, um zu beurteilen, ob eine experimentelle Infektion ebenfalls durch die Wirkstoffe inhibiert werden kann.

Weiterhin muss im Tierversuch die Biotoxizität geprüft werden, da Aussagen zur Zytotoxizität auf die Zellen bisher nur visuell im Mikroskop gemacht werden konnten.

Darüber hinaus soll nach erfolgreicher in vivo Anwendung weiterhin untersucht werden, wie sich die Wirkstoffe hinsichtlich ihrer Potenz besser modifizieren lassen. Eine solche Modifikation spielt auch im Hinblick auf die Minimierung möglicher Nebenwirkungen eine wesentliche Rolle.

Eine weitere Voraussetzung für den klinischen Einsatz der Wirkstoffe ist die Möglichkeit der biotechnologischen Herstellung dieser im großen Maßstab. Dazu muss die chemische Synthese der Wirkstoffe, die in ihrem Ursprung alle Produkte der Natur sind, erfolgreich funktionieren.

Für all diese weiterführenden Untersuchungen und Überlegungen im Hinblick auf neue Wirkstoffe für die Inhibition von *T. gondii* stellt diese Arbeit nun die Grundlage dar.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

- [1] Frenkel, J.K. (1970). Pursuing toxoplasma. *J Infect Dis* 122, 553-559.
- [2] Fayed, H.M., Allam, K.A., and Ali, N.E. (2004). Merogony of *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Coccidia) and its effect on the mortality and histopathology in the house mouse *Mus musculus*. *J Egypt Soc Parasitol* 34, 45-64.
- [3] Dubey, J.P., Lindsay, D.S., and Speer, C.A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 11, 267-299.
- [4] Elmore, S.A., Jones, J.L., Conrad, P.A., Patton, S., Lindsay, D.S., and Dubey, J.P. (2010). *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol* 26, 190-196.
- [5] Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., and Weiss, L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 30, 1217-1258.
- [6] Schluter, D., Daubener, W., Schares, G., Gross, U., Pleyer, U., and Luder, C. (2014). Animals are key to human toxoplasmosis. *Int J Med Microbiol* 304, 917-929.
- [7] Jackson, M.H., and Hutchison, W.M. (1989). The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv Parasitol* 28, 55-105.
- [8] Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., and Tauxe, R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5, 607-625.
- [9] Karanis, P., Aldeyarbi, H.M., Mirhashemi, M.E., and Khalil, K.M. (2013). The impact of the waterborne transmission of *Toxoplasma gondii* and analysis efforts for water detection: an overview and update. *Environ Sci Pollut Res Int* 20, 86-99.
- [10] Kapperud, G., Jennum, P.A., Stray-Pedersen, B., Melby, K.K., Eskild, A., and Eng, J. (1996). Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Results of a prospective case-control study in Norway. *Am J Epidemiol* 144, 405-412.
- [11] Cook, A.J., Gilbert, R.E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jennum, P.A., Foulon, W., Semprini, A.E., and Dunn, D.T. (2000). Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ* 321, 142-147.
- [12] Koethe, M., Pott, S., Ludewig, M., Bangoura, B., Zoller, B., Dauschies, A., Tenter, A.M., Spekker, K., Bittame, A., Mercier, C., *et al.* (2011). Prevalence of specific IgG-antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic turkeys determined by kinetic ELISA based on recombinant GRA7 and GRA8. *Vet Parasitol* 180, 179-190.
- [13] Dubey, J.P. (2009). Toxoplasmosis in pigs--the last 20 years. *Vet Parasitol* 164, 89-103.
- [14] Dubey, J.P. (2009). Toxoplasmosis in sheep--the last 20 years. *Vet Parasitol* 163, 1-14.
- [15] Wulf, M.W., van Crevel, R., Portier, R., Ter Meulen, C.G., Melchers, W.J., van der Ven, A., and Galama, J.M. (2005). Toxoplasmosis after renal transplantation: implications of a missed diagnosis. *J Clin Microbiol* 43, 3544-3547.
- [16] Dodd, R.Y. (1998). Transmission of parasites by blood transfusion. *Vox Sang* 74 Suppl 2, 161-163.
- [17] Dubey, J.P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 28, 1019-1024.

- [18] Dubey, J.P., and Frenkel, J.K. (1972). Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool* *19*, 155-177.
- [19] Frenkel, J.K., Ruiz, A., and Chinchilla, M. (1975). Soil survival of toxoplasma oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg* *24*, 439-443.
- [20] Hunter, C.A., and Sibley, L.D. (2012). Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol* *10*, 766-778.
- [21] Dobrowolski, J.M., and Sibley, L.D. (1996). *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell* *84*, 933-939.
- [22] Suss-Toby, E., Zimmerberg, J., and Ward, G.E. (1996). *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 8413-8418.
- [23] Dubey, J.P., Speer, C.A., Shen, S.K., Kwok, O.C., and Blixt, J.A. (1997). Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol* *83*, 870-882.
- [24] Frenkel, J.K. (1988). Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol Today* *4*, 273-278.
- [25] Dubremetz, J.F., and Ferguson, D.J. (2009). The role played by electron microscopy in advancing our understanding of *Toxoplasma gondii* and other apicomplexans. *Int J Parasitol* *39*, 883-893.
- [26] Frenkel, J.K., and Escajadillo, A. (1987). Cyst rupture as a pathogenic mechanism of toxoplasmic encephalitis. *Am J Trop Med Hyg* *36*, 517-522.
- [27] Howe, D.K., and Sibley, L.D. (1995). *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* *172*, 1561-1566.
- [28] Sibley, L.D., and Boothroyd, J.C. (1992). Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* *359*, 82-85.
- [29] Kim, K., and Weiss, L.M. (2004). *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *Int J Parasitol* *34*, 423-432.
- [30] Melo, M.B., Jensen, K.D., and Saeij, J.P. (2011). *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends Parasitol* *27*, 487-495.
- [31] Weiss, L.M., and Kim, K. (2000). The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci* *5*, D391-405.
- [32] Sibley, L.D., LeBlanc, A.J., Pfefferkorn, E.R., and Boothroyd, J.C. (1992). Generation of a restriction fragment length polymorphism linkage map for *Toxoplasma gondii*. *Genetics* *132*, 1003-1015.
- [33] Lehmann, T., Marcet, P.L., Graham, D.H., Dahl, E.R., and Dubey, J.P. (2006). Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 11423-11428.
- [34] Dubey, J.P., Applewhaite, L., Sundar, N., Velmurugan, G.V., Bandini, L.A., Kwok, O.C., Hill, R., and Su, C. (2007). Molecular and biological characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from Guyana, South America, identified several unique and common parasite genotypes. *Parasitology* *134*, 1559-1565.
- [35] Dubey, J.P., Velmurugan, G.V., Chockalingam, A., Pena, H.F., de Oliveira, L.N., Leifer, C.A., Gennari, S.M., Bahia Oliveira, L.M., and Su, C. (2008). Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Vet Parasitol* *157*, 299-305.
- [36] Frenkel, J.K., and Dubey, J.P. (1972). Toxoplasmosis and its prevention in cats and man. *J Infect Dis* *126*, 664-673.

- [37] Bowie, W.R., King, A.S., Werker, D.H., Isaac-Renton, J.L., Bell, A., Eng, S.B., and Marion, S.A. (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC Toxoplasma Investigation Team. *Lancet* *350*, 173-177.
- [38] Saffra, N.A., Seidman, C.J., and Weiss, L.M. (2013). Ocular Toxoplasmosis: Controversies in Primary and Secondary Prevention. *J Neuroinfect Dis* *4*.
- [39] Boothroyd, J.C., and Grigg, M.E. (2002). Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? *Curr Opin Microbiol* *5*, 438-442.
- [40] Bosch-Driessen, L.E., Berendschot, T.T., Ongkosuwito, J.V., and Rothova, A. (2002). Ocular toxoplasmosis: clinical features and prognosis of 154 patients. *Ophthalmology* *109*, 869-878.
- [41] Carme, B., Demar, M., Ajzenberg, D., and Darde, M.L. (2009). Severe acquired toxoplasmosis caused by wild cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerg Infect Dis* *15*, 656-658.
- [42] Pomares, C., Ajzenberg, D., Bornard, L., Bernardin, G., Hasseine, L., Darde, M.L., and Marty, P. (2011). Toxoplasmosis and horse meat, France. *Emerg Infect Dis* *17*, 1327-1328.
- [43] Sobanski, V., Ajzenberg, D., Delhaes, L., Bautin, N., and Just, N. (2013). Severe toxoplasmosis in immunocompetent hosts: be aware of atypical strains. *Am J Respir Crit Care Med* *187*, 1143-1145.
- [44] Henriquez, S.A., Brett, R., Alexander, J., Pratt, J., and Roberts, C.W. (2009). Neuropsychiatric disease and *Toxoplasma gondii* infection. *Neuroimmunomodulation* *16*, 122-133.
- [45] Fabiani, S., Pinto, B., and Bruschi, F. (2013). Toxoplasmosis and neuropsychiatric diseases: can serological studies establish a clear relationship? *Neurol Sci* *34*, 417-425.
- [46] Hinze-Selch, D., Daubener, W., Erdag, S., and Wilms, S. (2010). The diagnosis of a personality disorder increases the likelihood for seropositivity to *Toxoplasma gondii* in psychiatric patients. *Folia Parasitol (Praha)* *57*, 129-135.
- [47] Flegr, J. (2013). Influence of latent *Toxoplasma* infection on human personality, physiology and morphology: pros and cons of the *Toxoplasma*-human model in studying the manipulation hypothesis. *J Exp Biol* *216*, 127-133.
- [48] Luft, B.J., and Remington, J.S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* *15*, 211-222.
- [49] Chirch, L.M., and Luft, B.J. (2007). Cerebral toxoplasmosis in AIDS. *Handb Clin Neurol* *85*, 147-158.
- [50] Holland, G.N. (1989). Ocular toxoplasmosis in the immunocompromised host. *Int Ophthalmol* *13*, 399-402.
- [51] Eza, D.E., and Lucas, S.B. (2006). Fulminant toxoplasmosis causing fatal pneumonitis and myocarditis. *HIV Med* *7*, 415-420.
- [52] Desmots, G., and Couvreur, J. (1974). Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. *Bull N Y Acad Med* *50*, 146-159.
- [53] Lindsay, D.S., and Dubey, J.P. (2011). *Toxoplasma gondii*: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis. *Parasitology* *138*, 1829-1831.
- [54] Ajzenberg, D., Cogne, N., Paris, L., Bessieres, M.H., Thulliez, P., Filisetti, D., Pelloux, H., Marty, P., and Darde, M.L. (2002). Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated

with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *J Infect Dis* 186, 684-689.

[55] Delhaes, L., Ajzenberg, D., Sicot, B., Bourgeot, P., Darde, M.L., Dei-Cas, E., and Houfflin-Debarge, V. (2010). Severe congenital toxoplasmosis due to a *Toxoplasma gondii* strain with an atypical genotype: case report and review. *Prenat Diagn* 30, 902-905.

[56] Vogel, N., Kirisits, M., Michael, E., Bach, H., Hostetter, M., Boyer, K., Simpson, R., Holfels, E., Hopkins, J., Mack, D., *et al.* (1996). Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. *Clin Infect Dis* 23, 1055-1060.

[57] Dollfus, H., Dureau, P., Hennequin, C., Uteza, Y., Bron, A., and Dufier, J.L. (1998). Congenital toxoplasma chorioretinitis transmitted by preconceptionally immune women. *Br J Ophthalmol* 82, 1444-1445.

[58] Bachmeyer, C., Mouchnino, G., Thulliez, P., and Blum, L. (2006). Congenital toxoplasmosis from an HIV-infected woman as a result of reactivation. *J Infect* 52, e55-57.

[59] Azevedo, K.M., Setubal, S., Lopes, V.G., Camacho, L.A., and Oliveira, S.A. (2010). Congenital toxoplasmosis transmitted by human immunodeficiency-virus infected women. *Braz J Infect Dis* 14, 186-189.

[60] Fernandes, M.A., Batista, G.I., Carlos Jda, C., Gomes, I.M., Azevedo, K.M., Setubal, S., Oliveira, S.A., Velarde, L.G., and Cardoso, C.A. (2012). *Toxoplasma gondii* antibody profile in HIV-1-infected and uninfected pregnant women and the impact on congenital toxoplasmosis diagnosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis* 16, 170-1174.

[61] Holland, G.N. (1999). Reconsidering the pathogenesis of ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* 128, 502-505.

[62] Dutton, G.N. (1989). Recent developments in the prevention and treatment of congenital toxoplasmosis. *Int Ophthalmol* 13, 407-413.

[63] Auer, H., Vander-Mose, A., Picher, O., Walochnik, J., and Aspöck, H. (2000). Clinical and diagnostic relevance of the *Toxoplasma* IgG avidity test in the serological surveillance of pregnant women in Austria. *Parasitol Res* 86, 965-970.

[64] Pouletty, P., Pinon, J.M., Garcia-Gonzalez, M., Desmots, G., Thulliez, P., Thoannes, H., and Kadouche, J. (1984). An anti-human immunoglobulin M monoclonal antibody for detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Eur J Clin Microbiol* 3, 510-515.

[65] Remington, J.S., Araujo, F.G., and Desmots, G. (1985). Recognition of different *Toxoplasma* antigens by IgM and IgG antibodies in mothers and their congenitally infected newborns. *J Infect Dis* 152, 1020-1024.

[66] Pinon, J.M., Toubas, D., Marx, C., Mougeot, G., Bonnin, A., Bonhomme, A., Villaume, M., Foudrinier, F., and Lèpan, H. (1990). Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 28, 1739-1743.

[67] Takahashi, E.E., and Rossi, C.L. (1994). Use of three immunological techniques for the detection of *Toxoplasma* sptgA antibodies in acute toxoplasmosis. *J Clin Pathol* 47, 1101-1104.

[68] Grover, C.M., Thulliez, P., Remington, J.S., and Boothroyd, J.C. (1990). Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J Clin Microbiol* 28, 2297-2301.

[69] Montoya, J.G., and Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 1965-1976.

- [70] Hotop, A., Hlobil, H., and Gross, U. (2012). Efficacy of rapid treatment initiation following primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis* 54, 1545-1552.
- [71] Bosch-Driessen, L.H., Verbraak, F.D., Suttorp-Schulten, M.S., van Ruyven, R.L., Klok, A.M., Hoyng, C.B., and Rothova, A. (2002). A prospective, randomized trial of pyrimethamine and azithromycin vs pyrimethamine and sulfadiazine for the treatment of ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* 134, 34-40.
- [72] Frenkel, J.K. (1985). Toxoplasmosis. *Pediatr Clin North Am* 32, 917-932.
- [73] Madi, D., Achappa, B., Rao, S., Ramapuram, J.T., and Mahalingam, S. (2012). Successful treatment of cerebral toxoplasmosis with clindamycin: a case report. *Oman Med J* 27, 411-412.
- [74] Faucher, B., Moreau, J., Zaegel, O., Franck, J., and Piarroux, R. (2011). Failure of conventional treatment with pyrimethamine and sulfadiazine for secondary prophylaxis of cerebral toxoplasmosis in a patient with AIDS. *J Antimicrob Chemother* 66, 1654-1656.
- [75] Podzamczar, D., Salazar, A., Jimenez, J., Consiglio, E., Santin, M., Casanova, A., Rufi, G., and Gudiol, F. (1995). Intermittent trimethoprim-sulfamethoxazole compared with dapsone-pyrimethamine for the simultaneous primary prophylaxis of *Pneumocystis pneumonia* and toxoplasmosis in patients infected with HIV. *Ann Intern Med* 122, 755-761.
- [76] Kravetz, J.D., and Federman, D.G. (2005). Toxoplasmosis in pregnancy. *Am J Med* 118, 212-216.
- [77] Friese, K., Weigel, M., and Melchert, F. (1993). [Diagnosis and therapy of congenital toxoplasmosis]. *Dtsch Med Wochenschr* 118, 1814-1816.
- [78] Vaudaux, B., Rudin, C., Kind, C., Schaad, U.B., Gnehm, H.E., Nadal, D., Suter, S., Calame, A., and Hohlfeld, P. (1995). [Congenital toxoplasmosis: pediatric approach. Consensus report of the Swiss infectious disease pediatricians]. *Schweiz Med Wochenschr Suppl* 65, 70S-81S.
- [79] Valentini, P., Buonsenso, D., Barone, G., Serranti, D., Calzedda, R., Ceccarelli, M., Speciale, D., Ricci, R., and Masini, L. (2015). Spiramycin/cotrimoxazole versus pyrimethamine/sulfonamide and spiramycin alone for the treatment of toxoplasmosis in pregnancy. *J Perinatol* 35, 90-94.
- [80] Desmonts, G., and Couvreur, J. (1974). Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *N Engl J Med* 290, 1110-1116.
- [81] Piens, M.A., and Garin, J.P. (1989). New perspectives in the chemoprophylaxis of toxoplasmosis. *J Chemother* 1, 46-51.
- [82] Opremcak, E.M., Scales, D.K., and Sharpe, M.R. (1992). Trimethoprim-sulfamethoxazole therapy for ocular toxoplasmosis. *Ophthalmology* 99, 920-925.
- [83] Arens, J., Barnes, K., Crowley, N., and Maartens, G. (2007). Treating AIDS-associated cerebral toxoplasmosis - pyrimethamine plus sulfadiazine compared with cotrimoxazole, and outcome with adjunctive glucocorticoids. *S Afr Med J* 97, 956-958.
- [84] Rothova, A., Meenken, C., Buitenhuis, H.J., Brinkman, C.J., Baarsma, G.S., Boen-Tan, T.N., de Jong, P.T., Klaassen-Broekema, N., Schweitzer, C.M., Timmerman, Z., *et al.* (1993). Therapy for ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* 115, 517-523.
- [85] Lakhanpal, V., Schocket, S.S., and Nirankari, V.S. (1983). Clindamycin in the treatment of toxoplasmic retinochoroiditis. *Am J Ophthalmol* 95, 605-613.

- [86] Yapar, N., Erdenizmenli, M., Oguz, V.A., Cakir, N., and Yuce, A. (2005). Cerebral toxoplasmosis treated with clindamycin alone in an HIV-positive patient allergic to sulfonamides. *Int J Infect Dis* 9, 64-66.
- [87] Guldsten, H. (1983). Clindamycin and sulphonamides in the treatment of ocular toxoplasmosis. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 61, 51-57.
- [88] Engstrom, R.E., Jr., Holland, G.N., Nussenblatt, R.B., and Jabs, D.A. (1991). Current practices in the management of ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* 111, 601-610.
- [89] Mittelviehhaus, H. (1992). [Clindamycin therapy of suspected toxoplasmosis retinochoroiditis]. *Klin Monbl Augenheilkd* 200, 123-127.
- [90] Newman, D.J., and Cragg, G.M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 75, 311-335.
- [91] Kjaer, A., Grevsen, K., and Jensen, M. (2012). Effect of external stress on density and size of glandular trichomes in full-grown *Artemisia annua*, the source of anti-malarial artemisinin. *AoB Plants* 2012, pls018.
- [92] D'Angelo, J.G., Bordon, C., Posner, G.H., Yolken, R., and Jones-Brando, L. (2009). Artemisinin derivatives inhibit *Toxoplasma gondii* in vitro at multiple steps in the lytic cycle. *J Antimicrob Chemother* 63, 146-150.
- [93] Hertiani, T., Edrada-Ebel, R., Ortlepp, S., van Soest, R.W., de Voogd, N.J., Wray, V., Hentschel, U., Kozytska, S., Muller, W.E., and Proksch, P. (2010). From anti-fouling to biofilm inhibition: new cytotoxic secondary metabolites from two Indonesian *Agelas* sponges. *Bioorg Med Chem* 18, 1297-1311.
- [94] Ibrahim, S.R., Min, C.C., Teuscher, F., Ebel, R., Kakoschke, C., Lin, W., Wray, V., Edrada-Ebel, R., and Proksch, P. (2010). Callyaerins A-F and H, new cytotoxic cyclic peptides from the Indonesian marine sponge *Callyspongia aerizusa*. *Bioorg Med Chem* 18, 4947-4956.
- [95] Kjer, J., Debbab, A., Aly, A.H., and Proksch, P. (2010). Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nat Protoc* 5, 479-490.
- [96] Thoms, C., Ebel, R., and Proksch, P. (2006). Activated chemical defense in aplysina sponges revisited. *J Chem Ecol* 32, 97-123.
- [97] Ortlepp, S., Pedpradap, S., Dobretsov, S., and Proksch, P. (2008). Antifouling activity of sponge-derived polybrominated diphenyl ethers and synthetic analogues. *Biofouling* 24, 201-208.
- [98] Bayer, M., Hellio, C., Marechal, J.P., Frank, W., Lin, W., Weber, H., and Proksch, P. (2011). Antifouling bastadin congeners target mussel phenoloxidase and complex copper(II) ions. *Mar Biotechnol (NY)* 13, 1148-1158.
- [99] Cortes, J., Vahdat, L., Blum, J.L., Twelves, C., Campone, M., Roche, H., Bachelot, T., Awada, A., Paridaens, R., Goncalves, A., *et al.* (2010). Phase II study of the halichondrin B analog eribulin mesylate in patients with locally advanced or metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline, a taxane, and capecitabine. *J Clin Oncol* 28, 3922-3928.
- [100] Smith, J.J., Lilly, M.D., and Fox, R.I. (1990). The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol Bioeng* 35, 1011-1023.
- [101] Tan, R.X., and Zou, W.X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep* 18, 448-459.

- [102] Strobel, G., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R.S., and Hess, W.M. (1996). Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology* 142 (Pt 2), 435-440.
- [103] Ebrahim, W., Aly, A.H., Wray, V., Mandi, A., Teiten, M.H., Gaascht, F., Orlikova, B., Kassack, M.U., Lin, W., Diederich, M., *et al.* (2013). Embellicines A and B: absolute configuration and NF-kappaB transcriptional inhibitory activity. *J Med Chem* 56, 2991-2999.
- [104] Ronsberg, D., Debbab, A., Mandi, A., Vasylyeva, V., Bohler, P., Stork, B., Engelke, L., Hamacher, A., Sawadogo, R., Diederich, M., *et al.* (2013). Pro-apoptotic and immunostimulatory tetrahydroxanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis longicolla*. *J Org Chem* 78, 12409-12425.
- [105] Bara, R., Zeffass, I., Aly, A.H., Goldbach-Gecke, H., Raghavan, V., Sass, P., Mandi, A., Wray, V., Polavarapu, P.L., Pretsch, A., *et al.* (2013). Atropisomeric dihydroanthracenones as inhibitors of multiresistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Chem* 56, 3257-3272.
- [106] de Kraker, M.E., Wolkewitz, M., Davey, P.G., Koller, W., Berger, J., Nagler, J., Icket, C., Kalenic, S., Horvatic, J., Seifert, H., *et al.* (2011). Clinical impact of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay related to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 1598-1605.
- [107] Maechler, F., Pena Diaz, L.A., Schroder, C., Geffers, C., Behnke, M., and Gastmeier, P. (2015). Erratum to: Prevalence of carbapenem-resistant organisms and other Gram-negative MDRO in German ICUs: first results from the national nosocomial infection surveillance system (KISS). *Infection* 43, 257.
- [108] Lwin, K.M., Imwong, M., Suangkanarat, P., Jeeyapant, A., Vihokhern, B., Wongsan, K., Snounou, G., Keereecharoen, L., White, N.J., and Nosten, F. (2015). Elimination of *Plasmodium falciparum* in an area of multi-drug resistance. *Malar J* 14, 319.
- [109] Hoffmann, S., Batz, M.B., and Morris, J.G., Jr. (2012). Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *J Food Prot* 75, 1292-1302.
- [110] Pfefferkorn, E.R., and Pfefferkorn, L.C. (1977). Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil. *J Protozool* 24, 449-453.
- [111] Kim, C.Y., Ahn, M.J., and Kim, J. (2006). A preparative isolation and purification of arctigenin and matairesinol from *Forsythia koreana* by centrifugal partition chromatography. *J Sep Sci* 29, 656-659.
- [112] Sung, Y.Y., Lee, A.Y., and Kim, H.K. (2016). *Forsythia suspensa* fruit extracts and the constituent matairesinol confer anti-allergic effects in an allergic dermatitis mouse model. *J Ethnopharmacol* 187, 49-56.
- [113] Lee, B., Kim, K.H., Jung, H.J., and Kwon, H.J. (2012). Matairesinol inhibits angiogenesis via suppression of mitochondrial reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun* 421, 76-80.
- [114] Su, S., Cheng, X., and Wink, M. (2015). Cytotoxicity of arctigenin and matairesinol against the T-cell lymphoma cell line CCRF-CEM. *J Pharm Pharmacol* 67, 1316-1323.
- [115] Kuo, H.J., Wei, Z.Y., Lu, P.C., Huang, P.L., and Lee, K.T. (2014). Bioconversion of pinoresinol into matairesinol by use of recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 80, 2687-2692.

- [116] Xu, P., Huang, M.W., Xiao, C.X., Long, F., Wang, Y., Liu, S.Y., Jia, W.W., Wu, W.J., Yang, D., Hu, J.F., *et al.* (2017). Matairesinol Suppresses Neuroinflammation and Migration Associated with Src and ERK1/2-NF-kappaB Pathway in Activating BV2 Microglia. *Neurochem Res* *42*, 2850-2860.
- [117] Choi, S.W., Park, K.I., Yeon, J.T., Ryu, B.J., Kim, K.J., and Kim, S.H. (2014). Anti-osteoclastogenic activity of matairesinol via suppression of p38/ERK-NFATc1 signaling axis. *BMC Complement Altern Med* *14*, 35.
- [118] Pejin, B., Iodice, C., Tommonaro, G., Stanimirovic, B., Ciric, A., Glamoclija, J., Nikolic, M., De Rosa, S., and Sokovic, M. (2014). Further in vitro evaluation of antimicrobial activity of the marine sesquiterpene hydroquinone avarol. *Curr Pharm Biotechnol* *15*, 583-588.
- [119] Tommonaro, G., Garcia-Font, N., Vitale, R.M., Pejin, B., Iodice, C., Canadas, S., Marco-Contelles, J., and Oset-Gasque, M.J. (2016). Avarol derivatives as competitive AChE inhibitors, non hepatotoxic and neuroprotective agents for Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem* *122*, 326-338.
- [120] Pejin, B., Ciric, A., Markovic, D., Tommonaro, G., and Sokovic, M. (2016). In vitro avarol does affect the growth of *Candida* sp. *Nat Prod Res* *30*, 1956-1960.
- [121] Pejin, B., Tommonaro, G., Glumac, M., Jakimov, D., and Kojic, V. (2018). The redox couple avarol/avarone in the fight with malignant gliomas: the case study of U-251 MG cells. *Nat Prod Res* *32*, 616-620.
- [122] Namba, T., and Kodama, R. (2015). Avarol induces apoptosis in pancreatic ductal adenocarcinoma cells by activating PERK-eIF2alpha-CHOP signaling. *Mar Drugs* *13*, 2376-2389.
- [123] Tommonaro, G., Pejin, B., Iodice, C., Tafuto, A., and De Rosa, S. (2015). Further in vitro biological activity evaluation of amino-, thio- and ester-derivatives of avarol. *J Enzyme Inhib Med Chem* *30*, 333-335.
- [124] Kolarevic, S., Milovanovic, D., Kracun-Kolarevic, M., Kostic, J., Sunjog, K., Martinovic, R., Dordevic, J., Novakovic, I., Sladic, D., and Vukovic-Gacic, B. (2018). Evaluation of genotoxic potential of avarol, avarone, and its methoxy and methylamino derivatives in prokaryotic and eukaryotic test models. *Drug Chem Toxicol*, 1-10.
- [125] Amigo, M., Paya, M., Braza-Boils, A., De Rosa, S., and Terencio, M.C. (2008). Avarol inhibits TNF-alpha generation and NF-kappaB activation in human cells and in animal models. *Life Sci* *82*, 256-264.
- [126] Amigo, M., Terencio, M.C., Paya, M., Iodice, C., and De Rosa, S. (2007). Synthesis and evaluation of diverse thio avarol derivatives as potential UVB photoprotective candidates. *Bioorg Med Chem Lett* *17*, 2561-2565.
- [127] Sorrentino, E., Succi, M., Tipaldi, L., Pannella, G., Maiuro, L., Sturchio, M., Coppola, R., and Tremonte, P. (2018). Antimicrobial activity of gallic acid against food-related *Pseudomonas* strains and its use as biocontrol tool to improve the shelf life of fresh black truffles. *Int J Food Microbiol* *266*, 183-189.
- [128] Kang, J., Li, Q., Liu, L., Jin, W., Wang, J., and Sun, Y. (2018). The specific effect of gallic acid on *Escherichia coli* biofilm formation by regulating pgaABCD genes expression. *Appl Microbiol Biotechnol* *102*, 1837-1846.
- [129] Sharma, S., Kanwar, S.S., Dogra, P., and Chauhan, G.S. (2015). Gallic acid-based alkyl esters synthesis in a water-free system by celite-bound lipase of *Bacillus licheniformis* SCD11501. *Biotechnol Prog* *31*, 715-723.

- [130] Kosuru, R.Y., Roy, A., Das, S.K., and Bera, S. (2018). Gallic Acid and Gallates in Human Health and Disease: Do Mitochondria Hold the Key to Success? *Mol Nutr Food Res* 62.
- [131] Weng, Y.P., Hung, P.F., Ku, W.Y., Chang, C.Y., Wu, B.H., Wu, M.H., Yao, J.Y., Yang, J.R., and Lee, C.H. (2018). The inhibitory activity of gallic acid against DNA methylation: application of gallic acid on epigenetic therapy of human cancers. *Oncotarget* 9, 361-374.
- [132] Forester, S.C., Choy, Y.Y., Waterhouse, A.L., and Oteiza, P.I. (2014). The anthocyanin metabolites gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde decrease human colon cancer cell viability by regulating pro-oncogenic signals. *Mol Carcinog* 53, 432-439.
- [133] Forester, S.C., and Waterhouse, A.L. (2010). Gut metabolites of anthocyanins, gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde, inhibit cell proliferation of Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 58, 5320-5327.
- [134] Garud, M.S., and Kulkarni, Y.A. (2018). Gallic acid attenuates type I diabetic nephropathy in rats. *Chem Biol Interact* 282, 69-76.
- [135] Lou, J., Yu, R., Wang, X., Mao, Z., Fu, L., Liu, Y., and Zhou, L. (2016). Alternariol 9-methyl ether from the endophytic fungus *Alternaria* sp. Samif01 and its bioactivities. *Braz J Microbiol* 47, 96-101.
- [136] Simon, H., Hoffmann, G., Hubner, F., Humpf, H.U., and Karst, U. (2016). Electrochemical simulation of metabolic reactions of the secondary fungal metabolites alternariol and alternariol methyl ether. *Anal Bioanal Chem* 408, 2471-2483.
- [137] Stypula-Trebas, S., Minta, M., Radko, L., Jedziniak, P., and Posyniak, A. (2017). Nonsteroidal mycotoxin alternariol is a full androgen agonist in the yeast reporter androgen bioassay. *Environ Toxicol Pharmacol* 55, 208-211.
- [138] Grover, S., and Lawrence, C.B. (2017). The *Alternaria alternata* Mycotoxin Alternariol Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. *Int J Mol Sci* 18.
- [139] Lee, H.W., Kim, Y.J., Nam, S.J., and Kim, H. (2017). Potent Selective Inhibition of Monoamine Oxidase A by Alternariol Monomethyl Ether Isolated from *Alternaria brassicae*. *J Microbiol Biotechnol* 27, 316-320.
- [140] Tiessen, C., Ellmer, D., Mikula, H., Pahlke, G., Warth, B., Gehrke, H., Zimmermann, K., Heiss, E., Frohlich, J., and Marko, D. (2017). Impact of phase I metabolism on uptake, oxidative stress and genotoxicity of the emerging mycotoxin alternariol and its monomethyl ether in esophageal cells. *Arch Toxicol* 91, 1213-1226.
- [141] Porru, E., Franco, P., Calabria, D., Spinozzi, S., Roberti, M., Caliceti, C., and Roda, A. (2018). Combined analytical approaches to define biodistribution and biological activity of semi-synthetic berberrubine, the active metabolite of natural berberine. *Anal Bioanal Chem*.
- [142] Wan, Q., Liu, Z., Yang, Y., and Cui, X. (2018). Suppressive effects of berberine on atherosclerosis via downregulating visfatin expression and attenuating visfatin-induced endothelial dysfunction. *Int J Mol Med* 41, 1939-1948.
- [143] Bahar, M., Deng, Y., Zhu, X., He, S., Pandharkar, T., Drew, M.E., Navarro-Vazquez, A., Anklin, C., Gil, R.R., Doskotch, R.W., *et al.* (2011). Potent antiprotozoal activity of a novel semi-synthetic berberine derivative. *Bioorg Med Chem Lett* 21, 2606-2610.
- [144] Su, F., and Wang, J. (2018). Berberine inhibits the MexXY-OprM efflux pump to reverse imipenem resistance in a clinical carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate in a planktonic state. *Exp Ther Med* 15, 467-472.

- [145] Kim, S., Lee, J., You, D., Jeong, Y., Jeon, M., Yu, J., Kim, S.W., Nam, S.J., and Lee, J.E. (2018). Berberine Suppresses Cell Motility Through Downregulation of TGF-beta1 in Triple Negative Breast Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem* 45, 795-807.
- [146] Wang, L., Ma, H., Xue, Y., Shi, H., Ma, T., and Cui, X. (2018). Berberine inhibits the ischemia-reperfusion injury induced inflammatory response and apoptosis of myocardial cells through the phosphoinositide 3-kinase/RAC-alpha serine/threonine-protein kinase and nuclear factor-kappaB signaling pathways. *Exp Ther Med* 15, 1225-1232.
- [147] Zheng, H., Zhu, F., Miao, P., Mao, Z., Redfearn, D.P., and Cao, R.Y. (2017). Antimicrobial Natural Product Berberine Is Efficacious for the Treatment of Atrial Fibrillation. *Biomed Res Int* 2017, 3146791.
- [148] Guan, C., Qiao, S., Lv, Q., Cao, N., Wang, K., Dai, Y., and Wei, Z. (2018). Orally administered berberine ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice through promoting activation of PPAR-gamma and subsequent expression of HGF in colons. *Toxicol Appl Pharmacol*.
- [149] Aski, M.L., Rezvani, M.E., Khaksari, M., Hafizi, Z., Pirmoradi, Z., Niknazar, S., and Mehrjerdi, F.Z. (2018). Neuroprotective effect of berberine chloride on cognitive impairment and hippocampal damage in experimental model of vascular dementia. *Iran J Basic Med Sci* 21, 53-58.
- [150] Ming, J., Xu, S., Liu, C., Liu, X., Jia, A., and Ji, Q. (2018). Effectiveness and safety of bifidobacteria and berberine in people with hyperglycemia: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 19, 72.
- [151] Colarusso, S., Koch, U., Gerlach, B., Steinkuhler, C., De Francesco, R., Altamura, S., Matassa, V.G., and Narjes, F. (2003). Phenethyl amides as novel noncovalent inhibitors of hepatitis C virus NS3/4A protease: discovery, initial SAR, and molecular modeling. *J Med Chem* 46, 345-348.
- [152] Okoye, F.B., Nworu, C.S., Akah, P.A., Esimone, C.O., Debbab, A., and Proksch, P. (2013). Inhibition of inflammatory mediators and reactive oxygen and nitrogen species by some depsidones and diaryl ether derivatives isolated from *Corynespora cassiicola*, an endophytic fungus of *Gongronema latifolium* leaves. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 35, 662-668.
- [153] Chomcheon, P., Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Ngamrojanavanich, N., Kengtong, S., Mahidol, C., Ruchirawat, S., and Kittakoop, P. (2009). Aromatase inhibitory, radical scavenging, and antioxidant activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus *Corynespora cassiicola* L36. *Phytochemistry* 70, 407-413.
- [154] Zhao, D.L., Shao, C.L., Wang, C.Y., Wang, M., Yang, L.J., and Wang, C.Y. (2016). Naphthalenones and Depsidones from a Sponge-Derived Strain of the Fungus *Corynespora cassiicola*. *Molecules* 21, 160.
- [155] Szliszka, E., Skaba, D., Czuba, Z.P., and Krol, W. (2011). Inhibition of inflammatory mediators by neobavaisoflavone in activated RAW264.7 macrophages. *Molecules* 16, 3701-3712.
- [156] Kim, Y.J., Choi, W.I., Ko, H., So, Y., Kang, K.S., Kim, I., Kim, K., Yoon, H.G., Kim, T.J., and Choi, K.C. (2014). Neobavaisoflavone sensitizes apoptosis via the inhibition of metastasis in TRAIL-resistant human glioma U373MG cells. *Life Sci* 95, 101-107.
- [157] Szliszka, E., Czuba, Z.P., Sedek, L., Paradysz, A., and Krol, W. (2011). Enhanced TRAIL-mediated apoptosis in prostate cancer cells by the bioactive compounds

- neobavaisoflavone and psoralidin isolated from *Psoralea corylifolia*. *Pharmacol Rep* *63*, 139-148.
- [158] Don, M.J., Lin, L.C., and Chiou, W.F. (2012). Neobavaisoflavone stimulates osteogenesis via p38-mediated up-regulation of transcription factors and osteoid genes expression in MC3T3-E1 cells. *Phytomedicine* *19*, 551-561.
- [159] Pongkorpsakol, P., Wongkrasant, P., Kumpun, S., Chatsudthipong, V., and Muanprasat, C. (2015). Inhibition of intestinal chloride secretion by piperine as a cellular basis for the anti-secretory effect of black peppers. *Pharmacol Res* *100*, 271-280.
- [160] Lee, S.H., Kim, H.Y., Back, S.Y., and Han, H.K. (2018). Piperine-mediated drug interactions and formulation strategy for piperine: recent advances and future perspectives. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* *14*, 43-57.
- [161] Li, C., Wang, Z., Wang, Q., Ka Yan Ho, R.L., Huang, Y., Chow, M.S.S., Kei Lam, C.W., and Zuo, Z. (2018). Enhanced anti-tumor efficacy and mechanisms associated with docetaxel-piperine combination- in vitro and in vivo investigation using a taxane-resistant prostate cancer model. *Oncotarget* *9*, 3338-3352.
- [162] Han, S.Z., Liu, H.X., Yang, L.Q., Cui, L.D., and Xu, Y. (2017). Piperine (PP) enhanced mitomycin-C (MMC) therapy of human cervical cancer through suppressing Bcl-2 signaling pathway via inactivating STAT3/NF-kappaB. *Biomed Pharmacother* *96*, 1403-1410.
- [163] Greenshields, A.L., Doucette, C.D., Sutton, K.M., Madera, L., Annan, H., Yaffe, P.B., Knickle, A.F., Dong, Z., and Hoskin, D.W. (2015). Piperine inhibits the growth and motility of triple-negative breast cancer cells. *Cancer Lett* *357*, 129-140.
- [164] Guo, J., Cui, Y., Liu, Q., Yang, Y., Li, Y., Weng, L., Tang, B., Jin, P., Li, X.J., Yang, S., *et al.* (2018). Piperine ameliorates SCA17 neuropathology by reducing ER stress. *Mol Neurodegener* *13*, 4.
- [165] Mishra, A., Punia, J.K., Bladen, C., Zamponi, G.W., and Goel, R.K. (2015). Anticonvulsant mechanisms of piperine, a piperidine alkaloid. *Channels (Austin)* *9*, 317-323.
- [166] Garcia-Estrada, C., Ullan, R.V., Albillos, S.M., Fernandez-Bodega, M.A., Durek, P., von Dohren, H., and Martin, J.F. (2011). A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrins in *Penicillium chrysogenum*. *Chem Biol* *18*, 1499-1512.
- [167] Finoli, C., Vecchio, A., Galli, A., and Dragoni, I. (2001). Roquefortine C occurrence in blue cheese. *J Food Prot* *64*, 246-251.
- [168] Kopp-Holtwiesche, B., and Rehm, H.J. (1990). Antimicrobial action of roquefortine. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* *10*, 41-44.
- [169] Aninat, C., Hayashi, Y., Andre, F., and Delaforge, M. (2001). Molecular requirements for inhibition of cytochrome p450 activities by roquefortine. *Chem Res Toxicol* *14*, 1259-1265.
- [170] Xia, X., Li, Q., Li, J., Shao, C., Zhang, J., Zhang, Y., Liu, X., Lin, Y., Liu, C., and She, Z. (2011). Two new derivatives of griseofulvin from the mangrove endophytic fungus *Nigrospora* sp. (strain No. 1403) from *Kandelia candel* (L.) Druce. *Planta Med* *77*, 1735-1738.
- [171] Yang, W.J., Yang, C.S., Huang, C.J., Chen, K.S., and Lin, S.F. (2012). Bostrycin, a novel coupling agent for protein immobilization and prevention of biomaterial-centered infection produced by *Nigrospora* sp. No. 407. *Enzyme Microb Technol* *50*, 287-292.
- [172] Xu, J., Nakazawa, T., Ukai, K., Kobayashi, H., Mangindaan, R.E., Wewengkang, D.S., Rotinsulu, H., and Namikoshi, M. (2008). Tetrahydrobostrycin and 1-

deoxytetrahydrobostrycin, two new hexahydroanthrone derivatives, from a marine-derived fungus *Aspergillus* sp. *J Antibiot (Tokyo)* *61*, 415-419.

[173] Chen, D.N., Chen, H., She, Z.G., and Lu, Y.J. (2016). Identification of Bostrycin Derivatives as Potential Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* Protein Tyrosine Phosphatase (MtpB). *Med Chem* *12*, 296-302.

[174] Xu, C., Wang, J., Gao, Y., Lin, H., Du, L., Yang, S., Long, S., She, Z., Cai, X., Zhou, S., *et al.* (2010). The anthracenedione compound bostrycin induces mitochondria-mediated apoptosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* *10*, 297-308.

[175] Chen, W.S., Hou, J.N., Guo, Y.B., Yang, H.L., Xie, C.M., Lin, Y.C., and She, Z.G. (2011). Bostrycin inhibits proliferation of human lung carcinoma A549 cells via downregulation of the PI3K/Akt pathway. *J Exp Clin Cancer Res* *30*, 17.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer, der mir das interessante Thema dieser Dissertation und somit die Möglichkeit wissenschaftlichen Arbeitens zur Verfügung stellte. Er stand mir stets mit seiner hervorragenden Betreuung und Diskussionsbereitschaft zur Seite.

Herzlich danken möchte ich auch Frau Karin Buchholz, die mich nicht nur im Labor einarbeitete, sondern mir auch im Alltag durch ihre Hilfsbereitschaft und wertvollen Ratschläge eine sehr große Unterstützung war.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Proksch und seiner Arbeitsgruppe für die Bereitstellung der Wirkstoffe, die Diskussionen und die gute Zusammenarbeit.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Pfeffer sowie des gesamten Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene danke ich für das freundliche Miteinander und die angenehme Arbeitsatmosphäre, in der es immer eine Freude war zu arbeiten.

Zuletzt möchte ich insbesondere auch meiner Familie und meinen Freunden meinen Dank aussprechen, auf deren Unterstützung und Rücksicht ich während dieser Arbeit immer zählen konnte.