

**Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität**

Leiter:
Professor Dr. med. Thomas Löscher

**Molekulare Surveillance der Medikamentenresistenz
von *Plasmodium falciparum*
anhand von Isolaten aus Tansania**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Mirjam Schönfeld
aus Regensburg
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Löscher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann
Prof. Dr. Rüdiger von Kries

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Mirjam Schunk

Dekan: Prof. Dr. Dietrich Reinhard

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2008

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Schönfeld M , Barreto Miranda I , Schunk M , Maduhu I , Maboko L , Hoelscher M , Berens-Riha N , Kitua A , Löscher T. Molecular surveillance of drug-resistance associated mutations of *Plasmodium falciparum* in south-west Tanzania. *Malar J* 2007, 6:2.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1	Malaria tropica.....	6
1.2	Chemotherapeutika zur Behandlung der Malaria tropica	8
1.3	Medikamentenresistenz	10
1.3.1	Definition	11
1.3.2	Ursachen der Resistenzentwicklung	11
1.3.3	Molekulargenetik der Resistenz	11
1.3.4	Nachweismethode.....	13
2.	Problemstellung und Zielsetzung	14
3.	Material und Methoden	15
3.1	Proben.....	15
3.2	Material	16
3.2.1	Oligonukleotide	16
3.2.2	Enzyme	17
3.2.3	Chemikalien	18
3.2.4	Geräte und Software	19
3.2.5	Sonstiges	20
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	21
3.3.1	DNA-Extraktion	21
3.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
3.3.3	Restriktionsenzyme.....	22
3.3.4	Agarosegel-Elektrophorese.....	23
3.3.5	Positiv- und Negativkontrollen.....	24
3.4	Reaktionsansatz zum Nachweis der <i>Plasmodium</i> Spezies	25
3.5	Reaktionsansätze für PCR und RFLP-Methoden zum Nachweis von <i>in vitro</i> Medikamentenresistenz bei <i>Plasmodium falciparum</i>	25
3.5.1	<i>Pfcr</i> Gen	26
3.5.2	<i>Pfmdr</i> Gen.....	27
3.5.3.	<i>Dhfr</i> Gen.....	28
3.5.4	<i>Dhps</i> Gen	30
3.5.5	<i>Cytochrom-b</i> Gen.....	30
4.	Ergebnisse	32
4.1	Nachweis der Plasmodium - Spezies	32

4.2	Patientenkollektiv	33
4.3	Polymorphismus des <i>Pfcr</i> t Gens	34
4.4	Polymorphismus des <i>Pfmdr</i> Gens	35
4.5	Polymorphismus der <i>Dhfr</i> Gensequenz.....	36
4.5.1	Codon 16.....	36
4.5.2	Codon 51.....	37
4.5.3	Codon 59.....	37
4.5.4	Codon 108.....	38
4.5.5	Codon 164.....	39
4.6	Polymorphismus der <i>Dhps</i> Gensequenz.....	39
4.6.1	Codon 436.....	40
4.6.2	Codon 437.....	41
4.6.3	Codon 540.....	42
4.6.4	Codon 581.....	42
4.6.5	Codon 613.....	43
4.7	Polymorphismus der <i>Cytb</i> Gensequenz.....	44
4.8	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	46
4.9	Kombinationen von Einzelmutationen	48
4.10	Signifikanz der Ergebnisse.....	49
5.	Diskussion	50
5.1	Aussagekraft und Zuverlässigkeit der Untersuchungen	50
5.2	Polymorphismen molekularer Marker zum Nachweis von Medikamentenresistenz	52
5.2.1	Chloroquin.....	52
5.2.2	Sulfadoxin - Pyrimethamin	54
5.2.3	Atovaquon.....	57
5.3	Schlussbetrachtung.....	58
6.	Zusammenfassung.....	60
7.	Abkürzungen.....	63
8.	Standardisierter Fragebogen	64
9.	Literaturverzeichnis	65
10.	Danksagung.....	73
11.	Curriculum vitae	74

1. Einleitung

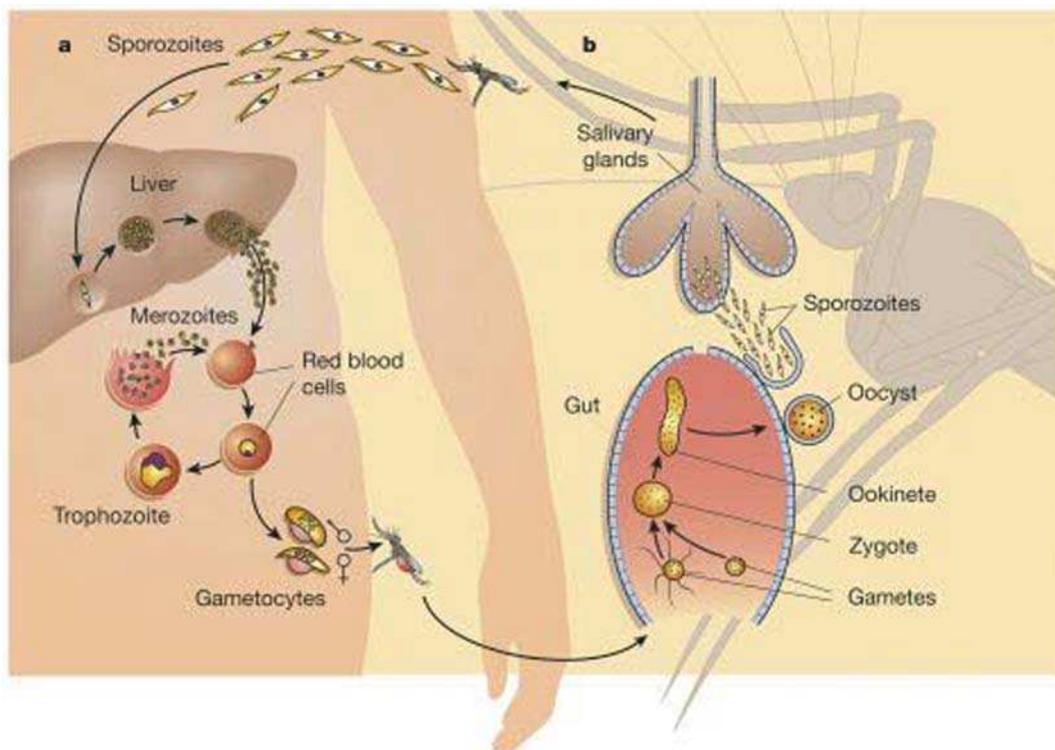
1.1 Malaria tropica

Malaria ist eine durch Plasmodien verursachte Protozoeninfektion (44). Bereits die alten Ägypter beschrieben in ihren Aufzeichnungen die typischen Krankheitssymptome der Malaria. Aber erst 1880 gelang dem französischen Militärarzt Alphonse Laveran mit der Beschreibung der Trophozoiten von *Plasmodium malariae* die Entdeckung des Erregers. Insgesamt wurden rund 125 Plasmodienarten entdeckt, von denen aber nur vier für den Menschen pathogen sind. *Plasmodium malariae*, Erreger der Malaria quartana, *Plasmodium ovale* und *vivax*, Erreger der Malaria tertiana, und *Plasmodium falciparum*, Erreger der klinisch bedeutsamsten und bedrohlichsten Form der Malaria, der Malaria tropica. *P. falciparum* besitzt 14 Chromosomen, die ca. 5300 Gene tragen. Überträger und Endwirte sind Stechmücken (Anopheles-Arten) aus der Familie der Culicidae. Mensch und Mücke sind das einzige Erregerreservoir der Plasmodien.

Der Erreger durchläuft während eines Lebenszyklus den Menschen als Zwischenwirt (asexuelle Phase) und die Anopheles-Mücke als Endwirt (sexuelle Phase). Die asexuelle Phase (Schizogenie) beginnt mit dem Stich einer infizierten Mücke. Hierbei werden mit dem Speichel Sporozoiten in das menschliche Blut übertragen, diese dringen in Leberparenchymzellen ein und vermehren sich dort ungeschlechtlich (exoerythrozytäre Schizogenie). So entstehen bis zu 30.000 Merozoiten, die nach dem Absterben der Hepatozyten in die Blutbahn gelangen. In den dort befallenen Erythrozyten vermehren sie sich (erythrozytäre Schizogenie), und reifen über das Stadium der Trophozoiten zu Blutschizonten. Bei *P. falciparum* führt die intraerythrozytäre Erregervermehrung nach ca. 48 Stunden zum Tod des Erythrozyten. Diese in den Kreislauf ausgeschwemmten Merozoiten befallen weitere rote Blutkörperchen, das dadurch freigesetzte Fremdeiweiß verursacht unter anderem die typischen Symptome einer Malaria: Fieber, Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen. Einige Merozoiten differenzieren sich zu Gametozyten, der geschlechtlichen Form der Parasiten. Diese stellen die infektiösen Stadien für den Endwirt, die Anopheles-Mücke. Durch eine erneute Blutmahlzeit gelangt nun gametozytenhaltiges Blut des Menschen in den Darm der Mücke, in diesem entwickeln sich die Gametozyten weiter zu Gameten. Bei der Vereinigung männlicher

und weiblicher Gameten entstehen die Zygoten, aus denen sich Oozysten entwickeln. Nach einer Meiose schließt sich die Sporogonie, in der rund 4000 Sporozoiten gebildet werden, an. Diese wandern in die Speicheldrüse der Mücke, um dann bei einem erneuten Stich in das menschliche Blut zu gelangen und den Kreislauf zu schließen.

Abbildung 1: Lebenszyklus des Plasmodiums



Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) leben ca. 3,2 Milliarden Menschen, in 107 verschiedenen Ländern der Erde, in Malaria-Risikogebieten. Mit 350-500 Millionen Erkrankungen pro Jahr, ist die Malaria eine der häufigsten Infektionskrankheiten der Welt. 1,2 bis 2,7 Millionen Menschen sterben jährlich weltweit an dieser Krankheit. Am höchsten ist das Malariarisiko im tropischen Afrika. Rund 80% der Todesfälle ereignen sich südlich der Sahara, der Großteil von ihnen sind Kinder unter fünf Jahre (86). Damit gehört die Malaria zu den häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität in tropischen Ländern.

Tansania zählt mit rund 37 Millionen Einwohnern, 45% davon sind Kinder unter 15 Jahre, zu den am wenigsten entwickelten Ländern der Welt. Die Lebenserwartung bei Geburt beträgt rund 41 Jahre, die Kindersterblichkeit liegt bei 134 (m) bzw. 117 (w)

pro 1000 Kinder. 38,2% dieser Todesfälle sind mit Malaria assoziiert. Insgesamt sterben jährlich 100.000 - 125.000 Menschen an einer Malariainfektion (85).

1.2 Chemotherapeutika zur Behandlung der Malaria tropica

Die Bekämpfung der Malaria stützt sich auf unterschiedliche Ansatzpunkte. Durch Vektorkontrolle wird versucht, den Überträger - die Anopheles-Mücke - vor allem durch Insektizide zu dezimieren. Die sogenannte Expositionsprophylaxe (Moskitonetze, lange und helle Kleidung, Repellentien) bietet Schutz vor dem Stich selbst. Zur Prophylaxe und Behandlung der Malaria sind Chemotherapeutika unverzichtbar. Die Wirkungsweisen der wichtigsten dieser Medikamente werden hier besprochen.

Chinoline

Der Wirkmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, es wird heute aber angenommen, dass sich die Wirkung im lysosomalen System der Parasiten entfaltet. Chinoline hemmen die Hämpolymerase, dieses Enzym wird von den Plasmodien benötigt, um das toxische Häm (Ferriprotoporphyrin, ein Abbauprodukt des Hämoglobins) in das unschädliche Hämazoin (Malariapigment) zu polymerisieren. Reduziertes Glutathion (GSH), das normalerweise freies Ferriprotoporphyrin abbaut, wird zusätzlich durch Chinoline gehemmt. Diese Akkumulation des toxischen Zwischenprodukts ist verantwortlich für das Zugrundegehen der Parasiten (1, 15, 16).

Chinin, das älteste Mittel gegen Malaria, wurde von Mitgliedern des Jesuitenordens im 17. Jahrhundert von Südamerika nach Europa gebracht („Jesuitenpulver“). Bis in das 20. Jahrhundert war das aus Chinarinde gewonnene Pulver in der westlichen Welt das einzige Mittel zur Behandlung der Malaria. Heute ist es Mittel der ersten Wahl bei der Therapie der komplizierten Malaria tropica. Darüber hinaus gewinnt es immer mehr an Bedeutung bei der Behandlung von Infektionen mit resistenten *Plasmodium falciparum* Stämmen. Chinin wirkt überwiegend schizontozid.

Strukturell verwandt ist *Chloroquin* (Resorchin[®]), ein 4-Aminochinolon, das effizient gegen Blutschizonten und, in geringerem Maße, auch gegen Gametozyten (außer bei *P. falciparum*) wirkt. In den letzten Jahren entwickelten sich immer häufiger Resistenzen gegen Chloroquin.

Aus diesem Grund wurde *Mefloquin* (Lariam®), ein 4-Chinolinmethanol, entwickelt, das wie Chloroquin zur Prophylaxe und Behandlung der Malaria geeignet ist.

Antifolate

Einer der wichtigsten Vertreter aus der Gruppe der Antifolate ist die Kombination Sulfadoxin/Pyrimethamin (Fansidar®). Seit der Einführung in den 60er Jahren wird es in vielen Ländern als effizientes und kostengünstiges Mittel der ersten und zweiten Wahl verwendet. Wegen erheblicher Nebenwirkungen, beispielsweise allergischer Hautreaktionen (Steven-Johnson-Syndrom), toxischer Epidermiolyse (Lyell-Syndrom) oder Störungen der Hämatopoese, wird von einer Langzeitprophylaxe abgeraten (4). In Deutschland wurde das Präparat aufgrund der möglichen toxischen Nebenwirkungen aus dem Handel genommen.

Beide Komponenten hemmen synergistisch den Folatezyklus (65), ein für den Parasiten notwendiger Schritt für seine DNA-Replikation, also Zellvermehrung. Sulfadoxin, ein Sulfonamid, hemmt die Dihydropteroat-Synthetase (*Dhps*) kompetitiv. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von p-Aminobenzoessäure (PABA) zu Dihydropteroat. Pyrimethamin greift später in den Folatezyklus ein. Es hemmt die Dihydrofolat-Reduktase (*Dhfr*) (25, 49), welche ein wichtiger Bestandteil der Nukleotidbiosynthese ist (20). Beide Enzyme spielen eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Resistenzen gegen Sulfadoxin/Pyrimethamin (SP). Die beschriebenen Unterbrechungen des Folatezyklus führen zum Absterben des Parasiten.

Artemisinin und Derivate

Diese aus der Pflanze *Artemisia annua* stammende Substanz wurde bereits vor 2000 Jahren von den Chinesen für die Behandlung von Fieber und Malaria verwendet. Aber erst während des Vietnamkrieges gelang es chinesischen Wissenschaftlern, das Artemisinin zu extrahieren. Die schädigende Wirkung auf alle Blutstadien des Erregers, einschließlich der Gametozyten (62), kommt durch Sauerstoffradikalbildung zustande. Diese Radikale schädigen die Zelle durch Methylierung der Erreger-DNA. Außerdem kann durch den entstandenen oxidativen Stress das toxische Hämin nicht mehr zu Hämazoin umgebaut werden. Artemisinin und Derivate sind zur Zeit die wichtigste Klasse der Antimalariamittel (41). Die Kombination Artemether/Lumefantrin

(Riamet®) stellt eine Alternative bei der Behandlung von multiresistenter Malaria tropica dar.

Atovaquone

Dieses Hydroxynaphtochinon wirkt gegen verschiedene Parasitenarten. Bei den Malariaerregern ist es effektiv gegen Blutformen, aber auch präerythrozytäre Stadien (Leberformen), Sexualformen und Insektenstadien (11, 12, 23, 28). Die Wirkung wird als Hemmung des mitochondrialen Elektronentransportes und Kollaps des Membranpotentials beschrieben (29, 70). Wegen der Strukturverwandschaft zu Ubichinon wurde ein Angriff am Cytochrom-b postuliert. Aufgrund der raschen Resistenzbildung wird Atovaquon mit Proguanil, einem Dihydrofolat-Reduktase-Hemmer, kombiniert. Malarone® kann zur Therapie, Prophylaxe und notfallmäßigen Selbstbehandlung eingesetzt werden.

Seit etwa 30 Jahren gehört die Entwicklung eines Impfstoffs ebenfalls zu den Zielen der Malariabekämpfung. Obwohl zur Zeit noch keine zuverlässig wirksame Vakzine gegen Malaria existiert, geben einige neue Impfstofftypen, die sich derzeit in Phase I bzw. II der klinischen Studien befinden, Anlass zur Hoffnung (2, 9, 34).

1.3 Medikamentenresistenz

1955 initiierte die WHO ein weltweites Eradikationsprogramm, das durch großflächigen Einsatz von Insektiziden und durch verstärkte Anwendung von Medikamenten, die Malaria beseitigen sollte. 1969 wurde dieses Programm verlassen nachdem klar wurde, dass die Ausrottung aufgrund des vermehrten Auftretens von resistenten Plasmodienstämmen gegen die Standardtherapeutika und der Resistenzentwicklung der Mücken gegen Insektizide nicht möglich war (80).

1.3.1 Definition

Resistenz ist definiert als Fähigkeit einer Plasmodienpopulation, zu überleben und sich zu vermehren, obwohl die Einnahme und Aufnahme einer ausreichenden Wirkstoffmenge vorliegen. Dabei muss für den Zeitraum, der für eine normale antiparasitäre Wirkung notwendig ist, der Wirkstoff in adäquater Menge am richtigen Ort vorliegen. Bei Erkrankung trotz Behandlung, kann nicht gleich auf Resistenz geschlossen werden. Die Gründe für sogenannte Therapieversager sind vielseitig (u.a. unzureichende Dosierung, fehlende Compliance). Als *multidrug resistance* (MDR) werden Stämme definiert, die gegen mehr als zwei Medikamente verschiedener Wirkstoffklassen eine Resistenz besitzen.

1.3.2 Ursachen der Resistenzentwicklung

Eine Spontanmutation im Erregergenom ist meist Auslöser einer Resistenzentwicklung. Diese genetisch gering veränderten Plasmodien kommen zu geringen Teilen in der Gesamtpopulation vor. Zeigt dieser mutierte Stamm dann unter Selektionsdruck einen Vorteil, so kann er sich gegenüber der „Wildtyppopulation“ teilweise oder vollständig durchsetzen. Einnahmegewohnheiten, Wirkstoffeigenschaften, Immunstatus und Vektoreigenschaften gehören zu den Faktoren, welche Entwicklung und Ausbreitung von resistenten Erregern beeinflussen (51, 82, 83, 87, 88).

1.3.3 Molekulargenetik der Resistenz

Chloroquinresistenzen (CQR) wurden erstmals in den späten 50er Jahren in der thailändisch-kambodschanischen Grenzregion beobachtet (83). In Afrika wurden CQR in den späten 70er Jahren zum ersten Mal beschrieben (77). Heute sind das Vorkommen der *Malaria tropica* und das Auftreten von Chloroquinresistenz kongruent. Als molekulargenetische Grundlage werden die Mutationen in zwei Genen des *P. falciparum* Genoms angenommen.

Das „chloroquine-resistance-transporter“ (*Pfcr1*) Gen auf Chromosom 7 codiert für ein Transportprotein in der Lysosomenmembran (81). Der Austausch von Lysin zu Threonin in Codon 76 spielt hier eine zentrale Rolle (13, 21). Durch diesen Aminosäurenwechsel kommt es zu einer verstärkten Ausschleusung von Chloroquin aus der Vakuole. Das Vorliegen eines resistenten Phänotyps bei einem Drittel der Erkrankten mit der Thr 76 Mutation, und die langsame Entwicklung von Chloroquinresistenz sind möglicherweise Hinweise auf einen multifaktoriellen Prozess (80). Eine weitere Mutation, die mit Chloroquinresistenz in Verbindung gebracht wird, ist der Austausch von Asparagin zu Thyrosin in Codon 86 des *Pfmdr* Gens. Dieses „multi drug resistance“ Gen auf Chromosom 5 verschlüsselt ein P-Glykoprotein (Pgh-1), ein lysosomaler transmembraner Transporter. Die Folge ist eine zu geringe Wirkstoffkonzentration im Lysosom.

Wegen der sich immer weiter ausbreitenden Resistenz gegen CQ führten viele Länder Sulfadoxin/Pyrimethamin (SP) als Mittel der ersten Wahl bei der Behandlung der unkomplizierten Malaria tropica ein. Doch auch hier entwickelten sich rasch Resistenzen. Die Pyrimethaminresistenz wird mit spezifischen Punktmutationen im *Dhfr* Gen assoziiert. Eine dadurch bedingte Veränderung des aktiven Zentrums des Enzyms, führt zu einer verminderten Affinität gegenüber Pyrimethamin. Essentiell ist der Austausch von Serin zu Asparagin an Codon 108. Weitere Mutationen, welche die Wirkung noch verstärken, sind an Codon 51 (Asn→Ile), Codon 59 (Cys→Arg) und Codon 164 (Ile→Leu). Eine Punktmutation an Codon 16 (Ala→Val) in Verbindung mit einem Aminosäurenwechsel von Serin zu Threonin an Codon 108, induziert dagegen eine Resistenz gegen Cycloguanil (26, 57).

Der Polymorphismus des *Dhps* Gens ist verantwortlich für die Ausbildung von Resistenzen gegen Sulfadoxin. Folgende Veränderungen wurden beschrieben: Codon 436 (Ser→Ala/Phe), Codon 437 (Ala→Gly), Codon 540 (Glu→Lys), Codon 581 (Ala→Gly) und Codon 613 (Ala→Thr/Ser). Kombinationen verschiedener Mutationen begünstigen die Ausbildung eines resistenten Phänotyps.

Verschiedene Untersuchungen zeigten einen Zusammenhang zwischen Atovaquon/Proguanil Resistenz und Punktmutationen im Cytochrom-bc₁ Gen, dem Angriffsort des Atovaquon. Viele der aufgedeckten Mutationen befinden sich nahe des aktiven Zentrums des Enzyms und vermindern somit die

Substratbindungsfähigkeit (38). Eine besondere Bedeutung kommt der Mutation in Codon 268 zu, hier wurden Aminosäurewechsel von Thyrosin zu Serin bzw. Cystein beschrieben (19, 63, 69). Syafruddin *et al.* beschrieb in einer Studie mit *Plasmodium berghei* drei weitere Mutationen, an Position 133 oder 144 zusätzlich zu einer Mutation an Position 284. Durch diese Mutationskombinationen kam es zu einem erhöhten Resistenzniveau (71).

Anzeichen für eine verminderte Sensitivität gegen Artemisinin und seine Derivate wurden schon vor längerem beschrieben (89), aber nun gibt es in Französisch-Guyana Hinweise auf *in-vitro* Resistenzen. Diese werden mit einer Mutation in Codon 769 der PfATPase, eine Kalzium abhängige ATPase im sarko/endoplasmatischen Retikulum (SERCA), in Verbindung gebracht (35).

1.3.4 Nachweismethode

Der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) bildet die Grundlage für den Nachweis verschiedener Allele mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR). Eine Restriktionslänge ist ein DNA-Fragment, das entsteht, wenn der DNA-Doppelstrang mit einem spezifischen Enzym - der Restriktionsendonuklease - zerschnitten wird. Es entsteht ein charakteristisches Fragment-Muster. Aufgrund vorhandener Mutationen entstehen oder verschwinden Erkennungssequenzen für diese Enzyme, das RFLP-Muster verändert sich. Mit Hilfe der Gelelektrophorese können diese Banden sichtbar gemacht werden.

2. Problemstellung und Zielsetzung

Ein Grund für die seit einigen Jahren zunehmende Morbidität und Mortalität durch Malaria ist die steigende Zahl der resistenten Falciparum-Stämme (33, 73). Ein hohes Resistenzniveau zeigt sich vor allem gegen Chloroquin und Sulfadoxin/Pyrimethamin, die in vielen afrikanischen Ländern die Standardtherapeutika darstellen. Dadurch wird es immer schwieriger, eine suffiziente Behandlung vor allem der potentiell tödlichen Malaria tropica in Endemiegebieten durchzuführen. Voraussetzung hierfür ist der genaue Kenntnisstand über die Resistenzlage. Da *in-vivo* Sensitivitätsstudien sehr zeit-, personal- und kostenaufwendig sind, benutzt man heute oftmals molekularbiologische Methoden zur Aufdeckung und Überwachung von Resistenzen. Ein Vorteil dieser Methode besteht in der Möglichkeit, die Blutproben auf Filterpapier, das auch in tropischen Gebieten ungekühlt gelagert werden kann, zu sammeln. Ein Weiterer ist die schnelle und einfache Analyse großer Probenmengen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Aufdeckung der Prävalenz und Verteilung von Punktmutationen bei *Plasmodium falciparum*, die mit Medikamentenresistenz assoziiert sind. Dazu wurden folgende Genabschnitte untersucht:

- ◆ *Pfcr*-Gen (Codon 76)
- ◆ *Pfmdr*-Gen (Codon 86)
- ◆ *Dhfr*-Gen (Codon 16, 51, 59, 108, 164)
- ◆ *Dhps*-Gen (Codon 436, 437, 540, 581, 613)
- ◆ *Cytochrom-bc1*-Gen (Codon 268)

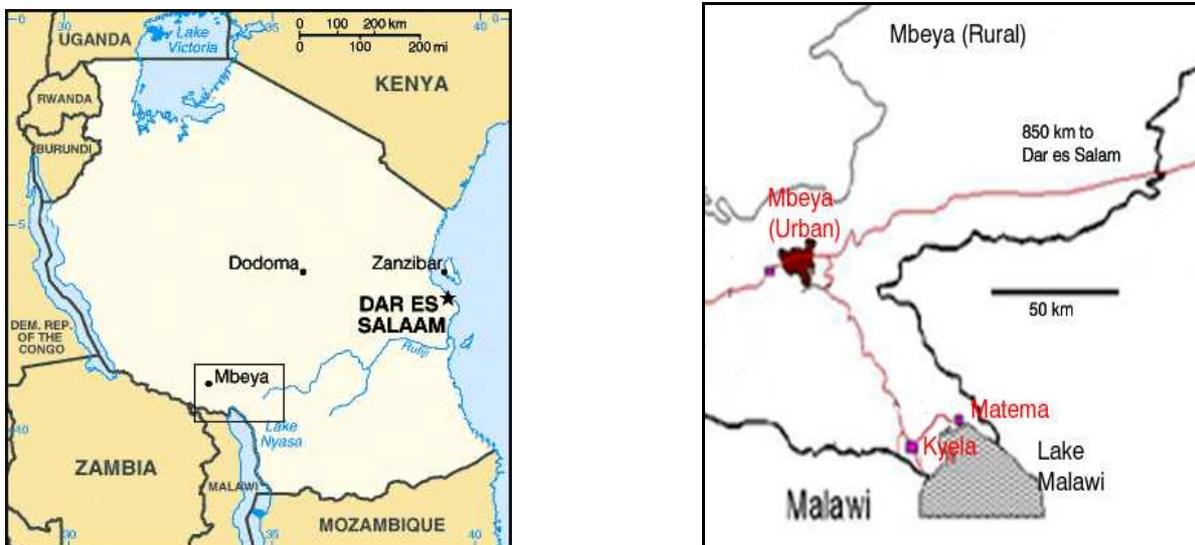
Die Ergebnisse dieser Studie sollen dazu beitragen, sich ein Bild über den aktuellen molekularen Resistenzstatus der mit Chloroquin, Sulfadoxin/Pyrimethamin und Atovaquon assoziierten Mutationen im Studiengebiet machen zu können. Seit Beginn 2006 besteht in Tansania die Therapieempfehlung zu Artemether-Lumefantrin (Riamet®). Diese Artemisinin-Kombinationstherapie (ACT) ist derzeit aber nur beschränkt verfügbar, so dass CQ und SP weiterhin, vor allem im privaten Sektor, verwendet werden.

3. Material und Methoden

3.1 Proben

Das verwendete Untersuchungsmaterial stammte von mit Malaria infizierten Patienten aus Matema und Mbeya. Beide Gebiete befinden sich in der Mbeya Region im südwestlichen Tansania. Matema, ein Dorf im Distrikt Kyela am nördlichen Ufer des Malawi-Sees, wird als endemisches Gebiet mit einer vier bis sechs monatigen Transmissionszeit von Dezember bis Mai eingestuft. Mbeya befindet sich auf einem Hochplateau von 1700 m und ist mit 0,4 Millionen Einwohnern die Hauptstadt dieser Region. Mbeya selbst ist bis auf einige sporadische Fälle malariafrei. Bei den diagnostizierten Malariafällen wird angenommen, dass es sich um importierte Fälle aus der mesoendemischen Umgebung mit einer Transmissionszeit von ein bis drei Monaten von Dezember bis März handelt.

Abbildung 2: Lageplan der Studiengebiete



Gesammelt wurden die Blutproben im Matema Health Care Center von August bis September 2004 und im Juli 2005. Im Mbeya Referral Hospital erfolgte die Sammlung von August bis September 2004 und von März bis April 2005. Die Proben wurden von Patienten entnommen, die mit Verdacht auf Malaria in einem der beiden Studiengebiete vorstellig wurden. Dieser Verdacht bestand, wenn anamnestisch eine oder mehrere der folgenden Beschwerden erhoben werden konnten: Fieber,

Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, gastrointestinale Störungen und Gliederschmerzen. Von jedem dieser Patienten wurde Blut aus der Fingerkuppe entnommen, ein Blutausschrieb und ein dicker Tropfen angefertigt und ca. neun Tropfen auf Filterpapier konserviert. Die Ausschriebe wurden gefärbt und unter dem Lichtmikroskop begutachtet. Von jedem Patienten oder dessen Erziehungsberechtigten, wurde eine Einwilligungserklärung unterzeichnet und ein Fragebogen (s. Anhang) ausgefüllt. Die Patienten mit positivem Malaria-Test wurden entsprechend den dortigen Standards therapiert. Die Proben von 86 Patienten, 69 aus Matema und 17 aus Mbeya, wurden in die Studie aufgenommen.

3.2 Material

3.2.1 Oligonukleotide

Tabelle 1: Primersequenzen

Name	Primersequenz 5' → 3'
Spezies	
rPLU5	CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC
rPLU6	TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG
rFAL1	TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT
rFAL2	ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC
rVIV1	CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC
rVIV2	ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA
<i>Pfprt</i>	
TCRP1	CCG TTA ATA ATA AAT ACA CGC AG
TCRP2	CGG ATG TTA CAA AAC TAT AGT TAC C
TCRD1	TGT GCT CAT GTG TTT AAA CTT
TCRD2	CAA AAC TAT AGT TAC CAA TTT TG
<i>Pfmdr</i>	
MDR1	ATG GGT AAA GAG CAG AAA GA
MDR2	AAC GCA AGT AAT ACA TAA AGT CA
MDR3	TGG TAA CCT CAG TAT CAA AGA A
MDR4	ATA AAC CTA AAA AGG AAC TGG
<i>Dhfr</i>	
M1	TTT ATG ATG GAA CAA GTC TGC
M5	AGT ATA TAC ATC GCT AAC AGA
M3	TTT ATG ATG GAA CAA GAC TGG GAC GTT
F/	AAA TTC TTG ATA AAC AAC GGA ACC TTT TA

M4 TTA ATT TCC CAA GTA AAA CTA TTA GAG CTT C
 F GAA ATG TAA TTC CCT AGA TAT GGA ATA ATT

Dhps

R2 AAC CTA AAC GTG CTG TTC AA
 R/ AAT TGT GTG ATT TGT CCA CAA
 K TGC TAG TGT TAT AGA TAT AGG ATG AGC ATC
 K/ CTA TAA CGA GGT ATT GCA TTT AAT GCA AGA A
 L ATA GGA TAC TAT TTG ATA TTG GAC CAG GGA TTC
 L/ TAT TAC AAC ATT TTG ATC ATT CGC GCA ACC GG

Cytb

Cytb1 CTC TAT TAA TTT AGT TAA AGC ACA
 Cytb2 ACA GAA TAA TCT CTA GCA CC
 Cytb3 AGC AGT AAT TTG GAT ATG TGG AGG
 Cytb5 GGT TTA CTT GGA ACA GTT TTT AAC AAT G
 Cytb6 TGA ATG GTA CTT TCT ACC AGT T
 Cytb7 ACC TGA ATG GTA CTT TCT ACA ATA T

3.2.2 Enzyme

Folgende Enzyme wurden für die Studie verwendet:

Tabelle 2: Restriktionsenzyme mit Temperaturoptimum, Puffer und Inkubationszeit

Enzym	Inkubationstemperatur	Puffer	Inkubationszeit in h
Afl III	37°C	NEB 3/ BSA	6 - 12
Alu I	37°C	NEB 2	6 - 12
AlwN I	37°C	NEB4	> 12
Apo I	50°C	NEB 3/ BSA	6 - 12
Ava II	37°C	NEB 4	6 - 12
BsaWI	60°C	NEB 2/ BSA	6 - 12
Bsr I	65°C	NEB 3	6 - 12
BstN I	60°C	NEB 2/ BSA	6 - 12
BstU I	60°C	NEB 2	6 - 12
Dra I	37°C	NEB 4	> 12
Fok I	37°C	NEB 4	> 12
Mnl I	37°C	NEB 2/ BSA	6 - 12
MspA I	37°C	NEB 4/ BSA	> 12
Mwo I	60°C	NEB <i>Mwo I</i>	6 - 12
Nla III	37°C	NEB 2/ BSA	> 12
Nsi I	37°C	NEB 3 <i>Nsi I</i>	> 12
Ssp I	37°C	NEB <i>Ssp I</i>	> 12
Tsp509 I	65°C	NEB 1	6 - 12
Xmn I	37°C	NEB 2/ BSA	6 - 12

3.2.3 Chemikalien

Folgende Chemikalien kamen im Rahmen der Arbeit zum Einsatz:

Bezeichnung	Firma
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
DNA Leiter (50bp, 100bp)	Invitrogen Ltd. Paisley, Scotland, UK
dNTPs (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	Q-BIOgene, Heidelberg
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Enzyme (Restriktionseendonukleasen)	New England Biolabs NEB, Schwalbach
Ficoll 400	Sigma, Deisenhofen
InstaGene™ Matrix	Bio-Rad, München
Meliseptol	B. Braun, Melsungen
MetaPhor® agarose	Cambrex, Rockland, ME, USA
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
Oligonukleotide (Primer)	Thermo Electron, Erlangen
Orange G	Sigma, St. Luis, USA
SeaKem® LE agarose	Cambrex, Rockland, ME, USA
Sucrose	Sigma, St. Luis, USA
<i>Taq</i> Polymerase	Q-BIOgene, Heidelberg
Tris	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
10x Puffer TAE Ultra pure	Invitrogen Ltd. Paisley,Scotland, UK

Lösungen:

Blau-Puffer:

Ficoll	1,50g
10% SDS-Lösung	1,00ml
0,5 M EDTA	2,00ml
Bromphenolblau	2,60mg
TE-Puffer	2,90ml

Orange-Puffer:

Sucrose	4,00g
Orange G	0,035g
AquaDest	ad 10ml

3.2.4 Geräte und Software

Die folgenden Geräte wurden im Laufe der Untersuchungen verwendet:

Geräte	Firma
Heiz- und ThermoMixer	HLC, Bovenden
<u>Gelelektrophoresekammern:</u>	
PEQLab Easy Coast	PQ-Lab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PEQLab	PQ-Lab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Laminar Flow	Keßler + Luch GmbH, Giessen
Mikroskop	Zeiss, Jena
<u>PCR-Maschinen:</u>	
Uno II	Biometra, Göttingen
TGradient	Biometra, Göttingen
<u>Vortexer:</u>	
Vortexer MS1 Minishaker	IKA-Werke, Staufen
Vortex Mixer K	NeoLab, Heidelberg
Vortex-Genie™	Scientific Industries, Bohemia, USA
Reamix	Assistent, Sondheim
<u>Waage:</u>	
Kern 440-33	Kern & Sohn, Balingen

Zentrifugen:

Biofuge pico

Heraeus, Hanau

Tischzentrifuge EBA 12

Hettich, Tuttlingen

Software:

Access 2000

Microsoft

Grabit®

UVP Products Ltd., Cambridge, UK

3.2.5 Sonstiges

Filterpapier 3MM Chr

Whatman, Maidstone, England

Lanzettenspitzen

Pfm, Köln

Objektträger

Menzel, Braunschweig

Pipettenspitzen

Gilson, Middleton, USA

Pipettenspitzen mit Filter

G. Kisker, Steinfurt

Tubes

Biozym, Oldendorf

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 DNA-Extraktion

Als Ausgangsmaterial für die DNA-Extraktion nach der Aufkochmethode von Kain dienten Blutproben (5-10 μ l) auf Whatman Filterpapier. Diese wurden nach der Abnahme zuerst ausreichend getrocknet und dann einzeln in Plastiktüten verpackt. Dies hatte den Vorteil, Kreuzkontaminationen zu vermeiden und die Proben auch für längere Transporte haltbar zu machen. Zur Extraktion wurde von jeder Probe ein Tropfen Blut ausgeschnitten, auch hier wurde darauf geachtet, Kontaminationen zu vermeiden und nach jeder Probe wurde die Schere mit Meliseptol desinfiziert. Die Blutprobe wurde in ein 1,5 μ l Eppendorf-Reaktionsgefäß gebracht, dazu gab man 200 μ l Matrixsuspension (InstaGene™ Matrix) zur DNA-Isolierung. Diese Mischung wurde für 30 Sekunden gevortexet und für 15 Minuten bei 100°C in dem Heiz- und Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde für 4 Minuten bei 12.000 U/min zentrifugiert und der Überstand (ca. 100 μ l) in ein neues Eppendorf-Gefäß abpipettiert. Um Reste der Matrix zu beseitigen, wurde erneut 4 Minuten bei 12.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand (70-90 μ l) enthielt die extrahierte DNA und wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (engl. **P**olymerase **c**hain **r**eaction) wird seit der Entwicklung 1983 durch Kary Mullis als sensitive und relativ einfache Methode zur Vervielfältigung von spezifischen DNA-Sequenzen verwendet. Sie erlaubt die millionenfache selektive Amplifizierung einer ausgesuchten DNA-Sequenz *in-vitro*. Das Prinzip lässt sich in drei Schritte gliedern und wie folgt beschreiben:

Erster Schritt ist die Denaturierung, das Aufschmelzen des nativen DNA-Doppelstrangs in zwei Einzelstränge. Dies erfolgt bei ca. 94°C. Als nächstes folgt das Annealing, die Anlagerung spezifischer Oligonukleotidprimer bei ca. 50°C. Die synthetischen Oligonukleotide hybridisieren komplementär zu den bekannten Enden des gesuchten Genabschnittes. Diese lagern sich aufgrund ihrer geringeren Größe und dadurch besseren Beweglichkeit deutlich schneller an den einzelnen DNA-Strang als die native DNA. Die Oligonukleotid-Verlängerung, Elongation, ist letzter

Schritt dieser Methode. Hier wird unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase, *Taq*-Polymerase, und in Anwesenheit einzelner Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs) der DNA-Einzelstrang vom 5`- zum 3`-Ende vervollständigt. Als Startmolekül dient der in Schritt zwei entstandene Primerkomplex. Ein grosser Vorteil der thermostabilen DNA-Polymerase liegt darin, dass man alle Komponenten in einem Reaktionsansatz zusammenfassen kann. Durch die zyklische Wiederholung dieser drei Schritte erreicht man eine exponentielle Vermehrung der spezifischen DNA-Abschnitte. So erhält man nach 30 Zyklen bereits 10^9 Kopien der gewünschten DNA-Sequenz. Um die Spezifität der Reaktion zu steigern wurde eine „nested-PCR“ verwendet. Die Besonderheit liegt in zwei aufeinanderfolgenden Amplifikationsschritten. Bei dem Ersten wird ein Oligonukleotidenpaar außerhalb des spezifischen PCR-Fragments ausgesucht, dieses größere Amplicon dient als Vorlage der zweiten Vervielfältigung mit internen Oligonukleotiden. Somit lässt sich das Risiko von unerwünschten Nebenprodukten minimieren.

3.3.3 Restriktionsenzyme

Zu den gewonnenen PCR-Produkten wurden spezifische bakterielle Restriktionsendonukleasen gegeben. Diese Enzyme spalten die vorliegenden doppelsträngigen DNA-Fragmente an bestimmten definierten Gen-Sequenzen. Auf diese Weise ist es möglich, Punktmutationen, die an dieser Schnittstelle liegen, nachzuweisen. Zum Einen werden durch diesen Basenaustausch vorhandene Schnittstellen zerstört, zum Anderen können auch neue gebildet werden. So dass je nach Mutation, charakteristische Restriktionsfragmente (RFLPs) entstehen. Bei der Untersuchung der verschiedenen Genloci wurden spezifische Enzyme je nach der zu erkennenden Sequenz verwendet. Jede dieser Endonukleasen arbeitet nur unter bestimmten Inkubationsbedingungen optimal. Um das bestmögliche Arbeitsmilieu für jede Endonuklease zu schaffen, wurde das PCR-Produkt-Enzym-Gemisch bei unterschiedlichen Temperaturen von einigen Stunden bis über Nacht inkubiert. Optional wurde bei einigen Enzymen zur Entfaltung ihrer Aktivität zusätzlich BSA, Rinderserum Albumin, zugegeben (siehe Tabelle 2). Durch die Gelelektrophorese kann das Ergebnis des Enzymverdaus sichtbar gemacht werden.

3.3.4 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Trennung und Identifizierung von DNA-Bruchstücken ist die Agarosegel-Elektrophorese eine effektive Technik. Das Prinzip basiert auf dem Transport geladener Teilchen durch elektrischen Strom im elektrischen Feld. Durch die polyanionischen Ladungen der Phosphatgruppen an den Nukleinsäuren wandern die DNA-Fragmente, abhängig von ihrer Größe und ihrer Ladung, auf die positive Elektrode zu. Agarosegel, das aus Seetang gewonnen wird, diente als Trägersubstanz. Es wurden verschiedene Geltypen verwendet. Die PCR-Produkte benötigten ein 2%-iges Gel aus SeaKem[®] LE agarose. Bei der Auswertung des Enzymverdau kam hingegen eine 3%-ige MetaPhor[®] agarose zum Einsatz. Zur Herstellung der Gele wurde die benötigte Menge an Pulver abgewogen, auf 100ml bzw. 50ml mit TAE Puffer (Tris Acetat + EDTA) aufgefüllt und in der Mikrowelle so lange erhitzt, bis das Pulver vollständig gelöst war. Um die DNA-Banden später unter UV-Licht im GDS 8000[®] Ultraviolett Transilluminator sehen zu können, wurde Ethidiumbromid (2-3 μ l/100ml) zugegeben. Diese organische Verbindung interkaliert zwischen die Basen der DNA und erzielt so bei Anregung mit ultraviolettem Licht eine Fluoreszenz. Auf diese Weise leuchten im Agarosegel die Stellen, an denen sich Nukleinsäure befindet, hell auf, während Stellen ohne Nukleinsäure dunkel erscheinen. Nach Erkalten des Gemisches goß man mit Hilfe eines Kammes und eines Gelschlittens ein Gel mit Taschen. Sobald das Gel vollständig erstarrt und mit TAE-Puffer bedeckt in einer Elektrophoresekammer war, wurden die Proben (8-10 μ l), mit Orange-Puffer gemischt, um die Dichte der Lösung zu erhöhen, in die Kammern pipettiert. Zusätzlich liefen in jedem Gel zur Längenmarkierung mehrere DNA-Leiter (100 bzw. 50bp) mit, welche zuvor mit Bromphenolblau angefärbt wurden. Je nach Gelart erfolgte die Elektrophorese bei 50-100V für 60-240 Minuten. Mit der Verarbeitungssoftware Grabit[®] wurde das durch eine an den PC angeschlossene Kamera fotografierte Bild abgespeichert.

3.3.5 Positiv- und Negativkontrollen

Um die Reproduzierbarkeit der Untersuchungen zu sichern, liefern in jedem Ansatz mindestens eine Positiv- und Negativkontrolle mit. Genauso wie die Proben der Patienten, wurden auch die Kontrollen extrahiert und gelagert. Als Positivkontrollen wurden definierte *Plasmodium falciparum*-Stämme verwendet.

Tabelle 3: *P. falciparum* Kontrollstämme

PCR	Positivkontrolle	
	Mutation	Wildtyp
<i>Pfcr</i>	K1	3D7
<i>Pfmdr</i>	K1,7G8	
<i>Dhfr</i>		
Codon 16:	FCR3	K1
Codon 51:	7G8	K1
Codon 59:	K1	FCR3
Codon 108:	K1 (Mut.1) FCR3 (Mut.2)	3D7
Codon 164:		K1,3D7
<i>Dhps</i>		
Codon 436:	T9/96	K1
Codon 437:	K1	FCR3
Codon 540:	TN 420	K1,3D7
Codon 581 :	K1	FCR3,3D7
Codon 613 :	TN 296	K1
<i>Cytb</i>		
Codon 268:	TN352 (Mut.1) NGATV01 (Mut.2)	K1

3.4 Reaktionsansatz zum Nachweis der *Plasmodium* Spezies

Mit der hier verwendeten „nested PCR“ wurden alle Proben auf eine *Plasmodium falciparum*- bzw. *vivax*-Infektion getestet. *P. vivax* ist nach *P. falciparum* der zweithäufigste humanpathogene Malariaerreger dieser Region. Nest 2 hat den gleichen Reaktionsansatz wie Nest 1.

Nest 1		
Reagenz	Vol. pro sample	Endkonz. pro tube
H ₂ O*	2,92µl	
Primer Plu5+6**	2,00µl	5µM
PCRPuffer+MgCl	2,00µl	10x
dNTP's	10,00µl	125µM
Taq	0,08µl	0,4U

* Nest2: H₂O 3,92µl

** Primer Spezies:

Plasmodium falciparum: rFAL1 + rFAL2

Plasmodium vivax: rVIV1 + rVIV2

Reaktionsbedingungen		
Schritt 1	95°C	5 min
Schritt 2	58°C	2 min
Schritt 3	72°C	2 min
Schritt 4	94°C	1 min
→ Schritte 2 bis 4: 24 mal wiederholen		
Schritt 5	58°C	2 min
Schritt 6	72°C	5 min
Schritt 7	20°C	10 min

Nest2: Schritt 2 bis 4: 29 mal wiederholen

Nest 1: 17µl Master Mix mit 1 Tropfen Öl überschichten→3µl DNA-Template

Nest 2: 18µl Master Mix mit 1 Tropfen Öl überschichten→2µl PCR-Produkt aus Nest1

3.5 Reaktionsansätze für PCR und RFLP-Methoden zum Nachweis von *in vitro* Medikamentenresistenz bei *Plasmodium falciparum*

Wie bereits beschrieben, wurde für den Nachweis von Medikamentenresistenzen eine Kombination von „nested PCR“ mit anschließendem Enzymverdau eingesetzt. Die Inkubationstemperaturen und -zeiten der jeweiligen Restriktionsenzyme können in Tabelle 2 „Restriktionsenzyme“ nachgesehen werden.

3.5.1 *Pfcr* Gen

Eine Punktmutation in Codon 76 des *Pfcr* (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter) Gens von ACA (Thr) nach AAA (Lys) gilt als eine der Hauptursachen für die Chloroquin Resistenz von *Plasmodium falciparum*.

Nest 1		
Reagenz	Vol. pro sample	Endkonz. pro tube
H ₂ O	24,25µl	
Primer TRCP1+2	8,00µl	1µM
PCR Puffer+MgCl	5,00µl	10x
dNTP's	10,00µl	200mM
Taq	0,25µl	2,5U

47,5µl Master Mix mit 1 Tropfen Öl
überschichten → 2,5µl DNA-Template

Nest 2		
Reagenz	Vol. pro sample	Endkonz. pro tube
H ₂ O	24,25µl	
Primer TRCD1+2	8,00µl	1µM
PCR Puffer+MgCl	5,00µl	10x
dNTP's	10,00µl	200mM
Taq	0,25µl	2,5U

47,5µl Master Mix mit 1 Tropfen Öl über-
schichten → 2,5µl PCR-Produkt aus
Nest 1

Reaktionsbedingungen Nest 1		
Schritt 1	94°C	3 min
Schritt 2	94°C	30 sec
Schritt 3	56°C	30 sec
Schritt 4	60°C	1 min
→ Schritte 2 bis 4: 44 mal wiederholen		
Schritt 5	60°C	3 min
Schritt 6	20°C	10 min

Reaktionsbedingungen Nest 2		
Schritt 1	92°C	2,5 min
Schritt 2	92°C	30 sec
Schritt 3	48°C	30 sec
Schritt 4	65°C	30 sec
→ Schritte 2 bis 4: 29 mal wiederholen		
Schritt 5	65°C	3 min
Schritt 6	20°C	10 min

Restriktions-Enzym-Verdau:

Ansatz	
<i>ApoI</i>	0,5µl
NE-Puffer 3	1,0µl
AquaDest	1,4µl
BSA	0,1µl

Je 3µl pro Ansatz plus 7µl PCR-Endprodukt

3.5.2 *Pfmdr* Gen

Zur Detektion der Mutation N86Y des *Pfmdr* (*Plasmodium falciparum* multi drug resistance) Gen wurde ebenso eine „verschachtelte“ PCR angewendet. Der Verdau erfolgte mit dem Enzym *AfIII*, bei positivem Verdau und Vorliegen der Mutation erhielt man zwei Banden (210bp und 290bp). Mit dem Enzym *ApoI* hatte man die Möglichkeit eines Kontrollverdau, hier wurde der Wildtyp, nicht die Mutation, geschnitten.

Nest 1		
Reagenz	Vol. pro sample	Endkonz. pro tube
H ₂ O	12,38µl	
Primer MDR1+2	5,00µl	1µM
PCR Puffer+MgCl	2,50µl	10x
dNTP's	2,00µl	200mM
Taq	0,12µl	2,5U

Nest 1: 22µl Master Mix mit 1 Tropfen Öl überschichten → 3µl DNA-Template

Nest 2		
Reagenz	Vol. pro sample	Endkonz. pro tube
H ₂ O	12,38µl	
Primer MDR3+4	5,00µl	1µM
PCR Puffer+MgCl	2,50µl	10x
dNTP's	2,00µl	200mM
Taq	0,12µl	2,5U

Nest 2: 22µl Master Mix mit 1 Tropfen Öl überschichten → 3µl PCR-Produkt aus Nest 1

Reaktionsbedingungen Nest 1		
Schritt 1	95°C	3 min
Schritt 2	92°C	30 sec
Schritt 3	48°C	45 sec
Schritt 4	60°C	1 min
→ Schritte 2 bis 4: 44 mal wiederholen		
Schritt 5	65°C	5 min
Schritt 6	20°C	10 min

Reaktionsbedingungen Nest 2		
Schritt 1	95°C	3 min
Schritt 2	92°C	30 sec
Schritt 3	48°C	30 sec
Schritt 4	65°C	45 sec
→ Schritte 2 bis 4: 29 mal wiederholen		
Schritt 5	65°C	5 min
Schritt 6	20°C	10 min

Restriktions-Enzym-Verdau:

Ansatz	
<i>ApoI</i> / <i>AfIII</i>	0,5µl
NE-Puffer 3	1,0µl
AquaDest	1,4µl
BSA	0,1µl

Je 3µl pro Ansatz plus 7µl PCR-Endprodukt

3.5.3. *Dhfr* Gen

Bei dieser PCR war es notwendig, das Produkt aus Nest 1 aufzuteilen. Die Reaktionsansätze und -bedingungen für beide Primerpaare (M3+F/ und M4+F) waren identisch. Um die spezifischen Mutationen des *Dhfr* Gens aufzudecken, wurde anschließend der Enzymverdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen durchgeführt.

Tabelle 4: Aminosäuren und Gensequenzen des *Dhfr* Gens

Codon	16	51	59	108	164
Wildtyp	Ala (GCA)	Asn (AAT)	Cys (TGT)	Ser (AGC)	Ile (ATA)
Mutation	Val (GTA)	Ile (ATT)	Arg (CGT)	Asn/Thr (AAC/ACC)	Leu (TTA)

Nest 1		
Reagenz	Vol. pro sample	Endkonz. pro tube
H ₂ O	33,30µl	
Primer M1+5	5,00µl	0,25µM
PCR Puffer+MgCl	5,00µl	10x
dNTP's	4,00µl	200mM
Tween 20	0,50µl	1%
Taq	0,20µl	

Nest 1: 48µl Master Mix mit 1 Tropfen Öl überschichten → 2µl DNA-Template

Nest 2		
Reagenz	Vol. pro sample	Endkonz. pro tube
H ₂ O	51,28µl	
Primer M3+F/ M4+F	8,00µl	0,25µM
PCR Puffer+MgCl	8,00µl	10x
dNTP's	6,40µl	200mM
DMSO	4,00µl	
Taq	0,32µl	

Nest 2: 78µl Master Mix mit 1 Tropfen Öl überschichten → 2µl PCR-Produkt aus Nest 1

Reaktionsbedingungen Nest 1		
Schritt 1	94°C	3 min
Schritt 2	94°C	1 min
Schritt 3	50°C	2 min
Schritt 4	72°C	2 min
→ Schritte 2 bis 4: 39 mal wiederholen		
Schritt 5	72°C	10 min
Schritt 6	20°C	10 min

Reaktionsbedingungen Nest 2		
Schritt 1	94°C	2 min
Schritt 2	94°C	1 min
Schritt 3	45°C	2 min
Schritt 4	72°C	2 min
→ Schritte 2 bis 4: 4 mal wiederholen		
Schritt 5	94°C	1 min
Schritt 6	45°C	1 min
Schritt 7	71°C	1 min
→ Schritte 5 bis 7 34 mal wiederholen		
Schritt 8	72°C	10 min
Schritt 9	20°C	10 min

Restriktions-Enzym-Verdau:

Ansatz	
Enzym	1,0µl
Puffer*	1,0µl
AquaDest	3,9µl
BSA**	0,1µl

* Puffer-Nr. je nach Enzym

**Zugabe von BSA abhängig vom jeweiligen Enzym

Ist kein BSA nötig, wird insgesamt 4,0µl AquaDest zugefügt

Je 6µl pro Ansatz plus 4µl PCR-Endprodukt

Tabelle 5: Restriktionsenzyme mit charakteristischen Bandenlängen

M3+F/

Codon	Enzym	Wildtyp (bp)	Mutation (bp)
16	<i>NlaIII</i>	93,54	147
51	<i>Tsp509I</i>	62,153	215
108	<i>AluI</i>	327,190	332,190
108	<i>BsrI (Mut1)</i>	499	522
108	<i>BstNI (Mut2)</i>	521	332,190
164	<i>DraI</i>	170	27,143

M4+F

Codon	Enzym.	Wildtyp (bp)	Mutation (bp)
59	<i>XmnI</i>	190	28,162
108	<i>AluI (Wt)</i>	119,190	309
108	<i>BsrI (Mut1)</i>	326	140,186
108	<i>BstNI (Mut2)</i>	326	140,186

3.5.4 *Dhps* Gen

Die Reaktionsansätze und Amplifikationsbedingungen sind identisch zu der Arbeitsanleitung des *Dhfr* Gens. Verwendete Primerpaare waren für Nest 1 R2+R/ und für Nest 2 K+K/ bzw. L+L/. Der Ansatz des Restriktions-Enzym-Verdau ist ebenfalls identisch zu der Anleitung des *Dhfr* Gens.

Tabelle 6: Aminosäuren und Gensequenzen des *Dhps* Gens

Codon	436	437	540	581	613
Wildtyp	Ser (TCT)	Ala (GCT)	Lys (AAA)	Ala (GCG)	Ala (GCC)
Mutation	Ala (GCT)	Gly (GGT)	Glu (CAA)	Gly (GGG)	Thr/Ser (ACC/TCC)

Tabelle 7: Restriktionsenzyme mit charakteristischen Bandenlängen:

K+K/

Codon	Enzym	Wildtyp (bp)	Mutation (bp)
436	<i>MnII</i>	283,39	324
436	<i>MspAI</i>	438	410
437	<i>Avall</i>	438	36,402
437	<i>Mwol</i>	31,387	420
540	<i>FokI</i>	404	84,320

L+L/

Codon	Enzym.	Wildtyp (bp)	Mutation (bp)
581	<i>BstUI</i>	31,130	161
581	<i>BsII</i>	161	31,130
613	<i>Mwol</i>	24,137	161
613	<i>BsaWI</i>	161	31,130

3.5.5 *Cytochrom-b* Gen

Zur Differenzierung der Mutation auf Codon 268 waren drei verschiedene Endonukleasen für den Enzymverdau nötig. Tabelle 8 zeigt die Restriktionsenzyme, Nukleotidsequenzen und charakteristischen Bandenlängen des Wildtyps und der beiden Mutationen.

Nest 1		
Reagenz	Vol. pro sample	Endkonz. pro tube
H ₂ O	9,90µl	
Primer Cytb1+2	5,00µl	0,125µM
PCR Puffer+MgCl	2,00µl	1x
dNTP's	2,00µl	0,2mM
Taq	0,10µl	0,025U

Nest 1: 19µl Master Mix mit 1 Tropfen Öl
überschichten → 1µl DNA-Template

Nest 2		
Reagenz	Vol. pro sample	Endkonz. pro tube
H ₂ O	9,9µl	
Primer Cytb3+5 Cytb2+6 Cytb2+7	5,00µl	0,5µM
PCR Puffer+MgCl	2,00µl	1x
dNTP's	2,00µl	0,2mM
Taq	0,10µl	0,025U

Nest 2: 22µl Master Mix mit 1 Tropfen Öl
überschichten → 3µl PCR Produkt
aus Nest 1

Reaktionsbedingungen Nest 1		
Schritt 1	94°C	5 min
Schritt 2	94°C	50 sec
Schritt 3	50°C	50 sec
Schritt 4	70°C	60 sec
→ Schritte 2 bis 4: 34 mal wiederholen		
Schritt 5	70°C	5 min
Schritt 6	20°C	10 min

Reaktionsbedingungen Nest 2 Primer Cytb 3+5 und 2+6		
Schritt 1	94°C	5 min
Schritt 2	95°C	30sec
Schritt 3	55°C	30 sec
Schritt 4	72°C	30 sec
→ Schritte 2 bis 4: 30 mal wiederholen		
Schritt 5	72°C	5 min

Bei Cytb 2+7 erfolgt Schritt 3 bei 45°C;
die Schritte 2 bis 4 wurden 35-mal wiederholt

Restriktions-Enzym-Verdau:

Ansatz	
<i>Nsil/AlwNI</i>	0,1µl
Puffer: <i>Nsil</i> spez./ Nr.4	2,2µl
AquaDest	14,7µl

Ansatz	
<i>Sspl</i>	0,2µl
Puffer <i>Sspl</i>	2,2µl
AquaDest	14,6µl

Je 17µl pro Ansatz plus 5µl PCR-Endprodukt.

Tabelle 8: Bandenlängen:

	AS	<i>Nsil</i>	<i>AlwNI</i>	<i>Sspl</i>
Wildtyp (TAT)	Tyr	359	171	150
Mutation 1 (TCT)	Ser	384	147	150
Mutation 2 (AAT)	Asn	359	171	174

4. Ergebnisse

4.1 Nachweis der Plasmodium - Spezies

Mit der Spezies PCR wurden die Proben, wie unter 3.4 beschrieben, auf die zwei häufigsten Malaria Erreger dieser Region, *P. falciparum* und *P. vivax*, getestet. Bei positiver PCR für *P. falciparum* erhielt man eine Bande bei 205 bp, bei positiver PCR für *P. vivax* eine Bande bei 120 bp.

Abbildung 3: Produkte der Spezies PCR



1: Negativkontrolle

2,3: Patientenproben

4: Positivkontrolle (*P.falciparum*)

5: Positivkontrolle (*P. vivax*)

6: DNA-Leiter (100bp)

Bei 86 Patienten konnte eine *P. falciparum*-Infektion nachgewiesen werden. 17 Proben kamen aus Mbeya und 69 Proben aus Matema. Keine Probe wurde positiv auf *P. vivax* getestet. Die 86 Proben mit einer Falciparum-Infektion wurden in die Studienkohorte aufgenommen.

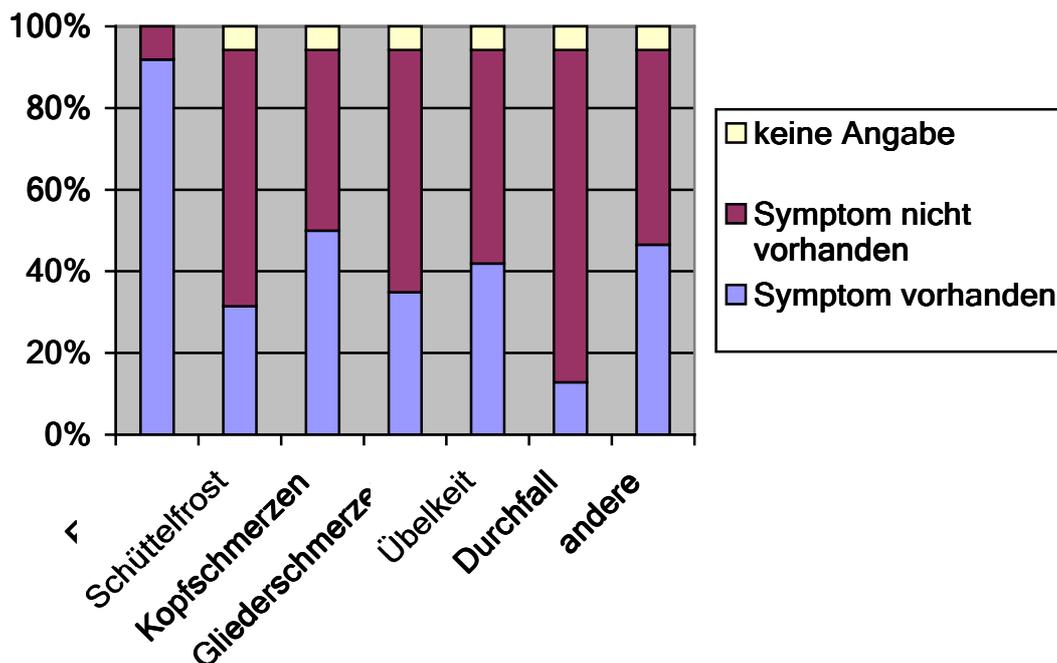
4.2 Patientenkollektiv

Von allen 86 Proben waren die Blutproben auf Whatmann™ 3MM Filterpapier vorhanden. Die anamnestischen Daten wurden mit einem standardisierten Fragebogen ermittelt, siehe Punkt 8. Angaben zu diesen Daten sind folgender Tabelle und Abbildung zu entnehmen:

Tabelle 9: Patientendaten

	Insgesamt		Mbeya		Matema	
	N	%	N	%	N	%
Isolate	86	100	17	19,8	69	80,2
Geschlecht						
Männlich	41	47,7	8	47,1	30	43,5
Weiblich	45	52,3	9	52,9	39	56,5
Alter						
> 5 Jahre	21	24,4	0	0	21	30,4
Median	21 Jahre		28 Jahre		19 Jahre	
Min	8 Monate		6 Jahre		8 Monate	
Max	73 Jahre		73 Jahre		55 Jahre	
Herkunft						
städtisch	10	11,6	10	58,8	0	0
ländlich	76	88,4	7	41,2	69	100

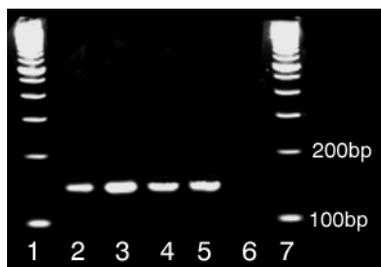
Abbildung 4: Häufigkeitsverteilung von Symptomen der beiden Studienggebiete (Mehrfachnennung möglich)



4.3 Polymorphismus des *Pfcr* Gens

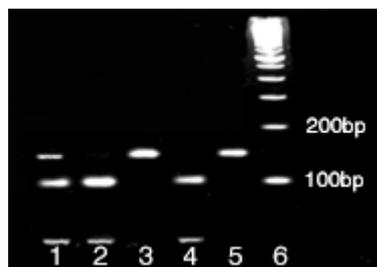
Die Amplifizierung des *Pfcr* Gens ergab eine Bande von 145 bp. Alle 86 Proben zeigten diese Bande. Durch den Enzymverdau mit *ApoI* und anschließender Gelelektrophorese wurden bei Vorliegen des Wildtyps charakteristische Banden von 111 bp und 34 bp sichtbar. Bei einer Mutation, Aminosäurewechsel von Threonin zu Lysin in Codon 76, bleibt das PCR-Produkt ungeschnitten. Diese 145 bp Bande wiesen 10 Proben aus Mbeya und 27 Proben aus Matema auf, zusätzlich zeigten 6 Isolate einen Mischtyp, bestehend aus einem mutierten Stamm und einem Wildtyp. In 7 Proben aus Mbeya und 36 aus Matema war die Wildtypkonstellation nachzuweisen.

Abbildung 5: PCR und Enzymverdau von *Pfcr* Codon 76



PCR:

- 1,7: DNA-Leiter (100bp)
- 2-4: Patientenproben
- 5: Positivkontrolle
- 6: Negativkontrolle



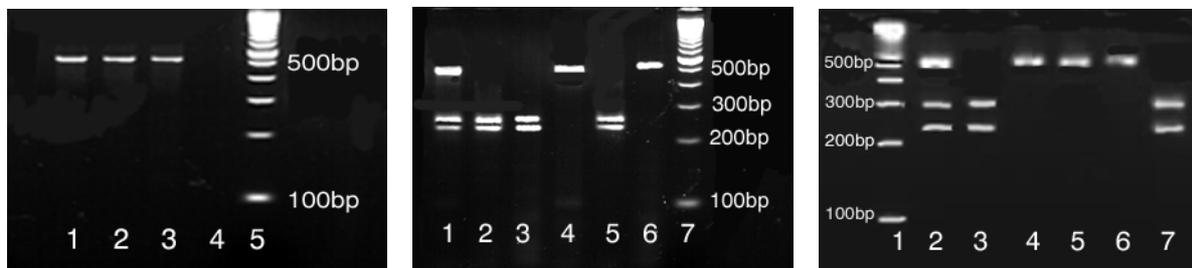
Enzymverdau:

- 1: Patientenprobe Mischinfektion
- 2: Patientenprobe Wildtyp (Wt)
- 3: Patientenprobe Mutation (Mt)
- 4: Positivkontrolle (Wt)
- 5: Positivkontrolle (Mt)
- 6: DNA-Leiter (100bp)

4.4 Polymorphismus des *Pfmdr* Gens

Das Produkt der nested PCR war eine 500bp lange Bande. Diese zeigten 85 Proben. Um die Mutation von Asparagin zu Tyrosin auf Codon 86 aufzudecken, wurden zwei Restriktionsenzyme verwendet. *Afl III* schneidet nur die Mutation, es ergeben sich Bandenlängen von 290 bp und 210 bp. *Apo I* zeigt für den Wildtyp ein charakteristisches Muster mit 250 bp, 214 bp und 36 bp. Dieses Muster wiesen 5 bzw. 36 Proben aus Mbeya bzw. Matema auf. 11 Proben aus Mbeya und 27 Proben aus Matema zeigten eine Mutation und 6 Proben einen Mischtyp, eine davon aus Mbeya.

Abbildung 6: PCR und Enzymverdau von *Pfmdr* Codon 86



PCR:

- 1,2: Patientenproben
- 3: Positivkontrolle
- 4: Negativkontrolle
- 5: DNA-Leiter (100bp)

Enzymverdau mit *Apo I*:

- 1: Patientenprobe (Mix)
- 2,3: Patienteproben (Wt)
- 4: Patientenprobe (Mt)
- 5: Positivkontrolle (Wt)
- 6: Positivkontrolle (Mt)
- 7: DNA-Leiter (100bp)

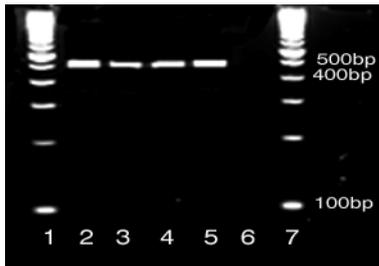
Enzymverdau mit *Afl III*:

- 1: DNA-Leiter (100bp)
- 2: Patientenprobe (Mix)
- 3: Patientenprobe (Mt)
- 4,5: Patientenproben (Wt)
- 6: Positivkontrolle (Wt)
- 7: Positivkontrolle (Mt)

4.5 Polymorphismus der *Dhfr* Gensequenz

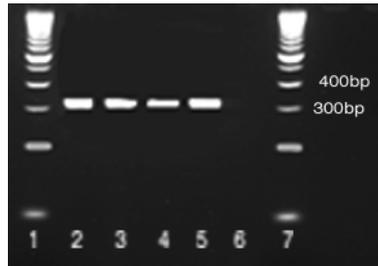
Für das Primerpaar M3 +F/ erhielt man als PCR-Produkt eine Bande bei 522 bp. Die Primer M4 + F zeigten eine Bande bei 326 bp. Der Nachweis dieser Banden war bei allen 86 Proben möglich.

Abbildung 7: PCR Produkte der Primerpaare M3+F/ und M4+F



M3+F/:

- 1,7: DNA-Leiter (100bp)
- 2-4: Patientenproben
- 5: Positivkontrolle
- 6: Negativkontrolle



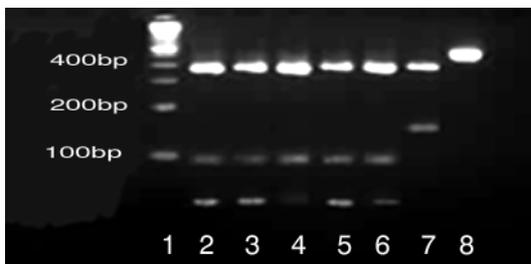
M4+F:

- 1,7: DNA-Leiter (100bp)
- 2-4: Patientenproben
- 5: Positivkontrolle
- 6: Negativkontrolle

4.5.1 Codon 16

Der Verdau mit dem Enzym *Nla III* zeigte bei allen Proben die für den Wildtyp (Ala) charakteristischen Banden bei 54 bp und 93 bp. Keine Probe wies die für die Mutation (Val) typische Bande bei 147 bp auf. Die Kontrollbande von 375 bp war in beiden Fällen zu erkennen.

Abbildung 8: Enzymverdau mit *Nla III*

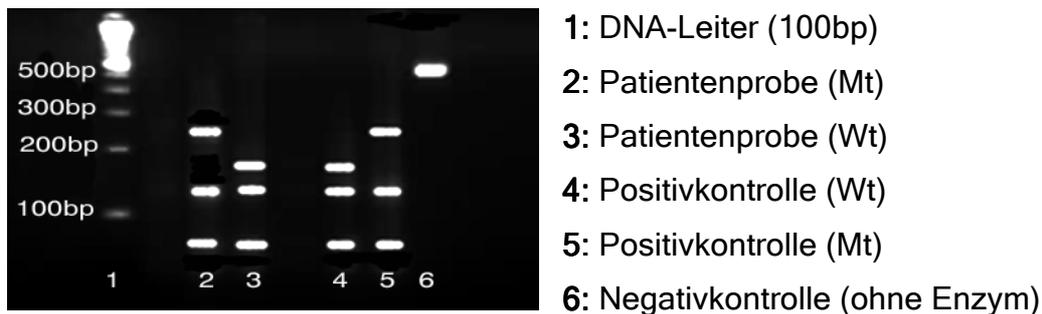


- 1: DNA-Leiter (100bp)
- 2-5: Patientenproben (Wt)
- 6: Positivkontrolle (Wt)
- 7: Positivkontrolle (Mt)
- 8: Negativkontrolle (ohne Enzym)

4.5.2 Codon 51

Ein positiver Nachweis für die Wildtyp - Aminosäure Asparagin ergab sich bei 6 (7%) der Isolate, davon stammten alle aus dem Studienort Matema. Die restlichen 80 Proben schnitt das Enzym *Tsp509 I* bei 215 bp. Dies spricht für das Vorliegen der Aminosäure Isoleucin, also der Mutation.

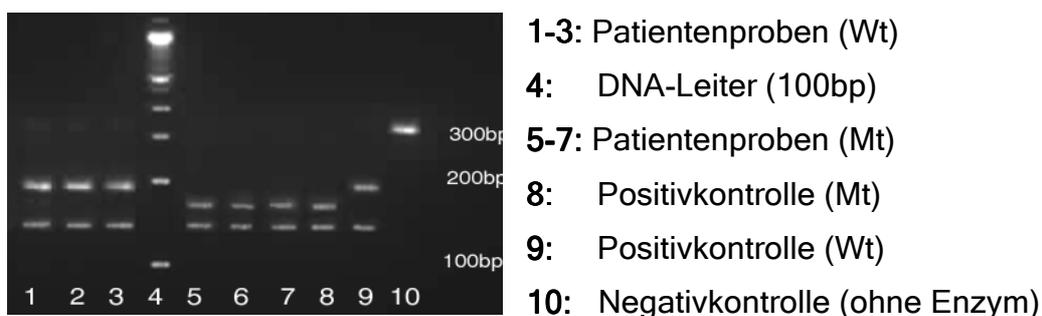
Abbildung 9: Enzymverdau mit *Tsp509I*



4.5.3 Codon 59

Den Wildtyp (Cys) schnitt das Restriktionsenzym *Xmn I* einmal bei 190 bp. Die Mutation (Arg) hatte hingegen zwei Schnittstellen, bei 28 bp und 162 bp. Die 28 bp Bande konnte mit den verwendeten Gelen nicht sichtbar gemacht werden. Alle Proben zeigten die Kontrollbande bei 136 bp. Insgesamt war in 11 Isolaten der Wildtyp nachzuweisen, eines davon kam aus Mbeya. 53 Proben aus Matema zeigten die Mutation und 6 eine Bandenkonstellation, die für den Mischtyp sprach.

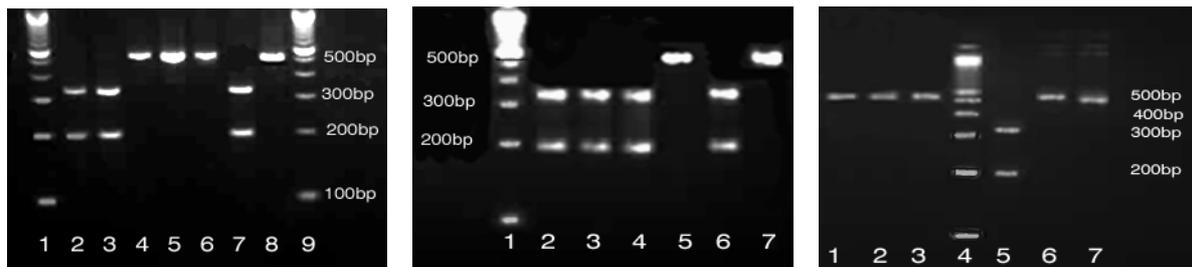
Abbildung 10: Enzymverdau mit *XmnI*



4.5.4 Codon 108

Um den Polymorphismus auf Codon 108 aufzudecken, waren drei Restriktionsendonukleasen, *AluI*, *BsrI* und *BstNI*, nötig. *AluI* schneidet nur den Wildtyp, diese Banden von 327 bp und 190 bp zeigten zwei Isolate. Bei 84 Proben war die ungeschnittene Bande von 522 bp zu erkennen. Mit Hilfe der Enzyme *BsrI* und *BstNI* konnte man bei den 84 Mutationen zwischen der Aminosäure Asparagin und Threonin unterscheiden. Alle Mutationen zeigten bei dem Verdau mit *BsrI* die für Asparagin charakteristischen Banden von 332 bp und 190 bp. Im Falle einer Mutation zu Threonin zeigten sich mit Hilfe des Enzyms *BstNI* ebenfalls Banden von 190 bp und 332 bp.

Abbildung 11: Enzymverdau mit *AluI*, *BsrI* und *BstNI*



AluI:

- 1,9: DNA-Leiter (100bp)
- 2,3: Patientenproben (Wt)
- 4,5: Patientenproben (Mt)
- 6: Positivkontrolle (Mt)
- 7: Positivkontrolle (Wt)
- 8: Negativkontrolle

BsrI:

- 1: DNA-Leiter (100bp)
- 2-4: Patientenproben (Mt)
- 5: Positivkontrolle (Wt)
- 6: Positivkontrolle (Mt)
- 7: Negativkontrolle

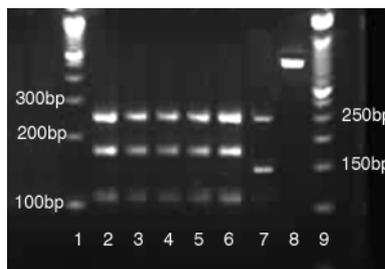
BstNI:

- 1-3: Patientenproben (Wt)
- 4: DNA-Leiter (100bp)
- 5: Positivkontrolle (Mt)
- 6: Positivkontrolle (Wt)
- 7: Negativkontrolle

4.5.5 Codon 164

Der Aminosäurewechsel von Isoleucin zu Leucin in Codon 164 wurde mit dem Enzym *Dra I* nachgewiesen. Alle Proben zeigten die für den Wildtyp charakteristischen Banden bei 106 bp, 170 bp und 246 bp. Bei Vorliegen einer Mutation könnte man anstatt der 170 bp Sequenz eine 27 bp und eine 143 bp Bande sehen.

Abbildung 12: Enzymverdau mit *Dra I*

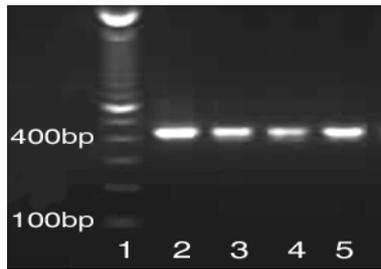


- 1: DNA-Leiter (100bp)
- 2-5: Patientenproben (Wt)
- 6: Positivkontrolle (Wt)
- 7: Positivkontrolle (Mt)
- 8: Negativkontrolle (ohne Enzym)
- 9: DNA-Leiter (50bp)

4.6 Polymorphismus der *Dhps* Gensequenz

Mit dem Primerpaar K+K/ entsteht ein PCR Produkt von 438 bp Länge, das an drei Codons mit fünf verschiedenen Restriktionsenzymen untersucht wurde. Das Primerpaar L+L/ ergibt ein 161 bp Fragment, das an zwei Codons mit vier verschiedenen Restriktionsenzymen untersucht wurde.

Abbildung 13: PCR Produkte der Primerpaare K+K/ und L+L/



K+K/:

- 1: DNA-Leiter (100bp)
- 2-4: Patientenproben
- 5: Positivkontrolle



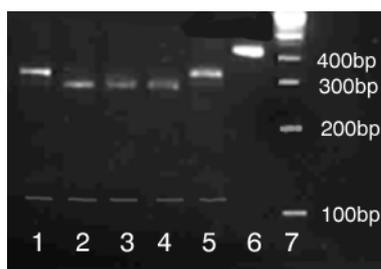
L+L/:

- 1: DNA-Leiter (100bp)
- 2-4: Patientenproben
- 5: Positivkontrolle
- 6: Negativkontrolle

4.6.1 Codon 436

Bei positivem Verdau mit *Mnl* / erhielt man für den Wildtyp (Ser) eine 283 bp und 39 bp lange Sequenz. Die Mutation zeigte eine Bande bei 324 bp. Die 114 bp Bande war in beiden Fällen zu sehen. Bei dem Gegenverdau mit *MspA* / war im Falle der AS Alanin eine Bande bei 410 bp nachzuweisen. Eine Probe aus Mbeya und drei Proben aus Matema zeigten dieses Muster. Eine Mischinfektion lag bei drei Proben vor.

Abbildung 14: Enzymverdau mit *Mnl* und *MspA*



Mnl:

- 1: Patientenprobe (Mt)
- 2,3: Patientenproben (Wt)
- 4: Positivkontrolle (Wt)
- 5: Positivkontrolle (Mt)
- 6: Negativkontrolle
(ohne Enzym)



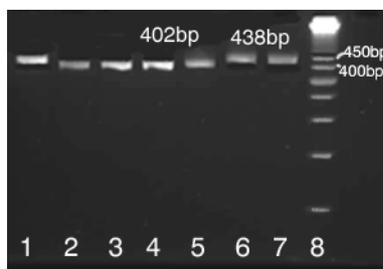
MspA:

- 1: Positivkontrolle (Wt)
- 2: Positivkontrolle (Mt)
- 3-5: Patientenproben (Wt)
- 6: Patientenprobe (Mt)
- 7: Negativkontrolle (ohne Enzym)
- 8: DNA-Leiter (100bp)

4.6.2 Codon 437

Um den Polymorphismus auf Codon 437 aufzudecken, wurden zwei Restriktionsenzyme verwendet. Lag nach Inkubation mit *Ava* II eine ungeschnittene Gensequenz mit 438 bp vor, sprach das für den Nachweis der Wildtyp-Aminosäure Alanin. Diese Bande konnte insgesamt bei 16 Proben gesehen werden. Davon waren 7 aus Mbeya und 9 aus Matema. Zwei Proben aus Matema zeigten eine Mischinfektion. Der Kontrollverdau mit *Mwo* I, das den Wildtyp, nicht aber die Mutation schneidet, bestätigte das Ergebnis.

Abbildung 15: Enzymverdau mit *Ava* II und *Mwo* I



Ava II:

- 1: Positivkontrolle (Wt)
- 2: Positivkontrolle (Mt)
- 3-5: Patientenproben (Mt)
- 6,7: Patientenproben (Wt)
- 8: DNA-Leiter (50bp)



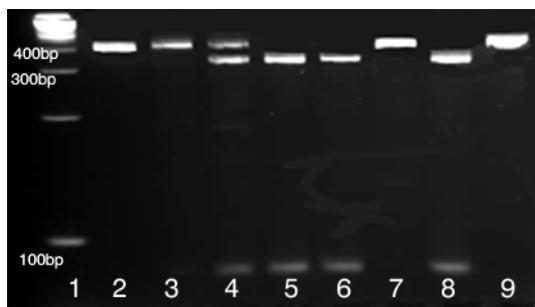
Mwo I:

- 1: Positivkontrolle (Wt)
- 2: Positivkontrolle (Mt)
- 3: Patientenprobe (Wt)
- 4,5: Patientenproben (Mt)
- 6: DNA-Leiter (100bp)

4.6.3 Codon 540

Bei positivem Verdau mit *Fok I* zeigten sich Banden bei 83 bp und 320 bp. Dies war bei 77,4% (n=65) der Isolate der Fall, das heißt, hier lag die AS Glutamat, also eine Mutation, vor. 9,5% der Proben ergaben einen Mischtyp. Der Wildtyp (Lys) konnte mit einer Bande von 404 bp bei 13,1% nachgewiesen werden.

Abbildung 16: Enzymverdau mit *Fok I*



- 1: DNA-Leiter (100bp)
- 2,3: Patientenproben (Wt)
- 4: Patientenprobe (Mix)
- 5,6: Patientenproben (Mt)
- 7: Positivkontrolle (Wt)
- 8: Positivkontrolle (Mt)
- 9: Negativkontrolle (ohne Enzym)

4.6.4 Codon 581

Durch den Verdau mit *BstU I* entstanden bei 98,8% der Proben Banden von 130 bp und 31 bp. Dies spricht für das Vorliegen der AS Alanin, also dem Wildtyp. Bei einer Probe aus Matema konnte eine Mutation nachgewiesen werden. Hier blieb die 161 bp lange Gensequenz ungeschnitten.

Abbildung 17: Enzymverdau mit *BstU I*

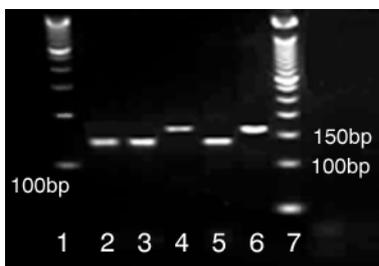


- 1: DNA-Leiter (100bp)
- 2-4: Patientenproben (Wt)
- 5: Positivkontrolle (Mt)
- 6: Positivkontrolle (Wt)
- 7: Negativkontrolle
- 8: DNA-Leiter (50bp)

4.6.5 Codon 613

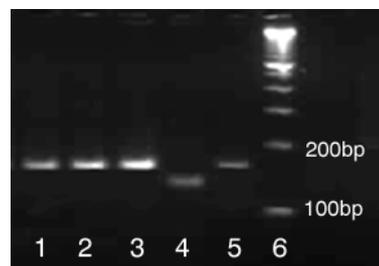
Zum Nachweis der Punktmutation auf Codon 613, wurde das PCR-Produkt mit dem Enzym *Mwo* / inkubiert. Alle Proben zeigten die für den Wildtyp (Alanin) beschriebene Bande bei 137 bp, die zweite Bande bei 24 bp konnte nicht sichtbar gemacht werden. Bei dem Kontrollverdau mit *BsaWI* bestätigte sich das Ergebnis. Hier wiesen alle Isolate die ungeschnittene Bande bei 161 bp auf.

Abbildung 18: Enzymverdau mit *Mwo* und *BsaWI*



Mwo:

- 1: DNA-Leiter (100bp)
- 2,3: Patientenproben (Wt)
- 4: Positivkontrolle (Mt)
- 5: Positivkontrolle (Wt)
- 6: Negativkontrolle (ohne Enzym)
- 7: DNA-Leiter (50bp)



BsaWI:

- 1,2: Patientenproben (Wt)
- 3: Positivkontrolle (Wt)
- 4: Positivkontrolle (Mt)
- 5: Negativkontrolle (ohne Enzym)
- 6: DNA-Leiter (50bp)

4.7 Polymorphismus der *Cytb* Gensequenz

Um den Polymorphismus auf Codon 268 zu untersuchen, musste man alle Proben zuerst mit drei verschiedenen Primerpaaren (*Cytb* 3+5, *Cytb* 2+6 und *Cytb* 2+7) amplifizieren. Bei 85 Proben konnten die spezifischen Banden in der Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Abbildung 19: PCR Produkte der Primerpaare *Cytb* 3+5, 2+6 und 2+7



Cytb 3+5:

- 1-3: Patientenproben
- 4: Positivkontrolle
- 5: Negativkontrolle
- 6: DNA-Leiter (100bp)



Cytb 2+6

- 1: Positivkontrolle
- 2: Negativkontrolle
- 3,4: Patientenproben
- 5: DNA-Leiter (100bp)

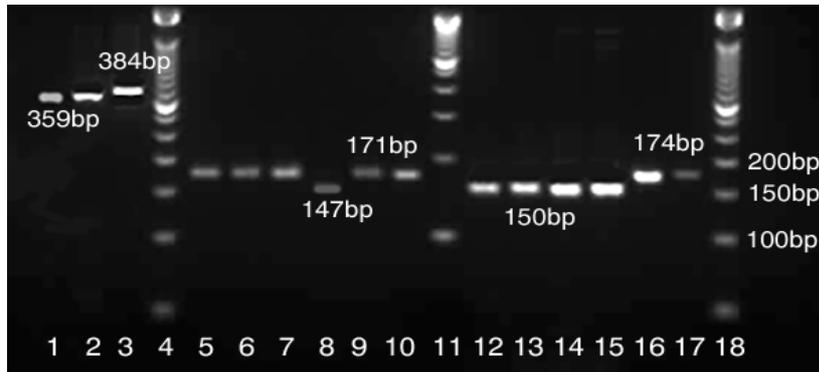
Cytb2+7

- 6: Positivkontrolle
- 7-9: Patientenproben

Ergebnisse

Für den Enzymverdau wurden drei Endonukleasen, *Nsi I*, *A/wNI* und *Ssp I*, verwendet. Die charakteristischen Banden können unter 3.4.5 nachgelesen werden. Alle Proben zeigten die Wildtypsequenz TAT.

Abbildung 20: Enzymverdau mit *NsiI*, *A/wNI* und *SspI*



NsiI:

- 1: Patientenprobe (Wt)
- 2: Positivkontrolle (Wt)
- 3: Positivkontrolle (Mt)
- 4, 18: DNA-Leiter (50 bp)

SspI:

- 12-14: Patientenproben (Wt)
- 15: Positivkontrolle (Wt)
- 16: Positivkontrolle (Mt)
- 17: Negativkontrolle (ohne Enzym)

A/wNI:

- 5-7: Patientenproben (Wt)
- 8: Positivkontrolle (Mt)
- 9: Positivkontrolle (Wt)
- 10: Negativkontrolle (ohne Enzym)
- 11: DNA-Leiter (100bp)

4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus in nachstehenden Tabellen zusammengefasst. Dabei wurden die Ergebnisse im Gesamten und unterteilt in die beiden Studienorte Mbeya und Matema betrachtet. Als Wt wurde der Wildtyp, als Mt die Mutation benannt. Als Mix wurden die Mischinfektionen, bestehend aus einem mutierten Stamm und einem Wildtyp, bezeichnet.

Tabelle 10: Prävalenz der Einzelmutationen in Mbeya und Matema

Gen	Codon	N	Wt	%	Mt	%	Mix	%
Pfcr	T76	86	43	50	37	43	6	7
Pfmdr	Y86	85	41	48,2	38	44,7	6	7,1
Dhfr	V16	86	86	100	0	0	0	0
	I51	86	6	7	80	93	0	0
	R59	86	11	12,8	69	80,2	6	7
	N108	86	2	2,3	84	97,7	0	0
	T108	86	86	100	0	0	0	0
	L164	86	86	100	0	0	0	0
Dhps	A436	84	77	91,6	4	4,8	3	3,6
	G437	84	16	19	66	78,6	2	2,4
	E540	84	11	13,1	65	77,4	8	9,5
	G581	81	80	98,8	1	1,2	0	0
	N613	81	81	100	0	0	0	0
Cytb	N268	85	85	100	0	0	0	0

Tabelle 11: Prävalenz der Einzelmutationen in Mbeya

Gen	Codon	N	Wt	%	Mt	%	Mix	%
Pfcrf	T76	17	7	41,2	10	58,8	0	0
Pfmdr	Y86	17	5	29,4	11	64,7	1	5,9
Dhfr	V16	17	17	100	0	0	0	0
	I51	17	0	0	17	100	0	0
	R59	17	1	5,9	16	94,1	0	0
	N108	17	0	0	17	100	0	0
	T108	17	17	100	0	0	0	0
	L164	17	17	100	0	0	0	0
Dhps	A436	17	16	94,1	1	5,9	0	0
	G437	17	7	41,2	10	58,8	0	0
	E540	17	6	35,3	10	58,8	1	5,9
	G581	17	17	100	0	0	0	0
	N613	17	17	100	0	0	0	0
Cytb	N268	17	17	100	0	0	0	0

Tabelle 12: Prävalenz der Einzelmutationen in Matema

Gen	Codon	N	Wt	%	Mt	%	Mix	%
Pfcrf	T76	69	36	52,2	27	39,1	6	8,7
Pfmdr	Y86	68	36	52,9	27	39,7	5	7,4
Dhfr	V16	69	69	100	0	0	0	0
	I51	69	6	8,7	63	91,3	0	0
	R59	69	10	14,5	53	76,8	6	8,7
	N108	69	2	2,9	67	97,1	0	0
	T108	69	69	100	0	0	0	0
	L164	69	69	100	0	0	0	0
Dhps	A436	67	61	91	3	4,5	3	4,5
	G437	67	9	13,4	56	83,6	2	3
	E540	67	5	7,5	55	82,1	7	10,4
	G581	64	63	98,4	1	1,6	0	0
	N613	64	64	100	0	0	0	0
Cytb	N268	68	68	100	0	0	0	0

4.9 Kombinationen von Einzelmutationen

Einige Studien beschreiben, dass durch Kombination bestimmter Mutationen der Resistenzgrad gegen Antimalariamedikamente erhöht wird. Besondere Bedeutung erreicht dies bei den Mutationskombinationen des *Dhfr* und *Dhps* Gens. Die Fünffach-Mutation (*Dhfr* 51+59+108 + *Dhps* 437+540) spricht für einen hohen Grad an Resistenz gegen das in vielen afrikanischen Ländern als Mittel der ersten Wahl eingesetzte Fansidar® (Sulfadoxin/Pyrimethamin). In dieser Studie wiesen 64,3% der Proben diese Kombination auf. 94,1% der Isolate aus Mbeya zeigten eine Dreifach-Mutation (51+59+108) des *Dhfr* Gens. Eine Übersicht über die wichtigsten Mutationskombinationen gibt Tabelle 12, wobei Mischinfektionen als Mutationen betrachtet wurden.

Tabelle 12: Kombination der wichtigsten Einzelmutationen.

Codon	Mbeya & Matema		Mbeya		Matema	
	N	%	N	%	N	%
<i>Pfcr</i> + <i>Pfmdr</i> 76+86	29	34,1	9	52,9	20	29,4
<i>Dhfr</i> 51+59	71	82,6	16	94,1	55	79,7
51+108	80	93	17	100	63	91,3
51+59+108	71	82,6	16	94,1	55	79,7
<i>Dhps</i> 437+540	68	81	10	58,8	58	86,6
Fünffach - Mutation 51+59+108+437+540	54	64,3	9	52,9	45	67,2

4.10 Signifikanz der Ergebnisse

Anhand einer Vierfeldertafel wurde mit dem Fisher Exact Test (2-tailed) die Signifikanz der Ergebnisse berechnet. Dabei wurde geprüft, ob die einzelnen Mutationen in einem der beiden Studiengebiete signifikant häufiger vorkamen. Nur Codon 437 und 540 des *Dhps* Gens wiesen einen signifikanten Unterschied auf. Mit dem Prävalenzverhältnis (risk ratio) sollte gezeigt werden, um wie viel höher/niedriger das Risiko in Matema gegenüber Mbeya ist, eine der untersuchten Mutationen zu tragen. Der größte Unterschied mit 1,5224 konnte hier für Codon 436 festgestellt werden. Das 95%-Konfidenzintervall beschreibt den Bereich, in dem sich der Wert für den Unterschied in beiden Studiengebieten, auch nach Wiederholung der Untersuchungen, mit gleichem Stichprobenumfang mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit befindet.

Tabelle 13: Prävalenz der Mutationen in Matema und Mbeya, p-Wert, Prävalenzverhältnis und 95%-Konfidenzintervall (Mischinfektionen wurden als Mutationen betrachtet).

Gen	Codon	Matema	Mbeya	P-Wert	Prävalenz- verhältnis	95%-Konfidenz - intervall	
		Prävalenz (%)	Prävalenz (%)			unterer	oberer
<i>Pfcr</i>	T76	33 (47,8)	10 (58,8)	0,5891	0,8130	0,5092	1,2981
<i>Pfmdr</i>	Y86*	32 (47,1)	12 (70,9)	0,1065	0,6667	0,4481	0,9917
<i>Dhfr</i>	V16	0 (0)	0 (0)	1,0000			
	I51	63 (91,3)	17 (100)	0,5936	0,9710	0,9322	1,0114
	R59	59 (85,5)	16 (94,1)	0,6850	0,9085	0,7792	1,0592
	N108	67 (97,1)	17 (100)		0,9710	0,9322	1,0114
	T108	0 (0)	0 (0)	1,0000			
	L164	0 (0)	0 (0)	1,0000			
<i>Dhps</i>	A436**	6 (9)	1 (5,9)	1,0000	1,5224	0,1962	1,8139
	G437**	58 (86,6)	10 (58,8)	0,0159	1,4716	0,9779	2,2147
	E540**	62 (92,5)	11 (64,7)	0,0073	1,4301	1,0002	2,0449
	G581***	1 (1,6)	0 (0)	1,0000			
	N613***	0 (0)	0 (0)	1,0000			
<i>Cytb</i>	N268*	0 (0)	0 (0)	1,0000			

* N= 85 ** N=84 *** N= 81

5. Diskussion

Malaria, die bedeutendste parasitäre Erkrankung der Welt, verursacht jährlich über 1 Million Tote. Die Hauptlast trägt das tropische Afrika. Nach einer stetigen Abnahme der Mortalitätsrate, stieg diese in den letzten zwei Jahrzehnten im östlichen und südlichen Afrika wieder dramatisch an (39, 68). In Tansania nahmen die registrierten Malariafälle von 2002 bis 2003 um 30% zu (84). Neben einem besseren Erfassungssystem ist hierfür vor allem die zunehmende Medikamentenresistenz der Plasmodienstämme verantwortlich.

In vorliegender Arbeit sollte mit Hilfe von molekularen Markern das Resistenzprofil von *P. falciparum* gegen Standardtherapeutika erfasst werden. Es wurden Proben aus zwei Regionen im Südwesten Tansanias miteinander verglichen. Matema, ein ländliches holoendemisches Gebiet am nördlichen Ufer des Malawi-Sees, und Mbeya, die Hauptstadt dieser Region mit importierten Malariafällen aus der mesoendemischen Umgebung. Zu diesem Zweck wurden die Proben unter Verwendung von PCR und Restriktionsverdau auf spezifische Punktmutationen in definierten Genabschnitten untersucht.

5.1 Aussagekraft und Zuverlässigkeit der Untersuchungen

Die Proben für vorliegende Studie wurden in Tansania auf Filterpapier gesammelt, getrocknet und in das Untersuchungslabor am Münchner Tropeninstitut transportiert. Filterpapiertyp, Trocknung und Lagerung der Proben spielen dabei für die Sensitivität der späteren Analyse eine entscheidende Rolle. Die höchste Sensitivitätsrate kann bei schneller Trocknung in direktem Sonnenlicht erzielt werden, wobei das ultraviolette Licht der Sonne keinen schädigenden Einfluss auf die DNA zu haben scheint. Wichtige Faktoren für die Lagerung der Proben sind Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Die Sensitivität der PCR sinkt bei hohen Temperaturen und hoher Luftfeuchtigkeit deutlich ab. Verglichen mit Filterpapier, hat Vollblut, das nach Entnahme sofort tiefgefroren wird, eine 10fach höhere Sensitivität (18). Diese Methode ist aufgrund des technischen und finanziellen Aufwandes in vielen Malariagebieten aber nicht durchführbar.

Bei vorliegender Studie wurde Whatmann 3MM Filterpapier verwendet. Die Trocknung erfolgte in direktem Sonnenlicht, danach wurden die Proben einzeln in

verschließbare Tüten verpackt und bis zur Ankunft in München trocken bei Raumtemperatur aufbewahrt. In München wurden die Proben bei -20°C gelagert. Die geringere Sensitivität der Proben aus Matema (2004) könnte durch den verzögerten Transport nach Deutschland, erst sechs Monate nach Entnahme, bedingt sein. Es ist anzunehmen, dass unter den in Tansania herrschenden Lagerungsbedingungen bereits DNA-Abbau stattgefunden hat.

Die Mikroskopie, Goldstandard der Malariadiagnostik, ist preiswert und schnell durchführbar. Aber Erfahrung des Untersuchers, Qualität der Färbung und des Mikroskops sowie der Zeitaufwand pro Probe sind Faktoren, die großen Einfluss auf das Ergebnis haben. Eine Studie aus Südafrika zeigte bei gleichen Rahmenbedingungen eine enorme Differenz der Ergebnisse zwischen unterschiedlichen Untersuchern (14). Die Sensitivität des Mikroskops liegt bei ca. 10-30 Parasiten/ μ l Blut (32). In Anbetracht der großen Menge an Untersuchungsmaterial, das täglich in einem Endemiegebiet mikroskopiert wird, wird diese aber nur selten erreicht (66). Mischinfektionen und niedrige Parasitämien werden somit leicht übersehen. Snounou *et al.* (1993) entwickelte eine PCR, die es möglich macht, auch eine geringere Parasitenzahl zu detektieren. Die Sensitivität liegt unter optimalen Bedingungen bei einem Parasiten/ μ l Blut (67). Das Protokoll besteht aus zwei Amplifikationsrunden. Das Produkt der ersten Runde wird in vier separate PCRs geteilt, jede mit einem Primerpaar für eine der vier humanpathogenen Malariaerreger. Somit durchläuft jede Probe fünf PCRs und vier Produkte müssen durch die Gelelektrophorese analysiert werden. Kostengünstiger und schneller wäre eine Methode, in der nur zwei PCRs notwendig sind. Singh *et al.* (1999) beschreibt eine solche PCR. Nest 1 verwendet artspezifische Primer, davon werden nur die positiven Proben in Nest 2 mit speziesspezifischen Primern amplifiziert. Die Sensitivität dieses Protokolls lag bei sechs Parasiten/ μ l Blut, also immer noch deutlich besser als mit dem Mikroskop erzielt werden kann (66).

Viele Studien stellen eine Relation zwischen *in-vivo* und *in-vitro* Resistenzen gegen Antimalariamedikamente her. Der sinnvolle Einsatz von molekularen Markern als Zusatz von *in-vivo* Resistenztestungen wurde durch Wellems *et al.* (2001) nachgewiesen. Die Prävalenz der Mutationen liegt in fast allen Studien höher als die *in-vivo* Medikamentenresistenz selbst. Dies ist von mehreren Faktoren wie

Wirtsimmunität, Ernährungszustand des Menschen und Pharmakokinetik abhängig (74, 79, 80). Djimde *et al.* (2001) versuchte in einer großen Studie in Mali ein Verhältnis zwischen dem mit Chloroquin-Resistenz assoziiertem Genotyp (*pfcr*t T76) und dem *in-vivo* Chloroquin-Resistenzniveau zu bestimmen. Dazu ermittelte er den Genotyp-Resistenz-Index (GRI) und den Genotyp-Therapieversager-Index (GFI). Der GRI errechnet sich aus der Prävalenz des Resistenzassoziierten Genotyps durch die Prävalenz der Erregerresistenz (RI - RIII). Der GFI errechnet sich ähnlich, aus dem Verhältnis des resistenten Genotyps und den CQ-Therapieversagerraten. Ein Ergebnis war die Feststellung, dass beide Verhältnisse stark vom Alter des Patienten abhängen. Beide Indices waren bei älteren Patienten (>5 Jahre) höher, dies unterstützt die Aussagen, dass Therapieversager nicht nur von dem Vorhandensein der Mutation, sondern zusätzlich von Wirtsfaktoren (Semi-Immunität) abhängen. Unter Verwendung der logistischen Regression variierten der GRI und GFI für CQ zwischen 1,6 und 2,8 für die Studiengebiete in Mali. Um zuverlässige Aussagen treffen zu können, müssen diese Untersuchungen aber für jedes Studiengebiet separat durchgeführt und regelmäßig wiederholt werden.

Verlässliche molekulare Marker, die Vorhersagen des Resistenzniveaus gegen Antimalariamittel ermöglichen, gibt es zur Zeit für Chloroquin, Sulfadoxin/Pyrimethamin und Atovaquon (13, 43, 63). Die spezifischen Marker aller drei Antimalariamittel wurden in der vorliegenden Studie untersucht. Der Nachweis von allelischen Polymorphismen an definierten Genabschnitten bietet so eine effektive Alternative zu den im Vergleich logistisch und finanziell wesentlich aufwendigeren *in-vivo* Resistenzstudien.

5.2 Polymorphismen molekularer Marker zum Nachweis von Medikamentenresistenz

5.2.1 Chloroquin

Chloroquin war während der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts in vielen Ländern das Mittel der Wahl zur Behandlung der unkomplizierten Malaria. Es war gut verträglich, billig und effektiv gegen die Erreger wirksam (13). Resistenzen wurden erstmals in den späten 50er Jahren in der thailändisch-kambodschanischen Grenzregion beobachtet. Seit den 80er Jahren wurde auch in Afrika eine rasche

Verbreitung der Chloroquinresistenzen registriert (83). Warsame *et al.* (1999) berichtet über *in-vivo* Resistenzraten von 70% bei tansanischen Kindern im Alter zwischen einem und neun Jahren (78). Auch in anderen afrikanischen Staaten wie Kenia (6), Malawi (5) und Uganda (24) wurde ein ähnliches Resistenzniveau beobachtet.

Chloroquin Resistenz (CQR) in *Plasmodium falciparum* ist assoziiert mit Mutationen im *Pfcr*t Gen, einem transmembranen Transporter in der Nahrungsvakuole (21). Vor allem der Austausch der Aminosäure Threonin zu Lysin in Codon 76 kann mit *in-vitro*, aber auch mit *in-vivo* Resistenzen in Verbindung gebracht werden (13, 21, 47). Kontrovers diskutiert wird die Beteiligung des *Pfmdr*-1 Gens an der CQR. Dieses für ein Pgh1 (P-glycoprotein homologue) codierende Gen zeigte bei einigen Studien einen Zusammenhang zwischen verschiedenen Punktmutationen und der Abnahme der Chloroquin-Sensitivität. Eine zentrale Rolle spielt hier der Aminosäurewechsel von Asparagin zu Thyrosin in Codon 86 (27). Andere Untersuchungen hingegen konnten eine solche Assoziation nicht bestätigen (3, 59). Eine weitere Hypothese postuliert die Abhängigkeit der *Pfmdr* Y86 Mutation von der *Pfcr*t T76 Mutation (46, 72). Bei Proben aus Westafrika konnte gezeigt werden, dass die *Pfcr*t Mutation in 82% der Fälle vorlag, in denen auch das *Pfmdr* Gen mutiert war, aber nicht mal die Hälfte der Proben, die im *Pfcr*t Gen mutiert waren, auch die *Pfmdr* Mutation besaßen. Dies lässt darauf schließen, dass die beobachtete Verbindung dieser Mutationen nur in eine Richtung besteht, von *Pfcr*t zu *Pfmdr* (72). Andere Punktmutationen auf Codon 1042 und 1246 des *Pfmdr* Gens könnten eine verstärkende Wirkung ausüben. Bis heute ist aber die Rolle des *Pfmdr* Gens für die CQ-Resistenz noch nicht eindeutig geklärt.

In vorliegender Studie zeigten 50% der Isolate mindestens einen Parasitenklon, der die K76T Mutation exprimierte. 51,8% trugen die Mutation im *Pfmdr* Gen. Eine Doppelmutation (T76+Y86) wiesen 29 Proben (34,1%) auf. Von allen Blutproben mit *Pfcr*t Mutation waren zusätzlich 67,4% im *Pfmdr* Gen mutiert. 59,1% der Isolate mit *Pfmdr* Mutation trugen ebenfalls die *Pfcr*t Mutation. Bei dem Vergleich der beiden Studiengebiete erhielt man ein ähnliches Verhältnis der beiden Mutationen zueinander für Mbeya, dem städtischen Gebiet, wobei die Prävalenz allgemein höher lag (90% und 75%). In Matema, dem ländlichen holoendemischen Gebiet, gab es nur einen sehr geringen Unterschied (60,6% für erste und 62,5% für letzte Variante), bei geringerem Vorkommen der Einzelmutationen, knapp 40%. Die Ergebnisse in

vorliegender Studie unterstützen somit nicht die Annahme, dass das Auftreten einer *Pfmdr1* Y86 Mutation vom Vorhandensein einer *Pfcr1* T76 abhängig ist.

Aufgrund des hohen Resistenzniveaus gegen CQ, wechselte Tansania 2001, wie viele andere afrikanische Staaten bereits zuvor, zu Sulfadoxin/Pyrimethamin als Mittel der ersten Wahl zur Behandlung der unkomplizierten Malaria. Kublin *et al.* (2003) und Mita *et al.* (2003) berichteten in Malawi über eine fast vollständige Wiederherstellung der CQ-Sensitivität und einen enormen Rückgang der Mutationen im *Pfcr1* Gen, sieben Jahre nachdem CQ als Mittel der ersten Wahl verlassen wurde. Vorliegende Studie verzeichnet zwar eine leichte Abnahme der T76 Mutation, aber mit einer Prävalenz von 50%, 58% in Mbeya und 47,8% in Matema, kann drei bzw. vier Jahre nach Wechsel zu SP nur von einer leichten Erholung gesprochen werden. Grund hierfür könnte einerseits die trotz anders lautender Therapieempfehlungen weiterhin häufige Anwendung von Chloroquin sein, was zu einer kontinuierlichen Resistenzinduktion führt. Andererseits ist vielleicht die Zeitspanne seit Verlassen des Medikaments für einen deutlichen Rückgang der resistenzassoziierten Mutationen in der Parasitenpopulation zu kurz. Es besteht die Hoffnung, dass sich der Wildtyp nach längerer Zeit ohne Medikamentendruck wieder vollständig durchsetzt, wie Studien in Malawi zeigten (42, 50). Sollte dadurch die therapeutische Wirksamkeit von Chloroquin wieder gesichert sein, könnte bei steigenden SP-Therapieversagerraten über ein erneutes Einführen von Chloroquin nachgedacht werden. Um eine erneute Resistenzentwicklung zu vermeiden, sollte Chloroquin dann jedoch mit einem anderen Medikament, zum Beispiel Artemisinin oder einem seiner Derivate, kombiniert werden. Eine engmaschige Kontrolle der Prävalenz von mit CQR verbundenen Mutationen ist daher unverzichtbar.

5.2.2 Sulfadoxin - Pyrimethamin

Durch die high-level Chloroquin-Resistenz in Afrika wurde die Antifolat Kombination Sulfadoxin/Pyrimethamin (Fansidar[®]) zunehmend das Mittel der ersten Wahl zur Therapie der Malaria. Als erstes afrikanisches Land wechselte Malawi 1993, Tansania folgte 2001, obwohl zu diesem Zeitpunkt schon eine nachlassende Wirkung des Medikaments bekannt war (48). Durch den nun zusätzlichen Selektionsdruck stieg das Resistenzniveau weiter an. So wurde über SP-Therapieversager von 45%

im Nordosten Tansanias berichtet (54), in Äthiopien lag diese Zahl mit 72% sogar noch höher (37). Hauptverantwortlich hierfür sind Punktmutationen im *Dhfr* und *Dhps* Gen. Beide Enzyme spielen eine Schlüsselrolle im Folatezyklus des Parasiten. Durch einen Aminosäureaustausch von Serin zu Asparagin in Codon 108 des *Dhfr* Gens erhöht sich die Resistenz zu Pyrimethamin bis zu einem 100fachen (10, 58). Zusätzliche Mutationen in Codon 51, 59 und 164 haben auf diese einen weiteren additiven Effekt. Sulfadoxin-Resistenz wird durch Mutationen an fünf verschiedenen Codons im *Dhps* Gen verursacht (Codon 436, 437, 540, 581 und 613), wobei hier die Mutation A437G eine vorherrschende Rolle einnimmt (65). Studien zeigten, dass die Mutationen im *Dhps* Gen erst entstehen, wenn die Mehrzahl der Parasiten in einer Population bereits eine Zwei- bzw. Dreifachmutation in *Dhfr* tragen (55, 56). *In-vivo* und *in-vitro* Resistenzen gegen SP wurden mit diesen Mutationen assoziiert (10, 26, 57, 58, 90).

In dieser Arbeit wurden die in zwei Studiengengebieten gesammelten Proben auf Vorliegen der *Dhfr* und *Dhps* Polymorphismen untersucht.

Die Prävalenz der Schlüsselmutation N108 im *Dhfr* Gen lag in Mbeya bei 100% und in Matema 97,1%. Die hohe Prävalenz dieser Schlüsselmutationen korreliert mit Ergebnissen von Untersuchungen aus Uganda und Äthiopien (8, 64). Eine Mutation in Codon 108 von Serin zu Threonin sowie ein Aminosäurewechsel zu Valin in Codon 164 konnten, wie auch bei anderen Studien, nicht gefunden werden. Diese Kombination spielt bei der Ausbildung von Cycloguanil-Resistenz eine wichtige Rolle (26, 57). Peterson *et al.* (1990) und Foot *et al.* (1990) brachten ebenfalls die Mutation in Codon 16 mit dieser Resistenz gegen Cycloguanil in Verbindung. Auch diese konnte in vorliegender Studie nicht nachgewiesen werden.

Die zusätzlichen Mutationen I51 und R59 im *Dhfr* Gen hatten eine hohe durchschnittliche Prävalenz in beiden Studiengengebieten. Die Verteilung zeigte keinen signifikanten Unterschied in den beiden Regionen. Die Tripelmutation (*Dhfr* I51, R59 und N108) wurde in Tansania als zuverlässiges Frühwarnsystem für die Ausbildung von SP-Resistenz postuliert (53). Außerdem zeigte Mugittu *et al.* (2004), dass der Genotyp der Tripelmutation in Gebieten mit hoher SP-Resistenz viermal höher liegt als in Gebieten mit moderater Resistenz. Er konnte in dieser Studie, mit fünf über das ganze Land verteilten Studiengengebieten, einen Genotyp-Therapieversager-Index (GFI)

von 3,4 in Gebieten mit hoher SP-Resistenz und 2 in Gebieten mit moderater Resistenz feststellen. Diese Tripelmutation konnte in Matema in 79,7% der Isolate nachgewiesen werden. In Mbeya zeigten bis auf eine Probe alle diese Mutation (94,1%). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungen aus einem vergleichbar endemischen Gebiet in Malawi (8).

Brooks *et al.* (1994) stellte erstmals eine Verbindung zwischen *in-vitro* Resistenz gegen Sulfadoxin und zwei verschiedenen Punktmutationen in Codon 436 und Codon 613 des *Dhps* Gens her (7). Verschiedene Studien in Tansania, Malawi und Kenia wiesen vor einigen Jahren Mutations-Prävalenzen von bis zu 20% in diesen Codons nach (36, 61). Vorliegende Studie konnte diese Zahlen nicht bestätigen. Der Aminosäurewechsel von Alanin zu Serin bzw. Threonin in Codon 613 wurde in keinem der Isolate nachgewiesen. Eine Probe aus Mbeya (5,9%) und sechs aus Matema (9%) zeigten die Mutation von Serin zu Alanin in Codon 436. Die Verteilung in beiden Studiengebieten war nicht signifikant. Neuere Studien berichten über eine vorherrschende Rolle des A437G Wechsels alleine oder in Kombination mit anderen Mutationen, vor allem dem Aminosäuretausch von Lysin zu Glutamin in Codon 540, in Feldisolaten (65). Diese Aussage ist konform mit Untersuchungen aus Malawi (8), Tansania (36) und einer großen Feldstudie mit verschiedenen Studiengebieten in Afrika und Asien (76). Vorliegende Arbeit stimmt mit diesen Beobachtungen überein. So zeigten 86,6% der Proben aus Mbeya und 58,8% aus Matema den AS Wechsel in Codon 437. Hier ergibt sich bei dem Vergleich zwischen den beiden Studiengebieten eine statistische Signifikanz ($p= 0,0159$). Ebenfalls signifikant sind die Unterschiede in Codon 540. 11 Proben aus Mbeya (64,7%) und 62 aus Matema (92,5%) präsentierten diese Mutation. Ein Aminosäurewechsel vom 581-Gly-Typ konnte nur in einer Probe entdeckt werden. Auch dieses Ergebnis steht im Einklang mit anderen Untersuchungen aus Tansania (53).

Kublin *et al.* (2002) etablierte die Fünffachmutation (*Dhfr*: I51, R59, N108 + *Dhps*: G437, E540) als prädiktiven Parameter für SP-Therapieversager. Eine hohe Prävalenz dieser Kombination konnte in Äthiopien (30), Malawi (8) und Kenia (55) bereits detektiert werden. Ebenso ergab meine Auswertung eine große Verbreitung dieser Kombination, 52,9% in Mbeya und 67,2% in Matema. Diese Werte liegen deutlich höher als Untersuchungsergebnisse aus Kyela, ca. 30 km westlich von

Matema, vermuten ließen (53). Dies ist wahrscheinlich durch den längeren Selektionsdruck bedingt, da die Studie in Kyela 2003, also zwei bzw drei Jahre vor unserer Studie, durchgeführt wurde. Die hohe Prävalenz dieser „quintuple“-Mutation unterstützt Aussagen, in denen auf die nur noch bedingte Wirksamkeit von Fansidar® in Tansania hingewiesen wird (52).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hohe Prävalenz resistenzassoziierter Mutationen für CQ und SP und die dadurch bedingte Morbidität und Mortalität, ein alarmierendes Gesundheits- und Wirtschaftsproblem in Tansania darstellen. Die Entscheidung zu einem Regimewechsel zugunsten Artemether+Lumefantrin (Riamet®), einer Kombination aus Artemisinin und einer synthetischen Fluoren Racemat-Mischung, ist somit völlig gerechtfertigt. Durch diesen Wechsel könnte SP auch für den Gebrauch als intermittierende prophylaktische Behandlung (IPTp= intermittent preventive treatment of pregnant women) schwangerer Frauen erhalten werden. Dies ist momentan das einzige Medikament, das wegen seines sicheren Profils zu diesem Zweck benützt werden kann (52).

5.2.3 Atovaquon

Der Wirkmechanismus von Atovaquon, einem Hydroxynaphtochinon, basiert auf einem Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials und der dadurch bedingten Hemmung der parasitären Atmungskette (69). Resistenzen gegen dieses Medikament sind mit Punktmutationen auf dem Cytochrom-bc₁ Gen assoziiert (40). Korsinczky *et al.* (2000) berichtete aus Thailand die erste Resistenz gegen Atovaquon im Menschen. Bei der molekularbiologischen Untersuchung konnte eine Punktmutation von TAT zu TCT in Codon 268 nachgewiesen werden. Der Aminosäurewechsel Thyrosin zu Asparagin (TAT zu AAT) war eine weitere Mutation, die auf diesem Codon entdeckt wurde (22). Schwöbel *et al.* (2003) entwickelte eine PCR mit Restriktionsverdau, um die definierten Mutationen auf Codon 268 zu detektieren. Die im Rahmen dieser Studie gesammelten Blutproben, wurden dementsprechend getestet und alle Isolate zeigten die Wildtypsequenz.

Zur Vermeidung von Resistenzbildung wird Atovaquon mit Proguanil, einem Dihydrofolat-Reduktase-Hemmer, kombiniert. Cycloguanil, der aktive Metabolit von

Proguanil, wird mit einer Dreifachmutation im *Dhfr* Gen assoziiert (V16A, S108T und I164L) (26, 57). Wie unter 5.2.2 beschrieben, konnte in den Isolaten aus Mbeya und Matema keine Mutation in diesen Genloci aufgedeckt werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer Studie aus Sansibar, Guinea Bissau und Kap Verde, in der ebenfalls keine Punktmutationen gefunden werden konnten (31). Selbst bei multiresistenten Erregern erzielt Malarone[®] (Atovaquon+Proguanil) Therapieerfolge bis zu 97%, wie eine Studie aus Thailand zeigte (75). Aufgrund der hohen Kosten ist die Einführung von Malarone[®] als Therapeutikum in Malariaendemiegebieten allerdings nicht möglich.

Da jedoch, wie die Einzelberichte von Therapieversagern zeigen, bereits ohne Selektionsdruck resistenzassoziierte Mutationen auftreten können, ist es auch hier sinnvoll, regelmäßige Untersuchungen bezüglich des Vorkommens der Resistenzmarker durchzuführen.

5.3 Schlussbetrachtung

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine zuverlässige Methode, um molekulare Resistenzmarker für definierte Antimalariamittel zu detektieren. Mit Etablierung der Real-Time-PCR besteht die Möglichkeit, die Präzision der Methode weiter zu verbessern und Kontaminationen zu vermeiden. Ein weiterer Vorteil ist die Zeitersparnis, da bei dieser Methode keine Gelelektrophorese mehr nötig ist (17). Es gibt bereits Protokolle, die eine Untersuchung aller vier humanpathogener Malariaspezies in nur einem Reaktionsansatz erlauben (45).

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Studie lässt sich feststellen, dass die Prävalenz vor allem der Mutationen, die mit SP-Resistenz assoziiert sind, sehr hoch ist. Wie Studien belegen, sind diese Zahlen nicht identisch mit den Zahlen der Therapieversager in dieser Region. Es gibt verschiedene Methoden zur Erfassung von Medikamentenresistenzen, jede mit Vor- und Nachteilen. So können auch kosten- und zeitintensive *in-vivo* Studien kein genaues Abbild des Resistenzprofils geben, da Therapieerfolge von mehr Faktoren als der Erregerresistenz abhängig sind. So spielen Immunantwort, Ernährungszustand des Wirts und Bioverfügbarkeit des Medikaments eine entscheidende Rolle (60). Durch *in-vivo* Tests läuft man Gefahr, den wahren Resistenzstatus der Plasmodien zu unterschätzen, vor allem wenn diese

Untersuchungen in der semiimmunen Erwachsenen-Bevölkerung durchgeführt wurden. *In-vitro* Studien und molekulare Methoden sind zusätzlich nötig, um diesen Faktor der Semi-Immunität zu eliminieren.

Ein molekularer Marker gibt gute Hilfestellung als zusätzliches Werkzeug bei der Entscheidung über einen Wechsel der Therapieempfehlungen. Wie in Malawi gezeigt wurde, kann einige Jahre nach Verlassen von Chloroquin als Mittel der Wahl, unter Voraussetzung des Rückgangs der mit CQR verbundenen Mutationen, über ein erneutes Einführen nachgedacht werden (42, 50). Trifft diese Erholung auch für SP zu, was durch Studien noch belegt werden muss, besteht die Möglichkeit einer „Rotation“ der sicheren und billigen Antimalariamittel (60). Ein zuverlässiges flächendeckendes Erfassungssystem, wie es das EANMAT (East African Network for Monitoring Antimalarial Treatment) darstellt, ist erforderlich, um diese Mutationen aufzudecken und das Resistenzniveau zu überwachen. Mit Hilfe dieser Überwachung lassen sich effektive nationale Therapieempfehlungen geben.

6. Zusammenfassung

Malaria, eine durch Protozoen verursachte Infektionskrankheit, verschuldet jährlich bis zu zwei Millionen Tote. Am stärksten betroffen sind Kinder und schwangere Frauen im tropischen Afrika. *P. falciparum*, der Erreger der gefährlichen Malaria tropica, hat den größten Anteil daran. In Tansania stellt Malaria ein enormes Wirtschafts- und Gesundheitsproblem dar. Es ist eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität in der Bevölkerung. Eine wirksame medikamentöse Therapie ist unentbehrlich für die erfolgreiche Malaria-Kontrolle. In den letzten Jahren zeigten sich jedoch zunehmende Resistenzen gegen die Standardtherapeutika Chloroquin und Sulfadoxin/Pyrimethamin. Multiresistente Erreger verstärken das Problem zusätzlich.

In vorliegender Studie wurde mit Hilfe von molekularen Resistenzmarkern die Prävalenz von definierten, mit Medikamentenresistenz assoziierten Punktmutationen auf verschiedenen Genen des Erregers *P. falciparum*, bestimmt. Die PCR und der Restriktionsenzymverdau erwiesen sich als einfache und zuverlässige Methode, diese Mutationen nachzuweisen. Das Untersuchungsmaterial stammte aus zwei Gebieten im Südwesten Tansanias, die hinsichtlich ihrer Endemität und Sozialgeographie Unterschiede aufwiesen. Matema, ein ländliches Dorf am nördlichen Ufer des Malawi-Sees mit hoher Endemität, und Mbeya, eine Stadt mit importierten Malariafällen aus der mäßig endemischen Region. Untersucht wurden bekannte molekulare Marker, die mit Resistenzen gegen Chloroquin, Sulfadoxin/Pyrimethamin und Atovaquon assoziiert sind.

Chloroquin (Resorchin[®]), ein 4-Aminochinolon, hemmt den Hämoglobinabbau des Erregers. Durch Akkumulation der toxischen Zwischenprodukte geht das Plasmodium zugrunde. Resistenzen gegen CQ werden mit Punktmutationen in Codon 76 des *Pfcrt* Gens in Verbindung gebracht. Umstritten ist die Beteiligung des *Pfmdr* Gens an der CQR. Es wird aber angenommen, dass vor allem eine Mutation in Codon 86 einen modulierenden Einfluss auf diese hat. Beide Gene codieren für Transporterproteine in den Membranen. In beiden untersuchten Gebieten war die Prävalenz der entscheidenden Mutationen hoch, wobei in Mbeya die höheren Prozentsätze erreicht wurden (*Pfcrt*: 58,8% und *Pfmdr*: 70,6%). Dieses Ergebnis spricht gegen eine weitere Verwendung von Chloroquin, eine strikte Pause könnte jedoch die Selektion des Wildtyps fördern.

SP (Fansidar®) gehört zu der Gruppe der Antifolate, diese hemmen die Folsäuresynthese des Parasiten. Durch diese Blockade der DNA-Replikation stirbt der Parasit ab. Sulfadoxin, ein Sulfonamid, hemmt das Enzym Dihydropteroat-Synthetase (*Dhps*). Auf fünf verschiedenen Codons wurden sechs Mutationen mit der Ausbildung von Resistenzen assoziiert (16, 51, 59, 108 und 164). Pyrimethamin hemmt die Dihydrofolat-Reduktase (*Dhfr*). Hier werden ebenfalls sechs Mutationen auf fünf Codons mit Resistenzentwicklung in Verbindung gebracht (436, 437, 540, 581 und 613). Die Ergebnisse der Studie verdeutlichen, dass die Prävalenz der mit SP assoziierten Mutationen in diesem Teil Afrikas hoch ist. So liegt die Häufigkeit für die Schlüsselmutation der Resistenz gegen Pyrimethamin in beiden Studiengebieten bei knapp 100%. Weitere modulierende Mutationen im *Dhfr* Gen erreichen nahezu gleiche Prävalenzen. Die Verteilungsfrequenz der *Dhps* Genloci zeigt ebenfalls hohe Werte, wobei diese in Matema signifikant häufiger vorkommen (*Dhps* 437:86,6% und 540: 92,5%). Aufgrund verschiedener Studien in Ostafrika wird die Fünffachmutation (*Dhfr* 51, 59, 108 und *Dhps* 437 und 540) als wichtiger molekularer Marker für SP-Therapieversager in Patienten mit unkomplizierter *P. falciparum*-Infektion betrachtet. Das Vorkommen dieser Kombination kann mit 64,3% im Vergleich zu anderen ostafrikanischen Staaten als hoch eingestuft werden. Die Prävalenz reicht von 10% in Kenia bis 78% in Malawi.

Außerdem wurden Punktmutationen in Codon 268 des *Cytb* Gens, die mit Resistenzen gegen Atovaquon assoziiert sind, untersucht. Dieses Medikament, das eine Hemmung des Elektronentransportes im Erreger verursacht, wird im tropischen Afrika wegen seines hohen Preises zur Zeit kaum verwendet. Dieser fehlende Selektionsdruck könnte auch erklären, warum in diesem Genlocus keine Mutationen gefunden wurden.

Trotz der geringen Anzahl der untersuchten Patientenproben, deutet das Mutationsmuster dieser 86 Isolate auf eine nur noch geringe Wirksamkeit der Antifolatkombination Sulfadoxin/Pyrimethamin in dieser Region hin. Diese Studie unterstützt somit die Entscheidung eines Regimewechsels. Ob dieser zugunsten der Kombination Artemether/Lumefantrin (Riamet®) sinnvoll war, wird die Zukunft zeigen, da dieses Medikament kostspielig und nur bedingt verfügbar ist. Eine andere Alternative wäre das Präparat Chlorproguanil/Dapson (LapDap®), das als preisgünstige, bereits verfügbare und effektive Behandlungsalternative für SP-

resistente Malariaerreger empfohlen wird. Aufgrund der kurzen Eliminationshalbwertszeit wird der Selektionsdruck auf den Erreger reduziert.

Die Anwendbarkeit der molekularen Marker in epidemiologischen Studien wurde durch mehrere Untersuchungen postuliert. Es werden aber regelmäßige Studien nötig sein, um diese Ergebnisse zu verifizieren.

7. Abkürzungen

A:	Adenin	Mix:	Mischinfektion
Ala:	Alanin	Mt:	Mutation
Arg:	Argenin	N:	Asparagin
AS:	Aminosäure	PABA:	p-Aminobenzoessäure
Asn:	Asparagin	PCR:	Polymerase Kettenreaktion
Asp:	Asparaginsäure	<i>Pfcr1</i> :	<i>P. falciparum</i> chloroquine resistant transporter
bp:	Basenpaar	<i>Pfmdr1</i> :	<i>P. falciparum</i> multidrug resistance
BSA:	bovine serum albumine	R:	Arginin
C:	Cytosin	RFLP:	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
CQ:	Chloroquin	Ser:	Serin
CQR:	Chloroquin Resistenz	SP:	Sulfadoxin/Pyrimethamin
<i>Cytb</i> :	Cytochrom b	T:	Threonin
<i>Dhfr</i> :	Dihydrofolat Reduktase	TAE:	Tris-Acetat+EDTA
<i>Dhps</i> :	Dihydropteroat Synthetase	Taq:	Thermus aquaticus
DMSO:	Dimethylsulfoxid	Thr:	Threonin
DNA:	Desoxyribonukleinsäure	V:	Valin
E:	Glutamat	Val:	Valin
EDTA:	Ethylene diamine tetraacetic acid	w:	weiblich
G:	Guanin	WHO:	World Health Organisation
Glu:	Glutamat	Wt:	Wildtyp
I:	Isoleucin	Y:	Tyrosin
Ile:	Isoleucin		
K:	Lysin		
L:	Leucin		
Leu:	Leucin		
Lys:	Lysin		
m:	männlich		

8. Standardisierter Fragebogen

Clinical form for Plasmodium falciparum resistance study

Serial ID No.:.....

Hospital No.:.....			
Date:...../...../.....			
<u>Patient's particulars:</u>			
Age:.....		Sex: male <input type="radio"/> female <input type="radio"/>	
Place of living: urban <input type="radio"/> rural <input type="radio"/>			
Weight:.....kg	Height:.....cm	Temperature:.....°C	

Initials of clinician:.....

Symptoms/Signs

	Yes (please tick)	No (please tick)	Duration of symptoms (days)
Fever			
Shivering			
Headache			
Joint pain			
Nausea			
Diarrhea			
others(specify)			

Does the patient have any other known illnesses? Yes No
 If yes, please mention type of illness:

Does the patient currently take any medicine regularly? (other than antimalarial drugs)
 If yes, please mention the medicine:

Does the patient have malaria/fever within the last 6 weeks? Yes No
 Does the patient take any antimalarial drugs within the last 6 weeks? Yes No
 If yes, please mention type of drugs:

Laboratory result:			
Thick smear		Positive <input type="radio"/> Negative <input type="radio"/>	
Thin smear		Positive <input type="radio"/> Negative <input type="radio"/>	
Falciparum	<input type="radio"/>	Malariae	<input type="radio"/>
Ovale	<input type="radio"/>	Vivax	<input type="radio"/>

9. Literaturverzeichnis

1. **Aktorics K, F. U., Hofmann F, Starke K.** 2005. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban und Fischer.
2. **Alonso, P. L., J. Sacarlal, J. J. Aponte, A. Leach, E. Macete, P. Aide, B. Sigauque, J. Milman, I. Mandomando, Q. Bassat, C. Guinovart, M. Espasa, S. Corachan, M. Lievens, M. M. Navia, M. C. Dubois, C. Menendez, F. Dubovsky, J. Cohen, R. Thompson, and W. R. Ballou.** 2005. Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of Plasmodium falciparum disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet* **366**:2012-8.
3. **Basco, L. K., and P. Ringwald.** 1997. pfm₁ gene mutation and clinical response to chloroquine in Yaounde, Cameroon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **91**:210-1.
4. **Bjorkman, A., and P. A. Phillips-Howard.** 1991. Adverse reactions to sulfa drugs: implications for malaria chemotherapy. *Bull World Health Organ* **69**:297-304.
5. **Bloland, P. B., E. M. Lackritz, P. N. Kazembe, J. B. Were, R. Steketee, and C. C. Campbell.** 1993. Beyond chloroquine: implications of drug resistance for evaluating malaria therapy efficacy and treatment policy in Africa. *J Infect Dis* **167**:932-7.
6. **Brandling-Bennett, A. D., A. J. Oloo, W. M. Watkins, D. A. Boriga, D. M. Kariuki, and W. E. Collins.** 1988. Chloroquine treatment of falciparum malaria in an area of Kenya of intermediate chloroquine resistance. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **82**:833-7.
7. **Brooks, D. R., P. Wang, M. Read, W. M. Watkins, P. F. Sims, and J. E. Hyde.** 1994. Sequence variation of the hydroxymethyl-dihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, Plasmodium falciparum, with differing resistance to sulfadoxine. *Eur J Biochem* **224**:397-405.
8. **Bwijo, B., A. Kaneko, M. Takechi, I. L. Zungu, Y. Moriyama, J. K. Lum, T. Tsukahara, T. Mita, N. Takahashi, Y. Bergqvist, A. Bjorkman, and T. Kobayakawa.** 2003. High prevalence of quintuple mutant dhps/dhfr genes in Plasmodium falciparum infections seven years after introduction of sulfadoxine and pyrimethamine as first line treatment in Malawi. *Acta Trop* **85**:363-73.
9. **Carvalho, L. J., C. T. Daniel-Ribeiro, and H. Goto.** 2002. Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects. *Scand J Immunol* **56**:327-43.
10. **Cowman, A. F., M. J. Morry, B. A. Biggs, G. A. Cross, and S. J. Foote.** 1988. Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of Plasmodium falciparum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:9109-13.

11. **Davies, C. S., M. Pudney, P. J. Matthews, and R. E. Sinden.** 1989. The causal prophylactic activity of the novel hydroxynaphthoquinone 566C80 against *Plasmodium berghei* infections in rats. *Acta Leiden* **58**:115-28.
12. **Davies, C. S., M. Pudney, J. C. Nicholas, and R. E. Sinden.** 1993. The novel hydroxynaphthoquinone 566C80 inhibits the development of liver stages of *Plasmodium berghei* cultured in vitro. *Parasitology* **106** (Pt 1):1-6.
13. **Djimde, A., O. K. Doumbo, J. F. Cortese, K. Kayentao, S. Doumbo, Y. Diourte, A. Dicko, X. Z. Su, T. Nomura, D. A. Fidock, T. E. Wellems, C. V. Plowe, and D. Coulibaly.** 2001. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med* **344**:257-63.
14. **Durrhelm, D. N., P. J. Becker, K. Billingham, and A. Brink.** 1997. Diagnostic disagreement--the lessons learnt from malaria diagnosis in Mpumalanga. *S Afr Med J* **87**:609-11.
15. **Egan, T. J.** 2001. Structure-function relationships in chloroquine and related 4-aminoquinoline antimalarials. *Mini Rev Med Chem* **1**:113-23.
16. **Famin, O., M. Krugliak, and H. Ginsburg.** 1999. Kinetics of inhibition of glutathione-mediated degradation of ferriprotoporphyrin IX by antimalarial drugs. *Biochem Pharmacol* **58**:59-68.
17. **Farcas, G. A., K. J. Zhong, T. Mazzulli, and K. C. Kain.** 2004. Evaluation of the RealArt Malaria LC real-time PCR assay for malaria diagnosis. *J Clin Microbiol* **42**:636-8.
18. **Farnert, A., A. P. Arez, A. T. Correia, A. Bjorkman, G. Snounou, and V. do Rosario.** 1999. Sampling and storage of blood and the detection of malaria parasites by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **93**:50-3.
19. **Farnert, A., J. Lindberg, P. Gil, G. Swedberg, Y. Berqvist, M. M. Thapar, N. Lindegardh, S. Berezcky, and A. Bjorkman.** 2003. Evidence of *Plasmodium falciparum* malaria resistant to atovaquone and proguanil hydrochloride: case reports. *Bmj* **326**:628-9.
20. **Ferone, R.** 1977. Folate metabolism in malaria. *Bull World Health Organ* **55**:291-8.
21. **Fidock, D. A., T. Nomura, A. K. Talley, R. A. Cooper, S. M. Dzekunov, M. T. Ferdig, L. M. Ursos, A. B. Sidhu, B. Naude, K. W. Deitsch, X. Z. Su, J. C. Wootton, P. D. Roepe, and T. E. Wellems.** 2000. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* **6**:861-71.
22. **Fivelman, Q. L., G. A. Butcher, I. S. Adagu, D. C. Warhurst, and G. Pasvol.** 2002. Malarone treatment failure and in vitro confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. *Malar J* **1**:1.

23. **Fleck, S. L., M. Pudney, and R. E. Sinden.** 1996. The effect of atovaquone (566C80) on the maturation and viability of *Plasmodium falciparum* gametocytes in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **90**:309-12.
24. **Flueck, T. P., T. Jelinek, A. H. Kilian, I. S. Adagu, G. Kabagambe, F. Sonnenburg, and D. C. Warhurst.** 2000. Correlation of in vivo-resistance to chloroquine and allelic polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Uganda. *Trop Med Int Health* **5**:174-8.
25. **Foote, S. J., and A. F. Cowman.** 1994. The mode of action and the mechanism of resistance to antimalarial drugs. *Acta Trop* **56**:157-71.
26. **Foote, S. J., D. Galatis, and A. F. Cowman.** 1990. Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:3014-7.
27. **Foote, S. J., D. E. Kyle, R. K. Martin, A. M. Oduola, K. Forsyth, D. J. Kemp, and A. F. Cowman.** 1990. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature* **345**:255-8.
28. **Fowler, R. E., P. F. Billingsley, M. Pudney, and R. E. Sinden.** 1994. Inhibitory action of the anti-malarial compound atovaquone (566C80) against *Plasmodium berghei* ANKA in the mosquito, *Anopheles stephensi*. *Parasitology* **108** (Pt 4):383-8.
29. **Fry, M., and M. Pudney.** 1992. Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochem Pharmacol* **43**:1545-53.
30. **Gebru-Woldearegai, T., A. Hailu, M. P. Grobusch, and J. F. Kun.** 2005. Molecular surveillance of mutations in dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes of *Plasmodium falciparum* in ethiopia. *Am J Trop Med Hyg* **73**:1131-4.
31. **Gil, J. P., F. Nogueira, J. Stromberg-Norklit, J. Lindberg, M. Carrolo, C. Casimiro, D. Lopes, A. P. Arez, P. V. Cravo, and V. E. Rosario.** 2003. Detection of atovaquone and Malarone resistance conferring mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b gene (cytb). *Mol Cell Probes* **17**:85-9.
32. **Gilles HM, W. D.** 1993. *Diagnostic methods in malaria*, London.
33. **Greenberg, A. E., M. Ntumbanzondo, N. Ntula, L. Mawa, J. Howell, and F. Davachi.** 1989. Hospital-based surveillance of malaria-related paediatric morbidity and mortality in Kinshasa, Zaire. *Bull World Health Organ* **67**:189-96.
34. **Hill, A. V.** 2006. Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. *Nat Rev Immunol* **6**:21-32.
35. **Jambou, R., E. Legrand, M. Niang, N. Khim, P. Lim, B. Volney, M. T. Ekala, C. Bouchier, P. Esterre, T. Fandeur, and O. Mercereau-Puijalon.** 2005.

- Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet* **366**:1960-3.
36. **Jelinek, T., A. M. Ronn, M. M. Lemnge, J. Curtis, J. Mhina, M. T. Duraisingh, I. C. Bygbjerg, and D. C. Warhurst.** 1998. Polymorphisms in the dihydrofolate reductase (DHFR) and dihydropteroate synthetase (DHPS) genes of *Plasmodium falciparum* and in vivo resistance to sulphadoxine/pyrimethamine in isolates from Tanzania. *Trop Med Int Health* **3**:605-9.
37. **Jima, D., G. Tesfaye, A. Medhin, A. Kebede, D. Argaw, and O. Babaniyi.** 2005. Efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in Ethiopia. *East Afr Med J* **82**:391-5.
38. **Kessl, J. J., K. H. Ha, A. K. Merritt, B. B. Lange, P. Hill, B. Meunier, S. R. Meshnick, and B. L. Trumpower.** 2005. Cytochrome b mutations that modify the ubiquinol-binding pocket of the cytochrome bc1 complex and confer anti-malarial drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**:17142-8.
39. **Korenromp, E. L., B. G. Williams, E. Gouws, C. Dye, and R. W. Snow.** 2003. Measurement of trends in childhood malaria mortality in Africa: an assessment of progress toward targets based on verbal autopsy. *Lancet Infect Dis* **3**:349-58.
40. **Korsinczky, M., N. Chen, B. Kotecka, A. Saul, K. Rieckmann, and Q. Cheng.** 2000. Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2100-8.
41. **Krishna, S., A. C. Uhlemann, and R. K. Haynes.** 2004. Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resist Updat* **7**:233-44.
42. **Kublin, J. G., J. F. Cortese, E. M. Njunju, R. A. Mukadam, J. J. Wirima, P. N. Kazembe, A. A. Djimde, B. Kouriba, T. E. Taylor, and C. V. Plowe.** 2003. Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis* **187**:1870-5.
43. **Kublin, J. G., F. K. Dzinjalama, D. D. Kamwendo, E. M. Malkin, J. F. Cortese, L. M. Martino, R. A. Mukadam, S. J. Rogerson, A. G. Lescano, M. E. Molyneux, P. A. Winstanley, P. Chimpeni, T. E. Taylor, and C. V. Plowe.** 2002. Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* **185**:380-8.
44. **Lang W., L. T.** 2000. *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
45. **Lee, M. A., C. H. Tan, L. T. Aw, C. S. Tang, M. Singh, S. H. Lee, H. P. Chia, and E. P. Yap.** 2002. Real-time fluorescence-based PCR for detection of malaria parasites. *J Clin Microbiol* **40**:4343-5.

46. **Lopes, D., F. Nogueira, J. P. Gil, C. Ferreira, V. E. do Rosario, and P. Cravo.** 2002. *pfcr* and *pfmdr1* mutations and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* from Sao Tome and Principe, West Africa. *Ann Trop Med Parasitol* **96**:831-4.
47. **Mayor, A. G., X. Gomez-Olive, J. J. Aponte, S. Casimiro, S. Mabunda, M. Dgedge, A. Barreto, and P. L. Alonso.** 2001. Prevalence of the K76T mutation in the putative *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcr*) gene and its relation to chloroquine resistance in Mozambique. *J Infect Dis* **183**:1413-6.
48. **Mberu, E. K., M. K. Mosobo, A. M. Nzila, G. O. Kokwaro, C. H. Sibley, and W. M. Watkins.** 2000. The changing in vitro susceptibility pattern to pyrimethamine/sulfadoxine in *Plasmodium falciparum* field isolates from Kilifi, Kenya. *Am J Trop Med Hyg* **62**:396-401.
49. **McCutchan, T. F.** 1988. Pyrimethamine resistance in malaria parasites. *Parasitol Today* **4**:64-5.
50. **Mita, T., A. Kaneko, J. K. Lum, B. Bwijo, M. Takechi, I. L. Zungu, T. Tsukahara, K. Tanabe, T. Kobayakawa, and A. Bjorkman.** 2003. Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene mutation K76T following the discontinuance of chloroquine use in Malawi. *Am J Trop Med Hyg* **68**:413-5.
51. **Molyneux, D. H., K. Floyd, G. Barnish, and E. M. Fevre.** 1999. Transmission control and drug resistance in malaria: a crucial interaction. *Parasitol Today* **15**:238-40.
52. **Mugittu, K., S. Abdulla, N. Falk, H. Masanja, I. Felger, H. Mshinda, H. P. Beck, and B. Genton.** 2005. Efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine in Tanzania after two years as first-line drug for uncomplicated malaria: assessment protocol and implication for treatment policy strategies. *Malar J* **4**:55.
53. **Mugittu, K., M. Ndejemi, A. Malisa, M. Lemnge, Z. Premji, A. Mwita, W. Nkya, J. Kataraihya, S. Abdulla, H. P. Beck, and H. Mshinda.** 2004. Therapeutic efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine and prevalence of resistance markers in Tanzania prior to revision of malaria treatment policy: *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase mutations in monitoring in vivo resistance. *Am J Trop Med Hyg* **71**:696-702.
54. **Mutabingwa, T., A. Nzila, E. Mberu, E. Nduati, P. Winstanley, E. Hills, and W. Watkins.** 2001. Chlorproguanil-dapsone for treatment of drug-resistant *falciparum* malaria in Tanzania. *Lancet* **358**:1218-23.
55. **Nzila, A. M., E. K. Mberu, J. Sulo, H. Dayo, P. A. Winstanley, C. H. Sibley, and W. M. Watkins.** 2000. Towards an understanding of the mechanism of pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: genotyping of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of Kenyan parasites. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:991-6.

56. **Nzila, A. M., E. Nduati, E. K. Mberu, C. Hopkins Sibley, S. A. Monks, P. A. Winstanley, and W. M. Watkins.** 2000. Molecular evidence of greater selective pressure for drug resistance exerted by the long-acting antifolate Pyrimethamine/Sulfadoxine compared with the shorter-acting chlorproguanil/dapsone on Kenyan Plasmodium falciparum. *J Infect Dis* **181**:2023-8.
57. **Peterson, D. S., W. K. Milhous, and T. E. Wellems.** 1990. Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in Plasmodium falciparum malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:3018-22.
58. **Peterson, D. S., D. Walliker, and T. E. Wellems.** 1988. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:9114-8.
59. **Pillai, D. R., A. C. Labbe, V. Vanisaveth, B. Hongvangthong, S. Pomphida, S. Inkathone, K. Zhong, and K. C. Kain.** 2001. Plasmodium falciparum malaria in Laos: chloroquine treatment outcome and predictive value of molecular markers. *J Infect Dis* **183**:789-95.
60. **Plowe, C. V.** 2003. Monitoring antimalarial drug resistance: making the most of the tools at hand. *J Exp Biol* **206**:3745-52.
61. **Plowe, C. V., J. F. Cortese, A. Djimde, O. C. Nwanyanwu, W. M. Watkins, P. A. Winstanley, J. G. Estrada-Franco, R. E. Mollinedo, J. C. Avila, J. L. Cespedes, D. Carter, and O. K. Doumbo.** 1997. Mutations in Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *J Infect Dis* **176**:1590-6.
62. **Price, R. N., F. Nosten, C. Luxemburger, F. O. ter Kuile, L. Paiphun, T. Chongsuphajaisiddhi, and N. J. White.** 1996. Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *Lancet* **347**:1654-8.
63. **Schwobel, B., M. Alifrangis, A. Salanti, and T. Jelinek.** 2003. Different mutation patterns of atovaquone resistance to Plasmodium falciparum in vitro and in vivo: rapid detection of codon 268 polymorphisms in the cytochrome b as potential in vivo resistance marker. *Malar J* **2**:5.
64. **Sendagire, H., M. Kaddumukasa, D. Ndagire, C. Aguttu, M. Nassejje, M. Pettersson, G. Swedberg, and F. Kironde.** 2005. Rapid increase in resistance of Plasmodium falciparum to chloroquine-Fansidar in Uganda and the potential of amodiaquine-Fansidar as a better alternative. *Acta Trop* **95**:172-82.
65. **Sibley, C. H., J. E. Hyde, P. F. Sims, C. V. Plowe, J. G. Kublin, E. K. Mberu, A. F. Cowman, P. A. Winstanley, W. M. Watkins, and A. M. Nzila.** 2001. Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in Plasmodium falciparum: what next? *Trends Parasitol* **17**:582-8.
66. **Singh, B., A. Bobogare, J. Cox-Singh, G. Snounou, M. S. Abdullah, and H. A. Rahman.** 1999. A genus- and species-specific nested polymerase chain

- reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg* **60**:687-92.
67. **Snounou, G., S. Viriyakosol, X. P. Zhu, W. Jarra, L. Pinheiro, V. E. do Rosario, S. Thaithong, and K. N. Brown.** 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* **61**:315-20.
68. **Snow, R. W., J. F. Trape, and K. Marsh.** 2001. The past, present and future of childhood malaria mortality in Africa. *Trends Parasitol* **17**:593-7.
69. **Srivastava, I. K., J. M. Morrissey, E. Darrouzet, F. Daldal, and A. B. Vaidya.** 1999. Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites. *Mol Microbiol* **33**:704-11.
70. **Srivastava, I. K., H. Rottenberg, and A. B. Vaidya.** 1997. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *J Biol Chem* **272**:3961-6.
71. **Syafuruddin, D., J. E. Siregar, and S. Marzuki.** 1999. Mutations in the cytochrome b gene of *Plasmodium berghei* conferring resistance to atovaquone. *Mol Biochem Parasitol* **104**:185-94.
72. **Tinto, H., J. B. Ouedraogo, A. Erhart, C. Van Overmeir, J. C. Dujardin, E. Van Marck, T. R. Guiguemde, and U. D'Alessandro.** 2003. Relationship between the Pfcrt T76 and the Pfmdr-1 Y86 mutations in *Plasmodium falciparum* and in vitro/in vivo chloroquine resistance in Burkina Faso, West Africa. *Infect Genet Evol* **3**:287-92.
73. **Trape, J. F., G. Pison, M. P. Preziosi, C. Enel, A. Desgrees du Lou, V. Delaunay, B. Samb, E. Lagarde, J. F. Molez, and F. Simondon.** 1998. Impact of chloroquine resistance on malaria mortality. *C R Acad Sci III* **321**:689-97.
74. **van Hensbroek, M. B., S. Morris-Jones, S. Meisner, S. Jaffar, L. Bayo, R. Dackour, C. Phillips, and B. M. Greenwood.** 1995. Iron, but not folic acid, combined with effective antimalarial therapy promotes haematological recovery in African children after acute *falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **89**:672-6.
75. **van Vugt, M., E. Leonardi, L. Phaipun, T. Slight, K. L. Thway, R. McGready, A. Brockman, L. Villegas, S. Looareesuwan, N. J. White, and F. Nosten.** 2002. Treatment of uncomplicated multidrug-resistant *falciparum* malaria with artesunate-atovaquone-proguanil. *Clin Infect Dis* **35**:1498-504.
76. **Wang, P., C. S. Lee, R. Bayoumi, A. Djimde, O. Doumbo, G. Swedberg, L. D. Dao, H. Mshinda, M. Tanner, W. M. Watkins, P. F. Sims, and J. E. Hyde.** 1997. Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum* monitored by sequence analysis of dihydropteroate synthetase and dihydrofolate reductase alleles in a large number of field samples of diverse origins. *Mol Biochem Parasitol* **89**:161-77.

77. **Warhust David C.** 2001. A molecular marker for chloroquine-resistant malaria. *New Engl J Med* **344**:299-302.
78. **Warsame M., K. V. A., Wernsdorfer W.H., Lebbad M., Rutta A.S., Ericsson O.,** 1999. Resistance to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* in Muheza district, Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **93**:312-13.
79. **Watkins, W. M., E. K. Mberu, C. G. Nevill, S. A. Ward, A. M. Breckenridge, and D. K. Koech.** 1990. Variability in the metabolism of proguanil to the active metabolite cycloguanil in healthy Kenyan adults. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **84**:492-5.
80. **Wellems, T. E., and C. V. Plowe.** 2001. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis* **184**:770-6.
81. **Wellems, T. E., A. Walker-Jonah, and L. J. Panton.** 1991. Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:3382-6.
82. **Wernsdorfer, W. H.** 1994. Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta Trop* **56**:143-56.
83. **Wernsdorfer, W. H., and D. Payne.** 1991. The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther* **50**:95-121.
84. **WHO.** 2006. Global Health Atlas.
85. **WHO.** <https://www.int/countries/tza/en/>.
86. **WHO.** 2005. World Malaria Report 2005, Geneve.
87. **Winstanley, P.** 2001. Modern chemotherapeutic options for malaria. *Lancet Infect Dis* **1**:242-50.
88. **Wongsrichanalai, C., J. Sirichaisinthop, J. J. Karwacki, K. Congpuong, R. S. Miller, L. Pang, and K. Thimasarn.** 2001. Drug resistant malaria on the Thai-Myanmar and Thai-Cambodian borders. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **32**:41-9.
89. **Yang, H. L., D. Q. Liu, Y. M. Yang, K. G. Huang, Y. Dong, P. F. Yang, M. Z. Liao, and C. Y. Zhang.** 1997. In vitro sensitivity of *Plasmodium falciparum* to eight antimalarials in China-Myanmar and China-Lao PDR border areas. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **28**:460-4.
90. **Zolg, J. W., J. R. Plitt, G. X. Chen, and S. Palmer.** 1989. Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **36**:253-62.

10. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Thomas Löscher danke ich für die Möglichkeit, meine Promotion am Institut für Infektions- und Tropenmedizin durchzuführen und die Unterstützung bei der Durchführung der Forschungsarbeit.

Herrn PD Dr. med. Michael Hölscher danke ich für die Realisation des Auslandsaufenthaltes und die freundliche Hilfe bei Problemlösungen.

Frau Dr. Mirjam Schunk und Frau Isabel Barreto-Miranda danke ich ganz herzlich für die Betreuung und persönliche Unterstützung dieser Arbeit.

Die Realisation der Feldstudien in Tansania wären nicht möglich gewesen ohne die Bereitschaft und Mitarbeit des Mbeya Medical Research Project und den Mitarbeitern des Matema Health Care Center. Mein besonderer Dank an Dr. Samky, Dr. Maduhu, Dr. Maboko, Dr. Schimanowsky, Dr. Geis und Vera Kleinfeldt.

Einen Dank allen Angestellten des Instituts für Infektions- und Tropenmedizin, die immer mit Hilfe und Rat zur Seite standen, besonders an Erna Fleischmann für praktische Unterstützung und Motivation und Dr. rer. nat. Elmar Saathoff für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Außerdem möchte ich meiner Familie für die großartige Unterstützung während dieser Zeit danken.

11. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Mirjam Nicole Schönfeld
Geburtsdatum: 20.05.1980
Geburtsort: Regensburg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

1986 - 1990 Grundschole Königswiesen, Regensburg
1990 - 1999 Von -Müller-Gymnasium, Regensburg
04/2001 - 12/ 2007 Studium der Humanmedizin an der Ludwig -
Maximilians-Universität München

Studienbezogene Praktikas

Famulaturen:

08/03 - 09/03 Kardiologie, Krankenhaus am Prenzlauerberg,
Berlin
02/04 - 03/04 Anästhesie, LMU, München
04/04 Radiologie, LMU, München
08/04 - 09/04 Innere Medizin, Matema Hospital, Tansania
02/05 - 03/05 Allgemeinmedizin, Praxis Dr.Weber, Augsburg

Praktisches Jahr:

08/06 - 10/06 Chirurgie, Royal Norh Shore Hospital, Sydney
10/06 - 12/06 Chirurgie, KH Traunstein
12/06 - 01/07 Gynäkologie, LMU, München
02/07 - 03/07 Gynäkologie, Harare, Zimbabwe
04/07 - 07/07 Innere Medizin, KH Dritter Orden, München