**Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin**

der Medizinischen Klinik
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Leiter
Professor Dr.med. Thomas Löscher

# Korrelation von *in vivo*-Resistenz gegen Chloroquin mit allelischen Polymorphismen bei *Plasmodium falciparum*-Isolaten aus Uganda

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

vorgelegt von

Thomas Paul Franz Flüeck
aus Landshut

2002

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München**

| | |
|---|---|
| Berichterstatter: | Prof. Dr. med. T. Löscher |
| Mitberichterstatter: | Priv.Doz. Dr. J. Haas |
| | Prof. Dr. med. Pilars de Pilar |
| Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: | Priv.Doz. Dr. med. T. Jelinek |
| Dekan: | Prof. Dr. med. Dr. h.c. K.Peter |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 25.04.2002 |

Auszüge der Arbeit wurden mit schriftlicher Genehmigung des Dekanats vom 5.4.2000 von den Autoren Flüeck TPF, Jelinek T, Kilian AHDE, Adagu IS, Kabagambe G, von Sonnenburg F und Warhurst DC unter dem Titel „Correlation of *in vivo*-resistance to chloroquine and allelic polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Uganda“ im Journal *Tropical Medicine and International Health*, Ausgabe 5, No.3, S.174-178, März 2000 veröffentlicht.

# Inhaltsverzeichnis

**1. Einleitung** **3**

**1.1. Die *Malaria tropica*** **3**

1.1.1. Verbreitung der Malaria 3

1.1.2. Übertragung, Pathogenese und Krankheitsbild der *Malaria tropica* 3

1.1.3. Maßnahmen der Malariabekämpfung 5

**1.2. Chloroquinresistenz** **7**

1.2.1. Verbreitung der Chloroquinresistenz 9

1.2.2. Wirkungsweise von Chloroquin 10

1.2.3. Mechanismus der Chloroquinresistenz 14

1.2.4. Molekulargenetische Ursachen der Resistenz 16

**2. Problemstellung und Zielsetzung** **22**

**3. Methoden, Materialien und Durchführung** **26**

**3.1. Prinzip der verwendeten molekulargenetischen Methoden** **26**

3.1.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) 26

3.1.2. Restriktionsanalyse (RFLP) 28

3.1.3. Agarosegelelektrophorese 28

**3.2. Fachausdrücke und Definitionen der Malariagenetik** **29**

**3.3. Material** **30**

3.3.1. Herkunft der Proben und klinischen Daten 30

3.3.2. Geräte 34

3.3.3. Chemikalien 34

3.3.4. Reaktionspuffer 34

3.3.5. Enzyme 35

3.3.6. Nukleotide 35

**3.4. Durchführung** **36**

3.4.1. labortechnische Durchführung und Förderung der Forschung 36

3.4.2. DNA-Präparation 36

3.4.3. DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) 38

3.4.4. Agarosegelelektrophorese 40

3.4.5. Restriktionsanalyse der DNA (RFLP) 41

3.4.6. Kontrolle der RFLP mittels Agarosegelelektrophorese 44

3.4.7. Allelspezifische Polymerasekettenreaktion (AS-PCR) 44
3.4.8. Maßnahmen zur Sicherstellung der Ergebnistreue 47

**4. Ergebnisse 50**
**4.1. Ergebnisse der Genanalyse 50**
4.1.1. Eignung der PCR 50
4.1.2. Codon 86 51
4.1.3. Codon 1042 53
4.1.4. Codon 1246 54
4.1.5. Codon 184 56
**4.2. Resistenzstatus der Proben 58**
**4.3. Korrelation mit Chloroquinresistenz 58**
4.3.1. Codons 86, 1042 und 1246 58
4.3.2. Codon 184 64
**4.4. Signifikanz der Ergebnisse 64**

**5. Diskussion 65**
**5.1. Charakterisierung der Studie 66**
**5.2. Vergleich mit anderen Studien 68**
5.2.1. Studien am *Pfmdr1*-Gen 68
5.2.2. Studien am *Cg2*-Gen 71
5.2.3. Studien am *Pfcrt*-Gen 74
5.2.4. Der multigenetische Ansatz 76
5.2.5. *in vitro*-Ergebnisse im Vergleich zu *in vivo*-Daten 79
5.2.6. Geographische Unterschiede 81
**5.3. Schlussfolgerungen 82**

**6. Zusammenfassung 86**

**7. Abkürzungen 88**

**8. Literaturverzeichnis 89**

# 1. Einleitung

## 1.1.Die *Malaria tropica*

### 1.1.1. Verbreitung der Malaria[1]

Die Malaria ist zu Beginn des 21.Jahrhunderts immer noch eine Infektionskrankheit mit weit reichender Bedeutung. Nach Angaben der WHO sind vierzig Prozent der Weltbevölkerung in hundert Ländern einem Malariarisiko unterschiedlicher Höhe ausgesetzt. Am stärksten betroffen sind das südliche Asien, Gebiete im Südwestpazifik, Teile von Zentral- und Südamerika sowie die tropischen Regionen Afrikas, in denen mehr als 90% der Malariafälle sowie der Großteil der Todesfälle gezählt werden. Die Zahl der jährlich neu auftretenden Malariafälle wird von der WHO auf 300-500 Millionen geschätzt, die der Todesfälle auf 1,5 bis 2,7 Millionen. Die große Mehrzahl der Todesfälle tritt bei jungen Kindern im tropischen Afrika auf, insbesondere in rückständigen ländlichen Gebieten mit wenig Zugang zu ärztlicher Hilfe.

### 1.1.2. Übertragung, Pathogenese und Krankheitsbild[2]

Erreger der Malaria ist das Protozoon Plasmodium. Plasmodien-Parasiten der Spezies *Plasmodium falciparum* sind mit Abstand die virulentesten Malaria-Parasiten und Verursacher so genannter *Malaria tropica*. In 92 Ländern beinhaltete die Transmission diese maligne Form der Malaria. Unbehandelt kann diese Infektionskrankheit zu fatalen Komplikationen führen. Neben *Plasmodium falciparum* existieren noch drei weitere humanpathogene, jedoch weniger gefährliche Spezies, die Malaria verursachen: *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* sind die Erreger der *Malaria tertiana*, *Plasmodium malariae* ist der Erreger der *Malaria quartana*.

[1] Informationen zur Malariaverbreitung aus: WHO wöchentlicher Bericht, Quelle http://www.who.int
[2] Informationen aus Kayser FH *et al.*: Medizinische Mikrobiologie, *Thieme Verlag*, 1993, **8.Auflage**, 445-461

Die Parasiten werden von der weiblichen Anophelesmücke übertragen. Wie alle anderen Moskitos brütet auch der Anopheles-Typ im Wasser, jede Spezies verfügt jedoch über eigene Brutgebiete, eigenes Futterverhalten und unterschiedliche Aufenthaltsorte. Ebenso ist auch die Sensitivität gegenüber Insektiziden sehr variabel.

Die ersten Entwicklungsphasen der Plasmodien erfolgen im Gastrointestinaltrakt des Moskitos, von wo sie bei der Blutmahlzeit als Sporozoiten über den Speichel des Insekts in den Menschen inokuliert werden. Dort durchlaufen sie den weiteren Entwicklungszyklus, der sich in exoerythrozytäre und erythrozytäre Stadien einteilen lässt:

Die Sporozoiten werden zunächst im Blutstrom zur Leber des Opfers übertragen, wo sie die Hepatozyten befallen und sich weiter vermehren. Nach 9 bis 16 Tagen Vermehrung im Leberparenchym kehren deren Abkömmlinge (so genannte Merozoiten) in die Blutbahn zurück (Parasitämie) und penetrieren die Erythrozyten. In diesen findet der Schizogoniezyklus statt, eine erneute Vermehrung bis hin zu Merozoiten, die nach etwa 48 Stunden zum Platzen der Blutkörperchen und damit zur Freisetzung dieser Formen führt. Wiederum befallen die Merozoiten andere Erythrozyten und durchlaufen den Schizogoniezyklus erneut. Diese Art der Vermehrung findet auf asexueller Ebene statt, gleichzeitig kommt es aber auch zur Reifung von Geschlechtsformen (Gametozyten), deren Paarung und Fortpflanzung bis hin zu einer neuen Generation von Sporozoiten aber nur nach einem weiteren Biss im Magen der Stechmücke erfolgen kann.

Die ungeschlechtliche Vermehrung in den Erythrozyten verläuft bei *Plasmodium falciparum* im Gegensatz zu den anderen Erregerspezies nicht synchronisiert. Die Freisetzung der Merozoiten führt zur Ausschüttung pyrogener Substanzen. Zusammen mit weiteren prodromalen Symptomen (Schüttelfrost, Gelenk- und Kopfschmerzen, Übelkeit, etc.) kommt es zu unregelmäßig intermittierenden Fieberanfällen und zur Anämie des infizierten

Individuums. Kreislaufstörungen mit Kollaps sowie deliriöse Zustände und weitere neurologische Ausfälle sind für die Lebensbedrohlichkeit des Krankheitsbildes bezeichnend. Bei der zerebralen Form der Malaria obstruieren die Erythrozyten Blutgefäße im Gehirn. Die Schädigung weiterer vitaler Organe kann schließlich zum Tode des Patienten führen.

In endemischen Gebieten mit hoher Transmission werden die Menschen immer wieder infiziert. Dies führt zu einer schrittweisen Entwicklung von Immunität gegen die Krankheit. Bis sie diese Immunität erworben haben, bleiben Kinder allerdings hoch gefährdet. Ebenso sind schwangere Frauen gefährdet, da deren natürliche Abwehrmechanismen während der Schwangerschaft vermindert sind [Wellems & Plowe 2001].

### 1.1.3. Maßnahmen der Malariabekämpfung[3]

Detailwissen über die Ökologie der örtlichen Insektenvektoren ist essenziell, um effektive Maßnahmen der Malariabekämpfung ergreifen zu können. Zwar sind die Symptome der Malaria seit jeher wohl bekannt, die eigentliche Ursache blieb aber lange unklar. Ursprünglich hielt man schlechte Luft (*ital. mala aria* von gr. m£loj ≅ schlecht, ¢»r ≅ Luft) in der Nähe von Sümpfen für die Ursache der Krankheit. Einige antike Behandlungen waren allerdings bemerkenswert effektiv. Chinin wurde zur Behandlung und Heilung von Millionen Kranken benutzt und erstmals 1820 von den Apothekern Pelletier und Caventou aus der Pflanze Cinchona isoliert, die schon seit 2000 Jahren in China eingesetzt worden war.

Systematische Malariabekämpfung wurde aber erst möglich, nachdem Laveran 1880 den Malariaparasit entdeckte –was ihm 1907 den Nobelpreis einbrachte- und Ross 1897 den Moskito als Vektor der Malaria identifizierte.

Während des zweiten Weltkrieges wurde die starke insektizide Wirkung des DDT erkannt.

Ebenfalls in diesem Zeitraum wurden effektive und preiswerte Antimalariamittel von der Art des Chloroquin hergestellt, einem 4-Aminochinolin. Diese Entdeckungen zogen Bekämpfungsstrategien nach sich; zwischen 1955 und 1969 ergriff die WHO zahlreiche Maßnahmen mit dem Ziel, Malaria weltweit zu eradizieren [Wellems & Plowe 2001]. Diese Initiative erwies sich in großen Gebieten Nordamerikas, Südeuropas, der früheren Sowjetunion und einigen Gebieten Asiens und Südamerikas als erfolgreich: Die Übertragung wurde dort unterbunden und die Malaria ausgerottet.

In Lateinamerika, Afrika und den meisten asiatischen Ländern waren die Erfolge allerdings recht bescheiden und die Krankheit blieb weiter bestehen. Die Probleme bei der Malariabekämpfung wurden durch inadäquate Gesundheitsstrukturen und miserable sozioökonomische Bedingungen in den Entwicklungsländern erschwert. Die mit den Kontrollprogrammen verbundenen logistischen Probleme wurden vielfach unterschätzt. Regelmäßig brachen Epidemien aus, auch in Gegenden, wo man Malaria für ausgerottet gehalten hatte.

Bis heute gibt es keinen wirksamen Impfstoff gegen Malaria. Einen gewissen Schutz bieten neben der so genannten Expositionsprophylaxe einige Chemoprophylaktika. Daneben stehen im Falle einer Erkrankung mehrere Chemotherapeutika zur Verfügung, die jeweils auf bestimmte Entwicklungsformen der Parasiten im menschlichen Organismus wirken. Folgende Medikamente sind hier –neben dem erwähnten Chloroquin (Resochin®, Bayer AG), das zum Teil in Kombination mit Proguanil (Paludrine®, Zeneca GmbH) verabreicht wird- vor allem zu nennen:

Chinin (Chininum Dihydrochloricum®, Casella-med GmbH), das Alkaloid aus der

[3] Informationen zur Geschichte der Malariabekämpfung aus: WHO wöchentlicher Bericht, Quelle http://www.who.int

Chinarinde, wird heute vor allem bei schweren Fällen von Malaria eingesetzt. Zunehmend findet Mefloquin (Lariam®, Hoffmann-La Roche AG), ein in der Struktur dem Chinin ähnliches Mittel, in der Prophylaxe und Therapie vor allem der chloroquinresistenten Malaria Gebrauch. Weniger gebräuchliche Medikamente, die zur Behandlung der Malaria eingesetzt werden, sind Halofantrin (Halfan®, Smith Klein Pharma GmbH), das in der Struktur dem Mefloquin gleicht und Tetracyclin, das allerdings für Kleinkinder und Schwangere kontraindiziert ist. Vor allem in Südostasien und Afrika greift man auch auf Co-Trimoxazol, eine Kombination aus Sulfadoxin, einem Sulfonamid, und Pyrimethamin zurück. Riamet® (Artemether-Lumefantrin, Novartis Pharma AG) hat sich als sicher und wirksam bei der Behandlung von *P.falciparum*-Malaria erwiesen und wird sechsmalig über 3 Tage verabreicht [Lefevre *et al.* 2001]. Doxycyclin (z.B. Vibramycin®, PFIZER GmbH) wird von der WHO als Prophylaktikum v.a. für Hochrisikogebiete empfohlen, in denen auch Mefloquinresistenz vorkommt. Bisher für die Behandlung akuter unkomplizierter Malaria eingesetzt, nun aber auch für die Prävention zugelassen ist ein Mischpräparat aus Atovaquon und Proguanil (Malarone®, Glaxo Wellcome, Cascan), dem in aktuellen Studien eine gute Wirksamkeit gegenüber Blutschizonten auch in Gegenden mit hoher Chloroquinresistenz bestätigt wurde [Llanos-Cuentas 2001].

## 1.2. Chloroquinresistenz (CQR)

### 1.2.1. Verbreitung der Chloroquinresistenz

Trotz aller Versuche hat man die Malaria bis heute nicht in den Griff bekommen, vor allem deshalb, weil Resistenzen gegen Insektizide und gegenüber Medikamenten auftraten, die ursprünglich erfolgreich angewendet worden waren. Besonders bedenklich ist die Resistenz gegen das am häufigsten eingesetzte Mittel: Chloroquin!

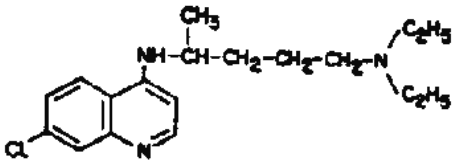

Abb.1: chemische Struktur des Chloroquin
(Quelle: Slater 1993, S.206)

Chloroquin (7-chloro-4-(4-dieethylamino-1-methylbutylamino)chinolin) (Abb.1) wurde seit seiner Entwicklung in den 40er Jahren wegen seiner Effizienz, Sicherheit, Stabilität, niedrigen Kosten und einfachen Herstellung das weitverbreiteste synthetische Antimalariamittel. Es wurde effektiv sowohl zur Prophylaxe als auch zur Behandlung einer akuten Malariainfektion angewendet. Mit dem Ziel, Malaria zu eradizieren, wurde es sogar in Lebensmittel wie z.B. Salz gemischt und einer breiten Bevölkerung zur Verfügung gestellt. Wegen der massiven Anwendung dieses Mittels wurden die Parasitenpopulationen weltweit einem enormen Selektionsdruck ausgesetzt.

Resistenzen gegen Chloroquin traten erstmals 1957 auf, nahezu gleichzeitig in Südostasien und Südamerika (Abb.2) [Payne 1987]. Nachfolgend kam es ausgehend von diesen Foci zur Ausbreitung der Resistenz; auf dem afrikanischen Kontinent wurde sie erst 20 Jahre später in Kenia beschrieben [Kean 1979].

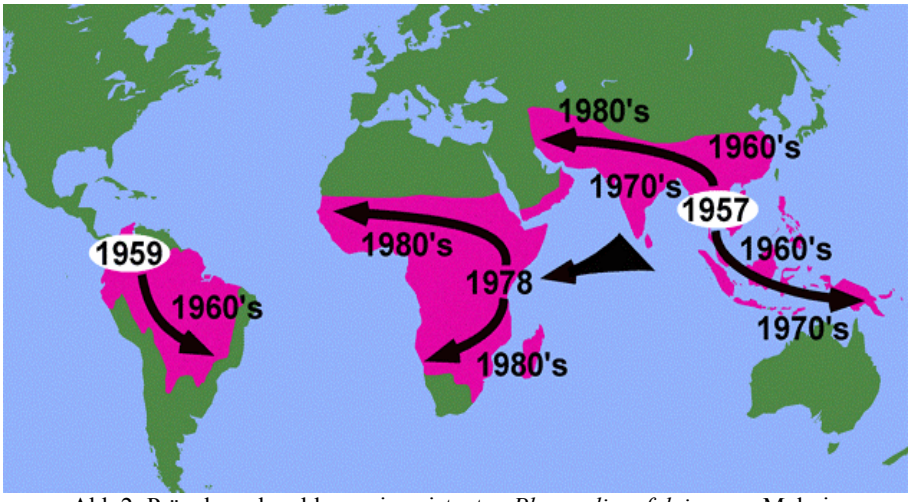


Abb.2: Prävalenz der chloroquinresistenten *Plasmodium falciparum*-Malaria
Die Ausbreitung begann in den späten 50er Jahren von zwei Foci in Südostasien und Südamerika. In Afrika wurde Chloroquinresistenz in den späten 70er Jahren in Kenya beobachet und breitete sich von dort über den Kontinent aus. [Quelle: Waters 1998]

Die Verbreitung der Resistenz hat die Möglichkeiten der klinischen Anwendbarkeit von Chloroquin substanziell beeinträchtigt. Das gesamte Ausmaß des Problems wurde im Jahr 1994 deutlich, als in fast allen Ländern, in denen *Plasmodium falciparum* endemisch ist, auch Resistenzen gegenüber Chloroquin festgestellt wurden [WHO wöchentlicher Bericht, http://www.who.int]. Die auf dem internationalen Markt erhältlichen Alternativmedikamente sind zwar zum Teil effektiv, vielfach aber für die breite Anwendung in öffentlichen Gesundheitsprogrammen zu teuer, sodass in vielen Ländern Chloroquin immer noch als Medikament erster Wahl bei der Behandlung unkomplizierter *Plasmodium falciparum*-Malaria gilt.

Das Auftreten von gleichzeitiger Resistenz gegen weitere Antimalariamittel (so genannte „multiple drug resistance“) hat die Krise weiter verschärft. Entscheidungen in der Gesundheitspolitik werden zunehmend schwieriger.

Nicht nur in vielen Ländern der Tropen ist die *Malaria tropica* zu einer schwer kontrollierbaren Bedrohung geworden. Wegen des wachsenden Fernreiseverkehrs sind auch Reisende in tropische Länder betroffen und importierte Fälle bieten daher immer öfter therapeutische Probleme.

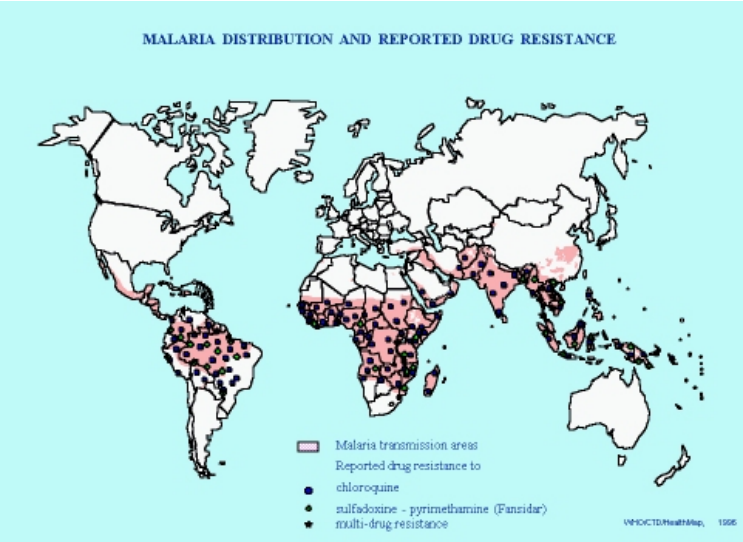


Abb.3: Malaria-Übertragungsgebiete und Gebiete mit bekannter Chloroquinresistenz
(Quelle: Internetseite der Weltbank www.worldbank.org – Malaria-Updates)

### 1.2.2. Wirkungsweise von Chloroquin

Trotz intensiver Forschungsaktivitäten sind die Zielmoleküle und Wirkmechanismen von Chloroquin und anderen Aminochinolinen nicht völlig geklärt. Mit den übrigen Aminochinolinen hat Chloroquin einige wichtige strukturelle Eigenschaften und ähnliche Effekte auf den Parasiten gemeinsam [Slater 1993]. Chemische Modifikation an den Positionen und Substituenten in der Struktur des Chloroquin können sich auf die antiparasitäre Aktivität auswirken [Ridley 1998]. Aus diesem Grunde sind bereits viele Analoga der Aminochinoline auf der Suche nach verbesserter antiparasitärer Aktivität synthetisiert und getestet worden, ohne dass ein geeignetes Ersatzmittel für Chloroquin gefunden worden wäre.

Hier sollen kurz die wichtigsten Hypothesen über die Wirkungsweise von Chloroquin widergegeben werden: Die biologischen Effekte sind offensichtlich limitiert auf jene Entwicklungsstadien des Parasiten, in denen aktiv Hämoglobin abgebaut wird. Fairley beschrieb schon 1947 morphologische Degenerationen von *P.falciparum*-Ringen, Trophozoiten, und jungen Gametozyten nach dem Kontakt mit Chloroquin. Die exoerythrozytäre Entwicklung wird durch Chloroquin nicht beeinträchtigt. Sinden [1982] beobachtete, dass die hohe Chloroquinsensitivität unreifer Gametozyten, die sich von Hämoglobin des Wirtes ernähren, im Laufe ihrer Transformation in einen reifen Gametozyten verloren geht. Slater [1993] bestätigt, dass die Verwundbarkeit von intraerythrozytären Malaria-Parasiten durch Chloroquin während ihres Katabolismus von Hämoglobin am größten ist.

Ultrastrukturelle Studien an intraerythrozytären Malaria-Parasiten haben offen gelegt, dass die Schädigung lysosomaler Strukturen die erste morphologisch greifbare Veränderung nach Chloroquinkontakt ist [Langreth *et al*, 1978] und brachten dies mit einer Anreicherung unverdauten Hämoglobins in der Nahrungsvakuole in Verbindung [Zhang 1987, Sullivan *et*

*al.* 1996; Wellems & Plowe 2001]. Von Picot *et al.* [1997] wurde die Fragmentation der parasitären DNA mit nachfolgender Apoptose beobachtet.

Im Einzelnen wird die Wirkungsweise noch kontrovers diskutiert. Übereinstimmend wird angenommen, dass die selektive Toxizität Chloroquins auf der parasitenspezifischen Anreicherung beruht [Krogstad *et al.* 1987; Bray *et al.* 1992, 1993, 1998; Martiney *et al.* 1995; Wellems & Plowe 2001]: Diese ist in infizierten Blutkörperchen mehrere hundertfach gesteigert im Vergleich zu nicht-infizierten Erythrozyten [Fitch 1969, Ferrari & Cutler 1990]. Die Energieabhängigkeit der Chloroquinaufnahme in den Parasiten könnte auf die Exposition von Rezeptorbindungsstellen hindeuten. Daher wurde ein Transporter vorgeschlagen, der an der äußeren Oberfläche des Erythrozyten, am Parasit-Erythrozyt Zwischenraum oder an der Oberfläche der Nahrungsvakuole lokalisiert ist [Bray & Ward 1998].

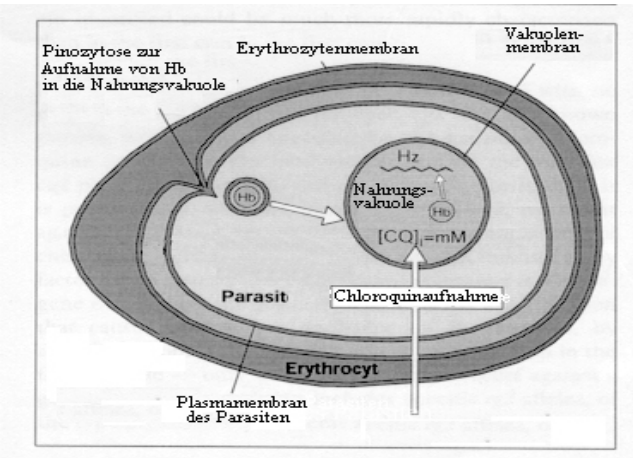


Abb.4: Schematische Darstellung eines reifen Malariaparasiten innerhalb eines Erythrozyten mit den Membranbarrieren, die von Chloroquin bis zum Erreichen der Nahrungsvakuole überwunden werden müssen, wo Hämoblobin abgebaut und zu Hämatin polymerisisiert wird.[Modifiziert nach Ridley 1998]

Fitch schlug vor, dass dieser spezifische Rezeptor nur in der infizierten Zelle vorhanden sei. Homewood *et al.* [1972] betonten, dass Chloroquin strukturell zur Familie schwacher Basen gehöre, die bei geringem pH protoniert vorliegen, bei neutralem oder alkalischem Milieu aber neutral sind. Neutrale Basen sind zugleich lipophil und gut membranpermeabel. Folglich

könnten sich die lipophilen Basen (nach Ferrari & Cutler [1990] ein äußerst geringer Anteil von 0,01% am Gesamtchloroquin) innerhalb der gesamten Zelle frei verteilen, auch in die Lysosomen permeieren, da dort aber saures Milieu herrscht, käme es unverzüglich zur Protonierung und damit zu einer impermeablen Form. Die kontinuierliche Diffusion weiterer Basen in die Lysosomen würde schließlich zur Anreicherung in diesen Organellen führen [Ferrari & Cutler 1990]. Wie Krogstad *et al.* [1985] zeigten, wird der saure pH der Nahrungsvakuole durch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Protonenleck und einer ATP-getriebenen Protonenpumpe aufrecht gehalten. Von Wunsch *et al.* [1998] wurde vorgeschlagen, dass Chloroquin in den Parasiten überhaupt erst durch den $Na^+/H^+$-Austauscher gelangen kann. Ihre Messungen an einzelnen Parasiten-Zellen ergaben, dass chloroquinresistente Parasiten beständig einen erhöhten cytoplasmatischen pH im Vergleich zu dem chloroquinsensitiver Zellen besitzen. Sanchez *et al.* [1997] bestätigen, dass die Pumpe bei der Aufnahme Chloroquins in die Zelle eine regulative Rolle spielen könnte. Wie schon Yayon *et al.* [1984, 1985] durch Modifizierungen des transvakuolären pH-Gradienten zeigen konnten, ist die Anreicherung Chloroquins in der Nahrungsvakuole und damit die Wirkung auf die vitalen Funktionen von *Plasmodium falciparum* tatsächlich pH-abhängig: Die Änderung des Protongradienten entweder durch Verminderung des extrazellulären pHs oder durch Alkalisierung der Nahrungsvakuole mit $NH_4Cl$ resultierte in einer reversiblen Verminderung der Chloroquinanreicherung am Zielort; dass aber kein direkter Austausch von Chloroquin gegen Protonen besteht, wurde von Bray *et al.* [1998] unterstrichen

Die eigentliche Wirkung von Chloroquin wurde von Parker & Irvin [1952] auf die Bindung an die parasitäre DNA zurückgeführt: Dadurch würden essenzielle zelluläre Funktionen wie Replikation und RNA-Synthese behindert und der Zelltod verursacht. Der Vorschlag von Sherman [1979] beruht darauf, dass Malariaparasiten eine große Menge an Proteinen in

verschiedenen Stadien synthetisieren und die Biochemie ähnlich zu der anderer eukaryonter Zellen ist; die Theorie führt die Chloroquinwirkung auf die Blockade dieser Proteinbiosynthese zurück. Von Slater [1993] wurde die Inhibition einer Häm-Polymerase vorgeschlagen: Wie erwähnt, internalisieren intraerythrozytäre Malariatrophozoiten Hämoglobin der sie umgebenden Blutkörperchen in ihre Lysosomen und bauen dort das Protein zu seinen Aminosäuren ab. Die Proteolyse von Hämoglobin setzt Häm frei, welches verschiedene Enzyme inhibieren kann und damit zur Anreicherung toxischer Substanzen führen kann [Van der Jagt *et al.* 1986]. Solange Häm an Globin in einer eisentragenden Form gebunden ist, kann es reversibel die Verbindung mit Sauerstoff eingehen. Wenn jedoch oxigeniertes Häm aus seiner Bindung zu Globin gelöst wird, oxidiert es und setzt nachfolgend Superoxid frei. Diese Form ist Hämatin, die zu oxidativem Stress und verschiedenen Zellschädigungen führt [Slater 1993]. Der Parasit verhindert die Akkumulation toxischer Konzentrationen freien Hämatins, indem er es in kristallines Material, so genanntes Hämozoin (Malariapigment) polymerisiert [Wellems & Plowe 2001]. Diese Formen wurden bisher nur in Malariatrophozoiten gefunden [Slater 1993] und entstehen nicht spontan unter physiologischen Bedingungen, sondern nach Slater katalysiert durch die *Hämpolymerase* [Slater 1992]: Bei Anwesenheit von Chloroquin sei die Aktivität der *Hämpolymerase* behindert und damit werde auch die Sequestration von Hämatin in Hämozoin unterbunden. Es komme zur Akkumulation von Hämatin in seiner freien Form und damit letztlich zum Zusammenbruch der lysosomalen Funktion. Andere metabolische Störungen wie der Mangel an Aminosäuren werde durch die Hemmung des Hämoglobin-Abbaus in den lysosomalen Kompartments hervorgerufen.

Wahrscheinlicher als die Theorie der *Hämpolymerase* klingt die Annahme, dass die Bildung eines Hämatin-Chloroquin-Komplexes die toxische Wirkung bewirkt [Fitch 1983]. Durch den

Komplex selbst wird die Sequestrierung in Hämozoin unterbunden [Ridley 1998]; die Chloroquin-Hämatin-Komplexe wirken membraninteraktiv und damit für den Parasiten toxisch [Ridley 1997, Carlton *et al.* 2001]. Dies wurde auch von Sullivan *et al.* [1996] und Dorn *et al.* [1998] bestätigt.

### 1.2.3. Mechanismus der Chloroquinresistenz

So wenig der genaue Wirkmechanismus Chloroquins gesichert ist, so unklar sind die Erkenntnisse über den Mechanismus der gegen den Wirkstoff gerichteten Resistenz, obwohl er seit Jahren Gegenstand der Forschung ist [Wellems & Plowe 2001].

Anzunehmen ist, dass es bei resistenten Parasiten zu molekularen Veränderungen der Zielstrukturen von Chloroquin kommt oder zu einer Verminderung der Konzentration von Chloroquin in der Nachbarschaft dieser Zielstrukturen [Bray *et al.* 1992, 1993, 1998 Okt; Fitch 1969; Yayon *et al.* 1984; Wellems & Plowe 2001].

Es wurde vorgeschlagen, dass die verminderte Konzentration auf einer geringeren Aufnahme des Wirkstoffes beruht [Ridley 1998]. Mögliche Gründe für eine reduzierte Aufnahme sind Änderungen im pH-Gradienten beidseits der Membran der Nahrungsvakuole bzw. zwischen dem Parasit und Erythrozytenzytosol [Dzekunov *et al.* 2000, Wellems & Plowe 2001], Veränderungen in der Membranpermeabilität oder der Spezifität einer Permease bzw. eines anderen Transporters [Krogstad *et al.* 1987]. Veränderungen in einem Molekül wie z.B. einem Protein, das mit Hämatin in der Nahrungsvakuole assoziiert ist und das die Erreichbarkeit Hämatins für den Wirkstoff Chloroquin beeinträchtigt, sind ebenfalls denkbar [Ridley 1998, Carlton *et al.* 2001].

Im Gegensatz dazu wurde die Hypothese aufgestellt, dass die erniedrigte Konzentration Chloroquins im resistenten *Plasmodium* das Ergebnis eines Effluxmechanismus und hierbei eine Effluxpumpe beteiligt ist [Bayoumi *et al.* 1994; Cowman & Karcz 1991; Foote *et al.* 1990; Karcz & Cowman 1991; Krogstad *et al.* 1987*,* 1992; Riordan *et al.* 1985; Wellems *et al.* 1990; Wilson *et al.* 1989]. Die Theorie des aktiven Effluxes kann als wichtiger Meilenstein gewertet werden: Dieser Mechanismus ähnelt demjenigen der so genannten „multiple drug resistance" verschiedener Tumorzellen [Endicott & Ling 1989; Karcz & Cowman 1991, Krogstad *et al.*1987]. Ein solcher Phänotyp wird häufig in Zelllinien beobachet, die für Resistenz gegen ein einzelnes Agens selektiert wurden. [Bray & Ward, 1998]. Die Resistenz der Tumorzellen ist bedingt durch Amplifikation [Riordan 1985] eines „multiple drug resistance*"(mdr)*-Gens. Das exprimierte Genprodukt, das so genannte P-Glycoprotein, wirkt als ATP-getriebene Effluxpumpe zytotoxischer Substanzen. [Cowman & Karcz 1991; Foote *et al.* 1990; Karcz & Cowman 1991; Riordan *et al.* 1985; Wilson *et al.* 1989].

Mittels Immunfluoreszenztechnik wurde ein dem P-Glycoprotein homologes Protein *(Pgh1* = P-Glycoprotein Homolog 1*)* von etwa 160.000 Dalton an der Vakuolenmembran von *Plasmodium falciparum* identifiziert [Cowman & Karcz 1991; Cremer *et al.* 1995 Endicott & Ling 1989; Krogstad 1987; Yayon *et al.* 1984, 1985], das zu 33% mit der Aminosäuresequenz des menschlichen P-Glycoproteins identisch ist [Ullmann 1995] und in ähnlicher Weise Chloroquin ausstoßen (bis zu 50-fach gesteigerter Efflux) oder auf andere Weise seine Akkumulation in den Vesikeln vermindern könnte [Krogstad 1987; Ruetz *et al.* 1996; Yayon *et al.* 1984, 1985]. Folglich kann Chloroquin nicht mehr in ausreichender Konzentration an seinen Wirkungsort gelangen und der Parasit „ungestört" die toxischen Komponenten verarbeiten, die beim Verdau des Hämoglobins in den Erythrozyten anfallen [Ward 1988]. Ein zusätzlicher Hinweis auf die Beteiligung von *Pgh1* ist, dass es genau in den

erythrozytären asexuellen Entwicklungsstadien exprimiert wird, in denen Chloroquin normalerweise seine antiparasitäre Wirkung entfaltet [Foote *et al.* 1989, Cowman & Karcz 1991]. Van Es *et al.* [1994 Dez.] haben mit Ovarzellen von chinesischen Hamstern experimentiert und festgestellt, dass Pgh1 beim Austausch von Chlorid-Ionen beteiligt ist und somit den pH innerhalb der Nahrungsvakuole reguliert. Zumindest hat die Pgh1-Expression so auf Hefezellen zu zellulärer Resistenz gegenüber Mefloquin, Chinin und Halofantrin geführt [Ruetz *et al.* 1996].

Eine weitere Parallele zwischen Tumorzellen und den Plasmodien wird in der Auswirkung von Modulatorsubstanzen deutlich, die den Effluxmechanismus des P-Glycoproteins hemmen, somit eine Anreicherung Chloroquins bewirken und die Resistenz dadurch rückgängig machen können. [Martin *et al.* 1987]. Diese Reversibilität der Resistenz findet sich *in vitro* auch im Parasit, wie etwa die Wirkung des Calciumkanalblockers Verapamil als Modulatorsubstanz zeigt [Krogstad *et al.* 1987; Bayoumi *et al.* 1994]. Nach Cowman & Karcz [1991] könnte die Wirkung von Verapamil darauf beruhen, dass es an das P-Glycoprotein bindet und somit den Efflux verhindert. Jacobs *et al.* [1988] stellten nach Applikation von Verapamil sekundär ultrastrukturelle morphologische Veränderungen wie Degeneration der Nuklei, Mitochondrien und anderer Zellorganelle fest. Dies spricht für die erhöhte Konzentrationen von Chloroquin. Weitere sensitivierende Wirkstoffe sind Diltiazem, Galopamil, Chlorpromazin und Desipramin [Bray & Ward 1998].

Dennoch ist nicht klar, ob *Pgh*s eigentliche Wirkung nun wirklich im Efflux besteht oder ob das Protein gar Chloroquin in die Zelle pumpt und in dieser Funktion nur durch bestimmte genetische Veränderungen behindert wird, die dem Parasiten die Fähigkeit zur Resistenz verleihen [Bray & Ward 1998]. Die Analyse von Ginsburg & Stein [1991] konnte keine Aktivität einer “Pumpe” nachweisen und auch keine Änderung der Effluxkinetik bei

verschiedenen Resistenzstufen. Die Rolle von *Pgh* wurde auch anderweitig kontrovers diskutiert: Cremer *et al.* [1995] konnten in ihren Experimenten keine Auswirkungen dieses *Pfmdr1*-Produktes auf die CQR nachweisen: mit verschiedenen Antikörpern und mittels Immunfluoreszenztechnik wiesen sie zwar das 160kDa große Proteinprodukt bei klinischen Isolaten und Klonen unterschiedlicher Herkunft nach, allerdings unabhängig vom Ausmaß der Resistenz gegen Chloroquin oder der Modulation der Chloroquinanreicherung durch Desipramin.

### 1.2.4. Molekulargenetische Ursachen der Resistenz

Die zum erwähnten *mdr*-Gen von Tumorzellen homologen Gene des Malariaparasiten werden in Anlehnung als „*Plasmodium falciparum multiple drug resistance*-Gene“ (*Pfmdr1* und *Pfmdr2*) bezeichnet und sind auf Chromosom 5 und 14 lokalisiert. Dem *Pfmdr2*-Gen wird keine Funktion bei der Chloroquinresistenz zugeschrieben [Cowman & Karcz 1991; Rubio & Cowman 1994; Wilson *et al.* 1993; Zalis *et al.* 1993, 1994]. Es wurde berichtet, dass das *Pfmdr1*-Gen das bereits erwähnte *Pgh1* kodiert [Foote *et al.* 1989; Triglia *et al.* 1991; Wilson *et al.* 1989] und in einigen chloroquinresistenten *Plasmodium falciparum*-Stämmen amplifiziert vorkommt. Die Studie von Triglia *et al.* [1991] machte deutlich, dass die Amplifikation auf Grund von multiplen unabhängigen Ereignissen aufgetreten sei, ein Hinweis, dass dieser Abschnitt des Parasitengenoms unter hohem selektivem Druck gestanden habe.

Nachfolgende Untersuchungen überprüften den Zusammenhang zwischen Amplifikation und/oder vermehrter Expression des *Pfmdr1*-Gens mit Chloroquinresistenz, lieferten aber unterschiedliche Ergebnisse, deuteten Zt. sogar auf eine Deamplifikation hin [Barnes *et al.* 1992; Cowman *et al.* 1991, 1994; Ekong *et al.* 1993; Peel *et al.* 1994; Wellems *et al.* 1990; Wilson *et al.* 1993].

Die Amplifikation des *Pfmdr1*-Gens wurde auch mit Resistenz gegenüber anderen Antimalariamitteln wie Chinin, Mefloquin und Halofantrin in Verbindung gebracht [Cowman *et al.* 1993, 1994, Peel *et al.* 1994, Barnes *et al.* 1992, Ruetz *et al.* [1996], Wilson *et al.* 1989,1993]. Dies wäre geradezu charakteristisch für die *multiple drug resistance* von Tumorzellen: Verminderte Sensibilität gegen Medikamente, denen die Zellen noch gar nicht exponiert worden waren. Allerdings wurde dieser mögliche Zusammenhang bei *Plasmodium falciparum* nicht in allen Studien beobachtet [Lim *et al.* 1996]. Von Barnes *et al.* [1992] wurde festgestellt, dass Parasiten mehr und mehr empfindlich gegen Mefloquin werden, je höher der Level der Chloroquinresistenz ist und umgekehrt [auch bei Peel *et al.* 1994, Cowman *et al.* 1994]. Diese Laborstudien beschreiben allerdings Isolate von *Plasmodium falciparum,* die an Kulturbedingungen adaptiert wurden, also unter Bedingungen, die sich von der normalen Wirt-Parasit-Beziehung unterscheiden und nicht das Resistenzprofil im Feld widerspiegeln [Bray & Ward 1998]. Was die Kreuzresistenz Chloroquins mit anderen Wirkstoffen angeht, so tendieren choroquinresistente Isolate generell, auch resistent gegenüber anderen 4-Aminochinolinen zu sein [Bray & Ward 1998, Cowman & Karcz 1993].

Zusammengenommen schlagen die Beobachtungen vor, dass die *Pfmdr1*-Amplifikation möglicherweise mit Mefloquinresistenz zusammenhängt, aber nicht mit einer hohen Ausprägung von Chloroquinresistenz kompatibel ist. Hinsichtlich Chloroquin wurde diese generelle Schlussfolgerung von einigen nachfolgenden Studien bestätigt [Babiker *et al.* 1991; Bayoumi *et al.* 1993; Cowman *et al.* 1993, 1994; Ekong *et al.* 1993; Peel *et al.* 1994; Wilson *et al.* 1993]. Bei Untersuchungen an *Pfmdr2* ließ sich zwischen resistenten und sensitiven Isolaten ebenfalls kein Unterschied in der Kopienanzahl feststellen [Cowman & Karcz 1991].

Als weitere Ursache der Chloroquinresistenz vermutete man auch Längen-Polymorphismen einer bestimmten Region des *Pgh*s, charakterisiert durch Verlängerung zweier repetitiver Regionen im *Pfmdr1* [Foote *et al.* 1990; Saiki *et al.* 1988]. Auch diese wurden in nachfolgenden Studien bei chloroquinresistenten Stämmen nicht vorgefunden [Bhattacharya *et al.* 1997].

Durch Sequenzanalysen des *Pfmdr1*-Gens kamen Foote *et al.* [1989, 1990] zu Ergebnissen, die sicherlich als Meilenstein der Malaria-Forschung gelten: Sie fanden heraus, dass bei allen untersuchten sensitiven Isolaten die identische Genstruktur vorlag, während es bei den chloroquinresistenten Isolaten (darunter sog. K1- und 7G8-Stämme) zu Mutationen an fünf Nukleotiden des Gens gekommen war [Foote *et al.* 1990]. Diese Punktmutationen führten an den Abschnitten 86, 184, 1034, 1042 und 1246 der Aminosäurenkette zum Austausch von einzelnen Aminosäuren: An der Position 86 der Aminosäurenkette war es zum Austausch der Aminosäure *Asparagin* gegen *Tyrosin* gekommen; dies stellte die einzige Veränderung bei den K1-Stämmen [Foote *et al.* 1990] dar.

Zusätzlich wurde bei 7G8-Stämmen am Codon 1042 die Aminosäure *Asparaginsäure* statt *Asparagin* vorgefunden. Ein Austausch von *Asparaginsäure* gegen *Tyrosin* war für die Mutation am Codon 1246 typisch, während für das Codon 1034 gehäuft *Serin* statt *Cystein* produziert wurde. Außerdem wiesen die 7G8-Isolate eine Veränderung an Codon 184 auf, die mit einem Aminosäurenaustausch von *Tyrosin* zu *Phenylalanin* einherging. Auf der Basis dieser Aminosäuresubstitutionen konnten Foote *et al.* den Chloroquin-Resistenzstatus in 34 von 36 Isolaten richtig bestimmen.

Die Aminosäure $86^{Tyr}$ ist nach Foote *et al.* an einem Membransegment lokalisiert, das bei der Substratspezifität des Genproduktes (P-Glycoprotein) eine Rolle spielen könnte. Zwei weitere Veränderungen ($1246^{Tyr}$ und $1042^{Asp}$) im Genom des 7G8 hatten ebenfalls Auswirkungen in einer Domäne, die auf Grund ihrer Lage in der Membran der Nahrungsvakuole beim Chloroquintransport beteiligt sein könnte (Abb.5).

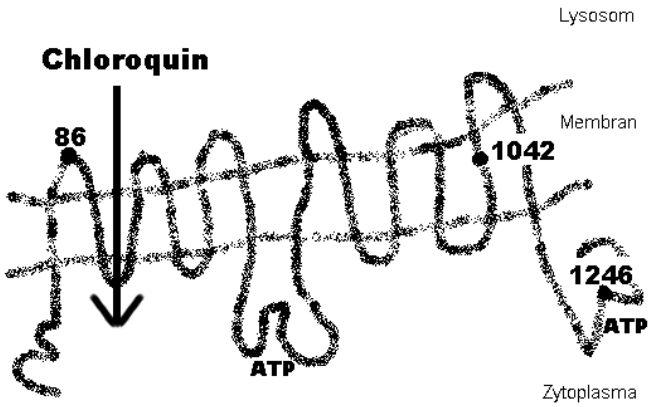


Abb.5: Membranmodell mit Darstellung der durch Punktmutation ausgetauschten Aminosäuren an den Positionen 86, 1042 und 1246.

Die Ergebnisse von Duraisingh *et al.*[2000] deuten darauf hin, dass verschiedene *Pfmdr1*-Sequenzpolymorphismen auch gegenüber anderen strukturell nicht mit Chloroquin verwandten Antimalariamitteln wie Mefloquin und Artesimin den Grad der Sensitivität verändern können.

Die Mutation $86^{Tyr}$ trat in den Experimenten Footes v.a. bei südostasiatischen Isolaten auf, während Foote *et al.* [1989, 1990] die Mutationen $1246^{Tyr}$, $1034^{Cys}$ und $1042^{Asp}$ (mit nur einer Ausnahme) bei südamerikanischen Isolaten vorfanden. Daraus zogen sie den Schluss, dass Chloroquinresistenz in Südostasien und Südamerika unabhängig voneinander aufgetreten sei und sich von dort in den späten Fünfzigerjahren weiterverbreitet habe.

Die Beobachtung, dass chloroquinresistente Stämme von *Plasmodium falciparum* in Südamerika durch die Mutationen $1042^{Asp}$ und $1246^{Tyr}$ charakterisiert sind, wurde von Cox-Singh *et al.* [1995] und Adagu *et al.* [1996] unterstützt. Povoa *et al.* [1998] bestätigten zwar, dass $86^{Tyr}$ in Brasilien nicht präsent ist, fanden aber die Punktmutationen $1042^{Asp}$ und $1246^{Tyr}$ sowohl bei resistenten als auch sensitiven Stämmen.

Die Rolle der *Pfmdr1*-Mutationen wurde in den letzten Jahrzehnten äußerst kontrovers diskutiert. Dass diese genetischen Veränderungen (v.a. der Polymorphismus $86^{Tyr}$) eine Rolle spielen könnten, wurde einerseits von zahlreichen Untersuchungen unterstützt. [Adagu *et al.* 1995, 1996, 1997, 1999; Basco *et al.*1995; Cox-Singh *et al.* 1995; Duraisingh *et al.* 1997; Gómez-Saladín *et al.* 1999; Grobusch *et al.* 1998; Peel *et al.* 1994; Nagesha *et al.* 2001; van Es *et al.* 1994 Apr.]. Hingegen wurde bei Isolaten aus dem Sudan [Awad-El-Kariem *et al.* 1992], Thailand [Wilson *et al.* 1993], Kambodscha [Basco *et al.* 1996], Indien [Bhattacharya *et al.* 1997, 1999], Gambia [von Seidlein *et al.* 1997], Südafrika [McCutcheon *et al.* 1999], und an manchen Kulturstämmen [Haruki *et al.* 1994] keine Assoziation nachgewiesen.

# 2. Problemstellung und Zielsetzung

Auf Grund der kontroversen Aussagen verschiedener Wissenschaftler soll durch diese Arbeit geklärt werden, ob den Allelen des *Pfmdr1*-Gens in Uganda eine besondere Schlüsselrolle hinsichtlich der Chloroquinresistenz zukommt.

In den letzten Jahrzehnten haben sich in Afrika chloroquinresistente *Plasmodium falciparum*-Stämme explosionsartig ausgebreitet; in den Nachbarländern Ugandas wurde bei 50% bis 80% aller Infektionen Resistenz gegen Chloroquin nachgewiesen. Dies wurde berichtet für den Sudan [Bayoumi *et al.* 1989], Kenia [Watkins *et al.* 1988, Brandling-Bennet *et al.* 1988], Tansania [Fowler *et al.* 1993, Premji *et al.*1994], Ruanda [Sexton *et al.* 1988] und Zaire [Wolday *et al.* 1995]. In einigen Gegenden des Kontinents kann Chloroquin kaum noch effektiv eingesetzt werden [Nuwaha 2001]. Erhöhte Mortalität, schwerere Krankheitsverläufe und das Auftreten von Epidemien sind die Folge. Die konsequente Reaktion auf diesen Trend wäre, Chloroquin durch andere effektive Substanzen zu ersetzen, nur dass dieser Schritt durch die limitierte Zahl geeigneter Mittel beeinträchtigt ist.

In Uganda war die Situation vor einigen Jahren noch nicht so brisant. Im Gegensatz zu den anderen genannten Gegenden war hier der Level der Chloroquinresistenz wesentlich niedriger beschrieben worden (4-31% im Jahr 1988 [Sezi *et al.*1991], 16% im Jahr 1992 [Kamugisha *et al.* 1993], 2-12% im Jahr 1993 [CDC/MoH 1994], 26% im Jahr 1995 [Nevill *et al.* 1995]). Kilian *et al.*, die in Uganda eine *in vivo*-Studie durchführten, schrieben dieses Phänomen der relativen Isolation des Landes in den 70er- und 80er-Jahren sowie dem geringen Angebot von Antimalariamitteln und dem folglich geringen Selektionsdruck zu [Kilian *et al.* 1998].

Sollte sich die Resistenzlage seit diesen Beobachtungen nicht wesentlich geändert haben, bedeutet dies, dass Chloroquin in Uganda nach wie vor ein wirksames Therapeutikum bzw. Prophylaktikum für die *Malaria tropica* darstellt und der Einsatz so genannter Reservemittel überflüssig bzw. nur limitiert notwendig ist. Da der Resistenzstatus bei Beginn der Behandlung aber nicht bekannt ist, kommt es bei einer Infektion mit chloroquinsensitiven *Plasmodium falciparum*-Stämmen häufig zum unnötigen Einsatz von Reservemitteln, oder aber umgekehrt, falls resistente Fälle zunächst mit Chloroquin anbehandelt werden, erfolgt eine wirksame Behandlung mit Reservemitteln möglicherweise zu spät für den einzelnen Patienten. Die Ausdehnung der Resistenz auch innerhalb Ugandas lässt sich letztlich nur durch den sinnvollen Einsatz Chloroquins verhindern bzw. verzögern.

Dies setzt allerdings die Überwachung der Ausbreitung chloroquinresistenter Malariastämme voraus. Die klinisch beobachtete Resistenz ist aus vielerlei Gründen (so z.B. mögliche Reinfektion, Superinfektion oder nicht vollausgebildete Immunität, etc.) in tropischen Gebieten nicht immer als goldener Standard zu dokumentieren. Wünschenswert wäre also eine Methode, die rasch Aufschluss über den Resistenzstatus geben kann. Sowohl *in vivo*- als auch bisherige *in vitro*-Methoden führten frühestens nach 36-48 Stunden zu einem mehr oder weniger verlässlichen Ergebnis mit der Folge einer verzögerten Entscheidung über die adäquate Therapie. Zudem sind die bisher verwendeten *in vitro*-Methoden zur Identifizierung von Resistenz bei *Plasmodium falciparum* teuer und stellen hohe Ansprüche an die Ausbildung des Personals. Die Interpretation der Tests ist immer subjektiv beeinflusst und die Korrelation zur *in vivo*-Resistenz schwach.

Daraus ergibt sich das wichtige Ziel, eine standardisierte, schnelle und preisgünstige Überwachungsmethode von Chloroquinresistenz zu etablieren, die in endemischen Gebieten Ugandas oder darüber hinaus das Monitoring von Malaria erleichtern könnte.

Der Einsatz der Polymerasekettenreaktion (PCR) in Verbindung mit Restriktionsanalyse könnte sich als ein Schritt zur Verwirklichung dieses Zieles erweisen, wenn dadurch Genmutationen identifiziert werden können, die wesentlich für die Resistenz verantwortlich sind. Diese Methode wurde von Frean *et al.* [1992] als einfach und wenig invasiv beschrieben; sie sei geeignet für ausgedehnte Untersuchungen von Mutationen und deren Zusammenhang mit Resistenzen. Später wurde die PCR auch von Adagu *et al.*[1996] wegen hoher Spezifität (91,7-100%) und befriedigender Sensitivität (68,6-72,7%) für die Studie der CQR in abgelegenen Gegenden vorgeschlagen.

Die theoretische Möglichkeit, den Verdacht der Chloroquinresistenz bei *Plasmodium falciparum* innerhalb weniger Stunden durch den Einsatz dieser Methode zu erhärten, bleibt allerdings so lange utopisch, wie nicht die für das Auftreten von Chloroquinresistenz beteiligten Gene und relevanten Sequenzen bekannt sind. Gerade was Uganda angeht, ist es derzeit noch ungeklärt, in welchem Ausmaß die oben beschriebenen genetischen Veränderungen mit Chloroquinresistenz korrelieren.

Die vorliegende Untersuchung hat deshalb zum Ziel,

1. die Häufigkeit der von Foote *et al.* [1990] beschriebenen Mutationen $86^{Tyr}$, $184^{Phe}$, $1042^{Asp}$ und $1246^{Tyr}$ an einem Panel ugandischer Isolate zu bestimmen,
2. das Auftreten von Chloroquinresistenz in Westuganda zu ermitteln und
3. eine mögliche Korrelation der Resistenz mit den beschriebenen Punktmutationen zu evaluieren.

Die rasche und sichere Diagnose von relevanten Mutationen mittels PCR könnte Entscheidungskriterien für eine gezielte Therapie liefern, so die Sicherheit und Wirksamkeit der Präventions- und Behandlungsprogramme erhöhen und notwendige Voraussetzungen für eine sinnvolle Politik im Umgang mit dem Präparat schaffen. Darüber hinaus könnte sie auch hinsichtlich epidemiologischer Fragestellungen wie etwa der Verbreitung der CQR, der Virulenz der verschiedenen *P.falciparum*-Stämme sowie der durch sie verursachten Morbidität und Mortalität Aufschluss geben.

Die molekularen Grundlagen der PCR und der übrigen verwendeten Analyseverfahren sowie die methodischen Arbeitsschritte werden im nächsten Kapitel dargestellt.

# 3. Material und Methoden

## 3.1. Prinzip der verwendeten molekulargenetischen Methoden

### 3.1.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) bietet die Möglichkeit, genetische Sequenzen der Plasmodia zu entschlüsseln, unmittelbar nachdem sie von ihrem infizierten Wirt gewonnen wurden und ohne sie dazwischen in einer Kultur ansetzen zu müssen [Pröll 1997].

Da die DNA-Menge zum Zwecke der Analyse oftmals zu klein ist, ist es notwendig, die winzigen Mengen an Erbsubstanz einem Vervielfältigungsprozess zu unterziehen. Dafür ist die Polymerasekettenreaktion (engl. **P**olymerase **C**hain **R**eaction, PCR) die Methode der Wahl, da sie eine *in vitro*-Nachahmung der realen DNA-Replikation ist, wie sie in allen Lebewesen vorkommt. Sie macht es möglich, von einem genau definierten Abschnitt der Erbsubstanz (Desoxyribonukleinsäure, *engl.* **D**esoxyribo**n**uclein**a**cid, DNA) eine nahezu unbegrenzte Anzahl von Kopien zu erstellen. Auf Grund der hohen Sensitivität, Schnelligkeit und Automatisierbarkeit eröffnet sie neue Möglichkeiten in der medizinischen Diagnostik und in anderen Bereichen der molekularbiologischen Forschung [Saiki *et al.* 1988].

Das Prinzip der PCR imitiert den natürlichen DNA-Replikationsvorgang, begrenzt auf die für die jeweiligen Anwendungen interessanten Sequenzen. Da die Vermehrung der DNA exponenziell erfolgt, sind bereits nach 20 Zyklen ca. 1 Million, nach 30 Zyklen 1 Milliarde Kopien des gewünschten DNA-Abschnittes vorhanden [Saiki *et al.* 1988].

Um allerdings das gewünschte Produkt zu erhalten, müssen vor dem Genabschnitt die Randbereiche bekannt sein. So muss der Genbereich, der repliziert werden soll, genau definiert werden. Große Sorgfalt ist von dem Design der so genannten „Primer“ zu fordern, die jeweils den Anfangspunkt des Genabschnittes darstellen. Zu beachten ist, dass die

Sequenzen der Primer nicht zueinander komplementär sind, da dadurch eine Replikation der Primer, als so genannte „Primerdimere“, erfolgen würde [Pröll 1997].

Die Polymerasekettenreaktion funktioniert nach folgendem Prinzip [Saiki *et al.*1988]:
Da die native DNA in Doppelsträngen vorliegt, muss erst eine Aufspaltung in die Einzelstränge erfolgen. Zu erreichen ist dies durch die Erwärmung auf Temperaturen um 92°C (Aufspaltung der Doppelstrang-DNA: Denaturierung). Nach Absenkung der Temperatur erfolgt die Zugabe der Primer, die sich nun wegen der geringen Größe und der daraus resultierenden höheren Beweglichkeit schneller an die DNA anlagern können als der zweite Nativstrang (Anlagerung der Primer: Hybridisierung). Nachdem dieser Vorgang beendet ist, werden nun die DNA-Polymerase und alle vier Nukleotide (Adenosin, Cytosin, Guanin und Thymidin, in Form von **D**esoxy**n**ukleotid**tri****p**hosphaten, dNTPs) zugegeben. Die DNA-Polymerase benötigt zum Start ein kurzes Stück doppelsträngiger DNA, die durch den angelagerten Primer geschaffen wird. Mit dem freien 3‘-OH Ende des Primers als Startpunkt synthetisiert die Polymerase durch Veresterung der Nukleotide, unter Abspaltung der Phosphatgruppen, einen neuen DNA-Strang, wobei sie die zu vervielfältigende Sequenz als Vorlage (Matrize) benutzt. Bei diesem Vorgang werden die jeweiligen Primer durch Einbau in das Amplifikat verbraucht.
Die thermostabile Polymerase ist ein Isolat aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, das in heißen Quellen gefunden wird.

### 3.1.2. Restriktionsanalyse

Die eigentliche Auswertung des in der PCR amplifizierten DNA-Stranges erfolgt durch Enzymverdau. Die amplifizierten Gensequenzen werden dazu einem Restriktionsenzym (Restriktions-Endonuclease) ausgesetzt. Hier handelt es sich um eine Gruppe bakterieller Enzyme, die DNA-Doppelstränge spalten. Sie entfalten ihre Wirkung an den amplifizierten

Codons in spezifischer Weise, wenn eine bestimmte Gensequenz vorliegt und trennen das PCR-Produkt in weitere kleine Sequenzabschnitte. Die zahlreichen bekannten Restriktions-Enzyme werden mit Abkürzungen benannt, die auf den Ursprungsorganismus hinweisen (z.B. *EcoRV*, eine Nuklease, die aus dem Bakterium *Escherichia coli* isoliert wurde). Wird im Falle einer Punktmutation eine Base ausgetauscht und so die Erkennungssequenz verändert, spaltet das betreffende Restriktionsenzym an dieser Stelle nicht mehr. Umgekehrt können durch Mutationen neue Restriktionsstellen entstehen. Entsprechende DNA-Abschnitte aus zwei verschiedenen, genetisch nicht ganz identischen Individuen ergeben also häufig Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge. Dieser Effekt wird als Längen-Polymorphismus von Restriktionsfragmenten (engl. Restriction-Fragment-Length-Polymorphism, RFLP) bezeichnet. Liegt die für das Restriktionsenzym spezifische Sequenz vor, wird sie in Stränge definierter Länge gespalten und kann durch Gelelektrophorese weiter ausgewertet werden.

### 3.1.3. Agarosegelelektrophorese

Bei diesem analytischen Verfahren werden Moleküle durch Wanderung in einem elektrischen Feld getrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird von der Nettoladung, Molekülgröße und –form, sowie der angelegten Spannung bestimmt. Das hier verwendete Elektrophorese-Verfahren benutzt als Träger Agarosegele und dient einerseits zur Darstellung der durch die PCR amplifizierten DNA-Sequenzen, als auch zur Trennung der nach RFLP unterschiedlich großen Sequenz-Abschnitte. Eine bestimmte Menge der DNA-Fragmente wird nebeneinander auf gleicher Höhe jeweils in Geltaschen eingebracht. Die Gelkammer wird über einen bestimmten Zeitraum an eine festgelegte Spannung gelegt. Je nach ihrer Größe wandern in diesem Zeitraum die DNA-Stränge in der Richtung von Anode zu Kathode unterschiedlich weit durch das Gel; Produkte geringeren molekularen Gewichts wandern in dieser Zeit weiter als größere Moleküle und produzieren somit Banden unterschiedlicher Größe. Als

Größenstandard läuft parallel zu den PCR-Produkten ein DNA-Marker, der die Längenmessung der Amplifikate ermöglicht. Um die Bandenverteilung sichtbar zu machen, werden die DNA-Abschnitte mit Ethidiumbromid angefärbt. Durch Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA-Doppelhelix leuchten die DNA-Banden bei Betrachtung im ultravioletten Licht auf und können im Vergleich zum Größenstandard (DNA-Leiter) an ihrer Länge ermittelt werden.

## 3.2. Fachausdrücke und Definitionen der Malariagenetik

Im Folgenden werden für Plasmodia die Begriffe „Isolat“, „Linie“ und „Klon“ benutzt. Zunächst soll hier eine Definition der Bezeichnungen gemäß dem National Centre for Biotechnology Information, der National Library of Medicine und den National Institutes of Health gegeben werden[4]:

**Isolat:** Eine Probe von Parasiten, die von einer infizierten Person gewonnen wurde und noch nicht kultiviert wurde. Ein Isolat ist nicht geklont und besteht folglich aus mehr als einem genetisch unterschiedlichen Klon.

**Klon:** Die Nachkommen eines einzelnen Parasiten, entstanden durch asexuelle Replikation, zunächst alle genetisch identisch, solange sie noch nicht durch weitere Mutationen verändert sind.

**Linie:** Parasiten einer einzelnen Spezies, gewonnen aus einem einzelnen Isolat und *in vivo* oder *in vitro* weiterverarbeitet. Sie weisen einige phänotypische Gemeinsamkeiten auf, wie z.B. Wirkstoffresistenz.

[4] publiziert auf der Webseite http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Malaria/Epid/definition_short.html

## 3.3. Material

### 3.3.1. Herkunft der Proben und klinischen Daten

Das Untersuchungsmaterial der vorliegenden Arbeit stammt aus der bereits erwähnten Studie, die unter der Leitung von Dr. Kilian im Westen Ugandas durchgeführt wurde [Kilian *et al.* 1998, siehe Kapitel 2]. In diesem klinischen Survey wurde die Wirksamkeit von Chloroquin, Sulphadoxin-Pyrimethamin und Co-Trimoxazol bei *Malaria tropica*-Patienten in vier ländlichen Gesundheitsstationen und zwei Krankenhäusern in den beiden westugandischen Distrikten Bundibugyo und Kabarole untersucht (Abb. 6).

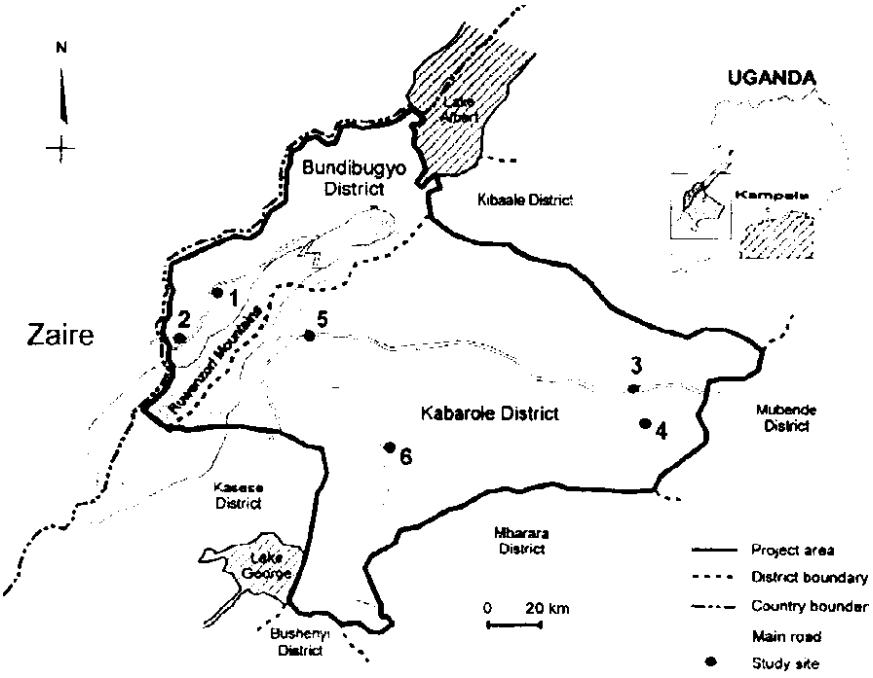


Abb.6 : Lageplan der Kabarole – und Bundibugyo-Distrikte, Westuganda: 1-6: Studienzentren [Kilian *et al.* 1998]

Malaria ist in beiden Distrikten verbreitet und die Studienzentren schlossen endemische Gebiete ein. Beide Distrikte sind räumlich voneinander durch die nördlichen Ausläufer der Ruwenzori Berge getrennt; den Wanderbewegungen der Bevölkerung zwischen den Distrikten sind durch die Bergkette ein natürliches Hindernis gesetzt. Der Bundibugyo

Distrikt liegt entlang der Grenze zu Zaire (jetzt Republik Kongo), über die ein reger Austausch besteht und vor allem 1992 und 1995 im Rahmen von Flüchtlingsströmen aus Zaire bestand.

In die Studie wurden nur Patienten eingeschlossen, wenn sie folgende Kriterien erfüllten:

- Monoinfektion mit *Plasmodium falciparum* mit einer Parasitämie von mindestens 300/µl.
- Messbares Fieber oder Anamnese von Fieber in den letzten 24 Stunden.
- Keine erkennbare komplizierte Form der Malaria oder anderer Krankheiten
- Keine Einnahme von Malaria-Medikamenten in den letzten 4 Wochen.
- Einwilligung in die Teilnahme an der Studie; bei Kindern Einverständnis der Eltern.

Die obigen Kriterien wurden wie folgt ermittelt:

Alle Patienten wurden von qualifiziertem medizinischen Personal klinisch untersucht. Die Körpertemperatur wurde gleichzeitig in beiden Axillae mit digitalen Thermometern erhoben. Fieber wurde als Temperatur ≥ 37,5° C festgelegt. Anamnese von Fieber wurde auf die Aussage des Patienten oder der Eltern gestützt.

Kurz nach der ersten Blutabnahme wurde allen beteiligten Patienten Chloroquintabletten (Dawaquine®) basierend auf der Standarddosierung von 25 mg/kg KG über 3 Tage verabreicht. Die erste Dosis wurde unter ärztlicher Aufsicht gegeben und der Patient für mindestens 30 Minuten beobachtet. Im Falle von Erbrechen wurde die Gabe wiederholt. Bei Versagen des Medikaments wurde sekundär Sulphadoxin-Pyrimethamin in Standarddosierung gegeben.

Die beteiligten Patienten wurde an den Tagen 3, 7 und 14 wie oben beschrieben nochmals untersucht und im Falle von Symptomen auch zwischen diesen Terminen. Bei jeder Untersuchung wurde das Auftreten von Fieber und anderer Symptome in den letzten 24 Stunden erhoben und die Temperatur gemessen sowie die Parasitendichte bestimmt (siehe unten).

Ausgeschlossen wurden Patienten, die in dieser Zeit andere Antimalariamittel eingenommen hatten. Patienten, die Zeichen einer Komplikation aufwiesen, wurden sofort hospitalisiert, mit oraler Chinin-Dosis über weitere 7 Tage adäquat behandelt und ebenfalls von der Studie ausgeschlossen. Eine aktive Überwachung der Patienten seitens der Untersucher in ihren Behausungen wurde nicht durchgeführt, doch für die vollständige Teilnahme an allen Kontrolluntersuchungen wurde eine kleine Belohnung ausgehändigt. Die Studie wurde entsprechend den Erklärungen von Helsinki und internationalen ethischen Richtlinien biomedizinischer Forschung durchgeführt [CIOMS/WHO 1993].

Zur Feststellung der Parasitämie wurde mittels Einmal-Lanzette Blutsproben aus der Fingerbeere entnommen und anhand eines gefärbten „Dicken Tropfens“ unverzüglich von einem Laborassistent mikroskopisch auf *Plasmodium falciparum* untersucht. Als negativ wurde ein Ergebnis nach ergebnisloser Untersuchung von 100 Ölimmersionsfeldern gewertet. Die Dichtemessung des Präparates wurde durch Auszählen der Trophozoitenzahl in 100 Feldern und bei einem Volumen von 0,25 µl pro 100 Feldern durch Multiplikation mit Faktor 4 festgelegt [Kilian *et al.* 1998]. Diese Untersuchung wurden an den Tagen 3, 7 und 14 wiederholt und jeweils später im Zentrallabor nochmals einer Kontrolle unterzogen.

Um das Ansprechen der Patienten auf die Chloroquinbehandlung zu klassifizieren, wurde nicht nur die mikroskopisch festgestellte Parasitämie herangezogen, sondern auch *in vivo*-Parameter wie Fieber und andere Zeichen der Malaria berücksichtigt. Die Behandlungsergebnisse wurden dabei –mit kleinen Modifikationen- analog zur WHO-Empfehlung [1996] wie folgt eingeteilt:

**Klinisches Versagen (OUTC4):** Parasitämie an Tag 3 > 25% vom Tag 0 mit oder ohne messbarem Fieber oder Zeichen komplizierter Malaria an oder vor Tag 3.

**Parasitologisches Versagen (OUTC3)**: Fieber oder Anamnese von Fieber in den letzten 24 Stunden assoziiert mit Parasitämie an einem beliebigen Zeitpunkt nach Tag 3.

**Asymptomatische Resistenz (OUTC2):** anfängliche klinische Besserung, kein Fieber mehr an Tag 3 oder in den letzten 24 Stunden, aber Parasitämie an Tag 14 (persistierend oder wieder neu auftretend)

**Sensitiv (OUTC1):** Nach frühzeitiger klinischer Besserung weiterhin kein Fieber oder keine Anamnese von Fieber in den letzten 24 Stunden und auch keine Parasiten an Tag 14.

Die Kategorien „OUTC1“ und „OUTC2“ repräsentieren nach der WHO-Definition ein adäquates **klinisches** Ansprechen auf die Chloroquintherapie.

Das für vorliegende Arbeit relevante und auf Mutationen untersuchte Material besteht aus den Blutsproben der Patienten, die sich mit unkomplizierter Malaria in einem der Krankenhäuser bzw. Gesundheitsstationen vorstellten. Bei der ersten Vorstellung, noch vor Beginn der Behandlung mit Chloroquin, wurde jeweils ein Teil des entnommenen Blutes (ca. 10µl) auf DNA-freies Whatman-Filterpapier (Whatman 3MM™) aufgebracht, in getrocknetem Zustand in Kunststofftütchen eingebracht und für weitere Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Der Transport zur Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin in München erfolgte innerhalb von 3 Monaten im Handgepäck eines an der Untersuchung beteiligten Mitarbeiters. Die Lagerung der Proben bis zu weiteren Verarbeitung erfolgte bei Raumtemperatur.

Das nach obigen Kriterien klassifizierte Ansprechen der Patienten auf die Chloroquintherapie wurde im Nachhinein mit den jeweiligen Ergebnissen der DNA-Mutations-Analyse (Blut vom Tag 0) verglichen und auf mögliche Zusammenhänge hin interpretiert.

### 3.3.2. Geräte

Folgende Geräte standen zur Verfügung:

| | |
|---|---|
| Tischzentrifuge EBA 12 | Hettich Zentrifugen |
| Schüttler MS1 Minishaker | IKA® |
| PCR-Gerät UNO II Thermoblock | Biometra, Göttingen |
| Horizontal-Gelelektrophoresekammern: | Easy Cast, OWL |
| | DNA Sub Cell ™, Bio Rad |
| UV-Leuchttisch: | Ultraviolet Transilluminator, UVP |
| Inkubator: | Heraeus Inkubator |

### 3.3.3. Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden im Laufe der Untersuchungen verwendet:

| | |
|---|---|
| Chelex: InstaGene™ Matrix | Bio Rad, München |
| Ethidiumbromid | Sigma, Deisenhofen |
| Mineralöl „Light White Oil“ | Sigma, Deisenhofen |
| Orange G | Sigma, Deisenhofen |
| Saponin | Sigma, Deisenhofen |

### 3.3.4. Reaktionspuffer

Folgende Reaktionspuffer wurden für die Restriktionsanalyse benutzt:

| | | |
|---|---|---|
| NE-puffer 3: | 100mM NaCl | New England Biolabs, Schwalbach |
| | 50mM Tris-HCl | |
| | 100mM $MgCl_2$ | |
| | 1mM DTT | pH 7,9 @ 25°C |

### 3.3.5. Enzyme

Folgende Enzyme wurden für die Studie verwendet:

Polymerase:

| | |
|---|---|
| Taq DNA-Polymerase (5u/µl) | Appligene, Heidelberg |

Restriktionsendonukleasen:

| | |
|---|---|
| *Afl*III | New England Biolabs, Schwalbach |
| *Ase* I | New England Biolabs, Schwalbach |
| *Eco*RV | New England Biolabs, Schwalbach |

### 3.3.6. Nukleotide

Folgende Nukleotide wurden für die Untersuchung herangezogen:

| | |
|---|---|
| dATp, dCTp, dGTp, dTTp, je 10 mM | Appligene, Heidelberg |
| Agarose „molecular biology grade“ | Appligene, Heidelberg |
| 100bp DNA-Leiter: | Gibco BRL, Eggenstein |
| Oligonukleotide Primer: | MWG-Biotech GmbH, Ebersberg |

*Pfmdr* 1-1: 5‘ AGA TGG TAA CCT CAG TAT CA 3’

*Pfmdr* 1-2: 5‘ TTA CAT CCA TAC AAT AAC TTG 3’

*Pfmdr* 1-3: 5‘ GCG TGT ATT TGC TGT AAG AG 3’

*Pfmdr* 1-4: 5‘ CAG CAT AAC TAC CAG TTA AT 3’

*Pfmdr* 1-5: 5‘ GTG GAA AAT CAA CTT TTA TGA 3’

*Pfmdr* 1-6: 5‘ TTA GGT TCT CTT AAT AAT GCT 3’

184 F: 5‘CAT GAT AAT AAT CCT GGA TCT 3’

184 B: 5‘CAG TTC TTA TTC CCA TTA AAG 3’

MT184 F: 5‘CAG TTC CTT TTT AGG TTT ACT 3’

WT 184 F: 5‘CAG TTC CTT TTT AGG TTT ACA 3’

## 3.4. Durchführung

### 3.4.1. labortechnische Durchführung und Förderung der Forschung

Die PCR-Einstellungen sowie die verwendeten Primersequenzen wurden in Kooperation mit Dr. Adagu von der London School of Hygiene & Tropical Medicine erarbeitet. Die DNA-Analysen wurden in den Jahren 1998/99 sowohl in den Labors der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der LMU München in der Arbeitsgruppe von PD Dr.T.Jelinek als auch während eines einmonatigen Arbeitsaufenthaltes in der London School of Hygiene & Tropical Medicine in der Arbeitsgruppe von Dr.D.Warhurst durchgeführt. Der einmonatige Arbeitsaufenthalt in London wurde vom Boehringer Ingelheim Fonds Stuttgart finanziell unterstützt. Ergebnisse dieser Dissertation wurden im Journal *Tropical Medicine and International Health* vorabpubliziert [Flüeck *et al.* 2000].

### 3.4.2. DNA-Präparation

Zur Mutationsanalyse und zum Einsatz in der PCR ist eine vorgereinigte Parasiten-DNA notwendig, da die Methode auf Stör- oder Hemmstoffe sehr empfindlich reagiert. Aus den getrockneten Blutsproben extrahierte DNA ist für den Einsatz in der PCR geeignet und lässt sich bei Beachtung strenger Sterilitätsbedingungen in ausreichendem Maße amplifizieren [Long *et al.* 1995].

Die Präparation PCR-fähiger DNA-Templates wird nach der Methode von Kain und Lanar [1991] wie folgt durchgeführt:

- Ausschneiden eines kleines Stückes des getrockneten Tropfens (etwa die Hälfte eines 10µl Tropfens) aus dem Whatman Filterpapier.
- Einbringen von 180 µl einer 5%-Chelex Lösung in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß und Kochen bei 100°C für 5 Minuten
- Hinzufügen des ausgeschnittenen Filtersektors, Vermischen mit der Chelexlösung auf dem Schüttler (30 Sekunden)
- Kochen für weitere 10 Minuten bei 100°C
- Zentrifugation bei 12000U für 3 Minuten.
- Der Überstand (etwa 120 µl) wird mit einer Pipette abgesaugt und in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß eingebracht.
- Weitere Zentrifugation bei 12000U für 3 Minuten.
- Weiteres Abpipettieren des Überstandes (ca. 100 µl) und Einbringen in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß. Von dieser Präparation werden nun jeweils 5 µl für einen PCR-Ansatz verwendet

Die Aufbewahrung der DNA-Extrakte sollte bei –20°C im Gefrierschrank erfolgen. Die von Kain und Lanar [1991] empfohlene Aufbewahrung bei 4°C in Kühlschrank hat sich selbst bei kurzfristiger Lagerung für diese PCR als ungeeignet erwiesen, da sich schon nach kurzer Zeit eine graduelle Qualitätsminderung im Ansprechen der PCR erkennen ließ.

Die angegebenen Kochzeiten bei 100°C sind als Minimalangaben zu interpretieren. Eine längere Kochzeit kann aus eigener Erfahrung das Präparationsergebnis verbessern. Eine Verkürzung der Zeitspanne führt erfahrungsgemäß zu einer Verschlechterung.

### 3.4.3. DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die molekularen Abläufe der PCR wurden bereits in Punkt 3.1.1. erläutert, sodass hier nur noch die Aufstellung der beteiligten Chemikalien, spezieller Einstellungen und einzelner Arbeitsschritte erfolgt. (Zur allelspezifischen PCR an Codon 184 siehe Abschnitt 3.4.7.). Für die Loci 86, 1042 und 1246 ist der verwendete Ansatz analog und unterscheidet sich lediglich durch die Verwendung unterschiedlicher spezifischer Primerpaare. Das Primerpaar *Pfmdr1-1* und *Pfmdr1-2* wird zur Amplifikation eines Fragments von 330 Basenpaaren um den Locus 86 eingesetzt. In ähnlicher Weise flankieren die Primer *Pfmdr1-3* und *Pfmdr1-4* ein PCR-Produkt von 400 Basenpaaren, welches zur Detektion von $1042^{Asp}$ weiterverwandt wird. Die Primer *Pfmdr1-5* und *Pfmdr1-6* umspannen Fragment von 500 Basenpaaren um das Codon 1246.

Das PCR-Gemisch wird in einem separaten DNA-freien Raum unter Verwendung des Laminar-Flow angesetzt, der idealerweise bereits 20 Minuten vor Beginn eingeschaltet ist. Alle Pipettiermaterialien und Chemikalien werden in diesem Raum gelagert und dürfen nicht aus dem DNA-freien Bereich entfernt werden.

Der verwendete Reaktionsansatz setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen, die sämtlich in kleine Mengen aliquotiert und frei von DNA-Kontamination bei –20°C gelagert werden. Das Gesamtvolumen des Ansatzes ergibt sich zu 50 µl. Die zugefügte Menge, sowie die Ausgangs- und gewünschte Endkonzentration lässt sich aus unten stehender Aufstellung ersehen. Eine höhere Primerkonzentration hat keine positive Auswirkung, sondern vermehrt nur das Auftreten sog. Primer Dimere in der Gelelektrophorese.

| | | Ist-Konz. | Soll-Konz. | Menge |
|---|---|---|---|---|
| **Primermix** | Primer 1 | 20 µM | 0,5 µM | 1,25 µl |
| | Primer 2 | 20 µM | 0,5 µM | 1,25 µl |
| | | | | -------- |
| | | | | **2,50 µl** |
| **Mastermix** | Aqua dest, steril | | | 33,25 µl |
| | Reaktionspuffer | 10 x | 1 x | 5,00 µl |
| | dNTPs Mix | 10 mM | 200µM | 4,00 µl |
| | Taq Polymerase | | | 0,25 µl |
| | | | | -------- |
| | | | | **42,50 µl** |
| **DNA-Präparat** | Template | | | **5,00 µl** |
| | | | | -------- |
| **Gesamtmenge Reaktionsgemisch** | | | | **50,00 µl** |

Arbeitsschritte:

- In einem 1,5ml Eppendorff Reaktionsgefäß wird zunächst ein Primer Mix hergestellt, der das Primerpaar zu jeweils gleichen Bestandteilen in einer Konzentration von 20µM enthält. Wegen möglicher Pipettierfehler wird von einer geringgradig höheren Anzahl von Ansätzen ausgegangen als tatsächlich in der PCR verwendet werden.
- Der Primermix wird auf einer Zentrifuge vermischt und nun auf 0,2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt.
- Der Mastermix setzt sich aus den Bestandteilen sterile Aqua dest., Reaktionspuffer, dNTp und Taq Polymerase zusammen und wird in einem 1,5 ml Eppendorff Reaktionsgefäß angesetzt. Alle Bestandteile werden nach völligem Auftauen hinzugefügt. Das Enzym jedoch wird bis zum Mischen des Mastermixes in einem Kühlelement („Applifreeze“, Appligene, Heidelberg) bereitgehalten und zuletzt zugegeben.
- Der Mastermix wird auf der Zentrifuge vermischt und nun auf die 0,2 ml Reaktionsgefäße

mit der bereits vorgelegten Primermischung verteilt. Pro Reaktionsgefäß wird eine Menge von 42,5 µl zugegeben und mit dem vorgelegten Primergemisch durch Pumpen vermischt.

- In einem dritten Raum wird dem Reaktionsgemisch nun 5 µl des DNA-Präparats hinzugefügt. Dabei empfiehlt sich die Verwendung von Filter-Pipettenspitzen, um Kontamination zu vermeiden.
- Der Reaktionsansatz wird mit ca. 10 µl (1 Tropfen) Mineralöl überschichtet, um so die bei den verwendeten hohen Temperaturen die mögliche Verdunstung des wässrigen Ansatzes auf ein Minimum zu beschränken.

Die Zyklenzahl ergibt sich zu 42; die einzelnen Zyklen sehen wie folgt aus:

| **Zyklus** | **Denaturierung** | **Annealing** | **Extension** |
|---|---|---|---|
| 1 | 94°C (2,5 min) | - | - |
| 40 | 94°C (45 sec) | 49°C (1 min) | 72°C (1 min) |
| 1 | - | - | 72°C (10 min) |

Alle oben angeführten Einstellungen und Konzentrationen wurden durch eigene Optimierungsverfahren an einem Kulturstamm (K1), einem 3D7-Stamm und Patientenisolaten überprüft (näheres siehe 3.4.8.).

### 3.4.4. Agarosegelelektrophorese

Das Ergebnis des Amplifizierungsprozesses wurde mittels Elektrophorese in einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel kontrolliert. Zur Bereitung eines 1%igen Agarosegels werden 2g Agarose eingewogen und mit 200ml TAE-Puffer unter Aufkochen gelöst. Nach Gießen und Erkalten des Gels werden 10µl der PCR-Produkte zusammen mit 2µl Loading Buffer in die Taschen des Gels eingebracht und mittels Elektrophorese auf gelungene Amplifikation überprüft.

Die Elektrophorese wird bei 120mV für 90 min durchgeführt; als Größenstandard laufen parallel zu den PCR-Produkten auch 8µl eines 100bp-DNA-Leiter-Gemischs (10µl der Leiter angesetzt in 80µl H20 und 10µl Blaupuffer). Dadurch wird die Längenmessung der Amplifikate ermöglicht.

Das Gel wird anschließend in einem Ethidiumbromidbad (Konzentration Staining Solution: 0,5µg/ml $H_2O$) für 15 min auf dem Schüttler durchtränkt. Durch Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA-Doppelhelix leuchten die DNA-Banden auf und können durch Vergleich mit dem Längenstandard beurteilt werden. Diese Auswertung erfolgt im Ultraviolet Transilluminator und wird mittels Grabit-Software am Computer begutachtet, durch Speichern als bmp-Datei und Ausdruck dokumentiert

### 3.4.5. Restriktionsanalyse der DNA (RFLP)

Auf die PCR folgt eine Restriktionsanalyse nach dem Prinzip von Frean *et al.* [1992] und Awad-El-Kariem *et al.* [19929. In der Restriktionsanalyse (*engl.* RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism) werden die amplifizierten Proben weiter durch Enzymverdau auf mögliche Punktmutationen untersucht.

Wenn die Qualität der Banden in der Gelelektrophorese für eine erfolgreiche Amplifikation spricht, werden 4µl des PCR-Produkts mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gemäß den Instruktionen des Herstellers inkubiert und in einem mit Ethidiumbromid gefärbten 2%-Agarosegel analysiert (siehe 3.4.6.).

Für den Vorgang wird ein 6µl-Gemisch aus H20, Reaktionspuffer, evtl. BSA und entsprechendem Restriktionsenzym hergestellt, in das jeweils die 4µl der PCR-Produkte eingebracht und der Wirkung des Enzyms für 12h bei einer Temperatur von 37°C ausgesetzt werden.

Der Reaktionsansatz mit den PCR86-Amplifikaten ist wie folgt:

| | |
|---|---|
| H2O | 3,75 µl |
| Reaktionspuffer 3 | 1,00 µl |
| BSA purified | 1,00 µl |
| Enzym: Afl III | 0,25 µl |
| PCR86-Produkt | 4,00 µl |
| | --- |
| **Gesamt** | **10,00 µl** |

Der Reaktionsansatz für die PCR1042-Amplifikate:

| | |
|---|---|
| H2O | 4,75 µl |
| Reaktionspuffer 3 | 1,00 µl |
| Enzym: Ase I | 0,25 µl |
| PCR1042-Produkt | 4,00 µl |
| | --- |
| **Gesamt** | **10,00 µl** |

Der Reaktionsansatz für die PCR1246-Amplifikate:

| | |
|---|---|
| H2O | 3,75 µl |
| Reaktionspuffer 3 | 1,00 µl |
| BSA purified | 1,00 µl |
| Enzym: EcoRV | 0,25 µl |
| PCR1246-Produkt | 4,00 µl |
| | --- |
| **Gesamt** | **10,00 µl** |

Inkubation erfolgt für jeweils 12 Stunden bei 37°C.

Das Reaktionsenzym entfaltet seine Wirkung an den amplifizierten Codons in charakteristischer Weise, wenn eine bestimmte DNA-Sequenz vorliegt und spaltet das PCR-Produkt in weitere kleine Sequenzabschnitte. So ist die Mutation $86^{Tyr}$ definiert durch das Vorhandensein einer *AflIII*-Erkennungssequenz; die amplifizierte Region um das Codon 1042 wird mit *AseI* inkubiert, und *EcoRV* wurde benutzt, um Polymorphismen am Codon 1246 zu identifizieren.

Das Enzym *AflIII* ist durch folgende Restriktionsstelle charakterisiert (Abb 7, 8 und 9 aus der jeweiligen Packungsbeilage).

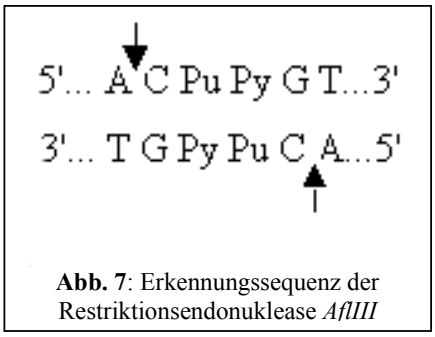


**Abb. 7**: Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *AflIII*

In den Abbildungen 8 und 9 sind die Restriktionsstellen der Enzyme *AseI* und *EcoRV* dargestellt.

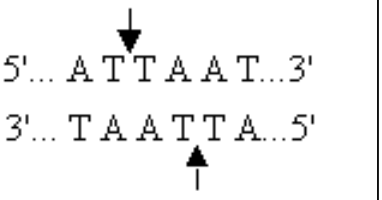


**Abb. 8**: Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *AseI*

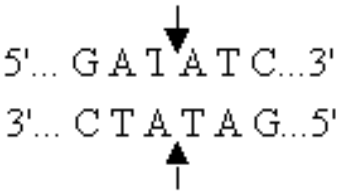


**Abb. 9**: Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *EcoRV*

K1 diente als Positivkontrolle für den Verdau mit *AflIII* und als negative Kontrolle für die Codons 1042 und 1246. Als positive Kontrolle für die beiden letzteren Codons wurde 7G8 eingesetzt.

Die Kontrolle der enzymatischen Restriktion wird mittels Gelelektrophorese (siehe 3.4.6.) durchgeführt.

### 3.4.6. Kontrolle der RFLP mittels Agarosegelelektrophorese

Zu diesem Zweck wird ein 2%iges Agarosegel bereitet:. Es werden 4g Agarose eingewogen und mit 200ml TAE-Puffer unter Aufkochen gelöst. Nach Gießen und Erkalten des Gels werden die gesamten 10µl der Inkubate aus der RFLP zusammen mit 2µl Loading Buffer in die Taschen des Gels eingebracht und die Gelkammer 90 Minuten lang an eine Spannung von 120mV angeschlossen.

Als Größenstandard laufen auch hier parallel 8µl eines 100bp-DNA-Leiter-Gemischs (10µl der Leiter angesetzt in 80µl H20 und 10µl Blaupuffer). Färbung im Ethidiumbromidbad und die Auswertung im Ultraviolet Transilluminator werden analog zu den Ausführungen in 3.4.4. durchgeführt.

### 3.4.7. Allelspezifische Polymerasekettenreaktion (AS-PCR)

Für das Codon 184 wird eine allelspezifische Polymerasekettenreaktion genutzt, die ohne RFLP auskommt und in einem einzigen Reaktionsgefäß (semi-nested) angesetzt werden kann [Adagu & Warhurst 1999b].

Die Oligonukleotide der AS-PCR werden so ausgewählt, dass sie die Region mit dem Codon 184 auf dem *Pfmdr1*-Gen flankieren. Zusätzlich zu den äußeren Vorwärts(184F)- und Rückwärtsprimern (184R) wird ein mutationsspezifischer innerer Vorwärtsprimer (MT184F) verwendet. Ebenso werden die gleichen Proben für eine weitere PCR mit den gleichen äußeren Primern, aber im Gegensatz zum ersten Ansatz mit einem wildtypspezifischem inneren Vorwärtsprimer (WT184F) benutzt (siehe Abb.10). Die äußeren Primer werden also

sowohl für die wildtypspezifische als auch die mutationsspezifische PCR benutzt, lediglich der Gebrauch der inneren Primer variiert.

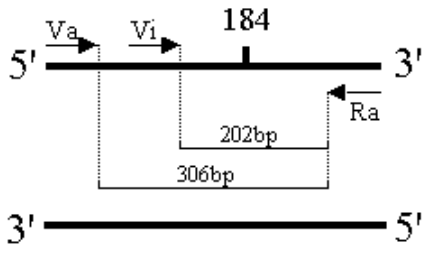


**Abb. 10**: schematische Darstellung der DNA im Bereich von Codon 184 und der unterschiedlich langen Amplifikate aus der allelspezifischen PCR
Va: äußerer Vorwärstprimer (184F)
Vi: innerer Vorwärtsprimer (MT oder WT 184F)
Ra: äußerer Rückwärtsprimer (184B)

Besonders vorteilhaft erweist sich hier die einfache Diagnose von Gemischpopulationen. In diesem Falle finden sich positive Banden sowohl bei der Verwendung des wildtyp- spezifischen als auch des mutationsspezifischen inneren Vorwärtsprimers. Grundsätzlich jedoch zeigen Proben mit Punktmutation [$184^{Phe}$] kein Produkt in der wildtypspezifischen PCR, umgekehrt weisen Isolate mit positiven Fragmenten in ebendieser PCR keine Banden auf, wenn der mutationsspezifische Primer verwendet wird.

Der Ansatz wird in einem Reaktionsgefäß mit 50µl angesetzt und besteht analog zu den Ausführungen in Abschnitt 3.4.3. aus 5µl DNA-Template, Primermix, Standard-PCR-Puffer (1,5mM $MgCl_2$; 50mM KCl; 10mM Tris-HCl; pH 8,3; 0,01% (w/v) Gelatin); 1,25 U *Taq*-Polymerase und 150µM jeder der vier dNTPs.

Zunächst wird ein Primermix mit drei Oligonukleotiden (äußerer Vorwärtsprimer, mutations- oder wildtypspezifischer innerer Vorwärtsprimer und Reversprimer) gemischt und die kalkulierte Menge in jedes Reaktionsgefäß eingebracht. Für die mutationsspezifische PCR werden die Primer 184F, MT184F und 184B in den Konzentrationen 0,05µM, 0,5µM und

0,3µM benutzt. Außer für 184F (hier 0,1µM) werden bei der wildtypspezifischen PCR die gleichen Konzentrationen verwendet. Daraufhin wird ein Wachstropfen (Lambwax$^{TM}$) genommen, bei 58°C geschmolzen, über den Mix geträufelt und bei Raumtemperatur härten gelassen.

Ein Mastermix der übrigen Komponenten ($ddH_2O$, Reaktionspuffer, dNTPs und *Taq*-Polymerase) wird hergestellt und die berechnete Menge in Aliquots jedem Gefäß hinzugefügt. Schließlich wird das DNA-Template hinzugefügt, die Gefäße beschriftet, kurz zentrifugiert und in den Thermalcycler eingebracht. Während des ersten Denaturationsprozesses mischen sich Primer- und Mastermix, nachdem die trennende Wachsschicht geschmolzen ist.

Die Zyklenzahl ergibt sich zu 40; die einzelnen Zyklen sehen wie folgt aus:

| **Zyklus** | **Denaturierung** | **Annealing** | **Extension** |
|---|---|---|---|
| 40 | 94°C (45 sec) | 47°C (1 min) | 72°C (1 min) |

Diese Zyklen erwiesen sich als optimal sowohl für die mutations- als auch die wildtypspezifische PCR. Die „Hot Start PCR“ wurde durchgeführt, um eine initiale Polymerisation mit falschen Temperaturen zu verhindern.

Die Auswertung dieser PCR erfolgt analog zu 3.4.6. mittels Elektrophorese anhand eines 2%igen Agarosegels.

### 3.4.8. Maßnahmen zur Sicherstellung der Ergebnistreue

Um die PCR zu optimieren, wurden einzelne Parameter selektiv ausgetestet. Dies trifft z.B. für die Annealingtemperatur und Zyklenzahlen zu. Die Annealingtemperatur für die Temperaturwerte 49°C, 58°C, 66°C und 75°C getestet.

Die notwendige Menge an nachweisbarer DNA wurde in einer Verdünnungsreihe bestimmt. Auch der Einsatz größerer DNA-Mengen wurde getestet. Die Konzentration der Primer wurde ebenfalls variiert. Jeder dieser Parameter wurde einzeln getestet und in dieser Phase die anderen Faktoren konstant gehalten. Keine der getesteten Einstellungen erwies sich den oben aufgeführten überlegen.

Um ein möglichst spezifisches Ergebnis zu erzielen, wird in jeden PCR-Ansatz eine positive und negative Kontrolle eingebaut, die das Gelingen bzw. eventuelle Kontamination anzeigen sollen und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherstellen sollen. Die Negativprobe enthält an Stelle einer DNA-Template 5µl Aqua destillata, die bei Hinzufügen der Templates in die Reaktionsgefäße analog in ein mit Mastermix und Primermix versetztes Reaktionsgefäß eingebracht und ebenso den Zyklen ausgesetzt wird.

Die Positivprobe, die aus dem Kulturstamm K1 und 7G8 gewonnen worden war, wird dem selben Extraktionsverfahren unterzogen und parallel zu allen anderen Extraktionen vorgenommen. Eine in der PCR als negativ erscheinende Positivkontrolle führt zur Überprüfung des Verfahrens, um einen eventuellen systematischen Fehler auszuschließen, der zum Beispiel durch eine alte Chemikalie oder einen vergessenen Arbeitsschritt entstehen würde. Ebenso lässt eine positiv erscheinende Negativprobe einen systematischen oder groben Fehler vermuten, da es sich hier mit großer Wahrscheinlichkeit um Verunreinigungen der verwendeten Chemikalien oder Geräte handelt. Ein systematischer Fehler würde also

frühzeitig auffallen und zur Überprüfung aller eingesetzten Chemikalien, Geräte und Arbeitsschritte führen.

Die DNA-Extraktion ist im Rahmen der Voreinstellungen einer grundsätzlichen Kontrolle unterzogen worden, indem Extrakte in eine andere robuste PCR zum Nachweis von *Plasmodium falciparum* eingeleitet wurden. Ein positives PCR-Ergebnis der mitgelaufenen Kontrolle (aus der Kultur entnommenes Material, das mikroskopisch nachweisbar *Plasmodium falciparum* enthielt) bestätigte außerdem die Eignung der DNA-Extraktion.

Weisen Positivkontrollen nach Durchlaufen der PCR ein negatives Ergebnis auf, werden alle Proben aus diesem Extraktions- und Amplifikationsvorgang verworfen und neu präpariert.

Um Kontamination noch weiter auszuschließen, werden sämtliche im PCR-Ansatz verwendeten Chemikalien (auch $H_2O$) in kleine Mengen aliquotiert bei –20°C aufbewahrt und können so gezielter dem Auftauprozess unterzogen werden. Damit lassen sich unnötige Temperaturwechsel vermeiden. Häufiges Öffnen und Schließen der Stocks wird somit ausgeschlossen, da sie gezielt geöffnet und der Inhalt nach zwei, spätestens drei Ansätzen verbraucht ist.

Eine Probe wurde dann als positiv erkannt, wenn sie folgende Kriterien erfüllte:

- eine erkennbare Bande, die auf eine abgelaufene Amplifikation schließen lässt
- die Lage der Bande entspricht der erwarteten Länge des Amplifikates, verglichen wurde mit dem in der Gelelektrophorese mitgelaufenen Längenstandard (DNA-Leiter)

Mit Rücksicht auf den nächsten Arbeitsschritt des Enzymverdaus (RFLP) wird zusätzlich und parallel zu den anderen Proben eine 7G8-Probe an den Codons 1042 und 1246 amplifiziert. Die 7G8-Probe besitzt bekanntermaßen die Punktmutationen $1042^{Asp}$ und $1246^{Tyr}$, nicht aber die $86^{Tyr}$-Mutation, und wird deswegen als positive Kontrolle für den RFLP-Vorgang

eingesetzt. Der Stamm K1 besitzt die Punktmutation $86^{Tyr}$, an den anderen Codons 1042 und 1246 aber keine Veränderung. Daraus wird seine Rolle als Positivkontrolle bzw. Negativkontrolle (wie in den letzten beiden Fällen) ersichtlich.

Die mikroskopische Auswertung erfolgte in Uganda. Sie wurde durch erfahrene Mikroskopierer durchgeführt. Die Ergebnisse der Mikroskopie wurden erst nach Abschluss der PCR-Testung zum statistischen Abgleich zur Verfügung gestellt.

# 4. Ergebnisse

## 4.1. Ergebnisse der Genanalyse

### 4.1.1. Eignung der PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) lieferte unter den Bedingungen, die in Abschnitt 3.4.3. für die Konzentrationen der Zusätze, die Zyklenzahl und die Temperatur genannt wurden, je nach verwendetem Primerpaar Amplifikate unterschiedlicher Länge.
Nur Proben mit erfolgter Amplifikation wurden im nächsten Schritt weiter verarbeitet; DNA-Extrakte von Proben mit fehlenden oder schwachen Banden wurden nochmals in die PCR eingeleitet und ein weiteres mal ausgewertet.

Trotz zahlreicher Maßnahmen zur Optimierung der PCR (siehe Punkt 3.4.8.) konnte nicht bei jedem Amplifizierungsprozess ein Ergebnis erzielt werden. Die Prozedur wurde mit verschiedenen Variationen so lange wiederholt, bis das limitierte Probenmaterial aufgebraucht war. Letztendlich lag nur bei 52% der 86er-Proben, bei 64% der 1042er-Proben und bei 67% der 1246er-Proben ein für die RFLP verwertbares Ergebnis vor. Dies bedeutet nicht, dass für bestimmte Proben konstant negative Ergebnisse erzielt worden wären, sondern durchaus z.B. bei einer Probe X Sequenzen um Codon 86 und 1246 erfolgreich amplifiziert werden konnten, wohingegen der Abschnitt um Position 1042 nicht in der PCR ansprach. Daher lässt sich erklären, dass von 57 Proben, die alle an irgendeinem Codon positiv waren, 30 Proben für die Auswertung an Codon 86, 36 Proben für Codon 1042 und schließlich 38 Proben für 1246 berücksichtigt werden konnten. Es gab nur 17 Proben, die an allen drei Codons positiv waren Um für die Interpretation größere Ns beurteilen zu können, wurden zunächst alle Codons getrennt betrachtet.

In der allelspezifischen PCR –einem völlig unterschiedlichen Konzept- wurden für alle Proben auswertbare Ergebnisse erzielt; allerdings standen nur noch 9 Proben zur Verfügung. Daher wird Codon 184 im Folgenden getrennt ausgewertet.

### 4.1.2. Codon 86

Durch die PCR mit dem Primerpaar *Pfmdr1-1* und *Pfmdr1-2* erhielt man eine Bande von 330bp (Abb. 11).

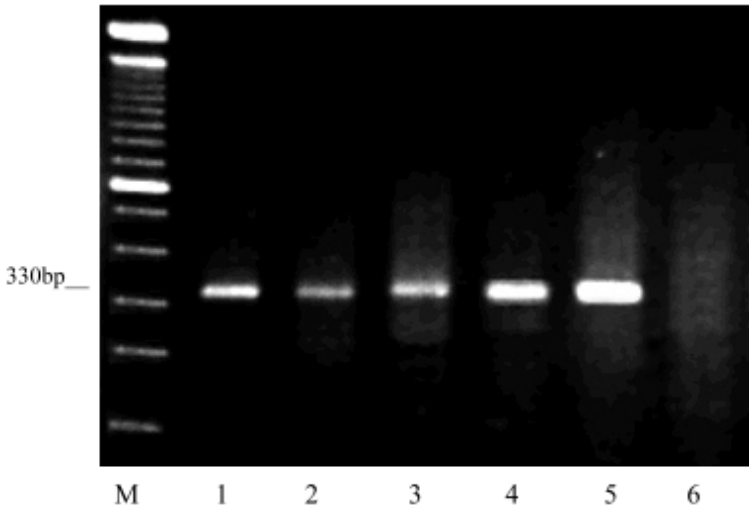


**Abbildung 11**: Gelelektrophorese: PCR am Codon 86, Amplifizierungsprodukte des Primerpaares *Pfmdr1-1* und *Pfmdr1-2* von 330bp Länge, M= Marker (Standard 100bp DNA-Leiter), Probe 5 = K1 Kontrolle, Probe 6 = $H_2O$ (Negativ-Kontrolle)

Ein besonders starkes Ergebnis zeigte der Stamm K1, der als positive Kontrolle in den Amplifizierungsprozess einbezogen wurde. Als Negativkontrolle wurde der Reaktionsansatz mit $H_2O$ versetzt, die erwartungsgemäß keine Bande in der Gelelektrophorese erkennen ließ.

Der amplifizierte Abschnitt mit seiner Größe von 330 Basenpaaren wird im Falle einer Mutation $86^{Tyr}$ durch das Restriktionsenzym *AflIII* in zwei Teilabschnitte von 110bp und 220bp gespalten. Ist die DNA-Sequenz nicht durch Punktmutation verändert, bietet der 330bp-Strang dem Enzym keinen Angriffspunkt, bleibt intakt und deutet bezüglich des Codons 86 auf das Vorliegen eines Wildtyps hin (Abb.12).

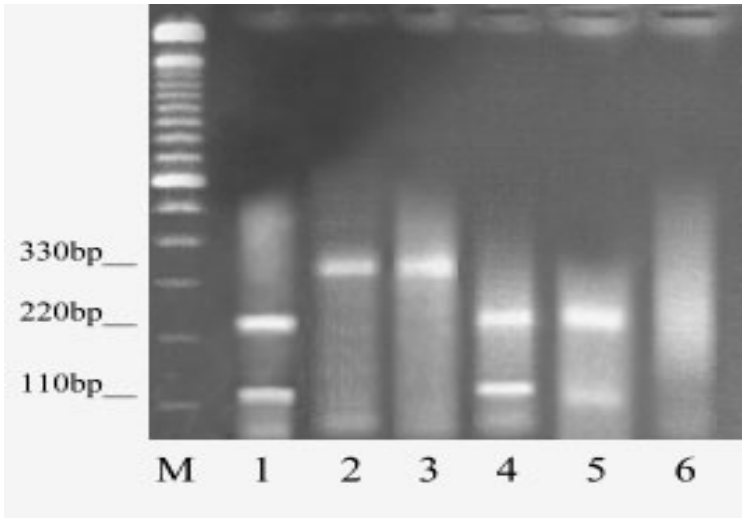


**Abbildung 12**: Restriktionsanalyse (RFLP) am Codon 86 mit *AflIII*
Spaltung des 330bp-Abschnittes in 110bp und 220bp bei Vorliegen von $86^{Tyr}$ (Proben 1, 4 und 5), keine Spaltung bei Wildtyp $86^{Asn}$ (Proben 2 und 3), Probe 5 = K1 (Positivkontrolle), Probe 6 = Negativkontrolle (Ansatz mit $H_2O$), M= Marker (Standard 100bp DNA-Leiter)

Dreißig Blutsproben aus Uganda wurden an Position 86 untersucht und durchliefen den Prozess aus PCR und RFLP; 16 der Proben wiesen die Mutation $86^{Tyr}$ auf.

### 4.1.3. Codon 1042

Abb. 13 zeigt Amplifikate von 400bp Länge, die durch die PCR mit den Primern *Pfmdr1-3* und *Pfmdr1-4* entstanden sind. In die PCR eingebunden wurden die Stämme K1 und 7G8 und ein Ansatz ohne DNA nur mit $H_2O$ versetzt.

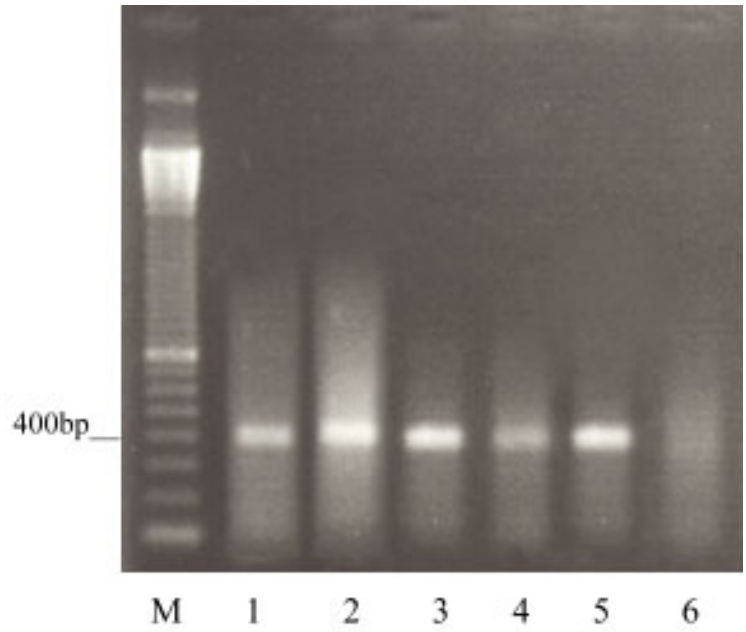


**Abbildung 13**: Gelelektrophorese: PCR am Codon 1042, Amplifizierungsprodukte des Primerpaares *Pfmdr1-3* und *Pfmdr1-4* von 400bp Länge., M= Marker (Standard 100bp DNA-Leiter), Probe 4 = K1 Kontrolle, Probe 5 = 7G8 Kontrolle, Probe 6 = $H_2O$ (negative Kontrolle)

Der amplifizierte Abschnitt an Codon 1042 wird von dem Restriktionsenzym *VspI* immer gespalten, im Falle des Wildtyps jedoch in drei Teilabschnitte von 160bp, 130bp und 110bp. Der Wildtyp liegt vor, wenn an Position 1042 die Aminosäure *Asn* kodiert wird, die Punktmutation ist durch Kodierung der Aminosäure *Asp* charakterisiert. Die Bandenverteilung bei einer Punktmutation besteht aus nur zwei Teilabschnitten von 240bp und 160bp (Abb.14).

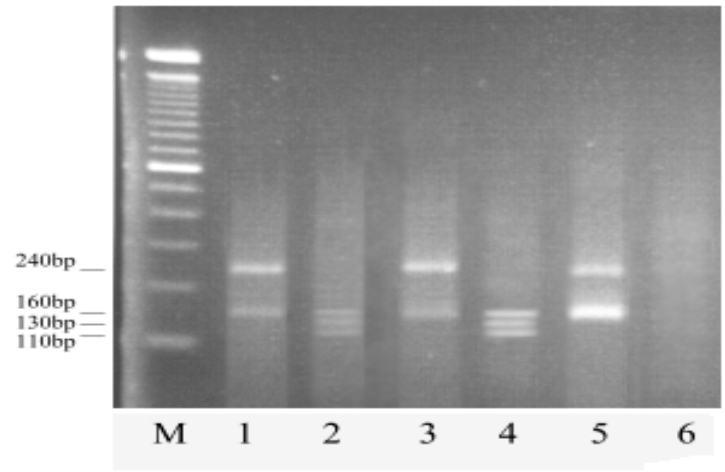


**Abbildung 14**: Restriktionsanalyse (RFLP) am Codon 1042 mit *AseI:* Spaltung des 400bp-Abschnittes in 110bp, 130bp und 160bp bei Vorliegen von Wildtyp $1042^{Asn}$ (Proben 2 und 4), Spaltung bei Mutation $1042^{Asp}$ in 240bp und 160bp (Proben 1 und 3), Probe 4 = K1 (Negativkontrolle), Probe 5 = 7G8 (Positivkontrolle), Probe 6: Ansatz mit $H_2O$; M= Marker (Standard 100bp DNA-Leiter)

Bei 36 untersuchten Proben tauchte die Punktmutation $1042^{Asp}$ 9-mal auf.

### 4.1.4. Codon 1246

Die PCR an Codon 1246 liefert Amplifikate von 500bp Länge (Abb. 15). Analog zur Amplifizierung an Codon 1042 wurden auch hier die Stämme K1 und 7G8 als Positivkontrollen verwendet.

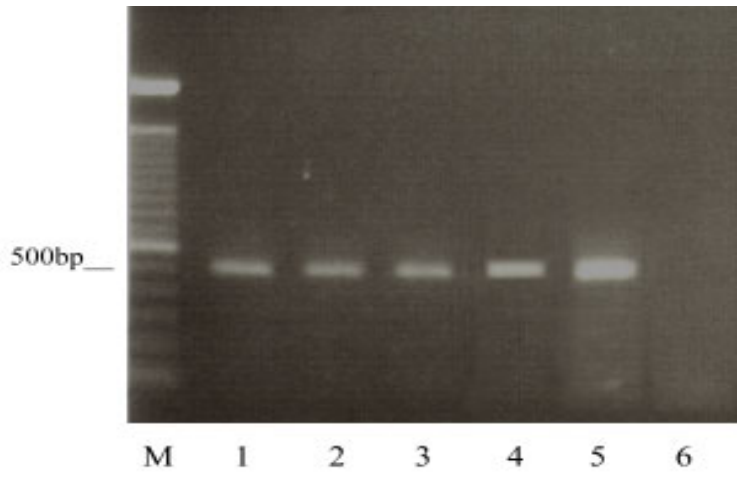


**Abbildung 15**: Gelelektrophorese: PCR am Codon 1246, Amplifizierungsprodukte des Primerpaares *Pfmdr1-5* und *Pfmdr1-6* von 500bp Länge., M= Marker (Standard 100bp DNA-Leiter), Probe 4 = K1-Kontrolle, Probe 5 = 7G8-Kontrolle, Probe 6 = $H_2O$ (Negativkontrolle)

Amplifikate um das Codon 1246 mit einer Länge von 500bp tragen als Wildtyp die Aminosäure *Asp;* die Sequenz wird als solche nicht von dem Restriktionsenzym *EcoRV* angegriffen. Zwei Banden von jeweils 250bp Länge sind indikativ für eine erfolgreiche Restriktion und die Mutation $1246^{Tyr}$ (Abb. 16).

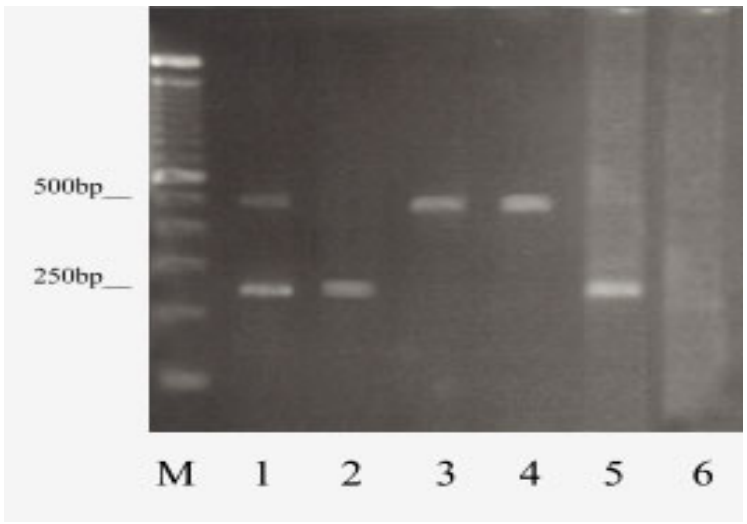


**Abbildung 16**: Restriktionsanalyse (RFLP) am Codon 1246 mit *EcoRV:*
Spaltung des 500bp-Abschnittes in 2x 250bp bei Vorliegen von Mutation $1246^{Tyr}$ (Proben 1, 2 und 5), keine Spaltung bei Wildtyp $1246^{Asp}$ (Proben 3 und 4),
Probe 4 = K1 (Negativkontrolle), Probe 5 = 7G8 (Positivkontrolle),
Probe 6: Ansatz mit $H_2O$; M= Marker (Standard 100bp DNA-Leiter)
Besonderheit: Probe 1: gemischte Klone mit Mutation und Wildtyp

Von 38 an Codon 1246 untersuchten Proben zeigten 6 Proben den Polymorphismus $1246^{Tyr}$ (5 davon mit gemischten Klonen), bei den übrigen 32 Proben war die DNA-Sequenz nicht durch Mutation an Position 1246 verändert.

Die verschiedenen Genotypen in einem Isolat komplizieren die Interpretation der Daten, da verschiedenen Polymorphismen häufig simultan vorhanden waren, und dies an Tag 0, bevor Selektionsdruck auf die Parasitenpopulation ausgeübt wurde. Allerdings handelt es sich hier um eine kleine Anzahl von Proben.

Abbildung 17 zeigt eine Übersicht der drei Amplifikate um die Positionen 86, 1042 und 1246.

Die Amplifikate wurden der Veranschaulichung halber in einer gemeinsamen Gelelektrophorese aufgetragen.

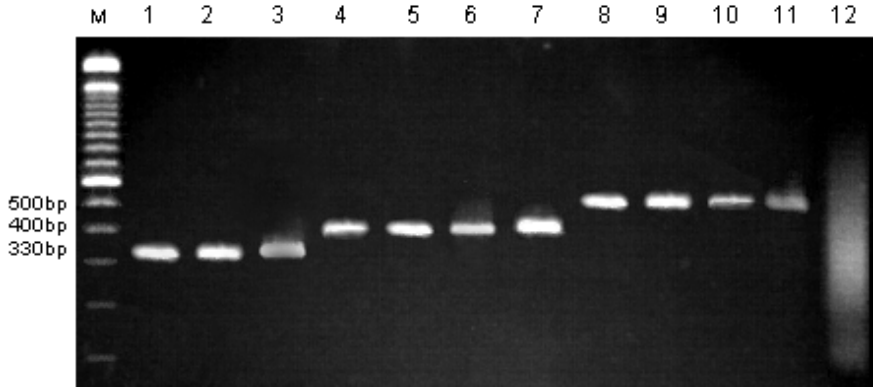


**Abbildung 17**: Proben 1-3: PCR am Codon 86, Probe 3 = K1 (Positivkontrolle)
Proben 4-7: PCR am Codon 1042, Probe 6 = 7G8, Probe 7 = K1
Proben 8-10: PCR am Codon 1246: Probe 10 = 7G8, Probe 11 = K1
Probe 12: Negativkontrolle der PCR an Codon 1246 (Ansatz mit $H_2O$)

### 4.1.5. Codon 184

Am Codon 184 werden durch die allelspezifische Polymerasekettenreaktion zwei verschiedene Produkte je PCR erzeugt. Das äußere Primerpaar führt durch die Amplifikation zu einer 306bp starken Bande. Die inneren Vorwärtsprimer (entweder wildtypspezifisch oder mutationsspezifisch) verursachen zusammen mit dem Rückwärtsprimer die Amplifikation eines 202bp Produktes. Das Produkt mit dem höheren molekularen Gewicht, 306bp, ist bei allen Proben sichtbar und dient als positive Kontrolle für die Eignung der verwendeten DNA-Templates. Das 202bp-Produkt dagegen zeigt spezifisch eine Mutation [$184^{Phe}$], sofern die PCR mit dem mutationsspezifischen inneren Vorwärtsprimer durchgeführt wurde. Bei Verwendung des wildtypspezifischen inneren Vorwärtsprimers steht die 202bp-Bande für Wildtyp.

In Abbildung 18 ist die allelspezifische PCR an Codon 184 dargestellt. Diese PCR wurde mit mutationsspezifischen Primern durchgeführt.

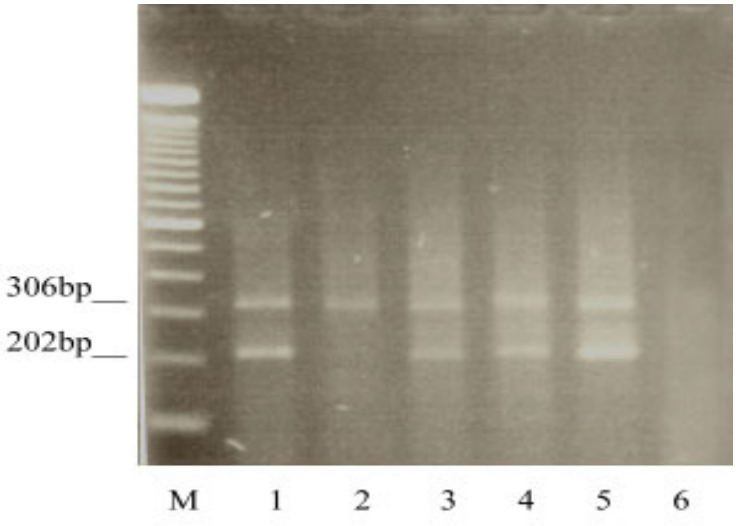


**Abbildung 18.:** allelspezifische PCR mit mutationspezifischem inneren Vorwärtsprimer (202bp-Produkt bei Mutations-Stämmen), kein 202bp-Produkt bei Wildtyp $184^{Tyr}$ (Probe 2). 306bp-Produkt zwischen äußeren Primern bei allen Proben, Probe 5: 7G8 (Positivkontrolle); Probe 6: Ansatz mit $H_2O$;
M= Marker (Standard 100bp DNA-Leiter)

In Abbildung 19 ist für die **gleichen** Proben der wildtypspezifische Primer verwendet worden. Nur die Proben, die sowohl Klone mit und auch solche ohne Mutation enthielten, waren bei Verwendung beider inneren Vorwärtsprimer positiv (Probe 3 in Abb.18 und 19); die übrigen Proben zeigten nur bei jeweils einem von beiden spezifischen Primern positive Banden.

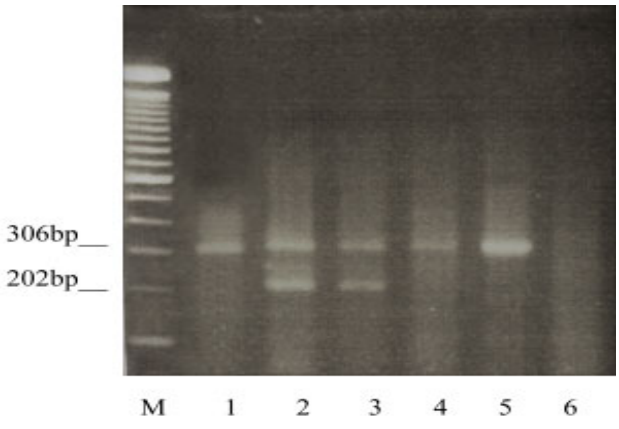


**Abbildung 19:** allelspezifische PCR mit wildtypspezifischem inneren Vorwärtsprimer 202bp-Produkt bei Wildtyp-Stämmen (Proben 2 und 3), kein 202bp-Produkt bei Mutation $184^{Phe}$ (Proben 1, 4 und 5). 306bp-Produkt zwischen äußeren Primern bei allen Proben, Probe 5: 7G8 (Negativkontrolle); Probe 6: Ansatz mit $H_2O$;
M= Marker (Standard 100bp DNA-Leiter)

Bei 8 von den 9 untersuchten Proben lagen Populationen mit der Mutation $184^{Phe}$ vor. Vier dieser Proben waren allerdings gemischt und es wurden zusätzlich zu den mutierten auch wilde Stämme detektiert. Nur ein Isolat bestand rein aus wilden Stämmen.

## 4.2. Resistenzstatus der Proben

Die mediane Parasitendichte vor der Behandlung belief sich auf 8200 Parasiten/µl. (Intervall 508-89520). Bei den in dieser Arbeit untersuchten Proben manifestierten sich *in vivo*-Resistenzen recht häufig. Bei 40 von 57 Patienten blieb der Behandlungserfolg aus, was einer Rate von 70,2% Chloroquinresistenz (anhand klinischer und parasitologischer Kriterien) entspricht. Dreizehn dieser 40 Patienten lassen sich gemäss den erwähnten Kriterien (siehe 3.3.1.) als **klinische** Therapieversager klassifizieren. Die übrigen 27 Patienten zeigten zu einem späteren Zeitpunkt Zeichen einer bleibenden bzw. rekurrierenden Parasitämie. Bei allen resistenten Fällen war die mediane Parasitämie 384/µl (Bereich: 16-27800/µl) an den Tagen 3/7/14 nach Behandlung.

## 4.3. Korrelation der Punktmutationen mit Chloroquinresistenz

### 4.3.1. Codons 86, 1042 und 1246

In Tabelle 1 sind alle untersuchten Proben, die Ergebnisse aus der PCR/RFLP bwz. AS-PCR (allelspezifische PCR) und der Resistenzstatus unter Chloroquintherapie angegeben.

„OUTC14“ bzw. „OUTC7“ stehen hierbei für das Ansprechen auf Chloroquintherapie nach 14 bzw. 7 Tagen. Die Werte von 1 bis 4 stehen analog zu den Angaben in Abschnitt 3.3.1. für sensitiv bis klinisch resistent. Klinische Resistenz wird durch die Kategorien 3 und 4 repräsentiert; zusammen mit Kategorie 2 wird auch die parasitologische Resistenz berücksichtigt. „DENS“ gibt jeweils die Parasitendichte für die Tage 0, 3, 7 und 14 an.

| Tabelle 1: Proben mit zugeordneten Ergebissen aus der PCR/RFLP und deren Resistenzstatus | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Probe #** | **PCR 86** | **RFLP 86** | **PCR 1042** | **RFLP 1042** | **PCR 1246** | **RFLP 1246** | **AS-PCR 184** | **Outc 14** | **Outc 7** | **Dens 0** | **Dens 3** | **Dens 7** | **Dens 14** |
| 6120 | Neg. | / | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | | 2 | 1 | 23000,0 | 140,0 | 0,0 | 20,0 |
| 6117 | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | | | 2 | 3840,0 | 0,0 | 420,0 | |
| 6112 | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | Neg. | / | | 2 | 1 | 3568,0 | 0,0 | 0,0 | 940,0 |
| 6110 | Neg. | / | Pos. | Mutation | Neg. | / | | 3 | 3 | 24440,0 | 2920,0 | 1568,0 | |
| 6108 | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | Neg. | / | | 1 | 1 | 1560,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 5066 | Pos. | Mutation | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wild/Mut. | Wild/Mut. | 3 | 3 | 4940,0 | 156,0 | 72,0 | |
| 5065 | Neg. | / | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | | 1 | 2 | 5260,0 | 980,0 | 48,0 | 0,0 |
| 5058 | Pos. | Mutation | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | | 3 | 3 | 4608,0 | 304,0 | 268,0 | |
| 5055 | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | Mutation | 2 | 1 | 18720,0 | 0,0 | 0,0 | 7900,0 |
| 5053 | Pos. | Mutation | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | | 3 | 3 | 83040,0 | 416,0 | 84,0 | |
| 5052 | Pos. | Mutation | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wild/Mut. | Wild/Mut. | | 1 | 27840,0 | 256,0 | 0,0 | |
| 5051 | Pos. | Mutation | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wild/Mut. | Mutation | 3 | 3 | 89520,0 | 758,0 | 268,0 | |
| 5044 | Pos. | Mutation | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | | 4 | 4 | 2672,0 | 1776,0 | 384,0 | |
| 5039 | Pos. | Mutation | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | Wild/Mut. | 1 | 1 | 32600,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 5020 | Pos. | Mutation | Neg. | / | Neg. | / | | | 2 | 2576,0 | 8,0 | 236,0 | |
| 4080 | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | Mutation | 3 | 3 | 59640,0 | 4016,0 | 3056,0 | |
| 4079 | Pos. | Mutation | Pos. | / | Neg. | / | | 3 | 3 | 516,0 | 20,0 | 6768,0 | |
| 4078 | Pos. | Wildtyp | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | | 3 | 3 | 612,0 | 72,0 | 464,0 | |
| 4067 | Pos. | Mutation | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wild/Mut. | | 4 | 4 | 5360,0 | 2076,0 | | |
| 4066 | Pos. | Wildtyp | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | | 4 | 4 | 8440,0 | 3560,0 | | |
| 4058 | Pos. | Wildtyp | Neg. | / | Neg. | / | | 3 | 3 | 6200,0 | 36,0 | | |
| 4055 | Pos. | Mutation | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | | 4 | 4 | 102800,0 | 27800,0 | | |
| 4052 | Pos. | Wildtyp | Neg. | / | Pos. | Mutation | | 4 | 4 | 8760,0 | 4080,0 | | |
| 4049 | Neg. | / | Pos. | Mutation | Neg. | / | | 4 | 4 | 508,0 | 376,0 | | |
| 4048 | Pos. | Mutation | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | Mutation | 3 | 3 | 81680,0 | 13920, | 140,0 | |
| 4047 | Pos. | Wildtyp | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | | 4 | 4 | 5000,0 | 1680,0 | | |
| 4039 | Neg. | / | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | | 3 | 3 | 11640,0 | 12,0 | 24,0 | |
| 3039 | Pos. | Mutation | Neg. | / | Pos. | Wild/Mut. | Wildtyp | 3 | 3 | 6800,0 | 452,0 | 216,0 | |
| 3032 | Neg. | / | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | | 4 | 4 | 6248,0 | 4800 | 28,0 | 7600,0 |
| 3026 | Neg. | / | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | | 4 | 4 | 7200 | 3600 | | |
| 3017 | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | Wild/Mut. | 4 | 4 | 29600,0 | 16800 | | |
| 3012 | Neg. | / | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | | 3 | 3 | 14000,0 | 1608,0 | 2860,0 | |
| 2069 | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | | 4 | 4 | 2792,0 | 1088,0 | | |
| 2066 | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | Neg. | / | | 3 | 2 | 22560,0 | 12,0 | 16,0 | 15380, |
| 2063 | Neg. | / | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | | 3 | 3 | 24600,0 | 768,0 | 292,0 | |
| 2060 | Neg. | / | Pos. | Mutation | Neg. | / | | | 2 | 3076,0 | 20,0 | 32,0 | |
| 2055 | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | | 3 | 3 | 6044,0 | 356,0 | 20,0 | |
| 2051 | Neg. | / | Pos. | Mutation | Neg. | / | | 3 | 3 | 6892,0 | 156,0 | 2888,0 | |
| 2050 | Neg. | / | Pos. | Mutation | Neg. | / | | 4 | 4 | 20160,0 | 5440,0 | 288,0 | |
| 2049 | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | | | 2 | 2152,0 | 24,0 | 100,0 | |
| 2043 | Pos. | Mutation | Neg. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | | 4 | 4 | 20400,0 | 8160,0 | 872,0 | |
| 2041 | Neg. | / | Pos. | Mutation | Neg. | / | | 3 | 3 | 7960,0 | 16,0 | 456,0 | |
| 2038 | Pos. | Wildtyp | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | | | 1 | 10240,0 | 24,0 | 0,0 | |
| 2037 | Neg. | / | Pos. | Mutation | Neg. | / | | | 2 | 11888,0 | 240,0 | 784,0 | |
| 2036 | Neg. | / | Pos. | Mutation | Neg. | / | | 3 | 3 | 14384,0 | 2680,0 | 2264,0 | |
| 2030 | Neg. | / | Pos. | Mutation | Neg. | / | | 3 | 1 | 24400,0 | 36,0 | 0,0 | 12360, |
| 1033 | Pos. | Mutation | Pos. | Wildtyp | Neg. | / | | 1 | 1 | 9440,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 1003 | Pos. | Mutation | Neg. | / | Neg. | / | | 3 | 3 | 9040,0 | 24,0 | 1200,0 | |
| 1036 | Neg. | / | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | | 1 | 1 | 4800 | 0 | 0 | 0 |
| 1041 | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | | 2 | 2 | 28720 | 0 | 4 | 12 |
| 1047 | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | Neg. | / | | 1 | 1 | 43360 | 0 | 0 | 0 |
| 3020 | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | Neg. | / | | | 1 | 23600 | 168 | 0 | |
| 3051 | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | | 1 | 1 | 56800 | 12 | 0 | 0 |
| 5047 | Neg. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | | 1 | 1 | 784 | 40 | 0 | |
| 5067 | Neg. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | | 1 | 1 | 5616 | 492 | 0 | 0 |
| 5073 | Neg. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | Pos. | Wildtyp | | | 2 | 1572 | 237 | 48 | 0 |
| 5121 | Neg. | / | Neg. | / | Pos. | Wildtyp | | 1 | 1 | 1556 | 0 | 0 | 0 |

Tabelle 2 zeigt in der Übersicht, bei wie vielen Proben mit den Mutationen $86^{Tyr}$, $1042^{Asp}$ oder $1246^{Tyr}$ nach 14 Tagen Chloroquintherapie **klinische** Resistenz aufgetreten war. Ebenso lässt sich aus ihr die Häufigkeit von Fällen sehen, die sich als klinisch resistent erwiesen, obwohl keine Mutation nachgewiesen wurde. Es ist zunächst deutlich, dass Resistenzen bei Proben mit Mutationen wesentlich häufiger vorkamen (86%-100%) als wenn keine dieser Mutationen (55%-64%) vorlag. Allerdings hat dieser Zusammenhang nur für Locus 1042 einen statistisch signifikanten Level erreicht.

Umgekehrt ist bei allen resistenten Proben die Zahl derer mit Mutation recht klein. Dies gilt für alle drei Loci. Nur bei Locus 86 übertraf sie die 50%-Grenze (12 resistente Mutations-Proben von insgesamt 19 resistenten Proben), während sie sich an den Loci 1042 und 1246 nur in bei 37% (7 von 19 Proben) bzw. 22% (5 von 23 Proben) manifestierte.

| **Polymorphismus** | **Klinisch resistente Proben / alle untersuchte Proben (%)** | **Odds Ratio (95%CI)** | **P ($\chi$2)** |
|---|---|---|---|
| Locus 86 (n=25) | | | |
| Mutation | 12/14 (86) | 3,4 | 0,2 |
| Wildtyp | 7/11 (63) | (0,5-23,8) | |
| % Mutation bei Resistenz | 63% | | |
| Locus 1042 (n=29) | | | |
| Mutation | 7/7 (100) | n.a. | 0,03** |
| Wildtyp | 12/22 (55%) | | |
| % Mutation bei Resistenz | 37% | | |
| Locus 1246 (n=33) | | | |
| Mutation | 5/5 (100) | n.a. | 0,1** |
| Wildtyp | 18/28 (64) | | |
| % Mutation bei Resistenz | 22% | | |
| Schnittmenge (n=26) | | | |
| Mindestens eine Mutation | 18/20 (90) | 18,0 | 0,006 |
| Wildtyp an allen drei Loci | 2/6 (33) | (1,9-16,9) | |
| % Mutation bei Resistenz | 90% | | |

**Tabelle 2: Klinische Resistenzen nach 14-tägiger Chloroquintherapie**
**Fisher's Exact Test, einseitig n.a.=nicht anwendbar
Die Odds Ratio bezeichnet das Risiko klinischer Resistenz bei Vorliegen einer Punktmutation im Vergleich zum Risiko von Resistenzen bei Infektion mit Wildtyp.

Zu den einzelnen Codons: Bei 86% der $86^{Tyr}$-Fälle traten im Verlaufe von 14 Tagen Resistenzen auf. Im Umkehrschluss fand sich diese klinische Resistenz aber auch bei 63% der Wildstämme.

Wenn in einer Probe die Mutation $1042^{Asp}$ gefunden wurde, ließ sich dies immer (zu 100%) mit Resistenz in Verbindung bringen. Ohne diese genetische Veränderung kam es nur bei 55% der Fälle zum Therapieversagen.

Parallelen lassen sich für den Polymorphismus $1246^{Tyr}$ finden: Klinische Resistenz trat jedes Mal auf, wenn diese Mutation vorlag. Bei Infektion mit Wildstämmen kam es durchaus auch zum Therapieversagen, aber im Vergleich dazu nur bei 64% der Fälle.

Spielt es nun eine Rolle, ob eine bestimmte Punktmutationen auftritt? Oder reicht es schon, wenn überhaupt irgendeine der drei Mutationen vorliegt, um die Wahrscheinlichkeit eines Therapieversagens zu erhöhen?

Alle Proben mit mindestens einer Mutationen an einem der drei untersuchten Loci wurden mit denen verglichen, die ausschließlich Wildtyp –und dies an allen Loci- präsentierten. Das Ergebnis der Betrachtung ist signifikant: 90% der 20 Fälle mit Mutationen waren klinisch resistent! (OR 18.0 95% Konfidenzintervall [1.9 – 16.9]; p=0,006). Patienten, die von Wildstämmen infiziert worden waren, sprachen dagegen mehrheitlich auf Chloroquin an, nur 1/3 zeigte weiterhin klinische Zeichen von Resistenz.

Wenn zusätzlich auch Proben mit parasitärer Resistenz (aber klinischer Heilung) mitberücksichtigt wurden, waren die Ergebnisse essenzielll gleich. Tabelle 3 gibt die entsprechenden Verhältnisse wider.

| **Polymorphismus** | **Parasitologisch resistente Proben / alle untersuchten Proben (%)** | **Odds Ratio (95%CI)** | **P ($\chi^2$)** |
|---|---|---|---|
| Locus 86 (n=25) | | | |
| Mutation | 12/14 (86) | 2,6 | 0,4 |
| Wildtyp | 8/11 (73) | (0,3-16,6) | |
| % Mutation bei Resistenz | 60% | | |
| Locus 1042 (n=29) | | | |
| Mutation | 7/7 (100) | n.a. | 0,1** |
| Wildtyp | 15/22 (68) | | |
| % Mutation bei Resistenz | 32% | | |
| Locus 1246 (n=33) | | | |
| Mutation | 5/5 (100) | n.a. | 0,3** |
| Wildtyp | 21/28 (75) | | |
| % Mutation bei Resistenz | 19% | | |
| Schnittmenge (n=26) | | | |
| Mind. eine Mutation | 18/20 (90) | 9,0 | 0,04 |
| Wildtyp an allen drei Loci | 3/6 (50) | (1,03-78,6) | |
| % Mutation bei Resistenz | 86% | | |

**Tabelle 3: Parasitologische Resistenzen nach 14-tägiger Chloroquintherapie**
**Fisher's Exact Test, einseitig n.a.=nicht anwendbar
Die Odds Ratio bezeichnet das Risiko parasitologischer Resistenz bei Vorliegen einer Punktmutation im Vergleich zum Risiko von Resistenzen bei Infektion mit Wildtyp.

Wenn nur ein Zeitraum von 7 Tagen betrachtet wird, können mehr Fälle berücksichtigt werden, auch jene, die dann später noch vor Ablauf der 14 Tage ausgeschieden sind. Dass sich die Zusammenhänge zwischen den Mutationen und klinischer bzw. parasitologischer Resistenz bei Fokussierung auf den Zeitraum von einer Woche nicht wesentlich von den 14-Tages-Werten unterscheiden, wird aus Tabelle 4 ersichtlich.

| Polymorphismus | klinisch resistente Proben / alle untersuchten Proben (%) | Odds Ratio (95%CI) | P ($\chi^2$) | Parasitologisch resistente Proben / alle untersuchten Proben (%) | Odds Ratio (95%CI) | P ($\chi^2$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Locus 86 (n=30) | | | | | | |
| Mutation | 12/16 (75) | 3,0 | 0,15 | 13/16 (81) | 2,4 | 0,3 |
| Wildtyp | 7/14 (50) | (0,6-14,0) | | 9/14 (64) | (0,5-12,7) | |
| % Mutation bei Resistenz | 63% | | | 59% | | |
| Locus 1042 (n=36) | | | | | | |
| Mutation | 6/9 (67) | 2,9 | 0,17 | 8/9 (89) | 5.5 | 0,08 |
| Wildtyp | 11/27 (41) | (0,6-14,1) | | 16/27 (59) | (0,6-50,4) | |
| % Mutation bei Resistenz | 35% | | | 33% | | |
| Locus 1246 (n=38) | | | | | | |
| Mutation | 5/6 (83) | 3,9 | 0,2 | 5/6 (83) | 2,0 | 0,5 |
| Wildtyp | 18/32 (56) | (0,4-37,2) | | 23/32 (72) | (0,2-19,1) | |
| % Mutation bei Resistenz | 22% | | | 18% | | |
| Schnittmenge (n=32) | | | | | | |
| Mind. eine Mutation | 17/25 (68) | 5,3 | 0,06 | 21/25 (84) | 7,0 | 0,04 |
| Wildtyp an allen drei Loci | 2/7 (29) | (0,8-33,5) | | 3/7 (43) | (1,1-44,0) | |
| % Mutation bei Resistenz | 90% | | | 88% | | |

**Tabelle 4: Klinische & Parasitologische Resistenzen nach 7-tägiger Chloroquintherapie**
n.a.=nicht anwendbar
Die Odds Ratio bezeichnet das Risiko klinischer bzw. parasitologischer Resistenz bei Vorliegen einer Punktmutation im Vergleich zum Risiko einer Resistenz bei Infektion mit Wildtyp.

Schließlich wurde der Fokus auf jene 17 Proben gesetzt, bei denen an allen 3 Codons auswertbare Ergebnisse erzielt wurden. Neun Fälle hatten sich nach 7 Tagen als klinisch resistent erwiesen. Dazu kam ein parasitologisch resistenter Fall (insgesamt in 58,8% resistente Verläufe). Neun Isolate präsentierten die Mutation $86^{Tyr}$, vier davon erwiesen sich als multiklonal und hatten zusätzlich die Mutation $1246^{Tyr}$. Sieben der neun $86^{Tyr}$-Proben waren zugleich klinisch resistent (77%). Unter den vier multiklonalen Proben gab es 3 Therapieversager (75%). Wenn die Aussage anhand einer solch kleinen Anzahl von Proben überhaupt möglich ist, so gibt es hier keinen Unterschied zwischen der Auswirkung einer einzelnen Mutation oder einer Kombination von mehreren Mutationen auf die Resistenz. Keines der Isolate zeigte Veränderungen an Codon 1042.

### 4.3.2. Codon 184

Die einzige Probe, bei der ausschließlich Populationen mit Wildtyp vorhanden waren, erwies sich als klinisch resistent gegenüber Chloroquin. Unter den Proben mit Mutation waren 75% resistent. Insgesamt traten bei den untersuchten Proben in 44% der Fälle Mischpopulationen auf. Bei diesen fand sich die gesamte Bandbreite von klinischen Verläufen von sensitiv bis klinisch resistent. Obwohl hier nur eine kleine Zahl von Proben für die Analyse an Codon 184 zur Verfügung stand, lässt sich an den uneinheitlichen Ergebnissen erkennen, dass sich für $184^{Phe}$ kein Zusammenhang mit Chloroquinresistenz konstruieren lässt.

## 4.4. Signifikanz der Ergebnisse

Ausgehend von den Tabellen (Vierfeldertafeln) wurden für jedes Codon Berechnungen zur Signifikanz erstellt. Dabei wurde jeweils anhand der entsprechenden Aminosäure geprüft, ob für die resistenten bzw. sensitiven Proben der „Wildtyp“ oder die „Mutation“ signifikant häufiger vorliegt. Die Werte für p und $\chi^2$ ergaben sich unter Verwendung des Fisher‘s Exact Test. Die Signifikanz der Ergebnisse lässt sich aus den einzelnen Tabellen 2, 3 und 4 in Abschnitt 4.3.1. ablesen. Die Proben, die jeweils zwei Genotypen aufwiesen, wurden ebenfalls in den Test einbezogen. Insgesamt besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Mutationen und Resistenz im Vergleich zu reinen Wildstämmen ($p=0,006$). Bei Fokussierung auf ein einzelnes Codon konnte eine derart deutliche Verbindung nicht nachgewiesen werden ($p=0,2$ für Lokus 86; $p=0,03$ für Codon 1042; $p=0,1$ für Codon 1246 / 14 Tages-Werte für klinische Resistenz).

# 5. Diskussion

Die *Malaria tropica* trägt immer noch entscheidend zur hohen Morbidität und Mortalität in Afrika bei [Fidock *et al.* 2001]. In der zweiten Hälfte des 20.Jahrhunderts wurde Chloroquin als das Antimalariamittel der Wahl eingesetzt. Die Gründe dafür waren seine schnelle Wirksamkeit, die hohe Effizienz auch gegen die anderen humanen Plasmodien-Spezies, gute Toleranz und Sicherheit bei jungen Kindern und Schwangeren sowie die preisgünstige Verfügbarkeit [Basco & Ringwald 2001]. Vor mehr als 40 Jahren traten in Südostasien und Südamerika erstmals Resistenzen gegen das Medikament auf. In diesen Regionen muss mittlerweile weitgehend auf Chloroquin zur Behandlung der *Malaria tropica* verzichtet werden. Aus Mangel an preisgünstigen Alternativen ist Chloroquin jedoch in den meisten afrikanischen Ländern einschließlich Uganda [Kamya *et al.* 2001] immer noch das Antimalariamittel Nummer Eins.

Die genetischen Grundlagen der Chloroquinresistenz sind nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt [Durand *et al.* 2001]. Dies nicht zuletzt, weil auch die Wirkungsmechanismen Chloroquins im Allgemeinen und der Chloroquinresistenz im Besonderen nicht umfassend entschlüsselt werden konnten. [Ridley 1998; Fitch 1969, 1983; Bray *et al.* 1998; Krogstad *et al.* 1987; Sanchez *et al.* 1997; Basco & Ringwald 2001; Wellems & Plowe 2001]. Weit gehende Übereinstimmung herrscht darüber, dass resistente Parasiten den pH und die Konzentration Chloroquins an seinem Wirkort, der Nahrungsvakuole, vermindern können und damit auch die Toxizität der Bindung von Chloroquin mit Hämatin, das während der Digestion des Ery-Hämoglobins in der Nahrungsvakuole freigesetzt wird [Carlton *et al.* 2001; Dorn *et al.* 1998; Ginsburg & Stein 1991; Krogstad *et al.* 1987, 1992; Ridley 1998; Basco & Ringwald 2001].

## 5.1. Charakterisierung der Studie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Häufigkeit von *in vivo*-Chloroquinresistenz (CQR) an einem Panel von 57 ugandischen *Malaria tropica* - Patienten ermittelt. Darüber hinaus wurde in deren Blutsproben das so genannte *Pfmdr1*-Gen des *Plasmodium falciparum* auf die Existenz der Punktmutationen $Tyr^{86}$, $Tyr^{1246}$, $Asp^{1042}$ und $Phe^{184}$ analysiert und eine Assoziation dieser Polymorphismen –einzeln und in Kombination- mit der CQR überprüft. Somit schätzt diese Arbeit die *Pfmdr1*-Mutationen in ihrer Tauglichkeit als prognostische Parameter des zu erwartenden klinischen Verlaufs ein.

Was Uganda angeht, so haben frühere Studien eine überraschend niedrige Rate an CQR ergeben (Spannweite 4-26%, beschrieben bei Sezi *et al.* [1991], Kamugisha *et al.* [1993], und Nevill *et al.* [1995]). In den Nachbarländern wurden dagegen 50-80% aller Infektionen von resistenten Erregern hervorgerufen (Bayoumi *et al.* 1989; Brandling-Bennet 1988; Fowler *et al.* 1993; Kamugisha *et al.*1993; Kilian *et al.* 1998; Nevill *et al.* 1995; Sezi *et al.*1991). Kilian *et al.* [1998] unterstrichen daher die Notwendigkeit einer Methode, die geeignet ist, sich entwickelnde, aber noch nicht klinisch manifeste Chloroquinresistenz zu erfassen. Obwohl hierbei die *in vitro*-Resistenzprüfung sehr hilfreich sein kann, muss sie für die Anwendung vor Ort wegen hoher Kosten als ungeeignet eingestuft werden.

In dieser Untersuchung wurde stattdessen die Polymerasekettenreaktion (PCR), entweder allelspezifisch oder in Verbindung mit Restriktionsanalyse, angewandt. In der PCR wurden mittels geeigneter Primersequenzen bestimmte Zielabschnitte des Plasmodien-Genoms amplifiziert, auf denen diejenigen Punktmutationen lokalisiert sind, die in Studien mit Chloroquinresistenz in Verbindung gebracht worden waren. Die vervielfachten DNA-Sequenzen wurden dann zusammen mit Restriktionsenzymen inkubiert. In der

Gelelektrophorese wurde ausgewertet, ob und welche Veränderungen in der Erbsubstanz vorliegen. Mit dieser recht schnell durchzuführenden Methodik ließen sich zwar bereits innerhalb weniger Stunden erste Ergebnisse gewinnen, insgesamt erwies sich die PCR aber als anfällig gegenüber äußeren Störfaktoren.

Von 57 *Plasmodium falciparum*-Isolaten wurde bei 41 Proben Chloroquinresistenz festgestellt (71,9%), recht hoch im Vergleich zu den erwähnten früheren Publikationen (siehe oben)! Dieses Ausdehnung von klinischer und parasitologischer Resistenz wurde auch in der aktuellen Studie von Kamya für Uganda bestätigt [72%, 14 Tages-Werte, Kamya *et al.* 2000, 2001].

Die Ergebnisse dieser Studie lassen insgesamt keine handfeste Assoziation dieser Resistenzwerte mit den einzelnen *Pfmdr1*-Punktmutationen zu. Angenommen, dass die Mutationen im *Pfmdr1*-Gen wirklich eine explizite Rolle bei der *in vivo*-CQR spielen, dann wäre die Chloroquintherapie bei Infektion mit *Pfmdr1*-mutierten Stämmen ineffektiv. Umgekehrt würde man erwarten, dass Patienten, die mit Wildstämmen infiziert sind, auf Chloroquin gut ansprechen.

Entgegen dieser theoretischen Erwägung gab es 8 resistente Proben unter 14 Isolaten mit $86^{Asn}$ (Wildtyp) und 4 chloroquinsensitive Proben mit $86^{Tyr}$-Populationen (Mutation!). Die Korrelation zur klinischen Antwort war auch dann lückenhaft, wenn eine weitere Mutation an Codon 1246 mitberücksichtigt wurde.

Was Codon 1042 angeht, so wies zwar keine der sensitiven Proben die $1042^{Asp}$-Mutation auf; weitere 16 Fälle hatten aber ebenso wenig diese Punktmutation und waren dennoch resistent. Auch hier ist keine zuverlässige Vorhersage möglich.

Am Codon 1246 und 1042 mutierte Stämme haben Studien zufolge eine Bedeutung in Südamerika [Povoa *et al.* 1998]. Ausgehend von unseren Ergebnissen, zeigte diese Mutation in Uganda keine signifikante Verbindung zu CQR .

Die Analyse des Codons 184 konnte auch keine spezifischen Ergebnisse liefern: Bei fast allen Proben lagen Populationen mit der Mutation $184^{Phe}$ vor. Die einzige Ausnahme, die noch die ursprüngliche Sequenz am Lokus 184 trug, war resistent. Wilson *et al.* [1993] hatten bereits vorgeschlagen, dass die Mutation $184^{Phe}$ einen Zusammenhang zur Mefloquinresistenz hat. Dieser könne durch Amplifikation des entsprechenden Abschnittes verstärkt werden. Adagu & Warhurst [1999] bestätigten, dass der 184-Polymorphismus lediglich für die Mefloquinresistenz Bedeutung hat.

Trotz all dieser Ausnahmen ist es jedoch eine Tatsache, dass es häufiger (in 90% der Fälle) zu einem Therapieversagen kam, wenn die Erreger irgendeine punktuelle Änderung in der *Pfmdr1*-Sequenz erfahren hatten. Dieser unspezifische Zusammenhang ist sogar signifikant (p=0,006 für 14-Tages-Werte).

## 5.2. Vergleich mit anderen Studien

### 5.2.1. Studien am *Pfmdr1*-Gen

Die Variationen im *Pfmdr1-Gen* und ihre Assoziation mit Chloroquinresistenz sind bereits in anderen Studien ohne übereinstimmende Ergebnisse analysiert worden. Dass die Punktmutationen - v.a. der Polymorphismus $86^{Tyr}$- eine Rolle bei der Resistenz spielen, wurde unterstützt von Adagu *et al.* [1995, 1996, 1997, 1999], Babiker *et al.* [2001], Basco *et al.*[1995], Cox-Singh *et al.* [1995], Djimdé *et al.* [2001], Duraisingh *et al.* [1997], Foote *et al.* [1990], Gómez-Saladín *et al.* [1999], Grobusch *et al.* [1998], Peel *et al.* [1994], Price *et al.* [1999], Nagesha *et al.* [2001], Reed *et al.* [2000] und van Es *et al.* [1994 Apr.,Dez.]. Hingegen wurden in den Studien von Awad-El-Kariem *et al.* [1992], Basco *et al.* [1996, 1997, 1998], Bhattacharya *et al.* [1997, 1999], Dorsey *et al.* [2001], Haruki *et al.* [1994], McCutcheon *et al.* [1999], Su *et al.* [1997], Volkman *et al.* 1995, von Seidlein *et al.* [1997],

Wilson *et al.* [1993] und bei Wellems *et al.* [1990, 1991] Belege gegen diesen Zusammenhang geliefert. Price *et al.*[1999] haben anhand von Isolaten aus Thailand neben den *Pfmdr1*-Mutationen auch die Kopienanzahl des Gens untersucht (wie schon zuvor Barnes *et al.* [1992], Basco *et al.* [1995, 1996], Wilson *et al.* [1989, 1993] und Zalis *et al.* [1998]) und dabei auch Resistenzen gegenüber anderen Antimalariamedikamenten ermittelt. Zusätzlich prüften sie auch die Präsenz der Mutation $184^{Phe}$, die nicht mit der Reaktion der Parasiten auf die Wirkstoffexposition in Verbindung zu bringen war. In eine Studie von Reed *et al.* [2000], in der Transformationsexperimente angewandt wurden, haben chloroquinsensitive *P.falciparum*-Parasiten durch den Austausch der Gensequenzen zwar die *Pfmdr1*-Mutationen $1034^{Cys}$, $1042^{Asp}$ und $1246^{Tyr}$ erworben, jedoch nicht die gegen Chloroquin gerichtete Resistenz. Umgekehrt zeigte sich aber, dass die Eliminierung dieser *Pfmdr1*-Mutationen aus dem Genom eines resistenten Parasiten und deren Ersatz durch die entsprechenden Wildallele *in vitro* das Maß der Resistenz reduziert hat [Reed *et al.* 2000].

Auf Grund der uneinheitlichen Ergebnisse werden selbst von Autoren, die dem *Pfmdr1* eine entscheidende Bedeutung zuschreiben, kritische Anmerkungen gemacht. Der gemeinsame Tenor: CQR wird nicht allein durch die *Pfmdr1*-Variationen verursacht, sondern ist ein multigenetisches Phänomen.

Gomez-Saladin *et al.* [1999] haben z.B. die Parasitenpopulation, die eine Chloroquintherapie überlebte, mit einer Kontrollpopulation, die nicht Chloroquin exponiert war, verglichen. Das Ergebnis: Die K1-Mutation $86^{Tyr}$ ist bei der CQR beteiligt, allerdings nicht als einziger Faktor. In der Studie von Grobusch *et al.* [1998] wurde mittels einer allelspezifischen PCR die *in vitro*-Sensitivität von 15 Isolaten aus Gabon mit der Prävalenz von $86^{Tyr}$ verglichen: Alle 15 Isolate trugen das mutierte Allel, 11 davon erwiesen sich als chloroquinresistent, sodass sich eine 73%ige Übereinstimmung ergab. $1246^{Tyr}$ war nicht vorhanden. Später ergab sich bei einer größeren Anzahl von Proben ein ähnliches Bild. Die Autoren folgerten daraus,

dass neben *Pfmdr1* noch weitere genetische Faktoren die Chloroquinresistenz beeinflussen.

Schon von Foote [Foote *et al.* 1990], dem „Vater“ der *Pfmdr1*-Theorie, wurden Zweifel geäußert und konstatiert, dass CQR eigentlich wesentlich eher hätte auftreten müssen, wenn nur ein einzelnes Gen die Resistenz determinieren würde. Dass CQR wirklich nur anhand weniger einfacher Basenveränderungen korrekt vorhergesagt werden könne, sei recht unwahrscheinlich und man müsse die Schlussfolgerung ziehen, dass das *Pfmdr1*-Gen eines von zumindest zwei Genen ist, deren Mutation für CQR notwendig ist.

Wellems *et al.* haben in ihren Studien einer alleinigen bzw. entscheidenden Rolle des *Pfmdr1* ganz widersprochen. Bei der Durchführung genetischer Kreuzungen zwischen sensitiven und resistenten Stämmen kam seine Arbeitsgruppe zu der Schlussfolgerung, dass Nachkommen dieser Stämme zwar die Polymorphismen an *Pfmdr1* geerbt hatten, aber nicht die phänotypische Resistenz gegen Chloroquin aufwiesen [Wellems *et al.* 1990]. Bei der Untersuchung der entstandenen Nachkommen waren einige resistent, andere wiederum sensitiv; Zwischenformen wurden nicht gefunden, was für eine Vererbung nach Mendel'schen Regeln spricht. (Plasmodium Parasiten sind haploid [Waters 1998]). Auch wenn Wellems eine multigenetische Grundlage der Resistenz nicht ganz ausschließen konnte, wies er doch auf Grund des Fehlens intermediärer Formen einem einzelnen, von dem bekannten *mdr*-Gen unabhängigen Lokus die Schlüsselrolle bei der Resistenz zu. Allerdings müssten –so schrieb er- schon komplexe molekulare Veränderungen im Resistenzgen von Statten gegangen sein, da sich Chloroquinresistenz in den letzten 40 Jahren sehr langsam von Südostasien und Südamerika verbreitet habe [Wellems & Plowe 2001].

### 5.2.2. Studien am *Cg2*-Gen

Seine Suche nach dem Resistenzgen konnte die Forschergruppe im Jahr 1991 [Wellems *et al.* 1991] auf einen 400kb großen Abschnitt auf Chromosom 7 einengen, ein Segment, das allerdings immer noch etwa 100 verschiedene Gene enthält (von ca. 5000-7000 im gesamten *P.falciparum*-Genom [Su *et al.* 1997]). Su *et al.* lokalisierten im Jahr 1997 die entscheidende Determinante in einem 36kb großen Segment. Dieses beherbergt zwar auch noch mehrere Gene, aber die DNS-Sequenz eines einzelnen Gens namens *Cg2* wies in ihren Untersuchungen konstant mehr als ein Dutzend Unterschiede zwischen resistenten und sensitiven Stämmen auf: In seinem genetischen Code traten Größenvariationen in 3 sich wiederholenden Abschnitten (κ, γ und ω) sowie verschiedene Punktmutationen und Größenvariationen in einem zentralen poly-*Asn* Abschnitt auf.

Die Wissenschaftler sahen in den zahlreichen komplexen Veränderungen im *Cg2* –ganz im Gegensatz zu einfachen Punktmutationen- eine Erklärung dafür, dass Chloroquin für so lange Zeit wirksam, bis es schließlich zu Resistenzen kam. Dass in Südamerika Stämme von chloroquinresistenten *Plasmodium falciparum* an *Cg2* eine unterschiedliche DNS-Sequenz als asiatische Parasiten aufwiesen, unterstützte die Hypothese, dass es für die Chloroquinresistenz geographisch unabhängige Ursprünge gibt.

Mittels Antikörpern, die sich an das von *Cg2* kodierte hochpolymorphe Protein von etwa 330kDa binden, identifizierten Wellems *et al.* das Protein innerhalb der Nahrungsvakuole, dem hämoglobinverdauenden Kompartment, und fanden so einen weiteren Beleg dafür, dass das Protein für die CQR relevant ist [Wellems *et al.,* 1998], sei es, indem es die Chloroquinaufnahme, die Weiterverarbeitung, die Häm-Sequestration oder die Toxizität des Hämatin-Chloroquin-Komplexes beeinflusst.

Weitere Studien [Basco & Ringwald 1999 a,b] maßen dem *Cg2*-Genotyp ähnliche Bedeutung zu. Allerdings wurden auch Unstimmigkeiten registriert. Aus ihren Ergebnissen lasse sich zwar folgern, so Basco & Ringwald in ihrer Studie, dass *Cg2* bei der CQR involviert sei, allerdings mit der Einschränkung, dass sich in ihren Experimenten kein 100%iger Zusammenhang feststellen ließ.

Davon hatten auch schon Su *et al.* berichtet: Eine Kombination der erwähnten *Cg2*-Polymorphismen zeigte bei Isolaten aus Afrika und Südostasien zwar eine deutliche Beziehung zur Resistenz [Su *et al.* 1997]. Allerdings gab es eine Ausnahme: Bei der Sequenzierung der Isolate wurde ein chloroquin**sensitiver** Klon aus dem Sudan gefunden, der den Polymorphismus beherbergte, den die Forschergruppe eigentlich als Auslöser für die Chloroquinresistenz angeführt hatten.

Deshalb wurde schon bald als neue Hypothese aufgestellt, dass das Expressionsprodukt des *Cg2* möglicherweise mit dem *Pfmdr1*-Protein interagiert. Bereits von Su *et al.*[1997] wurde diese Möglichkeit in Betracht gezogen. In der Studie von Adagu und Warhurst [1999] wurde bei westafrikanischen chloroquinresistenten *Plasmodium falciparum*-Stämmen eine hohe Prävalenz sowohl von *Cg2*- und *Pfmdr1*-Polymorphismen als auch ein hoher Grad der Assoziation zwischen den spezifischen Allelen an deren Chromosomen 7 und 5 gefunden. Wie sie ausführten, würde man dies unter natürlichen Populationen nicht erwarten, solange es dort keine Klonalität gibt oder Selektionsdruck herrscht und sie führten die hohe Wirkstoffexposition als eine wahrscheinliche Erklärung an. Bei ihrer Untersuchung stellte sich heraus, dass das $Tyr^{86}$ mit Chloroquinresistenz assoziiert ist, ebenso auch mit der *Cg2* $Ala^{281}$-Mutation und *Cg2* -Dd2Kappa-Wiederholungen. Dass aber dennoch keine vollständige Beziehung beobachtet werden konnte, deuteten die Forscher so, dass zusätzlich noch ein weiterer genetischer Faktor involviert ist. Wenn es auch auf den ersten Blick widersprüchlich

sei, dass eine Mutation, die eine Beziehung zur Resistenz haben soll, dennoch bei einem sensitiven Stamm auftreten kann, so ließe sich dies auch dadurch erklären, dass es sich hierbei zwar um ein kompetentes Allel handelt, dem Stamm aber ein zweites bzw. weitere Allele/Gene fehlen, die gemeinsam die Resistenz bedingen.
Diese Folgerung würde bedeuten, dass zusätzlich zu den beiden Genen *Pfmdr1* und *Cg2* noch ein weiteres Gen beteiligt ist und Chloroquinresistenz multifaktoriell determiniert wird [Adagu *et al.* 1996, 1999; Cowman & Karcz 1991].

Allerdings konnte die Schlüsselrolle des *Cg2* im Folgenden nicht weiter bestätigt werden [Fidock *et al.* 2000, Durand *et al.* 1999], obwohl die Entdeckung dieses Gens sicherlich einen Meilenstein in der Forschung der Chloroquinresistenz darstellt. Durch Wellems Arbeitsgruppe selbst wurde eine Methode der genetischen Transformation angewandt, mittels derer genetische Elemente des fraglichen CQR-Locus durch *Cg2*-Sequenzen sensibler Parasiten ersetzt wurden und eine Selektion dieses Genotyps bewirkt wurde. In der Resistenzbestimmung dieser modifizierten Linien konnte jedoch **keine** Veränderung der Empfindlichkeit im Vergleich zu vorher festgestellt werden - ein klarer Beweis gegen die *Cg2*-Hypothese. Als Folge dieser Entdeckungen schloss die Forschergruppe [Fidock *et al.* 2000 Sep.] das *Cg2* als Resistenzgen aus, zog aber die Schlussfolgerung, dass wegen der deutlichen Kopplung von CQR mit den *Cg2*-Polymorphismen von Feldisolaten [McCutcheon *et al.* 1999, Durand *et al.* 1999, Basco & Ringwald 1999, Adagu & Warhurst 1999] ein in der Nähe des *Cg2*-Komplexes gelegenes Gen für den Resistenzmechanismus entscheidend sein müsse. Babiker *et al.*[2001] sprechen in dem Zusammenhang von einem „Hitchhike“-Effekt, so vorzustellen, dass das *Cg2* quasi mit dem eigentlichen Resistenzgen „per Anhalter mitfahre“.

### 5.2.3. Studien am *Pfcrt*-Gen

Nach Kreuzungsexperimenten von chloroquinsensitiven- und resistenten Stämmen aus Afrika, Südamerika und Südostasien fanden Fidock *et al.* im Oktober 2000 einen weiteren Kandidaten für die Rolle des vielgesuchten Resistenzgens [Fidock *et al.* 2000 Okt]: In der Nähe von *Cg2* auf Chromosom 7 gelegen kodiert ein Gen namens *Pfcrt* mit 13 Exons ein Protein auf der Oberfläche der parasitären Nahrungsvakuole (*Pfcrt* steht für *Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter*).

Ein Set von 8 Punktmutationen wurde im *Pfcrt* gefunden; unter Linien von Südamerika und Asien/Afrika fanden sich unterschiedliche Sets, wieder ein Hinweis, dass sich CQR in diesen Gegenden unabhängig voneinander entwickelt habe [Payne 1987]. Von besonderem Interesse waren die Mutationen $^{Lys}76^{Thr}$ (*Threonin* an Stelle von *Lysin* an Position 76) und $^{Ala}220^{Ser}$ (*Serin* an Stelle von *Alanin*), die sich bei allen resistenten Isolaten fand, dafür aber bei keiner der sensitiven Proben, die *in vitro* getestet wurden. Ein weiterer Beleg für den zentralen Stellenwert von $76^{Thr}$ kam von einer sensitiven Linie. Diese wies mit Ausnahme der $76^{Thr}$ alle anderen *Pfcrt*-Polymorphismen auf. Umgekehrt wurde diese Punktmutation immer nur dann beobachtet, wenn auch die anderen Veränderungen nachzuweisen waren. Man folgerte daraus, dass Mutationen an den anderen Positionen notwendig seien, um in der Anwesenheit von $76^{Thr}$ kritische funktionelle Eigenschaften aufrecht zu erhalten. Dies erkläre wiederum die langsame Entwicklung der Chloroquinresistenz.

In weiteren genetischen Transformationsexperimenten wurden Plasmide mit den genannten *Pfcrt*-Mutationen in die genetische Struktur von mehreren chloroquinsensitiven Klonen integriert und daraufhin *in vitro*-Chloroquinresistenz festgestellt [Fidock *et al.* 2000 Okt]: Die Linien vermehrten sich bei Wirkstoffkonzentrationen, die sonst nur von chloroquinresistenten Parasiten toleriert wurden.

Der Gedanke liegt durchaus nahe, dass das kodierte Protein von seiner Lokalisation aus die Wirkung von Chloroquin oder dessen Konzentration im Vakuoleninnern beeinflussen kann. Es fand sich, dass bei resistenten Parasiten (im Gegensatz zu den sensitiven) der Vakuolen-pH vermindert ist. Diese Ansäuerung innerhalb des Kompartments resultierte in einer Verminderung des löslichen Hämatins –das vermehrt in Hämozoin konvertiert wird- und damit einer Reduktion des Chloroquin-Hämatin-Komplexes und dessen toxischer Wirkung [Carlton *et al.* 2001, Dorn *et al.* 1998, Dzekunov *et al.* 2000; Wellems & Plowe 2001]. Zusätzlich könnten die *Pfcrt*-Mutationen auch den Fluss von Chloroquin in das Verdauungskompartment alterieren, da speziell die Aminsäuren-Substitutionen innerhalb einer transmembranen Region liegen, die beim Substanztransport beteiligt ist [Carlton *et al.* 2001, Fidock *et al.*2000 Okt].

Weitere Untersuchungen über die *Pfcrt*-Marker und Chloroquintherapie wurden 2001 für Mali [Djimdé *et al.* 2001], Kamerun [Basco & Ringwald 2001], den Sudan [Babiker *et al.* 2001] und Mosambik [Mayor *et al.* 2001] veröffentlicht, aus Gegenden, wo sowohl chloroquinsensitive als auch –resistente *P.falciparum*-Stämme vorkommen [Wellems & Plowe]. Andere Berichte aus Brasilien [Vieira *et al.* 2001], Uganda [Dorsey *et al.* 2001], Laos [Pillai *et al.* 2001], Thailand und Papua Neu Guinea [Chen *et al.* 2001] beschreiben Ergebnisse aus Regionen, in denen chloroquinresistente mittlerweile dominant sind. Die Isolate der Studie von Vieira *et al.*[2001] aus dem Amazonasgebiet Brasiliens –einer mittlerweile endemischen Gegend- waren **alle** chloroquinresistent und zeigten alle die Punktmutation $76^{Thr}$. Um die Bedeutung von *Pfcrt* wirklich beurteilen zu können, hätten hier im Grunde noch chloroquinsensitive Proben herangezogen werden müssen.

Insgesamt liefern diese Berichte weitere substanzielle Hinweise für die Verknüpfung dieser Mutation mit der Chloroquinresistenz. Allerdings gab es auch erste Meldungen über Ausnahmefälle! Basco & Ringwald [2001] z.B. beurteilten die Auswirkung der Schlüsselmutation $76^{Thr}$ auf *in vivo*- und *in vitro*-Sensitivität und fanden eine signifikante ($p<0,001$), aber nicht ausnahmslose Beziehung. Auch bei Mayor *et al.* [2001] wird berichtet, dass $76^{Thr}$-Stämme bei 18 von 23 Patienten vorhanden waren, diese aber trotzdem ohne weiteres auf Chloroquin ansprachen.

Trotz der anfänglich enthusiastischen Berichterstattung über die Bedeutung von *Pfcrt* [McCarthy 2000] werden mittlerweile weitere Mechanismen an anderen Genen/Loci zur Modulation der Resistenz nicht mehr ausgeschlossen [Chen *et al.* 2001].

### 5.2.4. Der multigenetische Ansatz

In diesem Zusammenhang lag es nahe, wieder auf das *Pfmdr1* zurückzukommen und seine Bedeutung als möglicher **Kofaktor** des *Pfcrt* zu erwägen. Djimdé *et al.* [2001] bewerteten deshalb anhand von Proben aus Mali beide Gene *Pfmdr1* und *Pfcrt* in ihrer Bedeutung für **klinische** Chloroquinresistenz. Die Häufigkeit der Mutationen *Pfmdr1* $86^{Tyr}$ und *Pfcrt* $76^{Thr}$ wurde vor und nach Behandlung mit Chloroquin bestimmt, um eine Selektion dieser fraglichen Resistenzfaktoren als Folge der Exposition festzustellen. Für beide Polymorphismen konnte eine Selektion nachgewiesen werden: $76^{Thr}$ fand sich vor Therapiebeginn bei 41% aller Patienten, nach Abschluss der Therapie jedoch zu 100% bei den Patienten, die mit Chloroquin nicht geheilt werden konnten. Auch für $86^{Tyr}$ wurde eine Selektion bestätigt, da es in 48 von 56 klinischen Resistenzfällen vorhanden war (entspricht 86% im Vergleich zu 50% vor der Anbehandlung). Ein schwächerer, jedoch ebenfalls signifikanter Zusammenhang! (OR 3,2; bei $76^{Thr}$ 18,8, jeweils 95% Konfidenzintervall). Dass $76^{Thr}$ in einigen resistenten Proben vor der Behandlung nicht nachweisbar war, danach aber auftrat, führen die Autoren darauf zurück, dass eine gemischte Infektion vorlag (hauptsächlich

sensitive Parasiten mit einigen wenigen resistenten Populationen, deren Level aber unter der Nachweisgrenze lag). Während der Exposition gegenüber Chloroquin seien die sensitiven Populationen vernichtet worden, die resistenten aber hätten sich vermehrt und somit zu einem Therapieversagen geführt. Allerdings hat die Präsenz von Parasiten mit *Pfmdr* $86^{Tyr}$ zusätzlich zur *Pfcrt* $76^{Thr}$ das relative Risiko eines Therapieversagens im Vergleich zu Infektionen, die ausschließlich von *Pfcrt* $76^{Thr}$-Parasiten verursacht wurden, nicht erhöht.

Die anderen *Pfmdr*-Mutationen an den Codons 184, 1042, und 1246 wurden in dieser Studie ebenfalls untersucht, traten in den resistenten Proben aber nicht gehäuft auf. Die sieben weiteren von Fidock *et al.* beschriebenen *Pfcrt*-Punktmutationen an den Positionen 74, 75, 220, 271, 236, 356 und 371 waren in der Studie von Djimdé *et al.* bis auf die Mutation an Position 356 ebenfalls signifikant mit *in vivo*-Chloroquinresistenz assoziiert, ja traten sogar immer dann auf, wenn auch $76^{Thr}$ vorhanden war (konsistent mit Fidock *et al.* [2000 Okt]. Da *Pfmdr1* und *Pfcrt* auf verschiedenen Chromosomen liegen, kann ihre Koselektion nicht auf physische Verknüpfung zurückgeführt werden. Es könnte vielmehr sein, dass *Pfmdr1* dem Parasiten in Gegenwart von Chloroquin einen gewissen Vorteil verschafft, z.B. indem es seinen Grad der Resistenz vermehrt.

In der Studie von Dorsey *et al.* [2001] z.B. war die $76^{Thr}$-Mutation bei allen (!) untersuchten Isolaten aus Uganda vorhanden, und dies vor der Chloroquinbehandlung und obwohl circa die Hälfte der Patienten vollständig genas. Neben weiteren 7 *Pfcrt*-Mutationen wurden auch die Codons *Pfmdr1* 86 und 1246 einbezogen, ohne dass sich eine Korrelation ergeben hätte. Im Vergleich zur Mali-Studie [Djimdé *et al.* 2001] wurden hier die Ergebnisse in einer Region gewonnen, in der die Prävalenz von chloroquinresistenter Malaria wesentlich höher ist [Dorsey *et al.* 2000, Kamya *et al.* 2001]. In Mali war die $76^{Thr}$-Mutation sogar bis zu 23-mal häufiger als die eigentliche klinische Chloroquinresistenz, in Uganda dagegen nahezu gleich. In dieser Gegend dichter Transmission können Patienten offensichtlich die Parasitämie auch in Anwesenheit der *Pfcrt* $76^{Thr}$-Mutation klären.

Auch Durand *et al.* [2001] widmeten ihre Aufmerksamkeit den *Pfcrt- und Pfmdr1*-Genen [Durand *et al.* 2001] und zogen in ihre Untersuchungen auch das *Cg2* (die k-Wiederholung) ein. Anhand von 146 klinischen Isolaten von nicht-immunen Reisenden, die aus verschiedenen Ländern nach Europa zurückkehrten, wurde der Zusammenhang der Genotypen mit CQR *in vitro* bestimmt. Diese Auswahl liefert wirklichkeitsnähere Ergebnisse als bei kulturadaptierten Linien, die für natürlich vorkommende Parasiten nicht unbedingt repräsentierend sind. Für *Pfmdr1* $86^{Tyr}$ lag keine deutliche Assoziation vor, nur bei 68% der Isolate passten Genotyp und Chloroquinsensibilität zusammen. Allerdings kam $86^{Tyr}$ eindeutig seltener bei 50%-Hemmkonzentrationen ($IC_{50}$) unter 40nM vor (17% gegenüber 68% bei Konzentrationen > 80nM). Durand *et al.* sprechen auf Grund dieser Ergebnisse bei $86^{Tyr}$ von einer „adaptiven Mutation". Die Codons 184, 1034, 1042 and 1246 wurden hier nicht untersucht. Der Status von *Pfcrt* Codon 76 war ebenfalls abhängig von der 50%-Hemmkonzentration. Bei Werten zwischen 40 und 60nM fanden sich entweder $76^{Lys}$ oder $76^{Thr}$, für Werte über 60nM fand sich nur $76^{Thr}$. Der *Cg2*-Genotyp waren in geringerem Ausmaß als die *Pfcrt*-Determinanten mit CQR verknüpft und traten in 85% der Fälle gemeinsam mit $76^{Thr}$ auf, was die Autoren auf die örtliche Nähe im Genom zurückführen. Durand *et al.* Schlussfolgern ebenfalls, dass *Pfcrt*-Mutationen notwendig, jedoch nicht ausreichend seien, um Chloroquinresistenz zu erwerben. Der schrittweise Übergang des Genotyps je nach $IC_{50}$-Werten ist auch relevant für die Sicht, dass noch andere Genprodukte den Einfluss des *Pfcrt*-Proteins modulieren: Isolate mit $IC_{50}$-Werten unter 80nM vermissen nach dieser Anschauung das andere/die anderen Resistenzkomponente(n), sodass *Pfcrt* allein keinen signifikanten *in vitro*-Effekt hat.

Eine weitere Studie, in der anhand von Isolaten und Klonen aus dem Sudan ebenfalls *Pfmdr1* und *Pfcrt* untersucht wurden, ist kürzlich von Babiker *et al.* [2001] veröffentlicht worden: Zunächst fand sich eine signifikante Assoziation zwischen dem *Pfcrt* $76^{Thr}$-Allel und *in vitro*- ($p<0,001$) wie auch *in vivo*-Resistenz ($p<0,05$). Weniger signifikant war der Zusammenhang

der CQR mit dem *Pfmdr* $86^{Tyr}$-Allel ($p<0,13$), allerdings ließen die Daten die Interpretation zu, dass Resistenz auf einer gemeinsamen Aktion beider Gene beruht: Alle Patienten mit resistenten Infektionen waren von *Pfcrt* $76^{Thr}$- und *Pfmdr1* $86^{Tyr}$-Isolaten befallen worden, Wildstämme fanden sich keine. Bei den übrigen Patienten, die auf Chloroquin ansprachen, wurden beide Allele beider Gene vorgefunden (auch die „Resistenzallele"). Die Assoziation wurde deutlicher, wenn die Daten in höhere und niedrigere Resistenzwerte aufgeteilt wurden (höhere: $p=0,07$, bei niedrigeren: $p=0,23$). Insgesamt unterstützte die Studie die Beteiligung des *Pfmdr1* $86^{Tyr}$-Allels, aber nur als Modulator in Anwesenheit der für CQR wichtigeren Determinante *Pfcrt* $76^{Thr}$. *Pfmdr1*-Mutationen –und andere möglicherweise noch nicht identifizierte Modulatorgene- dürften daher sekundär Adaptionen bewirken, die die Widerstandsfähigkeit des Protozoons in Anwesenheit von *Pfcrt*-Mutationen erhöhen oder zumindest diese beeinflussen [Carlton *et al.* 2001].

### 5.2.5. *in vitro*-Ergebnisse im Vergleich zu *in vivo*-Daten

Bei der Diskussion dieser und anderer Studien ist es wichtig, die Definition von Chloroquinresistenz zu berücksichtigen und zwischen den Ergebnissen einer Chloroquinbehandlung *in vivo* und den Klassifikationen chloroquinresistenter bzw. -sensibler Parasiten bei *in vitro*-Versuchen zu unterscheiden. Der Begriff „Chloroquinresistenz" kann insofern zu Missverständnissen führen. *In vitro*-Resistenz wird durch die Fähigkeit von kulturadaptierten Stämmen charakterisiert, unter definierten Chloroquinkonzentrationen zu überleben. Die *in vivo*-Resistenz, wie in unserer Studie angewandt, steht für persistierende oder rekurrierende Parasitämie nach Behandlung oder inadäquaten Therapieerfolg. Sie hängt nicht nur von der „angeborenen" Fähigkeit der Parasiten ab, mit Chloroquin zurecht zu kommen [Wellems & Plowe 2001], sondern auch von Wirtsfaktoren wie Resorption, Distribution und Metabolismus des Wirkstoffes. Welch weitere Wirtsfaktoren (wie z.B. die Sichelzellerkrankung) die Beseitigung der chloroquinresistenten Parasiten beeinflussen

könnten, ist noch nicht klar belegt bzw. verstanden worden [Carlton *et al.*2001]. Wellems & Plowe [2001] unterstreichen die Bedeutung von interindividuellen Variationen, die die Klassifikation von *in vivo*-Resistenz erheblich beeinflussen können, auch wenn die Parasiten vielleicht *in vitro* den gleichen Phänotyp an Chloroquinresistenz geboten hätten.

Dorsey *et al.* [2001] betonen ebenfalls diesen Unterschied: Auch wenn sie eine Primärrolle von *Pfcrt in vitro* festgestellt hätten, so bleibe aber die Bedeutung bei der Vermittlung der klinischen Antwort auf die Chloroquintherapie doch unklar. Wie bereits anhand der Studie von Djimdé *et al.*[2001] aufgeführt, reagierten viele Patienten auf Chloroquin, obwohl sie von $76^{Thr}$-Stämmen infiziert wurden.

Djimdé *et al.* [2001] zogen daher das Alter der Patienten als zusätzlichen Parameter in die Betrachtung mit ein und stellten einen positiven Zusammenhang zwischen höherem Lebensalter ( ≥10 Jahre) und erfolgreicher Behandlung fest – diese Assoziation reflektiert den graduellen Erwerb von partieller Immunität in einer endemischen Gegend.

Dass die Diskrepanz zwischen dem theoretisch postulierten Zusammenhang und den tatsächlichen Verhältnissen zum Teil durch den Einfluss der Immunität auf den Krankheitsverlauf erklärt werden kann, wird auch von Kamya *et al.*[2001] bestätigt: Bei Kindern unter 5 Jahren belegten ein wesentlich höheres Risiko für klinisches Versagen nach Chloroquintherapie als bei älteren Individuen.

Wellems und Plowe [2001] unterstreichen in ihren Ausführungen auch die wichtige Rolle der präexistierenden Immunität bei der Behandlung von resistenten Infektionen. Der Einfluss solcher Faktoren auf das klinische Outcome macht natürlich die Vorhersage verlässlicher klinischer Verläufe unter Chloroquinbehandlung noch schwieriger, sogar unmöglich, wenn sie -wie in unserer Studie- nur auf den Polymorphismen des *Pfmdr1*-Gens beruht. Man könnte folgern, dass die prozentuale Korrelation in unseren Experimenten vielleicht etwas höher

gewesen wäre, wenn wir den Effekt des *Pfmdr1*-Gens in einem *in vitro*-Test überprüft hätten. Aber die kausale Verknüpfung der *Pfmdr1*- Variationen ist ja selbst unter *in vitro*-Bedingungen von vielen Autoren in Frage gestellt worden.

Basco und Ringwald [1997] zweifeln grundsätzlich den Zusammenhang zwischen *in vitro*-Resistenz und der *in vivo*-Antwort an. Auf Grund der widersprüchlichen Ergebnisse anderer Studien schließen sie sogar die Verwendung molekularer Techniken -basierend auf dem *Pfmdr1*-Gen- zum Monitoring der Chloroquinsensitivität in einer epidemiologischen Untersuchung aus. Die Bestimmung der Resistenz durch eine simple und schnelle molekulargenetische Technik sei von weiteren Studien abhängig, in denen die Rolle des *Pfmdr1* Gens weiter geklärt werde oder relevante „Resistenzgene" aufgedeckt würden. Auf jeden Fall scheint mit der Entdeckung des *Pfcrt* ein weiteres Puzzlestück in den offensichtlich komplexen genetischen Grundlagen der Chloroquinresistenz gefunden worden zu sein.

### 5.2.6. Geographische Unterschiede

Wie von Basco und Ringwald [1997] angeführt wird, ist der Zusammenhang zwischen Punktmutationen und Chloroquinresistenz abhängig vom geographischen Ursprung des Parasiten. Das bedeutet, dass sich Aussagen zunächst nur für diejenige Region treffen lassen, aus denen die untersuchten Isolate stammen. Ein Beispiel dafür sind die unterschiedlichen genetischen Profile südamerikanischer und südostasiatischer Isolate [Foote *et al.* 1990]. Möglicherweise sind Isolate aus einem bestimmten Gebiet durch einen ganz bestimmten Mutationstyp charakterisiert, und dies unter Umständen ohne Korrelation zum Auftreten der Resistenz. Insofern muss jede Beurteilung von genetischen Veränderungen und Resistenzprofilen berücksichtigen, wie häufig diese Veränderungen in einem bestimmten Gebiet angetroffen werden und wie sich die Proportion sensitiver zu resistenten Parasiten in dieser Gegend verhält. [Haruki *et al.* 1994; von Seidlein *et al.* 1997]. Dies bedeutet, dass in

anderen geographischen Regionen unterschiedliche Mechanismen bzw. resistenzgebende Mutationen prädominieren können und unsere Ergebnisse nur auf Uganda bezogen werden können.

Es gibt Hinweise, dass die Resistenzmechanismen auch in Labor- oder Feldstämmen differieren [Lim *et al.* 1996, Carlton *et al.* 2001]. Vor kurzem haben Nomura *et al.*[2001] nachgewiesen, dass die genetischen Grundlagen für CQR auch bei anderen Plasmodium Spezies wie z.B. *P.vivax* unterschiedlich sind und *Pfcrt* hierbei keine Rolle spielt.

## 5.3. Schlussfolgerungen

Zusammenfassend kann die vorliegende Studie keine eindeutige Wechselbeziehung zwischen einzelnen *Pfmdr1*-Mutationen und Chloroquinresistenz in Uganda belegen. Eine gewisse Interaktion trat in begrenztem Maße auf und ist konsistent mit früheren Studien. Andere Veröffentlichungen lehnten dies ganz ab und brachten Beispiele dafür, dass resistente Infektionen durchaus auch von Parasiten ohne die besagten Mutationen verursacht werden können – und umgekehrt. Insgesamt führen die Ergebnisse dieser und zahlreicher anderer Studien –so widersprüchlich sie auf den ersten Blick auch sein mögen- zu der Schlussfolgerung „Zusammenhang ja, Korrelation nein“.

Es gibt also Hinweise, dass *Pfmdr1* das Ausmaß der Resistenz *in vitro* modulieren oder vielleicht sogar die Wirkung von *Pfcrt* $76^{Thr}$ komplettieren könnte [Reed *et al.* 2000, Basco & Ringwald 2001]. Dies impliziert, dass es sich bei Chloroquinresistenz um ein multigenetisches Phänomen handelt, wie bereits von anderen Studien vorgeschlagen wurde [Basco & Ringwald 2001; Cowman *et al.* 1991; Djimdé *et al.* 2001; Durand *et al.* 2001; Fidock *et al.* 2000; Krogstad *et al.* 1987; Reed *et al.* 2000; Wellems & Plowe 2001; Wilson *et*

*al.* 1993]. Dass Chloroquinresistenz nahezu gleichzeitig in Südostasien und Südamerika auftrat, kann man als weiteren Hinweis werten, dass dieses Phänomen multiple Transportmechanismen und multiple Gene involviert [Wellems & Plowe 2001].

Bei zukünftigen Studien in Uganda sollte man daher auch das *Pfcrt*-Gen in die Analyse mit einschließen. Gerade in Uganda lassen sich vor allem bei älteren Patienten mit partieller Immunität und Zeichen unkomplizierter Malaria noch Erfolge mit Chloroquin erzielen [Babiker *et al.* 2001]; nach wie vor ist es offiziell das Medikament der Wahl [Dorsey *et al.* 2001]. Bei einem Medikament, das in seiner Wirksamkeit durch parasitäre Resistenz beeinträchtigt wird, ist der adäquate Gebrauch essenziell, um eine weitere Ausbreitung der Resistenz zu verzögern. Daher betonen Studien [Kilian *et al.* 1998, Dorsey *et al.* 2001] die Dringlichkeit einer Methode, mit der schon im Vorhinein verlässlich der Grad der Chloroquinresistenz bestimmt werden kann. Vielleicht kann hier das Monitoring von *Pfmdr1* in Kombination mit *Pfcrt* weiterhelfen.

Die Situation ist dramatisch. Kamya *et al.* [2001] schlagen mittlerweile vor, Chloroquin als First-Line Medikament für unkomplizierte Malaria in Uganda durch andere Wirkstoffe zu ersetzen, zumindest bei jungen Kindern. Klare Alternativen seien notwendig, um Malaria in dieser Gegend in den Griff zu bekommen. Dem schließen sich auch Nevill *et al.* [1995] an. Allerdings muss man fürchten, dass ein zu früher Wechsel zu anderen Mitteln diese Option schnell erschöpfen würde. Resistenz gegen Pyrimethamin/Sulfadoxin, das Medikament zweiter Wahl, ist in Ostafrika bereits verbreitet und wird sich wahrscheinlich schnell und vollständig über das tropische Afrika ausbreiten [Kilian *et al.* 1998, Kilama 2000]. Die übrigen Mittel sind teuer und für den großflächigen Einsatz zu unsicher. Die Entwicklung neuer Substanzen wird von den Industrienationen darüber hinaus nicht als kommerziell rentabel erachtet [Nuwaha 2001].

Um die weitere Ausbreitung von Resistenzen gegen neue und gebräuchliche Substanzen einzuschränken, müssen daher verschiedene Gesichtspunkte berücksichtigt werden: rationalerer Einsatz von Medikamenten, limitierter Massengebrauch (z.B. kein chloroquinversetztes Salz), vermehrter Gebrauch von imprägnierten Moskitonetzen, etc.. Tatsächlich ist es ist durchaus wünschenswert, dass Chloroquin weiter als Mittel erster Wahl für die Behandlung unkomplizierter Malaria eingesetzt werden kann, wo es klinisch noch effektiv ist. Wenn es schon keinen aussagekräftigen Test gibt, um schnell den zu erwartenden Erfolg einer Chloroquinbehandlung zu bestimmen, so muss man sich anhand klinischer Kriterien weiterhelfen. Kamya *et al.* [2000] haben speziell für Uganda Parameter genannt, die ein Therapieversagen andeuten können: Dazu gehören ein Alter < 5 Jahren, Fieber über 38°C, die Einnahme von Chloroquin 3 bis 14 Tage vor Konsultation des Arztes (im Vergleich zu Patienten, die erst kürzlich oder noch gar kein Chloroquin eingenommen haben).

Das große Ziel ist und bleibt ein Wirkstoff, der die Funktion von Chloroquin nachahmt, aber gleichzeitig den Resistenzmechanismus blockieren kann. Hierbei ist das Verständnis des molekularen Mechanismus der Chloroquinresistenz von entscheidender Bedeutung, da dieser deutliche Strukturspezifität besitzt [Carlton *et al.* 2001, Wellems & Plowe 2001]. Ein solches Medikament, z.B. 4-Aminochinoline mit veränderten Seitenketten oder sonstige Derivate, könnte sicher langfristig eingesetzt werden [Fidock *et al.* 2001], z.B. auch in Verbindung mit sog. Chemosensitizern, die das Ausmaß der Resistenz vermindern. Dies ist aber solange utopisch, wie nicht die Resistenzgene mit allen beteiligten Kofaktoren aufgeklärt sind. Letztlich ist es nötig, den gesamten genetischen Bauplan von *P.falciparum* zu verstehen, da dieser einen tiefen Einblick in die Lebensprozesse des Parasiten und die von ihm verursachte Krankheit ermöglicht [Wellems *et al.* 1999].

# 6. Zusammenfassung

Die *Malaria tropica* ist zu Beginn des 21.Jahrhunderts in den tropischen Ländern wegen hoher Inzidenz und Letalität v.a. unter Kindern und Schwangeren nach wie vor ein sehr ernst zu nehmendes Problem. Frühere Hoffnungen auf die komplette Eradikation der Malaria erwiesen sich in großen Teilen Afrikas, Asiens und Südamerikas als haltlos. Gerade die Effektivität von Chloroquin, das wegen guter Wirksamkeit, großer Sicherheit, geringer Nebenwirkungen und niedriger Kosten bei der Prophylaxe und Behandlung der unkomplizierten Malaria jahrelang favorisiert worden war, wird durch zunehmende Resistenz des Erregers *Plasmodium falciparum* beeinträchtigt [Ridley 1998, Wellems & Plowe 2001].

Studien über die Wirkungsweise Chloroquins – und umso mehr über die gegen das Mittel gerichtete Resistenz- lieferten widersprüchliche Ergebnisse. Weit gehende Einigkeit herrscht im Grundsatz darüber, dass Chloroquin den Abbau des Wirt-Hämoglobins als primäre Nahrungsquelle des Parasiten in der Verdauungsvakuole beeinträchtigt. Ebenso ist gezeigt worden, dass resistente Parasiten Chloroquin in geringerem Maße anreichern. Studien brachten dies mit der pH-Regulation oder einer aktiven Chloroquin-Effluxpumpe an der Nahrungsvakuole in Verbindung, ähnlich dem Resistenzmechanismus von Tumorzellen im Rahmen der so genannten „multiple drug resistance“.

Das Auftreten von bestimmten Punktmutationen im sog. *Plasmodium falciparum multiple drug resistance Gen 1 (Pfmdr1* auf Chromosom 5*)*, das für das Efflux-Protein kodieren könnte, ist mit Chloroquinresistenz assoziiert worden [Foote *et al.* 1989, 1990]. In dieser Studie wurden an *Plasmodium falciparum*-Isolaten mittels PCR und anschließender Restriktionsenzymanalyse Mutationen an den Codons 86, 1042, 1246 und 182 des *pmfdr1*-

Gens und deren Korrelation zu *in vivo*-Daten von Patienten untersucht, die in Uganda wegen Malaria tropica mit Chloroquin behandelt worden waren. Das Ziel der Studie war, die Punktmutationen als mögliche Ursachen für die Chloroquinresistenz zu bewerten und sie als Kriterien für die Therapiewahl und die Einschätzung des klinischen Verlaufs zu evaluieren.

Dabei erwies sich die Prävalenz der Chloroquinresistenz in Uganda bei 40 resistenten unter 57 untersuchten Proben als recht hoch (79%), v.a. im Vergleich zu früheren Publikationen (4-26%).

Assoziationen zwischen *in vivo*-Resistenz gegen Chloroquin und den *Pfmdr1*-Polymorphismen ließen sich in dieser Studie zwar belegen: Bei der Auswertung aller PCR-Ergebnisse zeigte sich, dass Resistenzen durchgehend häufiger auftraten, wenn Mutationen an einem der drei untersuchten Codons vorhanden waren (86%-100%, bei Wildtyp nur 55-64%). In 90% aller resistenten Proben war mindestens ein *Pfmdr1*-Polymorphismus nachweisbar.

Dennoch ist die Einschätzung des klinischen Verlaufs anhand der *Pfmdr1*-Polymorphismen nicht verlässlich: bei Individuen müssen z.B. auch Faktoren wie Immunität berücksichtigt werden. Im Gegensatz zu einer einfachen Verknüpfung mit der CQR muss ein Zusammenspiel der untersuchten Mutationen mit weiteren genetischen Veränderungen angenommen werden. Dass es sich hierbei um das von Su *et al.* [1990] identifizierte *Cg2*-Gen auf Chromosom 7 handelt, wurde in den letzten Jahren propagiert, ist aber mittlerweile unwahrscheinlich geworden. Vielmehr könnte dem in der Nähe gelegenen *Pfcrt* [Fidock *et al.* 2000] eine Schlüsselrolle zukommen. Ob dieses oder noch andere Kofaktoren eine Rolle spielen, müssen allerdings weitere Untersuchungen ergeben.

## 7. Abkürzungen

| | |
|---|---|
| A | Adenin |
| Asn | Asparagin |
| Asp | Asparaginsäure/Aspartat |
| bp | base pair (Basenpaar) |
| BSA | bovine serum albumine |
| CQR | Chloroquinresistenz |
| C | Cytosin |
| Cys | Cystein |
| Da | Dalton |
| DHFR | Dihydrofolat-Reduktase |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | äquimolare Mischung der Desoxynukleotidtriphophate dATP, dCTP, dGTP und dTTp |
| *et al.* | *et al*ii = lat. „und andere“ (Koautoren einer Veröffentlichung) |
| G | Guanin |
| Kb | Kilobasen |
| LMU | Ludwig-Maximilians-Universität |
| M | molar (molare Konzentration) |
| mdr | multiple drug resistance |
| µl | Mikroliter |
| OR | Odds Ratio |
| PCR | polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion) |
| *Pfcrt* | *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter |
| *Pfmdr* | *Plasmodium falciparum* multiple drug resistance |
| RFLP | restriction fragment length polymorphism |
| Ser | Serin |
| *Taq* | *Thermus aquaticus* |
| T | Thymin |
| TS | Thimydilat-Synthetase |
| Tyr | Tyrosin |
| U | unit (Einheit der Enzymaktivität) bzw. Umdrehung bei Zentrifugation |
| WHO | World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation) |

## 8. Literaturverzeichnis


1. Adagu IS, Warhurst DC, Carucci DJ, Duraisingh MT: Antimalarial drug response of *Plasmodium falciparum* from Zaria, Nigeria, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* 1995, **89,** 422-425

2. Adagu IS, Dias F, Pinheiro L, Rombo L, Do Rosario V, Warhurst DC: Guinea Bissau: association of chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* with the Tyr86 allele of the multiple drug-resistance gene *Pfmdr1, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* 1996, **90**, 90

3. Adagu IS, Ogala WN, Carucci DJ, Duraisingh MT, Warhurst DC: Field chloroquine-resistance determinants, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology,* 1997, **91,** 107-111

4. Adagu IS, Warhurst DC: Association of *Cg2* and *Pfmdr1* genotype with chloroquine resistance in field samples of *Plasmodium falciparum* from Nigeria, *Parasitology,*1999, **119,** 343-348

5. Adagu IS, Warhurst DC: Allele-specific, nested, one tube PCR: application to *Pfmdr1* polymorphisms in *Plasmodium falciparum, Parasitology,* 1999, **119,** 1-6

6. Awad-El-Kariem FM, Miles MA, Warhurst DC: Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from the Sudan lack two mutations in the *Pfmdr1* gene thought to be associated with chloroquine resistance, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1992, **86**, 587-589

7. Babiker HA, Creasey AM, Bayoumi RA, Walliker D, Arnot DE: Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in a village in eastern Sudan. 2. Drug resistance, molecular karyotypes and the *mdr1* genotype of recent isolates, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1991, **85(5)**, 578-583

8. Babiker HA, Pringle SJ, Abdel-Muhsin A, Mackinnon M, Hunt P, Walliker D: High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine resistance transporter gene *Pfcrt* and the multidrug resistance Gene *Pfmdr1*, *Journal of Infectious Diseases,* 2001 Mai, **183(10)**, 1535-1538

9. Barnes DA, Foote SJ, Galatis D, Kemp DJ, Cowman AF.: Selection for high-level chloroquine resistance results in deamplification of the *Pfmdr1* gene and increased sensitivity to mefloquine in *Plasmodium falciparum, The EMBO Journal,* 1992, **11(8),** 3067-3075

10. Basco LK, Le Bras J, Rhoades Z, Wilson CM: Analysis of *Pfmdr1* and drug susceptibility in fresh isolates of *Plasmodium falciparum* from Subsaharan Africa*, Molecular and Biochemical Parasitology,* 1995 **74,** 157-166*,*

11. Basco LK, dePecoulas PE, LeBras J, Wilson CM: *Plasmodium falciparum*: molecular characterization of multidrug-resistant Cambodian isolates, *Experimental Parasitology*, 1996 Mar, **82 (2)**, 97-103

12. Basco LK, Ringwald P (1997): *Pfmdr1* Gene mutation and clinical response to chloroquine

in Yaoundé, Cameroon, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1997, **91**, 210-211

13. Basco LK, Ringwald P: Molecular epidemiology of malaria in Yaoundé, Cameroon. III. Analysis of chloroquine resistance and point mutations in the multidrug resistance 1 (*Pfmdr1)* gene of *Plasmodium falciparum, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 1998, **59(4),** 577-581

14. Basco LK, Ringwald P: Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* and polymorphism of the *Cg2* gene, *Journal of Infectious Diseases,* 1999, **180 (6),** 1979-1986

15. Basco LK, Ringwald P: Molecular epidemiology of malaria in Yaoundé, Cameroon V, analysis of the omega repetitive region of the *Plasmodium falciparum Cg2* gene and chloroquine resistance, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 1999, **61(5),** 807-813

16. Basco LK, Ringwald P: Analysis of the key *pfcrt* point mutation and *in vitro* and *in vivo* response to chloroquine in Yaoundé, Cameroon, *The Journal of Infectious Diseases,* 2001, **183**, 1828-1831

17. Bayoumi RA, Babiker HA, Ibrahim SM, Ghalib HW, Saeed BO, Khider S, Elwasila M, Karim EA: Chloroquine-resistant Plamodium falciparum in Eastern Sudan, *Acta Tropica,* 1989, **46**, 157-165

18. Bayoumi RAL, Creasey AM, Babiker HA, Carlton JMR, Sultan AA, Satt G, Shoal AK, Walliker D, Jensen JB, Arnot DE: Drug response and genetic characterization of *Plasmodium falciparum* clones recently isolated from a Sudanese village, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1993, **87**, 454-458

19. Bayoumi RAL, Babiker HA, Arnot DE: Uptake and efflux of chloroquine by chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* clones recently isolated in Africa, *Acta Tropica,* 1994 Nov, **58(2),** 141-149

20. Bhattacharya PR, Biswas S, Kabilan L: Alleles of the *Plasmodium falciparum Pfmdr1* gene appear not to be associated with chloroquine resistance in India, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1997, **91**, 454-455

21. Bhattacharya PR, Pillai CR: Strong association, but incomplete correlation, between chloroquine resistance and allelic variation in the *Pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* isolates from India, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology,* 1999**, 93(7),** 679-684

22. Brandling-Bennet AD, Oloo AJ, Watkins WM, Boriga DA, Kariuki DM, Collins WE: Chloroquine treatment of falciparum malaria in an area of Kenya of intermediate chloroquine resistance. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1988, **82**, 833-837

23. Bray PG, Howells RE, Ritchie GJ, Ward SA: Rapid chloroquine efflux phenotype in both chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. A correlation of chloroquine sensitivity with energy-dependent drug accumulation, *Biochemical Pharmacology,*1992, **44,** 1317-1324

24. Bray PG, Ward SA: Malaria chemotherapy: resistance to quinoline containing drugs in *Plasmodium falciparum*, *FEMS Microbiology Letters*, 1993, Oct 1;**113(1)**,1-7. Review.

25. Bray PG, Ward SA: A comparison of the phenomenology and genetics of multidrug resistance in cancer cells and quinoline resistance in *Plasmodium falciparum*, *Pharmacology and Therapeutics*, 1998 Jan;**77(1)**,1-28. Review.

26. Bray PG, Mungthin M, Ridley RG, Ward SA: Access to haematin: the basis of chloroquine resistance, *Molecular Parasitology,*1998, **54,** 170-179

27. Carlton JM, Fidock DA, Djimdé A, Plowe CV, Wellems TE: Conservation of a novel vacuolar transporter in Plasmodium species and its central role in chloroquine resistance of *P. falciparum*, *Current opinion in microbiology*, 2001 Aug, **4(4)**,415-420

28. CDC/MoH: *In vivo* assessment of chloroquine and sulphadoxine-pyrimethamine in the treatment of clinical falciparum malaria in Kabarole, Apac, Tororo and Kampala Districts, *Communicable Disease Control, Ministry of Health Uganda,* 1994 (unpublished Document), zitiert bei Kilian *et al.* [1998]

29. Chen N, Russell B, Staley J, Kotecka B, Nasveld P, Cheng Q.: Sequence polymorphisms in *Pfcrt* are strongly associated with chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*, *Journal of Infectious Diseases*, 2001 May;**183(10)**:1543-1545

30. CIOMS/WHO: International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects, *Council for International Organizations of Medical Sciences* & *WHO,* Geneva 1993, 1-60, zitiert bei Kilian *et al.* [1998]

31. Cowman AF, Karcz SR: The *Pfmdr* gene homologues of *Plasmodium falciparum*, *Acta Leidensia,* 1991, **60 (1),** 121-129

32. Cowman AF, Karcz S, Galatis D, Culvenor JG: A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole, *Journal of Cell Biology,* 1991 Jun, **113(5),** 1033-1042

33. Cowman AF, Karcz S: Drug resistance and the P-glycoprotein homologues of *Plasmodium falciparum*, *Seminars in Cell Biology,* 1993, **4(1),** 29-35, Review

34. Cowman AF, Galatis AF, Thompson JK: Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *Pfmdr1* gene and cross-resistance to halofantrine und chinine, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.,* 1994, **91(3),** 1143-1147

35. Cox-Singh J, Singh B, Alias A, Abdullah MS: Assessment of the association between three *Pfmdr1* point mutations and chloroquine resistance *in vitro* of Malaysian *Plasmodium falciparum* isolates, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* 1995, **89(4),** 436-437

36. Cremer G, Basco LK, Le Bras J, Camus D, Slomianny C: *Plasmodium falciparum:* detection of P-glycoprotein in chloroquine-susceptible and chloroquine-resistant clones and isolates, *Experimental Parasitology,* 1995 Aug, **81(1),** 1-8

37. Djimdé A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, Dicko A, Su XZ, Nomura T, Fidock DA, Wellems TE, Plowe CV, Coulibaly D: A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria, *The New England Journal of Medicine,* 2001 Jan, **344(4)**, 257-63

38. Dorn A, Vippagunta SR, Matile H, Jaquet C, Vennerstrom JL, Ridley RG: An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials, *Biochemical Pharmacology*, 1998, **55(6)**, 727-736

39. Dorsey G, Kamya MR, Ndeezi G, Babirye JN, Phares CR, Olson JE, Katabira ET, Rosenthal PJ: Predictors of chloroquine treatment failure in children and adults with falciparum malaria in Kampala, Uganda, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 2000 Jun, **62(6),** 686-692

40. Dorsey G, Kamya MR, Singh A, Rosenthal PJ: Polymorphisms in the *Plasmodium falciparum Pfcrt* and *pfmdr-1* genes and clinical response to chloroquine in Kampala, Uganda, *Journal of Infectious Diseases,* 2001 Mai;**183(9)**:1417-1420

41. Duraisingh MT, Drakeley CJ, Muller O, Bailey R, Snounou G, Targett GAT, Greenwood BM, Warhurst DC.: Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the *Pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amiodaquine, *Parasitology,* 1997, **114,** 205-211

42. Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC: The tyrosine-86 allele of the *Pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin, *Molecular and Biochemical Parasitology,* 2000, **108 (1),** 13-23

43. Durand R, Gabbett E, Di Piazza JP, Delabre JF, Le Bras J: Analysis of kappa and omega repeats of the *Cg2* gene and chloroquine susceptibility in isolates of *Plasmodium falciparum* from Subsaharan Africa, *Molecular and Biochemical Parasitology,* 1999, **101**, 185-197

44. Durand R, Jafari S, Vauzelle J, Delabre J, Jesic Z, Le Bras J: Analysis of *Pfcrt* point mutations and chloroquine susceptibility in isolates of *Plasmodium falciparum,* 2001 Apr, **114(1)**, 95-102

45. Dzekunov SM, Ursos LM, Roepe PD: Digestive vauolar pH of intact intraerythrocytic *P.falciparum* either sensitive or resistant to chloroquine, *Molecular and Biochemilcal Parasitology,* 2000, **110(1)**, 107-124

46. Endicott J, Ling V: The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance, *Annual. Review of Biochemistry,* 1989, **58**, 137-171

47. Ekong RM, Robson KJ, Baker DA, Warhurst DC: Transcripts of the multidrug resistance genes in chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*, *Parasitology,* 1993, **106,** 107-115

48. Fairley NH: Sidelights on malaria in man obtained by subinoculation experiments, *Transactions of the Society of Tropical Medicine & Hygiene,* 1947, **40,** 621-676

49. Ferrari V, Cutler DJ: Uptake of chloroquine by human erythrocytes, *Biochemical Parasitology,* 1990, **39,** 753-762

50. Fidock DA, Nomura T, Cooper RA, Su X, Talley AK, Wellems TE: Allelic modifications of the *Cg2* and *cg1* genes do not alter the chloroquine response of drug-resistant *Plasmodium falciparum*, *Molecular and Biochemical Parasitology* 2000 Sep, **110(1)**, 1-10

51. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu AB, Naude B, Deitsch KW, Su XZ, Wootton JC, Roepe PD, Wellems TE: Mutations in the *P.falciparum* digestive vacuole transmembrane protein *Pfcrt* and evidence for their role in chloroquine resistance, *Molecular Cell,* 2000 Okt, **6 (4),** 861-871

52. Fitch CD: Chloroquine resistance in malaria. A deficiency of chloroquine binding, *Proceedings of the National.Academy of Science of the U.S.A,* 1969, **64,** 1181-1187

53. Fitch CD: Mode of action of antimalarial drugs. *Malaria and the Red Cell, Ciba Foundation Symposium,* 1983, 222-232, Pitman Press London

54. Flüeck TPF, Jelinek T, Kilian AHD, Adagu IS, Kabagambe G, Sonnenburg F, Warhurst DC:Correlation of *in vivo*-resistance to chloroquine and allelic polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Uganda, *Tropical Medicine and International Health,* 2000, **5(3)**, 174-178

55. Foote SJ, Thompson JK, Cowman AF, Kemp DJ: Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of P. falciparum, *Cell,* 1989 Jun 16, **57(6)**, 921-930

56. Foote SJ, Kyle DE, Martin RK, Oduola AMJ, Forsyth K, Kemp DJ, Cowman AF: Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum, Nature,* 1990 May 17, 345, 255-8

57. Fowler VG, Lemnge M, Irare SG, Malecela E, Mhina J, Mtui S, Mashaka M, Mtoi R: Efficacy of chloroquine on *Plasmodium falciparum* transmitted at Amani, Eastern Usambara Mountains, North-east Tanzania: an area where malaria has recently become endemic. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 1993, 96, 337-345

58. Frean JA, Awad-El-Kariem FM, Warhurst DC, Miles MA: Rapid detection of *pmdr1* mutations in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria by polymerase chain reaction analysis of blood spots, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* 1992, **86**, 29-30

59. Ginsburg H, Stein WS: Kinetic modelling of chloroquine uptake by malaria-infected erythrocytes. Assessment of the factors that may determine drug resistance. *Biochemical Pharnacology,* 1991, **41,** 1463-1470

60. Gómez-Saladin E, Fryauff DJ, Taylor WR, Laksana BS, Susanti AI, Purnomo, Subianto B, Richie TL: *Plasmodium falciparum mdr1* mutations and *in vivo* chloroquine resistance in Indonesia, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 1999, **61(2),** 240-244

61. Grobusch MP, Adagu IS, Kremsner PG, Warhurst DC: *Plasmodium falciparum: in vitro* chloroquine susceptibility and allele-specific PCR detection of *Pfmdr1* $^{Asn}86^{Tyr}$ polymorphism in Lambarene, Gabon, *Parasitology,* 1998, **116,** 211-217

62. Haruki K, Bray PG, Ward SA, Hommel M, Ritchie GY: Chloroquine resistance of

*Plasmodium falciparum*: further evidence for a lack of association with mutations of the *Pfmdr1* gene, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1994, **88**, 694

63. Homewood CA, Warhurst DC, Peters W, Baggaley VC: Lysosomes, pH and the anti-malarial action of chloroquine, *Nature,*1972, **235,** 50-52

64. Jacobs GH, Oduola AM, Kyle DE, Milhous WK, Martin SK, Aikawa M: Ultrastructural study of the effects of chloroquine and verapamil on *Plasmodium falciparum, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 1988 Jul, **39(1),** 15-20

65. Kain KC, Lanar DE: Determination of genetic variation within *Plasmodium falciparum* by using enzymatically amplified DNA from filter paper disks impregnated with whole blood, *Journal of Clinical Microbiology*, 1991 Jun;**29(6)**:1171-4

66. Kamugisha J, Kipp W, Burnham G: *In vivo* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, amodiaquine, and sulphadoxine-pyrimethamine in Western Uganda, *Tropical and Geographical Medicine,* 1993, **46**, 364-365

67. Kamya MR, Dorsey G, Gasasira A, Ndeezi G, Babirye JN, Staedke SG, Rosenthal PJ: The comparative efficacy of chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Kampala, Uganda, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* 2001, **95(1)**, 50-55

68. Karcz S, Cowman A: Similarities and differences between the multidrug resistance phenotype to mammalian tumor cells and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*, Review, *Exp Parasitol.,* 1991 Aug, **73 (2),** 233-240

69. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Lindenmann J: Medizinische Mikrobiologie, *Thieme Verlag*, 1993, **8.Auflage**, 445-461

70. Kean BH: Chloroquine-resistant falciparum from Africa, *Journal of the American Medical Association,* 1979, **241**, 395

71. Kilama WL: Roll back malaria in Sub-Saharan Africa?, *Bulletin of the World Health Organization,* 2000, **78(12)**, 1452-1453

72. Kilian AHD, Jelinek T, Prislin I, Kabagambe G, Byamukama W, Mpigika G, Korte R, von Sonnenburg F. Resistance *in vivo* of *P. falciparum* to co-trimoxazole in Western Uganda, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1998, **92**, 197-200

73. Krogstad DJ, Schlesinger PH, Gluzman IY: Antimalarials increase vesicle pH in *Plasmodium falciparum, Journal of Cell Biology,* 1985, **101,** 2302-2309

74. Krogstad DJ, Gluzman IY, Kyle DE, Odoula Am, Martin SK, Milhous WK,Schlesinger PH: Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance, *Science,* 1987, **238,** 1283-1285

75. Krogstad DJ, Gluzman IY, Herwaldt BL, Schlesinger PH, Wellems TE: Engery dependence of chloroquine accumulation and chloroquine efflux in *Plasmodium falciparum, Biochemical Pharmacology,* 1992, **43**, 5762

76. Langreth SG, Nguyen-Dinh P, Trager W: *Plasmodium falciparum:* merozoite invasion *in vitro* in the presence of chloroquine, *Experimental Parasitology,* 1978, **46,** 235-238

77. Lefevre G, Looareesuwan S, Treeprasertsuk S, Krudsood S, Silachamroon U, Gathmann I, Mull R, Bakshi R: A clinical and pharmacokinetic trial of six doses of artemether-lumefantrine for multidrug-resistant Plasmodium falciparum malaria in Thailand*, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2001, **64(5-6)**, 247-256

78. Lim ASY, Cowman AF: *Plasmodium falciparum:* Chloroquine selection of a cloned line and DNA rearrangements, *Experimental Parasitology,* 1996, **83(3)**, 283-294

79. Llanos-Cuentas A, Campos P, Clendenes M, Canfield J, Hutchinson DB: Atovaquone and Proguanil Hydrochloride compared with Chloroquine or Pyrimethamine/ Sulfodaxine for treatment of acute *Plasmodium falciparum* malaria in Peru, *Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2001,* **5(2),** 67-72

80. Long GW, Fries Lou, Watt GH, Hoffman S: Polymerase chain reaction amplification from *Plasmodium falciparum* on dried blood spots, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 1995, **52,** 344-346

81. Martin SK, Oduola AM, Milhous WK: Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*, *Science,* 1987, **235(4791),** 899-901

82. Martiney JA, Cerami A, Slater AF: Verapamil reversal of choroquine resistance in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is specific for resistant parasites and independent of the weak base effect. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, **270**, 22393-22398

83. Mayor AG, Gomez-Olive X, Aponte JJ, Casimiro S, Mabunda S, Dgedge M, Barreto A, Alonso PL: Prevalence of the K76T mutation in the putative *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*Pfcrt*) gene and its relation to chloroquine resistance in Mozambique, *Journal of Infectious Diseases,* 2001 Mai, **183(9)**:1413-1416

84. McCarthy M: Is one gene the key to chloroquine-resistant malaria?, *Lancet,* 2000, **356**, 1582

85. McCutcheon KR, Freese JA, Frean JA, Sharp BL, Markus MB: Two mutations in the multidrug-resistance gene homologue of *Plasmodium falciparum, Pfmdr1,* are not useful predictors of *in-vivo* or *in-vitro* chloroquine resistance in Southern Africa, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* 1999, **93(3),** 300-302

86. Nagesha HS, Din-Syafruddin, Casey GJ, Susanti AI, Fryauff DJ, Reeder JC, Cowman AF: Mutations in the *pmfdr1, dhfr* and *dhps* genes of *Plasmodium falciparum* are associated with in-vivo drug resistance in West Papua, Indonesia, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* 2001, **95(1)**, 43-49

87. Nevill CG, Ochen K, Munafu CG, Bekobita D, Sezi CL: Response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine and Fansidar *in vivo* and chloroquine and amodiaquine *in vitro* in Uganda, *East African Medical Journal,* 1995, **72 (6)**, 349-354

88. Nomura T, Carlton JM, Baird JK, , Fidock DA, Su X, Collins WE, McCutchan TF, Wellems TE: Evidence for different mechanisms of chloroquine resistance in 2 Plasmodium species that cause human malaria, *Journal of Infectious Diseases*, 2001 Jun; **183(11)**:1653-1661

89. Nuwaha F: The challenge of chloroquine-resistant malaria in sub-Saharan Africa, *Health Policy Plan*, 2001 Mar, **16(1)**, 1-12

90. Parker FS, Irvin JL: The interaction of chloroquine with nucleic acids and nucleoproteins, *Journal of biological Chemistry,* 1952, **199,** 897-909

91. Payne D: Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum, Parasitology Today*, 1987, **3,** 241-246

92. Peel SA, Bright P, Yount B, Handy J, Baric RS: a strong association between mefloquine and halofantrine resistance and amplification, overexpression and mutation in the P-glycoprotein gene homolog (*Pfmdr*) of *Plasmodium falciparum, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 1994, **51(5),** 648-658

93. Picot S, Burnod J, Bracchi V, Chumpitazi BF, Ambroise-Thomas P: Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* 1997, **91(5),** 590-591

94. Pillai DR, Labbe AC, Vanisaveth V, Hongvangthong B, Pomphida S, Inkathone S, Zhong K, Kain KC: *Plasmodium falciparum* malaria in Laos: chloroquine treatment outcome and predictive value of molecular markers, *Journal of Infectious Diseases,* 2001 Mar, **183(5)**, 789-795

95. Povoa MM, Adagu IS, Oliveira SG, Machado RLD, Miles MA, Warhurst DC: *Pfmdr1* $^{Asn}1042^{Asp}$ and $^{Asp}1246^{Tyr}$ polymorphisms, thought to be associated with chloroquine resistance, are present in chloroquine-resistant and –sensitive Brazilian field isolates of *Plasmodium falciparum*, *Exp Parasitol.,* 1998 Jan, **88 (1),** 64-68

96. Premji Z, Minjas JN, Shiff CJ: Chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* in coastal Tanzania: A challenge to be continued strategy of village based chemotherapy for malaria control, *Tropical Medicine and Parasitology,* 1994, 45, 47-48

97. Price R, Cassar C, Brockman A, Duraisingh M, van Vugt M, White NJ, Nosten F, Krishna S: The *Pfmdr1* gene is associated with a multidrug-resistant pheotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 1999, **43(12)**, 2943-2949

98. Pröll S: Einsatz der Polymerase-Ketten-Reaktion zur Diagnostik der Malaria im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen in West-Uganda, *Dissertation an der LMU München,* 1997

99. Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk M, Cowman AF: *Pgh1* modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum, Nature,* 2000, **403 (6772),** 906-909

100. Ridley RG, Dorn A, Vippagunta SR, Vennerstrom JL: Haematin (haem) polymerisation and its inhibition by quinoline antimalarials, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology,* 1997, **91,** 559-556

101. Ridley RG: Malaria: dissecting chloroquine resistance, *Current Biology,* 1998, **8(10)**, R346-349

102. Riordan JR, Deuchars K, Karner N, Alon N, Trent J, Ling V: Amplification of P-glycoprotein genes in mulitdrug-resistant mammalian cell lines, *Nature,* 1985 Aug-Sep, **316(6031),** 817-819

103. Rubio JP, Cowman AF**:** *Plasmodium falciparum*: The *Pfmdr2* protein is not overexpressed in chloroquine-resistant isolates of the malaria parasite, *Experimental Parasitology,* 1994 Sep, **79 (2),** 137-147

104. Ruetz S, Delling U, Brault M, Schurr E, Gros P: The *Pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* confers cellular resistance to antimalarial drugs in yeast cells, *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.,* 1996 Sep, **93,** 9942-9947

105. Saiki RK, Gelfan DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science,* 1988**, 239(4839),** 487-491

106. Sanchez CP, Wunsch S, Lanzer M.: Identification of a chloroquine importer in *Plasmodium falciparum.* Differences in import kinetics are genetically linked with the chloroquine-resistant phenotype, *Journal of Biological Chemistry,* 1997 Jan, **272(5),** 2652-2658

107. Sezi CL, Nevill C, Ochen K, Munafu C, Bekobita D: The response of *Plasmodium falciparum* to 4-aminoquinolines and pyrimethamine/sulphadoxine at six sites scattered throughout Uganda, *Uganda Medical Journal,* 1991, **8**, 33-46

108. Sexton JD, Deloron P, Bugilimfura, Neill M: Parasitological and clinical efficiacy of 25mg/kg and 50mg/kg of chloroquine for treamtent of *Plasmodium falciparum* malaria in Ruandan children. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 1988, **38:** 237-243

109. Sherman IW: Biochemistry of *Plasmodium falciparum (*malarial parasites), *Microbiology, Rev.,* 1979, **43**, 453-495

110. Sinden RE: Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum in vitro:* ultrastructural observations on the lethal action of chloroquine. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology,* 1982, **76,** 15-23

111. Slater AFG: Malaria pigment, *Experimental Parasitology,* 1992, **74,** 362-365

112. Slater AFG: Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum, Pharmacology and Therapeutics,*1993, **57(2-3),** 203-235, Review

113. Su X, Kirkman LA, Fujioka H, Wellems TE.: Complex polymorphisms in an ~330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant P. falciparum in Southeast Asia and Africa, *Cell*, 1997, **91,** 593-602

114. Sullivan DJ, Gluznan IY, Russell DG, Goldberg DE: On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action, *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.,* 1996, **93,** 11865-11870

115. Triglia T, Foote SJ, Kemp DJ, Cowman AF: Amplification of the multidrug-resistance gene *Pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* has arisen as multiple independent events, *Molecular and Cellular Biology,* 1991 Oct, **11(10),** 5244-5250

116. Ullman B: Multidrug-resistance and P-glycoproteins in parasitic protozoa, *Journal of bioenergetics and biomembranes.,*1995, **27,** 77-84

117. Van der Jagt DL, Hunsaker LA, Campos NM: Characterization of a hemoglobin-degrading, low molecular weight protease from *Plasmodium falciparum*, *Molecular and Biochemical Parasitology,* 1986, **18,** 389-400

118. van Es HHG, Karcz S, Chu F, Cowman AF, Vidal S, Gros P, Schurr E: Expression of the Plasmodial *Pfmdr1* gene in mammalian cells is associated with increased susceptibility to chloroquine, *Molecular and Cellular Biology,* 1994 Apr, **14(4),** 2419-2428

119. van Es HHG, Renkema H, Aerts H, Schurr E: Enhanced lysosomal acidifications leads to increased chloroquine accumulation in CHO cells expressing the *Pfmdr1* gene, *Molecular and Biochemical Parasitology,* 1994 Dec, **68 (2),** 209-219

120. Vieira PP, das Gracas Alecrim M, da Silva LH, Gonzalez-Jimenez I, Zalis MG: Analysis of the *Pfcrt* K76T mutation in *Plasmodium falciparum* isolates, *Journal of Infectious Diseases*, 2001 Jun, **183(12)**:1832-1833

121. Volkman SK, Cowman Af, Wirth DF: Functional complementation of the *ste6* gene of *Saccharomyces cerevisiae* with the *Pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum, Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.,* 1995, **92,** 8921-8925

122. von Seidlein L, Duraisingh MT, Drakeley CJ, Bailey R, Greenwood BM, Pinder M: Polymorphisms of the *Pfmdr1* gene and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* in The Gambia, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1997, 91, 450-453

123. Walgate R: Malaria drug resistance gene identified, *Bulletin of the World Health Organization,* 2000, **78(12)**, 1477

124. Ward SA: Mechanisms of chloroquine resistance in malarial chemotherapy, *Trends in Pharmacological Sciences,* 1988, 9, 241-246

125. Waters AP: Chloroquine resistance – discovering the missing link?, *Nature Medicine,* 1998, **4(1),** 23-24

126. Watkins WM, Percy M, Cramptom JM, Ward S, Koech D, Howells RE: The changing response of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in East Africa, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1988, **82**, 21-26

127. Wellems TE, Panton LJ, Gluzman IY, do Rosario VE, Gwadz RW, Walker-Jonah A, Krogstad DJ: Chloroquine resistance not linked to *mdr*-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross, *Nature*, 1990, **345**, 253-255

128. Wellems TE, Walker-Jonah A, Panton LJ: Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.,* 1991, **88(8),** 3382-3386

129. Wellems TE, Wootton JC, Fujioka H, Su X, Cooper R, Baruch D, Fidock DA: *P. falciparum Cg2*, linked to chloroquine resistance, does not resemble Na+/H+ exchangers, *Cell*, 1998

Aug, **94(3),** 285-286

130. Wellems TE, Su XZ, Ferdig M, Fidock DA: Genome projects, genetic analysis, and the changing landscape of malaria research, *Current opinion in microbiology,*1999 Aug, **2(4),** 415-419

131. Wellems TE, Plowe CV: Chloroquine-resistant Malaria, *The Journal of Infectious Diseases,* 2001*,* **184,** 770-776

132. WHO: Assessment of therapeutic efficiacy of antimalarial drugs for uncomplicated falciparum malaria in areas with intense transmission, *WHO/MAL/96.* 1996, 1077

133. Wilson CM, Serrano AE, Wasley A, Bogenschutz MP, Shankar AH, Wirth DF: Amplification of a gene related to mammalian mdr genes in drug resistant *Plasmodium falciparum, Science*, 1989, 244,1184-1186.

134. Wilson CM, Volkman SK, Thaithong S, Martin RK, Kyle DE, Milhous WK, Wirth DF: Amplification of *Pfmdr1* associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand, *Molecular and Biochemical Parasitology,* 1993 Jan, **57(1),** 151-160

135. Wolday D, Kibreab T, Hodes R.: Sensitivity of *Plasmodium falciparum in vivo* to chloroquine and pyrimethamine-sulphadoxine in Rwandan patients in a refugee camp in Zaire, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1995, **89**, 654-656

136. Wunsch S, Sanchez CP, Gekle M, Grosse-Wortmann L, Wiesner J, Lanzer M: Differential stimulation of the $Na^+/H^+$ exchanger determines chloroquine uptake in *Plasmodium falciparum*, *Journal of Cell Biology*, 1998, **140,** 2645-2654

137. Yayon A, Cabantchik ZI, Ginsburg H: Identification of the acidic compartment of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes as the target of the antimalarial drug chloroquine, *The EMBO Journal*, 1984 Nov; **3(11)**: 2695-2700

138. Yayon A, Cabantchik ZI, Ginsburg H: Susceptibility of human malaria parasites to chloroquine is pH dependent, *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A*, 1985, **82(9)**:2784-2788

139. Zalis MG, Wilson CM, Zhang Y, Wirth DF: Characterization of the *Pfmdr*2 gene for *Plasmodium falciparum*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1993 Nov, **62 (1),** 83-92

140. Zalis MG, Wilson CM, Zhang Y, Wirth DF: Characterization of the *Pfmdr*2 gene for *Plasmodium falciparum*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1994 Feb, **63 (2),** 311

141. Zalis MG, *et al.*: Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from the Amazon region of Brazil: evidence for quinine resistance, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 1998 May, **58(5),** 630-637

142. Zhang Y: Inhibition of hemoglobin degradation in *Plasmodium falciparum* by chloroquine and ammonium chloride, *Experimental Parasitology,* 1987, **64,** 322-327

**Danksagung**

**Herrn Professor Dr.med. Thomas Löscher danke ich für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit.**

**Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr.med. Tomas Jelinek für die wissenschaftliche Betreuung und Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung dieser Arbeit.**

**Danken möchte ich ferner den Angestellten des Tropeninstituts für ihre hilfreiche Unterstützung.**

**Nicht zu vergessen ist Michael Alifrangis aus Kopenhagen, der mir vor allem im Anfangsstadium manch wertvolle Anregung gab.**

**Ebenso zu Dank verpflichtet bin ich Dr.Warhurst von der London School of Hygiene and Tropical Medicine, der mich als Praktikant an der London School willkommen hiess und Dr.Adagu, der viel wertvolle Vorarbeit geleistet hat und mir bei der Durchführung der Laborarbeit eine große Hilfe war.**

**Dem Boehringer-Ingelheim Fonds bin ich zu besonderem Dank verpflichtet, durch dessen finanzielle Unterstützung mir das Arbeitspraktikum an der London School ermöglicht wurde.**

**Herzlich verbunden bin ich meinen Eltern, die mich ermutigt haben, die wissenschaftliche Arbeit am Tropeninstitut München aufzunehmen und meiner Frau Anu, deren moralische Unterstützung mich in meiner Arbeit immer wieder bestärkt hat.**

## Curriculum vitae

## Thomas Paul Franz Flüeck

| | |
|---|---|
| 26. Juli 1973 | Geboren in Landshut |
| Sep.1984 bis Juli 1993 | Hans-Carossa-Gymnasium, Landshut |
| Okt.1993 bis März 2000 | Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes/ Fakultät Homburg |
| August/September 1997 | Famulaturen in Innerer Medizin und Pädiatrie im Sahrudaya Hospital, Alleppey, Kerala, Südindien |
| seit Mai 1998 | Doktorand in der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der LMU München |
| Juli 1998 | Arbeitsaufenthalt an der London School of Hygiene & Tropical Medicine unter der Leitung von Dr.D.Warhurst, unterstützt durch ein Stipendium des Boehringer Ingelheim Fonds |
| 29.August 1998 | Hochzeit mit Anu Kunnumpuram, geb. in Kerala, Indien |
| März 2000 | Veröffentlichung der Forschungsarbeit im Journal *Tropical Medicine and International Health*, Titel: „Correlation of *in-vivo*-resistance to chloroquine and allelic polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Uganda“ Vol.5, No3, 2000 |
| April 2000 – März 2001 | Praktisches Jahr in den Fächern Chirurgie (Spital Walenstadt, Schweiz), Pädiatrie (Toronto Hospital for Sick Children, Kanada, Department of Infectious Diseases) und Innere Medizin (Klinikum Landshut) |
| Mai 2001 | Staatsexamen an der Ludwig-Maximilians-Universität München |
| seit Dezember 2001 | Arzt im Praktikum an der Medizinischen Klinik I, Klinikum Landshut |