Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin
Leiter: Prof. Dr. med. T. Löscher

an der Medizinischen Poliklinik Innenstadt
Direktor: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Molekulare Surveillance der Medikamentenresistenz bei Plasmodium falciparum: Evaluation der Methodik anhand von Isolaten aus Laos

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischschen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Nicole Isabelle Melanie Berens
aus München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Th. Löscher
Mitberichterstatter:	PD Dr. St. Odenbreit PD Dr. H. M. Diepolder
Mitbetreuung durch den Promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. T. Jelinek
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	07.07. 2005

Auszüge dieser Arbeit wurden publiziert:

Berens N, Schwoebel B, Jordan S, Vanisaveth V, Phetsouvanh R, Christophel EM, Phompida S, Jelinek T (2003) *Plasmodium falciparum*: correlation of in vivo resistance to chloroquine and antifolates with genetic polymorphisms in isolates from the south of Lao PDR. Tropical Medicine and International Health 8(9): 775-782

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
1.1. Malaria tropica 1
1.1.1. Verbreitung der Malaria tropica 1
1.1.2. Übertragung und Pathogenese der Malaria tropica 2
1.1.3. Bekämpfungs- und Schutzmaßnahmen 6
1.1.4. Definition der Resistenz 11

1.2. Chloroquin 12
1.2.1. Resistenzentwicklung und –verbreitung 12
1.2.2. Wirkungsweise 13
1.2.3. Molekulargenetik der Resistenz 21

1.3. Antifolate 29
1.3.1. Resistenzentwicklung und –verbreitung 29
1.3.2. Wirkungsweise 30
1.3.3. Molekulargenetik der Resistenz 31

2. Problemstellung und Zielsetzung 35

3. Patienten, Material und Methoden 37
3.1. Proben
3.1.1. Studiengelände und Einschlusskriterien 37
3.1.2. Behandlung und Klassifikationskriterien 38
3.1.3. Plasmodium falciparum Stämme als Positivkontrollen 39

3.2. Material
3.2.1. Nukleotide 40
3.2.2. Enzyme 42
3.2.3. Chemikalien 42
3.2.4. Geräte 43
3.2.5. Filme 43

3.3. Methoden
3.3.1. Grundprinzipien der verwendeten Methoden 44
3.3.1.1. DNA-Extraktion 44
3.3.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 44
3.3.1.3. Restriktionsanalyse (RFLP) 45
3.3.1.4. Agarosegelelektrophorese 46
3.3.2. Durchführung im Labor 47
3.3.2.1. DNA-Extraktion mit der Chelex-Methode 47
3.3.2.2. Amplifikation mit Hilfe der PCR 47
3.3.2.3. Restriktionsverdau mit Endonukleasen (RFLP) 55
3.3.2.4. Agarosegelelektrophorese zur Kontrolle von PCR und RFLP 63

4. Ergebnisse
4.1. Daten der in vivo-Studie in Laos 65
4.2. PCR und Restriktionsverdau 65
4.2.1. Spezifizierung 66
4.2.1.1. *Plasmdium falciparum* 66
4.2.1.2. *Plasmodium vivax* 67

4.2.2. Pfmdr 67
4.2.2.1. Codon 86 68
4.2.2.2. Codon 1042 71
4.2.2.3. Codon 1246 72

4.2.3. Pfcrt 73
4.2.3.1. Codon 76 73

4.2.4. DHFR 74
4.2.4.1. Codon 16 75
4.2.4.2. Codon 51 76
4.2.4.3. Codon 59 77
4.2.4.4. Codon 108 78
4.2.4.5. Codon 164 81

4.2.5. DHPS 82
4.2.5.1. Codon 436 83
4.2.5.2. Codon 437 84
4.2.5.3. Codon 540 86
4.2.5.4. Codon 581 86
4.2.5.5. Codon 613 88

4.3. Korrelation mit den *in vivo*-Daten 89
4.3.1. Chloroquin-Gruppe 89
4.3.2. Antifolat-Gruppe 90
4.3.3. Chloroquin-Antifolat-Kombination-Gruppe 91

5. Diskussion 93
5.1. Vergleich mit anderen Ländern 93
5.2. Vergleich mit in vitro-Studien 108
5.3. Andere Faktoren 112
5.4. Rekrudeszenz-Reinfektion 115
5.5. Rekrudezenz-Gametozytämie 116
5.6. Dauer der Follow up-Periode 118
5.7. Schlußbetrachtungen 120

6. Zusammenfassung 125

7. Danksagung 127

8. Abkürzungen 128

9. Literaturverzeichnis 129

10. Abbildungsverzeichnis 156

1. Einleitung

1.1. Malaria tropica

1.1.1. Verbreitung der Malaria

Die Malaria stellt nach wie vor die bedeutendste parasitäre Erkrankung weltweit dar. Sie hat, hauptsächlich in der gefährlichen Form der Malaria tropica, schon Schlachten entschieden und durch den Tod bedeutender Staatsmänner Einfluß auf den Lauf der Weltgeschichte gehabt. Alexander der Große war wohl eines der bekanntesten Opfer dieser Krankheit, durch die ganze Städte ausgelöscht und Gegenden unbewohnbar gemacht wurden - wie etwa Milet, Ephesos und später Ravenna. Für das alte Rom bedeutete die Seuche Gefahr und Schutz vor Feinden wie den Vandalen, Goten oder Hunnen zugleich. Der italienische Malariaforscher Angelo Celli meint, dass der beste und zuverlässigste Bundesgenosse der Päpste in ihrem Kampf gegen die deutschen Kaiser im Mittelalter die Malaria war. Auch konnten nicht aus Italien stammende Päpste damit rechnen, sehr bald nach ihrer Wahl dem Sumpffieber zu erliegen. Der schlimmste Fluch, den ein Römer in der Antike aussprechen konnte, war: „Quartana te teneat !“ (übertragen: „Das Fieber soll dich holen !“) (Winkle, Kulturgeschichte der Seuchen)

Auch heute noch hat die Krankheit nichts an Gefährlichkeit eingebüßt. Nach Angaben der WHO leben ca. 48% der Weltbevölkerung in endemischen Malariagebieten in 88 Ländern. [Stand 2002] Trotz erfolgreicher Verkleinerung auf ungefähr die Hälfte der mit Malaria verseuchten Landfläche während des letzten Jahrhunderts (von ca. 53 % auf ca. 27 % der globalen Landfläche), ist die Zahl derer, die dem Ansteckungsrisiko ausgesetzt sind, aufgrund demographischer Entwicklungen auf fast drei Milliarden Menschen gestiegen. In Südostasien leben annähernd eine Milliarde Menschen in hypo- und mesoendemischen Malariagebieten. (Hay *et al.* 2004)

Die Inzidenz bei Malaria wird auf 300-500 Millionen Erkrankte pro Jahr geschätzt, die Zahl der jährlichen Todesfälle beträgt 1,5 – 2,7 Millionen. Mehr als 90% der Krankheits- und Todesfälle ereignen sich in West- und Ostafrika, der Rest verteilt sich auf Südostasien und Südamerika. (WHO 1997, 2002)

90% der Opfer sind Kinder oder Frauen in der Schwangerschaft. Malaria ist nicht eine obligate Tropenerkrankung, die dort herrschenden Bedingungen begünstigen die Verbreitung und wirken sich ungünstig auf eine dauerhafte Ausrottung der Überträger aus. Armut

verbunden mit Mangel- und Unterernährung fördern schwere und tödliche Verläufe. Krankheiten wie AIDS und Tuberkulose, welche die körpereigene Abwehr schwächen, stehen im Verdacht, den Verlauf negativ zu beeinflussen. (Hay et al. 2004, Suh et al. 2004)

Malaria ist auch einer der Hauptgründe der Sterblichkeit und Morbidität in Laos.
(Anothay *et al.* 2000) Die Volksrepublik mit einer Bevölkerung von ungefähr 5,53 Millionen Einwohnern ist ein Entwicklungsland, das in tropischen Breitengraden gelegen ist. Die Lebenserwartung bei Geburt liegt bei 55 Jahren, die Kindersterblichkeit zwischen 131-146/1000 Kinder. (www.who.int/country/lao) Insgesamt 80% der ethnisch sehr diversen Bevölkerung leben in von Malaria verseuchten Gebieten. (Anothay *et al.* 2000)

Da die Ausbreitung der Malaria sehr von klimatischen Parametern abhängig ist, findet man sie heutzutage vor allem in tropischen und subtropischen Gebieten. In Höhen über 1500 m nördlich bzw. südlich des 30. Breitengrades und am Äquator über 2500 m gibt es keine Malaria. Für den mehrtägigen Entwicklungszyklus in der Mücke ist eine konstante Außentemperatur von mindestens 17°C notwendig. Eine große Rolle spielt das Vorkommen von stehenden Süßwasserbereichen und Sümpfen. Noch vor hundert Jahren war die Malaria im gesamten Europa bis zum nördlichen 64. Breitengrad in Europa, d.h. bis an die Nord- und Ostseeküste, anzutreffen. Mit Trockenlegung der Sümpfe wurde sie nach Süden verdrängt, eine Renaissance in bestimmten Gebieten ist allerdings im Zuge der weltweiten Klimaveränderungen, der erneuten Einfuhr der Vektoren und erworbener Resistenzen gegen Insektizide zu erwarten. (Lang & Löscher, Winkle, Toellner)

1.1.2. Übertragung und Pathogenese der Malaria tropica

Lange Zeit hielt man die Luft der Sümpfe für den Übeltäter, daher auch die Bezeichnung malaria (= ital. schlechte Luft), Hippokratiker und andere hatten verseuchtes Wasser als Krankheitserreger im Verdacht, nur vereinzelt waren schon bei den Babyloniern („Fieberfliege“), Römern und afrikanischen Stämmen Mücken als Überträger vermutet worden. Lancisi (1654-1720) verfaßte ein Werk über die Malaria, in der er Mücken als Überträger der Krankheit anprangerte und einen parasitären Urstoff annahm, doch konnte er seine Theorie mangels ausreichender Auflösung damaliger Mikroskope nicht beweisen.

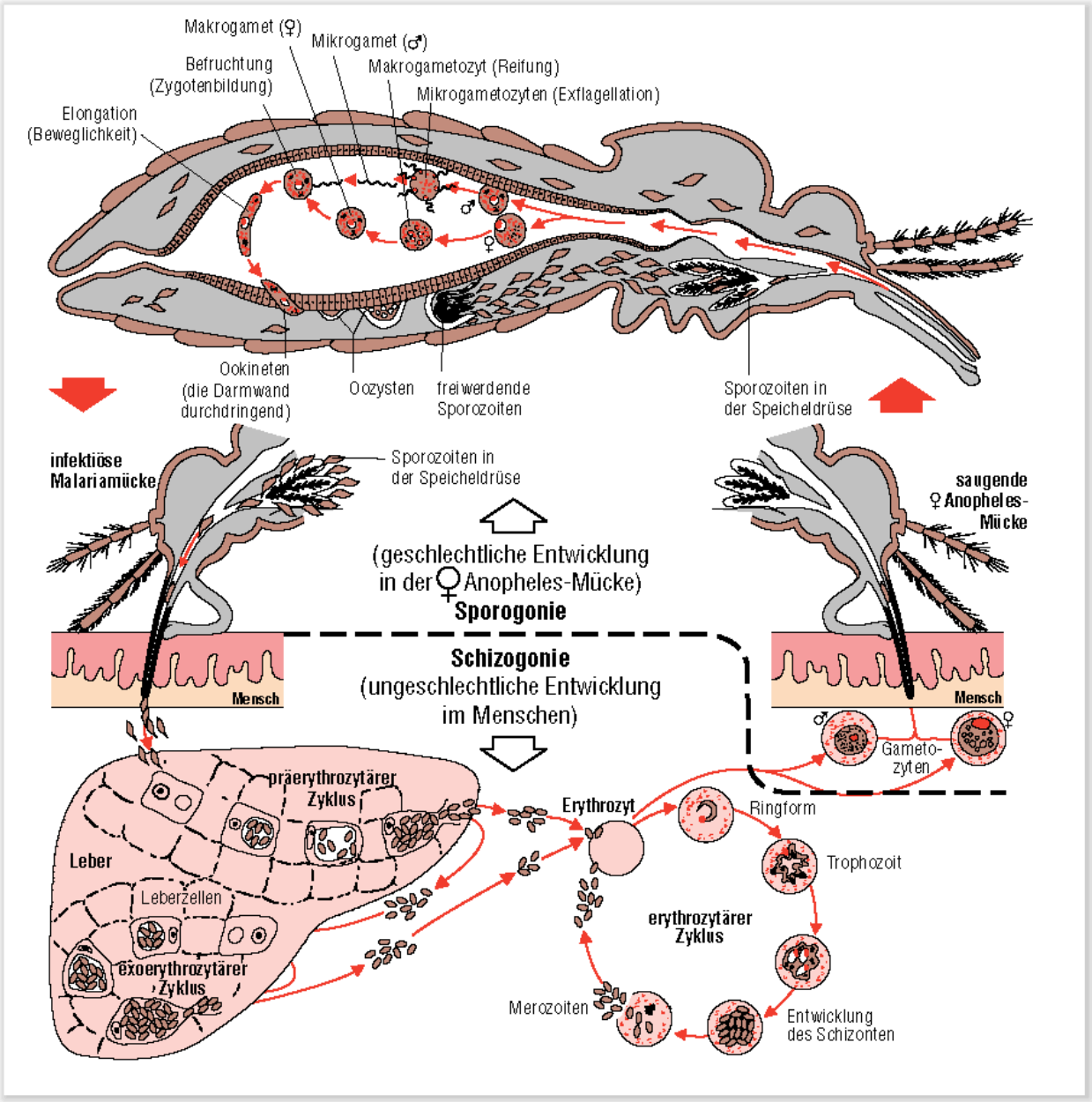
Den Vermehrungszyklus der Parasiten konnte als erster Ronald Ross in Indien 1897 nachvollziehen, nachdem es Alphonse Laveran 1880 in Bône gelungen war, die Plasmodien als Erreger zu entdecken. (Toellner)
Grassi wies 1898 mit Feldstudien in der Campagna romana nach, dass nur Mücken der Gattung Anopheles als Vektoren dienen können. (Winkle, Kulturgeschichte der Seuchen)
Krankheitserreger der Malaria tropica ist das Protozoon *Plasmodium falciparum*. Die weniger gefährlichen Formen der Malaria werden von den Plasmodien anderer Spezies verursacht. *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax* sind Erreger der Malaria tertiana, *Plasmodium malariae* ist Erreger der Malaria quartana. In Laos wird von den Spezies *P. falciparum, P. malariae* und *P.vivax* berichtet, wobei die Malaria tropica vorherrscht. (Pholsena 1992)

Anopheles-Mücken brüten alle im Wasser, jede Spezies zeigt aber unterschiedliche Brutgebiete und Ernährungsgewohnheiten. (Lang & Löscher) In den verschiedenen Landesteilen von Laos kommen mehr als 30 verschiedene Spezies von Anopheles vor, die beiden Hauptvektoren heißen Anopheles minimus und Anopheles balabacensis oder dirus. Anopheles minimus ist weit verbreitet. Sie kann sich von Tier- und Menschenblut ernähren und wird in Höhen zwischen 300 und 900 Meter angetroffen. Erwachsene Mücken halten sich aber meist in Höhen zwischen 300-400 Meter auf, in denen das ganze Jahr über ein mildes Klima herrscht. Ihre Brutstellen sind meist langsam fließende oder stehende Gewässer sowie von Tieren oder Menschen verursachte Wasserlöcher während der Regenzeit. Anopheles balabacensis oder dirus findet man eher selten. Sie ist bekannt für ihr aggressives Verhalten und gilt als Vektor der Waldmalaria. Sie lebt ausschließlich in dichten feuchten Wäldern in den Bergen oder in der Ebene. Das Weibchen legt seine Eier in alle stehenden Gewässer, Wasserlöcher, Pfützen sogar Fußabdrücke, in denen sich Wasser gesammelt hat. (Pholsena 1992)

Der Hauptwirt der Plasmodien ist die weibliche Mücke, nur die Weibchen der Mücken stechen. Durch den Stich gelangen Sporozoiten ins Blut des Opfers und schließlich zur Leber. Sie penetrieren die Hepatozyten und vermehren sich in ihnen weiter. Nach 9 –16 Tagen Reifung zu einem Leberschizonten zerfällt dieser in mehrere einkörnige amöboid bewegliche Tochtermerozoiten, die ins Blut ausgeschüttet werden. (Präerythrozytäre Schizogonie) Diese befallen Erythrozyten, in denen sie über die Ringform und Trophozoit zum Blutschizonten heranreifen. Nach ca. 48 Stunden bei der Malaria tropica und M. tertiana und ca. 72 Stunden bei der M. quartana führt das Wachstum zum Platzen der Zelle. Die bis zu 32

Tochtermerozoiten werden erneut in den Blutkreislauf geschüttet. Diese Parasitämie führt durch Ausschüttung pyrogener Substanzen zu Fieber und Schüttelfrost beim Zwischenwirt Mensch. Der Zyklus dieser asexuellen Schizogonie beginnt von Neuem.

Abb. 1: *Entwicklungszyklus der Plasmodien nach H.C. Jeffrey & R.M. Leach*



aus: Urban & Fischer 2003, Roche Lexikon Medizin, 5. Auflage

Nach mehreren unbehandelten Fieberanfällen erscheinen in den roten Blutkörperchen des Patienten auch die ersten geschlechtlichen Formen, die unbeweglichen Gametozyten. Sie werden in weibliche (Makrogameten) und männliche (Mikrogameten) unterteilt. Werden diese bei einem erneuten Stich einer weiblichen Anophelesmücke aufgenommen, erfolgt eine Befruchtung des weiblichen durch einen männlichen Gameten. Dieser so entstandene Ookinet

wandert durch die Zellwand des Mückenmagens, um sich unter dessen Außenmembran abzukapseln. Unter vielen Kernteilungen entwickelt er sich zu einer mit mehreren tausend Sporozoiten angefüllten Oocyste (Eikugel), die sich am Ende der Reifung in den Magen entleert. Die sichelförmigen Zellen (Sporozoiten) wandern in die Speicheldrüse der Mücke und werden bei einem neuerlichen Stich auf den nächsten Zwischenwirt übertragen. Dies nennt man die sexuelle Sporogonie. Gameten treten nur bei menschlichen Wirten auf, sie sind besonders häufig bei Kindern unter 12 Jahren und Patienten mit Rückfällen zu finden. (Lang & Löscher)

Schon früh kannte man das Krankheitsbild der Malaria. Vor allem die M. tertiana und M. quartana, die von sich in zwei- bzw. dreitägigem Rhythmus wiederholenden Fieberschüben gekennzeichnet sind, stellen einen einprägsamen Krankheitsverlauf dar. Bei jeder Parasitämie kommt es zu 6 bis 8 Stunden währenden Fieberanfällen. Da bei der Malaria tropica die Zyklen meist nicht synchron verlaufen, kommt das Fieber selten in einem bestimmten Rhythmus, was die Erkennung der Erkrankung so schwierig macht. Der Fieberrhythmus kann dem der M. tertiana ähneln, meist aber dauern die Fieberschübe 16 bis 24 Stunden mit kurzen oder fehlenden fieberfreien Intervallen, weshalb schon in der Antike der Name Quotidiana (= täglich) geprägt wurde. Zusätzlich zum Fieber kommen prodromale Symptome wie Schüttelfrost, Übelkeit, Kopf- und Gliederschmerzen, Diarrhoe u.a. hinzu. Die Zerstörung der Erythrozyten führt zu einer Anämie. Bei der Malaria tropica kann die Parasitämie unbegrenzt ansteigen, wohingegen bei den anderen Formen selten Parasitämien über 1-2 % diagnostiziert werden.

Die gefährlichste Komplikation der Malaria tropica stellt die zerebrale Form dar. Infizierte Erythrozyten heften sich an das Endothel von Gefäßen und obstruieren diese durch Verklumpung und Thrombenbildung, was zu einer Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff führt. Infarzierungen verschiedenster Organe wie ZNS, Milz, Leber u.a. sind die Folge und können zu einem Multiorganversagen führen.

Bei chronischen Formen der Malaria, die bei Malaria tertiana und M. quartana sowie auch in endemischen Gebieten mit erworbener Teilimmunität bei Malaria tropica vorkommen, ist eine Milzvergrößerung zu beobachten.

Der Malariaindex einer Region ergibt sich aus dem Parasitenindex (Prozentsatz an Kindern mit Parasitämie) und dem Milzindex (Prozentsatz Erwachsener mit Milztumor als Zeichen einer chronischen Malaria). (Lang & Löscher, Winkle)

1.1.3. Bekämpfungs- und Schutzmaßnahmen

Da man schon früh die Malaria mit Sümpfen in Verbindung gebracht hatte, gab es immer wieder Projekte zur Trockenlegung von Sümpfen. Schon die Etrusker huben ein Netz von mannshohen, mehrere hundert Kilometer langen Gängen („Cuniculi“) aus, die der Drainage sumpfiger und Berieselung trockener Flächen sowie der Trinkwassergewinnung dienten. Die Römer bauten das Netz zunächst als Cloaca Maxima weiter aus, Kriege und die daraus folgende Vernachlässigung der Anlagen und der Landwirtschaft ließen die Gegend um Rom im Sommer unbewohnbar werden. Das gesamte Mittelalter hindurch bis in die Neuzeit war die Gegend um Rom malariaverseucht. Leonardo da Vinci unternahm unbewußt einen Versuch, die Malaria in Italien einzudämmen, als er Pläne zur wassertechnischen Regulierung des Arno und zur Trockenlegung der Pontinischen Sümpfe und des Chianatals ersann. Leider wurden sie nie in die Tat umgesetzt. (Winkle, Kulturgeschichte der Seuchen)

Nach Entdeckung des Krankheitserregers und des Überträgers versuchte man durch die Ausrottung der Vektoren Abhilfe zu schaffen. Zwischen1955 und 1969 versuchte die WHO in verschiedenen Ansätzen, die Malaria weltweit zu eradizieren. (Wellems & Plowe 2001) Eine Methode stellte der Einsatz von Insektiziden, hauptsächlich DDT, in der Angriffsphase dar, die auch große Erfolge erzielte. Italien, der Balkan, Spanien, Nordafrika, Gebiete in Süd- und Nordamerika, in Asien und der ehemaligen Sowjetunion wurden mittels DDT zeitweilig malariafrei. In einigen Gebieten, z.B. Indien erwies sich die Ausrottung als nicht dauerhaft oder vollständig, DDT-resistente Anophelesmücken entwickelten sich und reduzierten die Wirkung dieser Art von Bekämpfung. (Sharma *et al.* 1996) Auch in zwei Dritteln von Laos wurde 1960 DDT eingeführt, der Gebrauch aber bald wieder eingestellt. Krieg, gesundheitliche Bedenken und schwindende Effektivität verhinderten konstante Maßnahmen. (www.who.int/country/lao) Während Umweltverträge und Sponsoren von Malaria-Kontroll-Programmen mehrheitlich gegen den Gebrauch von DDT sind, sprechen sich mittlerweile wieder einige Studien für einen gezielten Gebrauch, vor allem im Haushalt in Kombination mit medikamentöser Prophylaxe aus. (Roberts *et al.* 1997, Smith 2000)

Eine andere Art des Schutzes stellt die Expositionsprophylaxe in Form von Moskitonetzen dar. Ganz neu ist die Erfindung nicht, schon im alten Ägypten schliefen beispielsweise die Fischer unter ihren Netzen, mit denen sie tagsüber zum Fischen gingen. Die Pharaofrau Hetep-teres besaß ein transportables Schlafzimmer, das mit feinen Leinentüchern lästige

Insekten fernhielt. Der Zusammenhang zwischen Fieber und Mücken wurde im allgemeinen aber noch nicht hergestellt. (Winkle, Kulturgeschichte der Seuchen)
Das konsequente Schlafen unter mit oder ohne Insektizide (Permethrin) imprägnierten Moskitonetzen trägt bedeutend zur Eindämmung von Malariaerkrankung bei, insbesondere Kinder profitieren in endemischen Gebieten davon. (Choi *et al.* 1995, Mutambu & Shiff 1997, Marchant *et al.* 2002, Takken 2002, Maxwell *et al.* 2002, Lengeler 2004) Leider schläft nur jedes 7. Kind in Afrika unter einem Netz, nur 2% insgesamt haben imprägnierte Bettnetze. (BMJ 2004) Auch in Laos wird die Benutzung von mit DDT oder anderen Insektiziden imprägnierten Bettnetzen untersucht und gefördert. Eine Senkung der Malariainfektionen konnte in Dörfern mit Bettnetzen verzeichnet werden. (Philavong *et al.* 2000, Kobayashi *et al.* 2004) Mit der Reduktion der Malariaerkrankungen im Kindesalter sinkt die Semi-Immunität und schwere Erkrankungen im Erwachsenenalter könnten zunehmen. Der entstehende Nachteil steht aber natürlich in keinem Verhältnis zur hohen Kindersterblichkeit in Endemiegebieten, wenn keine Schutzmaßnahmen getroffen werden.

Touristen wird zusätzlich das Auftragen von Repellents auf die unbekleidete Haut nach Einbruch der Dunkelheit empfohlen, für ständige Bewohner eines Endemiegebietes eignet sich diese Form der Prophylaxe nicht.

Es wird derzeit an genetisch manipulierten Mückenmännchen geforscht, zeugungsunfähige sollen natürliche zeugungsfähige Männchen in freier Wildbahn verdrängen, um so zu einem Aussterben der Anopheles-Arten zu führen. Dies könnte allerdings nur in abgegrenzten Gebieten wie Inseln zum Erfolg führen, weshalb an der Durchführbarkeit und Praktikabilität für die meisten Malariaregionen gezweifelt wird. (Suh *et al.* 2004)

Neben all diesen Maßnahmen stehen noch die Chemotherapeutika sowohl zur Prophylaxe als auch zur Therapie zur Verfügung. Sowohl Reisenden als auch Kindern unter 5 Jahren in Endemiegebieten wird eine regelmäßige Prophylaxe empfohlen. (Geerligs *et al.* 2004)
Ein großes Problem diesbezüglich stellt die zunehmende Resistenz der Plasmodien gegen viele dieser Medikamente dar.
Das älteste wirksame und auch heute noch in schweren Fällen gebräuchliche Medikament steht uns mit dem Chinin zur Verfügung. Es ranken sich allerlei Legenden um die Entdeckung des Heilmittels für Europa. In China ist diese Pflanze als Anti-Malaria-Mittel seit 3000 Jahren bekannt. Der erste Heilerfolg soll die Genesung der Gräfin del Chinchon, der Frau des

Vizekönigs von Peru, 1638 gewesen sein, nach der auch der Baum benannt wurde. Jedoch glaubt man heute eher, dass die Jesuiten die Wirkung der Chinarinde erkannten. Durch ihr Verkaufsmonopol gelangte das „Jesuitenpulver“ nach Europa und verbreitete sich dort schnell. Durch Heilungen bekannter Persönlichkeiten setzte sich das Mittel allmählich trotz vieler Kritiker aus protestantischem und galenischem Lager durch. Karl II von England und Ludwig der XIV, der Sonnenkönig, wurden beide vom bekannten Arzt Robert Talbot mit dem Wirkstoff der Chinarinde geheilt. Chinin wurde künftig zur Behandlung Millionen Kranken benutzt und half, auch schlimme Epidemien einzudämmen.
1820 gelang es den Apothekern Pelletier und Caventou, aus der Pflanze den Wirkstoff zu isolieren. (Winkle, Kulturgeschichte der Seuchen)
Das aus ihr gewonnene Chinin (Chininum Dihydrochloricum) ist ein Alkaloid, das heute wie oben erwähnt hauptsächlich bei schweren Fällen von Malaria eingesetzt wird. Es ist wegen seiner Nebenwirkungen weder zur Prophylaxe noch als Mittel der Wahl zur Therapie geeignet. Von Resistenzen wurde zwar schon seit 1910 berichtet, doch ist die Resistenzrate nicht vergleichbar mit denen anderer Medikamente. (Zalis *et al.* 1998, Jelinek *et al.* 2001)

Mittel der Wahl war lange Zeit, das von deutschen Forschern in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelte Chloroquin. Es gehört zur Gruppe der 4-Aminochinolone und kann sowohl zur Therapie als auch zur Prophylaxe verwendet werden (Resochin®). Als die WHO Pläne zur Ausrottung der Malaria entwarf und ab 1955 begann, diese in die Tat umzusetzen, stellte Chloroquin einen festen Bestandteil in der Bekämpfungsstrategie dar. 1961 wurden erstmals Therapieversager aufgrund von Resistenzen bei Chloroquinbehandlung beobachtet. Fast zeitgleich hatten sich resistente Plasmodien-Stämme in Südamerika und Südostasien entwickelt. Die Resistenzen nahmen von diesem Zeitpunkt an rasant zu. In vielen Gebieten wurde der Einsatz von Chloroquin nutzlos, neue Medikamente mußten für den alternativen Einsatz entwickelt oder mit Chloroquin kombiniert werden. (Suh *et al.* 2002)

Eines dieser Medikamente enthält den Wirkstoff Mefloquin und ist als Lariam® im Handel. Es ist in der Struktur dem Chinin ähnlich und wird sowohl zur Prophylaxe als auch zur Therapie verwendet. Bekannt geworden durch zahlreiche Nebenwirkungen hat es eine gewisse Vorsicht und Unbeliebtheit bei Touristen als Prophylaktikum hervorgerufen. In Afrika wird es noch immer sehr viel eingesetzt, währenddessen sich in Südostasien, speziell Thailand, Resistenzen entwickelt haben, die den Einsatz dort einschränken oder teilweise

nicht mehr befürworten. (Wernsdorfer 1994) Für Laos liegen noch nicht sehr viele Studien vor, bisher konnte von keinen Resistenzen berichtet werden. (Schwoebel *et al.* 2003)

Eine Alternative zu Mefloquin vor allem als Prophylaktikum bietet Malarone®, das aus einer Kombination von Atovaquon und Proguanil besteht. Der Wirkmechanismus entspricht keinem der bis dato bekannten Medikamente. Atovaquone hemmt den Elektronentransport in den parasitischen Mitochondrien, so dass die mitochondrialen Membranpotentiale des Parasiten kollabieren. Mit der recht hohen Heilungsrate von über 95 % und den geringeren Nebenwirkungen im Vergleich zu Mefloquin wurde ein gut wirksames Medikament zur Behandlung und Prophylaxe der Malaria auf den Markt gebracht. Allerdings haben sich auch gegen Atovaquon mittlerweile Resistenzen gebildet. (Vaidya & Mather 2000)

Weitere Medikamente zur Therapie stehen mit Halofantrin und Lumefantrin zur Verfügung. Primaquin wird hauptsächlich bei der Malaria tertiana zur Beseitigung der Hypnozyten eingesetzt. Doxycyclin aus der Gruppe der Tetracycline gilt als alternatives Stand by-Präparat bei Kurzaufenthalten, das jedoch für Kleinkinder und Schwangere kontraindiziert ist.
(Lüllmann & Mohr)

Immer mehr Studien beschäftigen sich mit Artemisin und seinen Derivaten, die in China entwickelt wurden und dort schon seit Jahrtausenden zum Einsatz kommen.
In Monotherapie entwickeln sie schnell Resistenzen, in Kombination mit anderen Medikamenten sind sie sehr effektiv, wie beispielsweise Coartemether aus Artemether und Lumefantrin. (Wernsdorfer 2004) Diese Kombination ist als Riamet® im Handel und seit kurzem auch in Deutschland zugelassen.
Die Kombination von Artesunat mit Mefloquin wird in Gebieten multiresistenter Erreger eingesetzt. In Thailand konnte sie zu einem Sensitivitätsanstieg von Mefloquin führen.
(Brockman *et al.* 2000, Wongsrichanalai *et al.* 2002)

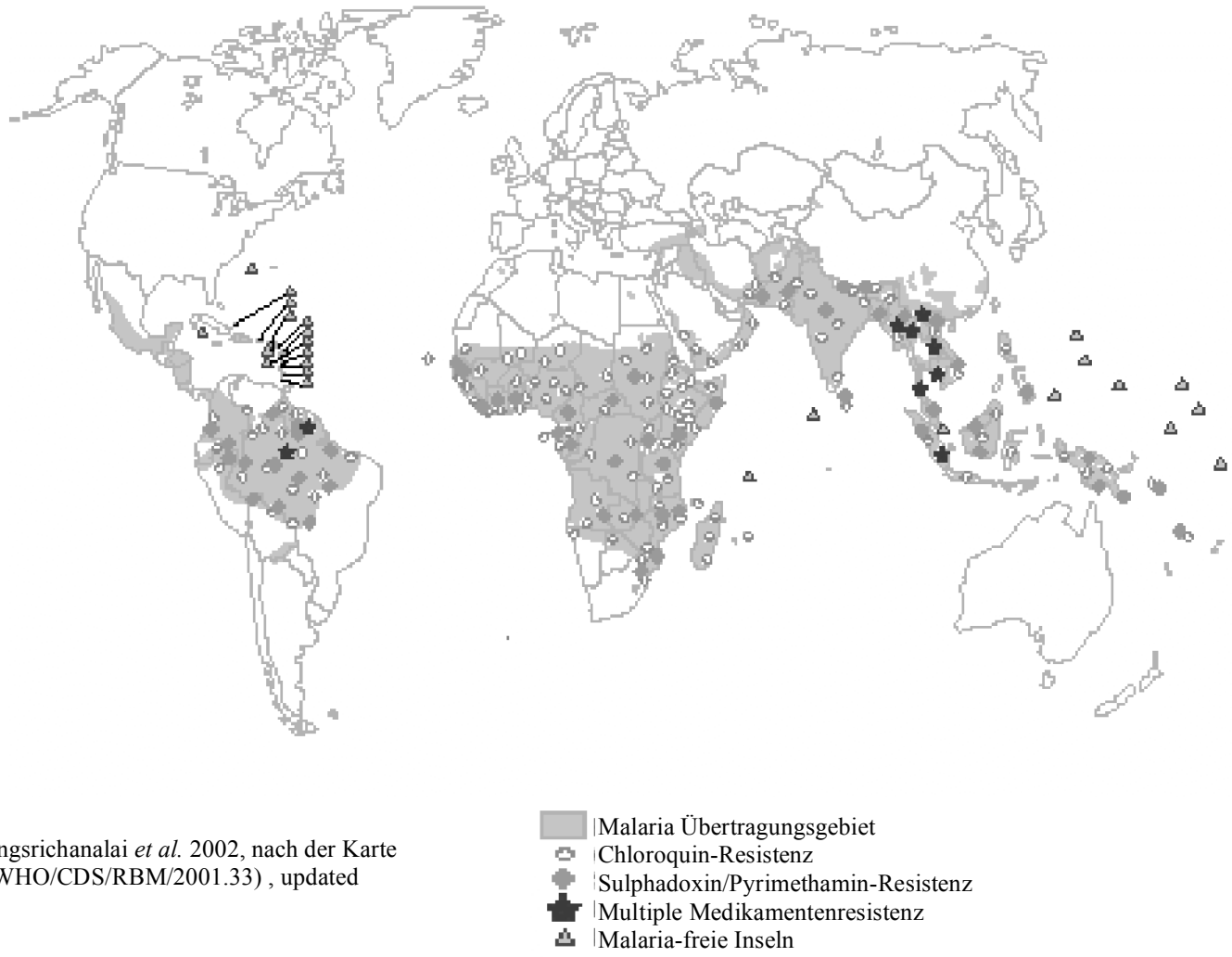
Die Kombination von Präparaten erfreut sich zunehmender Beliebtheit. Eine schon lange gebräuchliche stellt die aus Sulphonamiden und Antifolaten dar, die man vor allem in Südostasien und Afrika einsetzt. Auch in Laos wurde die bekannte Kombination aus Pyrimethamin und Sulphadoxin als Mittel der zweiten Wahl gehandelt, da sie neben ihrer Effektvität auch noch recht preisgünstig war. Sie ist im Handel als Fansidar®. Resistenzen sind allerdings auch gegen diese Kombination aufgetreten und nehmen weiter zu. Sie werden vor allem in Südostasien, Südamerika und Ostafrika beobachtet. Studien aus Laos deuten

ebenfalls auf eine zunehmende Resistenzentwicklung hin. (Wongsrichanalai *et al.* 2002, Schwöbel *et al.* 2001, Viengxay *et al.* 1997)

Der wohl dauerhafteste und nebenwirkungsärmste Schutz wäre mit einer Impfung gegeben. Doch trotz angestrengter Forschung weltweit konnten noch keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden. (Alonso *et al.* 1994, Fletcher 1998)

Daher ist der Gebrauch von Medikamenten sowohl in der Prophylaxe als auch nach eingetretener Infektion noch immer von enormer Bedeutung. Die Entwicklung von immer neuen Medikamenten oder die Kombination bekannter ist ein Wettlauf mit der Zeit. Bisher haben sich gegen jedes gefundene Mittel Resistenzen entwickeln können.
Da sowohl nicht immer die finanziellen Mittel in ärmeren Ländern zur Verfügung stehen, sich die allerneuesten Medikamente zu kaufen, als auch die Entwicklung von Resistenzen sehr schnell verläuft, ist die Kombination verschiedener Präparate eine Möglichkeit, die Effizienz zu verbessern und Therapieversager zu vermeiden.
Das Verständnis zum einen für den Wirkmechanismus der Medikamente und zum anderen für die Resistenzentwicklung der Plasmodien ist von essentieller Bedeutung für eine erfolgreiche therapeutische Strategie.

Abb. 2: **Weltkarte der Resistenz**



aus: Wongsrichanalai *et al.* 2002, nach der Karte 00344 (WHO/CDS/RBM/2001.33) , updated

1.1.4. Definition der Resistenz

Resistenz ist das Nichtansprechen eines Medikamentes entweder bei einem Patienten (in vivo-Resistenz) oder unter Laborbedingungen bei den Parasiten bzw. Krankheitserregern direkt (in vitro-Resistenz).

Die multiple Medikamenten-Resistenz war definiert als Resistenz gegen mehr als zwei Medikamente verschiedener Stoffklassen. (Wernsdorfer 1994), kürzlich wurde diese Definition in einer Studie auf drei Stoffklassen erweitert (Wongsrichanalai et al. 2002) Die ersten beiden Klassen sind im Allgemeinen die 4-Aminoquinoline und die Antifolate. Ein präzises Kriterium für den Verlust der Wirksamkeit ist bisher nicht eindeutig definiert worden, man hat sich aber auf eine Therapieversagerquote von über 25 % geeinigt.

1.2. Chloroquin

1.2.1. Resistenzentwicklung und -verbreitung

Nachdem man den Kampf gegen die Malaria auf verschiedene Weise aufgenommen und anfangs gute Erfolge erzielt hatte, war es ein großer Schlag, als plötzlich Resistenzen gegen das effektivste und günstigste Medikament, das Mittel der Wahl besonders in ärmeren Ländern, gemeldet wurden. Zu allem Unglück breiteten sich diese Resistenzen schnell aus und verlangten nach einer Änderung der Politik. Die ersten Resistenzen wurden schon 1957 aus Südostasien, an der thailändisch-kambodschanischen Grenze, gemeldet, nur ein paar Jahre nach den großen Eradikationsplänen der WHO. Das Medikament war massiv zur Therapie und Prophylaxe eingesetzt worden, beispielsweise mischte man es sogar in bestimmte Nahrungsmittel, so dass der Selektionsdruck auf die Plasmodien bis zu diesem ungewollten Maße anstieg. (Wernsdorfer & Payne 1991)

Unabhängig von Asien wurden in Kolumbien ein Jahr später ebenfalls chloroquin-resistente Stämme beobachtet, die sich von dort und einem zweiten Focus in Südamerika über den ganzen Kontinent ausbreiteten. Ein dritter Focus wird seit 1989 auf Papua Neuguinea angenommen. Verhältnismäßig spät wurde von Resistenzen in Afrika berichtet, die sich von Asien aus verbreitet hatten, 1979 wurden chloroquin-resistente Fälle aus Kenia und später Tansania gemeldet. (Kean *et al.* 1979, Wellems & Plowe 2001)

Die Resistenzen nahmen in den achtziger und neunziger Jahren dermaßen zu, dass es sinnvoll gewesen wäre, dieses Medikament als Mittel der Wahl durch ein effektiveres neues Mittel zu ersetzen. In fast allen Ländern mit endemischer Malaria, in denen Chloroquin eingesetzt wurde, gab es Berichte über Resistenzen gegenüber diesem Medikament. (WHO, 1997) Leider sind die neueren Alternativen wesentlich teurer als das Aminoquinolin, was dazu führte, dass in vielen Ländern am Chloroquin festgehalten wurde, obwohl dies mangelnde Effektivität bedeuten mußte.

Auch das Gesundheitsprogramm in Laos schrieb noch zur Zeit dieser Studie Chloroquin als Mittel der Wahl vor. Die Ergebnisse dieser und anderer Studien zeigten deutlich, dass dies nicht mehr zu verantworten ist. Therapieversager in 40–60 % der Fälle bei Chloroquin-behandlung zwingen zu einem Überdenken der medikamentösen Strategie. (Guthmann *et al.* 2002, Schwöbel *et al.* 2003)

1.2.2. Wirkungsweise

Chloroquin (7-chloro-4-(4-diethylamino-1-methylbutylamino)chinolin), 1934 in Deutschland entwickelt, wurde gegen Ende des Zweiten Weltkrieges aufgrund seiner guten Wirksamkeit, Sicherheit und Stabilität das Mittel der Wahl sowohl zur Prophylaxe als auch zur Behandlung der akuten Infektion.

Obwohl seit der Entstehung dieses Medikamentes daran geforscht wurde, seinen Wirkmechanismus zu verstehen, ist es bis heute nicht gelungen, eine vollständige Erklärung zu bieten. In der Hoffnung besser wirksame Antimalaria-Mittel zu entdecken, wurden viele Analoga zu Chloroquin synthetisiert. Bei Testungen fand sich allerdings kein Aminoquinolon mit einer besseren Wirksamkeit. Auch wenn Chloroquin mit seinen Analoga gemeinsame Eigenschaften in der Struktur und Verhaltensweise gegenüber den Parasiten besitzt, bewirken diese Veränderungen in der Struktur und Position der Substituenten eine unterschiedliche antiparasitäre Aktivität. (Hawley *et al.* 1996 ; Ridley *et al.* 1998)

Nach der Entwicklung und Verbreitung der Resistenz gegen Chloroquin wurde erneut fieberhaft nach einem Ersatzmittel gesucht. Nun war es um so wichtiger, Wirkmechanismen zu verstehen, um Resistenz erklären und nicht-resistente Alternativen entwickeln zu können.

Es existieren mehrere Hypothesen zu diesem Thema, die wichtigsten sollen hier erläutert werden.

Der parasitäre Metabolismus

Um mögliche Wirkprinzipien erläutern zu können, muß auch auf den parasitären Stoffwechsel im Menschen eingegangen werden.

Als Parasiten leben sie auf Kosten des Wirtes. Proteine und Lipide werden aus der Umgebung oder durch Verdau von Wirtsproteinen, Energie mittels Glykolyse aus Wirtsglukose zu Laktat gewonnen, was beim Patienten zu einer Laktatazidose führen kann. Für die 4-Aminoquinolone hat sich die Proteolyse, speziell der Hämoglobinverdau als von entscheidender Bedeutung erwiesen. Die Plasmodien besitzen verschiedene Möglichkeiten, Aminosäuren für die Proteinsynthese zu gewinnen. Zum einen synthetisieren sie de novo, zum anderen nehmen sie freie Aminosäuren aus Plasma oder Zellen des Wirtes auf. Den weit aus größten Teil in der Aminosäuregewinnung nimmt aber der Abbau des verdauten Wirtshämoglobins ein. (Francis *et al.* 1997, Lang & Löscher)

Die Plasmodien verdauen bis zu 80 % des Hämoglobins der Wirtszelle. (Dorn *et al.* 1995)

Der Hämoglobinkatabolismus hat seine größte Entfaltung im wachsenden Trophozoiten. Im Stadium der reifen Trophozoiten und frühen Schizonten wird der Abbau eingestellt, um im Ringstadium wieder aufgenommen zu werden. (Orjih *et al.* 1994).
Das Hämoglobin gelangt mittels Endozytose in die Nahrungsvakuole des Parasiten und wird dort unter Einwirkung verschiedener Enzyme verdaut. Es wird angenommen, dass diese Verdauungsproteine zuvor vom Parasiten in Zytosol und Membranen der Wirtszelle sowie zur parasitären Membran ex- und transportiert werden, um zusammen mit dem Hämoglobin in die Lysosomen des Parasiten aufgenommen zu werden. (Deitsch & Wellems 1996 ; Sullivan *et al.* 1996a)
Die Ingestion wird mittels sogenanntem Zytostom bewerkstelligt. Dieses Vesikel stellt eine doppelmembranöse Einstülpung (Invagination) der parasitären Membranen dar, das nach Hämoglobinaufnahme und Lösung von den Membranen zur Nahrungsvakuole wandert und mit ihr fusioniert. (Gratzer & Dluzewski 1993 ; Goldberg 1993)

Aus dem Globin-Anteil entstehen über Plasmepsin I, einen Peptid-Transporter, und Peptidasen die erwünschten Aminosäuren, Produkt aus dem Häm-Anteil ist Ferriprotoporphyrin IX (Hämatin). (Gluzman *et al.* 1994) Letzteres stellt eine toxische Substanz dar, die vom Parasiten beseitigt werden muß. Dies geschieht durch Polymerisation in Hämozoin oder beta-Hämatin und durch Abbau von freiem FPIX mittels reduziertem Gluthathion (GSH). (Atamna & Ginsburg 1995; Ginsburg *et al.* 1998)
Hämozoin, das mikrokristalline Malariapigment, besteht aus einem Häm-Polymer verbunden mit einem zentralen Eisen-Ion eines Häm-Moleküls und einer carboxylierten Seitengruppe Sauerstoff eines anderen Häm-Moleküls. Das Hämatin wird über diese Verbindung in ein unlösliches Produkt überführt. (Slater *et al.* 1991).

Über das Zustandekommen der Polymerisation wurde schon viel diskutiert. Slater und Kollegen behaupteten 1993, dass eine Häm-Polymerase für diesen Vorgang verantwortlich sei. (Slater *et al.* 1993) Als mögliche Kandidaten sind *in vitro* Histidin-reiche Proteine, speziell das Histidin-reiche Potein II (HRPII) vorgeschlagen worden. (Sullivan *et al.* 1996b ; Papalexis *et al.* 2001) Andererseits konnten Zellinien aus dem Labor mit einem natürlichen Mangel an HRPII und HRPIII immer noch Hämozoin produzieren. (Sullivan *et al.* 1996b)
Dorn und Kollegen präsentierten 1995 eine Studie, in der sie aufzeigten, daß die Polymerisation einen rein chemischen Prozeß darstellen würde, der ohne Enzymvermittlung

vonstatten ginge und nur von der Präsenz des Ausgangsproduktes abhängig wäre. Diese Ansicht wird mittlerweile mehrheitlich vertreten. (Dorn *et al.* 1995)
Vorstellbar ist auch, dass die HRPs als Keimbildner des Kristallisationsvorgangs dienen. (Sullivan et al. 1996b) Lipide könnten bei diesem Prozeß ebenfalls eine Rolle spielen. (Bendrat et al. 1995) Eine einmal begonnene Kristallisation könnte dann ohne weitere Proteine vonstatten gehen. (Dorn et al. 1995, Egan et al. 1994)

Chloroquin-Wirkung

Wo und wie wirkt nun das Chloroquin auf den Metabolismus der Plasmodien?
Schon 1947 wurden morphologische Degenerationen von Blutschizonten, Trophozoiten und jungen Gametozyten nach dem Kontakt mit Chloroquin beschrieben. (Fairley 1947)
1978 konnte dann eine Schädigung der parasitären Lysosomen nach 4-Aminoquinolon-Kontakt nachgewiesen werden. (Langreth *et al.* 1978)
Picot und Kollegen berichteten ebenfalls 1997 über die Fragmentation des Erbguts mit nachfolgender Apoptose der Parasiten nach Chloroquingabe. (Picot *et al.* 1997)

Ein Stück weiter führte eine Studie von Sinden. Er beobachtete, dass Gametozyten sich während ihrer Reifung von Hämoglobin ernähren, was sie für Chloroquin angreifbar macht. Reife hämoglobin-unabhängige Gametozyten hingegen besitzen keine Chloroquin-Sensitivität. (Sinden *et al.* 1982)
Zhang und Kollegen untersuchten 1986 alle Entwicklungsstadien der Plasmodien unter Chloroquin-Einfluß. Die Merozoiten waren durch das Medikament gar nicht zu beeinflussen, das Ringstadium stellte sich als besonders sensitive Phase heraus. Trophozoiten benötigten die 6-fache Hemmkonzentration. Die Transformation von Ringen in Trophozoiten konnte mittels Chloroquin verhindert werden, jedoch nicht die von Trophozoiten in Schizonten und Schizonten in neue Ringe. (Zhang *et al.* 1986)

Die Studie von Orjih und Kollegen bestätigte 1994 diese Beobachtung. Sobald der Hämoglobinkatabolismus stadiengemäß abgeschaltet wurde, waren die Parasiten resistent gegen die morphologischen Veränderungen wie Membranschäden durch Chloroquin. Außerdem demonstrierten sie in im Ring-Stadium befindlichen Plasmodien einen distalen Block im Hämoglobin-Abbauprozeß. Unter Chloroquin sammelten sich in den Parasiten Hämoglobin-gefüllte Vesikel und die Umwandlung von Ferriprotoporphyrin IX (FPIX) in Hämozoin sank um das 18-fache. Dies wurde als hochgradige Blockade der Polymerisation

von FPIX zu Hämozoin gewertet. FPIX und FPIX-Chloroquin-Komplexe würden dadurch akkumulieren und ihre schädigende Wirkung entfalten.
Andere Studien zeigten ebenfalls eine Anreicherung nicht vollständig verdauten Hämoglobins in den Lysosomen, wenn die Plasmodien mit Chloroquin in Berührung gekommen waren.
(Zhang *et al.* 1987, Sullivan *et al.* 1996, Wellems & Plowe 2001)

Einig ist man sich also, dass die Zielstrukturen von Chloroquin mit dem Hämoglobin-Abbau in Verbindung stehen. Das Medikament verursacht morphologische Veränderungen sowie Akkumulation von Hämoglobin und FP in endozytotischen Vesikeln. (Fitch 2004)
Endozytose und Vesikel-Vakuolen-Fusion werden ebenfalls zunehmend gehemmt. (Hoppe *et al.* 2004)
Auch die Rolle des toxischen Ferriprotoporphyrins IX als Hauptverantwortlichen für das Parasitensterben ist allgemein akzeptiert.
Das Bindungsverhalten von Ferriprotoporphyrin IX wurde auch schon genauer untersucht. Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase von Plasmodium falciparum
(PfGAP-DH) und weitere glykolytische Enzyme sowie 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase und etliche andere Enzyme wie Pf-Gluthation-Reduktase werden von FPIX gebunden und damit in ihrer Aktivität gehemmt. Speziell PfGAP-DH im Vergleich zum humanen Gegenstück reagiert empfindlich auf FPIX und führt so zu einer Hemmung der parasitären Glykolyse. (Campanale *et al.* 2003) Die Inhibition von 6-Phosphoglukonat-DH könnte eine Reduktion der Aktivität des Hexose-Monophosphat-Shunts durch Chloroquin erklären.
(Famin & Ginsburg 2003) Die Hemmung dieser beiden Prozesse würde sich katastrophal für den Parasiten auswirken und eine Erklärung für sein schnelles Absterben darstellen.

Auf welche Weise Chloroquin zu seinen bekannten Folgen führt, wurde allerdings lange und viel diskutiert.
Sherman und Kollegen sprachen sich für eine chloroquin-abhängige Hemmung der Proteinsynthese aus. (Sherman *et al.* 1979) Ebenso könnte das Medikament Enzyme der Vakuole blockieren und so zu einem Absterben führen. Verschiedene parasitäre Enzyme wurden vorgeschlagen, z.B. eine Phospholipase (Ginsburg & Geary 1987) und eine Proteinase (Vander Jagt *et al.* 1987).
Vor allem Vertreter der Häm-Polymerase-Hypothese sahen den Angriffsort von Chloroquin dort. Die Hemmung der Polymerase sollte dann schließlich zur Akkumulation von freiem FP mit oben angeführten Konsequenzen führen. (Slater *et al.* 1993)

In einem Versuch von Akompong und Kollegen 2002 zeigten Plasmodien mit transformiertem funktionell reduziertem Histidin-reichen Protein II, einem Polymerase-Kandidaten, eine Reduktion der Hämozoin-Produktion und einen verminderten Transport von Vakuolenenzymen sowie HRPII in die Nahrungsvakuole. Sie schrieben daher HRPII regulatorische Eigenschaften bei den parasitären Verdauungsprozessen und einen gewissen Einfluß auf die Hämozoin-Synthese im Lysosomen zu. (Akompong *et al.* 2002)

Eine andere heute favorisierte Variante geht von der direkten Bildung eines Komplexes zwischen Chloroquin und nicht-dimerisiertem Ferriprotoporphyrin aus.
Die Komplexbildung würde zu einer verspäteten Entgiftung sowie Akkumulation des FPIX mit oben genannten Folgen führen. (Orjih *et al.* 1981 ; Bray *et al.* 1998)
Wie oben erwähnt hatten Dorn und Kollegen bereits 1995 die Polymerisation als enzym-unabhängigen Prozeß erklärt.
Schon 1967 wurde FPIX als Chloroquin-Rezeptor vorgeschlagen (Macomber *et al.* 1967) und später identifiziert (Chou *et al.* 1980). Auch Fitch sprach sich für eine direkte Bildung eines Komplexes zwischen Chloroquin und Hämatin aus. (Fitch *et al.* 1983, 1989)

Sullivan und Kollegen untersuchten 1998 Parasiten nach Gabe von Chloroquin und Chinin. Elektronenmikroskopisch konnte die Verbindung von Chloroquin mit Hämozoin nachgewiesen werden. Sie stellten ein Modell auf, nachdem der Chloroquin-Häm-Komplex in das wachsende Polymer eingebaut wird und damit das weitere Wachstum beendet.
Eine weitere Studie mit verschiedenen Quinolinen unterstützte diese Hypothese, indem gezeigt wurde, dass die Verbindung zwischen Quinolin-Häm-Komplex mit Häm-Polymer spezifisch, sättigbar und mit hoher Affinität zustande kam. Die verschiedenen Quinolin-Analoga konkurrierten um die Bindungsstellen. Die relative Bindungsaffinität von Quinolin zum Häm-Polymer im Vergleich zu freiem Häm korrelierte mit der Unterbrechung der Häm-Polymerisation. (Sullivan *et al.* 1998)

Freies FPIX wird wie oben erwähnt bis zu einem gewissen Grad durch reduziertes Gluthathion (GSH) abgebaut. Dieser Prozeß wird ebenfalls von Chloroquin und auch Amodiaquin inhibiert, Chinin und Mefloquin greifen dort nicht ein. (Deharo *et al.*
2003) Dies könnte direkt durch Chloroquin oder indirekt über die Bildung von FPIX und dessen inhibitorische Fähigkeiten verursacht sein.

Eine Interaktion von Phospholipiden mit Chloroquin bzw. dem Häm-Chloroquin-Komplex wird neuerdings ebenfalls diskutiert. (Fitch *et al.* 2004) Eine Ausschleusung des Komplexes aus der Nahrungsvakuole mittels Lipiden ins Zytosol wurde erwogen. Die verminderte Konzentration an Komplexen im Zytosol und der höhere pH-Wert würden eine Polymerisation sehr unwahrscheinlich werden lassen, so dass der Komplex dann mit verschiedenen zellulären Strukturen reagieren könnte. (Bray *et al.* 1998)

Chloroquin-Wirkort

Eine anderes nicht weniger wichtiges Thema behandelt die Frage, wie Chloroquin überhaupt in die parasitären Lysosomen gelangt. Es wirkt sehr spezifisch und reichert sich in den Nahrungsvakuolen stark an. Mehrere hundertfach gesteigerte Werte lassen sich für infizierte Erythrozyten im Vergleich zu nicht-infizierten nachweisen. (Fitch 1969 ; Ferrari & Cutler 1990)

Für die Aufnahme in die menschlichen Erythrozyten scheinen Interaktionen mit Hydrogen-Bindungsgruppen innerhalb der Membran wichtig zu sein. Die Permeabilität von unionisiertem Chloroquin gegenüber Hydroxychloroquin ist um das 50-fache gesteigert, die Transportenergie jedoch fast identisch. (Ferrari & Cutler 1991)

Die Aufnahme von Chloroquin in das Zytosol und die Nahrungsvakuole des Parasiten könnte durch Diffusion oder einen von Energie ab- oder unabhängigen Transportmechanismus geregelt sein. Vieles spricht für die passive Diffusion von Chloroquin über einen Gradienten vom Zytosol in die sauren Lysosomen. In diesen herrscht ein pH von 5,0-5,2, in den Zellorganellen dagegen ein pH von 6,9-7,4.

Homewood und Kollegen bekräftigten 1972, dass Chloroquin als schwache Basen bei niedrigem pH fast nur protoniert vorliegt. Im neutralen bis alkalischen Milieu verschiebt sich das Verhältnis hin zur dibasischen Form. Beim pH-Wert von ungefähr 5 stehen dibasische zu protonierter Form im Verhältnis $1:10^8$, bei einem pH-Wert 7 im Verhältnis $1:10^4$. Dieser geringe Anteil von 0,01% bleibt also im neutralen Milieu des Zytosols stets unprotoniert (Ferrari & Cutler 1990). In dieser Form ist die Substanz membrangängig und vermag, in das Lysosom einzudringen. Hier findet sofort eine Protonierung mit einer Verschiebung des Dissoziationsgleichgewichts zur diprotonierten Form statt. Diese kann das apolare Innere der Phospholipidmembran passiv nicht überwinden und reichert sich durch kontinuierliche passive Diffusion der basischen Form in den Lysosomen an. Die Protonierung verhindert also die Rückdiffusion (Homewood *et al.* 1972, Lüllmann & Mohr)

Für die pH-abhängige Diffusion von Chloroquin sprechen auch die Ergebnisse der Studie von Yahon und Kollegen. (Yahon *et al.*1984). Eine Erniedrigung des pH-Wertes außerhalb der Lysosomen oder eine Erhöhung des pH-Wertes innerhalb mit NHCl reduzierte die Chloroquin-Aufnahme reversibel.
Ergänzend zeigten Krogstad und Kollegen 1985, dass Chloroquin als schwache Base den pH-Wert der parasitären Nahrungsvakuolen erhöht, da die Protonierung des Chloroquins zu einem Verbrauch von Wasserstoffionen und damit zu einer Alkalisierung des Milieus führt. (Krogstad *et al.* 1985)

Kinetik und Aufnahmevolumina sprachen gegen die Vermutung einer reinen Diffusion durch die Plasmamembran ins Zytosol.
1985 wurde ein ATP-betriebener parasitärer Na^+/H^+-Austauscher in der Plasmamembran entdeckt (Yayon *et al.* 1985) und vorgeschlagen, dass die Chloroquin-Aufnahme und –Sättigung hauptsächlich von der Protonen-Titration bestimmt sein sollte. (Ginsburg & Geary 1987 ; Ginsburg & Stein 1991).
Spätere kinetische Untersuchungen der Sättigung der Chloroquin-Aufnahme sprachen ebenfalls für einen Carrier-vermittelten Transport. Basierend auf der Möglichkeit von 5-(N-ethyl-N-isopropyl-)Amilorid, einem spezifischen Inhibitor des Na^+/H^+-Antiports, die Chloroquin-Aufnahme kompetitiv zu hemmen, wurde vorgeschlagen, dass Chloroquin direkt vom parasitären Na^+/H^+-Austauscher (Na/H exchanger: NHE) in die Parasiten transportiert würde - anstelle von Natrium und im Austausch mit Protonen. Ein von Plasmodium falciparum codiertes Protein sollte den Chloroquin-Import ermöglichen. Die Aufnahme von Chloroquin wurde als temperatur-abhängiger, sättig- und hemmbarer Prozeß beschrieben. (Sanchez *et al.* 1997)
Später wurde diese Hypothese modifiziert und ein Transport über die Protonenpumpe über selbst-stimulierten Natrium-Protonen-Austausch vorgeschlagen. Jeweils 2 Natrium-Ionen würden gegen ein Wasserstoff-Ion ausgetauscht. Solche Transporter sind auch in Epithelialzellen Wirbelloser gefunden worden. Dieses Protein wäre analog zum vertebralen amilorid-sensitiven elektroneutralen NHE , würde aber wesentlich mehr Transportfunktionen aufgrund seiner elektroneutralen Natur erfüllen. (Ahearn *et al.* 1996) Dieser NHE sollte nun diprotoniertes Chloroquin anstelle von Natrium transportieren, allerdings müßten ~ 500 Protonen pro Chloroquin-Molekül ausgeschleust werden. Nach Erreichen eines Gleichgewichts würde die Chloroquin-Aufnahme stagnieren, die Sättigung wäre erreicht. (Wünsch *et al.* 1998)

In Studien von Bray und Kollegen wurde allerdings gezeigt, daß Chloroquin weder direkt noch aktiv gegen Natrium ausgetauscht wird. Die sättigbare Aufnahme war dort einzig von der Bindung Chloroquins zu Hämatin abhängig. Natrium spielte bei der Aufnahme Chloroquins keine bedeutende Rolle. In Natrium-freien Milieu wurde die Chloroquin-Aufnahme keinesfalls eingestellt und auch keine Änderung der Fähigkeit Amilorids, die Aufnahme zu hemmen, beobachtet. (Bray *et al.* 1999)

Eine andere Studie sprach sich sogar gegen einen NHE als pH-Wert-Regulator aus. In Natrium-freien Milieu war der Parasit fähig, seinen pH-Wert konstant zu halten und sich von einer intrazellulären Azidifizierung/Ansäuerung zu erholen. Beide Prozesse waren ATP-abhängig. Amilorid verursachte eine Reduktion des pH-Wertes, wohingegen EMD 96785, eine potenter und angeblich selektiver Inhibitor von NHE, geringen Effekt ausübte. Ein Absinken des pH-Werte wurde allerdings auch von Bafilomycin A1, einem potenten Inhibitor der V-Typ H-ATPase, erzeugt. Es verhinderte ebenso die Erholung nach Azidifizierung. Diese Ergebnisse sprechen für eine V-Typ H-ATPase in der Plasmamembran der Plasmodien, die den Efflux von Protonen steuert. (Saliba & Kirk 1999)

Die Sättigbarkeit des Chloroquin-Häm-Komplexes wurde auch von Sullivan und Kollegen 1998 bestätigt. (s.o.) Es wurde zudem angenommen, dass nur der sättigbare Anteil an Chloroquin für die Medikamenten-Aktivität von Bedeutung ist, was auch schon in einer früheren Studie vorgeschlagen worden war. (Fitch 1979, Bray *et al.* 1998; Bray *et al.* 1999)
Es existiert eine nicht-sättigbare Chloroquin-Komponente, die der schwachen Bindungsaffinität Chloroquins an zahlreiche zytosolische Proteine zugesprochen wird.
(Menting *et al.* 1997, Dorn *et al.* 1998)

Wie das Chloroquin nun erst die Plasma- und dann die Vakuolenmembran überwindet, ist noch immer nicht aufgeklärt. Eine aktiver Transport ins Zytosol und pH-abhängige Diffusion in die Vakuole ? FPIX abhängige Diffusion in Zytosol und Vakuole ?
Soweit zu diesem kontroversen Thema, das im Kapitel über den Resistenzmechanismus weitergeführt wird.

1.2.3. Molekulargenetik der Resistenz

Die Kontroversen den Wirkmechanismus von Chloroquin betreffend erschweren natürlich das Verstehen der Resistenzentwicklung.

Man muß annehmen, dass bei Resistenz die gewohnte Interaktion mit seinen Zielstrukturen für Chloroquin nicht mehr möglich ist. Dieser Veränderung könnten viele verschiedene Ursachen zugrunde liegen. Die Idee einer molekularen Veränderung oder Blockade der Zielstrukturen von Chloroquin wäre denkbar, die zu einer Hemmung der erwarteten Reaktionskette oder einer verminderten Bindungsaffinität von Chloroquin an seine Zielstruktur führt. Die Störung des Chloroquin-Hämatin-Komplexes spielt bei dieser Überlegung eine zentrale Rolle.

Eine andere Überlegung setzt an einem veränderten Transport Chloroquins zu oder von den Zielstrukturen weg an. Verminderte Aufnahme, erhöhte Ausfuhr oder eine veränderte intrazelluläre Verteilung könnten zu einem Wirkverlust von Chloroquin führen.

Ein Abbau der Substanz findet nicht statt. (Fitch 1969)

Schon 1969 wurde von Fitch beobachtet, dass Chloroquin-sensitive Parasiten das sechsfache (Zelle : Medium: 600 : 1) an Medikamentenmenge ansammelten im Vergleich zu resistenten Artgenossen (100 : 1). Er folgerte daraus eine Defizit der resistenten Zelle, Chloroquin mit hoher Affinität zu binden, und schlug eine Abnahme der Anzahl, der Affinität oder Erreichbarkeit von Rezeptoren bzw. Bindungsstellen für Chloroquin vor. (Fitch 1969)

Die Beobachtung, dass resistente Zellen weniger Chloroquin als sensitive Zellen anreichern, wurde mehrfach bestätigt. (Ginsburg & Stein 1991 ; Bray *et al.* 1992, 1994, 1996 ; Martiney *et al.* 1995 ; Sanchez *et al.* 1997 ; Wünsch *et al.* 1998)

Wäre nun beispielsweise ein mit Hämatin reagierendes und für die Entstehung des Chloroquin-Hämatin-Komplexes notwendiges Molekül, etwa ein Protein, in seiner Struktur verändert, könnte dies zu einer verminderten Entstehung der Komplexe führen. Dies wiederum hätte einen vermehrten Abbau toxischen Hämatins zu Hämozoin und damit eine bessere Situation des Parasiten zur Folge.

Wie oben erwähnt zeigten Plasmodien mit transformiertem funktionell reduziertem Histidin-reichen Protein II eine Reduktion der Hämozoin-Produktion, einen verminderten Transport von Vakuolenenzymen in die Nahrungsvakuole und zudem eine verminderte Sensitivität von 30% gegenüber Chloroquin. Diese könnte mit einem Mangel an Keimbildnern des Polymerisationsprozesses erklärt werden. (Akompong *et al.* 2002)

Eine ausreichende Erklärung der Resistenz bietet diese Studie freilich nicht.
Eine andere Hypothese wurde beim Studium des Bindungs- und Sättigungsverhalten von Chloroquin aufgestellt. Ein Resistenzmechanismus, der spezifisch die Bindung zwischen Chloroquin und Hämatin in der Nahrungsvakuole verhindert, die Erreichbarkeit erschwert, wurde vermutet. Sowohl in resistenten wie in sensitiven Isolaten wurde eine gleiche Anzahl an Bindungsstellen gefunden, die Affinität der Bindung korrelierte allerdings mit der Medikamentenwirksamkeit.(Bray *et al.* 1998, Raynes *et al.* 1999)
Interessanterweise läßt sich die Resistenz gegen Chloroquin durch relativ einfache Modifikationen in der Basis der 4-Aminoquinolin-Struktur rückgängig machen.
(Hawley *et al.* 1996 ; De *et al.* 1998) Dies spricht für eine spezifische Hemmung.

Ein anderer Ansatz besteht in der Annahme einer Erniedrigung der Chloroquin-Konzentration in der Nähe der Reaktionspartner, ohne Veränderung von Affinität oder Vulnerabilität der Zielstrukturen. Vorstellbar ist eine verminderte Aufnahme von Chloroquin.
Dies könnte an einer Membranpermeabilitätsstörung oder einer Änderung eines Transporters oder einer Permease liegen, die sich an der Erythrozyten-, Parasitenzytosol- oder Vakuolenmembran befindet. (Ferrari & Cutler 1991, Warhurst 1996, Ridley *et al.* 1998)
Simulationen zeigten, dass die Aufnahme von Chloroquin in chloroquin-sensitive Zellen wesentlicher höher ausfiel, als man Diffusion voraussetzend erwarten durfte. Resistente Stämme hingegen nahmen die errechnete Menge an Medikament auf.
Daraus wurde geschlossen, dass ein Medikamenten-Importeur oder Transporter für Chloroquin in sensitive Zellen existiert, welcher in resistenten abwesend ist. Der Resistenzmechanismus stellt sich als ein Ausschalten des Transporters zum Schutz der Zelle dar. (Ferrari & Cutler 1991)
Hier kommt der oben erwähnt NHE wieder zur Sprache. Sanchez und Kollegen vermuteten eine Chloroquin-Einschleusung mittels NHE. Zwar sprachen sie sowohl resistenten wie sensitiven Isolaten einen erleichterten Chloroquin-Aufnahme zu, wiesen aber auf die unterschiedliche Kinetik hin. Chloroquin-resistente Parasiten zeigten einen Transportmechanismus von geringerer Aktivität sowie verminderter Affinität für Chloroquin.
Diese kinetischen Änderungen würden ein notwendiges Ereignis zur Erlangung der Resistenz darstellen. (Sanchez *et al.* 1997)

Eine andere Erklärung für die reduzierte Aufnahme könnte in der Änderung des pH-Wertes verschiedener Kompartimente liegen. So könnte eine Erhöhung des Vakuolen-pH-Wertes bzw. eine Erniedrigung des Parasitenzytosol-pH-Wertes zu einer reduzierten Diffusion von Chloroquin in die Nahrungsvakuole führen. (Yahon *et al.* 1984)
Als Resistenzmechanismus wurde nun eine geschwächte Protonenpumpe der Nahrungsvakuole vorgeschlagen. (Ginsburg & Stein 1991)
Der pH-Wert der Vakuole müßte in resistenten Isolaten höher als in sensitiven sein. Dies konnte von Krogstad und Kollegen nicht bestätigt werden. (Krogstad *et al.*1985;
Krogstad *et al.* 1992)
Eine andere Arbeitsgruppe konnte dafür beobachten, daß chloroquin-resistente Parasiten beständig einen erhöhten zytoplasmatischen pH im Vergleich zu dem chloroquin-sensitiver Zellen besaßen. (Wünsch *et al.* 1998)

Ein ganz anderer Ansatz geht von der Vorstellung von einem aktivem Efflux von Chloroquin aus dem Lysosom aus. Hierzu würde der Parasit einen Transportmechanismus gebrauchen, diese nur in resistenten Parasiten vorhandene Effluxpumpe könnte Chloroquin unter Energieverbrauch aus seinem Wirkungskreis heraustransportieren.
Dieser Effluxmechanismus ist ein aus der Onkologie bekanntes Phänomen.
Manche Tumorzellen haben die Fähigkeit entwickelt, sich Zytostatika mittels Effluxpumpe zu entledigen und so keinen Schaden zu nehmen. Einmal erworben, schleust dieser Transporter auch Medikamente heraus, mit denen die Zelle noch nie zuvor Kontakt hatte. Die Resistenz wird durch die Amplifikation eines (multi-drug-resistance) mdr-Gens erklärt. (Riordan *et al.* 1985)
Dieses codiert für ein sogenanntes P-Glycoprotein, das als aktiver Transporter toxische Substanzen aus der Zelle schleust. Der Efflux wird mittels ATP betrieben und ist bis zu 50-fach gegenüber der sensitiven Zelle gesteigert. (Endicott & Ling 1989 ; Krogstad *et al.* 1987)
Man fand heraus, dass Verapamil, ein Calcium-Kanal-Blocker, die entwickelte Resistenz komplett aufheben konnte. Es wurde ein kompetitiver Hemmechanismus vermutet. (Cano-Gauci & Riordan 1987)

Aufgrund dieser Erkenntnis testete man in vitro, ob diese Wirkung auch bei resistenten Plasmodien zu beobachten war. Verapamil war tatsächlich in der Lage, in der gleichen Dosierung Chloroquin-Resistenz aufzuheben, die bei Kulturen von neoplastischen mdr-Zellen

benötigt wird. Die gleiche Dosis Verapamil hatte keinerlei Effekt auf chloroquin-sensitive Parasiten. (Martin *et al.* 1987)

Nach Gabe von Verapamil konnten auch Jacobs und Kollegen ultrastrukturelle morphologische Veränderungen an Zellkernen, Mitochondrien und anderen Zellorganellen beobachten, typische Zeichen der Einwirkung von Chloroquin. (Jacobs *et al.* 1998)

Dieser Effekt wurde ebenso mit Vinblastin, Daunomycin, Chlorpromazin, Desipramin, Diltiazem und Galopamil erreicht. (Krogstad *et al.* 1987 ; Bray & Ward 1998)

Die Wirkung von Verapamil könnte durch eine Bindung an das P-Glycoprotein und die Verhinderung des Efflux erklärt werden. (Cowman & Karcz 1991)

Sanchez und Kollegen schlugen als Erklärung für die Reversibilität der CQR mittels Verapamil eine Modulation der Aktivität des NHE vor. Dies sollte calcium/calmodulin-abhängig reguliert werden. (Sanchez *et al.*)

Daunomycin als Modulator des parasitären Chloroquin-Transports erhöhte in einer anderen Studie signifikant die Akkumulation von Chloroquin in chloroquin-resistenten und – zu einem geringeren Grad – in chloroquin-sensitiven Isolaten. Daraus folgerten Bray und Kollegen zuerst, dass Resistenz gegen 4-Aminoquinoline mit einer reduzierten Permeabilität der Parasiten assoziiert ist. (Bray *et al.* 1996) Eine pH-Erhöhung aufgrund dieser Substanz und daraus folgender Erhöhung der Affinität Chloroquins zu FPIX wurde später in Erwägung gezogen. (Bray *et al.* 1999)

Der Efflux von Chloroquin als alleiniger Resistenzmechanismus wurde seitdem immer wieder kontrovers diskutiert. Bray und Kollegen sprachen sich in mehreren Studien gegen dieses Modell aus. Änderungen in der Effluxrate wären nicht ausreichend, Chloroquin-Resistenz zu erklären. (Bray *et al.* 1992 ; Bray *et al.* 1998)

Eine neuere Studie kommt zum gegenteiligen Schluß. Chloroquin ist demnach an intrazelluläre Bindungsplätze sowohl in resistenten als auch sensitiven Zellen gebunden, der Unterschied besteht in einem nur in resistenten Parasiten vorkommenden Transporter, der Chloroquin energie-abhängig ausschleust. Ein mathematisches Modell unterstützt die kinetischen Vorgänge. (Sanchez *et al.* 2003)

pfmdr

1995 konnte mittels Immunfluoreszenztechnik ein dem P-Glycoprotein homologes Protein (P-Glycoprotein Homolog 1 = Pgh 1) in der Lysosomenmembran von Plasmodium falciparum ermittelt werden. Es besitzt eine Größe von ca. 160 000 Dalton und eine zu 33% mit dem menschlichen P-Glycoprotein in Tumorzellen identische Aminosäure/Gensequenz .

(Cowman & Karcz 1991)
Das dazugehörige Gen wurde auf Chromosom 5 lokalisiert und Pfmdr 1 (Plasmodium falciparum multi drug resistance-Gen) genannt. Ein weiteres Gen, das mit den mdr-Genen verwandt zu sein scheint, wurde Chromosom 14 gefunden und Pfmdr 2 genannt. Es scheint aber nicht mit Chloroquin-Resistenz assoziiert zu sein. (Cowman & Karcz 1991)

In Experimenten an Ovarzellen von chinesischen Hamstern konnte gezeigt werden, dass Pgh1 beim Chloridtransport und der Einstellung des pH-Wertes beteiligt ist. Durch Transfektion von pfmdr 1 mit Wildtyp-Form in Lysosomen von Säugetieren konnte eine stärkere Ansäuerung erreicht werden. (Van Es *et al.* 1994) Von Warhurst wurde 2001 vorgeschlagen, dass die Ansäuerung des Lysosomenmilieus vom Protein Pgh1 im Sinne einer Protonenpumpe geregelt werden könnte.
Interessanterweise wird Pgh 1 in der asexuellen Schizogonie, also der erythrozytären Reifephase exprimiert. Nur in dieser Zeit, wenn sich die Parasiten vom Abbau des Hämoglobins ernähren, wirkt Chloroquin auf die Plasmodien biozid. In Chloroquin resistenten Plasmodien konnten höhere Konzentrationen als in sensitiven registriert werden.
(Foote 1989, Cowman & Karcz 1991) Nach Chloroquin-, Chinin- und Mefloquin-Gabe konnte eine Induktion der pfmdr1 Expression auch in sensitiven Zellen nachgewiesen werden. Die Transkriptionslevel von Pfmdr erhöhten sich spezifisch um das 2,1-2,7-fache. (Myrick *et al.* 2003)
Längen-Polymorphismen im Pgh1-Protein, welche durch Verlängerung zweier repetitiver Regionen im Pfmdr1-Gen entstehen, wurden anfangs mit Resistenz gegen Chloroquin in Verbindung gebracht. (Saiki *et al.* 1988) Allerdings konnten sie in chloroquin-resistenten Stämmen nicht nachgewiesen werden. (Bhattacharya *et al.* 1997)

Seit Erfindung der PCR und der Möglichkeit, Gene zu sequenzieren, kann ein Genom bis auf die letzte Nukleinsäure entschlüsselt und jedes Gen zur Untersuchung beliebig amplifiziert werden.
Foote und Kollegen sequenzierten nun das Pfmdr-Gen in chloroquin-sensitiven und –resistenten Isolaten. Dieser entscheidende Schritt deckte mehrere genetische Unterschiede zwischen den Isolaten auf. Die sensitiven Zellen zeigten eine identische Gensequenz, die resistenten Stämme, K1 und 7G8 Stämme, wiesen Punktmutationen im pfmdr-Gen auf, die zum Austausch von fünf Aminosäuren im Pgh1 Protein führten. (Foote *et al.* 1990)

Diese Änderung kann theoretisch eine veränderte Faltung und damit Funktion des Protein zur Folge haben. Pgh1 zeigte je nach Plasmodienstamm an den Positionen 86, 184, 1034, 1042 und 1246 eine andere Primärstruktur. Speziell der Mutation an Codon 86 könnte besondere Bedeutung zukommen. Die Aminosäure 86Tyrosin ist nach Einbringung in die Plasmodienmembran an einer für das Protein Pgh1 spezifischen Stelle positioniert. In Kanalnähe könnte sie die Substratspezifität des Proteins als Transporter bedingen.
Die Mutationen an den Codons 1246 und 1042 könnten ebenfalls Auswirkungen auf Protononen- und Chloroquin-Transport zeigen.

Hier zu den für diese Studie relevanten Mutationen eine Tabelle:
Tab. 1:

Pfmdr-Codon	Wildtyp	Mutation
86	Asparagin	Tyrosin
1042	Asparagin	Asparaginsäure
1246	Asparaginsäure	Tyrosin

Diese Mutationen gaben der Forschergruppe ein System vor, anhand dessen sie den Resistenzstatus der Isolate in vitro zu bestimmen versuchten. In 34 von 36 Fällen lagen sie mit ihrer Vorhersage richtig.
Die 86Tyr Mutation im Pfmdr-Gen wurde hauptsächlich in Isolaten aus Südostasien entdeckt.
Die Mutationen an den Codons 1042 und 1246 hingegen fanden sich fast ausschließlich in Isolaten aus Südamerika.
Dieser Umstand führte zu der Überlegung, die Resistenzen hätten sich in Südamerika und Asien unabhängig voneinander entwickelt und verbreitet. (Foote *et al.* 1990)
Nach Entdeckung dieser Mutationen wurden zahlreiche Studien durchgeführt und eine sehr kontroverse Diskussion, die bis heute nicht geendet hat, begann.
Etliche Studien konnten einen glaubhaften Zusammenhang zwischen den Mutationen und Therapieversagen aufgrund Medikamentenresistenz herstellen. (Adagu *et al.* 1995, 1996, 1997, Cox-Singh *et al.* 1995, Duraisingh *et al.* 1997, Nagesha *et al.* 2001)
Es gibt aber auch das andere Lager, das keinerlei oder zumindest keine signifikante Korrelation zwischen diesen beiden Größen finden konnte. (Bhattacharya *et al.* 1997,
Basco & Ringwald *et al.* 1998, Povoa *et al.* 1998, McCutcheon *et al.* 1999)

Pfcrt

Auf der Suche nach anderen Genen, die mit Chloroquin-Resistenz in Zusammenhang stehen könnten, fand die Forschergruppe um Fidock 2000 das Pfcrt-Gen auf Chromosom 7. Einige Jahre zuvor hatte man dort das Gen Cg2 lokalisiert und für Resistenzen verantwortlich gemacht. Nach dem jetzigen Stand der Forschung spielt dieses Gen jedoch keine Rolle im Rahmen der Resistenzentwicklung gegen Chloroquin. (Fidock *et al.* 2000, Babiker *et al.* 2000) Im Gegensatz dazu wurde dem Pfcrt Gen eine Schlüsselfunktion zugeschrieben. Pfcrt steht für Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter.

Das Gen besteht aus 13 Exons und kodiert für ein Protein auf der Oberfläche der Lysosomen von Plasmodium falciparum.

Fidock et al. fanden acht Punktmutationen, von denen die Mutation von Lysin zu Threonin an Codon 76 die größte Bedeutung zuzukommen scheint. Alle in vitro-resistenten Isolate besaßen diese Mutation, die jedoch in keiner sensitiven Linie gefunden werden konnte. Ein Klon enthielt alle anderen sieben Mutationen, ohne Resistenz zu zeigen. Die Lys76Thr Mutation fand sich allerdings nur in Anwesenheit der anderen Mutationen. Daraus schloß man, dass die anderen Polymorphismen für den parasitären Stoffwechsel notwendig seien, bevor die Mutation an Codon 76 zustandekommen könne. Dieser Vorlauf in der Resistenzbildung verträgt sich gut mit der Praxis der langsamen Resistenzentwicklung gegen Chloroquin. Die Forscher kreuzten für diese Experimente chloroquin-resistente und –sensitive Isolate aus Südostasien, Afrika und Südamerika.

Transformationsstudien derselben Forschergruppe , bei denen pfcrt-Mutationen mittels Plasmiden in chloroquin-sensitive Klone eingebracht wurden, zeigten in vitro Chloroquin-Resistenz. (Fidock *et al.* 2000). Wie oben erwähnt, scheint Chloroquin-Resistenz an mindestens zwei verschiedenen Foci entstanden zu sein, an denen überall die Mutation K76T gefunden wurde. Dies scheint ein weiterer Beweis für die zentrale Rolle dieser Pfcrt-Mutation zu sein. (Wellems & Plowe 2001)

Verschiedene Haplotypen und Mikrosatelliten Marker für das pfcrt-Gen sind mittlerweile ermittelt worden, die Aufschluß über die Herkunft der Plasmodien geben können. Asiatische/afrikanische und südamerikanische Isolate unterscheiden sich genotypisch, was ein weiteres Indiz für eine voneinander unabhängige Resistenzentwicklung in Asien und Südamerika zu sein scheint. S(V)MNT gilt als der südamerikanische, C(V)IET als der afrikanisch/südostasiatische Haplotyp. In einer indischen Studie war erstaunlicherweise dort der S(V)MNT-Typ verbreitet, über Laos liegen derzeit kein Daten vor. (Huaman *et al.* 2004; Nagesha *et al.* 2003, Vathsala *et al.* 2004) Kürzlich wurde ein asiatisches Pfcrt-Allel in

Südamerika gefunden. Die Forschergruppe vermutet, dass es von Asien oder Afrika nach Südamerika gelangt ist. (Vieira *et al.* 2002)

Dieses Protein PFCRT sitzt an einer strategisch günstigen Position, an der Membran zwischen Zytosol und Nahrungsvakuole, die das Chloroquin überwinden muß, um zu seinem Wirkort zu gelangen. So könnte das Protein als Protonentransporter dienen, der bei Resistenz erhöhte Aktivität zeigt. Der pH-Wert im Inneren der Lysosomen wäre in resistenten Plasmodien vermindert, was zu einer verminderten Bildung des toxischen Hämatin-Chloroquin-Komplexes führte, da weniger Hämatin in freier Form vorläge. Es würde vermehrt in Hämozoin umgewandelt. (Fidock *et al.* 2001, Dorn *et al.* 1998, Dzekunov *et al.* 2000, Wellems & Plowe 2001)
Eine andere Vorstellung besagt folgendes: Während des Hämoglobinabbaus werden protonierte Aminosäuren zusammen mit Ferriprotoporphyrin IX aus der Nahrungsvakuole geschleust. Dies soll mit Hilfe des transmembranen Proteins Pfcrt vonstatten gehen. Weiterhin wird angenommen, dass Chloroquin, welches in der Vakuole protoniert vorliegt, in sensitiven Zellen über diesen Transporter anstatt der Aminosäuren ausgeschleust werden könne. Die Kapazität sei wahrscheinlich eingeschränkt, weshalb keine größeren Mengen des Medikamentes exportiert werden würden. In resistenten Zellen stellt man sich nun aber vor, würde die Mutation im pfcrt-Gen zu einer veränderten Konformation des Proteins mit gesteigerter Affinität für Chloroquin führen und so einen relevanten Efflux bewirken.
Diese Theorie ist mit der Vorstellung von Pgh1 als Protonenpumpe kombiniert worden. Im sensitiven Isolat mit einem pfmdr-Wildtyp dient das Protein als Protonenpumpe zur Ansäuerung des Vakuolenmilieus. Im Falle einer Mutation des Codons 86 oder mehrerer des pfmdr-Gens könnte die Fähigkeit zum Protonentransport gestört sein, was die für den Parasiten ungünstige Ansäuerung durch Protonen und nicht wegtransportierte Aminosäuren bremsen könnte. Chloroquin würde weniger in die Vakuole diffundieren. (Warhurst 2001)

Auch zu dieser Mutation sind viele Studien durchgeführt worden. (Babiker *et al.* 2001, Djimde *et al.* 2001, Pillai *et al.* 2001, Durand *et al.* 2001) Insgesamt scheint die Mutation, eine Grundlage für die Resistenzentwicklung zu legen, zu der sich zusätzliche Mutationen in Verbindung mit verschiedenen Faktoren gesellen müssen. (Warhurst 2001)
Tab. 2:

Pfcrt – Codon	Wildtyp	Mutation
76	Threonin	Lysin

Eine kürzlich neu entdeckte Mutation S163R auf Pfcrt scheint ebenfalls eine Rolle in der Resistenzbildung zu führen und scheint in Zusammenhang mit einem Export von Chloroquin zu stehen. (Johnson *et al.* 2004)

1.3. Pyrimethamin/Sulphadoxin

1.3.1. Resistenzentwicklung und –verbreitung

Antifolate und ihre Kombinationen waren in der Malariatherapie nicht so massiv wie Chloroquin eingesetzt worden, doch kamen ihre einzelnen Vertreter auch bei einer Vielzahl anderer Erkrankungen zum Einsatz. Dies führte schon 1954, also noch vor den ersten bekannten chloroquin-resistenten Stämmen, zum Entstehen von Resistenzen gegenüber der Antifolat-Kombination. In Gebieten mit endemischer Malaria tragen weite Teile der erwachsenen Bevölkerung immer wieder Parasiten in sich, ohne stark oder überhaupt zu erkranken. Erhalten diese Menschen nun häufig Antifolate zur Therapie verschiedener Erkrankungen besteht kontinuierlich Kontakt zwischen Plasmodien und Antifolaten. Dies stellt einen genügend hohen Selektionsdruck dar, um Resistenzen entstehen und wachsen zu lassen.

Der vielerorts breite Einsatz trotz Resistenzentwicklung, der sich mit Aufkommen der Chloroquin-Resistenz teilweise noch verstärkte, führte zu immer höheren Resistenzraten. Unkontrollierter Gebrauch, eine am Finanziellen orientierte Gesundheitspolitik und besonders in Afrika ausgedehnte Völkerwanderungen verschärften die Situation zunehmend.
(Kondrachine & Trigg 1997)

Eine lange Halbwertszeit der Wirkstoffe, wie es hier der Fall ist, könnte eine Selektion resistenter Stämme begünstigen. (Watkins & Moboso 1993)

Eine Therapie mit S/P scheint Gametozyten zu induzieren, Therapieversagen könnte zu einem Anstieg und einer Persistenz der Gametozytämie nach Behandlung führen. Die immer wieder beobachtete Gametozytämie unter S/P-Therapie und erhöhten Gametozytenraten bei Therapieversagen könnte so die Verbreitung der Resistenz erheblich vergrößern. (*Robert et al. 2000*, Von Seidlein *et al.* 2001, Bousema *et al.* 2003, Sutanto *et al.* 2004)

In Asien wurden Resistenzen erstmals 1970 gemeldet. (Ebisawa et al. 1970) In Thailand ist man aufgrund hoher Resistenzraten schon lange von diesem Mittel abgekommen. (Reacher *et al.* 1981) Studien aus Laos zeigten eher niedrige Resistenzraten von ca. 20 % für die

Kombination Pyrimethamin und Sulphadoxin. Obwohl es offiziell als Mittel der zweiten Wahl gehandelt wurde, fand es keine breite Anwendung. Das Standardtherapeutikum war Chloroquin, bei Therapieversagen wurde meist mit Chinin weiterbehandelt. Derzeit planen die Regierung von Laos und die WHO eine Umstellung der Malariaempfehlungen zu Gunsten der Kombination Chloroquin und Fansidar. Allerdings ist nun mit einer raschen Resistenzvermehrung wie in den Nachbarländern zu rechnen. (Pillai *et al.* 2001, Schwöbel *et al.* 2002)

1.3.2. Wirkungsweise

Wie schon in Kapitel 1.2.1. erläutert bedürfen die Plasmodien zur Vermehrung und Aufrechterhaltung ihres Stoffwechsels verschiedener Proteine, Fette und anderer Stoffe, die sie entweder als Parasiten komplett übernehmen oder aus Grundbausteinen des Wirtes über de-novo-Synthese herstellen.

Ein essentieller Schritt ist die Folatsynthese aus GTP. Sie dient der Bereitstellung von reduziertem Dihydrofolat, welches in die Pyrimidinsynthese eingespeist wird. Das entstehende Thymidilat dTMP ist eines der Grundbausteine der DNS-Replikation. Der Folatzyklus dient aber auch der Herstellung von Aminosäuren, sowie der Reduktion von NADP.

Sehr viele Enzyme sind beteiligt, eine Blockierung eines oder mehrerer dieser würde zum Stillstand der Reaktionskette und letztendlich durch mangelnde DNS-Replikation zum Absterben des Parasiten führen.

Die Antifolate Pyrimethamin und Sulphadoxin greifen durch Enzymblockade in dieses Netzwerk ein.

Sulphadoxin stört die Folatsynthese, in dem es die Dihydropteroat Synthetase (DHPS) hemmt, welches der Bildung von Dihydropteroat aus 6-Hydroxymethyldihydropterin-pyrophosphat und para-Aminobenzoesäure (PABA) dient. (Walter *et al.* 1991, Foote & Cowman 1994)

Pyrimethamin setzt später ein, es blockiert im Folatzyklus die Reduktion von 7,8-Dihydrofolat mittels NADPH + H^+. Dies verhindert die Entstehung von $NADP^+$ und 5,6,7,8-Tetrahydrofolat, welches methyliert für die Thymidilatsynthese, also die DNS-Replikation, von nöten ist. Das die Reduktion katalysierende Enzym heißt Dihydrofolat-Reduktase

(DHFR) und wird durch Pyrimethamin, Cycloguanil und Methotrexat (MTX) gehemmt. MTX blockiert allerdings auch das humane Enzym, während Pyrimethamin spezifisch die Plasmodien-Reduktase angreift. (Ferone *et al.*1977)
Die beiden Antifolate ergänzen sich dementsprechend gut, ihre Wirkung ist synergistisch. Es gilt als sehr effiziente und auch nicht zu teure Kombination gegen Malaria und wird in vielen Ländern als Mittel erster oder zweiter Wahl gehandelt.
Als Langzeit-Prophylaktikum eignet es sich wegen zahlreicher nicht unerheblicher Nebenwirkungen nicht. Die Kombination kann zu reversiblen Blutbildveränderungen, Leber- und Knochenmarksstörungen, gastrointestinalen Störungen und allergischen Hautreaktionen führen. (Björkman *et al.*1991, Lang & Löscher, Lüllmann & Mohr)

1.3.3. Molekulargenetik der Resistenz

Ein großer Vorteil gegenüber Chloroquin besteht darin, dass Wirkmechanismus und -ort der Medikamente weitgehend bekannt sind. Trotzdem gibt es theoretisch verschiedene Möglichkeiten für den Parasiten, sich der Wirkung der Medikamente zu entziehen. Ein wichtiger Schritt war die Entdeckung der betroffenen Enzyme und ihres Ursprungs, d.h. der entsprechenden Gene. Das DHFR codierende Gen dhfr liegt auf Chromosom 4. DHPS entsteht aus dem dhps-pppk-Gen auf Chromosom 8 mit zwei Introns, das für zwei Enzyme codiert. PPPK wirkt ebenfalls bei der Folatsynthese mit.
Ein kurzer Überblick zu den Überlegungen und Theorien, die man sich zur Antifolat-Resistenz gemacht hat.

Zuerst fanden Inselburg et al. 1987 in einem resistenten Laborstamm eine Überproduktion von Dihydrofolatreduktase (DHFR) durch Duplikation des dhfr-Gens. Sie folgerten daraus, dass Pyrimethamin durch diese Überproduktion das Enzym DHFR nicht mehr ausreichend hemmen konnte. Die Resistenz wäre also mit Wirkstoffmangel durch überproportionale Produktion von Parasitenenzym begründet.
Dieser Versuch erwies aber als nicht reproduzierbar. In einem nachfolgenden Experiment mit Wildstämmen fand sich in allen sowohl resistenten und als auch sensitiven Isolaten nur eine Kopie des dhfr-Gens. (Foote *et al.*1990, Snewin *et al.*1989, Cowman *et al.*1988).
Ähnliche Vermutungen wurden in Hinsicht auf die Sulphadoxin-Resistenz entwickelt.
Auch hier konnte man die Überproduktion von DHPS mittels duplizierten dhps-Gens ausschließen. In sensitiven wie resistenten Stämmen ließ sich jeweils nur eine Kopie des Gens

nachweisen. (Dieckmann *et al.* 1986, Triglia *et al.* 1994, Zhang *et al.* 1991, Brooks *et al.* 1994).
Eine andere Theorie besagte, dass Veränderungen der parasitären Membran zu einer verminderten Medikamentenaufnahme führen würden. Eine herabgesetzte Permeabilität hätte niedrige Wirkstoffkonzentrationen im Plasmodium zur Folge. Dies konnte allerdings nie nachgewiesen werden. Die Pyrimethamin-Konzentration war in resistenten und sensitiven Parasiten annähernd gleich. (Inselburg *et al.*1987).

Ende der achtziger Jahre wurden dann mehrere Arbeiten zu einem neuen Ansatz veröffentlicht. Wie auch bei Chloroquin suchte man nach Veränderungen in den zuständigen Genen. Untersuchungstechniken wie die Sequenzierung von DNS und vor allem auch die Erfindung der PCR ermöglichten auch hier molekularbiologische Analysen. Das Genom der Plasmodien wird vollständig sequenziert und verschiedene Gene sind bekannt. Man untersuchte die DNS von resistenten und sensitiven Laborstämmen sowie isolierten resistenten Wildstämmen und fand verschiedene Mutationen im Genom der resistenten Parasiten. So fielen auch Punktmutationen in den für DHPS und DHFR codierenden Genabschnitten auf, die man nun mit der in vitro festgestellten Medikamentenresistenz assoziierte. (Triglia & Cowman 1994, Cowman *et al.*1988, Foote *et al.*1994, Peterson *et al.*1988, Zolg *et al.*1989) Punktmutationen können zu einer veränderten Sekundär- oder Tertiärstrukur, d.h. Faltung der Enzyme führen und dadurch eine verminderte Aktivität oder sogar einen totalen Wirkverlust verursachen.
Verschiedene Codons auf beiden Genen sind Gegenstand der Forschung. Die Kombination verschiedener Kombinationen scheint den Resistenzeffekt zu verstärken.

Mit Pyrimethamin-Resistenz werden hauptsächlich Mutationen in fünf verschiedenen Codons des dhfr-Gens in Verbindung gebracht. Sie konnten anhand von Laborstämmen aus verschiedenen Regionen der Erde untersucht werden.
Einen besonderen Stellenwert nimmt eine Punktmutation im Codon 108 ein. Sie bewirkt einen Austausch der Aminosäure Serin (Zellinie 3D7 aus Afrika, entspricht dem Wildtyp) zu Asparagin (HB3 aus Honduras). In vitro und in vivo wurde sie mit Pyrimethamin-Resistenz assoziiert. (Zolg *et al.*1989, Curtis *et al.*1996, Sirawaraporn *et al.*1997b, Basco & Ringwald 1998)
Gegenüber Proguanil bzw. seinem wirksamen Metaboliten Cycloguanil zeigten Parasiten mit dieser Mutationen nur geringes Resistenzverhalten. Das Codon 108 kann allerdings eine

weitere Mutation aufweisen, wodurch Serin mit Threonin (Stamm FCR-3 aus Gambia) vertauscht wird. Die Kombination aus dieser Mutation zusammen mit einem Aminosäureaustausch in Codon 16 (Alanin zu Valin) zeigte im in vitro Versuch Resistenz gegenüber Cycloguanil und nur geringen Sensitivitätsverlust von Pyrimethamin. (Foote *et al.* 1990, Sirawaraporn *et al.* 1997b)

Mutationen in den Codons 51 (Asparagin zu Isoleucin) und 59 (Arginin zu Cystein) spricht man eine verstärkende Wirkung der Resistenz bei Anwesenheit von Asparagin an Stelle 108 zu. (Zolg *et al.* 1989, Hyde *et al.* 1990, Curtis *et al.* 1998)

Weiterhin ist Codon 164 durch eine Mutation aufgefallen, die einen Austausch von Isoleucin zu Leucin bewirkt.

Untersuchungen ergaben auch hier, dass die Kombination dieser Mutation in Codon 164 zusammen mit der Mutation zu Asn-108 erhöhten Resistenz gegenüber Pyrimethamin und Cycloguanil führten. (Peterson *et al.* 1990)

Tab. 3:

DHFR - Codon	Wildtyp	Mutation
16	Alanin	Valin
51	Asparagin	Isoleucin
59	Cystein	Arginin
108	Serin	Asparagin/ Threonin
164	Isoleucin	Leucin

DHPS betreffend sind ähnliche Studien durchgeführt und verschiedene Codons hervorgehoben worden, die zu einer Resistenz führen könnten.

Fünf mutierte Genloci kommen in Gebieten mit hohen Resistenzraten besonders häufig vor, sie wurden in dieser Studie untersucht.

Besonders erwähnenswert scheinen die Mutationen am Codon 436 und 437 zu sein.

Der Wildtyp von 436 codiert für Serin, die Mutation für Alanin. Sie ist in verschiedenen Studien mit einem Wirkungsverlust von Sulphadoxine in Verbindung gebracht worden.

(Brooks *et al.* 1994, Triglia & Cowman 1994, Duraisingh *et al.* 1998)

Codon 436 kann auch bei entsprechender Mutation für Phenylalanin codieren. Diese Veränderung zusammen mit einer Mutation im Codon 613, die den Austausch der Aminosäure Threonin oder Serin statt Alanin bewirkt, wurde ebenfalls bei verminderter Sulphadoxin-Sensitivität beobachtet. (Brooks *et al.* 1994, Wang *et al.* 1997)

Ein Austausch der Aminosäure Alanin gegen Glycin am Codon 581 führte ebenso zu einer erhöhten Resistenz. (Brooks *et al.* 1994) In Kombination mit einer Mutation im Codon 437

(Alanin zu Glycin), welche in der Linie K1 aus Thailand zu beobachten ist, potenzierte sich der Resistenzeffekt um das 50-fache im Vergleich zum Wildtyp. Die in dieser Studie ebenfalls getestete Linie Dd2 aus Indochina, welche drei Mutationen besitzt (436, 437 und 613), zeigte das höchste Niveau an Resistenz. Die Resistenz lag 20-fach höher als bei K1.
Das mutierte Codon 437 allein (Linie 3D7 aus Afrika) zeigte eine leichte Stufe der Resistenz. (Wang *et al.* 1997)
Brooks und Kollegen hingegen konnten dem mutierten Codon 437 keinerlei resistenzverstärkende Wirkung zuschreiben. (Brooks *et al.* 1994)
Ein weiteres Codon, das Aufmerksamkeit gewinnen konnte, ist das an Stelle 540. Eine Mutation dort führt zum Austausch der Aminosäure Lysin gegen Glutamat, die in Verbindung mit den Codons 436 und 437 bei in vivo Resistenzen gegen Pyrimethamin-Sulphadoxin beobachtet wurde. (Curtis *et al.*1998)

Tab. 4:

DHPS - Codon	Wildtyp	Mutation
436	Serin	Alanin/ Phenylalanin
437	Alanin	Glycin
581	Alanin	Glycin
540	Lysin	Glutamat
613	Alanin	Serin/ Threonin

Bei Resistenz gegenüber der Kombination S/P muß von einem Zusammenspiel der beide Gene betreffenden Mutationen ausgegangen und sollten daher dementsprechende Untersuchungen anstellt werden.
Dieser synergistische Effekt wird natürlich ebenso eine Rolle bei anderen Medikamentenkombinationen spielen.

2. Problemstellung und Zielsetzung

Der zunehmende Verlust der Wirksamkeit von Medikamenten wie Chloroquin und Pyrimethamin/Sulphadoxin, die routinemäßig in vielen endemischen Gebieten verabreicht werden, stellt einen Rückschritt in der Malariabekämpfung dar, weshalb auch die WHO das Aufhalten und Verhindern der Resistenzentwicklung als eines der Hauptziele der Malariabekämpfung definiert hat.

1998 initiierte sie das Programm „Roll Back Malaria“, das derzeit an diversen Problemen zu scheitern droht. Die Anzahl der Todesfälle durch Malaria ist seither angestiegen, obwohl man als Ziel die Halbierung der Todesopfer bis zum Jahre 2010 veranschlagt hatte. (BMJ 2004)

Natürlich stellt in den Entwicklungsländern die Finanzierung immer eines der größten Probleme dar. Gerade deshalb ist dort eine vernünftige, ökonomisch effiziente Therapiestrategie sehr wichtig. Eine den Resistenzen und dem Individuum angepaßte, aber nicht unnötig teure Medikation ist nur möglich, wenn schnelle, preiswerte und effiziente Methoden zur Feststellung von Resistenzen zur Verfügung stehen. Optimalerweise sollte die Resistenzlage der Erreger vor Therapie getestet werden können, um dann das Mittel der Wahl einsetzen zu können. Man vermeidet so Therapieversagen oder Übertherapie mit damit verbundenem Anzüchten von Resistenzen. Da die *in vitro*-Tests zeitaufwendig und teuer sind, eignen sie sich nicht zur Routinediagnostik. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein preiswertes und schnelles Verfahren, das auch in Entwicklungsländern zum Einsatz kommen und bei der Wahl der Medikamente helfen könnte.

Man assoziiert nun seit einigen Jahren bestimmte Punktmutationen auf Genen von *Plasmodium falciparum* mit Resistenzen gegenüber verschiedenen Medikamenten.

Mittels PCR lassen sich diese Mutationen schnell analysieren, die korrekte Vorhersage des Therapieerfolges, bleibt derzeit noch unbefriedigend. Daß die gewissen Punktmutationen eine Rolle zu spielen scheinen, haben schon verschiedene Studien gezeigt. Welche davon wirklich aussagekräftig sind und sich für zuverlässige Vorhersagen eignen könnten, gilt es weiterhin herauszufinden. Vor allem scheinen viele andere Faktoren den Therapieerfolg mehr oder weniger zu beeinflussen, die Wirtsimmunität spielt dabei eine entscheidende Rolle. Interessanter als im individuellen Fall scheint die Anwendung der Punktmutationen als molekulare Marker in epidemiologischen Studien zu sein, um Resistenzentwicklungen frühzeitig zu erkennen.

Chloroquin war noch immer Mittel der ersten Wahl im Studiengebiet Laos. Daher war anzunehmen, daß sich auch dort Resistenzen gegen dieses Medikament gebildet hatten, ebenso gegen die Antifolat-Kombination Pyrimethamin-Sulphadoxin, die offiziell als Mittel der zweiten Wahl gegeben wurde. Die Regierung von Laos plante gemeinsam mit der WHO eine Änderung der Malariaempfehlungen. Die gesamte Studie diente der Aufklärung bezüglich der Effektivität der angewendeten Medikamente und der Resistenzlage der Parasiten in der Provinz Attapeu.

In Zusammenarbeit mit der WHO und dem nationalen Malariainstitut von Laos hat die Arbeitsgruppe während der Regenzeit 2001 eine *in vivo*-Studie durchgeführt, deren Daten hier verwendet werden. Das zu untersuchende Probenmaterial stammte von 119 Patienten mit Fieber und mikroskopisch nachgewiesener Malaria tropica aus der Provinz Attapeu im Südosten der laotischen Volksrepublik. (Schwoebel et al. 2003) Dieses Gebiet grenzt an die Länder Vietnam und Kambodscha, die hohe Resistenzraten aufweisen. Ein gewisser Einfluß auf die Resistenzlage laotischer Parasitenpopulationen im Grenzgebiet ist durch Migration zu vermuten.

Die vorliegende Teilstudie hat also zum Ziel, den Resistenzstatus der entnommenen Proben zu klären und mögliche Korrelationen zu den *in vivo*-Daten herzustellen, und liefert einen Überblick über die molekulare Resistenzlage in einem noch recht unerforschten, lange isolierten Land wie Laos, das Grenzen zu Multiresistenzgebieten besitzt.

Die Proben wurden in München auf die bekannten Mutationen hin geprüft. Bezüglich der Chloroquin-Resistenz wurden die Punktmutationen an den Codons 86, 1042, 1246 des pfmdr-Gens und an Codon 76 des pfcrt-Gens untersucht. Pyrimethamin-Sulphadoxin-Resistenz wird mit Punktmutationen an den Codons 16, 51, 59, 108 und 164 des dhfr-Gens und an den Codons 436, 437, 540, 581 und 613 des dhps-Gens assoziiert und wurde daraufhin getestet.

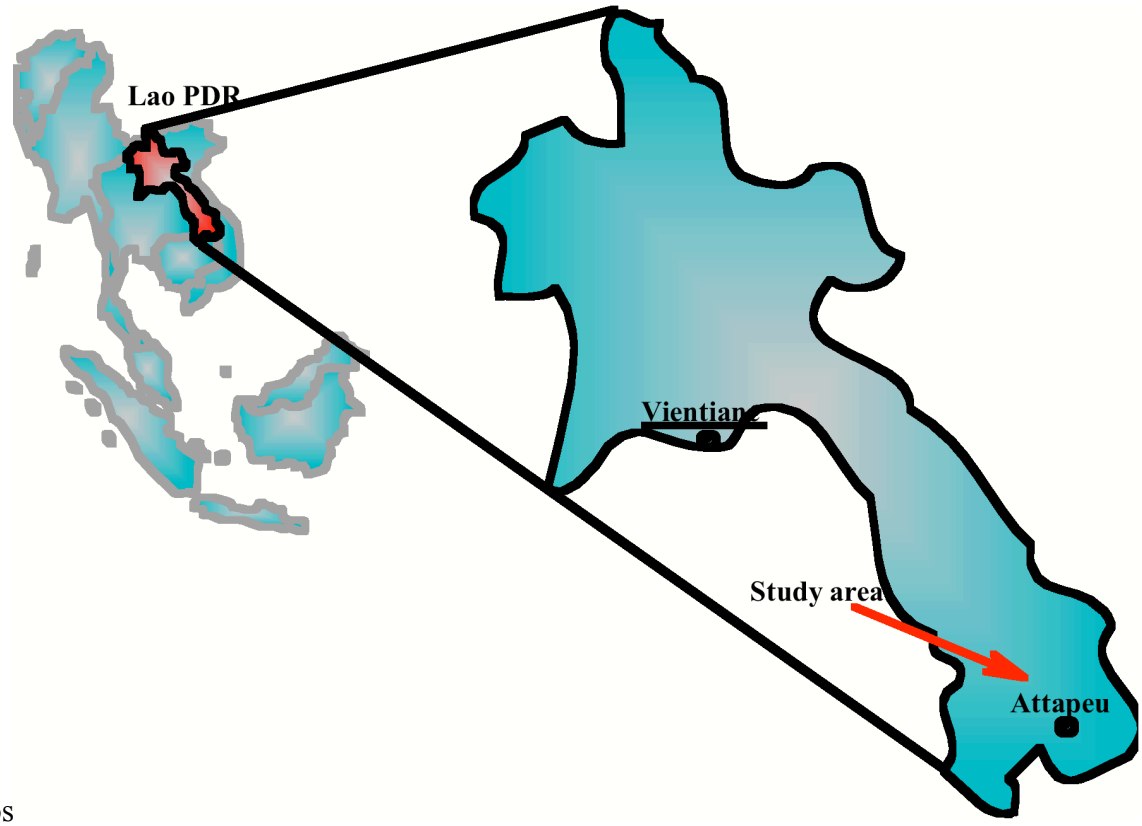
Die Hoffnung ist, eine signifikante Assoziation zwischen Punktmutationen auf relevanten Genabschnitten von *Plasmodium falciparum* und Medikamentenresistenz *in vivo* nachweisen zu können, um die Therapie optimieren und unnötiger Resistenzbildung vorbeugen zu können. Sensitivität und Spezifität der Resistenzmarker werden über Praktikabilität und Relevanz in epidemiologischen Studien und im klinischen Alltag entscheiden.

3. Patienten, Material und Methoden

3.1. Proben

3.1.1. Studiengelände und Einschlusskriterien

Abb. 3:



Laos

Die hier vorliegende Studie wurde mit einer *in vivo* Studie kombiniert, welche die Effektivität der Medikamente Chloroquin und P/S einzeln und als Kombination bei Behandlung der unkomplizierten Malaria tropica testen sollte. Die Proben wurden von August bis Oktober 2001 – also während der Regensaison - in allen fünf Distrikten der Provinz Attapeu gesammelt, die sich im Südosten von Laos befindet und an Vietnam und Kambodscha grenzt. Um an die Proben zu gelangen, wurden Patienten der örtlichen und Kreiskrankenhäuser auf Infektion mit Plasmodium falciparum gescreent, der größere Teil der Proben kam aber direkt von der Bevölkerung aus verschiedenen Dörfern, der bei Verdacht auf Malaria, d.h. vor allem bei Fieber, Blut abgenommen wurde. Die Blutproben wurden mikroskopisch auf Plasmodium falciparum untersucht, auf Whatman 3MM Chromatographie Filterpapier fixiert und so nach

München transportiert, wo sie im Labor der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München aufgearbeitet wurden.

119 Patienten wurden in die Studie aufgenommen, wovon 103 die 14-tägige Verlaufsbeobachtung absolvierten. Es wurden Blutproben an Tag Null, also vor Behandlung, dann am zweiten, dritten, siebten und 14ten Tag der medikamentösen Behandlung entnommen und auf Filterpapier getropft.
Zu den Einschlußkriterien gehörten :

- Symptomen oder Zeichen einer unkomplizierten Malaria
- *Plasmodium falciparum*-Monoinfektion
- Mindestalter von einem Jahr
- Aufklärung und Einwilligungserklärung des Patienten oder Erziehungsberechtigten
- Ausschluß einer Schwangerschaft
- Keine Einnahme von Medikamenten gegen Malaria

Die Parasitenanzahl spielte in der hier vorliegenden Studie keine Rolle, es wurden sowohl Parasitenzahlen unter 1000 und über 100 000 Parasiten/µl mit aufgenommen, da nur der mikroskopische und molekulare Nachweis von *Plasmodium falciparum* und dessen genetische Polymorphismen interessierten.

3.1.2. Behandlung und Klassifikationskriterien

Die Gesamtdosis für Chloroquin lag bei 25mg/kg KG auf drei Tage verteilt, Patienten in der Antifolat-Gruppe erhielten eine Einmal-Dosis Fansidar®
(Pyrimethamin/Sulphadoxin) äquivalent zu 1,25 Pyrimethamin/kg KG.
Die Kombinationstherapie bestand aus Gabe beider Medikamente mit gleicher Dosierung wie in der Einzeltherapie.
Die Therapieergebnisse wurden anhand des WHO-Protokolls für Malaria-Gegenden mit geringer oder moderater Transmissionsrate ausgewertet. Es gibt folgende Einteilung :

- Frühes Therapieversagen (Early Treatment Failure, ETF): Gefahrenzeichen oder klinische Manifestation der schweren Form der Malaria vor oder an Tag drei, Parasitämie an Tag zwei höher als an Tag Null, Parasitämie an Tag drei über 25 % erhöht im Vergleich zu Tag Null oder Fieber und Parasitämie an Tag drei

- Spätes Therapieversagen (Late Treatment Failure, LTF): Gefahrenzeichen oder klinische Manifestation in Anwesenheit von Parasiten nach Tag drei oder irgendeine Parasitämie mit oder ohne Fieber nach Tag drei
- Adäquate klinische und parasitologische Antwort (Adequate Clinical and Parasitological Response, ACPR): keine Kriterien oben genannten Therapieversagens

3.1.3. Plasmodium falciparum Stämme als Positivkontrollen

Für die verschiedenen PCRs dienten diverse Labor-Stämme von Plasmodium falciparum als Positivkontrollen. Der am häufigsten verwendetete Stamm wird mit K1 bezeichnet und kommt ursprünglich aus Thailand. Er wurde kultiviert und bei einer Parasitämie von 2-3% kryokonserviert, was es möglich macht, ihn jederzeit wieder anzuzüchten. Auf Filterpapier getropft, konnte K1 genau wie die Proben extrahiert und weiterverwendet werden.
Weitere Laborstämme, die hier verwendet wurden, sind 7G8, 3D7, FCR3, V1/S, W2, T9/96.

Tab. 20: *Resistenzmuster von K1*

Gen	pfmdr			pfcrt	DHFR					DHPS				
Codon	86	1042	1246	76	16	51	59	108	164	436	437	540	581	613
*	Mt	Wt	Wt	Mt	Wt	Wt	Mt	Mt	Wt	Wt	Mt	Wt	Mt	Wt
AS	Tyr	Asn	Asp	Lys	Ala	Asn	Arg	Asn	Ile	Ser	Gly	Lys	Gly	Ala

* Mt = Mutation, Wt = Wildtyp

3.2. Material

3.2.1. Nukleotide

Oligonukleotide Primer : MWG-Biotech GMbH, Ebersberg

Spezies

rPLU 5 : 5’ CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC 3’

rPLU6 : 5’ TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG 3’

rFAL1 : 5’ TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT 3’

rFAL2: 5’ ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC 3’

rVIV1 : 5’ CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC 3’

rVIV2 : 5’ ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA 3’

pfmdr

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’

MDR1 : 5’ ATG GGT AAA GAG CAG AAA GA 3’

MDR2 : 5’AAC GCA AGT AAT ACA TAA AGT CA 3’

MDR3 : 5’ TGG TAA CCT CAG TAT CAA AGA A 3’

MDR4 : 5’ ATA AAC CTA AAA AGG AAC TGG 3’

Pfcrt

TCRP1 : 5’ CCG TTA ATA ATA AAT ACA CGC AG 3’

TCRP2 : 5’ CGG ATG TTA CAA AAC TAT AGT TAC C 3’

TCRD1 : 5’ TGT GCT CAT GTG TTT AAA CTT 3’
TCRD2 : 5’ CAA ACC TAT AGT TAC CAA TTT TG 3’

DHFR
M1 : 5’ TTT ATG ATG GAA CAA GTC TGC 3’
M5 : 5’ AGT ATA TAC ATC GCT AAC AGA 3’

M3 : 5’ TTT ATG ATG GAA CAA GAC TGG GAC GTT 3’
F/ : 5’ AAA TTC TTG ATA AAC AAC GGA ACC TTT TA 3’

M4 : 5’ TTA ATT TCC CAA GTA AAA CTA TTA GAG CTT C 3’
F : 5’ GAA ATG TAA TTC CCT AGA TAT GGA ATA ATT 3’

DHPS
R2 : 5’ AAC CTA AAC GTG CTG TTC AA 3’
R/ : 5’ AAT TGT GTG ATT TGT CCA CAA 3’

K : 5’ TGC TAG TGT TAT AGA TAT AGG ATG AGC ATC 3’
K/ : 5’ CTA TAA CGA GGT ATT GCA TTT AAT GCA AGA AA 3’

L : 5’ ATA GGA TAC TAT TTG ATA TTG GAC CAG GGA TTC 3’
L/ : 5’ TAT TAC AAC ATT TTG ATC ATT CGC GCA ACC GG 3’

dATP, dCTP, dGTP, dTTP ; je 10 mM	Appligene, Heidelberg
100bp DNA-Leiter	Gibco BRL, Eggenstein

3.2.2. Enzyme

Amplifikation und Enzymverdau wurde mit folgenden Enzymen durchgeführt:

Polymerase: Taq DNA-Polymerase (5U/µl) Appligene, Heidelberg

Restriktionsendonukleasen: New England Biolabs, Schwalbach

Afl III	Bsl I	Fok I
Apo I	Bsr I	Mnl I
Alu I	BstN I	MspA I
Ase I	BstU I	Nla III
Ava II	EcoR V	Tsp509 I
Bsa WI	Dra I	Xmn I

3.2.3. Chemikalien

Chelex: InstaGene DNA Reinigungskit/Matrix	Bio Rad, München
Puffer $MgCl^2$	Appligene, Heidelberg
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva, Heidelberg
Tween 20 (1%)	Merck, Darmstadt
Inkubationspuffer NE-1, NE-2, NE-3, NE-4	New England Biolabs Schwalbach
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Mineralöl „Light white oil“	
Tris (2-Amino-2 (hydroxymethyl)-propan-1,3-diol)	
Orange G	
Bromophenolblau	
EDTA	
Ficoll 400	
NuSieve TM Agarose	FMC BioProducts,
SeaKem TM Agarose	Rockland, ME, USA

3.2.5. Geräte

Tischzentrifuge EBA 12/12 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Minishaker MS1	IKA-Works, Wilmington, USA
UNO II Thermocycler	Biometra, Göttingen
u.a.	
Wasserbad WBU 45	Memmert, Schwabach
Horizontal-Gelelektrophoresekammer “A2“	Owl Scientific, Woburn, USA
u.a.	
Ultraviolet Transilluminator	UVP, Upland, USA
Sofortbildkamera (Polaroid MP4)	Polaroid
Inkubator	Heraeus Inkubator

3.2.6. Filme

Sofortbildfilm 667	Polaroid (Vertrieb : Sigma), Deisenhofen

3.3. Methoden

3.3.1. Grundprinzipien der verwendeten Methoden

3.3.1.1. DNA-Extraktion

Um mit der Plasmodien-DNA arbeiten zu können, muß sie erst mal von Filterpapier und Blut getrennt, sprich extrahiert werden. Die PCR kann durch diverse Hemmstoffe gestört werden, die Gewinnung aus Blutproben auf Filterpapier ist aber unter Einhaltung spezieller Kriterien eine effektive Methode (Long *et al.* 1995). Bei der Methode nach Kain und Lanar werden durch Hitze die roten Blutkörperchen zum Platzen gebracht und die Proteine denaturiert. Die freigegebene Plasmodien-DNA wird durch das hinzugegebene Chelex und mehrmaliges Zentrifrugieren von den anderen Bestandteilen getrennt. Wichtig dabei ist auch die Entfernung des Hämoglobins, welches die Taq-Polymerase inaktiviert. (Higuchi *et al.*1989) Wird die extrahierte DNS bei –20°C gelagert, steht sie bis zu sechs Monate ohne Qualitätsminderung für die Polymerasekettenreaktion zur Verfügung.

3.3.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um eine ausreichende Menge DNS-Stränge für die weiteren Schritte zur Verfügung zu haben, müssen diese amplifiziert, d.h. vervielfältigt werden. Die einfachste Methode, dies schnell, kostengünstig und selektiv, d.h. nur die benötigten Abschnitte betreffend, zu bewerkstelligen, stellt die Polymerasekettenreaktion dar.

Sie imitiert die wichtigsten Schritte des natürliche Replikationsvorgangs in beliebiger Wiederholung *in-vitro*.

Ausgehend von initial zwei komplementären DNS-Strängen und einer Verdopplung der jeweils vorhandenen Doppelstränge findet ein exponentielles Wachstum der Genabschnitte statt, was nach 20 Zyklen zu ca. einer Millionen, nach 30 Zyklen zu einer Milliarde Kopien dieses Abschnitts der Erbsubstanz führt. (Saiki *et al.* 1988)

Damit nur der gewünschte Abschnitt amplifiziert wird, müssen sogenannte Primer, Oligonukleotide, hergestellt werden. Wie beim natürlichen Replikationsprozeß stellen sie die Startmoleküle des neuen DNS-Stranges dar, von dem die weitere Replikation abhängt. Die Gensequenz in diesem Bereich muß also genau bekannt sein, um für beide Einzelstränge komplementäre Primer designen zu können, die den Abschnitt von beiden Seiten her festlegen. Zueinander komplementär dürfen die beiden Primer nicht sein, da sonst sogenannte

Primer-Dimere entstehen, die zu keiner Replikation des gewünschten Abschnitts führen, auch „mispriming“ genannt. (Pröll *et al.* 1997)

Der Vorgang besteht aus folgenden Schritten:

Die native als Doppelstrang vorliegende DNS wird in einem Erwärmungsschritt in Einzelstränge aufgespalten. Diese Denaturierung erfolgt bei 94°C.

Nach Senkung der Temperatur findet als nächstes das Annealing bei 50°C statt. An die beiden Einzelstränge lagern sich die passenden Primer, die aufgrund der wesentlich geringeren Größe schneller und beweglicher als die native DNS sind.

Da mit der Primeranlagerung ein kurzer Doppelstrang entstanden ist, kann die Taq-Polymerase ihre Arbeit beginnen. Sie komplementiert den Einzelstrang mit den lose hinzugegebenen vier Nukleotiden (Adenosin, Cytosin, Guanin und Thymindin), die als Desoxynukleotidphosphate (dNTP) vorliegen. Vom freien 3’-OH-Ende des Primers ausgehend verbindet die Polymerase die Nukleotide, indem sie diese durch Abspaltung der Phosphatgruppen verestert. Dies geschieht bei einer Temperatur von 72°C. Die Taq-Polymerase ist aus dem Bakterium Thermus aquaticus isoliert worden, das in heißen Quellen lebt. Der vorliegenden Einzelstrang dient als Vorlage (Matrize) für den neu entstehenden. Liegen erneut komplementäre Doppelstränge vor, kann der Vorgang von vorne beginnen. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein von einer ausreichenden Menge an Primers und Nukleotiden, die bei jedem Zyklus verbraucht werden. Für den Nachweis der Produkte und zur Kontrolle der PCR wird die Agarosegelelektrophorese verwendet.

3.3.1.3. Restriktionsanalyse (RFLP)

Während die Polymerasekettenreaktion nur der Amplifikation des genetischen Materials dient, stellt die Restriktionsanalyse den eigentlichen Untersuchungsschritt dar. Sie besteht aus dem Verdau der Genabschnitte durch Restriktionsendonukleasen der Klasse II, die ohne Cofaktoren arbeiten, sind aus Bakterien isolierte Enzyme. Sie dienen dem Schutz des Bakteriums, indem sie eingedrungene fremde DNS, z.B. von Viren, spalten. Die ersten wurden aus Escherichia coli gewonnen, inzwischen sind mehr als 2500 verschiedene bekannt und kommerziell erhältlich. Die Abkürzungen der Enzyme weisen auf ihren Ursprung hin, so z.B. jenes EcoRV, das aus Escherichia coli isoliert wurde.

Die Endonukleasen besitzen die Fähigkeit, bestimmte Gensequenzen zu erkennen und diese an spezifischer Stelle zu schneiden. Bei der Klasse II sind Erkennungs- und Hydrolysesequenz identisch. Das PCR-Produkt wird also von einem bestimmten Enzym an einer oder mehreren ganz spezifischen Stellen zerschnitten, wobei zwei oder mehr

Restriktionsfragmente definierter Länge entstehen. Daher kommt der Begriff Längen-Polymorphismus von Restriktionsfragmenten (Restriction-Fragment-Length-Polymorphism, RFLP im Englischen). Befindet sich nun eine Punktmutation, ein Austausch einer Base, in der Enzymschnittstelle eines zu untersuchenden DNS-Abschnitts, der mit der entsprechenden Endonuklease inkubiert wird, erkennt diese ihre Schnittstelle nicht. Es entstehen nicht die erwarteten Restriktionsfragmente. Umgekehrt kann durch eine Punktmutation eine neue Schnittstelle entstehen. Der Enzymverdau dient also dem Nachweis von Punktmutationen in einer definierten Gensequenz. Sichtbar gemacht wird das Ergebnis des Restriktionsverdaus durch die Agarosegelelektrophorese.

3.3.1.4. Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine physikalische Trennung von Molekülen. In einem elektrischen Feld wandern diese abhängig von ihrer Größe und Form, von der Nettoladung und der angelegten Spannung unterschiedlich weit von Anode zu Kathode. Die DNS ist beim pH-Wert des Laufpuffers negativ geladen. Als Trägermaterial dient Agarosegel, das mit Ethidiumbromid versehen wird. Durch die Einlagerung von Ethidiumbromid-Molekülen kann später die DNS im ultravioletten Licht sichtbar gemacht werden.

Das zu untersuchende genetische Material wird in vorgeformte Geltaschen auf gleicher Höhe einpipettiert und eine festgesetzte Spannung über einen bestimmten Zeitraum angelegt. Abhängig von ihrer Größe wandern die Moleküle unterschiedlich schnell, DNS-Stränge von geringem Molekulargewicht bewegen sich schneller als längere, schwerere Stränge. Es entstehen unterschiedlich weit gewanderte Banden. Zur Längenmarkierung lässt man eine sogenannte DNS-Leiter parallel zum Untersuchungsmaterial laufen, um die Größe der verschiedenen Banden ablesen zu können. Sie zeigt logarithmisch alle 100bp eine Bande an.

Das Ethidiumbromid interkaliert mit der DNS-Doppelhelix und wandert in dieser angereichert mit, dies verlangsamt Wanderungsgeschwindigkeit allerdings um ca. 15%. Ethidiumbromid absorbiert UV-Licht der Wellenlänge 312nm und fluoresziert im sichtbaren Bereich bei 590nm rotorange.

Erscheint nun eine Bande in erwarteter Höhe, ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß es sich dabei um die gesuchte Bande handelt.

Zur besseren Auswertung der Banden wurde das Ergebnis der Elektrophorese mit einer an den PC angeschlossenen Kamera festgehalten und im PC abgespeichert.

3.3.2. Durchführung im Labor

3.3.2.1. DNA-Extraktion mit der Chelex-Methode

Die Extraktion der DNS

- Der auf Whatman Filterpapier getrocknete Tropfen wird ausgeschnitten (5x5mm) und in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß mit 180 µl 5%-Chelex Lösung versetzt.
- Daraufhin wird das Gemisch bei 12 000 U für 30 Sekunden zentrifugiert und anschließend im Wasserbad von 100°C für 20 Minuten gekocht.
- Nun wird das Gefäß erneut zentrifugiert bei 12 000 U für 3 Minuten.
- Der Überstand von ungefähr 120 µl wird mit einer 200µl Pipette aufgenommen und in ein frisches 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben.
- Daraufhin wird wiederum der Überstand bei 12 000 U für 3 Minuten zentrifugiert.
- Der Überstand von ca. 100 µl wird in ein frisches nummeriertes 1,0 ml Eppendorf Reaktionsgefäß einpipettiert.
- Die für die PCR gereinigten DNS-Templates werden bei –20°C im Gefrierschrank gelagert.

Die von Kain und Lanar empfohlene Kühlschranktemperatur von 4°C eignet sich nicht für die langfristige Aufbewahrung der DNS. (Kain & Lanar 1991) Qualitätseinbußen im Sinne von vermindertem Ansprechen der PCR ließen sich schon nach kurzer Zeit registrieren.
Ein ausgiebigeres Zentrifugieren der Chelex Lösung mit dem Filterpapier sowie eine Verlängerung der Kochzeit konnten das Ergebnis verbessern. Eine Verkürzung beider Vorgänge war von Nachteil.
Eine Vergrößerung des Blutvolumens konnte teilweise das Ergebnis der Extraktion bessern, wobei eine zu große Menge ohne entsprechende Chelex Lösung zu einer zu geringen Menge an Überstand führte.

3.3.2.2. Amplifikation mit Hilfe der PCR

Bei der Herstellung der Ausgangssubstanzen für eine PCR wurde grundsätzlich in einem als DNS-frei geltendem Raum unter Abzugshaube gearbeitet. Verwendete Pipetten und Ständer wurden ausschließlich dafür verwendet und nach jedem Arbeitsdurchlauf mit UVC-Licht bestrahlt. Die für die PCR benötigten Substanzen wurden in einem Eisschrank innerhalb des

Raumes gelagert und nur für die jeweilige PCR aufgetaut. Speziell die Tag-Polymerase sollte nicht länger als notwendig über Temperaturen von –20°C aufbewahrt werden.
Nach Herstellung von Primer- und Mastermix wurden die Tubes auf einen anderen Ständer geladen und in einem speziellen Raum mit der DNS versehen. Die dortige Pipette und der Minishaker zum Mixen der aufgetauten DNS wurden ausschließlich dafür verwendet. Die so aufbereiteten Tubes wurden in einen dritten Raum transportiert und in die PCR-Geräte eingebracht. Hier fand dann auch die Gelelektrophorese statt.
Prinzipiell ist die Herstellung des PCR-Gemisches bei allen PCRs ähnlich. Zuerst wird mit den beiden Primern ein Primermix hergestellt. Es sollte grundsätzlich ein um 4-5 Proben größerer Ansatz berechnet werden, da beim Pipettieren immer ein wenig Flüssigkeit verloren geht bzw. ein kleiner Rückstand im Gefäß zurückbleibt.
Die jeweilige Menge an Primermix wird nun in die nummerierten 0,2ml PCR-Tube einpipettiert. Ebenso verfährt man mit dem Mastermix, der für alle Proben zusammen hergestellt, gemischt und dann auf die einzelnen Tubes verteilt wird. Die einzige Ausnahme stellt hier die nested PCR für Pfmdr-86 dar, wo die Primer in den Mastermix gegeben werden und alles zusammen nach Zentrifugation in die Tubes pipettiert wird.
Als Positivkontrollen dienten die verschiedenen Stämme von Plasmodium falciparum, die weiter unten beschrieben werden. Sie wurden zum Verdau und zur Kontrolle der PCR gebraucht. Waren diese nämlich auch negativ, müßte man daraus einen systemischen Fehler schließen, z.B. das Vergessen einer Substanz wie der Taq-Polymerase. Umgekehrt ließ sich bei einer positiven Negativkontrolle, die aus Aqua destillata anstelle von DNS bestand, auf eine Kontamination schließen.
Anschließend wird ein Tropfen Öl in jedes Tube okuliert, das einer Verdampfung während der PCR entgegenwirken soll.
Die DNS wird eingebracht. Man sollte versuchen, sie an den Tuberand zu setzen, um eine vorzeitige Mischung mit den anderen Substanzen zu vermeiden.
Nach Zentrifugation der Tubes 2 Minuten mit 12 000 U/min werden die Tubes in die PCR-Geräte gegeben.
Nach Ende des Programms läßt man die Tubes auf Zimmertemperatur abkühlen und friert sie dann zur Aufbewahrung bei –20°C ein. Für Stunden bis wenige Tage reicht auch eine Lagerung im Kühlschrank bei 4°C aus.
Handelt es sich um eine nested PCR, kann man die Templates gleich weiterbenutzen.
Es hat sich als günstiger erwiesen, die fertigen PCR-Produkte sofort weiterzuverarbeiten. Sowohl bei der Gelelektrophorese als auch beim Enzymverdau erhält man bessere Ergebnisse,

wenn die DNS nicht zwischendurch eingefroren oder längere Zeit im Kühlschrank aufbewahrt wird.

Die Primer- und Mastermixe der einzelnen PCRs setzen sich wie folgt zusammen:

Spezies

Bei dieser PCR zur Feststellung der Spezies handelt es sich um eine nested PCR. Das Blut wurde auf DNS von Plasmodium falciparum und Plasmodium vivax getestet und stellt nur eine Kontrolle der PCR im Vergleich zur mikroskopischen Arbeit dar.

PCR 1

Primermix		
rPLU5	(250µM)	2,00µl
rPLU6	(250µM)	2,00µl

Mastermix		
dNTP	(125µM)	10,00µl
PCR-Puffer		2,00µl
Taq Polymerase	(0,02U/µl)	0,08µl
Aqua destillata		4,92µl
DNA-Template		1,00µl
		20,00µl

PCR-Bedingungen:

Schritt 1 = Denaturierung:	95°C für	5,0 min
Schritt 2 = Annealing:	58°C für	2,0 min
Schritt 3 = Extension:	72°C für	2,0 min
Schritt 4 = Denaturierung:	94°C für	1,0 min

Schritte 2 bis 4: 24 mal wiederholen

Schritt 5 = Annealing:	58°C für	2,0 min
Schritt 6 = Extension:	72°C für	5,0 min

PCR 2

Primermix für *Plasmodium falciparum*:

rFAL1	(250µM)	2,00µl
rFAL2	(250µM)	2,00µl

und für *Plasmodium vivax*:

rVIV	(250µM)	2,00µl
rVIV	(250µM)	2,00µl

Mastermix wie bei PCR 1.

PCR-Bedingungen:

Schritt 1 = Denaturierung:	95°C für	5,0 min
Schritt 2 = Annealing:	58°C für	2,0 min
Schritt 3 = Extension:	72°C für	2,0 min
Schritt 4 = Denaturierung:	94°C für	1,0 min
Schritte 2 bis 4: 29 mal wiederholen		
Schritt 5 = Annealing:	58°C für	2,0 min
Schritt 6 = Extension:	72°C für	5,0 min

Als Positivkontrolle wurden hier die Stämme K1 und 3D7 verwendet.

Pfmdr

Für das Codon 86 wurden die Primer pfmdr 1-1 und pfmdr 1-2 verwendet, für Codon 1042 die Primer pfmdr 1-3 und pfmdr 1-4, für 1246 entsprechen pfmdr 1-5 und pfmdr 1-6. Primer- und Master-Mix sind in allen drei PCRs vom Mischungsverhältnis und den Materialien bis auf die jeweils variierenden Primer identisch, ebenso die Bedingungen für die Amplifikation.

Primer-Mix:

		1. Ansatz	2. Ansatz
Primer A	(10µM)	1.00µl	1.25µl
Primer B	(10µM)	1.00µl	1.25µl

Mastermix:

dNTP	(1mM)	10.00µl	4.00µl (10mM)
PCR-Puffer		2.00µl	5.00µl
Taq-Polymerase (5000U/ml)		0.08µl	0.25µl
Aqua destillata		3.92µl	33.25µl
DNA-Template		2.00µl	5.00µl
		20.00µl	50.00µl

PCR-Bedingungen:

Schritt 1 = Denaturierung:	94°C für	2,5 min
Schritt 2 = Denaturierung:	94°C für	45 sec
Schritt 3 = Annealing:	47°C für	1,0 min
Schritt 4 = Extension:	72°C für	2,0 min
Schritte 2 bis 4: 37 (25-45) mal wiederholen		
Schritt 5 = Extension:	72°C für	10,0 min

Die erwartete Bandenlänge liegt für Codon 86 bei circa 300 bp, für Codon 1042 bei ca, 400bp und für Codon 1246 bei circa 500 bp.

Pfmdr Codon 86 (nested PCR)

PCR 1

Gesamtansatz (Primer- und Mastermix werden gemeinsam hergestellt):

MDR 1	(10µM)	2,50µl
MDR 2	(10µM)	2,50µl
dNTP	(200µM)	2,00µl
PCR-Puffer		2,50µl
Taq-Polymerase	(5000U/ml)	0,12µl
Aqua destillata		12,38µl
DNA-Template		3,00µl
		25,00µl

PCR-Bedingungen:

Schritt 1 = Denaturierung:	95°C für	3,0 min
Schritt 2 = Denaturierung:	92°C für	30 sec
Schritt 3 = Annealing:	48°C für	45 sec
Schritt 4 = Extension:	65°C für	1,0 min
Schritte 2 bis 4: 44 mal wiederholen		
Schritt 5 = Extension:	65°C für	5,0 min

PCR 2

Gesamtansatz (Primer- und Mastermix gemeinsam hergestellt):

MDR 3	(10µM)	2,50µl
MDR 4	(10µM)	2,50µl
dNTP	(200µM)	2,00µl
PCR-Puffer		2,50µl
Taq-Polymerase	(5000U/ml)	0,12µl
Aqua destillata		12,38µl
PCR-Produkt		3,00µl
		25,00µl

PCR-Bedingungen:

Schritt 1 = Denaturierung:	95°C für	3,0 min
Schritt 2 = Denaturierung:	92°C für	30 sec
Schritt 3 = Annealing:	48°C für	45 sec
Schritt 4 = Extension:	65°C für	1,0 min
Schritte 2 bis 4: 29 mal wiederholen		
Schritt 5 = Extension:	65°C für	5,0 min

Die erwartete Bandenlänge beträgt ca. 500 bp.
Für die PCR des pfmdr-Gens dienten als Positivkontrollen K1 und 7G8.

Pfcrt

Nested PCR
PCR 1

Primermix:

TCRP 1	(10µM)	4,00µl
TCRP 2	(10µM)	4,00µl

Mastermix:

dNTP	(20µM)	10,00µl
PCR-Puffer		5,00µl
Taq-Polymerase	(5000U/ml)	0,25µl
Aqua destillata		24,25µl
DNA-Template		2,50µl
		50,00µl

PCR-Bedingungen:

Schritt 1 = Denaturierung:	94°C für	2,5 min
Schritt 2 = Denaturierung:	94°C für	30 sec
Schritt 3 = Annealing:	56°C für	30 sec
Schritt 4 = Extension:	60°C für	1,0 min
Schritt 5 = Extension:	60°C für	3,0 min

Schritte 2 bis 4: 44 mal wiederholen

PCR 2

Primermix:

TCRD 1	(10µM)	4,00µl
TCRD 2	(10µM)	4,00µl

Identischer Mastermix wie in 1. PCR.

PCR-Bedingungen:

Schritt 1 = Denaturierung:	92°C für	2,5 min
Schritt 2 = Denaturierung:	92°C für	30 sec
Schritt 3 = Annealing:	48°C für	30 sec
Schritt 4 = Extension:	65°C für	30 sec
Schritt 5 = Extension:	65°C für	3,0 min

Schritte 2 bis 4: 29 mal wiederholen

Als Positivkontrolle dieser PCR dienten K1 und 3D7.

DHFR

Nested PCR
PCR 1

Primermix:

M1	(0,25µM)	2,50µl
M5	(0,25µM)	2,50µl

Mastermix:

dNTP	(200µM/Base)	4,00µl
PCR-Puffer		5,00µl
Taq-Polymerase	(5000U/ml)	0,20µl
Tween 20	(1%)	0,50µl
Aqua destillata		33,30µl
DNA-Template		2,00µl
		50,00µl

PCR-Bedingungen:

Schritt 1 = Denaturierung:	94 C für	3,0 min
Schritt 2 = Denaturierung:	94°C für	1,0 min
Schritt 3 = Annealing:	50°C für	2,0 min
Schritt 4 = Extension:	72°C für	2,0 min
Schritt 5 = Extension:	72°C für	10,0 min

Schritte 2 bis 4: 39 mal wiederholen

PCR 2

Primermix:

M3	(0,25µM)	4,0µl
F/	(0,25µM)	4,0µl
oder		
M4	(0,25µM)	4,0µl
F	(0,25µM)	4,0µl

Mastermix für M3+F/ oder M4+F:

dNTP	(200µM)	6,40µl
PCR-Puffer		8,00µl
Taq-Polymerase	(5000U/ml)	0,32µl
DMSO		4,00µl
Aqua destillata		51,28µl
PCR-Produkt		2,00µl
		80,00µl

PCR-Bedingungen:

Schritt 1 = Denaturierung:	94 C für	2,0 min
Schritt 2 = Denaturierung:	94°C für	1,0 min
Schritt 3 = Annealing:	45°C für	2,0 min
Schritt 4 = Extension:	72°C für	2,0 min
Schritte 2 bis 4: 4 mal wiederholen		
Schritt 5 = Denaturierung:	94°C für	1 min
Schritt 6 =Annealing:	45°C für	1 min
Schritt 7 = Extension:	72°C für	1 min
Schritte 5 bis 7 : 34 mal wiederholen		
Schritt 8 = Extension:	72°C für	10 min

Als Positivkontrollen wurden K1, 3D7, FCR3, W2, V1/S und T9/96 gebraucht.

DHPS

Nested PCR
PCR 1

Primermix:

R2	(0,25µM)	2,50µl
R/	(0,25µM)	2,50µl

Mastermix:

dNTP	(200µM/Base)	4,00µl
PCR-Puffer		5,00µl
Taq-Polymerase	(5000U/ml)	0,20µl
Tween 20	(1%)	0,50µl
Aqua destillata		33,30µl
DNA-Template		2,00µl
		50,00µl

PCR-Bedingungen: identisch mit DHFR Nest 1

PCR 2

Primermix:

K	(0,25µM)	4,0µl
K/	(0,25µM)	4,0µl
Oder		
L	(0,25µM)	4,0µl
L/	(0,25µM)	4,0µl

Mastermix für K+K/ oder L+L/:

dNTP	(200µM)	6,40µl
PCR-Puffer		8,00µl
Taq-Polymerase	(5000U/ml)	0,32µl
DMSO		4,00µl
Aqua destillata		51,28µl
PCR-Produkt		2,00µl
		80,00µl

PCR-Bedingungen: identisch mit DHFR Nest 2

Die Positivkontrollen bestanden wie bei DHFR aus K1, 3D7, FCR3, W2, V1/S und T9/96.

3.3.2.3. Restriktionsverdau mit Endonukleasen (RFLP)

Ist nun die DNS amplifiziert und per Gelelektrophorese bestätigt worden, wird sie mit Enzymen versetzt und verdaut. Da jedes PCR-Produkt eine andere Sequenz an Basenpaaren besitzt, werden verschiedene Enzyme benötigt. Die Endonukleasen der Klasse II bedürfen keiner Cofaktoren wie ATP oder NAD+ , benötigen jedoch einen Puffer und teilweise BSA sowie die richtige Umgebungstemperatur, um optimal schneiden zu können.

Der Standard-Ansatz ohne BSA/Tube lautet:

Enzym	0,5µl
NE-Puffer X	1,0µl
Aqua destillata	1,5µl
PCR-Endprodukt	7,0µl
	10,0µl

Der Standard-Ansatz mit BSA/Tube verhält sich wie folgt:

Enzym	0,5µl
NE-Puffer X	1,0µl
Aqua destillata	1,4µl
BSA	0,1µl
PCR-Endprodukt	7,0µl
	10,0µl

Man stellte erst den Gesamtansatz für die entsprechende Zahl von Proben her, pipettierte je 3µl in ein Tube und gibt dann 7µl PCR-Produkt hinzu. Ganz wichtig war auch hier wieder das Nummerieren der Tubes. Dies sollte gerade beim Verdau im Wasserbad immer mit wasserdichten Stiften erfolgen.
Da bei höheren Temperaturen die Gefahr der Verdunstung besteht, wird empfohlen, einen Tropfen Öl auf den fertigen Ansatz zu geben.
Die Tubes werden nun mit der für sie vorgeschriebenen Temperatur für mehrere Stunden oder auch über Nacht inkubiert.
Die Proben sollten direkt nach dem Verdau auf ein Gel aufgetragen und abgelesen werden.

Als Negativkontrollen dienten ein Ansatz ohne Enzym und einer mit Enzym aber ohne DNS, d.h. mit Aqua destillata. Als Positivkontrollen wurden die amplifizierten Positivkontrollen der PCR verwendet.

Es gab nicht immer eindeutige Ergebnisse. Waren die Banden beispielsweise nicht stark genug, wurde der Verdau wiederholt, bis man sie mit Sicherheit zuordnen konnte. Oft trat die Kombination aus erwarteten Wildtyp- zusammen mit Mutationsbanden auf, was auf einen Mischtyp schließen ließ.

Man muß allerdings beachten, daß bei einem Verdau, wo nur in einem Falle geschnitten wird und anderenfalls das ganze Fragment übrigbleibt, nicht nur ein Mischtyp für das Vorhandensein der geschnittenen und ungeschnittenen Banden verantwortlich sein muß. Eine nicht ausreichende Inkubationsdauer oder ein Mangel an Enzymen kann durchaus auch zu diesem Ergebnis führen. Daher ist es immer sinnvoll, sowohl Mutation als auch Wildtyp mit je einem Enzym nachzuweisen und Kontrollen mitlaufen zu lassen, von denen man das Vedauungsergebnis kennt.

Zur Überprüfung der Vollständigkeit eines vorschriftsmäßig durchgeführten Verdaus dienen auch die sogenannte Kontrollbanden. Je nach Fragment und Enzym entstehen diese in vorher bekannter Länge und Anzahl. Sind diese nicht vorhanden, hat entweder eine Mutation in ihrem Schnittbereich stattgefunden oder der Verdau insgesamt nicht funktioniert.
Mischtypen werden im übrigen in den Tabellen, die eine Korrelation zwischen in vivo Daten und molekularen Ergebnissen darzustellen versuchen, als Mutationen geführt, da in diesem Falle nur das Vorhandensein der Mutation von Relevanz ist.

Pfmdr

Tab. 5:

Codon 86	Aminosäure	Gensequenz*
Wildtyp	Asparagin	AAT
Mutation	Tyrosin	TAT
K1	Tyrosin	TAT
7G8	Tyrosin	TAT
Apo I	Nachweis von Asparagin	
Afl III	Nachweis von Tyrosin	

* Pubmed, GenBank; Triglia & Cowman 1994; Foote *et al.* 1989; Bzik *et al.* 1987

Tab. 6:

Codon 1042	Aminosäure	Gensequenz
Wildtyp	Asparagin	AAT
Mutation	Asparaginsäure	GAT
K1	Asparagin	AAT
7G8	Asparaginsäure	GAT
Ase I	Nachweis von Tyrosin	

Tab. 7:

Codon 1246	Aminosäure	Gensequenz
Wildtyp	Asparaginsäure	GAT
Mutation	Tyrosin	TAT
K1	Asparaginsäure	GAT
7G8	Tyrosin	TAT
EcoRV	Nachweis von Tyrosin	

Pfcrt

Tab. 8 :

Codon 76	Aminosäure	Gensequenz
Wildtyp	Threonin	ACA
Mutation	Lysin	AAA
K1	Lysin	AAA
3D7	Threonin	ACA
Apo I	Nachweis von Lysin	

DHFR

Tab. 9:

Codon 16	Aminosäure	Gensequenz
Wildtyp	Alanin	GCA
Mutation	Valin	GTA
K1	Alanin	GCA
FCR3	Valin	GTA
Nla III	Nachweis von Alanin	

Tab. 10:

Codon 51	Aminosäure	Gensequenz
Wildtyp	Asparagin	AAT
Mutation	Isoleucin	ATT
K1	Asparagin	AAT
7G8,W2	Isoleucin	ATT
Tsp509 I	Nachweis von Asparagin	

Tab. 11:

Codon 59	Aminosäure	Gensequenz
Wildtyp	Cystein	TGT
Mutation	Arginin	CGT
K1	Arginin	CGT
FCR3	Cystein	TGT
Xmn I	Nachweis von Arginin	

Tab. 12:

Codon 108 (M3+F\ und M4+F)	Aminosäure	Gensequenz
Wildtyp	Serin	AGC
Mutation 1	Asparagin	AAC
Mutation 2	Threonin	ACC
K1	Asparagin	AAC
T9/96, 3D7	Serin	AGC
FCR 3	Threonin	ACC
Alu I	Nachweis von Serin	
BsrI	Nachweis von Asparagin	
BstN I	Nachweis von Threonin	

Tab. 13:

Codon 164	Aminosäure	Gensequenz
Wildtyp	Isoleucin	ATA
Mutation	Leucin	TTA
K1, 3D7	Isoleucin	ATA
V1/S	Leucin	TTA
DraI	Nachweis von Isoleucin	

DHPS

Tab. 14:

Codon 436	Aminosäure	Gensequenz
Wildtyp	Serin	TCT
Mutation	Alanin	GCT
K1	Serin	TCT
T9/96	Alanin	GCT
Mnl I	Nachweis von Serin	
MspA1	Nachweis von Alanin	

Tab. 15:

Codon 437	Aminosäure	Gensequenz
Wildtyp	Alanin	GCT
Mutation	Glycin	GGT
K1	Glycin	GGT
FCR 3	Alanin	GCT
Ava II	Nachweis von Glycin	
Mwo I	Nachweis von Alanin	

Tab. 16:

Codon 540	Aminosäure	Gensequenz
Wildtyp	Lysin	AAA
Mutation	Glutaminsäure	CAA
K1, 3D7	Lysin	AAA
TN-1 *	Glutaminsäure	CAA
Fok I	Nachweis von Glutaminsäure	

* stand nicht zur Verfügung

Tab. 17:

Codon 581	Aminosäure	Gensequenz
Wildtyp	Alanin	GCG
Mutation	Glycin	GGG
K1	Glycin	GGG
FCR 3, 3D7	Alanin	GCG
BstU I	Nachweis von Alanin	
Bsl I	Nachweis von Glycin	

Tab. 18:

Codon 613	Aminosäure	Gensequenz
Wildtyp	Alanin	GCC
Mutation 1	Serin	TCC
Mutation 2	Threonin	ACC
K1	Alanin	GCC
W2	Serin	TCC
V1/S	Threonin	ACC
Mwo I	Nachweis von Alanin	
BsaW I	Nachweis von Serin	

Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen

Pfmdr und pfcrt:

ApoI

5'…Pu▼A A T T Py…3'

3'…Py T T A A▲Pu…5'

Afl III

5'...A▼C Pu Py G T…3'

3'…T G Py Pu C▲A…5'

Ase I

5'…A T▼T A A T…3'

3'…T A A T▲T A…5'

EcoRV

5’…G A T▼A T C…3’

3’…C T A▲T A G…5’

DHFR und DHPS:

AluI

5’…A G▼C T…3’

3’…T C▲G A…5’

AvaII

5’…G▼G A/T C C…3’

3’…C C T/A G▲G…5’

BsaWI

5’…A/T▼C C G G A/T…3’

3’…T/A G G C C▲T/A…5’

BslI

5’...C C N N N N N N▼N N G G...3’

3’...G G N N▲N N N N N C C...5’

BsrI

5’…A C T G G N▼…3’

3’…T G A C▲C N….5’

BstNI

5’…C C▼A/T G G…3’

3’…G G T/A▲C C…5’

BstUI

5’…C G▼C G…3’

3’…G C▲G C…5’

DraI

5’…T T T▼A A A…3’

3’…A A A▲T T T…5’

FokI

5’…G G A T G $(N)_9$▼…3’

3’…C C T A C $(N)_{13}$▲...5’

MnlI

5’…C C T C $(N)_7$▼….3’

3’…G G A G $(N)_6$▲…5’

MspA1I

5’…C A/C G▼CG/T G…3’

3’…G T/G C▲G C/A C…5’

MwoI

5’...G C N N N N N▼N N G C...3’

3’...C G N N▲N N N N N C G...5’

NlaIII

5’…...C A T G▼…3’

3’…▲G T A C…...5’

Tsp509I

5’…▼A AT T……3’

3’…...T T A A▲…5’

XmnI

5’…G A A N N▼N N T T C…3’

3’…C T T N N▲N N A A G…5’

Tab. 19:

Reaktionsbedingungen und der Enzyme

Enzym	Inkubations-puffer	BSA	Temperatur in °C	Inkubations-Zeit in h
Afl III	3	+	37	6-12
Alu I	2	--	37	6-12
Apo I	3	+	60	6-12
Ase I	3	--	37	6-12
Ava II	4	--	37	6-12
BsaW I	2	--	60	6-12
Bsl I	3	--	55	6-12
Bsr I	3	--	65	6-12
BstN I	2	+	60	6-12
BstU I	2	--	60	6-12
Dra I	4	--	37	>12
EcoRV	3	+	37	6-12
Fok I	4	--	37	6-12
Mnl I	2	+	37	6-12
MspA1 I	4	+	37	6-12
Mwo I	U	+	60	6-12
Nla III	4	+	60	>12
Tsp509 I	1	--	65	6-12
Xmn I	2	+	37	6-12

3.3.2.4. Agarosegelelektrophorese zur Kontrolle von PCR und RFLP

Zur Zubereitung des Gels erhitzt man TAE-Puffer, der mit Wasser verdünnt und mit Agarosegel-Pulver gemischt wurde, in der Mikrowelle. Für die vorliegende Arbeit wurde grundsätzlich eine 2%ige Lösung verwendet. SeaKem und NuSieve Pulver wurden in einem Verhältnis von 3:1 gemischt. So wurde z.B. 100ml Puffer mit insgesamt 2g Pulver eine Minute lang in der Mikrowelle erhitzt. Nach kräftigem Schwenken wurde die Mischung noch mal kurz erhitzt, bis sich das Pulver vollständig aufgelöst hatte. Beim Schwenken sollte man darauf achten, daß nicht zu viele Luftblasen entstehen. Man läßt dann die Mischung bis auf ca. 60°C abkühlen, bevor man Ethidiumbromid unter Schwenken hinzufügt und alles in die mit Kämmen vorbereiteten Tabletts füllt. Um ein Auslaufen zu verhindern, werden diese mit

Klebestreifen verschlossen, die vor Einsetzen in die Kammer wieder entfernt werden. Auf 100ml Gel gibt man 2µl Ethidiumbromid. Man achte auf das Tragen von Handschuhen, da diese Substanz als mutagen und eventuell kanzerogen gilt.
Das Gel läßt man nun erkalten, was je nach Größe eine halbe bis eine Stunde dauern kann. Im Kühlschrank läßt sich der Vorgang natürlich beschleunigen. Das Gel wird daraufhin in die Kammern eingelegt, die mit TAE-Puffer soweit gefüllt sind, daß sie die Gele vollständig bedecken. Die Kämme werden entfernt.
In die PCR-Tubes wird nun 5µl Orange-Puffer/Tube eingebracht. Nach Shaken dieser werden je 10µl in eine Geltasche einpipettiert. Der Orange-Puffer erhöht die Dichte, was ein Herabsinken der DNS-Puffer-Mischung in die Geltaschen bewirkt, und verhindert damit Auslaufen und Vermischen der DNS-Lösung. Zudem hilft die Anfärbung des farblosen PCR-Produktes beim Füllen der Geltaschen und ermöglicht eine Überwachung des Eletrophoreselaufs.
In die Taschen an den Enden der Kammern und je nach Größe des Gels auch in der Mitte wird die DNS-Leiter als Marker einpipettiert, um später die Größe der Banden bestimmen zu können. Diese wird vorher mit Bromphenolblau angefärbt.
Der Deckel der Kammer wird nun geschlossen und eine Spannung von 80-120V und 100-400mA je nach Kammergröße und gewollter Wanderungsgeschwindigkeit angelegt. Erwartet man sehr kleine oder viele dicht hintereinander liegende Banden, ist es ratsam, das Gel langsam über 2-3 Stunden laufen zu lassen, was besonders bei den Enzymverdauen der Fall ist. In die Tubes der Restriktionsanalyse wird vor der Elektrophorese nur 2-3µl Orange-Puffer eingebracht.

4. Ergebnisse

4.1. Daten der *in vivo*-Studie

Zur Gruppe der ausschließlich mit Chloroquin behandelten gehörten 36 Patienten. Die mittlere Parasitämie in dieser Gruppe vor Behandlung betrug 15.140,2 Parasiten/µl (359 – 150.000). Das mittlere Alter der Patienten betrug 8,5 Jahre (1 - 49). Neunzehn (52,8 %) Therapieversager traten auf, 15 davon wurden als späte und 4 als frühe Therapieversager klassifiziert.

Die Mehrheit der 33 Isolate der Antifolat-Gruppe zeigte in vivo-Sensitivität (86,1%). Vier von fünf Therapieversagern traten spät auf, nur einer an Tag 2. Die mittlere Parasitendichte betrug vor Behandlung mit P/S 6.271,3 Parasiten/µl (480,0 – 50.700,0). Das mittlere Alter lag bei 14,5 Jahren (1 - 70).

22,6 % der 31 Patienten, die mit der Kombination von Chloroquin und Pyrimethamin-Sulphadoxin behandelt wurden, zeigten Resistenz gegen diese Medikamentenkombination. 5 Fälle von spätem und 2 von frühem Therapieversagen wurde ermittelt. 24 Patienten wurden dagegen geheilt. Die mittlere Parasitendichte lag bei 7.735,2 (600 – 100.000) Parasiten/µl und das mittlere Alter betrug 16,1 Jahre (3,00 – 60,00). (Unveröffentliche Daten der Studie; Schwoebel *et al.* 2003)

Tab. 21:

Klinik / **Patienten**	**Chloroquin**	**Antifolate**	**Kombination**
ACPR	17	28	24
LTF	15	4	5
ETF	4	1	2
Gesamt	36	33	31

4.2. PCR und Restriktionsverdau Tag 0 bis Tag 14

Alle PCRs und Enzymverdaue wurden der Vollständigkeit halber und in Hinblick auf eine andere Studie bei allen Proben am Tag 0 durchgeführt. In dieser Studie werden nur die für den jeweiligen Medikamentenarm relevanten Ergebnisse präsentiert.

Die Verlaufsuntersuchungen an den Tagen 2 oder 3, 7 und 14 werden nicht vollständig aufgeführt. Bedeutsam sind Änderungen in den entsprechenden Codons im Verlauf. Meist handelt es sich um die Entwicklung von einer Mischinfektion zu einer reinen Mutation durch

Medikamentendruck. Ab und zu war auch der Wandel von einem vermuteten Wildtyp zu einer Mutation zu beobachten. Dies ist eher nicht auf eine spontane Neumutation zurückzuführen. Es ist viel wahrscheinlicher, daß die Anzahl der mutierten Gene an Tag Null noch unter der Nachweisgrenze lag und es erst unter Therapie zu einer Selektion der Mutation kam. Bei den klinisch sensitiven, also auf die Therapie erfolgreich ansprechenden Fällen, konnte man an Tag 14 durchschnittlich in 32,3% der Fälle DNS nachgewiesen werden.

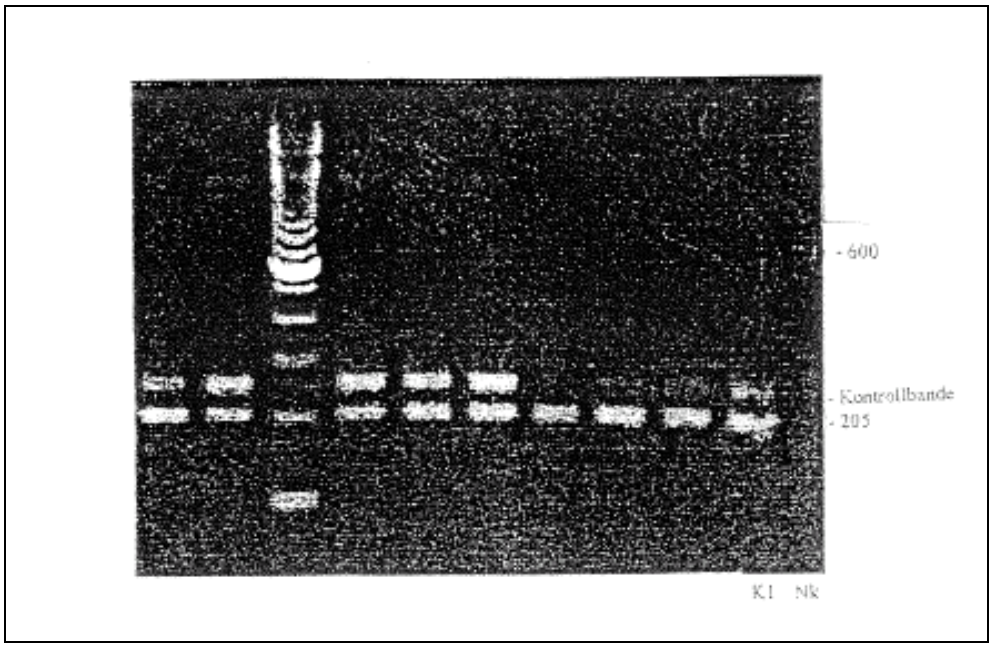
4.2.1. Spezifizierung

Mittels nested PCR mit den Primerpaaren rPLU5 und rPLU6 sowie rFAL1 und rFAL2 bzw. rVIV1 und rVIV2 kann man molekular die beiden Spezies Plasmodium falciparum bzw. Plasmodium vivax unterscheiden, indem jeweils ein Spezies-spezifisches Gen amplifiziert wird.

4.2.1.1. *Plasmodium falciparum*-Nachweis

Eine Bande von 205 bp zeigte das amplifizierte Gen an. 114 von den 119 Proben an Tag 0 waren positiv, bei den restlichen fünf lag die DNA-Menge anscheinend unter der Nachweisgrenze dieser PCR mit Parasitämien zwischen 358 und 640 Parasiten/µl. In diesem Falle war das Mikroskop also sensitiver als die PCR mit Gelelektrophorese. Die Ergebnisse von Tag 14 ergaben meist nur positive Ergebnisse bei Therapieversagern und zeigten für diese keine Abweichungen vom Tag 0.

Abb. 4:

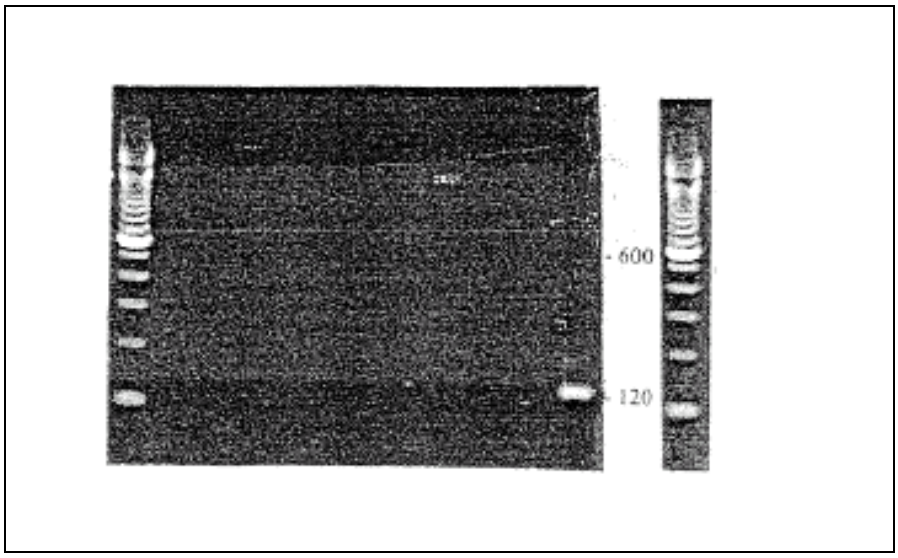


4.2.1.2. *Plasmodium vivax*-Nachweis

Das amplifizierte Gen lässt sich als Bande von 120 bp darstellen, alle Proben waren jedoch negativ - sowohl an Tag 0 als auch an Tag 14.

Mt = Mutation Wt = Wildtyp o.E. = ohne Enzym Pk = Positivkontrolle Nk = Negativkontrolle	Leitern sind teilweise zur besseren Übersicht nachträglich eingefügt.

Abb. 5:



4.2.2. Pfmdr

Die Amplifizierung des multi-drug-resistance-Gen von Plasmodium falciparum erwies sich anfangs als die PCR mit der niedrigsten Sensitivität. Im ersten Ansatz konnte bei allen Falciparum positiven Proben nur in 23,3% Codon 86, in 80,4% Codon 1042 und in 40,0% Codon 1246 nachgewiesen werden. Der zweite Ansatz erzielte eine insgesamt höhere Quote: 66,7 % jeweils für Codon 86 und 1246 sowie 83,3% für Codon 1042 aller Falciparum positiven Proben. Für die beiden relevanten Medikamentenarme Chloroquin allein und in Kombination mit S/P verschoben sich die Werte leicht. (76,1% für Codon 86, 92,5% für Codon 1042 und 50,8% für Codon 1246) Die nested PCR für Codon 86 mit den Primern MDR 1-4 erwies sich als wesentlich sensitiver (97,0% für die relevanten Medikamenten-arme), andererseits zeigte sich keine in der einfachen PCR positive Probe negativ in der nested PCR. Es ließen sich also insgesamt durch verschiedene Reaktionsansätze und andere Primer letztendlich bessere Ergebnisse erzielen, die jedoch speziell für Codon 1246 nicht mit denen der restlichen PCRs vergleichbar sind.

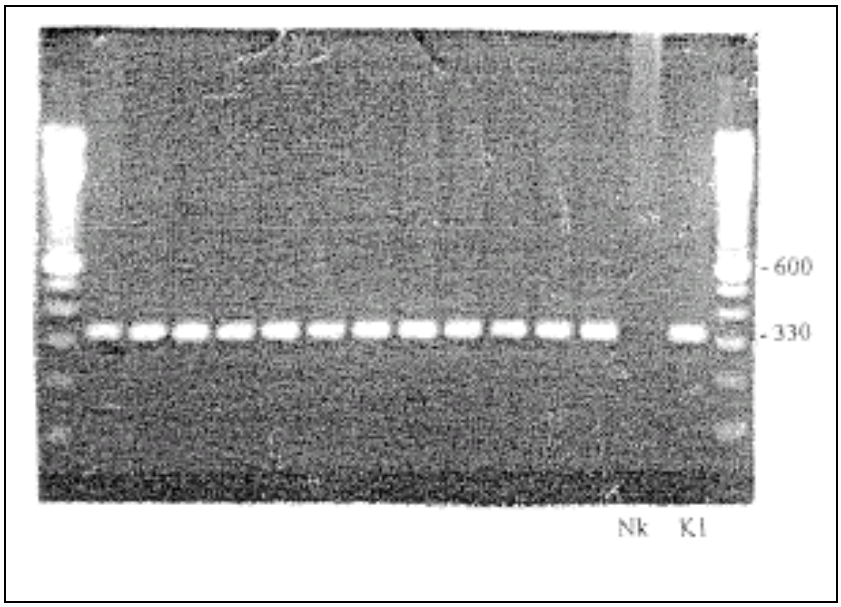
4.2.2.1. Codon 86

Einfache PCR

Mittels Primerpaar Pfmdr 1-1 und Pfmdr 1-2 ließ sich das Codon 86 auf dem pfmdr-Gen amplifizieren und in der Gelelektrophorese als Bande von 330pb darstellen.

32 der 36 Proben in der Chloroquin-Gruppe und 19 der 31 Proben der Kombinations-Gruppe waren zeigten die erwartete Bande.

Abb.6:



Das Enzym Apo I schneidet, wenn Codon 86 für Asparagin, d.h. den Wildtyp codiert, umgekehrt schneidet das Enzym Alf III, wenn Codon 86 für Tyrosin, d.h. die Mutation codiert. In beiden Fällen entstehen bei positivem Verdau Banden von 220 bp und 110 bp, findet die Restriktionsendonuklease ihre spezifische Schnittstelle nicht, bleibt die 330bp-Bande erhalten. Übereinstimmend ließen sich insgesamt 2 Mutationen, 28 Wildtypen und 3 Mischtypen in der Chloroquin-Gruppe und 1 Mutation, 15 Wildtypen und 3 Mischtypen in der Kombinationsgruppe am Tag 0 finden. Bis zum Tag 14 war keine Änderung des genetischen Status zu beobachten.

Abb.7: ApoI

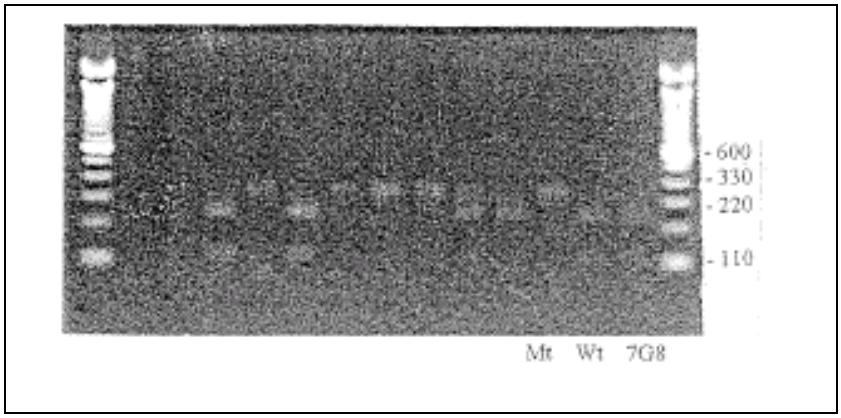
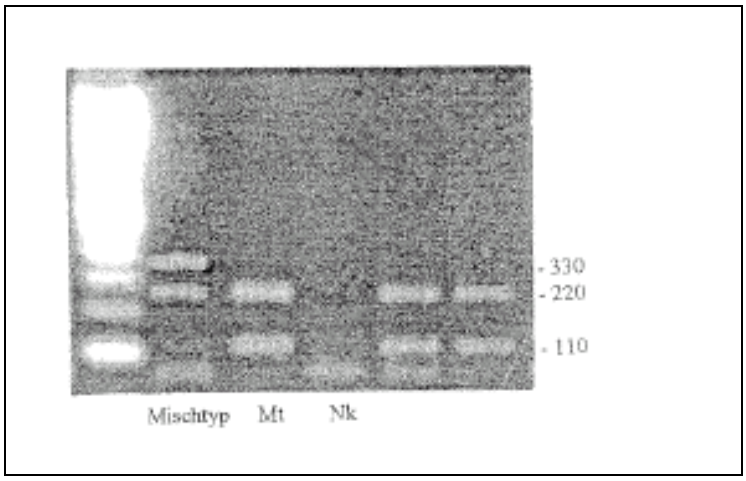


Abb.8: AflIII

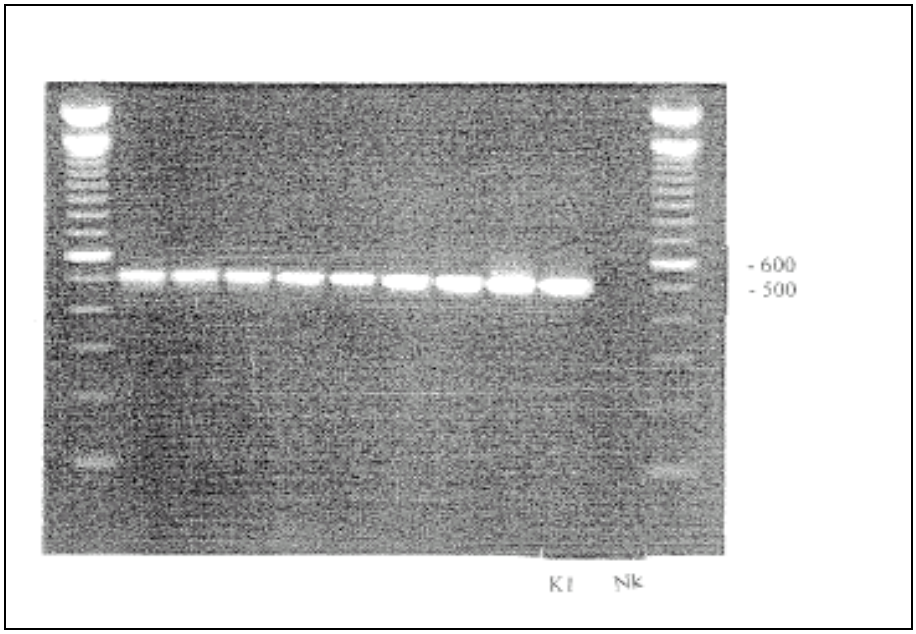


Nested PCR

Die nested PCR mit den Primern MDR1 und MDR2 sowie MDR3 und MDR4 ergab eine Bande von 500bp.

In den Gruppenarmen mit Chloroquin und mit der Kombination CLX und S/P zeigte sich in insgesamt 65 von den 67 Proben die jeweils erwartete Bande. Die nested PCR erwies sich als die sensitivere Methode. Negative Proben waren auch in der Einfach-PCR negativ.

Abb.9:



Der Verdau mit Apo I ergab für den Wildtyp eine Aufspaltung in zwei Banden von 250 bp. Der Kontroll-Verdau mit Afl III diente zum Nachweis der Mutation mit Tyrosin; ebenfalls zwei Banden von 250 bp zeigen ihr Vorhandensein.

Die 3 Mutationen sowie die 6 Mischtypen aus der ersten PCR bestätigten sich, neue kamen jedoch nicht hinzu. Der Anteil der Wildtypen vergrößerte sich somit auf 56 sowohl am Tag 0 als auch im weiteren Verlauf.

Abb.10: ApoI

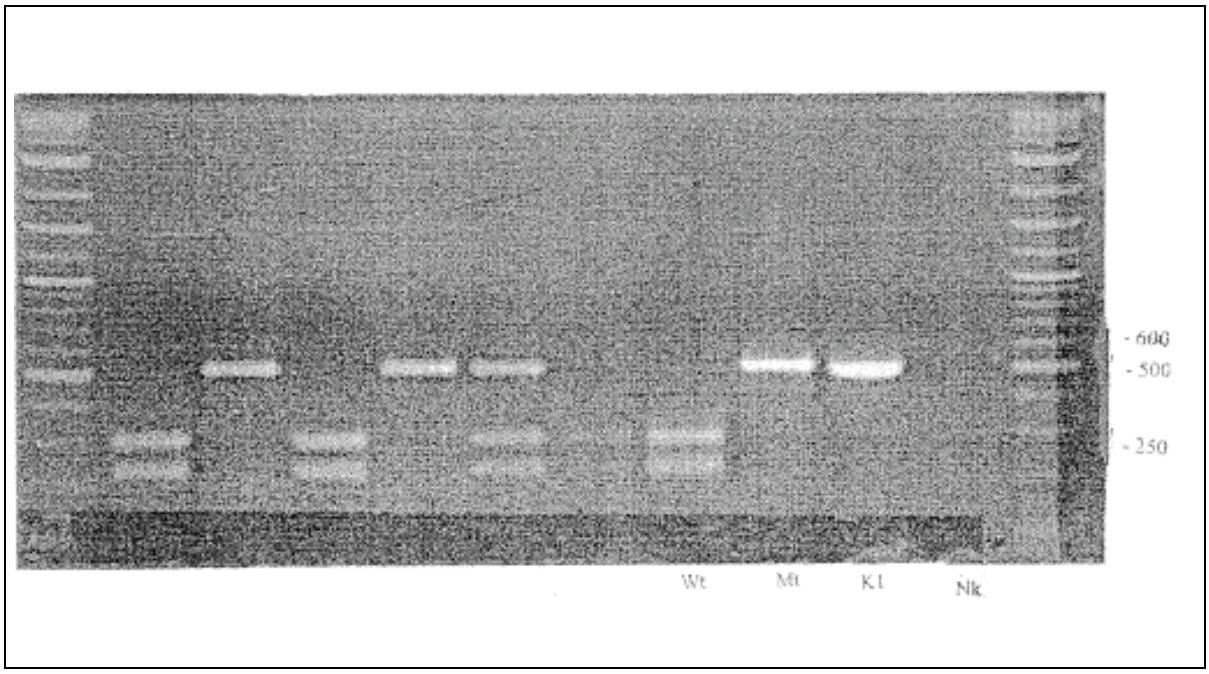
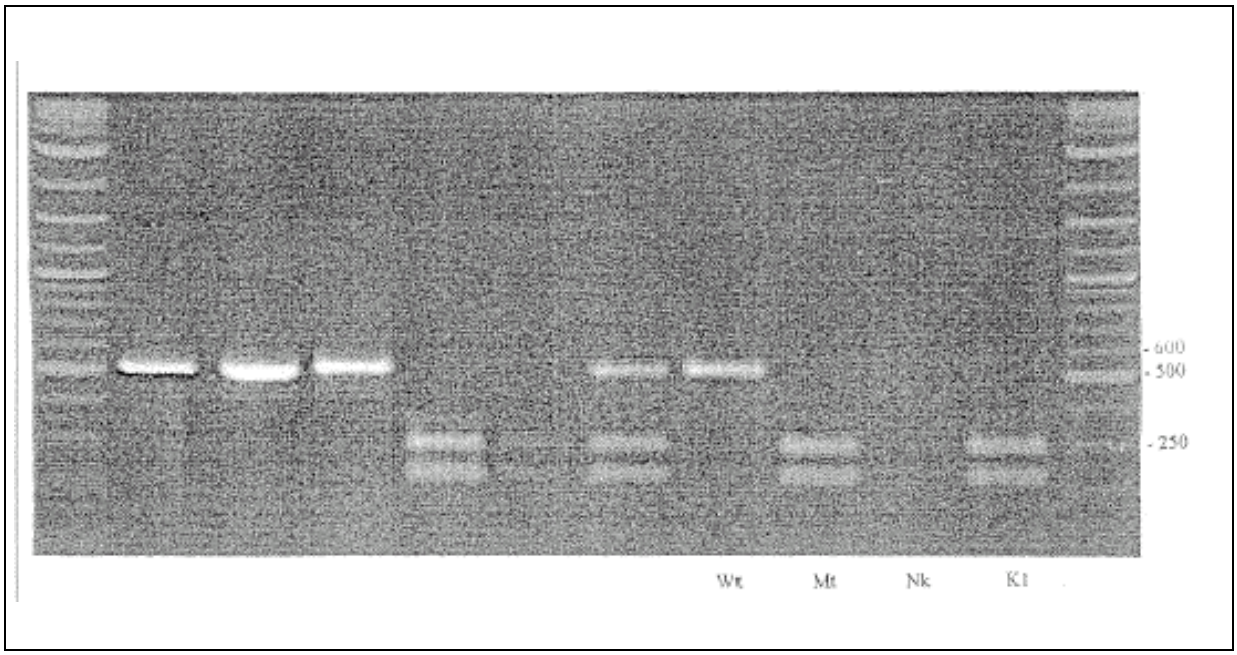


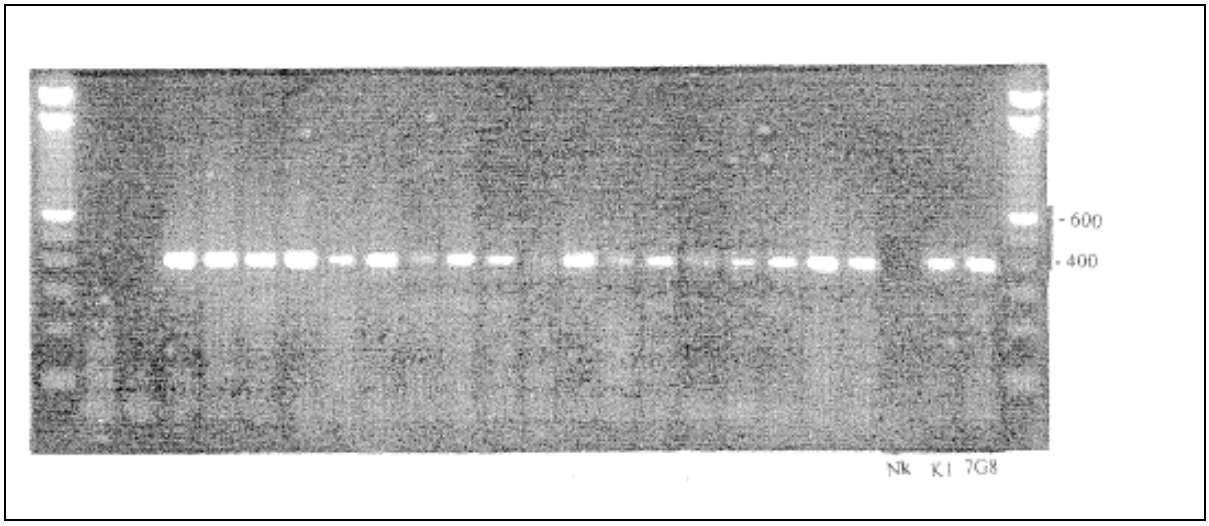
Abb.11: AflIII



4.2.2.2. Codon 1042

Für die Amplifizierung des Codons 1042 wurden die Primer pfmdr 1-3 und pfmdr 1-4 verwendet. Bei positivem Ergebnis wird eine Bande von 400bp erwartet. 62 der 67 Proben zeigten diese Bande.

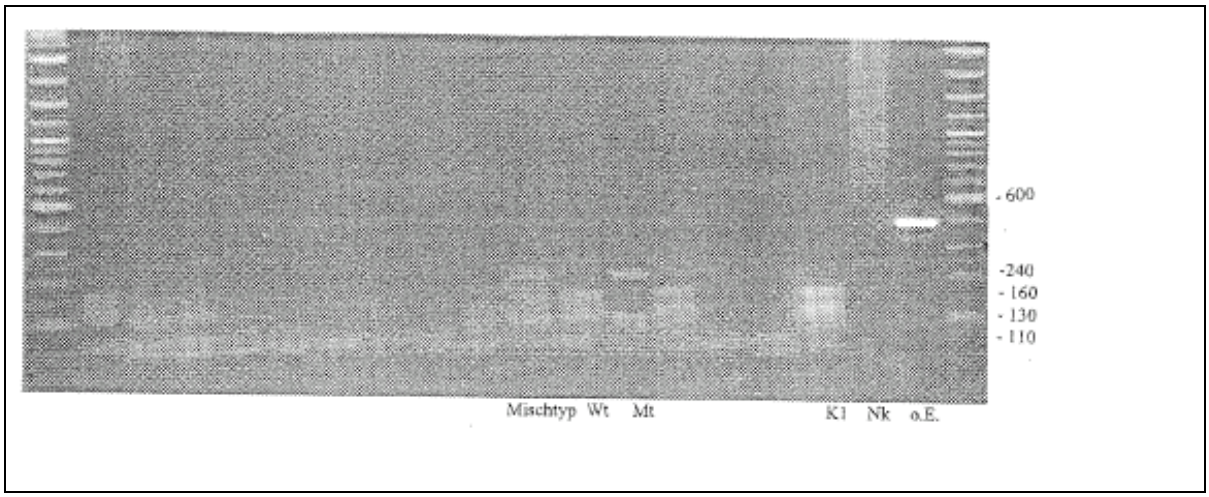
Abb.12:



Das Enzym Ase I schneidet den Genabschnitt in zwei Stücke der Bandenlänge 240 bp und 160 bp, sofern am Codon 1042 die Mutation zur Codierung von Asparaginsäure vorliegt. Das

war in 28 von den 62 Proben der Fall, wobei sich allerdings in allen diesen Proben ebenso der Wildtyp nachweisen ließ. Die Mischtypen zeigten sich an Tag 14 unverändert, es hatte keine Selektion zur Mutation stattgefunden. Der Rest der Proben, 34 an der Zahl, präsentierte ausschließlich den Wildtyp, der sich durch Codierung für Asparagin durch Codon 1042 auszeichnet. Ase I schneidet zusätzlich das 240 bp-Fragment in zwei kleinere Abschnitte, so dass man am Ende drei Banden von 160 bp, 130 bp und 110 bp erhält.

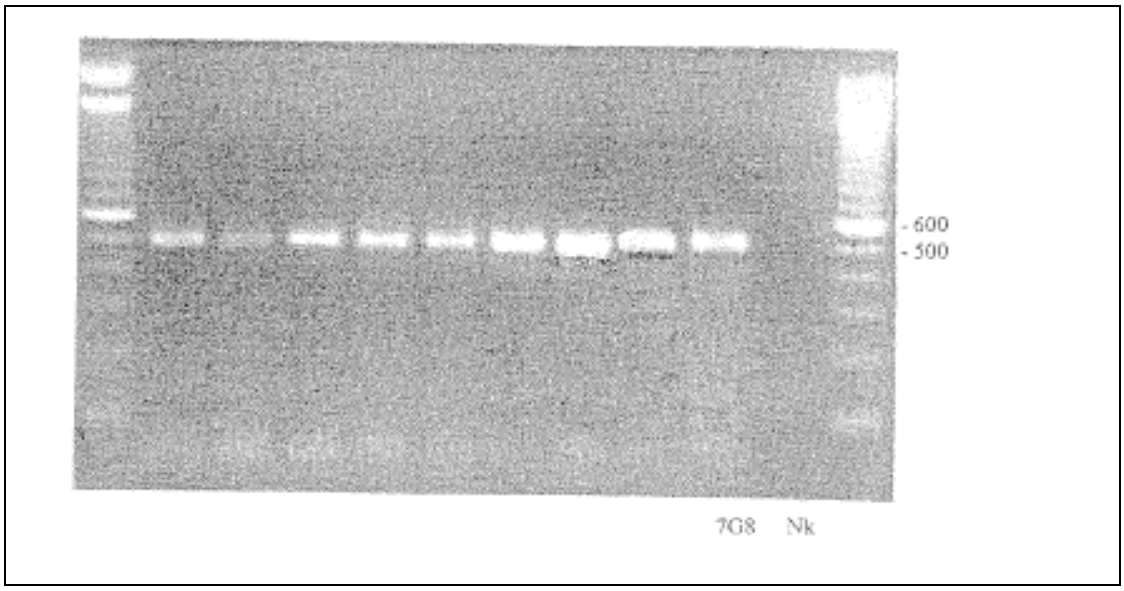
Abb.13:



4.2.2.3. Codon 1246

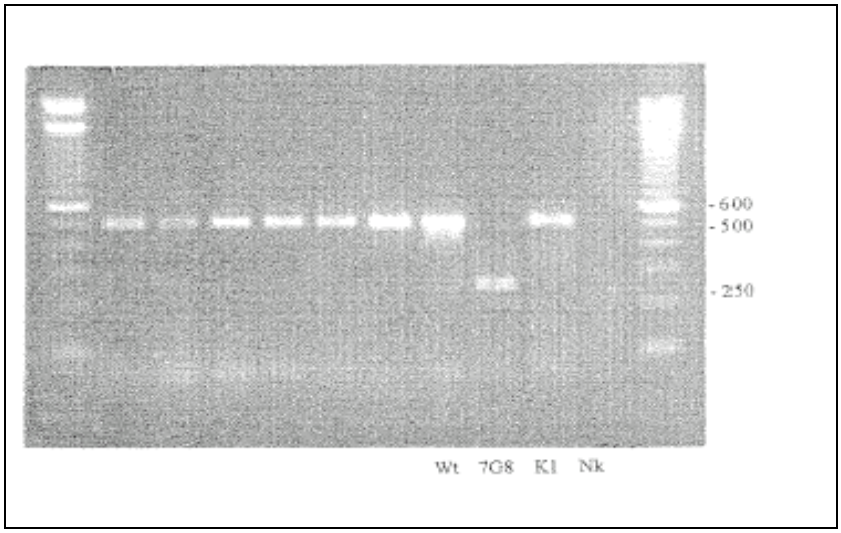
Um das Codon 1246 untersuchen zu können, wurde ein entsprechender Genabschnitt mit den Primern pfmdr 1-5 und pfmdr 1-6 amplifiziert. Leider ließ sich nur bei 34 von den 67 Proben die charakteristische Bande von 500 bp nachweisen.

Abb.14:



Verdaut wurde das PCR-Produkt mit der Endonuklease EcoR V. Das Codon 1246 enthält als mutierte Variante die Codierung für die Aminosäure Tyrosin und wird vom Enzym in zwei gleich große Fragmente mit der Bandenlänge von je 250 bp geschnitten. Dies war nie der Fall. Alle Proben zeigten vom Tag 0 bis Tag 14 den Wildtyp mit Asparaginsäure. Hierbei liegt für das Enzym keine passende Schnittstelle vor, so dass es zu keinem Verdau kommt und weiterhin eine Bande von 500 bp vorliegt.

Abb.15:

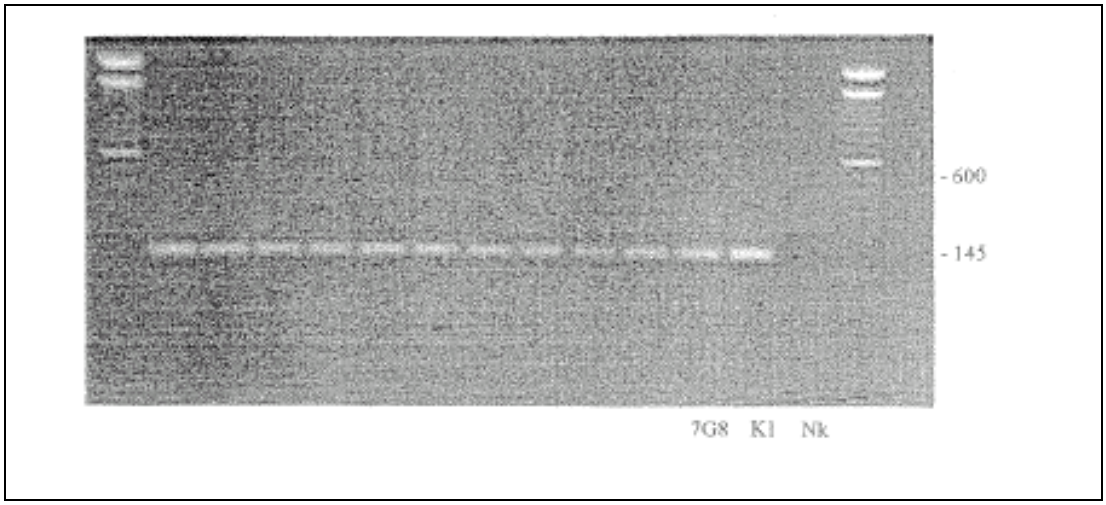


4.2.3. pfcrt

4.2.3.1. Codon 76

Die nested PCR führte zu einer Bande von 145 bp. In allen 67 Proben war dieser Genabschnitt nachweisbar.

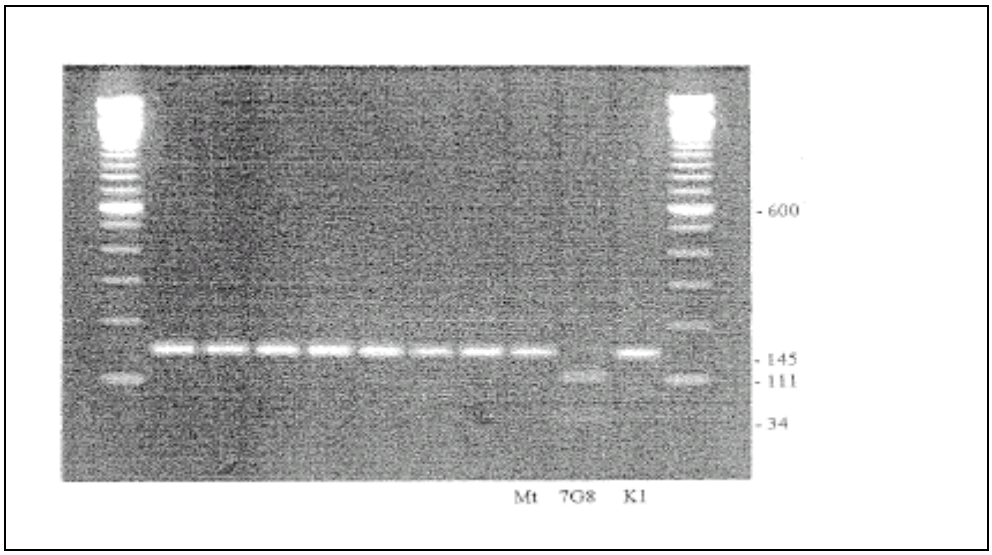
Abb.16:



Nach Enzymverdau mit Apo I zeigten sich 61 Mutationen, 4 Wild- und 2 Mischtypen am Tag 0. Am Tag 14 war der Wildtyp in den beiden Mischtyp-Proben nicht mehr nachweisbar.In den Proben mit reinem Wildtyp war an Tag 14 keinerlei Plasmodien-DNS mehr nachweisbar. Alle vier Patieten hatten auf die Therapie angesprochen.

Die Mutation im Codon 76 zeichnet sich durch die Aminosäure Lysin anstelle von Threonin aus, das beim Wildtyp zu finden ist. Das Enzym kann nur schneiden, sofern der Wildtyp vorliegt, es entstehen zwei Banden von 111 bp und 34 bp Länge. Im Falle der Mutation bleibt es bei einer Bande von 145 bp.

Abb.17:



4.2.4. DHFR

Mit der oben beschriebenen nested PCR des DHFR-Gens, die sich bei der zweiten PCR in zwei Arme aufteilt, entstehen die beiden PCR-Produkte mit der Bandenlänge von 522bp (Primer: M3 und F\) und der von 326bp (Primer : M4 und F).

59 der 63 Proben zeigten eine Bande von 522bp. Dieses Fragment wird an vier Codons untersucht mit sechs verschiedenen Enzymen. Für Codon 16, 51 und 164 wird jeweils nur ein Verdau vorgenommen. Codon 108 wird hingegen mit drei verschiedenen Restriktionsendonukleasen auf Wildtyp und zweierlei Mutationen untersucht.

Die 326bp Bande war bei 60 Patienten zu finden. Sie wird an den zwei Codons 59 und 108 untersucht. Jenes Codon 108 wird ebenfalls mit den gleichen drei Enzymen verdaut, es handelt sich dabei natürlich um dasselbe Codon, wie es sich auch auf der 522bp Bande befindet.

Abb. 18: Primer: M3 und F\

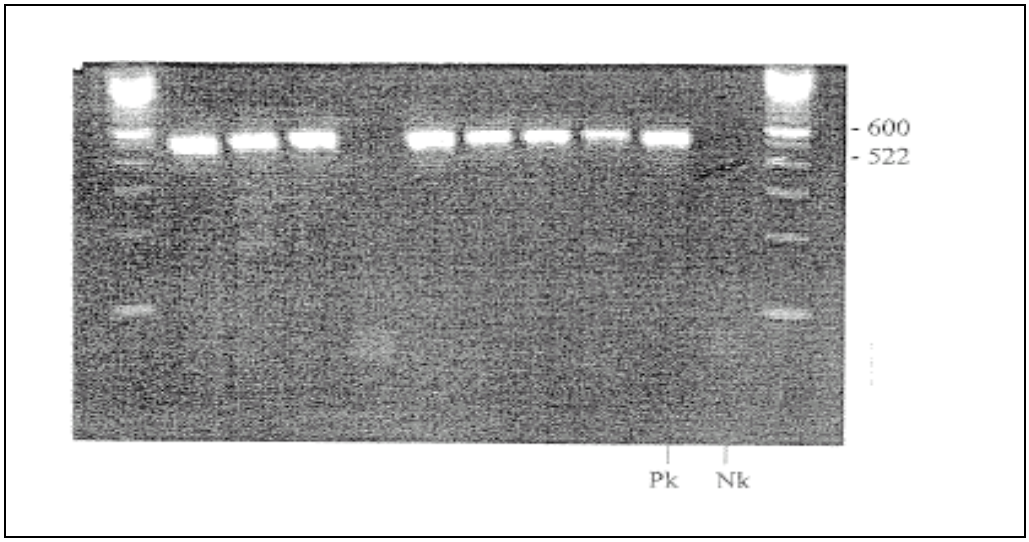
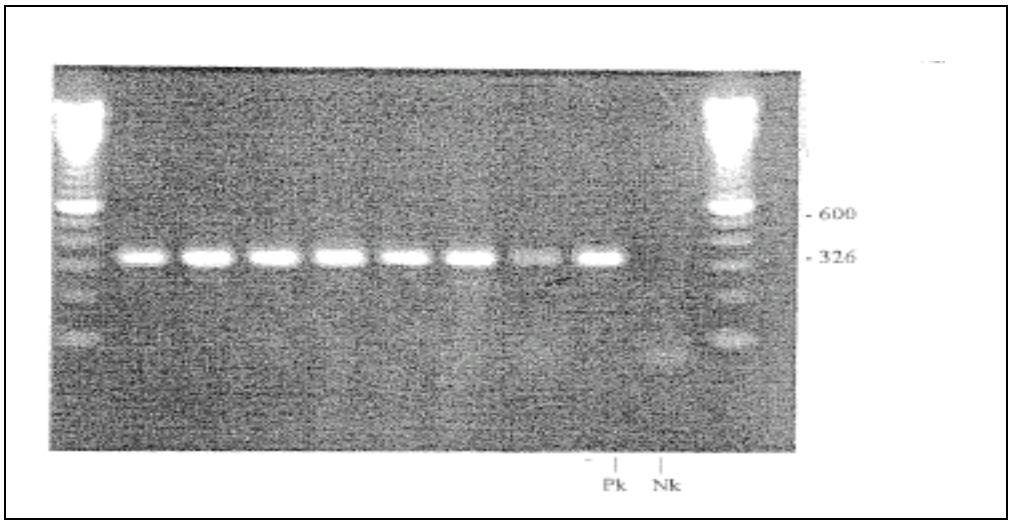


Abb. 19: Primer: M4 und F



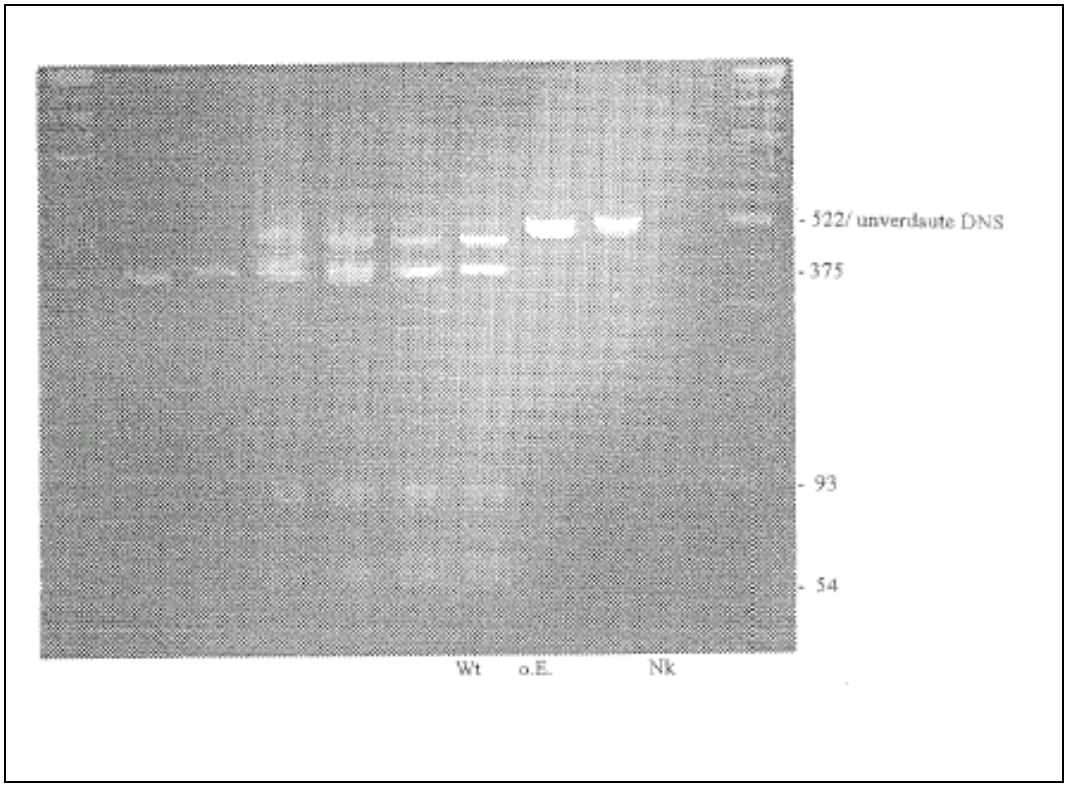
4.2.4.1. Codon 16

Das Enzym Nla III schneidet die Bande von 522bp in zwei und mehr Fragmente. Als Kontrollbande stellt sich in jedem Fall die Bande von 375bp dar.

Liegt nun die Punktmutation, die zur Aminosäure Val führt, am Codon 16 vor, schneidet Nla III das übrige Fragment nicht weiter. Eine Bande von 147bp lässt auf die Mutation schließen. Dies war bei keiner Probe bis zum Tag 14 der Fall. Alle 59 Proben wiesen den Wildtyp vor, der für die Aminosäure Alanin codiert und sich durch zwei weitere Banden zusätzlich zur Kontrollbande auszeichnet. Das Enzym zerschneidet das 147bp Fragment, wodurch die zwei Banden mit Basenpaarlänge 54 und 93 entstehen.

Die Inkubationsdauer sollte mindestens 6-12 Stunden betragen, weshalb die Proben immer über Nacht im Brutschrank verdaut wurden.

Abb. 20:

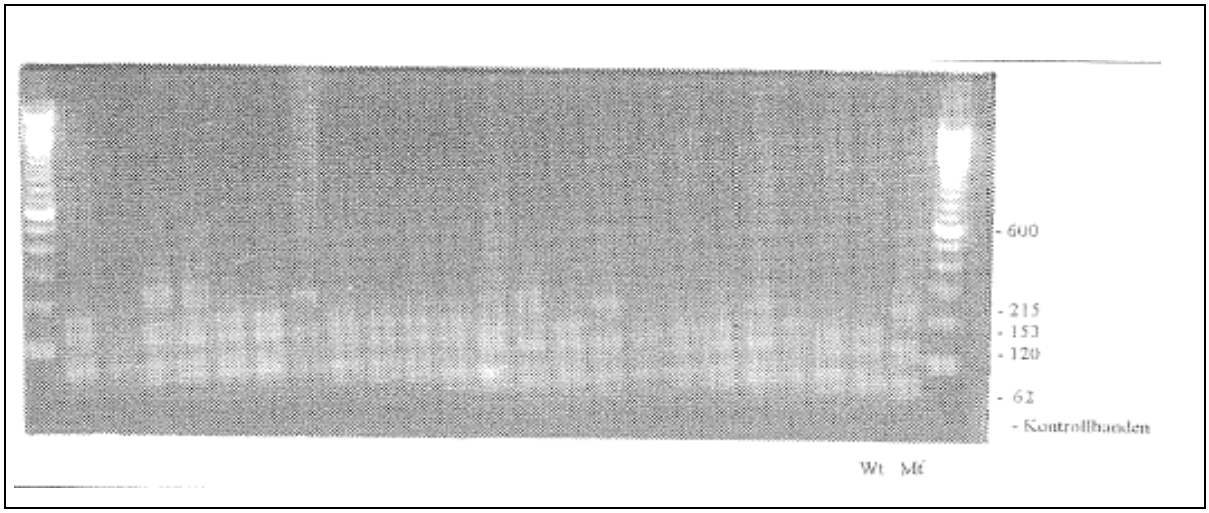


4.2.4.2. Codon 51

Um eine Mutation an Codon 51 feststellen zu könnnen, wird die 522bp Bande mit dem Enzym Tsp5091 inkubiert. Abgesehen von zahlreichen Kontrollbanden mit 5, 10, 46, 54, 67 und 120 Basenpaaren schneidet das Enzym an einer entscheidenden Stelle, die den Wildtyp nachweist. Befindet sich nämlich am Codon 51 die Codierung für die Aminosäure Serin, wird das Fragment in zwei weitere Stücke von der Basenpaarlänge 62 und 153 zerlegt. Dies traf bei 40 von 59 Proben zu.

Die Mutation zu Isoleucin läßt sich dementsprechend bei den 18 Proben vermuten, die eine Bande von 215bp zusätzlich zu den Kontrollbanden zeigten. In einem Fall waren alle hier beschriebenen Banden zu sehen, was für einen Mischtyp spricht. An Tag 14 zeigten zwei Proben, die an Tag 0 als reine Wildtypen gewertet worden waren, ein mutiertes Genom. Die Probe mit Mischtyp an Tag 0 enthielt an Tag 14 keine nachweisbare Plasmodien-DNS mehr.

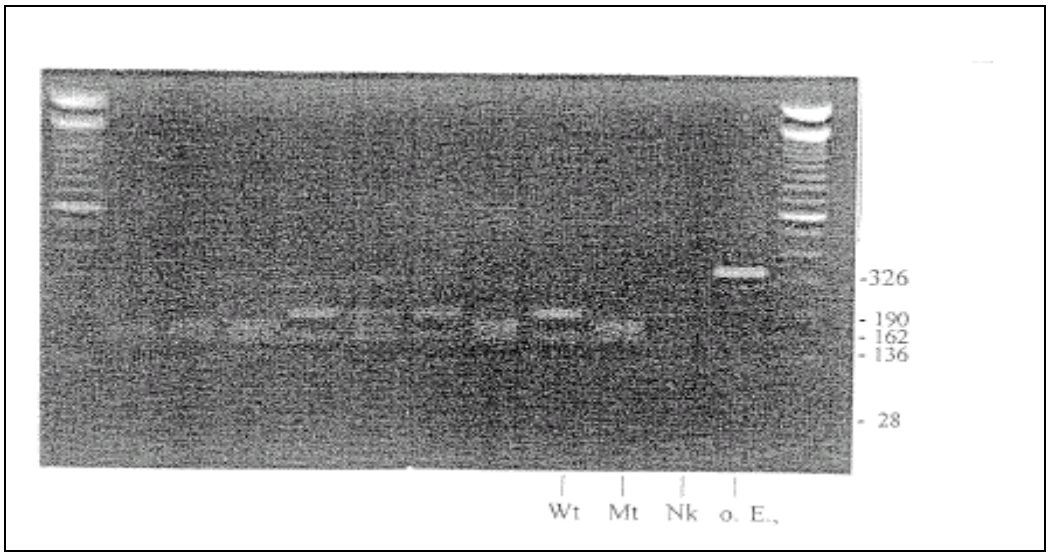
Abb. 21:



4.2.4.3. Codon 59

Die Restriktionsendonuklease XmnI weist durch ihr Verdauungsverhalten die Mutation Arginin nach, was sich durch die zwei Banden von 162bp und 28bp zeigt. Sie konnten in 49 von 60 Proben gefunden werden. Liegt der Wildtyp mit Cystein vor, wird die 190bp Bande nicht verdaut, d.h. geschnitten, und wird zusammen mit der immer vorhandenen 136bp Kontrollbanden der Gelelektrophorese sichtbar. Dies war bei 7 Proben der Fall. Die restlichen 4 Proben wiesen die sowohl den Wild-typ nachweisenden als auch die für die Mutation charakteristischen Banden auf und wurden somit als Mischtypen gewertet. An Tag 14 konnte in zwei der ehemaligen Mischtypen nur noch die Mutation nachgewiesen werden, die anderen zwei Mischtypen lieferten an Tag 14 keinerlei Hinweis auf Plasmodien-DNS mehr. Eine Wildtyp-Probe von Tag 0 präsentierte sich an Tag 14 als reine Mutation, was zu einer Gesamtanzahl der Mutationen von 52, der Wildtypen von 6 und der Mischtypen von 2 führte.

Abb. 22:



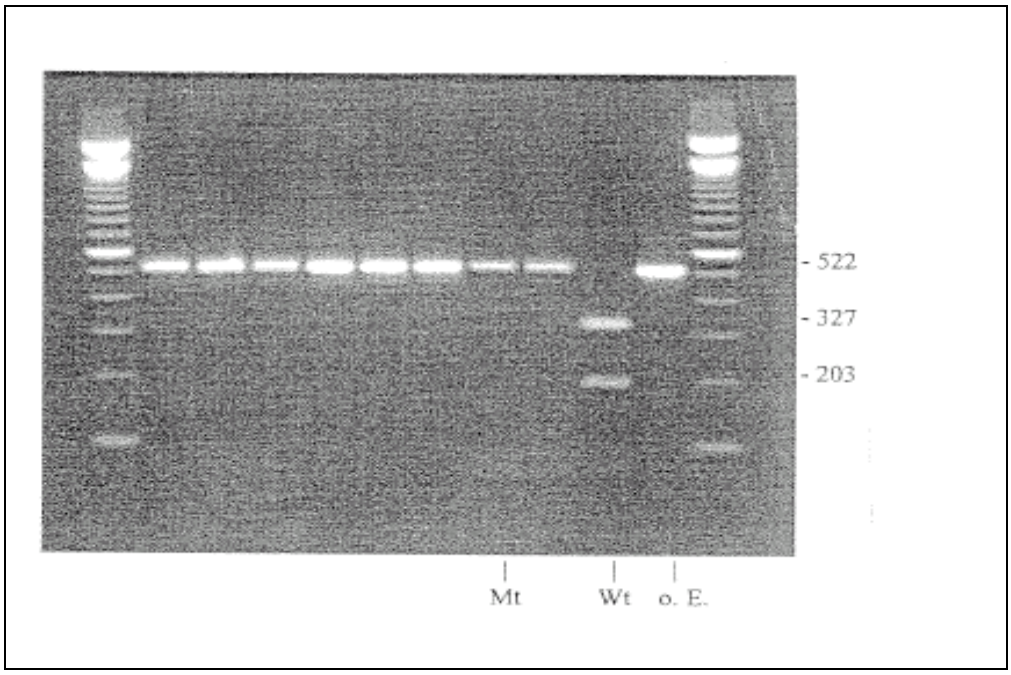
4.2.4.4. Codon 108

Für dieses Codon standen nun pro PCR-Produkt drei Verdaue zur

Verfügung, um letztendlich die eine ausschlaggebende Aminosäure aufzuspüren.

Dies dient der besseren Kontrolle sowie der Bestimmung der Vorhandenen Mutation und würde bei Ausschluß aller drei bekannten Varianten, die Entdeckung einer neuen Mutation ermöglichen. Mischtypen sind wie immer durch das Vorhandensein der mutations- und widltypspezifischen Banden gekennzeichnet. Die Endonuklease Alu I weist den Wildtyp an Codon 108 nach, der für die Aminosäure Serin codiert. Das 522bp PCR-Produkt wird bei Vorhandensein des Wildtyps in die Fragmente der Längen 327bp und 203bp geschnitten. Andernfalls findet kein Verdau statt, was eine der anderen zwei bekannten Mutationen vermuten lässt.

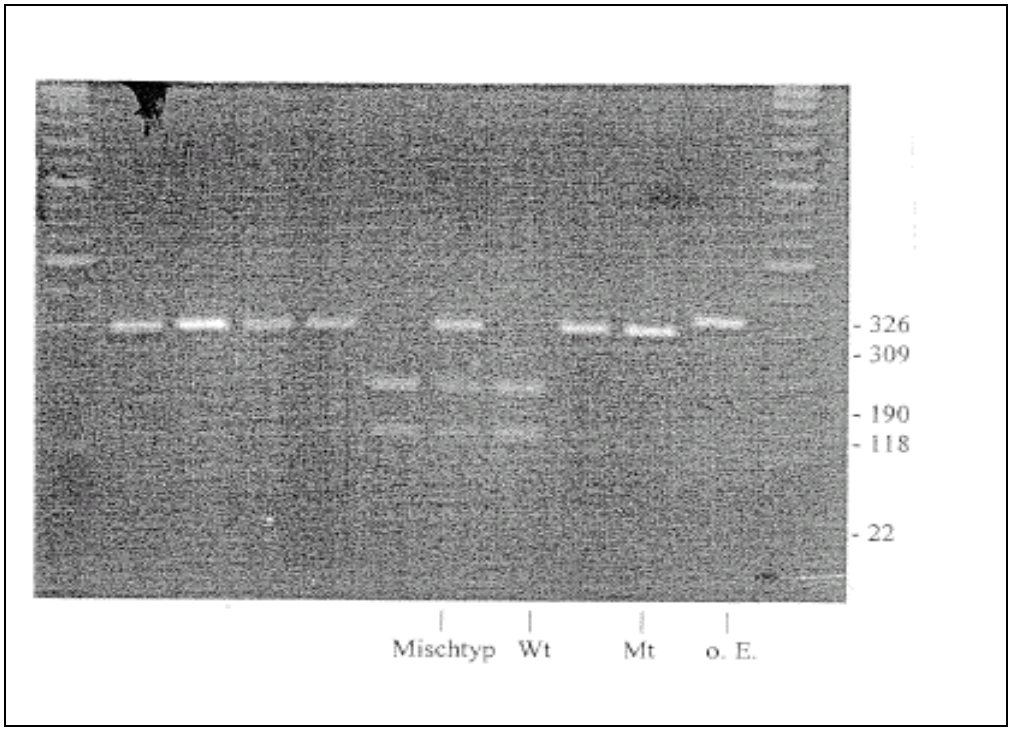
Abb. 23:



Ähnlich gestaltet sich das beim Verdau des 326bp Fragmentes mit Alu I. Für den Wildtyp spricht die Zerlegung des PCR-Produktes in zwei Fragmente der Länge von 190 und 119 Banden. Befindet sich nicht die Codierung für Serin am Codon 108, unterbleibt dieser Schritt und es kann eine Bande von 309bp kann beobachtet werden.

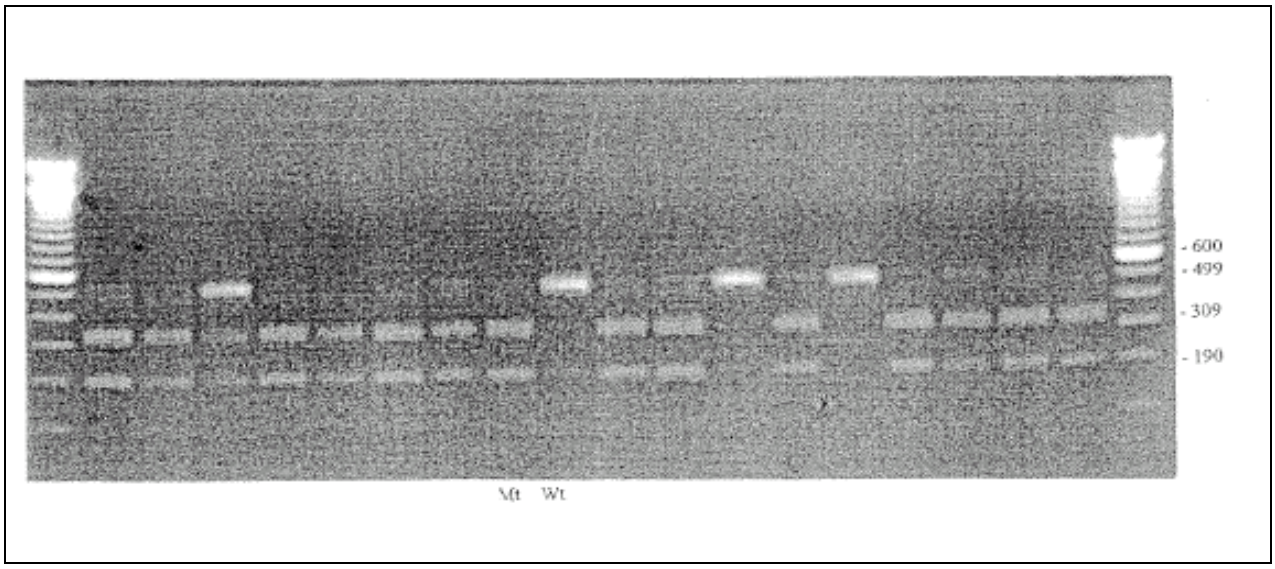
Eine Kontrollbande von 22bp findet sich stets.

Abb. 24:



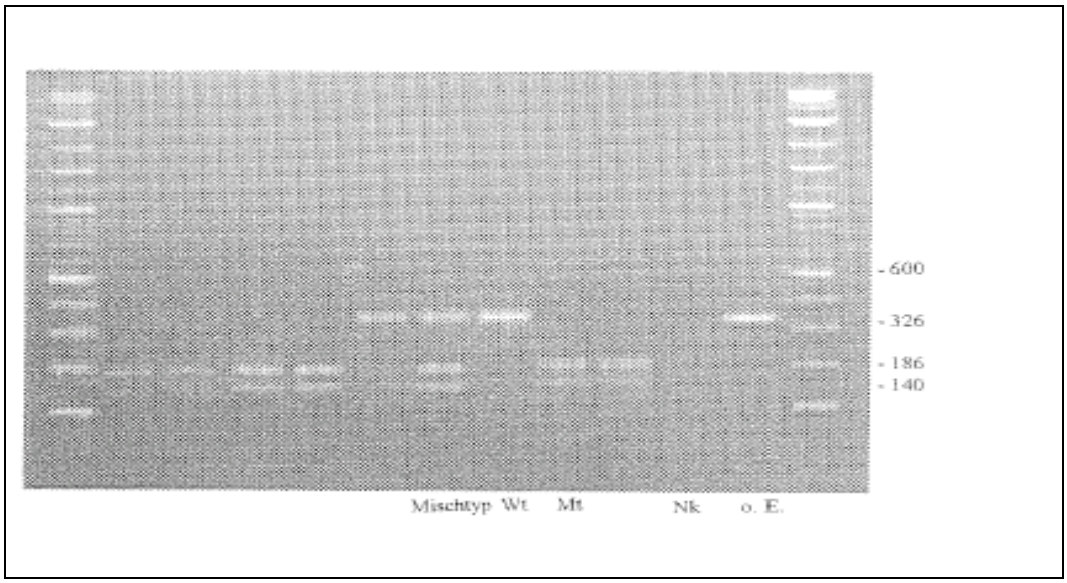
Um die Mutation zur Aminosäure Asparagin nachzuweisen, inkubiert man das 522bp Fragment mit dem Enzym Bsr I. Das PCR-Produkt wird neben einer immer vorhandenen Kontrollbande von 22bp in zwei Fragmente der Länge von 190 und 309 Basen geschnitten.
Liegt der Wildtyp mit der Codierung für Serin am Codon 108 vor, bleibt dieser Schnitt aus, es lässt sich nur eine Bande von 499bp zusammen mit der Kontrollbande im Gel sehen.

Abb. 25:



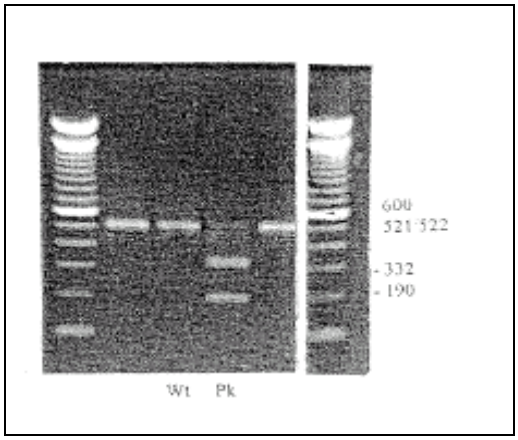
Genauso wird mit dem 326bp PCR-Produkt verfahren. Die enstehenden Fragment besitzen andere Längen, aber auch hier wird die Asparagin-Mutation nachgewiesen. Ist diese vorhanden, entstehen zwei Stücke der Länge 140 und 186 Basenpaare. Bleibt anderenfalls das Fragment unverdaut d.h. ungeschnitten, wird das als Wildtyp mit Serin interpretiert. Eine Kombination dieser Banden lässt entweder auf einen Mischtyp, eine nicht ausreichende Inkubationsdauer oder einen Mangel an Enzymen schließen. Daher ist es immer sinnvoll, sowohl Mutation als auch Wildtyp mit je einem Enzym nachzuweisen und Kontrollen mitlaufen zu lassen, von denen man das Vedauungsergebnis kennt.

Abb. 26:



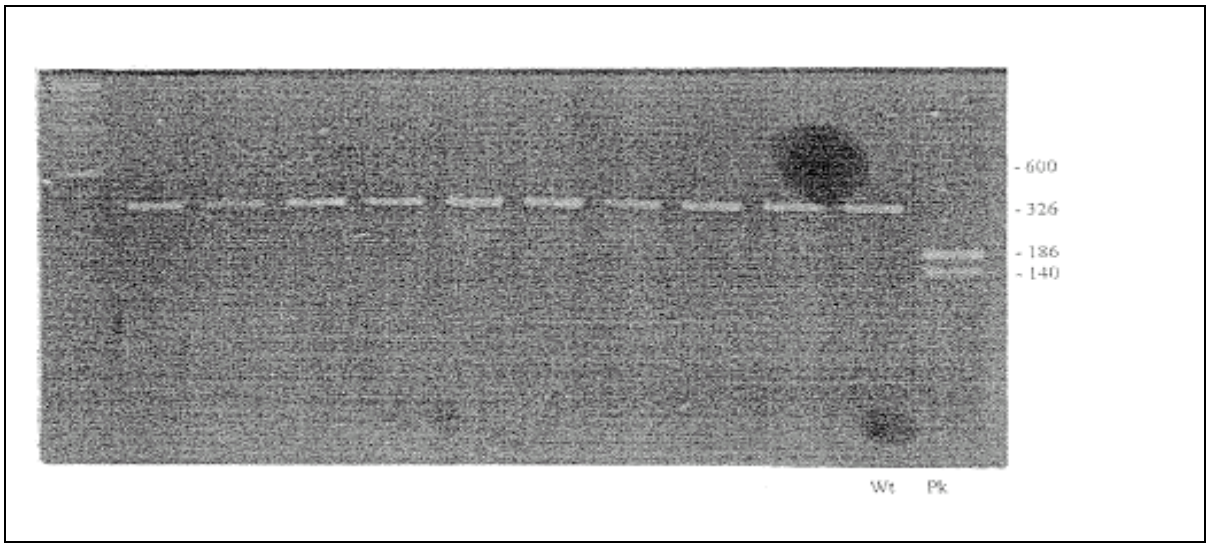
Für den Nachweis der Aminosäure Threonin benötigt man das Restriktionsenzym BstN I. Schneidet dieses das 522bp PCR-Produkt in zwei Fragmente der Länge 332 und 190 Basenpaare, spricht das für die Mutation an diesem Codon, das für Threonin codiert. Andernfalls zeigt sich ein Fragment mit 521 Basenpaaren.

Abb. 27:



Das 326bp-Fragment wird von BstN I in zwei Stücke der Länge von 186 und 140 Basenpaaren zerlegt, sofern die Mutation vorhanden ist. Liegt das Codon des Wildtyps oder der Asparagin-Mutation vor, findet kein Verdau statt, das Fragment zeigt sich in voller Länge.

Abb. 28:



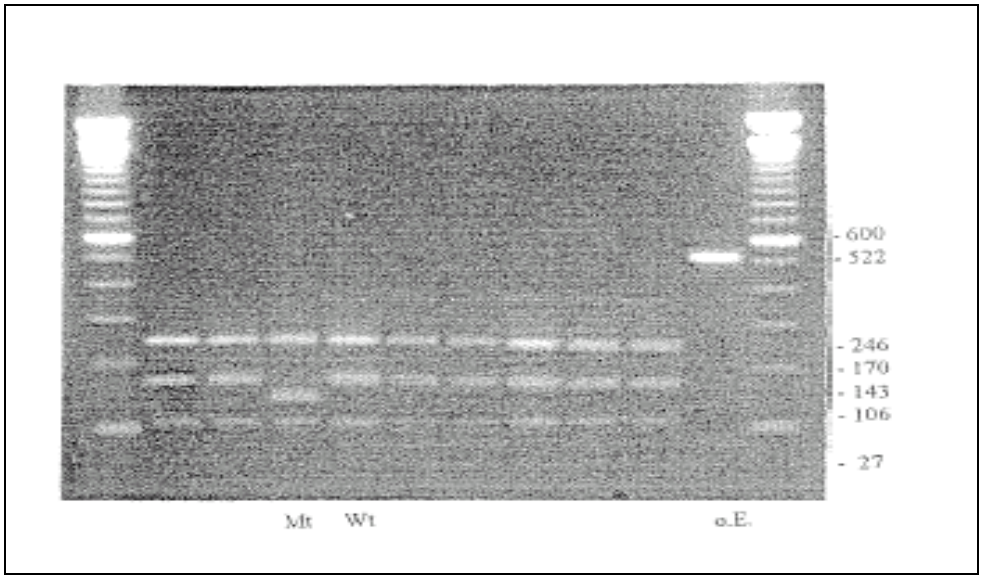
Übereinstimmend konnten 45 von 59 Proben als Asparagin-Mutation und nur 4 als Wildtypen gewertet werden. Die restlichen 10 Patienten trugen sowohl den Wildtyp als auch die Asparagin-Mutation in sich. Es kam kein Fall von Threonin-Mutation in diesem Probenkollektiv vor. Dies änderte sich auch nicht an Tag 14. Allerdings war in drei der zehn Mischtyp-Proben nur noch die Asparagin-Mutation zu finden. Die restlichen sieben wiesen an Tag 14 keinerlei Plasmodien-DNS mehr auf.

4.2.4.5. Codon 164

Zum Nachweis der Mutation an Codon 164 dient die Restriktionsendonuklease Dra I. Sie führt beim Verdau zum Entstehen mehrerer Fragmente, stets zu den Kontrollbanden von 106 und 246 Basenpaaren. Im Falle der Mutation mit Leucin an Codon 164 entstehen weitere zwei Banden der Basenpaarlänge von 27 und 143. Diese Konstellation zeigte sich in keinem der 59 Fälle.

Eine Bande von 170bp ließ auf den Wildtyp schließen. Dies betraf alle Proben in diesem Kollektiv. Eine lange Inkubationszeit ist bei diesem Verdau notwendig. Die Proben wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die sehr seltene Mutation wurde in der Chloroquingruppe an Tag O einmal gefunden wurde, was keine Konsequenzen für diese Studie hatte. Die Mutation ist damit aber in Laos vorhanden.

Abb. 29:



4.2.5. DHPS

Bei der nested PCR des DHPS-Gens enstehen nach der gemeinsamen ersten PCR zwei verschiedene PCR-Produkte aus der zweiten PCR analog zum DHFR-Gen.

Mit den Primern K und K\ entsteht ein Fragment mit der Länge von 438 Basenpaaren, das mit fünf verschiedenen Enzymen an 3 Codons untersucht wird.

In 61 von 67 Proben konnte diese Bande nachgewiesen werden.

Die Primer L und L\ führen zur Amplifikation eines 161bp-Fragmentes, das mit vier verschiedenen Enzymen an zwei Codons untersucht wird. Der Nachweis einer Bande dieser Länge erfolgte bei 64 Patienten dieses Kollektivs.

Die doppelte Untersuchung mancher Codons diente auch hier der besseren Kontrolle.

Abb. 30: Primer: K und K\

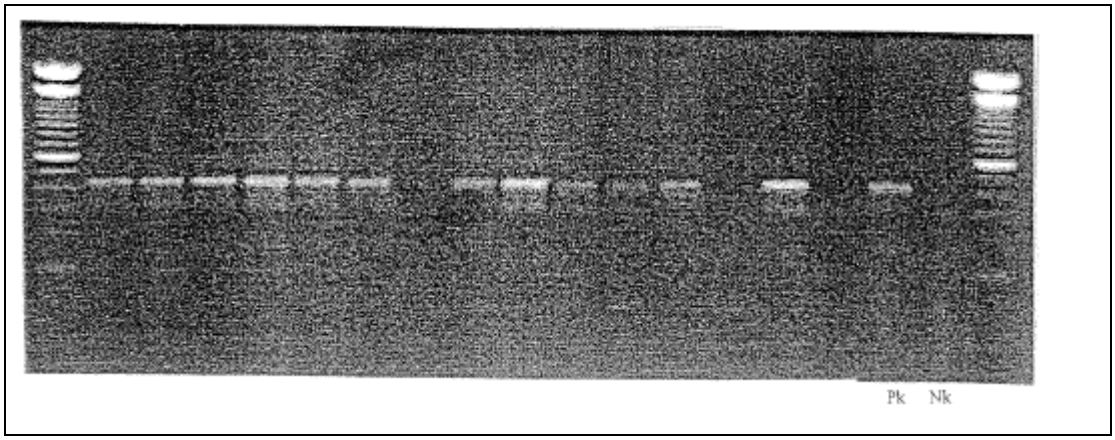
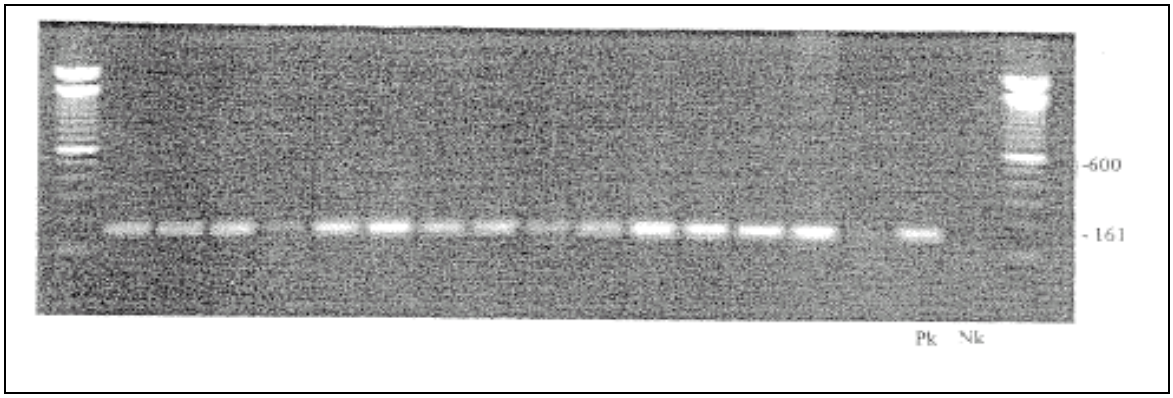


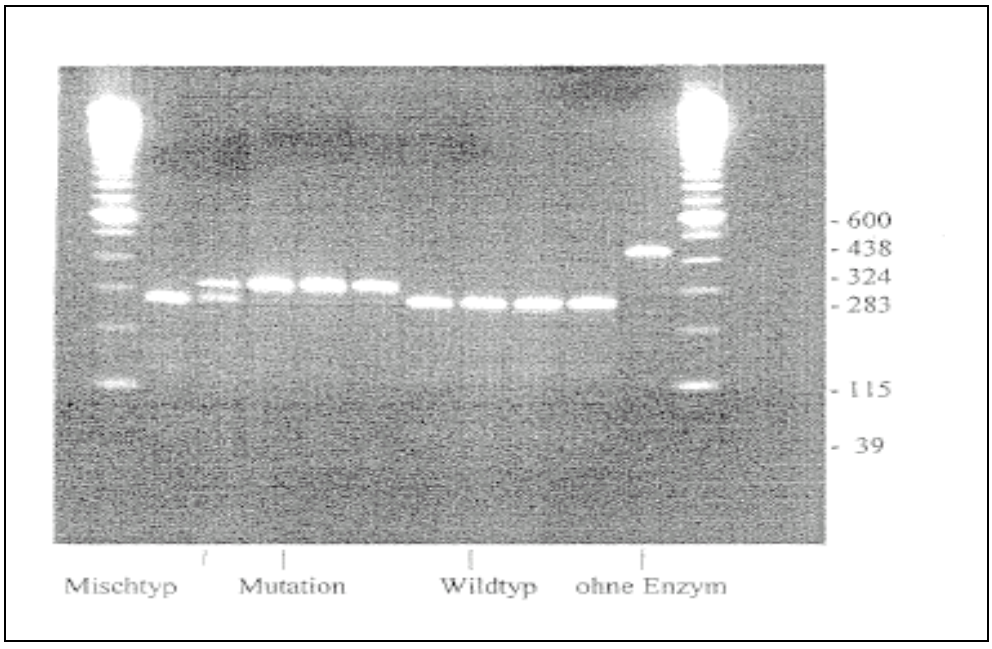
Abb. 31: Primer L und L\



4.2.5.1. Codon 436

Der Wildtyp von Codon 436 codiert für die Aminosäure Serin. Diese lässt sich mit dem Enzym Mnl I nachweisen, welches das PCR-Produkt von 438bp in drei Fragmente schneidet. Bedeutsam für den Wildtyp sind die Banden der Länge 39bp und 283bp. Die 115 bp Bande stellt nur eine Kontrollbande dar, die auch im Falle einer Mutation zur Codierung von Alanin entsteht. Die für den Wildtyp charakteristische Teilung der 324bp Bande findet beim Vorliegen der Mutation nicht statt.

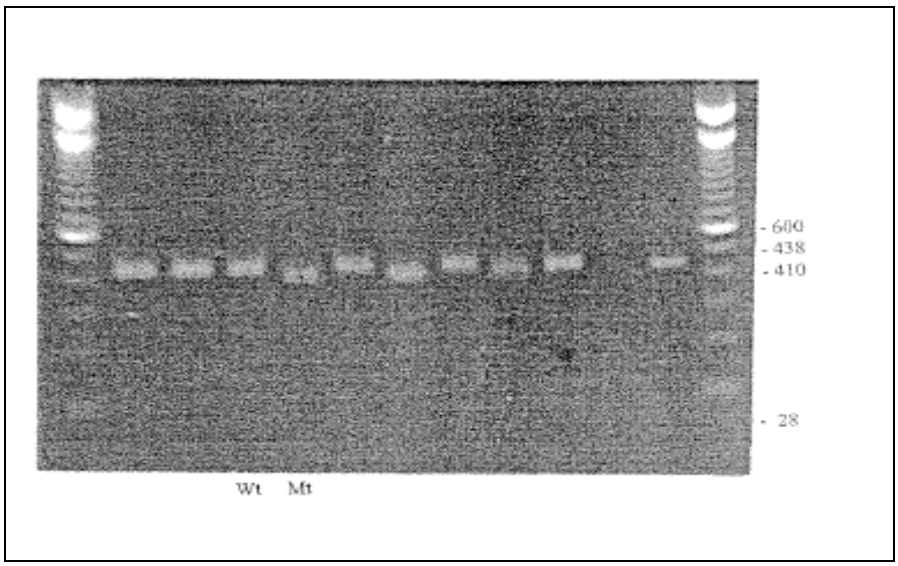
Abb. 32:



Beweisend für die Alanin-Mutation ist der Verdau mit der Endonuklease MspA1. Sie schneidet das PCR-Produkt in zwei Fragmente, wovon eines ca. 410bp und das andere 28bp Länge besitzt. Für die Differenzierung zum Wildtyp entscheidend ist, dass MspA 1 bei

Vorliegen des Wildtyps, der für Serin codiert, gar nicht schneidet und durch eine 438bp Bande dargestellt wird.

Abb. 33:



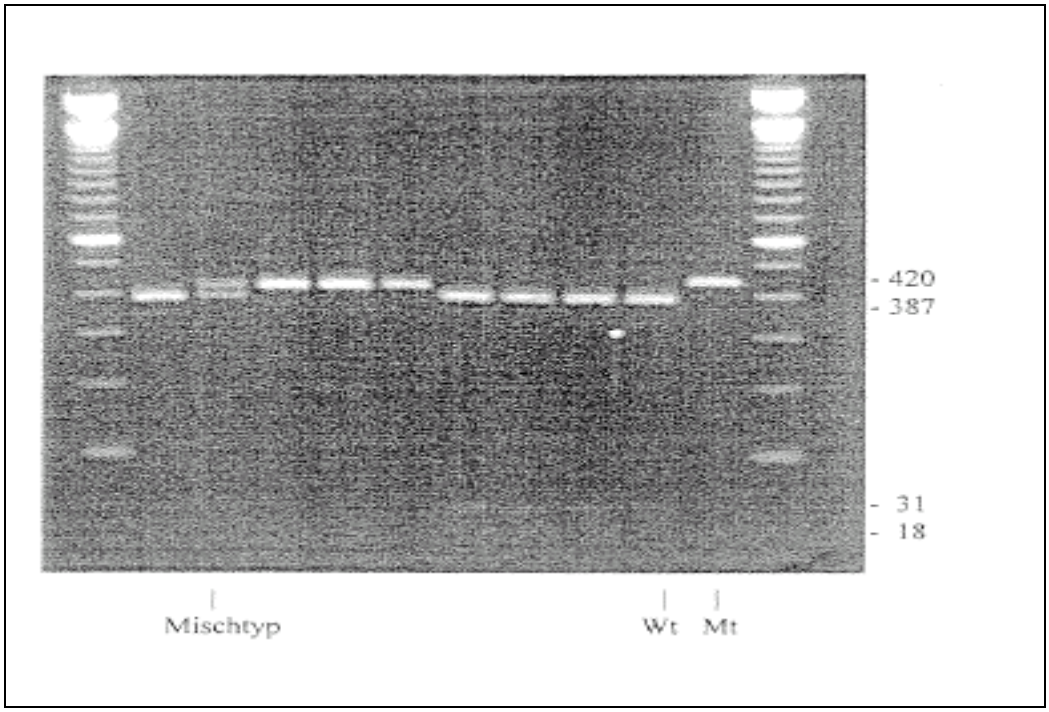
Übereinstimmend ließen sich 6 von 61 Proben an Tag 0 als Mutation auswerten. 5 Proben waren als Mischtypen zu definieren. Die restlichen 50 Patienten trugen nachweisbar nur die Wildtyp-DNS in sich.

An Tag 14 konnte in vier Proben, die an Tag 0 als Wildtyp eingestuft worden waren, nur noch mutiertes Genom nachgewiesen werden. An einer Probe konnte man den Verlauf besonders gut beobachten. An Tag 0 ließ sich nur Wildtyp-DNS nachweisen, an Tag 7 war das Amplifikat als Mischtyp und an Tag 14 als reine Mutation einzuschätzen. Vier Mischtyp-Proben von Tag 0 wiesen an Tag 14 keinerlei Plasmodien-DNS mehr nach, der fünfte Patient mit Mischtyp musste als früher Therapieversager am zweiten Tag mit Chinin behandelt werden und konnte deshalb nicht weiterverfolgt werden.

4.2.5.2. Codon 437

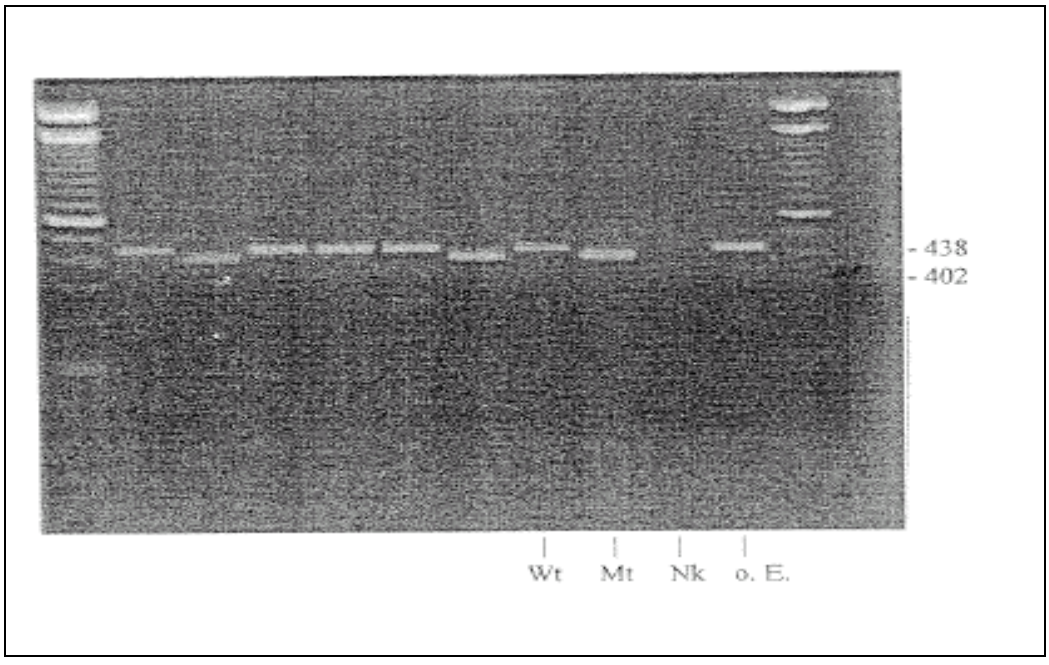
Die Untersuchung des Polymorphismus an Codon 437 wird ebenso mit zwei verschiedenen Ansätzen unternommen. Zum Nachweis des Wildtyps, der für die Aminosäure Alanin codiert, wird die Restriktionsenonuklease Mwo I verwendet. Sie schneidet das PCR-Produkt von 438pb zweimal. Die Kontrollbande von 18bp entsteht bei jedem Verdau unabhängig von der Base im Codon 437. Beweisend für den Wildtyp ist das Entstehen von zwei Banden der Länge 31bp und 387bp. Im Falle der Mutation, die zum Austausch von Alanin zu Glycin führt, wird an dieser Stelle nicht geschnitten, es bleibt eine Bande von 420bp.

Abb. 34:



Um Glycin als Mutation nachzuweisen, bedarf es des Restriktionsenzyms Ava II, welches das PCR-Produkt in die beiden Fragment von der Länge 36bp und 402bp zerteilt. Handelt es sich um den Wildtyp, erfolgt bei Inkubation mit Ava II kein Verdau, die Bande behält ihre Länge von 438 Basenpaaren.

Abb. 35:



Übereinstimmend konnten 11 Mutationen,11 Misch- und 39 Wildtypen an Tag 0 nachgewiesen werden.

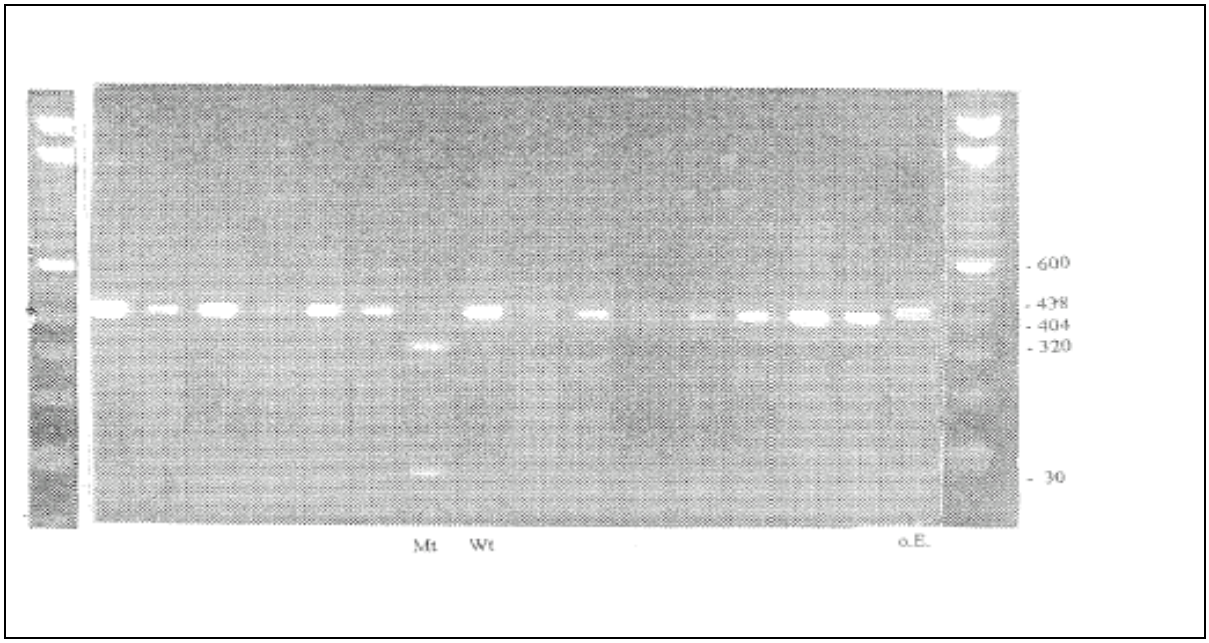
Bis zum Tag 14 gab es hauptsächlich Veränderungen bei den Mischtypen. In sechs Proben konnte man keinerlei Plasmodien-DNS mehr amplifizieren, drei der Mischtypen hatten sich von der Wildtyp-DNS befreit und mussten als reine Mutation gewertet werden. Bei zwei Patienten mit Wildtyp-DNS konnte an Tag 14 nur noch die Mutation in Codon 437 festgestellt werden.

4.2.5.3. Codon 540

Für dieses Codon wurde nur ein Ansatz verwendet. Mit Hilfe des Restriktionsenzyms Fok I kann man eine Mutation des Codons feststellen, die zur Codierung der Aminosäure Glutamat führt. Aus dem 438bp Fragment entstehen die beiden mutationsweisenden Banden von 84bp und 320bp, zusätzlich erscheint stets die Kontrollbande von 30bp. Der Wildtyp, für Lysin codierend, presentiert sich in einer Bande von 404 bp.

Es konnten 4 Mutationen und 6 Mischtypen nachgewiesen werden, bei den restlichen 50 Proben nimmt man den Wildtyp an. Bis zum Tag 14 trat keine Veränderung des Status ein.

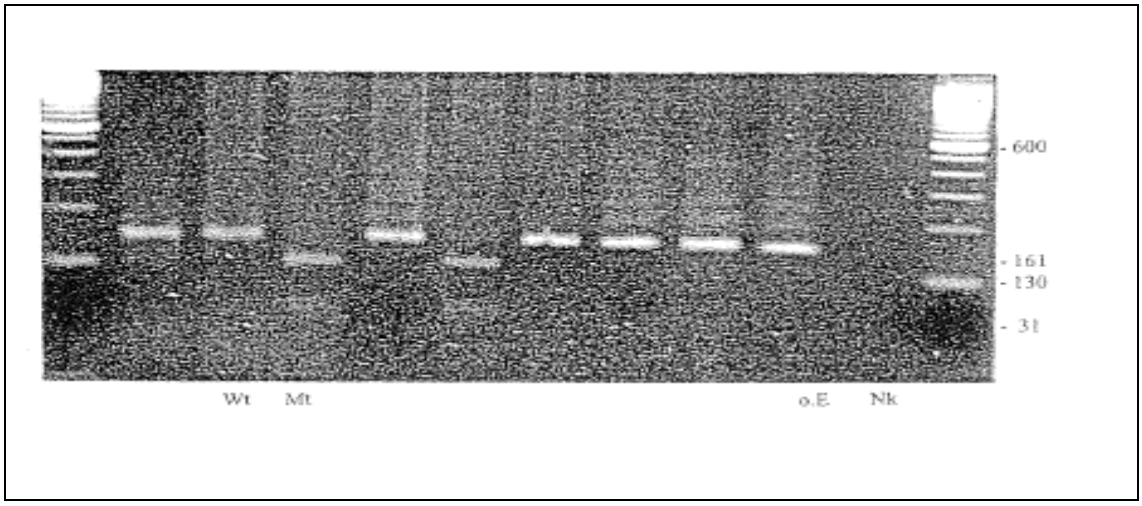
Abb. 36 :



4.2.5.4. Codon 581

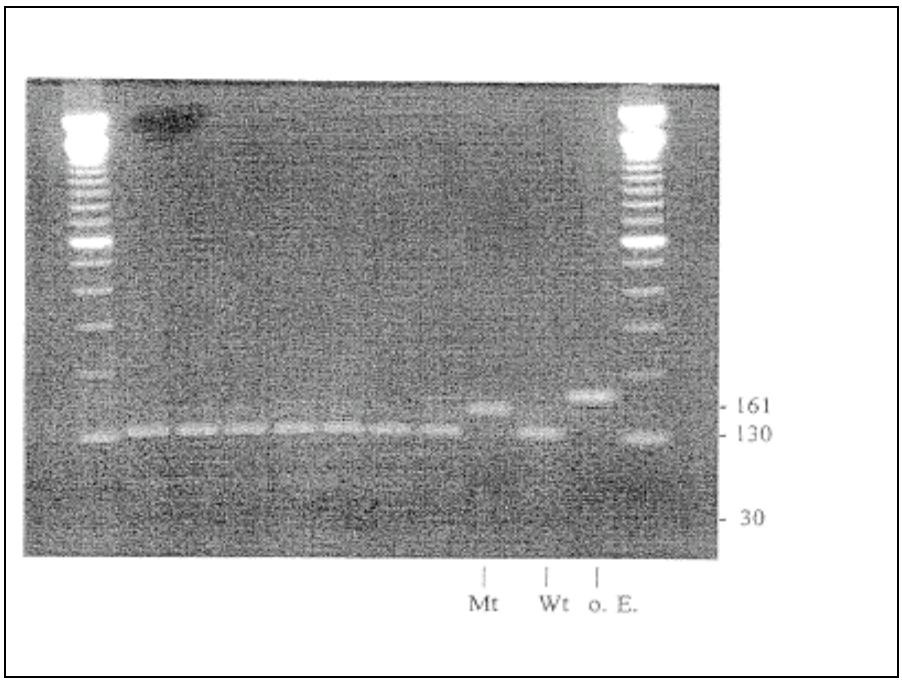
Um hier die Mutation, codierend für Glycin, nachweisen zu können, wurde das Enzym Bsl I verwendet. Es schneidet das 161bp Fragment in zwei Teile von 30 und 130 Basenpaaren. Liegt der Wildtyp vor, bleibt das Fragment erhalten. Er codiert für die Aminosäure Alanin.

Abb. 37:



Zum Nachweis des Wildtyps benötigt man die Endonuklease BstU I, die das Fragment analog in zwei Teile der Länge 30bp und 130 bp zerteilt. Bei Vorhandensein der Mutation findet kein Verdau bzw. kein Schnitt statt.

Abb. 38:

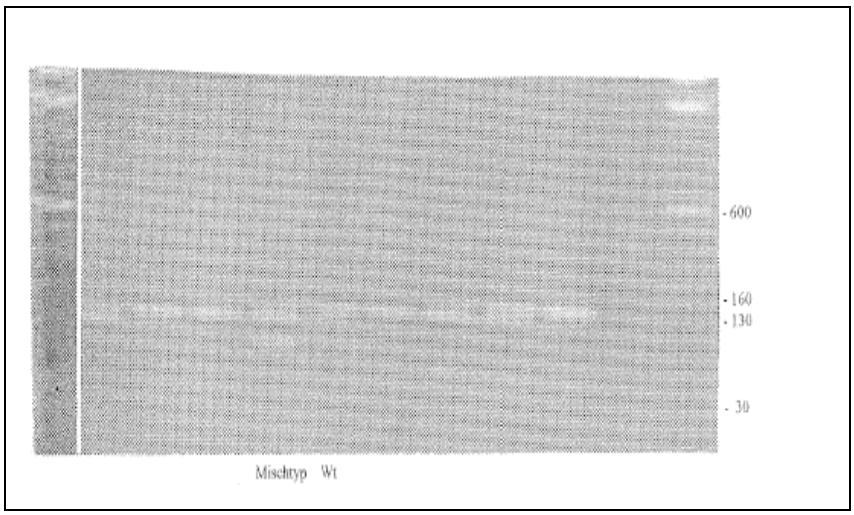


So konnten 3 Mutationen, 2 Misch- und 59 Wildtypen an Tag 0 nachgewiesen werden. Im Verlauf fanden erhebliche Veränderungen statt. 19 als Wildtypen eingestufte Proben zeigten an Tag 14 die Mutation, ebenso 2 Mischtypen. Bei den Patienten mit Mischtyp-DNS konnte man allerdings an Tag 14 keinerlei Plasmodien-DNS mehr nachweisen.

4.2.5.5. Codon 613

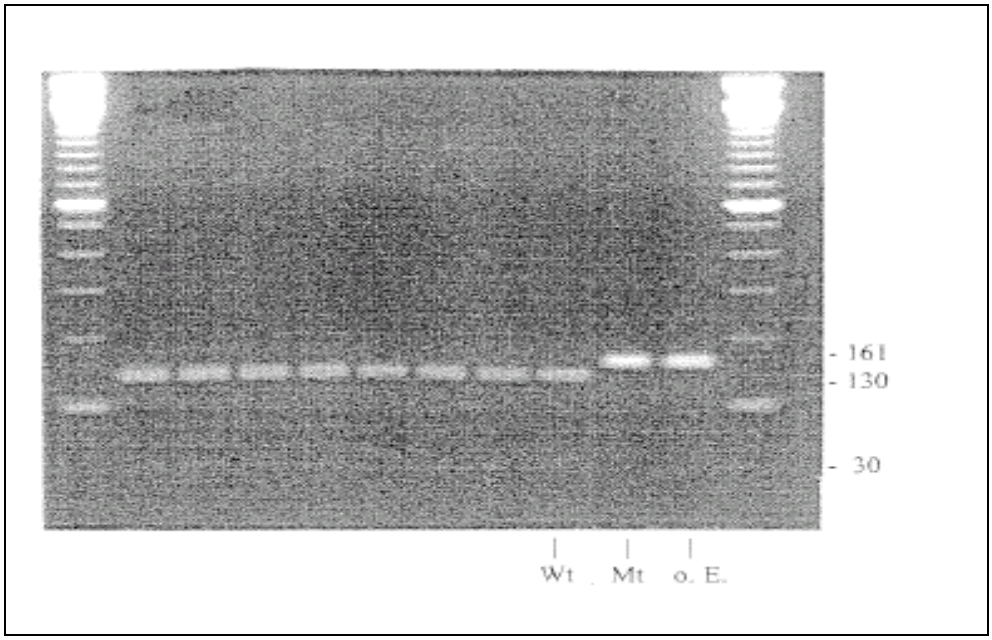
Zum Nachweis der Beschaffenheit von Codon 613 dienten zwei verschiedene Restriktionsendonukleasen. Beweisend für die Mutation, die zur Codierung von Serin im Gegensatz zu Alanin beim Wildtyp führt, ist ein positiver Verdau mit Bsa WI. Dieses Enzym schneidet das 160bp Fragment in zwei Fragmente von je 30bp und 130bp. Bleibt das Fragment ungeschnitten, spricht dies für den Wildtyp.

Abb. 39:



Umgekehrt lässt sich der Wildtyp mit dem Restriktionsenzym MwoI nachweisen. Es schneidet beim Vorkommen des nicht mutierten Codons das Fragment ebenfalls in zwei Teile der Längen 30 und 130 Basenpaare.

Abb. 40:



In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus beiden Verdauen ließen sich 63 Wildtypen und eine Mischinfektion an Tag 0 ermitteln.
Im Verlauf konnte man die Entwicklung von einem anfangs vermuteten Wildtypen zu einer Mutation an Tag 14 beobachten. Der Mischtyp konnte nicht weiterverfolgt werden, da der Patient am 3. Tag als früher Therapieversager eingestuft werden mußte und mit Chinin behandelt wurde.

4.3. Korrelation mit den *in vivo*-Daten

4.3.1. Chloroquin-Gruppe

Die Pfcrt-Mutation war in allen klinisch resistenten Isolaten nachweisbar (100,00% Sensitivität), aber auch hochprävalent in sensitiven Proben (94,11%). An Tag 0 zeigten zwei Patienten multi-klonale Isolate mit der Mutation und DNA vom Wildtyp. Am Tag 14 führte das Chloroquin zu einer Selektion des mutierten Genotyps in beiden Fällen.
Wildtyp-DNS wurde nur bei einer sensitiven auf das Medikament anschlagenden Parasitenpopulation gefunden.

Die pfmdr-86 Mutation wurde häufiger in Patienten mit Chloroquin-Resistenz gefunden (OR 4,27; CI 0,31-106,99). Nur eine Mutation (6,25%) präsentierte sich in der sensitiven Gruppe am Tag 0, dieser Patient trug aber gleichzeitig den Pfcrt Wildtyp.

Die Kombination der beiden Mutationen war in keinem Isolat mit in vivo Sensitivität zu finden aber in 21,05 % der Patienten mit Medikamentenresistenz (100,00% Spezifität und PPV 100,00%).
Die 1042-Mutation wurde sowohl in sensitiven wie auch resistenten Isolaten entdeckt.
1246 zeigte keinerlei Mutation.

Tab. 22:

Chloroquin	Prävalenz chloroquin-sensitiver Isolate (n°/total n° in %) Tag 0 - 14	Prävalenz chloroquin-resistenter Isolate (n°/total n° in %) Tag 0 - 14	Odds ratio (95% CI*) Tag 0 - 14
Pfcrt-76- Mutation	16/17 (94,11)	19/19 (100,00)	n.d.**
Pfmdr-86- Mutation	1/16 (6,25)	4/19 (21,05)	4,27 (0,31-106,99)
Pfmdr-1042-Mutation	8/16 (50,00)	10/17 (58,82)	1,43 (0,29-7,12)
Pfmdr-1246-Mutation	0/9 (0,00)	0/12 (0,00)	n.d.
Pfcrt-76-Mutation + Pfmdr-86-Mutation	0/17 (0,00)	4/19 (21,05)	n.d.
Pfcrt-76- Mutation + mind. 1 Pfmdr- Mut.	8/17 (47,06)	14/19 (73,68)	3,15 (0,64-16,36)

*CI = Konfidenzintervall ** n.d. = nicht definiert

4.3.2. Antifolate-Gruppe

Die Korrelation von in vivo Resistenz mit Mutationen im DHPS-Gen war hoch, besonders mit den Codons 436 und 437 am Tag 14 (0R: 122,50; CI 1,04 – 201,41 und 10,00; CI 0,80 – 276,72). Für Codon 436 errechnete sich eine Sensitivität von 60,00% und Spezifität von 89,34%, Codon 437 eine Sensitivität von 80,00% und 71,40% Spezifität zeigte.

An Tag 0 erschienen drei Isolate als monoklonale Wildtypen, erwiesen sich aber als multiklonal mit mutiertem Genotyp an Tag 14. An Tag 0 lag die DNA mit Mutation noch unter der Nachweisgrenze, der medikamentöse Druck führte zum Verschwinden des Wildtyps und der Vermehrung der mutierten Plasmodien.

Die Kombination der Mutationen auf beiden Codons zusammen mit der Mutation an Codon 613 zeigte eine erhöhte Korrelation mit in vivo Resistenz (OR 19,59; CI 1,38 – 442,59) an Tag 14.

Keine Korrelation zwischen in vivo Resistenz und Punktmutation ließ sich für Codon 540 des DHPS-Gens nachweisen.

Die 581-Glycin Mutation war ersichtlich in 36,36% aller Proben am Tag 14 aber nicht korreliert mit dem in vivo Ergebnis.

Was die Mutationen an den Codons 59 und 108 des DHFR-Gens betrifft, war ihre Prävalenz grundsätzlich sehr hoch (90,91% und 96,77%). Alle in vivo resistenten Isolate zeigten beide Mutationen, allerdings auch die Mehrheit der sensitiven Proben. Die Kombination aus 108Asn-Mutation und Mutationen an den Codons 51 und 59 war nicht signifikant korreliert mit dem Heilerfolg.

An den Codons 16 und 164 konnten keine Polymorphismen gefunden werden, Threonin an Codon 108 wurde ebenfalls nicht entdeckt.

Selektion unter Medikamentendruck wurde wie oben schon erwähnt auch in diesen Genen gesehen. Multiklonale Infektionen an Tag 0 besonders in Codon 108 (11,11%) zeigten an Tag 14 die Mutation befreit vom Wildtyp.

Tab. 23:

Pyrimethamin / Sulphadoxin	Prävalenz chloroquin-sensitiver Isolate (n°/total n° in %) Tag 0 - 14	Prävalenz chloroquin-resistenter Isolate (n°/total n° in %) Tag 0 - 14	Odds ratio (95% CI) Tag 0 - 14
DHPS-436-Mutation	3/28 (10,71)	3/5 (60,00)	12,50 (1,04-201,41)
DHPS-437-Mutation	8/28 (28,57)	4/5 (80,00)	10,00 (0,80-276,7)
DHPS-540-Mutation	3/28 (10,71)	0/4 (0,00)	n.d.
DHPS-581-Mutation	11/28 (39,29)	1/5 (20,00)	0,39 (0,01-4,7)
DHPS-613-Mutation	1/28 (3,57)	1/5 (20,00)	6,75 (0,00-328,41)
DHPS-436-437-613-Mut*	2/28 (7,14)	3/5 (60,00)	19,50 (1,38-442,59)
DHFR-16-Mutation	0/26 (0,00)	0/5 (0,00)	n.d.
DHFR-51-Mutation	9/26 (34,62)	1/5 (20,00)	0,47 (0,02-5,97)
DHFR-59-Mutation	25/27 (92,59)	5/5 (100,00)	n.d.
DHFR-108-Asn-Mutation	25/26 (96,15)	5/5 (100,00)	n.d.
DHFR-108-Thr-Mutation	0/26 (0,00)	0/5 (0,00)	n.d.
DHFR-164-Mutation	0/26 (0,00)	0/5 (0,00)	n.d.
DHFR-108-Asn-59	25/27 (92,31)	5/5 (100,00)	n.d.

* Mindestens 2 Mutationen

4.3.3. Chloroquin-Antifolate-Kombination-Gruppe

Die Isolate zeigten eine hohe Prävalenz der Mutationen im pfcrt-Gen. Die T 76-Mutation wurde in allen klinisch resistenten Proben gefunden (100,00% Sensitivität), aber wiederum war die Spezifität niedrig (12,50 %). Medikamentöser Druck führte hier auch zur Selektion von multiklonalen Infektionen zum mutierten Genotyp. Alle vier Isolate mit reiner Wildtyp-DNS erwiesen sich als klinisch sensitiv.

Die Inzidenz der Mutationen im Codon 86 war sehr gering (4 von 30 Proben). Eine relativ niedrige Korrelation von in vivo Resistenz und pfmdr-86-Mutationen wurde beobachtet (OR 4,20; CI 0,31 – 60,72; Spezifität 91,30).

Codon 1042 zeigte eine nur geringgradig höhere Korrelation.

Die Kombination aus pfcrt-Mutation und beliebiger pfmdr-Mutation (Asn86 oder 1042) führte zu einer höheren Korrelation zwischen klinischen Ausgang und Mutationsrate. Bei den

Genen, die mit P/S in Verbindung gebracht werden, korrelierte die DHPS-437 Mutation mit der in vivo Resistenz gut. (OR 15,00; CI 1,23 – 412,69).

Auch die DHPS 540 Mutation korrelierte (OR 3,19; CI 0,36 – 30,30). Die Prävalenz der DHFR Mutationen an den Codons 59 und Asn108 war wiederum stark ausgeprägt in sensitiven wie resistenten Proben.

Multiklonale Infektionen traten auch hier auf, besonders in Codon 108 (25,93%).

Selektion zum mutierten Genotyp unter Medikamenteneinsatz wurde ebenfalls beobachtet.

Kombinierte man Mutationen auf Codon 86 des pfmdr –Gens mit denen auf Codon 437 des DHPS-Gens, stieg die Korrelation im Vergleich zum Wert von pfmdr allein an (OR 8,80; CI 0,46 – 310,95), konnte aber nicht den signifikanten Wert von Codon 437 allein übertreffen.

Die Spezifität für die Kombination stieg jedoch auf 95,65% an.

Tab. 24:

CQ und P/S	Prävalenz chloroquin-sensitiver Isolate (n°/total n° in %) Tag 0 - 14	Prävalenz chloroquin-resistenter Isolate (n°/total n° in %) Tag 0 - 14	Odds ratio (95% CI[)] Tag 0 - 14
Pfcrt-76-Mutation	21/24 (87,50)	7/7 (100,00)	n.d.
Pfmdr-86-Mutation	2/23 (8,70)	2/7 (28,57)	4,20 (0,31-60,72)
Pfmdr-1042-Mutation	6/22 (27,27)	4/7 (57,14)	3,56 (0,46-30,13)
Pfcrt-+ eine Pfmdr-Mut.	7/23 (30,43)	5/7 (71,43)	5,71 (0,69-57,56)
Dhps-436-Mutation	6/21 (28,57)	3/7 (42,90)	1,88 (0,23-15,38)
Dhps-437-Mutation	6/21 (28,57)	6/7 (85,71)	15,00 (1,23-412,69)
Dhps-540-Mutation	4/21 (19,05)	3/7 (42,86)	3,19 (0,36-30,30)
Dhps-581-Mutation	10/24 (41,67)	2/7 (28,57)	0,56 (0,06-4,46)
Dhfr-51-Mutation	9/22 (40,91)	2/7 (28,57)	0,58 (0,06-4,74)
Dhfr-59-Mutation	18/22 (81,82)	6/6 (100,00)	n.d.
Dhfr-108-Mutation	19/22 (86,36)	6/6 (100,00)	n.d
Pfmdr-86-DHPS-436-Mut.	1/23 (4,35)	2/7 (28,57)	8,80 (0,46-310,95)

5. Diskussion

Medikamentenresistente Malaria wird in erster Linie von Plasmodium falciparum verursacht und ist mitverantwortlich für eine wieder zunehmende Mortalität durch Malaria tropica und das Scheitern der globalen Bemühungen, die Malaria auszurotten.(BMJ 2004)
Ein erster Schritt im Kampf gegen Resistenzen ist das Verständnis des Mechanismus dieser Entwicklung.
Die Ergebnisse solcher Studien sind nicht befriedigend. Einig ist man sich, daß Mutationen im Genom der Plasmodien zu einer hereditären Resistenz führen können.
Der Wirkmechanismus von Chloroquin als einem der ältesten und am längsten genutzten Medikamente ist noch immer nicht vollständig aufgeklärt. Das beeinträchtigt natürlich ebenso das Verständnis der Resistenzentwicklung. Vermutlich führt im sensitiven Parasiten eine Interaktion Chloroquins beim Hämoglobinabbau zu einer Ansammlung toxischer Substanzen. Dieser Mechanismus scheint bei Resistenz gestört zu sein. Eine allgemein akzeptierte These besagt, daß in der Nahrungsvakuole, dem Zielmilieu, resistenter Plasmodien weniger Chloroquin als der sensitiver vorzufinden ist. (Le Bras & Durand 2003) Dieser Beobachtung könnte beispielsweise ein verändertes Diffusionsverhalten aufgrund von ph-Wert-Verschiebungen in Zytosol oder Nahrungsvakuole, ein verminderter Einstrom und/oder ein aktiver Efflux von Chloroquin zugrunde liegen. Man vermutete daraufhin, daß veränderte Kanalproteine und Protonenpumpen für die Resistenzbildung verantwortlich sein könnten.
Bestimmte Punktmutationen im Pfmdr-Gen werden seit einiger Zeit mit der Resistenzentwicklung gegen Chloroquin in Verbindung gebracht. (Adagu *et al.* 1995, Duraisingh *et al*. 1997, Flueck *et al.* 2000, Nagesha *et al.* 2001) Dieses Gen codiert für ein Kanalprotein in der Vakuolenmembran. Eine Schlüsselrolle der CQ Resistenz ist für das pfcrt-Gen von Fidock und Kollegen 2000 beschrieben worden, das ebenfalls für ein Kanalprotein codiert, weitere Studien bestätigen dies. (Babiker *et al.* 2001, Pillai *et al.* 2001). Veröffentliche Ergebnisse lassen sehr wenig Zweifel an der Wichtigkeit dieses Gens, insbesondere der Mutationen an Codon 76, bezüglich der Resistenz gegen Chloroquin.

Die Resistenzbildung der Antifolate wird ebenfalls mit Mutationen in Genen erklärt, die für die Zielstrukturen der Medikamente codieren. Pyrimethamin-Resistenz wird mit Punktmutationen im dhfr-Gen assoziiert. Einer Resistenz gegen Sulphadoxin sollen

Veränderungen im dhps-Gen zugrunde liegen. (Zolg *et al.* 1989, Triglia & Cowman 1994, Reeder *et al.* 1996, Wang *et al.* 1997a, Duraisingh *et al.* 1998, Basco & Ringwald 2000a)

Als Mittel der Wahl ist Chloroquin mittlerweile in den meisten Ländern Asiens und Afrikas durch Fansidar oder die Kombination von Chloroquin mit Fansidar ersetzt worden. Chloroquin ist zwar preiswert, gut verträglich und bei Sensitivität des Erregers sehr effektiv, bei zu hohen Resistenzraten kann die Anwendung aber nicht mehr verantwortet werden. Fansidar, das Alternativpräparat oder Mittel der ersten Wahl in Ländern mit hoher Chloroquin-Resistenz, ist eine Kombination aus Pyrimethamin und Sulphadoxin (P/S). Seit Einführung dieses Mittels und dessen großzügiger Anwendung sind die Resistenzraten rapide angestiegen.
Gebiete mit Multiresistenz (multidrug resistance) zeichnen sich meist durch Resistenz gegen Chloroquin und Pyrimethamin/Sulphadoxin sowie Mefloquin und/oder Quinin aus. Zu ihnen gehören unter anderem Gebiete in Thailand, vor allem dessen sämtliche Grenzgebiete, Teile Kambodschas, Birmas und Vietnams, in denen man schon seit Jahren zu Mefloquin in Kombination mit Artemisinderivaten als Therapie der Wahl übergehen mußte. Sie alle stellen Nachbarländer von Laos dar. (Wongsrichanalai *et al.* 2002) Auch die laotisch-chinesische Grenzregion wies schon Anfang der 90er Jahre Resistenzraten von 95-100% gegen Chloroquin vor. (Yang *et al.* 1997)
Wie bei der Tuberkulose werden mittlerweile Medikamentenkombinationen bei der Malaria favorisiert, um der Resistenzbildung vorzubeugen und schon vorhandene Resistenzen zu kompensieren. (Whitty *et al.* 2004)

Die dieser Arbeit zugrundeliegende in vivo-Medikamentenstudie, die in Zusammenarbeit mit der WHO und dem nationalen Malariainstitut von Laos während der Regenzeit 2001 durchgeführt wurde, untersuchte die Resistenz gegen Chloroquin (44,8%), Fansidar (17,8%) und die Kombination beider Mittel (16,7%). Die Kombinationstherapie Fansidar/Chloroquin führte im Vergleich zu Fansidar allein also zu keinem signifikanten Unterschied im Therapieerfolg. (Schwoebel *et al.* 2002) Dieses Ergebnis steht in Einklang mit einer kürzlich in Laos stattgefunden Studie von Pillai und Kollegen (CQR 46%) sowie kleineren Studien zuvor. (Pillai *et al.* 2001) Erste Resistenzen gegen Chloroquin waren schon 1966 von Farid und gegen Fansidar 1970 von Ebisawa berichtet worden. Trotzdem war Chloroquin zum Zeitpunkt der Studie noch immer Mittel der Wahl. Die in vivo-Studie sollte nun die Effektivität der Medikamente sowie die in vivo-Resistenz untersuchen, da die

laotische Regierung gemeinsam mit der WHO ein Überdenken der Malariaempfehlungen plant.

Die hier vorliegende Studie hatte zum Ziel, eine mögliche Korrelation von Polymorphismen in oben genannten Genen und der in vivo-Resistenz gegen Chloroquin und Antifolate herzustellen und zu bewerten. Mit eindeutigen Korrelationen könnte man die Punktmutationen als Resistenzmarker definieren. Hohe Sensitivität und Spezifität wären für epidemiologische Studien von großer Bedeutung. Resistenzentwicklungen könnten früh erkannt und ein Scheitern des Therapiekonzeptes verhindert werden.

Die Feldstudie für die vorliegenden Daten fand im Süden von Laos, in der Provinz Attapeu, während der Regenzeit statt. Diese an Kambodscha und Vietnam grenzende Region ist als Gebiet mit moderaten Transmissionsraten klassifiziert. Dies bedeutet eine ganzjährliche Übertragung mit einem seasonalen Gipfel korrelierend mit der Regenzeit von Ende Mai bis Anfang Oktober, dem Monsun, und steht im Gegensatz zur perennealen Transmisson gleichbleibender Stärke. Die Übertragungsrate außerhalb der Regenzeit ist mäßig und größtenteils auf Feuchtgebiete beschränkt. Malaria steht aber trotzdem an erster Stelle unter den zehn führenden Ursachen für Morbidität und Mortalität in Laos, da es aufgrund dieser instabilen Malaria jedes Jahr zu verheerenden Ausbrüchen der Krankheit kommt. Ein Drittel der gesamten Bevölkerung leidet jährlich in irgendeiner Weise an Malaria und 1% der Betroffenen verliert sein Leben. 2/3 der Toten sind Kinder. 95% der Malariainfektionen werden von *Plasmodium falciparum* verursacht. (www.who.int/country/lao)
Die Patienten wurden in die drei oben erwähnten Medikamentenarme aufgeteilt. Insgesamt 31 der 100 Patienten, bei denen ein Follow-up bis zum Tag 14 durchgeführt werden konnte, wurden als Therapieversager klassifiziert.

5.1. Vergleich mit in vivo-Studien anderer Länder

Chloroquin

Eine hohe Resistenzrate wurde in der mit Chloroquin behandelten Gruppe beobachtet (52,8%). Dies war in Übereinstimmung mit anderen Studien aus Laos. Schon 1977 konnte ein Therapieversagen in 40% der Fälle ermittelt werden. (Al Tawil 1977) In den Neunzigern lag die Quote an Resistenzen zwischen 39 und 54%. (Pholsena 1992, Giboda *et al.* 1992, Pillai *et*

al. 1999) Neueste Studien aus Laos ermittelten ähnliche bis höhere Resistenzraten. Eine 2000 in der Sekong Provinz durchgeführte Studie errechnete eine Resistenzrate von 39,7% bei 88 Patienten (Guthmann *et al.* 2002) Eine weitere Studie von 2000 mit 29 Patienten ermittelte eine Therapieversagerquote von 78%. (Mayxay *et al.* 2003a) Die gleiche Gruppe erhielt in einem Kollektiv von 100 Patienten eine Resistenzrate von nur 36% für Chloroquin. (Mayxay *et al.* 2003b) Eine dazwischen liegende Quote (46%) erzielte die oben erwähnte Studie mit 39 Patienten, die von Pillai und Kollegen durchgeführt wurde.
(Pillai *et al.* 2001) Zusammengefaßt erhält man nun eine Rate, die auf jeden Fall zu hoch für das Mittel der ersten Wahl ist.
Die Schwankungen können durch Verfälschung aufgrund einer zu kleinen Patientengruppe sowie regionaler Unterschiede und Nachbarländer verschiedener Resistenzraten verursacht sein. Laos ist abgesehen von den sich im Süden verbreiternden Ebenen am Mekong ein vielfach zerschnittenes, unwegsames Bergland, in das Hochebenen und Becken eingeschaltet sind. Die Malaria stellt in Laos sowohl in tiefer gelegenen Feucht- und Ufergegenden als auch in den stark bewaldeten Hochebenen eine große Bedrohung dar. (Pholsena 1992) Laos ist ein Land verschiedenster Ethnien, einige Stämme haben keinerlei Kontakt zur Außenwelt, andere leben in regem Austausch mit ihren Nachbarregionen, -ländern.
Wie schon oben erwähnt, grenzt Laos an Länder mit etablierter Multiresistenz oder hohen Resistenzraten gegen Chloroquin und P/S. Attapeu teilt sich im Südwesten die Grenze mit Kambodscha und im Südosten mit Vietnam. Kambodscha, besonders an der Grenze zu Thailand, ist einer der Foci, von wo sich CQR und später Multiresistenz entwickelte und ausbreitete. Die nordöstliche an Laos grenzende Region weist allerdings noch keine bedeutende Resistenz gegen Chloroquin und P/S auf. (Mayxay *et al.* 2003b, Lim *et al.*
2003) Vietnam verzeichnete 1993 einen Anstieg auf 76% Resistenz gegen Chloroquin.
(Nguyen TA 1993) In Vietnam ist die Resistenzentwicklung enorm auf den Vietnamkrieg und seine Folgen zurückzuführen, der auch in weite Teile der Nachbarländer wie Kambodscha und Laos getragen wurde. Spätere politische Unruhen sowie wirtschaftliche Faktoren führten immer wieder zu Flüchtlingsströmen bzw. Migration zwischen den Ländern. Arbeiter aus Kambodscha beispielsweise brachten wahrscheinlich Mefloquin-Resistenz nach Bangladesh und Indien. (Wernsdorfer 1994)
Eine Beeinflussung des Resistenzstatus in Laos ist denkbar. Die Isolation der letzten Jahre muß dabei berücksichtigt werden. Die in vivo-Studie in Attapeu zeigte eine 100%ige Sensitivität für Mefloquin. (Schwöbel *et al.* 2003) Neuere Studien mit Mefloquin-Artesunat,

dem Mittel der Wahl in Thailand, Kambodscha und Vietnam, erbrachten ebenfalls Heilungsraten von 100%. (Mayxay *et al.* 2004, Stohrer *et al.* 2004)

Pfcrt

Die Pfcrt Mutation war in allen 19 klinisch resistenten Isolaten vorhanden (100% Sensitivität), was auf eine absolute Selektion dieser Mutation unter CQ-Medikation in den Parasiten schließen läßt. Beide multi-klonalen Isolate mit Mutation- und Wildtyp-DNS an Tag 0 zeigten an Tag 14 eine Selektion zum mutierten Genotyp. Die Mutation an Codon 76 scheint eine notwendige Determinante für CQ-Resistenz zu sein. Der einzige reine Wildtyp zeigte keine klinische Resistenz gegen Chloroquin. Allerdings wurden 16 der hier untersuchten Patienten, die dieses Allel trugen, von CQ geheilt. Die Mutation kam in 94,11% der klinisch sensitiven Isolate vor. Dies mindert die Aussagekraft dieses Resistenzmarkers erheblich.

Zwei Studien aus Laos gehen konform mit diesen Ergebnissen. Pillai und Kollegen beobachteten in ihrer Studie ebenfalls eine Sensitivität für den Marker von 100%, andererseits eine niedrige Spezifität sowie eine Heilungsrate von 54% mittels Chloroquin trotz starker Prävalenz der Mutation. Die Gruppe konnte daher keine Vorhersagen aus den Ergebnissen erzielen. (Pillai *et al.* 2001) Die zweite Studie konzentrierte sich nur auf das Vorkommen von mit CQR assoziierten Punktmutationen in Isolaten aus Laos und seinem Nachbarstaat Thailand. Alle 25 laotischen Proben besaßen die Mutation, was auf eine hohe Prävalenz schließen läßt. (Labbe *et al.* 2001)

Eine in vivo-Studie aus Indien mit 274 *Plasmodium falciparum* Isolaten erzielte ebenfalls eine Sensitivität von 100% für die Mutation an Codon 76, d.h. alle klinisch resistenten Parasiten trugen die Mutationen. Allerdings wiesen auch 96% der sensitiven Isolate diesen Polymorphismus auf, dessen Nutzen damit zur Differenzierung in auf Chloroquin ansprechende und nicht ansprechende Patienten gemindert ist. (Vinayak *et al.* 2003)

Da in den Nachbarländern von Laos schon lange hohe Resistenzen gegen Chloroquin und S/P zu anderen Therapiestrategien zwangen, wurden die in vivo-Studien dort eher mit Mefloquin und Artemisinderivaten durchgeführt. Die Korrelation des Pfcrt-Gens mit CQR wurde aber erst 2001 entdeckt.

Djimde und Kollegen fanden in ihrer in vivo-Studie ebenfalls eine hohe Prävalenz (86%) der Mutation an Codon 76 an afrikanischen Isolaten. Die Korrelation mit in vivo-Resistenz war mit einer Odds ratio von 18,8 sehr hoch, allerdings fehlte auch hier die genaue

Vorhersagemöglichkeit des Therapieverlaufs. Sie beobachteten ebenfalls eine absolute Selektion für diese Mutation unter Chloroquin-Therapie und kamen zu dem Schluß, daß K76T im pfcrt-Gen eine notwendige aber nicht ausschließliche Komponente der Resistenz darstellen würde. (Djimde *et al.* 2001)
Mehrere afrikanische Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen im Sudan (Babiker *et al.* 2001), in Kamerun (Basco & Ringwald 2001, Basco 2002) und in Tansania (Schneider *et al.* 2002). In Gabun konnten Binder und Kollegen in einer in vivo-Studie bei Kindern 100% Prävalenz bei einer Resistenz von 100% messen. (Binder *et al.* 2002) Eine Aussage zu sensitiven Isolaten läßt dieses Ergebnis natürlich nicht zu. In Mauretanien konnte eine Sensitivität von 100% beobachtet werden, allerdings lag die Spezifität nur bei 65,3%.
(Jelinek *et al.* 2002) In Uganda korrelierte die Mutation gut mit hohen Resistenzleveln und frühem Therapieversagen. (Talisuna *et al.* 2002) In einer nigerianischen Studie konnte andererseits keine Korrelation der Mutation mit Chloroquin-Resistenz ermittelt werden, nur eine sehr hohe Prävalenz von K76T wurde entdeckt. (Happi *et al.* 2003)

Zwei Studien aus verschiedenen Provinzen in Malawi zeigten indirekt einen Zusammenhang der Mutation mit Resistenzbildung. In Malawi war Chloroquin wegen hoher Resistenzen 1993 als Mittel der Wahl von Fansidar abgelöst worden. 1992 hatte die Prävalenz von K76T in Isolaten 85% betragen und war im Jahre 2000 auf 13% gesunken. Resistenzen gegen Chloroquin wurden in der Studie keine beobachtet. (Kublin *et al.* 2003) Die andere Studie beobachtete ebenfalls eine reduzierte Prävalenz (17% -> 2%) und einen Anstieg der Sensitivität gegenüber Chloroquin, es konnte allerdings keine signifikante Korrelation zwischen in vivo-Resistenz und K76T festgestellt werden. (Mita *et al.* 2003)

Zusammengefaßt kann man sagen, daß die Sensitivität der Mutation in den meisten Ländern sehr hoch und die Spezifität aufgrund der starken Prävalenz der Mutation niedrig anzusiedeln war. Eine individuelle Vorhersage ist dadurch nicht möglich, das Ergebnis gibt aber Hinweis auf Resistenzstatus der Parasiten und indirekt Informationen zur Immunität der Untersuchungsgruppe. Die erworbene Immunität der Bevölkerung spielt bei in vivo-Studien eine bedeutende Rolle und wird weiter unter besprochen.

Die Prävalenz in laotischen Isolaten differierte im Vergleich zu afrikanischen, südamerikanischen oder anderen asiatischen nicht, einzig verschiedene Haplotypen sind

bekannt. Ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Typen und einem Unterschied in der Resistenzbildung scheint nicht zu existieren.

Die Mutation im pfcrt-Gen wurde nun zunehmend als grundlegende Voraussetzung für die Resistenzbildung aber nicht als alleinige Mutation betrachtet. Ein multigenetischer Ansatz wurde angenommen. (Djimde *et al.* 2001, Pillai *et al.* 2001, Basco & Ringwald 2001, Basco 2002)
Warhurst sah in dem Genprodukt einen Transporter in der Vakuolenmembran von Plasmodium falciparum, der normalerweise Aminosäuren ausschleust, bei Kontakt mit Chloroquin dieses ebenso exportieren könne. Im Falle einer Mutation von Codon 76 würde der Efflux gesteigert sein.
Eine Mutation im pfmdr-Gen an Codon 86, die zum Ausfall oder einer verminderten Aktivität der Protonenpumpe führen könnte, würde für die Aufrechterhaltung des Milieus sorgen, d.h. eine zu starke Ansäuerung durch nicht exportierte Aminosäuren vermeiden. (Warhurst 2001)
Welche Funktion diese beiden Proteine auch genau haben mögen, eine Verstärkung der Resistenz durch Mutationen im pfmdr-Gen wurde häufig beobachtet.

Pfmdr

Die Korrelation der Punktmutationen in pfmdr Gen an Codon 86 mit in vivo Medikamenten Resistenz war höher als in der Studie von Pillai und Kollegen aus Laos (Pillai *et al.* 2001). Allerdings konnte auch hier kein signifikanter Zusammenhang beobachtet werden. Die Prävalenz dieses Polymorphismus war insgesamt mit 14,3% niedrig. Die Sensitivität von Codon 86 war gering (21,05%), was nicht für eine notwendige Anwesenheit der Mutation bei Resistenz spricht. Die Spezifität lag mit 95,75% recht hoch. In Kombination mit K76T von Pfcrt wuchs die Spezifität auf 100,00% - mit einem positiven Vorhersagewert von 100,00%.
Die pfmdr-86 Mutation kam häufiger in Patienten mit Chloroquin-Resistenz vor. Nur eine Mutation (6,25%) präsentierte sich in der sensitiven Gruppe am Tag 0, bei diesem Patienten fand sich aber gleichzeitig der pfcrt-Wildtyp. Die Kombination der beiden Mutationen bedingt nicht in vivo-Resistenz, das Fehlen beider spricht aber für Sensitivität. Das Fehlen von K76T scheint ausschlaggebender zu sein.
Seit Foote und Kollegen erst erhöhte Transkriptionslevel des pfmdr-Gens in chloroquin-resistenten Plasmodien proklamierten und 1990 verschiedene Punktmutationen im besagten Gen mit dieser Resistenz assoziierten, wurden sehr viele Studien zu diesem kontrovers

diskutierten Thema durchgeführt. (Foote *et al.* 1989, Foote *et al.* 1990) Die Mutation war sowohl in Asien und Afrika als auch in Südamerika zu finden.
Bei einer genetischen Kreuzung von Laborstämmen konnte in den Nachkommen kein Zusammenhang zwischen pfmdr-Genen, Chloroquin-Resistenz und dem Effluxmechanismus festgestellt werden. (Wellems *et al.* 1990)
Zahlreiche in vivo-Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Im Sudan konnte bei einer Studie 1992 keine pfmdr-Mutation trotz in vivo-Resistenz gefunden werden.
(Awad-el-Kariem *et al.* 1992), auch bei einer Studie in Peru 2004 trugen alle Plasmodien den Wildtyp, obwohl alle gegen Chloroquin resistent waren. (Huaman *et al.* 2004)
In Kambodscha (Basco *et al.* 1996), Gambia (von Seidlein *et al.* 1997), Thailand
(Wilson *et al.* 1993, Chaiyaroj *et al.* 1999, Lopes *et al.* 2002), Nigeria (Happi *et al.* 2003) und Bangladesch (Van den Broek *et al.* 2004) konnte keinerlei Korrelation zwischen N86Y und in vivo-Resistenz gemessen werden.
Eine Selektion unter Chloroquin, wie es bei Pfcrt oft beobachtet wurde, konnte in Tansania auch nicht gefunden werden. (Schneider *et al.* 2002)
Eine vorher schon erwähnte Studie in Malawi zeigte keinen Rückgang der Prävalenz von N86Y nach Absetzen von Chloroquin als Malariatherapeutikum. (Mita *et al.* 2003)

Eine gewisse Korrelation ohne Vorhersagekraft wurde von in vivo-Studien aus Nigeria
(Adagu *et al.* 1999), Uganda (Flueck *et al.* 2000), Mali (Djimde *et al.* 2001), Laos (Pillai *et al.* 2001), Indonesien (Nagesha *et al.* 2001), Sudan (Babiker *et al.* 2002), Gabun
(Binder *et al.* 2002), Burkina Faso (Tinto *et al.* 2003) postuliert.
Sie alle hielten diese Mutation nicht für die grundlegende und einzig bestimmende, sie schrieben ihr eher einen modulierenden Faktor zu. Nach Entdeckung des pfcrt-Gens und dessen Codon 76 versuchte man die Aussagekraft beider Mutationen zu kombinieren.
In Djimdes Studie in Mali führte die Kombination dieser Mutationen zu keiner höheren Aussagekraft. (Djimde *et al.* 2001)
Ein mäßiger Zusammenhang der einzelnen Mutationen mit in vivo- und in vitro-Chloroquin-Resistenz entwickelte sich in eine signifikante Korrelation bei Kombination von N86Y und K76T, wie jedoch eine Studie aus dem Sudan zeigte. (Babiker *et al.* 2001)
Eine in Mauretanien durchgeführte Studie erreichte eine deutlich erhöhte Spezifität im Vergleich zu den Einzelaussagen. (Jelinek *et al.* 2002)

Happi und Kollegen berichteten von einer Assoziation dieser Mutationskombination und hochgradiger in vivo-Resistenz in Nigeria, wenngleich eine Vorhersage im individuellen Fall nicht möglich war. (Happi *et al.* 2003)

In der vorliegenden Studie konnte keine Korrelation zwischen der Mutation in Codon 1042 und in vivo-Resistenz beobachtet werden. Mutationen traten in resistenten wie sensitiven Isolaten auf.
Diese Beobachtung machten auch Povoa und Kollegen in Brasilien. (Povoa *et al.* 1998)
In Thailand konnte auch keine Korrelation (Lopes *et al.* 2002) bzw. Mutation überhaupt gefunden werden (Chaiyaroj *et al.* 1999).

Im Gegensatz zu Studien aus Afrika und Südamerika konnte hier kein Polymorphismus im pfmdr Codon 1246 gefunden werden. Leider ließ sich nur bei 34 von den 67 Proben die charakteristische Bande von 500 bp nachweisen, was wohl an der niedrigen Sensitivität dieser PCR und vielleicht unbekannter Störfaktoren liegen mag. Auch ein bedeutender Anstieg der für die PCR zur Verfügung gestellten DNA konnte keine Verbesserung erzielen. Soweit die Ergebnisse auswertbar waren und wie auch andere Studien zeigten, scheint allerdings diese Mutation für den asiatischen Raum nicht von großer Bedeutung zu sein. (Chaiyaroj *et al.* 1999) Die Mutation scheint insgesamt nicht so häufig zu sein zu sein. Einige Studien konnten wie diese keine Mutation in dem Codon 1246 nachweisen, so in Isolaten aus verschiedenen südamerikanischen Ländern (Grobusch *et al.* 1998), in Thailand (Chaiyaroj *et al.* 1999), Nigeria (Happi *et al.* 2003) und Peru (Huaman *et al.* 2004).
Eine Assoziation dieser Mutation mit Chloroquin-Resistenz konnte von Flueck und Kollegen in Uganda auch nicht hergestellt werden. (Flueck *et al.* 2000) Eine Studie aus Brasilien kam zu dem gleichen Schluß. (Povoa *et al.* 1998) Bei einer Studie in Kenia mit schwerer chloroquin-resistenter Malaria konnte allerdings eine hohe Prävalenz von N86Y (92%) und Asp1246Tyr (83%) beobachtet werden (Omar *et al.* 2001b)

Speziell in Indien wurden weitere Mutationen im pfmdr-Gen untersucht und versucht, eine Assoziation mit Chloroquin-Resistenz herzustellen. Die Codons 754, 1049, 3598, 3622 und 4234 zeigten keinerlei Korrelation. (Bhattacharay *et al.* 1997, Bhattacharay & Pillai 1999)
Eine Assoziation von pfmdr-Amplifikation und Chloroquin-Resistenz, wie sie von Foote und Kollegen 1989 formuliert wurde, konnte später nicht bestätigt werde. (Basco *et al.* 1996)

Insgesamt scheint das pfmdr-Gen eine größere Rolle bei der Resistenz gegen Mefloquin zu spielen. Eine Amplifikation des Gens mit dem Wildtyp an Codon 86 soll mit einem verstärkten Efflux des Medikamentes zusammenhängen. Die Mutation hingegen zeigt erhöhte Sensitivität gegenüber Mefloquin. (Wilson *et al.* 1993, Price *et al.* 1999, Reed *et al.* 2000) Warhurst stellte die These auf, daß dies aufgrund der partiellen Inaktivierung der Fähigkeit, Mefloquin zu exportieren, geschieht, verursacht durch Mutationen im für Pgh1 codierenden Gen pfmdr. (Warhurst 2001)
Die Resistenz der Parasiten gegen Mefloquin verhielt sich in mehreren Studien umgekehrt zum Ausmaß der Resistenz gegen Chloroquin. Je resistenter gegen Chloroquin eine Zelle war, desto sensibler reagierte sie auf Mefloquin. (Peel *et al.* 1994, Cowman *et al.* 1994, Barnes *et al.* 1992) Chaiyaroj und Kollegen fanden allerdings in mefloquin-resistenten Isolaten aus Thailand keine Amplifikation des pfmdr-Gens, dies ist also keine notwendige Komponente für die Resistenz, sondern verstärkt sie womöglich. (Chaiyaroj *et al.* 1999)
Die Rolle des pfmdr-Gens ist für die Chloroquin-Resistenz noch nicht festgelegt, eine verstärkende Wirkung im Falle der Mutation ist aber sehr wahrscheinlich.

Antifolate

Nur 5 (13,9%) Therapieversager traten in der Gruppe auf, die alleine mit Antifolaten behandelt worden waren. Erste Studien in Laos konnten eine in vivo-Resistenz von 0-20% messen. (Ebisawa *et al.* 1970, Al Tawil 1978, Pholsena 1989) In den Neunzigern lag die Rate zwischen 7-9%. (Viengxay *et al.* 1996, 1997) Die hier ermittelte Resistenzrate deckt sich gut mit früheren Ergebnissen, eine rapide Resistenzentwicklung ist nicht erfolgt. Eine Erklärung könnte in der Tatsache liegen, daß – obwohl Fansidar offiziell zweites Mittel der Wahl war – S/P nicht verbreitet genutzt wurde in Laos. Wie schon oben erwähnt, liegen die Resistenzraten in den Nachbarländern von Laos teilweise bedeutend höher. In Vietnam wurde 1993 einen Anstieg der in vivo-Resistenz gegen Fansidar auf 83% registriert. (Nguyen TA 1993) Der angrenzende Nordosten Kambodschas gilt im Vergleich zum restlichen Land als wenig resistent. (Lim *et al.* 2003)

<u>DHFR</u>

Trotz der niedrigen in vivo-Resistenz beobachteten wir eine sehr hohe Prävalenz der Asparagin-Mutation von Codon 108 des dhfr-Gens. Dieses Ergebnis stand in

Übereinstimmung mit anderen Studien aus Gegenden mit weit höheren Resistenzraten, z.B. aus Uganda (Jelinek *et al.* 1998, Kyabayinze *et al.* 2003), Venezuela (Urdaneta *et al.* 1999), Indien (Biswas *et al.* 2000), Brasilien (Vasconcelos *et al.* 2000) und Mali (Omar *et al.* 2001a). Ausgedehnter Gebrauch von Sulphadoxin und vor allem Pyrimethamin als Antibiotika aller Art könnten das Auftreten von Mutationen beschleunigen. Häufige gegen Plasmodien nicht ausreichende Medikamentenspiegel, die aufgrund einer anderen Infektion erzielt wurden, führen bei (sub-)klinischer Malaria zur Anzucht resistenter Plasmodienstämme.

Multiklonale Infektionen im DHFR Gen wurden häufig beobachtet. Eine Selektion zum mutierten Genotyp hin unter medikamentösem Druck trat in jedem klinisch resistenten Isolat an Tag 14 auf. Diese Selektion wurde auch in vielen anderen Studien beobachtet. (Curtis *et al.* 1996, 1998, Jelinek *et al.* 1999a, 1999b, Diourte *et al.* 1999, Doumbo *et al.* 2000)
Die hohe Prävalenz im Vergleich zur niedrigen Resistenz ergab zwar einen guten Sensitivitätswert, eine spezifische Aussage ließ sich jedoch nicht machen. Gleiches läßt sich zum Codon 59 sagen. Eine absolute Selektion an Tag 14 konnte beobachtet werden. Dies stimmt mit Studien aus Tansania und Bangladesch überein. (Jelinek *et al.* 1997, Jelinek *et al.* 1998, Van den Broek *et al.* 2004)

Andererseits wurde keine Korrelation zwischen den Mutationen in Codon 51 oder 59 und dem klinischem Ergebnis gefunden. Das unterscheidet diese Studie von vielen anderen, die eine Assoziation zwischen diesen Mutationen und Antifolat-Resistenz in endemischen Gegenden gezeigt hatten (Peterson *et al.* 1989; Plowe *et al.* 1997, Curtis *et al.* 1998, Basco *et al.* 2000, Nagesha *et al.* 2001). In Uganda zeigte die Tripel-Mutation (Asn-108/Ile-51/Arg-59) sogar eine signifikante Korrelation mit Resistenz gegen Cotrimoxazol. (Jelinek *et al.* 1999b)

Die Kombination von Asn-108 und Arg-59 hatte ebenso wie die Tripelmutation (Asn-108/Ile-51/Arg-59) keine höhere Aussagekraft als die einzelnen Mutationen in unserer Studie. In den fünf resistenten Isolaten lagen an Tag 0 sowohl Wildtypen als auch Mutationen aller drei Codons verschieden kombiniert vor. Codon 51 zeigte keine Selektion zur Mutation an Tag 14. Dies deckt sich nicht mit einer Studie aus Afrika. Kinder in Mali erhielten dort fünf Wochen Pyrimethamin als Malariaprophylaxe. Die Prävalenz der Mutationen im dhfr-Gen im Falle einer Malariainfektion nahm innerhalb dieser Zeit zu. Asn-108 stieg von 13% auf 100%, was eine absolute Selektion bedeutet. Die Mutation lag an Tag 0 noch unter der

Erfassungsgrenze. Ile-51 nahm von 4% auf 50% und Arg-59 von 11% auf 90% zu. (Doumbo *et al.* 2000)
Plowe und Kollegen konnten für Asn-108 eine signifikante und Ile-51 und Arg-59 eine Korrelation ohne Signifikanz bei in vivo-Studien aus Mali, Kenia, Malawi und Bolivien nachweisen. (Plowe *et al.* 1997)
Kyabayinze und Kollegen fanden in Uganda 2003 eine hohe Prävalenz von Asn-108 und Ile-51, eine Korrelation war nur für Codon 59 herzuleiten. Nach einem Follow-up konnten höhere Korrelationen gemessen werden. Codon 59 zeigte die größte Assoziation. (Kyabayinze *et al.* 2003) Omar beobachtete eine Selektion für die Tripel-Mutation in Kenia, eine Aussage über den Therapieverlauf war jedoch nicht möglich. (Omar *et al.* 2001a)

Die mit Resistenz gegen Cycloguanil, der aktiven Substanz des Proguanils, assoziierte Mutationenkombination aus DHFR-Threonin-108 und –Valin-16 konnte in keinem unserer Isolate entdeckt werden. (Peterson *et al.* 1990) Der Gebrauch dieses Medikamentes ist in Laos auch nicht verbreitet.

Eine DHFR-Leucin-164 Mutation war ebenfalls nicht auffindbar. Diese Mutation war bisher nur in Asien und Lateinamerika beschrieben und mit hoher Resistenz gegen Pyrimethamin und auch Chlorproguanil-Dapson assoziiert worden. (Basco *et al.* 1995, Plowe *et al.* 1997, Masimirembwa *et al.* 1999) Die sogenannte Quadrupel-Mutation, die in vitro 1000-fach weniger sensitiv gegenüber Pyrimethamin ist, besteht aus der klassischen Tripel-Mutation und Leu-164. (Wilairatana *et al.* 1997, Plowe *et al.* 1998, Nzila-Mounda *et al.* 1998)

In einem Dorf in Tansania wurden 1998 imprägnierte Bettnetze für Kinder eingeführt. Die Prävalenz der Wildtypen in den Codons 108, 51 und 59 stieg bis zum Jahr 2000 merklich an. Im Nachbardorf ohne Bettnetze herrschte eine wesentlich höhere Prävalenz der Mutationen. Die Resistenzbildung hat anscheinend auch hier ein Potential zur Rückbildung. (Alifrangis *et al.* 2003)

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der beschriebene Polymorphismus an Codon 108 als Voraussetzung für klinische Resistenz gegen Pyrimethamin angenommen werden kann. Die hohe Prävalenz spricht für eine ausgeprägte Resistenz der Parasiten. Die in anderen Studien die Resistenz verstärkenden zusätzlichen Mutationen haben sich hier nicht als aussagekräftig erwiesen. Insgesamt mangelt es den meisten in vivo-Studien zu DHFR an signifikanter

Korrelation. Andere Faktoren im lebenden Wirtsorganismus wie die Immunität beeinflussen das Auftreten bzw. den Grad einer klinischen Resistenz. (Peterson *et al.* 1989, Zolg *et al.* 1989, Curtis *et al.* 1996, Sirawaporn *et al.* 1997b, Aubouy *et al.* 2003)

DHPS

Codon 437 von DHPS scheint eine Hauptrolle in der Entwicklung klinischer Resistenz gegen Sulphadoxin zu spielen, in beiden Medikamenten-Armen mit S/P zeigte dieses Codon eine hohe bis signifikante Korrelation zwischen klinischem Ergebnis und Mutation. Die Mutation Ser-436 war mit S/P-Resistenz an Tag 0 einfach und an Tag 14 signifikant korreliert. Auch andere Studien assoziierten diese Mutationen mit Resistenz gegen S/P. (Triglia & Cowman 1994, Brooks *et al.* 1994, Reeder *et al.* 1996, Triglia *et al.* 1997)

In einer in vitro-Studie stellte sich die Kombination von Ser-436, Gly-437 und Ser-613 als hochgradig resistent gegen Sulphadoxin heraus. (Wang *et al.* 1997) Diese Tripelmutation brachte auch in dieser Studie eine signifikante Korrelation mit einer Odds Ratio von 19,50 zutage.

Van den Broek und Kollegen konnten in Bangladesch gar keine Korrelation von in vivo-Resistenz gegen S/P mit Polymorphismen im dhps- oder dhfr-Gen feststellen. (Van den Broek *et al.* 2004)

Etliche Studien beobachteten eine einfache bis signifikante Korrelation bei unterschiedlichen Konstellationen der Mutationen. Eine in Mali durchgeführte in vivo-Studie beobachtete eine Selektion unter S/P-Therapie für die hier untersuchten Polymorphismen im dhps-Gen, die aber keine Signifikanz erreichten. (Diourte *et al.* 1999) Diese Beobachtung machte auch ein Forscherteam in West Papua, Indonesien. Speziell Asn-108 oder Arg-59 von DHFR gemeinsam mit Gly-437 implizierten scheinbar Resistenz verschiedenen Grades, die Mutation Glu-540 war mehr mit höhergradiger Resistenz assoziiert. (Nagesha *et al.* 2001)

Plowe und Kollegen erfaßten für die Mutation an Codon 540 eine signifikante Korrelation in Isolaten aus Mali, Kenia, Malawi und Bolivien. Ohne Signifikanz korrelierte Ser-437. (Plowe *et al.* 1997)

Kublin und Kollegen fanden einen Zusammenhang zwischen Resistenz gegen S/P und eine sogenannte Quintupel-Mutation, die sich aus Asn-108, Ile-51, Arg-59 von DHFR und Gly-437 und Glu-540 von DHPS zusammensetzte. Das Auftreten von Glu-540 und Arg-59 sagte die Quintupel-Mutation voraus. Dies würde wieder für die Grundmutationen Asn-108, nachfolgend Ile-51 und Gly-437 sprechen, die durch weitere Mutationen einen Anstieg der Resistenzerfahren. (Kublin *et al.* 2002)

Eine hohe Prävalenz dieser Quintupel-Mutation konnte auch bei schweren Malariafällen in Kenia gemessen werden. Chloroquin und S/P als Monotherapie hatten bei allen versagt. (Omar *et al.* 2001b) Diese Beobachtung einer Quintupel-Mutation konnte in unserer Studie nicht bestätigt werden.

Das gleiche Team beobachtete bei einer weiteren in vivo-Studie in Kenia eine sehr hohe Prävalenz dieser Mutationen. Eine Aussage bezüglich des Therpieverlaufs war unmöglich, da die Spezifität sehr niedrig war. Als verfälschender Faktor wurde die angeeignete Immunität der Bevölkerung erwogen. (Omar *et al.* 2001a)

Eine Vorhersage war auch für Kyabayinze und Kollegen in Uganda nicht möglich, die Mutationen 436, 437 und 540 korrelierten allerdings mit Resistenz gegen S/P. Nach einem Follow-up von 28 Tagen konnten durch Selektion der Mutation eine stärkere Assoziation beobachtet werden, die bei Glu-540 bei DHPS und Arg-59 von DHFR am höchsten ausfiel. (Kyabayinze *et al.* 2003)

Für Codon 540 konnte hier kein Zusammenhang mit einer Resistenzbildung beobachtet werden, obwohl viele Studien aus anderen Ländern gerade diesem Codon eine große Bedeutung beimaßen, wie oben beschrieben wurde. (Plowe *et al.* 1997, Nagesha *et al.* 2001, Kublin *et al.*. 2002, Kyabayinze *et al.* 2003)

Codon 581 und 613 alleine waren hier ebenfalls nicht mit Sulphadoxin-Resistenz assoziiert, obwohl andere Studien eine positive Korrelation herstellen konnten. (Brooks *et al.* 1994, Wang *et al.* 1997, Jelinek *et al.* 1999) Interessanterweise fand unter S/P-Therapie eine Selektion der Mutation Gly-581 in beiden Medikamentenarmen bis Tag 14 statt. Die Prävalenz der Mutationen wuchs von insgesamt 5 auf 24 von 64 Isolaten. Jedoch fanden sich die meisten Mutationen in den klinisch sensitiven Fällen. Die Mutation an Codon 613 war insgesamt sehr selten. Im gemischten Medikamentenarm wurde sie gar nicht entdeckt, im mit S/P behandelten Zweig war eine Mutation an Tag 0 zu finden. An Tag 14 fand sich in dem klinisch sensitiven Isolat keine Plasmodien-DNS mehr. Zwei Mutationen an Tag 14 hatten am Tag O Wildtyp gezeigt. Es hatte also eine Selektion zur Mutation stattgefunden, die Isolate erwiesen sich aber als klinisch sensitiv.

Bei Codon 581 wurde eine Sequenzierung einiger Templates durchgeführt, da Unklarheiten beim Enzymverdau aufgetreten waren. Es ließ sich aber an allen Proben nur die bekannte Mutation, codierend für Glycin, nachweisen.

In Gegenden hoher Resistenz gegen S/P ließ sich häufig eine hohe Prävalenz an Mutationen finden. Urdaneta und Kollegen berichteten von einer Prävalenz von 100% für die Mutation an Codon 437, von 96% an Codon 581 und für 96% an den Codons 437, 581, 108, 51 in Isolaten aus Venezuela. (Urdaneta *et al.* 1999)
Auch beobachteten Jelinek und Kollegen in Uganda und Tansania eine Selektion der Mutationen an Codon 436, 437, 540 und 581, konnten aber keine Korrelation herstellen (Jelinek *et al.* 1998, 1999) Diese Selektion bestätigten Curtis und Kollegen für 436, 437 und 540 unter S/P. Chlorproguanil-Dapson hatte hingegen keinerlei Effekt auf diese Codons. (Curtis *et al.* 1998)
In indischen Isolaten lag die Prävalenz der Mutationen mit 4,5% niedrig, im Vergleich zu Thailand mit 66%, was auch den allgemeinen Resistenzraten entsprach. (Biswas *et al.* 2000)
Die vorliegende Studie ermittelte für Laos ebenfalls eine eher mäßige Prävalenz an DHPS-Mutationen (24,6%) bei mäßiger S/P-Resistenz (18,25%, beide Medikamentenarme zusammengenommen).

Es muß berücksichtigt werden, daß Sulphadoxin immer mit Pyrimethamin gemeinsam gegeben wurde. Die niedrige Prävalenz der DHPS-Mutationen korreliert gut mit dem Therapieergebnis. Die hohe Prävalenz der DHFR-Mutationen und die schlechte Assoziation dürfen nur gemeinsam mit dem Kombinationspartner betrachtet werden, der bezüglich Codon 436 und 437 gut korreliert. Für die anderen Mutationen konnte kein Zusammenhang bestätigt werden, jedoch spielt natürlich auch hier die Wirtsimmunität eine entscheidende Rolle

Kombination
Zur Gruppe mit kombinierter Therapie läßt sich noch kurz einiges ergänzen.
22,6% Therapieversagen konnte in dieser Gruppe registriert werden. Eine in Laos durchgeführte in vivo-Studie über 42 Tage ermittelte eine Resistenzrate von nur 7% für diese Medikamenten-Kombination. (Mayxay *et al.* 2004) Sie steht als Therapie der Wahl derzeit zur Debatte.
In Bangladesch konnten Resistenzraten von 25,9-30,7% für diese Medikamentenkombination ermittelt werden. Sie wurde daher nicht als Mittel der Wahl vorgeschlagen. (Rahman *et al.* 2004) In Uganda lag die Rate der Therapieversager bei 7,2%. (Gasasira *et al.* 2003)
Die Prävalenz der Mutationen pfcrt-76, DHFR-Asn-108 und DHFR-59 lag insgesamt so hoch, daß keine Vorhersage möglich war. DHFR-51, DHPS-436 und DHPS-581 zeigten eine

Selektion der Mutation bis spätestens zum Tag 14.
In einer Studie aus Kenia mit CQ- und S/P-resistenten Isolaten konnte eine hohe Prävalenz an mit folgender Mutationen beobachtet werden: Pfmdr Tyr-86 und Tyr-1246 sowie DHFR Asn-108, Ile-51, Arg-59 und DHPS Gly-437 und Glu-540. (Omar *et al.* 2001a)
Einzig Codon 437 von DHPS zeigte eine signifikante Korrelation mit Resistenz in dieser Gruppe. Die Kombination der Mutationen pfmdr-86 und DHPS-437 erwies sich in der vorliegenden Studie als hoch spezifisch mit 95,65%. Aufgrund mangelnder Daten war ein Vergleich mit Mutationskombinationen anderer Länder nicht möglich.

5.2. Vergleich mit in vitro-Studien

In vitro-Studien zeigen die Reaktionen der Plasmodien unbeeinflußt von Wirtsfaktoren. Man kann besser beurteilen, ob eine bestimmte Mutation dem Parasiten wirklich zu Resistenz verhilft. Diese Studien zeigen insgesamt eine hohe Korrelation zwischen in vitro-Resistenz und den hier untersuchten Mutationen.

Chloroquin
Die Entdecker des Gens, Fidock und Kollegen, konnten eine komplette Korrelation zwischen Chloroquin-in vitro-Resistenz und der K76T Mutation im pfcrt-Gen in Plasmodienlinien aus Asien, Afrika und Südamerika herstellen. (Fidock *et al.* 2001)
Eine Studie aus Thailand errechnete ebenfalls eine signifikante Korrelation für Mutationen im pfcrt-Gen einschließlich an Codon 76 und Chloroquin-Resistenz in vitro. (Lopes *et al.* 2002) Weitere Studien in Kamerun (Basco & Ringwald 2001, Basco 2002), Thailand, Birma, Vietnam und Bangladesch (Pickard *et al.* 2003) sowie Papua Neuguinea (Nagesha *et al.* 2003) beobachteten gleichfalls eine hohe Korrelation, allerdings war eine Vorhersage des Resistenzverhaltens allein mit der Mutation nicht möglich. Huaman und Kollegen erfaßten bei einer in vitro-Studie in Peru eine Chloroquin-Resistenz von 100% bei einer Prävalenz von K76T von 100%. (Huaman *et al.* 2004) Analysen in Südvietnam zeigten ebenfalls eine 100%ige Prävalenz der Mutation bei in vitro-Resistenz. (Ngo *et al.* 2003). Tinto und Kollegen berichteten von Isolaten aus Burkina Faso, die eine gute Korrelation in vitro zeigten. (Tinto *et al.* 2003) Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie aus Kambodscha konnte zwar eine 100% Sensitivität messen, die Spezifität war jedoch niedrig, da 15 von 17 in vitro sensitiven Isolaten ebenfalls die Mutation trugen. (Lim *et al.* 2003)

Die Studien betreffend das pfmdr-Gen fallen sehr unterschiedlich aus.
Eine in vitro durchgeführte Studie mit Isolaten aus Südamerika erzielte nur eine inkonsistente Korrelation für die Mutation an Codon 86 (Grobusch *et al.* 1998), ebenso eine in vitro-Studie mit thailändischen Präparaten. (Price *et al.* 1999)
Im Gegenzug wurden zahlreiche Studien veröffentlicht, die eine Korrelation zwischen N86Y von pfmdr und Chloroquin-Resistenz herstellen konnten. In den meisten Fällen war sie allerdings nicht signifikant. Cox-Singh und Kollegen beispielsweise konnten 1995 eine positive Korrelation zwischen Codon 86 im pfmdr-Gen von malaysischen Isolaten und in vitro-Resistenz beobachten. (Cox-Singh *et al.* 1995) Duraisingh und Kollegen bestätigten dies 1997 mit verschiedenen Laborstämmen. (Duraisingh *et al.* 1997)
In vitro Studien aus Kambodscha (Lim *et al.* 2003) und Südvietnam (Ngo *et al.* 2003) zeigten nur eine geringe Korrelation zwischen dieser Mutation und in vitro-Resistenz. In vitro Studien mit laotischen Präparaten standen mir zum Vergleich nicht zur Verfügung.
Eine schwache Korrelation für die Codons 1042 und 1246 von pfmdr konnte in einer afrikanischen (Tinto *et al.* 2003) und einer südostasiatischen Studie mit Isolaten aus Thailand, Myanmar, Vietnam und Bangladesch (Pickard *et al.* 2003) bestätigt werden.
Eine andere thailändische in vitro-Studie von Lopes und Kollegen konnte keine Korrelation mit Resistenz für Codon 1246 im pfmdr-Gen herstellen. (Lopes *et al.* 2002)

Einen Anstieg der in vitro-Resistenz konnten Tinto und Kollegen mit Isolaten aus Burkina Faso bestätigen, wenn sie Mutationen kombinierten. Die Mutationen N86Y und K76T benötigten im Vergleich zu den einzelnen Mutationen die höchste Hemmkonzentration.
(Tinto *et al.* 2003)

Antifolate
In vitro-Studien zeigen interessanterweise auch hier eine wesentlich höhere Korrelation mit Resistenz als in vivo-Studien.
Zolg und Kollegen sequenzierten 1989 das dhfr-Gen verschiedener Laborstämme aus Südamerika, Asien und Afrika. Sie fanden vier differierende Nukleotide, d.h. Mutationen an vier Codons, die sie auf in vitro-Resistenz testeten. Asn-108 schien für sie die Basis der Resistenz gegen Pyrimethamin (Zolg *et al.* 1989)
Dies folgerten auch Sirawaporn und Kollegen aus ihren Studien. Sie stellten DHFR-Produkte mit künstlichen Mutationen an Codon 108 her. Alle 20 Aminosäuren wurden ausprobiert, neun Versionen waren enzymatische aktiv und resistent gegen Pyrimethamin. Das Protein mit

Asn-108 zeigte sogar eine Aktivität annähernd der des Wildtyps. Diese Eigenschaft in Kombination mit einer guten Resistenz gegen Pyrimethamin und der Tatsache eines einfachen Basenaustausches könnten die Selektion dieser Mutation erklären. (Sirawaporn *et al.* 1997a). Mutationen in den Codons 51, 59, 108 und 164 führten zu Resistenzen gegen P, die in vitro-Resistenz multipler Mutationen war größer als die Summe der einzelnen Mutationen, was auf synergistische Effekte schließen läßt. Die Resistenz würde mit der Asn108-Mutation beginnen und sich von dort schrittweise weiterentwickeln. (Sirawaporn *et al.* 1997b)
Das Forscherteam Basco und Ringwald konnte in mehreren in vitro-Studien in Kamerun eine gute Übereinstimmung der Polymorphismen im dhfr-Gen und Pyrimethamin-Resistenz finden. Sensitve Isolate bestanden in einer Studie zu 100% aus Wildtypen, 14 von 15 resistenten Präparaten zeigten Asn-108. (Basco & Ringwald 1998) 1999 konnten sie eine 95%ige Übereinstimmung zwischen Mutationen und Resistenzen messen und 2000 war ihr Fazit, daß desto mehr Resistenzen beobachtet werden könnten, je mehr Mutationen sich anhäuften in einem Isolat. Asn108, Ile51 und Arg59 korrelierten mit in vitro-Resistenz. (Basco & Ringwald 1999, 2000)
Eine signifikante Korrelation mit eben diesen Polymorphismen konnte auch von Khalil und Kollegen und festgestellt werden. (Khalil *et al.* 2003)
Eine Studie aus Gabon kam in ihren Untersuchungen der in vitro Resistenz zu ähnlichen Ergebnissen mit hoher Korrelation für die Tripelmutation Asn-108, Ile-51 und Arg-59. Die parallel geführte in vivo-Studie konnte diese Korrelation jedoch nicht bestätigen. Der Therapieerfolg stand in keinem Zusammenhang zur hohen Prävalenz der Mutationen. Mindestens zwei DHFR-Mutationen kombiniert mit mindestens einer im DHPS-Gen waren notwendig für ein Therapieversagen. Diese Kombination führte dennoch zu einer Heilung in 82% der Fälle. Mutationen, die sich in vitro als hochresistent darstellten, erwiesen sich in vivo als nicht ausreichend zur Ausbildung einer Resistenz. (Aubouy *et al.* 2003)

Eine in vitro-Studie von Brooks und Kollegen konnte hochgradige Resistenz bei der Kombination Ser-436 und Ala-613 oder der einzelnen Mutation Ala-581 des dhps-Gens messen. Keine Korrelation wurde für die Mutation an 437 gefunden. Eine Amplifikation des Gens hatte nicht stattgefunden. (Brooks *et al.* 1994)
Eine andere Beobachtung konnten Khalil und Kollegen machen, ein Zusammenhang von Sulphadoxin-Resistenz mit den Codons 436 und 437 wurde nicht gemessen. Sie erklärten, dies könne mit der Anwesenheit von Folat im Medium zusammenhängen. Wie oben erwähnt,

reduziert Folat Sulphadoxin-Resistenz. Niedrige bis mäßige Resistenz könnte durch Folsäure im Medium aufgehoben werden. (Khalil *et al.* 2003)

Eine 1997 durchgeführte in vitro-Studie mit Laborstämmen aus Afrika, Thailand, Indochina und Südamerika testete alle fünf auch untersuchten Mutationen von DHPS. Eine alleinige Mutation an Codon 437 (Laborstamm 3D7 aus Afrika) bewirkte einen signifikanten Unterschied zum HB3-Stamm, der in allen fünf Codons den Wildtyp trägt und sensitiv gegenüber Sulphadoxin ist. Ein zweifache Mutation im Stamm K1 aus Thailand mit Gly-437 und Gly-581 verdreifachte die nötige Hemmkonzentration. Die Mutation Ser-436 lag nur in Kombination mit Gly-437 und Ser-613 im Stamm Dd2 aus Indochina vor. Diese Triplemutation zeigte hochgradige Resistenz mit einer 20-30-fach höheren IC50.

(Wang *et al.* 1997) Die Kombination der Codons 436, 437 und 613 brachte auch in der vorliegenden Studie eine signifikante Korrelation mit einer Odds Ratio von 19,50 zutage.

Diese Kombination wurde auch von Wang und Kollegen in einer in vitro-Studie favorisiert, sie zeigte den höchsten Grad an Resistenz. Diese Studie machte noch auf einen anderen Einflußfaktor aufmerksam. Bei Folatgabe konnte die durch Mutationen gewonnene Resistenz wieder behoben werden. Dieser Effekt war um so eindringlicher je resistenter der Stamm und größer die Folatmenge war. Das dafür verantwortliche Gen scheint eng mit dem dhfr-Gen verbunden zu sein. (Wang *et al.* 1997)

Die Studie von Aubouy kombinierte eine in vitro- mit einer in vivo-Studie. Sie wurde schon im Zusammenhang mit dem dhfr-Gen erwähnt. Die Codons 436, 437, 540 und 581 wurden untersucht. 1-2 von ihnen in Kombination mit der Triple-Mutation Asn-108, Ile-51 und Arg-59 von DHFR korrelierten in vitro gut mit Resistenz gegen P/S. In vivo erwies sich jedoch diese Konstellation nicht ausreichend für eine Resistenzbildung. (Aubouy *et al.* 2003)

In der hier vorliegenden in vivo-Studie konnte zwar eine Korrelation für Codon 436 und 437 bestätigt werden, eine Vorhersage war jedoch nicht möglich.

Die Ergebnisse verdeutlichen gut den Unterschied zwischen in vivo- und in vitro-Studien. Die im Wirtsorganismus sich abspielenden Prozesse spielen eine bedeutende den Therapieverlauf bestimmende Rolle.

5.3. Andere Faktoren

Die in vitro im Vergleich mit in vivo-Studien haben deutlich gezeigt, dass noch andere Faktoren eine Rolle in der Resistenzbildung spielen müssen. Zwei Patienten können trotz gleicher Mutationen ihrer Erreger verschiedene Krankheitsbilder mit unterschiedlichem Therapieverlauf entwickeln. Sowohl Alter, angeeignete Immunität, bei Frauen Schwangerschaft, Erbkrankheiten der Erythrozyten wie Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel, Sichelzellanämie oder die in Asien sehr verbreiteten Beta-Thalassämien bestimmen über den Verlauf von Krankheit und Therapie. (Allison 1954, Ruwende *et al.* 1995, Djimde *et al.* 2001, Mühlberger *et al.* 2003, Sutanto *et al.* 2004, Suh *et al.* 2004) Im Süden von Laos ist kürzlich unter 603 Erwachsenen verschiedener Ethnien die höchste Frequenz an Hämoglobin E, eine Hämoglobinopathie, asienweit gefunden worden: 43,3% der erwachsenen Bevölkerung in der Sekong Provinz, 25,3% in Attapeu. (Flatz *et al.* 2004) Allgemein herrscht eine Prävalenz von ca.15% in der südostasiatischen Bevölkerung. Malaria führt zur natürlichen Selektion dieses Beta-Globin-Gens, da die Plasmodien sich in den Erythrozyten dieser Genträger schlechter vermehren können. Es besteht also ein gewisser natürlicher Schutz vor Malaria, der den Nachteil des nicht voll funktionsfähigen Hämoglobins aufwiegt. Eine milde hämolytische Anämie läßt sich meist nur bei Homozygoten beobachten. (Lang & Löscher) Die lange Isolation des Landes hat vielleicht die Konzentration dieses Gens in Laos noch begünstigt.

Bei Kindern ist eine Assoziation von Askaridenbefall mit schweren Malariaerkrankungen und hohen Parasitämien beschrieben worden. (Le Hesran *et al.* 2004) Ebenso scheint Unter- bzw. Mangelernährung bei Kindern zwischen 2 und 18 Jahren eine Erkrankung an Malaria tropica zu begünstigen, wie eine Studie aus Laos herausfand. (Takakura *et al.* 2001)

Begleitender Gesundheitszustand, chronische Erkrankungen und ein geschwächtes Immunsytem beeinflussen also zusätzlich den Krankheits- und Therapieverlauf.

Die erworbene Wirtsimmunität spielt sicherlich die größte Rolle unter den die in vivo-Sensitivität beeinflussenden Faktoren. Die meisten Todesopfer der Malaria sind Kinder unter 5 Jahren, die noch kein effizientes Immunsystem aufbauen konnten. Viele durchgemachte Erkrankungen erhöhen den Grad der Immunität, die nach einigen Jahren in Gebieten ohne Malaria wieder verloren geht. Es wird angenommen, daß bis zu 80% der Infektionen in semi-immunen Patienten asymptomatisch verlaufen. Spezifische Antikörper gegen die verschiedenen Parasitenstadien und parasitären Toxine werden gebildet. (Lang &

Löscher, Owusu-Agyei *et al.* 2001, Malaguarnera & Musumeci 2002, Roshanravan *et al.* 2003) Eventuell ist der Erwerb der Immunität spezifisch für einen Plasmodienstamm, weshalb es mehrere Infektionen benötigt, um mit allen Stämmen der Umgebung in Kontakt zu kommen. (Day & Marsh 1991) Zahlreiche Studien bezüglich der Immunität wurden durchgeführt, noch ist der Mechanismus nicht vollständig verstanden.

Eine mit Plasmodium chaubaudi durchgeführte Studie zeigte, daß Parasiten erfolgreich mit Antimalariamitteln, gegen die sie in vitro Resistenz gezeigt hatten, in semi-immunen Wirten eradiziert werden konnten. (Cravo *et al.* 2001)

Erworbene Semi-Immunität wird in Gegenden mit hohen Transmissionsraten angenommen (Smithhuis *et al.* 1997). Es ist möglich, daß ein gewisser Grad von Immunität ebenso in Gegenden mit eher moderaten Transmissionsleveln wie Laos existiert (Anothay *et al.* 2000).

In einer im Südosten von Laos durchgeführten Studie wurden 336 Bewohner zweier Dörfer mikroskopisch und mittels PCR auf *Plasmodium falciparum* überprüft. 17,3% waren mikroskopisch, 34,8% molekular nachweisbar infiziert. Patienten, bei denen beide Methoden positiv ausfielen, waren größtenteils junge Dorfbewohner, was die Präsenz vieler subklinischer Infektionen in älteren Leuten vermuten läßt. (Toma *et al.* 2001)

Djimde und Kollegen fanden heraus, daß die Fähigkeit, chloroquin-resistente Parasiten zu beseitigen, mit dem Alter zunimmt. Bei den unter 10-jährigen mit chloroquin-resistenten Parasiten konnten nur 32% mit Chloroquin geheilt werden, wohingegen sich 66% der älteren Kinder und Erwachsenen mit resistenten Plasmodien als klinisch sensitiv erwiesen. (Djimde *et al.* 2001) Eine im Süden von Laos durchgeführte Studie fand ebenfalls eine 4,9-fach höhere Therapieversagerquote unter den 5-15-jährigen als unter den Erwachsenen, was für die Präsenz einer angeeigneten Immunität spricht. (Mayxay et al. 2003b)

Aus diesem Grund könnte eine junge, noch nicht semi-immune Studienpopulation möglicherweise die Wahrscheinlichkeit einer zuverlässigen Vorhersage anhand der molekularen Marker erhöhen, aber die Anzahl der sehr jungen Kinder in unserer Studie ist zu gering für eine genaue Analyse.

Erwähnenswert ist aber das mittlere Alter in den verschiedenen Studiengruppen. Dieses lag bei den auf die Medikamente ansprechenden Patienten grundsätzlich höher als bei den Therapieversagern. Für die CQ-Gruppe errechnete sich ein mittleres Gesamtalter von 8,5 Jahren, insgesamt sehr jung, die Patienten mit resistenten Plasmodien besaßen ein mittleres Alter von 5,8 Jahren. Bezüglich S/P ergaben sich Werte von 14,5 zu 12,7 Jahren (ein Patient mit 50 Jahren hob das Gesamtalter der Therapieversager stark an) und für die kombiniert behandelte Gruppe errechneten sich Werte von 16,1 zu 4,7 Jahren. Die recht hohe Differenz

besonders in der letzten Gruppe spricht für ein altersabhängiges Therapieansprechen. Das mittlere Alter der Therapieversager von 4,7 Jahren entspricht dem Alter, in dem das Immunsystem noch nicht ausreichend ausgebaut ist. Nicht das Alter an sich sondern der Grad der Immunität, der mit den Lebensjahren in endemischen Malariagebieten gleichbedeutend mit der Anzahl stattgehabter Infektionen positiv korreliert, scheint dafür verantwortlich zu sein. Bei nicht-immunen Patienten korreliert das Lebensalter eher mit der Schwere der Erkrankung. (Mühlberger *et al.* 2003)

Bei einer kürzlich in Vietnam durchgeführten Studie mit 28 Tagen Follow-up wurde eine semi-immune Gruppe mit einer nicht-immunen verglichen. Je zwei Studiengruppen aus zwei verschiedenen Provinzen wurden mit je CQ + Artesunat und S/P + Artesunat behandelt. In der Provinz Dac Lac wurden 57 Patienten ausgesucht, die seit Geburt potentiell der Malaria ausgesetzt waren, die 66 Patienten von Bunh Phuoc stellten nicht-immune Arbeiter und ihre Angehörigen dar. Über 96% der Patienten beider Gruppen aus Dac Lac sprachen klinisch auf die Therapie an, 15,7% erwiesen sich per PCR als asymptomatische submikroskopische Rekrudeszenz an Tag 28. In Binh Phuoc reagierten weniger als 52% klinisch sensitiv. Die Prävalenz von K76T war in Dac Lac fast 100% und korrelierte nicht gut mit in vivo-Resistenz, in Binh Phuoc dagegen war eine Vorhersage des Therapieversagens anhand K76T möglich. (Nguyen *et al.* 2003) Die hohe Prävalenz in beiden Studiengebieten läßt auf eine weiterhin hohe Resistenz der Plasmodien schließen. Die Wiedereinführung von Chloroquin und S/P in Kombination mit Artesunat ist nicht zu empfehlen. Das gute Anschlagen in Dac Lac ist wohl auf die Immunität der Bevölkerung zurückzuführen, was der Vergleich mit der nicht-immunen Untersuchungsgruppe in Binh Phuoc verdeutlicht. In diesen nicht-immunen Patienten konnte K76T als Marker für klinische Resistenz verwendet werden. Die submikroskopische Rekrudeszenz in Lac Dac könnte auch durch eine Gametozytämie verursacht sein.

In der hier vorliegenden Studie galten Faktoren wie Schwangerschaft und starke Unterernährung als Ausschlußkriterien. Erkrankungen der roten Blutkörperchen wären größtenteils mikroskopisch aufgefallen, sind aber nicht völlig auszuschließen. Man kann sie als Teil der erworbenen Immunität der Bevölkerung verstehen, die allerdings hereditär ist. Die nach mehreren Infektionen angeeignete Semi-Immunität, die eine komplexe Immunantwort auf die Plasmodien darstellt, kann den Therapieausgang bestimmen, wie oben genannte Studien verdeutlichen. Studien aus dem Norden von Laos zeigten eine höhere Korrelation mit den in vivo-Daten, d.h. höheres Therapieversagen bei ähnlicher Prävalenz der Mutationen. Da

die Transmissionsraten im Süden von Laos stärker sind, kann eine ausgeprägtere Semi-Immunität in dieser Bevölkerungsgruppe angenommen werden. (Mayxay et al. 2003b)
Bezüglich dieser Studie läßt sich abschließend Folgendes sagen. Die Prävalenz von Mutationen im pfcrt- und dhfr-Gen überragt diejenige der Therapieversager deutlich. Das mittlere Alter der Therapieversager liegt mit 7,7 Jahren deutlich unter dem der gesundeten Patienten, die durchschnittlich 13,0 Jahre alt waren. Dies spricht für eine starke Verbreitung chloroquin- und pyrimethamin-resistenter Plasmodien, eine mäßige Sulphadoxin-Resistenz und eine nicht zu unterschätzende Semi-Immunität der laotischen Studienpopulation.

5.4. Rekrudeszenz-Reinfektion

Bei jeder in vivo-Studie stellt sich die Frage, ob es sich bei den späten Parasitämien um Therapieversager oder Neuinfektionen handelt.
Die Gefahr einer erneuten Infektion war in dieser Studie gegeben, da die Patienten auch nach Therapiebeginn den Vektoren der Malaria ausgesetzt waren, Bettnetze zum Schlafen wurden nicht verwendet. Die Halbwertszeit von S/P ist zwar mit 4 Tagen relativ kurz, eine Infektion vor Tag 14 ist dennoch unwahrscheinlich, wenn das Medikament vollständig resorbiert wurde. Medikamentenspiegel können natürlich individuell schwanken und dadurch den Therapieverlauf verändern. (Sowumni *et al.* 2003) Die lange Halbwertszeit von Chloroquin (10-14 Tage) spricht ebenfalls zusammen mit der Inkubationsdauer der Plasmodien gegen eine Reinfektion. Die Inkubationszeit der Malaria tropica liegt durchschnittlich bei 12 Tagen, ein Krankheitsbeginn unter 7 Tagen ist nicht zu erwarten. (Lang & Löscher)
Die Dauer der Studie von 14 Tagen, die moderate Transmission in diesem Studienareal sowie Inkubationszeit und Halbwertszeit der Medikamente machen eine Reinfektion daher sehr unwahrscheinlich (Basco & Ringwald 2000b).
Eine Genotypisierung, wie es nach Tag 14 üblich und notwendig ist, wurde aus diesem Grund nicht durchgeführt. Meist werden dabei drei Genloci der Plasmodien) nach Größe oder Mutationen mittels RFLP verglichen: merozoite surfaces proteins 1 und 2 (MSP-1 und MSP-2) und glutamate rich protein (GLURP). Finden sich am ersten und letzten Studientag die gleichen Muster, wird eine Rekrudeszenz angenommen, finden sich unterschiedlich, wird eine Reinfektion vermutet. Diese Methode birgt trotz guter Sensitivität der PCR Risiken der Mißinterpretation. Besonders multiple Infektionen erschweren die Auswertung. Allein die Mischtypen dieser Studie zeigen schon eindeutig eine Infektion mit mindestens zwei

verschiedenen Stämmen. Eine gewisse Restunsicherheit bleibt bestehen und eine Reinfektion ist oft nicht sicher auszuschließen. (Snounou & Beck 1998)

5.5. Rekrudeszenz-Gametozytämie

Die hohe Prävalenz der DHFR- und Pfcrt-Mutationen in dieser Studie hätte auf ein zahlreicheres Therapieversagen schließen lassen. Die mäßige Rate an Mutationen im DHPS-Gen deckt sich allerdings recht gut mit der Quantität der gemessenen Resistenz.
Die in klinisch sensitiven Isolaten nachweisbaren Erreger an Tag 14, die oft eine Selektion zur Mutation erfahren hatten, lassen an der Verläßlichkeit der Heilung zweifeln. Sieben Isolate der CQ-Gruppe, fünfzehn der S/P-Gruppe und zehn Isolate in der gemischten wiesen an Tag 14 noch Plasmodien-DNS vor. Da mikroskopisch allerdings keine Parasitämie mehr meßbar war, muß auch an eine Gametozytämie gedacht werden. Diese geschlechtlichen Formen entstehen nach mehreren asexuellen Vermehrungszyklen im Menschen und können 12-16 Tage im Kreislauf persistieren. (Smalley & Sinden 1977, Sinden 1983) Gametozytämien treten bei Therapieversagern statistisch häufiger auf, kommen aber auch bei Geheilten vor. Dies trifft auf die Behandlung sowohl mit Chloroquin als auch mit Fansidar zu, da beide Medikamente nur gegen die asexuellen Formen wirksam sind. Die Gametozytämien resistenter Parasiten sind verantwortlich für die schnelle regionale Verbreitung von Resistenzen. (Sowumni & Fataye 2003, Bousema *et al.* 2003) Chloroquin soll die Genese peripherer unreifer Gametozyten induzieren. (Aikawa & Ward 1974) Eine S/P-Behandlung scheint sogar signifikant mit Gametozytämien assoziiert zu sein. Zwischen Tag 7 und 14 wurden in einer Studie aus Nigeria die höchsten Gametozytämien im Vergleich mit Gabe von Chloroquin, Chloroquin plus Ketotifen bzw. Chlorpheniramin, S/P plus Chloroquin bzw. Amodiaquin gemessen. (Sowumni & Fateye 2003) Auch in Laos konnten Gametozytämien mit P/S-Bhandlung und Therapieversagen assoziiert werden. (Mayxay et al. 2003b)
Ebenfalls verantwortlich für eine positive PCR an Tag 14 können asymptomatische submikroskopische Rekrudeszenzen sein. Diese treten häufig in einer semi-immunen Bevölkerung auf. Die Erreger sind prinzipiell gegen das angewandte Medikament resistent, dem Immunsystem des Wirtes gelingt aber zusammen mit dem Medikament eine Unterdrückung des Wachstums der Parasiten. Die Parasitämien bleiben unter der Nachweisgrenze. Nach Wirkungsverlust des Medikamentes steigt die Parasitämie jedoch

an und kann erneut zu Symptomen führen. Dies würde also ein Therapieversagen bedeuten, das der Mikroskopie entgangen ist. Da für Laos eine gewisse Immunität gegen Malaria in der Bevölkerung angenommen wird, besteht diese Möglichkeit. Betrachtet man beispielsweise an Codon 76 des pfcrt-Gens die sieben Patienten der Chloroquingruppe, bei denen an Tag 14 mikroskopisch keine Parasiten nachweisbar waren, die PCR jedoch positiv ausfiel, fällt Folgendes auf:

Tab. 24:

Alter	Tag 0	Tag 2/3/7	Tag 14
5	PCR pos.: Mut*	Mut	Mut
6	Mut	Kein Nachweis	Mut
6	Mischtyp	Kein Nachweis	Mut
8	Mut	Mut	Mut
13	Mut	Kein Nachweis	Mut
13	Mut	Mut	Mut
49	Mut	Kein Nachweis	Mut

* Mutation

Es ist keine Übereinstimmung mit dem Alter auszumachen. Es wäre jedoch denkbar, daß der Fünfjährige eine Gametozytämie unter Therapie oder schon davor entwickelt hat und daher durchgehend DNS bei ihm nachweisbar war. Der 49-jährige könnte statt dessen an Tag 7 aufgrund seiner erworbenen Immunität eine Parasitämie unter der Nachweisgrenze gehabt haben, die bis Tag 14 wegen abfallender Medikamentenspiegel zugenommen hat. Das würde eine asymptomatische submikroskopische Rekrudeszenz bedeuten. Andererseits wäre auch hier eine Gametozytämie denkbar. Die unreifen Gametozyten reifen normalerweise in der Milz und im Knochenmark, erst die reifen Gametozyten werden in das periphere Blut ausgeschwämmt. Chloroquin scheint allerdings, wie oben erwähnt, eine periphere unreife Gametozytämie zu begünstigen. (Sowumni *et al.* 2003)

Submikroskopische Parasitämien, die aufgrund synchronisierter Zyklen auftreten, stellen eine weitere Erklärung dar, sind jedoch sehr unwahrscheinlich. Alle Parasiten müßten sich im gleichen Stadium befinden, synchronisiert sein. Da späte Erythrozytenstadien im peripheren Blut nahezu abwesend abwesend sein können, können sie in einem peripheren Blutausstrich dem Mikroskop entgehen. Synchronisierte Zyklen sind bei *Plasmodium falciparum* aber eher die Ausnahme. (Lang & Löscher, Snounou & Beck 1998)

Theoretisch ist auch möglich, daß die Inokulation, der Einstich, einer mehrfach infizierten Mücke zur Infektion mit verschiedenen Parasitenstämmen führt, die Variationen in der Entwicklung der Leberstadien aufzeigen. Dies würde zur zeitlich versetzten Ausschwemmung

der reifen Plasmodien führen und eine Infektion mit einem anderen Stamm verursachen, obwohl kein neuer Einstich erfolgte. Multiple Infektionen sind in endemischen Gebiete sehr häufig. (Snounou & Beck 1998)
Da die DNS zerfallener Plasmodien schnell beseitigt zu werden scheint, wird es sich eher nicht um DNS toter Parasiten handeln PCR-Analysen in Mäusen zeigen, daß die Amplifikation nicht länger als 24h nach Verschwinden der Parasiten aus dem Blutkreislauf aufrecht erhalten wird. Daher wird angenommen, daß die DNS toter Plasmodien sehr schnell aus dem peripheren Kreislauf beseitigt wird. (Snounou & Beck 1998) . Bei klinisch sensitiven Parasiten war an Tag 2-7 in den meisten Fällen keine DNS mehr zu messen.
Eine endgültige Entscheidung ist hier nicht zu treffen. Sowohl Parasitämien als auch Gametozytämien sind für diese Patienten denkbar, die Beobachtungen hoher Gametozytämien unter diesen beiden Medikamenten auch bei erfolgreicher Therapie spricht gerade bei den jüngeren noch nicht immunkompetenten Patienten für eine Gametozytämie.

5.6. Dauer der Follow up-Periode

Diese Studie wurde nach den Protokollen der WHO (1996) für Gebiete mit niedriger bis moderater Transmission und einer empfohlenen Verlaufskontrolle (Follow up) von 14 Tagen durchgeführt. Die erwarteten mäßigen Resistenzraten sprachen gegen eine modifizierte Version mit einem Follow-up von 28 bis 42 Tagen, wie es in Thailand und Gebieten mit Multiresistenz üblich geworden ist.
Wenn die Gebiete schwer zugänglich sind, die Studienpopulation sehr verstreut lebt und eine Anreise zum Studienzentrum beschwerlich ist, wie es hier der Fall war, sind kürzere Perioden auch daher von Vorteil, da eventuell viele Patienten den Follow-up nicht beenden würden.
Ein weiterer Nachteil von einer Verlaufskontrolle von über 14 Tagen ist die Gefahr der Reinfektion, weswegen dann eine Genotypisierung vorgenommen werden muß. Diese Methode birgt, wie oben erwähnt, eine gewisse Unsicherheit bei der Interpretation der Daten.

Die Beobachtung hoher Rekrudeszenzraten nach Tag 14 bei Behandlung mit CQ, P/S und anderen Malariamedikamenten führte zu einem verlängerten Follow-up in holoendemischen Gebieten mit perennealen Transmissionsraten. Späte Therapieversager treten aufgrund der erworbenen Immunität in der Bevölkerung oft erst nach Tag 14 auf.

Die relativ kurze Follow up-Periode von 14 Tagen in dieser Studie könnte die moderate Therapieversager Quote in der P/S-und CQ & P/S-Gruppe und die niedrige Korrelation zwischen Asn-108 Mutationen von DHFR und klinischem Ausgang erklären. Es ist vorstellbar, daß nach 28 Tagen höhere Raten für Rekrudeszenz bzw. spätes Therapieversagen ermittelt worden wären.

In Thailand werden die meisten Studien 28 - 42 Tage durchgeführt. (Fontanet *et al.* 1994) Allerdings herrscht dort Multiresistenz, als Folge sind Artemisinderivate wie Artesunat in Kombination mit beispielsweise Mefloquin oder Atovaquon Mittel der Wahl. Die Artemisine zeigen eine gute und schnelle Wirksamkeit und reduzieren die Parasiten innerhalb von Stunden. Jedoch ist z.B. Artesunat als Monotherapie in sehr hoher Dosierung zu verabreichen, um radikal alle Parasiten abzutöten. Bei Resistenz wurden Rekrudeszenzraten schon vor Tag 7 beobachtet. (White *et al.* 1994, Hien *et al.* 1997, Hoshen *et al.* 2000) Bei Kombination von Artesunat mit einem länger wirkenden Medikament wie Chloroquin ist die Dosierung von Artesunat gerade bei hohen Parasitämien oft nicht ausreichend, um alle Erreger abtöten zu können. Sind die Parasiten resistent gegen CQ kann es dadurch zu einer langsamen Rekrudeszenz dieser Stämme führen. Frühes Therapieversagen wird reduziert, spätes tritt dann meist erst nach Tag 14 auf. Aufgrund dieser Dynamik sind Follow-up-Perioden von 28-42 Tagen sinnvoll. (Adjuik *et al.* 2002, Sutherland *et al.* 2003)

Seit jedoch auch hohe Rekrudeszenzraten nach Tag 14 bei Monotherapie mit CQ und S/P beobachtet werden, schlagen neue Empfehlungen generell Verlaufskontrollen von mindestens 28 Tagen für in vivo-Studien mit Malariamedikamenten vor. (Stepniewska *et al.* 2004).

In Myanmar, einem Land mit höheren Resistenzraten als in Laos, wurde nach einem Follow-up von 14 Tagen unter Monotherapie mit CQ- 72% bzw. S/P 47% an Therapieversagern ermittelt, am Tag 28 stieg die Quote auf 82% bzw. 67%. (Smithuis *et al.* 1997)

Eine in Laos von den Ärzten ohne Grenzen durchgeführte Studie mit 88 Patienten wurde ebenfalls 28 Tage verfolgt. 17 von 28 Therapieversagern traten bis zum Tag 14 auf, die weiteren 11 (39,2%) ereigneten sich zwischen Tag 15 und 28. Neuinfektionen wurden nach Tag 7 weitesgehend mittels PCR ausgeschlossen, insgesamt 5 Reinfektionen ereigneten sich zwischen Tag 8 bis 28. Aufgrund dieser Ergebnisse empfehlen die Autoren Follow-up-Perioden von 28 Tagen auch für Gegenden niedriger und moderater Transmission sowie Genotypisierung nach Tag 14. (Guthmann *et al.* 2002) Dies bestätigte eine weitere Studie aus Laos. Sie verfolgte den Therapieverlauf sogar über 42 Tage, zwischen Tag 28 und Tag 42 konnte jedoch nur ein Therapieversager registriert werden. (Mayxay *et al.* 2003b)

In anderen Studien scheint die Mehrzahl der Therapieversager unter CQ oder S/P vor Tag 14 aufzutreten. Die von Pillai und Kollegen in Laos unternommene Studie ermittelte 13 von 18 Therapieversager bis Tag 7 und insgesamt 5 an den Tagen 14 und 28, d.h. zwischen Tag 8 und 28. 72,2% der Therapieversager waren also schon bis Tag 7 aufgetreten. (Pillai *et al.* 2001) Eine andere Studie aus dem Indonesischen Papua untersuchte über 28 Tage 51 nicht-immune immigrierte Javaner mit unkomplizierter Malaria tropica unter Chloroquingabe. 50 Therapieversager traten insgesamt auf, 45 bis zum Tag 14, die weiteren 5 bis zum Tag 18. Dies zeigt deutlich, daß die meisten Therapieversager bis zum Tag 14 eingetreten sind. Eine Genotypisierung wurde nicht durchgeführt. (Sumawinata *et al.* 2003)

5.7. Schlußbetrachtungen

Die Polymerasekettenreaktion ist ein sehr sensitiver (>90%) und spezifischer (~100%) Test in der Diagnostik der Malaria. (Snounou *et al.* 1993) Die Methode ist schnell und preiswert im Vergleich zu in vitro-Tests sowie relativ einfach durchführbar. (Adagu & Warhurst 1999)
Mit Etablierung der Real-time-PCR beispielsweise könnten unnötige Kontaminationen praktisch vermieden und die Präzision der Methode verbessert werden. Die Gelelektrophorese erübrigt sich für dieses Verfahren. (Farcas *et al.* 2004)
Von Untersuchungen der derzeit bekannten Resistenzgene ist kein prädiktives Potential für den Einzelfall in vivo zu erwarten. Größter Störfaktor ist der Wirt Mensch. Die in Endemiegebieten erworbene Immunität kann den Therapieverlauf entscheidend beeinflussen. Ergebnisse von in vivo-Studien in Endemiegebieten sind daher mit Vorsicht zu betrachten, da sie den wahren Resistenzstatus der Plasmodien verfälschen können. Begleitende in vitro-Studien oder molekulare Tests der Parasiten sind nötig, den Faktor der Semi-Immunität herauszufiltern. Da mit der PCR wesentlich schneller und preisgünstiger zu arbeiten ist, stellt dies die Methode der Wahl dar.

Auch wenn immer wieder Studien durchgeführt werden, bei denen die molekularen Marker zur Vorhersage von Therapieversagern im Einzelfall dienen sollen, lassen sich eher epidemiologische Aussagen als im individuellen Fall der Diagnostik treffen. Plowe und Kollegen schlugen schon 1995 vor, die PCR zum Zwecke der Surveillance bei Pyrimthamin-Resistenz einzusetzen. (Plowe *et al.* 1995)
Aufgrund hoher Prävalenzen bestimmter Mutationen und deren Kombinationen könnte beispielsweise von einem Therapieschema abgeraten, die Einführung eines anderen erwogen

werden. Soll in einem Land wie Laos das Mittel der ersten Wahl durch ein neues Medikament ersetzt werden, da die in vivo-Resistenzen einen Grad erreicht haben, der nicht mehr tragbar ist, so wäre es von Vorteil, über den Resistenzgrad des Alternativmittels schon im Vorfeld bescheid zu wissen. Durch einige in vivo-Studien sei das moderate Ausmaß der Resistenz gegen das Mittel der zweiten Wahl, Fansidar, bekannt. Hätte man nun aufgrund der Mutationen in den DHPS- und DHFR-Genen über neue Therapieempfehlungen entscheiden müssen, wäre man eventuell zu demselben Schluß gekommen. Die hohe Prävalenz von Asn-108 beispielsweise ist abschreckend, jedoch ist das Vorkommen der verstärkenden Mutationen eher gering, die Prävalenz der DHPS-Mutationen deckt sich mit der Höhe der beobachteten in vivo-Resistenz.

Die mit absoluter Resistenz assoziierte Quadripel-Mutation von DHFR (Asn-108, Arg-59, Ile-51 und Leu-164) konnte nicht entdeckt werden. (Wongsrichanalai *et al.* 2002)

Für Chloroquin läßt sich schwerer ein Zusammenhang ermitteln, die Prävalenz von Pfcrt-Tyr-76 zeugt von einem sehr hohen selektiven Druck, aber das eher niedrige Vorkommen der pfmdr-Mutationen deckt sich nicht mit der relativ hohen in vivo-Resistenz.

Die Prävalenz einer korrelierenden Mutation zeigt in jedem Fall den Resistenzgrad der Plasmodien. Die in vivo-Reaktion ist von der erworbenen Immunität der Bevölkerung und anderen Faktoren abhängig. Gegen ein Medikament resistente Parasiten können mit genau dem Medikament in einem semi-immunen Patienten beseitigt werden. Diese Patienten würde unter Umständen auch ganz ohne Medikament auskommen, die Clearence der Parasiten könnte sich aber verzögern. Eine subklinische latente Infektion kann sich bis zu sechs Monate und länger hinziehen. In Endemiegebieten verlaufen viele der Infektionen mit *Plasmodium falciparum* chronisch mit klinischen Episoden. Hohe Gametozytämien führen bei resistenten Stämmen zur Ausbreitung der Resistenz durch Übertragung der Gametozyten auf den Vektor. (Snounou & Beck 1998) Verstärkte Gametozytämien und häufigere Rekrudeszenzraten sprechen deshalb gegen die Weiterverwendung eines Medikamentes, das trotz Resistenz der Plasmodien aufgrund der Semi-Immunität greift. Ein noch wichtigerer Punkt ist, daß gerade die Kindersterblichkeit in Malaria-Endemiegebieten sehr hoch ist, dieser noch nicht immune Teil der Bevölkerung muß effektive Medikamente erhalten. Kinder, die viele Malariaerkrankungen überlebt haben, tragen häufig körperlichen Schaden oder geistige Retardierung davon. Schwangere Frauen sowie der Fetus sind ebenfalls häufige Opfer der Malaria. Niedriges Geburtsgewicht, Aborte, Frühgeburten und Tod der Mutter sind die Folgen. In Laos existiert der Spruch: „Schwanger zu sein ist wie auf seinen eigenen Tod zu

warten.“ Molekulare Surveillance in endemischen Gegenden ist daher von großer Wichtigkeit, um rechtzeitig Resistenzentwicklung zu erkennen und vorzubeugen.
Medikamentenstudien in semi-immunen Erwachsenen überschätzen die Effektivität der Antimalariamittel und werden häufig dazu benutzt ineffektive nationale Therapieempfehlungen zu unterstützen. (White 2002)

In einigen Gegenden sind molekulare Marker schon epidemiologisch eingesetzt worden.
(Wernsdorfer & Noedl 2003, Djimde *et al.* 2004)
In Malawi konnte nach Aussetzen Chloroquins über mehrere Jahre ein Rückgang der klinischen Resistenz zusammen mit einer niedrigeren Prävalenz der Mutation an Codon 76 vom pfcrt-Gen beobachtet werden. (Mita *et al.* 2003) Eine andere Gruppe beobachte die gleiche Entwicklung in einem anderen Gebiet von Malawi. Nach einer Chloroquinpause von ein paar Jahren wurde die Effektivität dieses Medikamentes wieder deutlich verstärkt und die Prävalenz der K76T-Mutation nahm deutlich ab. (Kublin *et al.* 2003) Eine Reduktion von Fansidar assoziierten Mutationen wurde auch nach Gebrauch von imprägnierten Bettnetzen beobachtet. (Alifrangis *et al.* 2003)
Ein molekularer Marker - epidemiologisch eingesetzt - kann also Hinweise auf das Vorhandensein klinischer Resistenz geben und bei Erwägung einer Wiedereinführung eines Medikamentes hinzugezogen werden. Dies war auch der Fall bei einer kürzlich in Vietnam durchgeführten Studie mit 28 Tagen Follow-up, die bereits oben erwähnt wurde. Zwei unterschiedlichen Gruppen (erworben immun und nicht-immun) wurde entweder CQ plus Artesunat oder S/P plus Artesunat verabreicht. Die Resistenzraten für CQ und S/P waren in Vietnam so hoch gewesen, daß man diese Therapie verlassen hatte, eine Wiedereinführung in Kombination mit Artesunat wurde nun überdacht. Die Patienten mit erworbener Immunität sprachen gut auf beide Therapieschemata an, währenddessen die nicht immune Gruppe fast zur Hälfte Therapieversager zeigte. Die sehr hohe Prävalenz von K76T in den mit Chloroquin behandelten Gruppen korrelierte nicht in der immunen, aber gut in der nicht-immunen Gruppe mit Therapieversagen. Die Prävalenz der Mutation ist immer noch sehr hoch, das gute Ansprechen in der einen Gruppe ist auf den immunologischen Status zurückzuführen, was man deutlich an der nicht-immunen Vergleichsgruppe sieht. Eine Wiedereinführung von CQ wäre in diesem Gebiet nicht zu befürworten. (Nguyen *et al.* 2003)
Auch eine Studie aus dem Grenzgebiet von China und Myanmar untersuchte die Prävalenz der Mutationen K76T von pfcrt und N86T von pfmdr, wo 1994 in vivo-Resistenzen gegen CQ von 96-100% geherrscht hatten und diese Therapie im Austausch mit Mefloquin plus

Artemisininderivaten verlassen worden war. Dies war Teil einer in vivo-Studie mit Chloroquin und Chloroquin plus Artesunat, zum Vergleich standen 12 Proben, die zwischen 1983-1992 gesammelt worden waren, für in vitro und molekulare Tests zur Vefügung. Die Ergebnisse zeigten ein Zunahme der Prävalenz des Wildtypes von Codon 86 im Vergleich zu den Isolaten vor 1994. Zum einen fördert die fünfjährige Chloroquinpause diese Rückentwicklung, zum anderen scheint Mefloquin, wie schon erwähnt, zu einer Selektion des Wildtyps zu führen. Die Prävalenz von K76T lag mit 100% höher als bei den älteren Isolaten. Die jüngste war allerdings von 1992 und Chloroquin wurde erst 1994 langsam verlassen. Die Heilungsrate für Chloroquin lag bei 10%, damit höher als vor Verlassen dieser Therapie. In Kombination mit Artesunat wurde eine Heilungsrate von 48% erreicht, die weiter hinter den 86% einer Monotherapie mit Artesunat blieb. Dies liegt anscheinend an einem antagonistischen Effekt dieser zwei Medikamente, wie die Autoren dieser Studie postulierten. Eine Kombination dieser Präparate wäre daher nicht zu empfehlen. Da die Mutation K76T sich in diesem Gebiet trotz abnehmenden Selektionsdruckes gut gehalten hat, wäre eine Wiedereinführung Chloroquins als Monotherapie zum jetzigen Zeitpunkt völlig verfrüht.
(Yang *et al.* 2002)
Eine ähnliche Beobachtung wurde an Isolaten aus Kambodscha gemacht, auch hier persistierte die Mutation K76T. (Lim *et al.* 2003)
Eine reine Prävalenzstudie aus Kolumbien untersuchte Mutation an den Genen von DHPS und DHFR. Aufgrund einer mäßigen Anzahl von dhfr- und geringem Ausmaß an dhps-assoziierten Mutationen kann eine beginnende Resistenzentwicklung angenommen werden. Der Einsatz dieser Präparate sollte mit Vorsicht beobachtet werden. (Schmider *et al.* 2003)
Eine andere Studie untersuchte Prävalenzen in Mauretanien und kam wegen hoher Vorkommen von dhps- und mäßiger dhfr-Mutationen zu dem Schluß, daß Fansidar als Mittel der Wahl nicht zu empfehlen wäre. Weitere Studien dieser Art fanden für beide hier untersuchten Medikamente statt und zeigen die Anwendbarkeit als Marker für epidemiologische Studien.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß es von Vorteil zu sein scheint, verschiedene kombinierte Schlüsselmutationen zu analysieren, sofern man Modelle zur Vorhersage von Therapieversagen entwerfen möchte. Eine Prognose bei Medikamentenkombinationen ist durch mögliche Interaktionen noch komplizierter, doch die Kombination der Mutationen hat sich in dieser Studie teilweise als vorteilhaft erwiesen. Obwohl hier keine spezifische Kombination von Mutationen mit einem prädiktivem Potential ermittelt werden konnte,

deuten höhere Korrelationen bei Kombination, die die Summe der einzelnen überschreiten, auf diese Möglichkeit hin. (Kublin *et al.* 2002)

Laos betreffend läßt sich sagen, daß die Kombination von S/P mit CQ gegenüber S/P als Monotherapie keinen signifikanten Unterschied gezeigt hat. Die Resistenzraten sind in beiden Gruppen relativ hoch, eine Empfehlung zum Mittel der Wahl würde eher in Richtung Mefloquin in Kombination mit Artesunat oder Artemether-Lumefantrin ausfallen. (Mayxay *et al.* 2004, Stohrer *et al.* 2004)

Die Prävalenz von K76T im pfcrt-Gen spricht gegen eine weitere Anwendung von Chloroquin, eine Pause könnte eventuell wieder zur Selektion des Wildtyps führen.

.

6. Zusammenfassung

Die Malaria ist trotz aller Eradikationsversuche und neuer Therapiekonzepte auch im neuen Jahrtausend eine gefürchtete Erkrankung, die jedes Jahr bis zu zwei Millionen Opfer fordert.
Seit dem Auftreten von Resistenzen gegen die zwei am meisten eingesetzten Medikamente Chloroquin (CQ) und Pyrimethamin-Sulphadoxin (P/S), schwanden die Hoffnungen auf eine baldige Ausrottung dieser gefährlichen Infektionskrankheit.
Sowohl Wirkmechanismus von als auch Resistenz gegen Chloroquin sind ein viel diskutiertes Thema. Eine gewisse Einigkeit herrscht bezüglich der Annahme, CQ blockiere den Hämoglobinabbau der Plasmodien. Als Resistenzmechanismen kommen eine verminderte Anreicherung, eine veränderte Substrataffinität und/oder ein Efflux des Medikamentes in Frage. Verschiedene Proteine, die als Membrankanäle oder Protonenpumpen agieren könnten, sind studiert und ihre Ursprungsgene sequenziert und auf Punktmutationen untersucht worden. Das *Plasmodium falciparum*-multidrug resistance (pfmdr)-Gen mit den Codons 86, 1042 und 1246 und das *Plasmodium falciparum*-chloroquine resistance transporter (pfcrt)-Gen mit dem Codon 76 gelten derzeit als die für Chloroquin-Resistenz (CQR) relevantesten Gene.
Die Kombination aus Pyrimethamin und Sulphadoxin (Fansidar®) wirkt über eine Hemmung der Folsäuresynthese und ihres Zyklus', in dessen Verlauf der lebensnotwendige DNS-Bausstein Thymidylat entsteht. Pyrimethamin blockiert ein Enzym namens Dihydrofolat-reduktase (DHFR), codiert vom Gen dhfr. Sechs Mutationen an fünf verschiedenen Codons wurden in früheren Studien häufig mit Resistenz gegen Pyrimethamin assoziiert. (16, 51, 59, 108 und 164). Sulphadoxin greift schon bei der Folsäuresynthese an und hemmt das Enzym Dihydropteroatsynthetase (DHPS), codiert vom dhps-pppk-Gen. Die Untersuchung dieses Gens führte ebenfalls zur Entdeckung verschiedener Punktmutationen, von denen sechs an fünf verschiedenen Codons als Resistenzmarker favorisiert werden (436, 437, 540, 581 und 613).

Eine in Laos durchgeführte Feldstudie mit 119 Patienten lieferte das Untersuchungsmaterial und Daten für diese Studie, die nun die Korrelation von dokumentierter *in vivo*-Resistenz gegen Antimalaria-Medikamente und genetischen Polymorphismen oben genannter Art analysiert. (Schwoebel *et al.* 2003)
In der mit Chloroquin behandelten Gruppe wurde eine große Zahl an Therapieversagern beobachtet (52,8%). Die Korrelation mit den Mutationen auf dem pfmdr-Gen erreichte keine

Signifikanz. Die mit Resistenz assoziierte Mutation im Codon 76 des pfcrt-Gens war in allen klinisch resistenten Isolaten vorhanden und scheint eine notwendige Determinante für CQR zu sein. Die Kombination dieser Mutation mit der in Codon 86 des pfmdr-Gens ergab einen prädiktiven Vorhersagewert von 100%.

Die *in vivo*-Resistenz gegen Antifolate (P/S) erwies sich mit 13,9% als relativ gering.

Die Mutation zu Arginin an Codon 108 des dhfr-Gens wird als Voraussetzung für klinische Resistenz gegen Pyrimethamin angenommen, aber zusätzliche Mutationen und Faktoren erscheinen notwendig bzw. verstärkend, für ein Auftreten der klinischen Resistenz zu sein. (Peterson *et al.*1989; Curtis *et al.*1996) Diese Annahme konnte hier aufgrund der hohen Prävalenz und gleichzeitig geringen Korrelation der Mutation bestätigt werden. Codon 436 des dhps-Gens scheint, eine Hauptrolle in der Entwicklung klinischer Resistenz gegen Sulphadoxin zu spielen. (Jelinek *et al.* 1999; Omar *et al.* 2001) In diesem Medikamenten-Arm zeigte das Codon eine signifikante Korrelation zwischen klinischem Ergebnis und der Mutation. Die Kombination von Codon 436, 437 und 613 (DHPS) erwies sich aufgrund einer sehr hohen Korrelation mit den *in vivo*-Daten als guter Marker für das Auftreten klinischer Resistenz.

22,6% Therapieversagen konnte in der Gruppe mit kombinierter Medikation registriert werden. Codon 437 des dhps-Gens zeigte eine signifikante Korrelation mit *in vivo*-Resistenz. Die Kombination der Mutationen an Codon 86 des pfmdr-Gens und an Codon 437 des dhps-Gens wies eine hohe Spezifität für Resistenz von 95,65% auf.

Die Ergebnisse zeigen, daß in Laos Resistenzen gegen CQ und P/S vorkommen und die mit Resistenz assoziierten Mutationen auf Genen von *Plasmodium falciparum* vorhanden sind.

Aufgrund anderer den Therapieverlauf beeinflussender Faktoren – im besonderen Maße der ganz individuellen Wirtsimmunität – besitzen die Resistenzmarker nicht das Potential zur Vorhersage im individuellen Fall. Sensitivität und Spezifität der Resistenzmarker sind aber geeignet, Aussagen zur parasitären Resistenz in einer bestimmten Region zu treffen. Die neuen molekularen Marker sind in der Lage, in epidemiologischen Studien Resistenzentwicklungen und ebenso einen Rückgang der Resistenz zu erkennen, um rechtzeitig andere Mittel einsetzen oder eine Wiedereinführung erwägen zu können. Insbesondere können sie helfen, eine zukünftige Resistenzentwicklung frühzeitig vorherzusagen, bevor Daten bezüglich in vivo-Resistenzen gewonnen werden konnten.

7. Danksagung

Mein Dank gebührt in erster Linie meinem Betreuer PD Dr. med. Tomas Jelinek, der dieses Projekt für mich ausgewählt und mich in allen Unternehmungen unterstützt und bestärkt hat.
Ebenso natürlich meinem Doktorvater, dem Schirmherrn des Projekts, Professor Dr. Thomas Löscher.
Große Hilfe erwiesen mir die Labormitarbeiter, insbesondere Frau Peyerl-Hoffmann, die mich geduldig in die verschiedenen Techniken eingewiesen und mich mit allem vertraut gemacht haben.
Diese Studie ist Teil eines größeren Projektes, an dem viele Leute beteiligt waren, denen ich zu Dank verpflichtet bin. Im einzelnen sind das Dr. Bounlay Phommasak (Deputy Director, Department of Hygiene and Prevention, Ministry of Health, Laos), das Center of Malariology, Parasitology and Entomology in Vientiane, der Attapeu Provincial Health Service und die Attapeu Provincial Malaria Station mit allen Mitarbeitern. Außerdem möchte ich allen teilnehmenden Dorfbewohner von Attapeu für ihre Kooperation, Unterstützung und Assistenz in der Feldarbeit danken.

Sehr dankbar bin ich auch dem WHO Office in Vientiane, das etliche Stadien des Projektes ermöglicht und die Arbeit erleichtert hat.

Finanzielle Unterstützung wurde von der Friedrich Baur Stiftung in München und dem Western Pacific Reginalbüro der WHO geliefert. Dafür möchte ich mich auch recht herzlich bedanken.

8. Abkürzungen

A	Adenosin
ATP	Adenosintriphosphat
CQR	Chloroquinresistenz
C	Cytosin
Cys	Dystein
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DHPS	Dihydropteroatsynthetase
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat: dATP, dCTP, dGTP, dTTP
et al.	Lat.: und andere (et alii), Bez. für Koautoren
G	Guanin
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
P/S-R	Pyrimethamin/Sulphadoxin-Resistenz
RFLP	restriction fragment length polymorphism
Ser	Serin
Taq	Thermus aquaticus
T	Thymin
Tyr	Tyrosin
U	unit (Einheit der Enzymaktivität) oder Umdrehung bei Zentrifugation
WHO	World Health Organisation

9. Literaturverzeichnis

Adagu I, Warhurst D, Carucci D, Duraisingh M (1995) Antimalarial drug response of *Plasmodium falciparum* from Zaria, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 90

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

Adagu IS, Warhurst DC (2001) Plasmodium falciparum: linkage disequilibrium between loci in chromosomes 7 and 5 and chloroquine selective pressure in Northern Nigeria. *Parasitology* 123(3): 219-24

Adagu IS, Dias F, Pinheiro L, Do Rosario V, Warhurst DC (1996) Guinea Bissau: association of chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* with Tyr86 allele of the multiple drug-resistance gene Pfmdr1. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 90-1

Adagu IS, Ogala WN, Carruci DJ, Duraisingh MT, Warhurst DC (1997) Field chloroquine-resistance determinants. *Ann Trop Med Parasitol* 91: S107-S111

Adjuik M, Agnamey P, Babiker A, Borrmann S, Brasseur P, Cisse M, Cobelens F, Diallo S, Faucher JF, Garner P, Gikunda S, Kremser PG, Krishna S, Cell B, Loolpapit M, Matsiegui PB, Missinou MA, Mwanza J, Ntoumi F, Olliaro P, Osimbo P, Rezbach P, Sane E, Taylor WR (2002) Amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in African children: a randomized, multicentre trial. *Lancet* 359(9315): 1365-72

Aikawa M, Ward RA (1974) Intraspecific variation in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 23: 570-3

Akompong T, Kadekoppola M, Harrison T, Oksman A, Goldberg DE, Fujioka H, Samuel BU, Sullivan D, Haldar K (2002) *Trans* Expression of a *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein II (HRPII) reveals sorting of soluble proteins in the periphery of the host erythrocyte and disrupts transport to the malarial food vacuole. *J Biol Chem* 277 (32): 28923-28933

Alifrangis M, Lemnge MM, Ronn AM, Segeja MD, Magesa SM, Khalil IF, Bygbjerg IC (2003) Increasing prevalence of wildtypes in the dihydrofolate reductase gene of *Plasmodium falciparum* in an area with high levels of sulfadoxine/pyrimethamine resistance after introduction of treated bed nets. *Am J Trop Med Hyg* 69(3): 238-43

Allison AC (1954) Protection afforded by sickle cell trait against subtertian malarial infection. *BMJ* 1: 290-4

Alonso PL, Smith T, Schellenberg JR, Masanja H, Mwankusye S, Urassa H, Bastos de Azevedo I, Chongela J, Kobero S, Menendez C, et al. (1994) Randomised trial of efficacy of SP66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Lancet* 344(8931): 1175-81

Al-Tawil N (1977) Response of falciparum malaria to a standard regimen of chloroquine in Vientiane, Lao People's Democratic Republic *J Trop Med Hyg* 80 : 230-7

Al-Tawil N (1978) Clearance of *falciparum* parasitaemia with a single dose sulfadoxine-pyrimethamine in Vientiane, Laos. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 9(3): 409-13

Anonym (2004) Roll Back Malaria: a failing global campaign. *BMJ* 328: 1086-87

Anothay O, Pongvongsa T, Maharat N, Sirivichayakul C, Chantavanich P, Silachamroon U, Looareesuwan S. (2000) Clinical presentation of childhood malaria in Savannakhet Province, Lao PDR. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 31 (Suppl 1), 85-90

Atamna H, Ginsburg H (1995) Heme degradation in the presence of glutathione. A proposed mechanism to account for the high levels of non-heme iron found in the membranes of hemoglobinopathic red blood cells. *J Biol Chem* 270(42): 24876-83

Aubouy A, Jafari S, Huart V, Migot-Nabias F, Mayombo J, Durand R, Bakary M, Le Bras J, Deloron P (2003) DHFR and DHPS genotypes of *Plasmodium falciparum* isolates from Gabon correlate with in vitro activity of pyrimethamine and cycloguanil, but not with sulfadoxine-pyrimethamine treatment efficacy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52: 43-49

Awad-el-Kariem FM, Miles MA, Warhurst DC (1992) Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from the Sudan lack two mutations in the pfmdr 1 gene thougt to be associated with chloroquine resistance. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86(6): 587-9

Babiker HA, Pringle SJ, Abdel-Mushin A, Mackinnon M, Hunt P, Walliker D (2001) 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. *J Infect Dis* 183 (10): 1535-8

Barnes DA, Foote SJ, Galatis D, Kemp DJ, Cowman AF (1992) Selection for high-level chloroquine resistance results in deamplification of the Pfmdr1 gene and increased sensitivity to mefloquine in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J* 11(8): 3067-75

Basco LK, de Pecoulas PE, Le Bras J, Wilson CM (1996) Plasmodium falciparum: molecular characterization of multidrug-resistant Cambodian isolates. *Exp Parasitol* 82(2): 97-103

Basco LK, Ringwald P (1998) Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon I. Analysis of point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 58(3): 369-73

Basco LK, Tahar R, Keundjian A, Ringwald P (2000) Sequence variations in the genes encoding dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase and clinical response to sulfadoxine-pyrimethamine in patients with acute uncomplicated *falciparum* malaria. *J Infect Dis* 182(2): 624-8

Basco LK, Ringwald P (2000a) Molecular epidemiolgy of malaria in Yaounde, Cameroon. VI. Sequence variations in the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and in vitro resistence to pyrimethamine and cycloguanil. *Am J Trop Med Hyg* 62(2): 271-6

Basco LK, Ringwald P (2000b) Molecular epidemiology of malaria in Younde, Cameroon.VII. Analysis of recrudescence and reinfection in patients with uncomplicated *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 63(5-6): 215-21

Basco LK, Ringwald P (2001) Analysis of the key pfcrt point mutation and in vitro and in vivo response to chloroquine in Yaounde, Cameroon. *J Infect Dis* 183(12): 1828-31

Begum K, Kim HS, Okuda Y, Wataya Y, Kimura M, Huruta T (2002) *Nucleic Acids Res Suppl* (2): 223-4

Bendrat K, Berger BJ, Cerami A (1995) Haem polymerization in malaria. *Nature* 378(6553): 138-9

Berens N, Schwoebel B, Jordan S, Vanisaveth V, Phetsouvanh R, Christophel EM, Phompida S, Jelinek T (2003) *Plasmodium falciparum*: correlation of in vivo resistance to chloroquine and antifolates with genetic polymorphisms in isolates from the south of Lao PDR *Trop Med Int Health* 8(9): 775-82

Bhattacharya PR, Biswas S, Kabilan L (1997) Alleles of the *Plasmodium falciparum* Pfmdr1 gene appear not to be associated with chloroquine resistance in India. *Trans R Soc Trp Med Hyg* 91: 454-5

Bhattacharya PR, Pillai CR (1999) Strong association, but incomplete correlation, between chloroquine resistance and allelic variations in the pfmdr-1 gene of *Plasmodium falciparum* isolates from India. *Ann Trop Med Parasitol* 93(7): 679-84

Binder RK, Borrmann S, Adegnika AA, Missinou MA, Kremsner PG, Kun JFJ (2002) Polymorphisms in the parasite genes for pfcrt and pfmdr-1 as molecular markers for chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* in Lambaréné, Gabon. *Parasitol Res* 88: 475-6

Biswas S, Escalante A, Chaiyaroj S, Angkasekwinai P, Lal AA (2000) Prevalence of point mutations in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from India and Thailand: a molecular epidemiologic study. *Trop Med Int Health* 5 (10): 737-43

Bjorkman A, Phillips-Howard PA (1991) Adverse reactions to sulfa drugs: implications for malaria chemotherapy. *Bull World Health Organ* 69(3): 297-304

Blakeley RL (1984) In: *Folates and Pteridines* Vol. 1 (eds RL Blakeley & SJ Benkovics) Wiley, New York, pp 191-253.

Bousema JT, Gouagna LC, Meutstege AM, Okech BE, Akim NI, Githure JI, Beier JC, Sauerwein RW (2003) Treatment failure of pyrimethamine-sulphadoxine and induction of *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in children in western Kenya. *Trop Med Int Health* 8(5): 427-30

Bray PG, Howells RE, Ritchie GY, Ward SA (1992) Rapid chloroquine efflux phenotype in both chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant Plasmodium falciparum. A correlation of chloroquine sensitivity with energy-dependent drug acumulation. *Biochem Pharmacol* 44 (7): 1317-24

Bray PG, Boulter MK, Ritchie GY, Howells RE, Ward SA (1994) Relationship of global chloroquine transport and reversal of resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 63(1): 87-94

Bray PG, Hawley SR, Ward SA (1996) 4-Aminoquinoline resistance of *Plasmodium falciparum*: insights from the study of amodiaquine uptake. *Mol Pharmacol* 50(6): 1551-8

Bray PG, Mungthin M, Ridley RG, Ward SA (1998) Access to hematin: the basis of chloroquine resistance *Mol Pharmacol* 54 (1): 170-179

Bray PG, Janneh O, Raynes KJ, Mungthin M, Ginsburg H, Ward SA (1999) Cellular uptake of chloroquine is dependent on binding to ferriprotoporphyrin IX and is independent of NHE activity in *Plasmodium falciparum*. *J Cell Biol* 45 (2): 363-376

Brockman A, Price RN, van Vugt M, Heppner DG, Walsh D, Sookto P, Wimonwattrawatee T, Looareesuwan S, White NJ, Nosten F (2000) *Plasmodium falciparum* antimalarial drug susceptibility on the north-western border of Thailand during five years of extensive use of artesunate-mefloquine. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94(5): 537-44

Brooks DR, Wang P, Read M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE (1994) Sequence variation of the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *Eur J B*iochem 224 (2): 397-405

Bzik DJ, Li WB, Horii T, Inselburg J (1987) Molecular cloning and sequence analysis of the Plasmodium dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(23): 8360-4

Campanale N, Nickel C, Daubenberger CA, Wehlan DA, Gorman JJ, Klonis N, Becker K, Tilley L (2003) Idendification and characterization of heme-interacting proteins in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 278 (30): 27354-27361

Cano-Gauci DF, Riordan JR (1987) Action of calcium antagonists on multidrug resistant cells. Specific cytotoxity independent of increased cancer drug accumulation. *Biochem Pharmacol* 36(13): 2115-23

Chaiyaroj SC, Buranakiti A, Angkasekwinai P, Looressuwan S, Cowman AF (1999) Analysis of mefloquine resistance and amplification of pfmdr1 in multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 61(5): 780-3

Choi HW, Breman JG, Teutsch SM, Liu S, Hightower AW, Sexton JD (1995) The effectiveness of insecticide-impregnated bednets in reducing cases of malaria infection: meta-analysis of published results. *Am J Trop Med Hyg* 52: 377-82

Chou AC, Chevli R, Fitch CD (1980) Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites. *Biochemistry* 19: 1543-1549

Chulay JD, WatkinsWM, Sixsmith DG (1984) Synergistic antimalarial activity of pyrimethamine and sulfadoxine against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Am J Trop Med Hyg* 33(3): 325-30

Cowman AF, Morry MJ, Biggs BA, Cross GA, Foote SJ (1988) Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(23): 9109-13

Cowman AF, Karcz SR (1991) The pfmdr gene homologues of *Plasmodium falciparum*. *Acta Leiden* 60 (1): 121-9

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

Cowman AF, Galatis AF, Thompson JK (1994) Selection for mefolquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the Pfmdr1 gene and cross-resistance to halofantrine and chinine. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(3): 1143-47

Cox-Singh J, Singh B, Alias A, Abdullah MS (1995) Assessment of the association between three Pfmdr1 point mutations and chloroquine resistance in vitro of Malaysian *Plasmodium falciparum* isolates. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 89(4): 436-37

Cravo P, Culleton R, Walliker D, Mackinnon MJ (2001) Antimalarial drugs clear resistant parasites from partially immune hosts. *Antimicrob Agents Chemother* 45(10): 2897-901

Curtis J, Duraisingh MT, Trigg JK, Mbwana H, Warhurst DC, Curtis CF (1996) Direct evidence that asparagine at position 108 of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase is involved in resistance to antifolate drugs in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90 (6): 678-80

Curtis J, Duraisingh MT, Warhurst DC (1998) In vivo selection for a specific genotype of dihydropteoate synthetase of *Plasmodium falciparum* by pyrimethamine-sulfadoxine but not chlorroguanil-dapsone treatment. *J Infect Dis* 177(5): 1429-33

Day K, Marsh K (1991) Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* 7: A68-A70

De D, Krogstad FM, Byers LD, Krogstad DJ (1998) Structure-activity relationships for antiplasmodial activity among 7-substituted 4-aminoquinolines. *J Med Chem* 41(25): 4918-26

Deharo E, Barkan D, Krugliak M, Golenser J, Ginsburg H (2003) Potentiation of the anti-malarial action of chloroquine in rodent malaria by drugs known to reduce cellular glutathine levels. *Biochem Pharmacol* 66(5): 809-17

Deitsch KW, Wellems TE (1996) Membrane modifications in erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum Mol Biochem Parasitol* 76(1-2): 1-10

Dieckmann A, Jung A (1986) Mechanism of sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 19(2): 143-7

Diourte Y, Djimde A, Doumbo OK, Sagara I, Coulibaly Y, Dicko A,Diallo M, Diakite M, Cortese JF, Plowe CV (1999) Pyrimethamine-sulfadoxine efficacy and selection for mutations *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase in Mali. *Am J Trop Med Hyg* 60 (3): 475-8

Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, Dicko A, Su X, Nomura T, Fidock DA, Wellems TE, Plowe CV (2001) A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *New Engl J Med* 344 (4): 257-63

Djimde AA, Dolo A, Ouattara A, Diakite S, Plowe CV, Doumbo OK. (2004) Molecular diagnosis of resistance to antimalarial drugs during epidemics and war zone. *J Infect Dis* 190(4): 853-5

Dorn A, Stoffel R, Matile H, Bubendorf A, Ridley RG (1995) Malarial haemozoin/beta-haematin supports haem polymerization in the absence of protein. *Nature* 374 (6519): 269-71

Dorn A, Vippagunta SR, Matile H, Bubendorf A, Vennerstrom JL, Ridley RG (1998) An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials. *Biochem Pharmacol* 55(6): 727-36

Doumbo OK, Kayentao K, Djimde A, Cortese JF, Diourte Y, Konare A, Kublin JG, Plowe CV (2000) Rapid selection of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase mutants by pyrimethamine prophylaxis. *J Infect Dis* 182 (3): 993-6

Duerr J, Ahearn G (1996) Characterization of a basolateral electroneutral Na^+/H^+ antiporter in Atlantic lobster (Homarus americanus) hepatopancreatic epithelial vesicles. *J Exp Biol* 199(Pt3): 643-51

Duraisingh M, Drakeley C, Muller O *et al.* (1997) Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the pfmdr1 gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine. *Parasitology* 114, 205-11

Duraisingh MT, Curtis J, Warhurst DC (1998) *Plasmodium falciparum*: detection of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydroperoate synthase genes by PCR and restriction digestion. *Exp Parasitol* 89 (1): 1-8

Eberle KJ, Jelinek T, Aida AO, Peyerl-Hoffmann G, Heuschkel C, el Valy AO, Christophel EM (2001) Prevalence of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and hydropteroate synthetase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from southern Mauritania. *Trop Med Int Health* 6 (10): 756-60

Ebisawa I, Muto T, Kameko S, Mitsui G (1970) Response of Laotian malaria strains to chemotherapy. *J Exp Med* 40 : 151-7

Ebisawa I, Muto T, Mitsui G, Kameko S (1971) Malaria at Nam Ngum Dam constriction site in Laos. *Japan J Exp Med* 41(3): 209-19

Ebisawa I, Muto T, Tanabe S (1979) Chemotherapy of falciparum malaria: regional differences in responsiveness to treatment. *Japan J Exp Med* 49(5): 405-12

Egan TJ, Ross DC, Adams PA (1994) Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of beta-haematin (malaria pigment). *FEBS Lett* 352(1): 54-7

Endicott J, Ling V (1989) The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Ann Rew Biochem* 58: 137-71

Farcas GA, Zhong KJ, Mazzulli T, Kain KC (2004) Evaluation of the RealArt malaria LC real-time PCR assay for malaria dignosis. *J Clin Microbiol* 42: 636-8

Fairley NH (1947) Sidelights on malaria in man obtained by subinoculation experiments. *Trans Soc Trop Med Hyg* 40 : 621-76

Famin O, Ginsburg H (2003) The treatment of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes wih chloroquine leads to accumulation of ferriprotoporphyrin IX bound to particular parasite proteins and to the inhibition of the parasite's 6-phosphogluconate dehydrogenase *Parasite* 10: 39-50

Ferone R (1977) Folate metabolism in malaria. *Bull World Health Organ* 55(2-3): 291-8

Ferrari V, Cutler DJ (1990) Uptake of chloroquine by human erythrocytes. *Biochem Pharmacol* 39(4): 753-62

Ferrari V, Cutler DJ (1991a) Kinetics and thermodynamics of chloroquine and hydroxychloroquine transport across the human erythrocyte membrane. *Biochem Pharmacol* 41(1): 23-30

Ferrari V, Cutler DJ (1991b) Simulation of kinetic data on the influx and efflux of chloroquine by erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. Evidence for a drug-importer in chloroquine-sensitive strains. *Biochem Pharmacol* 42Suppl: S167-79

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 (2000) Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 6(4): 861-71

Fitch CD (1969) Chloroquine resistance in malaria: a deficiency of chloroquine binding *Proc Nat Acad Sci USA* 64 (4): 1181-1187

Fitch CD, Chan RL, Chevli R (1979) Chloroquine resistance in malaria: accessibility of drug receptors to mefloquine. *Antimicrob Agents Chemother* 15(2): 258-62

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

Fitch CD (1989) Ferriprotoporphyrin IX: role in chloroquine susceptibility and resistance in malaria. *Prog Clin Biol Res* 313: 45-52

Fitch CD (2004) Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sci* 74(16): 1957-72

Flatz G, Sanguansermsri T, Sengchanh S, Horst D, Horst J (2004) The 'hot spot' of HB E [beta26(B8)Glu→Lys] in Southeast Asia: beta-globin anomalies in the Lao Theung population of southern Laos. *Hemoglobin* 28(3): 197-204

Fletcher C (1998) The *Plasmodium falciparum* genome project. *Parasitol Today* 14: 342-4

Flueck TPF, Jelinek T, Kilian AHD, Adagu IS, Kabagambe G, von Sonnenburg F, Warhurst DC (2000) Correlation of in vivo-resistance to chloroquine and allelic polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Uganda. *Trop Med Int Health* 5 (3): 174-78

Fontanet AL, Johnston BD, Walker AM, Bergqvist Y, Hellgren U, Rooney W (1994) Falciparum malaria in eastern Thailand: a randomized trial of the efficacy of a single dose of mefloquine. *Bull World Health Organ* 72(1): 73-81

Foote SJ, Thompson JK, Cowman AF, Kemp DJ (1989) Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. *Cell* 57(6): 921-30

Foote SJ, Galatis D, Cowman AF (1990) Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(8): 3014-17

Foote SJ, Kyle DE, Martin RK, Oduola AM, Forsyth K, Kemp DJ, Cowman AF (1990) Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 345 (6272): 255-8

Foote SJ, Cowman AF (1994) The mode of action and the mechanism of resistance to antimalarial drugs. *Acta Trop* 56(2-3): 157-71

Francis SE, Sullivan DJ, Goldberg DE (1997) Hemoglobin matabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu Rev Microbiol* 51: 97-123

Gasasira AF, Dorsay G, Nzarubara B, Staedke SG, Nassali A, Rosenthal P, Kamya MR (2003) Comparative efficacy of aminoquinoline-antifolate combinations for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Kampala, Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 68(2): 127-132

Geerligs PDP, Brabin BJ, Eggelte TA (2003) Analysis of the effects of malaria chemoprophylaxis in children on heamatological responses, morbidity and mortality. *Bull World Health Organ* 81:205-16

Giboda M, Pholsena K, Hongvanthong B, Gutvirth J, Rubik I (1992) Malariometric survey in Keoudom District, Laos: sensitivity of *Plasmodium falciparum* to anti-malarials and automedication with chloroquine. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 23(3): 383-8

Ginsburg H, Famin O, Zhang J, Krugliak M (1998) Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochem Pharmacol* 56(10): 1305-13

Ginsburg H, Geary TG (1987) Current concepts and new ideas on the mechanism of action of quinoline-containing antimalarials. *Biochem Pharmacol* 36(10): 1567-76

Ginsburg H, Stein WS (1991) Kinetic modelling of chloroquine uptake by malaria-infected erythrocytes. Assessment of the factors that may determine drug resistance. *Biochem Pharmacol* 41: 1463-70

Gluzman IY, Francis SE, Oksman A, Smith CE, Duffin KL, Goldberg DE (1994) Order and specifity of the *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation pathway. *J Clin Invest* 93(4): 1602-8

Goldberg DE (1993) Hemoglobin degradation in Plasmodium-infected red blood cells. *Semin Cell Biol* 4: 355-361

Gomes M, Wayling, Pang L (1998) Interventions to improve the use of antimalarials in South East Asia: an overview. *Bull World Health Organ* 76 (Suppl 1): 9-19

Gratzer WB, Dluzewski AR (1993) The red blood cell and malaria parasite invasion . *Semin Hematol* 30(3): 232-247

Grobusch MP, Adagu IS, Kremsner PG, Warhurst DC (1998) *Plasmodium falciparum*: in vitro chloroquine susceptibility and allele-specific PCR detection of Pfmdr1 Asn86Tyr polymorphisms in Lambaréné, Gabon. *Parasitology* 116(Pt3): 211-7

Guthmann JP, Kasparian S, Phetsouvanh R, Nathan N, Garcia M, Phompida S, Brockman A, Gastellu M, Legros D (2002) The efficacy of chloroquine for the treatment of acute, uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Laos. *Ann Trop Med Parasitol* 96 (6): 553-7

Happi TC, Thomas SM, Gbotosho GO, Falade CO, Akinboye DO, Gerena L, Hudson T, Sowunmi A, Kyle DE, Milhous W, Wirth DF, Oduola Am (2003) Point mutations in the Pfcrt and pfmdr-1 genes of *Plasmodium falciparum* and clinical response to chloroquine, among malaria patients from Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol* 97(5): 439-51

Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Abdisalan MN, Snow RW (2004) The global distribution and population at risk of malaria: past, present and future. *Lancet Infect Dis* 4: 327-36

Hawley SR, Bray PG, O'Neill PM, Park BK, Ward SA (1996) The role of drug accumulation in 4-aminoquinoline antimalarial potency. The influence of structural substitution and physicochemical properties. *Biochem Pharmacol* 52 (5): 723-33

Hien TT, VinhChau NV, Vinh NT, Hunh NT, Phung MY, Toan LM, Mai PP, Dung NT, HoaiTam DT, Arnold K (1997) Management of multiple drug-resistant malaria in Vietnam. *Ann Acad Med* 26: 659-63

Higuchi RG, Ochman H (1989) Production of single-stranded DNA templates by exonuclease digestion following the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 17(14): 5865

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

Hoppe HC, van Schalkwyk DA, Wiehart UIM, Meredith SA, Egan J, Weber BW (2004) Antimalarial Quinolines and Artemisinin inhibit endocytosis in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(7): 2370-78

Hoshen MB, Na-Bangchang K, Stein WD, Ginsburg H (2000) Mathematical modelling of the chemotherapy of *Plasmodium falciparum* malaria with artesunate: postulation of 'dormancy' a partial cytostatic effect of its drug, and its implication for treatment regimens. *Parasitology* 121: 237-46

Huaman MC, Roncal N, Nakazawa S, Long TT, Gerena L, Garcia C, Solari L, Magill AJ, Kanbara H (2004) Polymorphism of the *Plasmodium falciparum* multidrug resistance and chloroquine resistance transporter genes and in vitro susceptibility to aminoquinolines in isolates from the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 70(5): 461-6

Hyde JE (1990) The dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase gene in the drug resistance of malaria parasites. *Pharmacol Ther* 48(1): 45-59

Jacobs GH, Oduola AM, Kyle DE, Milhous WK, Martin SK, Aikawa M (1988) Ultrastructural study of the effects of chloroquine and verapamil on *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 39(1): 15-20

Jelinek T, Ronn AM, Lemnge MM, Curtis J, Mhina J, Duraisingh MT, Bygbjerg IC, Warhurst DC (1998) Polymorphisms in the dihydrofolate reductase (DHFR) and dihydropteroate synthase (DHPS) genes of *Plasmodium falciparum* and in vivo resistance to sulphadoxine/pyrimethamine in isolates from Tanzania. *Trop Med Int Health* 3 (8): 605-9

Jelinek T, Kilian AH, Curtis J, Duraisingh MT, Kabagambe G, von Sonnenburg F, Warhurst DC (1999a) *Plasmodium falciparum*: selection of serine 108 of dihydrofolate reductase during treatment of uncomplicated malaria with co-trimoxazole in Ugandan children. *Am J Trop Med Hyg* 61 (1): 125-30

Jelinek T, Kilian AHD, Kabagambe G, von Sonnenburg F (1999b) *Plasmodium falciparum* resistance to sulfadoxine/pyrimethamine in Uganda: correlation with polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes. *Am J Trop Med Hyg* 61 (3): 463-66

Jelinek T, Grobusch MP, Löscher T (2001) Patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance in nonimmune travellers to Africa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20: 284-86

Jelinek T, Aida AO, Peyerl-Hoffmann G, Jordan S, Mayor A, Heuschkel C, El Valy AO, Von Sonnenburg F, Christophel EM (2002) Diagnostic value of molecular markers in chloroquine-resistant *falciparum* malaria in southern mauretania. Am *J Trop Med Hyg* 67(5): 449-453

Johnson DJ, Fidock DA, Mungthin M, Lakshmanan V, Sidhu AB, Bray PG, Ward SA (2004) Evidence for a central role for PFCRT in conferring *Plasmodium falciparum* resistance to diverse antimalarial agents. *Mol Cell* 15(6): 867-77

Kain KC, Lanar DE (1991) Determination of gentic variation within *Plasmodium falciparum* by using enzymatically amplified DNA from filter paper disks impregnated with whole blood. *J Clin Micorbiol* 29 (6): 1171-4

Kean BH (1979) Chloroquine-resistant *falciparum* from Africa. *J Am Medical Association* 241: 395

Khalil I, Roenn AM, Alifrangis M, Gabar HA, Satti GMH, Bygbjerg IC (2003) Dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genotypes associated with in vitro resistance of *Plasmodium falciparum* to pyrimethamine, trimethoprim, sulfadoxine and sulfamethoxazole. *Am J Trop Med Hyg* 68(5): 586-89

Kobayashi J, Phompida S, Toma T, Looareensuwan S, Toma H, Miyagi I (2004) The effectiveness of impregnated bed net in malaria control in Laos. *Acta Trop* 89(3): 299-308

Kondrachine AV, Trigg PI (1997) Global overview of malaria. *Indian J Med Res* 106: 39-52

Krogstad DJ, Schlesinger PH, Gluzman IY (1985) Antimalarials increase vesicle pH in *Plasmodium falciparum*. *J Cell Biol* 101(6): 2302-9

Krogstad DJ, Gluzman IY, Kyle DE, Oduola AM, Martin SK, Milhous WK, Schlesinger PH (1987) Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science* 238(4831): 1283-5

Krogstad DJ, Gluzman IY, Herwaldt BL, Schlesinger PH, Wellems TE (1992) Energy dependence of chloroquine accumulation and chloroquine efflux in *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmocol* 43(1): 57-62

Kublin JG, Dzinjalamala FK, Kamwendo DD, Malkin EM, Cortese JF, Martino LM, Mukadam RA, Rogerson SJ, Lescano AG, Molyneux ME, Winstanley PA, Chimpeni P, Taylor TE, Plowe CV (2002) Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapson treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 185 (3): 380-1

Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, Mukadam AG, Wirima JJ, Kazemba PN, Djimde AA, Kouriba B, Taylor TE, Plowe CV (2003) Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* Malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis* 187 : 1870-5

Kyabayinze D, Cattamanchi A, Kamya MR, Rosenthal PJ, Dorsey G (2003) Validation of a simplified method for using molecular markers to predict sulfadoxine-pyrimethamine

treatment failure in African children with *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 69(3): 247-52

Labbe AC, Bualombai P, Pillai DR, Zhong KJ, Vanisaveth V, Hongvanthong B, Looareesuwan S, Kain KC (2001) Molecular markers for chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand and Laos. *Ann Trop Med Parasitol* 95(8): 781-8

Langreth SG, Nyugen-Dinh P, Trager W (1978) *Plasmodium falciparum*: merozoite invasion in vitro in the presence of chloroquine. *Exp Parasitol* 46: 235-38

Lang W, Löscher T, Tropenmedizin in Klinik und Praxis, 3. Auflage (2000) Georg Thieme Verlag Stuttgart, 10-33

Le Bras J, Durand R (2003) The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharmacol* 17(2): 147-53

Le Hesran JY, Akiana J, Ndiaye el HM, Dia M, Senghar P, Konate L (2004) Severe malaria attack is associated with high prevalence of Ascaris lumbricoides infection among children in rural Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98(7): 397-9

Lengeler C (2004) Insecticide-treated nets for malaria control: real gains. *Bull World Health Organ* 82(2): 84

Lim P, Chy S, Ariey F, Incardona S, Chim P, Sem R, Denis MB, Hewitt S, Hoyer S, Socheat D, Merecreau-Puijalon O, Fandeur T (2003) pfcrt Polymorphism and Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum* strains isolated in Cambodia. *Antimicrob Agents Chemother* 47(1): 87-94

Long GW, Fries L, Watt GH, Hoffman S (1995) Polymerase chain reaction amplification from *Plasmodium falciparum* on dried blood spots. *Am J Trop Med Hyg* 52: 344-46

Lopes D, Rungsihirunrat K, Nogueira F, Seugom A, Gil JP, do Rosário VE, Cravo P (2002) Molecular Characterisation of drug-resistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Malaria Journal* 14.10.2002: 1-12

Lüllmann H, Mohr K, Pharmakologie und Toxikologie, 14. Auflage (1999) Georg Thieme Verlag Stuttgart

Macomber PB, Sprinz H (1967) Morphological effects of chloroquine on *Plasmodium berghei* in mice. *Nature* 214: 937-39

Malaguarnera L, Musumeci S (2002) The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Inf Dis* 2(8): review

Marchant T, Schellenberg JA, Edgar T, Nathan R, Abdullah S, Mukasa O, et al. (2002) Socially marketed insecticide-treated nets improve malaria and anaemia in pregnancy in southern Tanzania. *Trop Med Int Health* 7: 149-58

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

Martiney JA, Cerami A, Slater AF (1995) Verapamil reversal of chloroquine resistance in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* is specific for resistant parasites and independent of the weak base effect. *J Biol Chem* 270: 22393-98

Masimirembwa CM, Phuongdung N, Phuc BQ (1999) Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* antifolate resistance in Vietnam: genotyping for resistance variants of dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase. *Int J Antimicrob Agents* 12: 203-11

Maxwell CA, Msuya E, Sudi M, Njunwa KJ, Carneiro IA, Curtis CF (2002) Effect of community-wide use of insecticide-treated nets for 3-4 years on malarial morbidity in Tanzania. *Trop Med Int Health* 7(12): 1003-8

Mayxay M, Phetsouvanh R, Phompida S, Newton PN, Khanthavong M, Vannachone B, Brockman A, White NJ (2003a) A randomized comparison of oral chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Laos. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97(3): 343-4

Mayxay M, Newton PN, Khanthavong M, Tiengkham P, Phetsouvanh R, Phompida S, Brockman A, White NJ (2003b) Chloroquine versus sulfadoxine-pyrimethamine for treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in Savannakhet Province, Lao People's Democratic Republic: an assessment of national antimalarial drug recommendations. *Clin Infect Dis* 37(8): 1021-8

Mayxay M, Khanthavong M, lindegardh N, Keola S, Barends M, Pongvongsa T, Yapom R, Annerberg A, Phompida S, Phetsouvanh R, White NJ, Newton PN (2004) Randomized comparison of chloroquine plus sulfadoxine-pyrimethamine versus artesunate plus mefloquine versus artemether-lumefantrine in the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in the Lao People's Democratic Republic. *Clin Infect Dis* 39(8): 1139-47

McCutcheon KR, Freese JA, Frean JA, Sharp BL, Markus MB (1999) Two mutations in the multidrug-resistance gene homologue of *Plasmodium falciparum*, pfmdr1, are not useful predictors of in vivo odr in vitro chloroquine resistance in southern Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91 : 454-44

Menting JG, Tilley L, Deady LW, Ng K, Simpson RJ, Cowman AF, Foley M (1997) The antimalarial drug, chloroquine, interacts with lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 88(1-2): 215-24

Milhous WK, Weatherly NF, Bowdre JH, Desjardins RE (1985) In vitro activities of and mechanisms of resistance to antofol antimalarial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 27(4): 525-30

Mita T, Kaneko A, Lum JK, Bwijo B, Takechi M, Zungu IL, Tsukahara T, Tanabe K, Kobayakawa T, Bjorkman A (2003) Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene mutation K76T following the discontinuance of chloroquine use in Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 68(4) : 413-5

Mühlberger N, Jelinek T, Behrens RH, Gjoerup I, Couland P, Clerinx J, Puente S, Burchard G, Gascon J, Grobusch MP etc. (2003) Age as a risk factor for severe manifestations and fatal outcome of *falciparum* malaria in european patients: Observations from TropNet Europ and SIMPID surveillance data. *Clinical Inf Dis* 36: 990-5

Mutambu S, Shiff C (1997) Implementing and sustaining community-based mosquito net interventions in Africa. *Parasitol Today* 13: 204-6

Myrick A, Munasinghe A, Patankar S, Wirth DF (2003) Mapping of *the Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 5'-upstream region, and evidence of induction of transcript levels by antimalarial drugs in chloroquine sensitive parasites. *Mol Microbiol* 49(3): 671-83

Nagesha HS, Din-Syafruddin, Casey GJ, Susanti AI, Fryauff DJ, Reeder JC, Cowman AF (2001) Mutations in the pfmdr, dhfr, dhps genes of *Plasmodium falciparum* are asociated with in vivo-drug resistance in West Papua, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95 (1): 43-9

Nagesha HS, Casey GJ, Rieckmann KH, Fryauff DJ, Laksana BS, Reeder JC, Maguire JD, Baird JK (2003) New haplotypes of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (pfcrt) gene among chloroquine-resistant parasite isolates. *Am J Trop Med Hyg* 68(4): 398-402

Ngo T, Duraisingh M, Reed M, Hipgrave D, Biggs B, Cowman AF (2003) Analysis of PFCRT, PFMDR1, DHFR and DHPS mutations and drug sensistivities in *Plasmodium falciparum* isolates from patients in Vietnam before and after treatment with artemisinin. *Am J Trop Med* 68(3): 350-356

Nguyen MH, Davis TM, Cox-Singh J, Hewitt S, Tran QT, Tran BK, Nguyen TH, Vo NP, Doan HN, Le DC (2003) Treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in southern Vietnam: can chloroquine or sulfadoxine-pyrimethamine be reintroduced in combination with artesunate? *Clin Infect Dis* 37(11): 1461-6. Epub 2003 Nov 03

Nguyen TA, (1993) [Malaria in Vietnam. Environment, prevention and treatment] *Bull Soc Pathol Exot* 86(5 Pt 2): 494-9 [in französisch]

Noedl H, Wernsdorfer WH, Kollaritsch H, Looareesuwan S, Miller RS, Wongsrichanalai C (2003) Malaria drug-susceptibility testing. HRP2-based assays: current data, future perspectives. *Wien Klin Wochenschr* 115 Suppl 3: 23-7

Nzila-Mounda A, Mberu EK, Sibley CH, Plowe CV, Winstanley PA, Watkins WM (1998) Kenyan *Plasmodium falciparum* field isolates: correlation between pyrimethamine and chlorcycloguanil activity in vitro and point mutations in the dihydrofolate reductase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 164-69

Omar SA, Adagu IS, Warhurst DC (2001a) Can pretreatment screening for dhps and dhfr point mutations in *Plasmodium falciparum* infections be used to predict sulfadoxine-pyrimethamine treatment failure ? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95(3): 315-9

Omar SA, Adagu IS, Gump DW, Ndaru NP, Warhurst DC (2001b) *Plasmodium falciparum* in Kenya: high prevalenc of drug-resistance-associated polymorphisms in hospital admission with severe malaria in an epidemic area. *Ann Trop Med Parasitol* 95 (7): 661-9

Orjih AU, Banyal HS, Chevli R, Fitch CD (1981) Hemin lyses malaria parasites. *Science* 214(4521) : 667-9

Orjih AU, Ryerse JS, Fitch CD (1994) Hemoglobin catabolism and the killing of intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* by chloroquine *Experimentia* 50 (1): 34-9

Owusu-Agyei S, Koram KA, Baird JK, Utz GC, Binka FN, Nkrumah FK, et al. (2001) Incidence of symptomatic and asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection following curative therapy in adult residents of northern Ghana. *Am J Trop Med Hyg* 65: 197-203

Papalexis V, Siomos MA, Campanale N, Guo X, Kocak G, Foley M, Tilley L (2001) *Mol Biochem Parasitol* 115: 77-86

Peel SA, Bright P, Yount B, Handy J, Baric RS (1994) A strong association between mefloquine and halofantrine resistance and amplification, overexpression, and mutation in the P-glykoprotein gene homolog (pfmdr) of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Am J Trop Med Hyg* 51(5): 648-58

Peterson DS, Walliker D, Wellems TE (1988) Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (23): 9114-8

Peterson MG, Marshall VM, Smythe JA, Crewther PE, Lew A, Silva A, Anders RF, Kemp DJ (1989) Integral membrane protein located in the apical complex of Plasmodium falciparum. *Mol Cell Biol* 9(7): 3151-4

Peterson DS, Milhous WK, Wellems TE (1990) Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (8): 3018-22

Philavong K, Phangmanixay S, Phommavong C, Kenesy B, Nhayhiangon K, Fungladda W, Saowakontha S, Merkle A, Schelp FP (2000) Malaria control through impregnated bednets – a pilot project in selected villages in Lao PDR. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 31(2): 22-31

Pholsena & Phomsoupha (1989) WHO report 1989 (unpub. IMPE) aus Malaria in Lao PDR – a Review by Dr. Laura Watson (September 1999)

Pholsena (1992) The malarial situation and the antimalarial program in Laos. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 23 (4): 39-44

Pickard AL, Wongsrichanalai C, Purfield A, Kamwendo D, Emery K, Zalewski C, Kawamoto F, Miller RS, Meshnick SR (2003) Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in pfmdr1. *Antimicrob Agents Chemother* 47(8): 2418-23

Picot S, Burnod J, Bracchi V, Chumpitazi BF, Ambroise-Thomas P (1997) Apoptosis related to chloroquine sensitivity of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91(5): 590-1

Pillai DR, Labbe AC, Vanisaveth V, Hongvangthong B, Pomphida S, Inkathone S, Zhong K, Kain KC (2001) *Plasmodium falciparum* malaria in Laos: chloroquine treatment outcome and predictive value of molecular markers. *J Infect Dis* 183 (5): 789-95

Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellems TE (1995) Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 52(6): 565-8

Plowe CV, Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA, Estrada-Franco JG, Mollinedo RE, Avila JC, Cespedes JL, Carter D, Doumbe OK (1997) Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate

synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *J Infect Dis* 176 (6): 1590-6

Plowe CV, Kublin JG, Doumbo OK (1998) *P. falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase mutations: epidemiology and the role in clinical resistance to antifolates. *Drug Resist Updat* 1: 389-96

Povoa MM, Adagu IS, Oliveira SG, Machado RL, Miles MA, Warhurst DC (1998) Pfmdr1 Asn1042Asp and Asp1246Tyr polymorphisms, thought to be associated with chloroquine resistance, are present in chloroquine-resistant and –sensitive Brazilian field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Exp Parasitol* 88 (1): 64-8

Pramatha R. Bhattacharya, Biswas S, Kabilan L (1997) Alleles of the *Plasmodium falciparum* Pfmdr1 gene appear not to be associated with chloroquine resistance in India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91: 454-5

Price RN, Cassar C, Brockman A, Duraisingh M, van Vugt M, White NJ, Nosten F, Krishna S (1999) The pfmdr1 gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand. *Antimicrob Agents Chemother* 43(12): 2943-9

Pubmed, GenBank, *Plasmodium falciparum*: pfmdr1, pfcrt

Rahman M, Rahman R, Bangali M, Das S, Talukder MR, Ringwald P (2004) Efficacy of combined chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Bangladesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98(7): 438-41

Raynes KJ, Bray PG, Ward SA (1999) Altered binding of chloroquine to ferriprotoporphyrin IX is the basis for chloroquine resistance. *Drug Resist Updat* 2(2): 97-103

Reacher M, Campbell CC, Freeman J, Doberstyn E, Brandling-Bennett A (1981) Drug therapy for *Plasmodium falciparum* malaria resistant to pyrimethamine-sulphadoxine (Fansidar). A study of alternate regimens in Eastern Thailand, 1980. *Lancet* 2: 1066-9

Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF (2000) Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 403(6772): 906-9

Reeder JC, Rieckmann KH, Genton B, Lorry K, Wines B, Cowman AF (1996) Point mutations in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes and in vitro susceptibility to pyrimethamine and cycloguanil of *Plasmodium falciparum* isolates from Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg* 55(2): 209-13

Ridley RG (1998) Malaria: dissecting chloroquine resistance. *Cur Biol* 8(10): R346-49

Riordan JR, Deuchars K, Karner N, Alon N, Trent J, Ling V (1985) Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* 316(6031): 817-9

Robert V, Awono-Ambene HP, Le Hesran JY, Trape JF (2000) Gametocytaemia and infectivity to mosquitoes of patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria attacks treated with chloroquine or sulfadoxine plus pyrimethamine. *Am J Trop Med Hyg* 62(3): 210-6

Roberts DR, Laughlin LL, Hsheih P, Legters LJ (1997) DDT, global strategies and a malaria control crisis in South America. *Emerg Infect Dis* 3: 295-302

Roshanravan B, Kari E, Gilman RH, Cabrera L, Lee E, Metcalfe J, et al. (2003) Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. *Am J Trop Med Hyg* 69: 45-52

Ruetz S, Delling U, Brault M, Schurr E, Gros P (1996) The pfmdr1 gene of *Plasmodium falciparum* confers cellular resistance to antimalarial drugs in yeast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9942-47

Ruwende C, Khoo SC, Snow RW, Yates SN, Kwiatkowski D, Gupta S, Warn P, Allsopp CE, Gilbert SC, Peschu N, et al. (1995) Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* 376(6537): 246-9

Saiki RK, Gelfan DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNS with thermostable DNS polymerase. *Science* 239(4839): 487-91

Saliba KJ, Kirk K (1999) pH regulation in the intracellular malaria parasite, *Plasmodium falciparum. J Biol Chemistry* 274(47): 33213-19

Sanchez CP, Wünsch S, Lanzer M (1997) Identification of a chloroquine importer in *Plasmodium falciparum*. *JBC* 272(5): 2652-58

Sanchez CP, Stein W, Lanzer M (2003) Trans stimulation provides evidence for a drug efflux carrier as the mechanism of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry* 42 (31): 9383-94

Schmider N, Peyerl-Hoffmann G, Restrepo M, Jelinek T (2003) Short communication: point mutations in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from Colombia. *Trop Med Int Health* 8(2): 129-32

Schneider AG, Premji Z, Felger I, Smith T, Abdulla S, Beck HP, Mshinda H (2002) A point mutation in codon 76 of pfcrt of *P. falciparum* is positively selected for by Cloroquine treatment in Tanzania. *Infect Genet Evol* 1(3): 183-9

Schwoebel B, Jordan S, Viengxay V, Phetsouvanh R, Phompida S, Jelinek T (2003) Therapeutic efficacy of the combination chloroquine plus sulfadoxine/pyrimethamine

compared to monotherapy with either chloroquine or sulfadoxine/pyrimethamine in *falciparum* malaria in Laos *Trop Med Int Health* 8(1): 19-24

Sharma VP (1996) Re-emergence of malaria in India. Indian *J Med Res* 103: 26-45

Sherman IW (1979) Biochemistry of *Plasmodium falciparum* (malarial parasites). *Microbiol Rev* 43: 453-95

Sibley CH, Hyde JE, Sims PF, Plowe CV, Kublin JG, Mberu EK, Cowman AF, Winstanley PA, Watkins WM, Nzila AM (2001) Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next ? *Trends Parasitol* 17 (12): 582-8

Sinden RE (1982) Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro: ultrastructural observations on the lethal action of chloroquine. *Ann Trop Med Parasitol* 76: 15-23

Sinden RE (1983) Sexual development of malaria parasites. *Advances in Parasitology* 22: 153-216

Sirawaraporn W, Sathikul T, Sirawaraporn R, Yuthavong Y, Santi DV (1997a) Antifolate-resistant mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (4): 1124-9

Sirawaraporn W, Yongkiettrakul S, Sirawaraporn R, Yuthavong Y, Santi DV (1997b) *Plasmodium falciparum*: asparagine mutant at residue 108 of dihydrofolate reductase is an optimal antifolate-resistant single mutant. *Exp Parasitol* 87(3): 245-52

Slater AFG, Swiggard WJ, Orton BR, Flitter WD, Goldberg DE, Cerami A, Henderson GB (1991) An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 325-329

Slater AF (1993) Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther* 57(2-3): 203-35

Smalley ME, Sinden RE (1977) *Plasmodium falciparum* gametocytes: their longevity and infectivity. *Parasitology* 74: 1-8

Smith AG (2000) How toxic is DDT? *Lancet* 356: 267-8

Smithuis FM, Monti F, Grundl M, Oo AZ, Kyaw TT, Phe O, White NJ (1997) *Plasmodium falciparum*: sensitivity in vivo to chloroquine, pyremethamine/sulphadoxine and mefloquine in western Myanmar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91 (4): 468-72

Snewin VA, England SM, Sims PF, Hyde JE (1989) Characterisation of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase gene from human malaria parasites highly resistant to pyrimethamine. *Gene* 76(1): 41-52

Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN (1993) Identification of the four human malarial species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol* 58: 283-92

Snounou G, Beck HP (1998) The use of PCR genotyping in the assessment of recrudescence or reinfection after antimalarial drug treatment. *Parasitol Today* 14(11): 462-8

Sowunmi A, Fateye BA, Happi TC, Gbotosho GO, Oduola AM (2003) *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in Nigerian children: peripheral immature gemetocytaemia as an indicator of a poor response to chloroquine treatment and its relationship to molecular determinants of chloroquine resistance. *Ann Trop Med Parasitol* 97(5): 453-68

Sowunmi A, Fateye BA (2003) Asymptomatic, recrudescent, chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* infections in Nigerian children: clinical and parasitological characteristics and implications for the transmission of drug-resistant parasites. *Ann Trop Med Parasitol* 97(5): 469-79

Stepniewska K, Taylor WR, Mayxay M, Price R, Smithuis F, Guthmann JP, Barnes K, Myint HY, Adjuik M, Olliaro P, Pukrittayakamee S, Looareesuwan S, Hien TT, Farrar J, Nosten F, Day NP, White NJ (2004) In vivo assessment of drug efficacy against *Plasmodium falciparum* malaria: duration of follow-up. *Antimicrob Agents Chemother* 48(11): 4271-80

Stohrer JM, Dittrich S, Thongpaseuth V, Vanisaveth V, Phetsouvanh R, Phompida S, Monti F, Christophel EM, Lindegardh N, Annerberg A, Jelinek T (2004) Therapeutic efficacy of artemether-lumefantrine and artesunate-mefloquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Luang Namtha Province, Lao People's Democratic Republic. *Trop Med Int Health* 9(11): 1175-83

Suh KN, Kain KC, Keystone JS (2004) Malaria *CMAJ* 170 (11): 1693

Sullivan DJ Jr, Gluzman IY, Goldberg DE (1996a) Plasmodium hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science* 271(5246): 219-222

Sullivan DJ Jr, Gluzman IY, Russell DG, Goldberg DE (1996b) On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11865-11870

Sullivan DJ Jr, Matile H, Ridley RG, Goldberg DE (1998) A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines. *J Biol Chem* 273(47): 31103-7

Sumawinata IW, Bernadeta, Leksana B, Sutamihardja A, Purnomo, Subianto B, Sekartuti, Fryauff DJ, Baird JK (2003) Very high risk of therapeutic failure with chloroquine for

uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria in Indonesian Papua. *Am J Trop Med Hyg* 68(4): 416-20

Sutanto I, Supriyanto S, Ruckert P, Purnomo, Maguire JD, Bangs MJ (2004) Comparative efficacy of chloroquine and sulfadoxine-pyrimethmine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria and impact on gametocyte carriage rates in the East Nusatenggara province of Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 70(5): 467-73

Sutherland CJ, Drakeley J, Obisike U, Coleman R, Jawara M, Targett GAT, Milligan P, Pinder M, Walraven G (2003) The addition of artesunate to chloroquine for treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in gambian children delays, but does not prevent treatment failure. *Am J Trop Med Hyg* 69(1): 19-25

Syafruddin D, Asih PB, Aggarwal SL, Shankar AH (2003) Frequency distribution of antimalarial drug-resistant alleles among isolates of *Plasmodium falciparum* in Purworejo district, Central Java Province, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 69(6): 614-20

Takakura M, Uza M, Sasaki Y, Nagahama N, Phommpida S, Bounyadeth S, Kobayashi J, Toma T, Miyagi I (2001) The relationship between anthropometric indicators of nutritional status and malaria infection among youths in Khammouane Province, Lao PDR *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 32(2): 262-7

Takken W (2002) Do insecticide-treated bednets have an effect on malaria vectors ? *Trop Med Int Health* 7(12): 1022-30

Talisuna AO, Kyosiimire-Lugemwa J, Langi P, Mutabingwa TK, Watkins W, Van Marck E, Egwang T, D'Alessandro U (2002) Role of the pfcrt codon 76 mutation as a molecular marker for population-based surveillance of chloroquine (CQ)-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Ugandan sentinel sites with high CQ resistance. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96(5): 551-6

Tarnchompoo B, Sirichaiwat C, Phupong W, Intaraudom C, Siriwaraporn W, Kamchonwongpaisan S, Vanichtanankul J, Thebtaranonth Y, Yuthavong Y (2002) Development of 2,4-diaminopyrimidines as antimalarials based on inhibition of S108N and C59R + S108N mutants of dihydrofolate reductase from pyrimethamine-resistant *Plasmodium falciparum*. *J Med Chem* 45 (6): 1244-52

Tinto H, Ouedraogo JB, Erhart A, Van Overmeir C, Dujardin JC, Van Marck E, Guiguemde TR, D'Alessandro U (2003) Relationship between the pfcrt T76 and the Pfmdr-1 Y86 mutations in *Plasmodium falciparum* and in vitro/in vivo chloroquine resistance in Burkina Faso, West Africa. *Infect Genet Evol* 3(4): 287-92

Toellner R, Illustrierte Geschichte der Medizin (1983) Band 7, Kapitel: Geschichte der Tropenkrankheiten S. 2622ff, Andreas & Andreas, Salzburg

Toma H, Kobayashi J, Vannachone B, Arakawa T, Sato Y, Nambanya S, Manivong K, Inthakone S (2001) A field study on malaria prevalence in southeastern Laos by polymerase chain reaction assay. *Am J Trop Med Hyg* 64(5-6): 257-61

Triglia T, Cowman AF (1994) Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (15): 7149-53

Triglia T, Menting JG, Wilson C, Cowman AF (1997) Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(25): 13944-9

Vaidya AB, Mather MW (2000) Atovaquone resistance in malaria parasites. *Drug Resist Updat* 3(5): 283-87

Urdaneta L, Plowe C, Goldmann I, Lal AA (1999) Point mutations in dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes of *Plasmodium falciparum* isolates in Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 61(3): 457-62

Vander Jagt DL, Hunsaker LA, Campos NM (1987) Comparison of proteases from chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol* 36(19): 3285-91

Van den Broek IV, Van Der Wardt S, Talukder L, Chakma S, Brockman A, Nair S, Anderson TC (2004) Drug resistance in *Plasmodium falciparum* from Chittagong Hill Tracts, Bangaldesh. *Trop Med Int Health* 9(6): 680-7

Van Es HHG, Karcz S, Chu F, Cowman AF, Vidal S, Gros P, Schurr E (1994) Expression of the plasmodial Pfmdr1 gene in mammalian cells is associated with increased susceptibility to chloroquine. *Mol Cell Biol* 14(4): 2419-28

Van Es HHG, Renkema H, Aerts H, Schurr E (1994) Enhanced lysosomal acidification leads to increased chloroquine accumulation in CHO cells expressing the pfmdr1 gene. *Mol Biochem Parasitol* 68: 209-19

Vasconcelos KF, Plowe CV, Fontes CJ, Kyle D, Wirth DF, Pereira da Siva LH, Zalis MG (2000) Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of isolates from the Amazon region fo Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95(5): 721-8

Vathsala PG, Pramanik A, Dhanasekaran S, Devi CU, Pillai CR, Subbaro SK, Ghosh SK,

Tiwari SN, Sathyanarayan TS, Deshpande PR, Mishra GC, Ranjit MR, Dash AP, Rangarajan PN, Padmanaban G (2004) Widespread occurrence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (Pfcrt) gene haplotype SVMNT in P. falciparum malaria in India. *Am J Trop Med Hyg* 70(3): 256-9

Vieira PP, Ferreira MU, Das Gracas Alecrim M, Alecrim WD, Da Silva LH, Sihuincha MM, Joy DA, Mu J, Su XZ, Zalis MG (2004) pfcrt Polymorphism and the Spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* populations across the Amazon Basin. *J Infect Dis* 190(2): 417-24

Viengxay et al. (1996, 1997) (unpub. IMPE) aus Malaria in Lao PDR – a Review by Dr. Laura Watson (September 1999)

Vinayak S, Biswas S, Dev V, Kumar A, Ansari MA, Sharma YD (2003) Prevalence of the K76T mutation in the pfcrt gene of *Plasmodium falciparum* among chloroquine responders in India. *Acta Trop* 87(2): 687-93

Von Seidlein L, Jawara M, Coleman R, Doherty T, Walraven G, Targett G (2001) Parasitaemia and gametocytaemia after treatment with chloroquine, pyrimethamine/sulfadoxine, and pyrimethamine/sulfadoxine combined with artesunate in young Gambians with uncomplicated malaria. *Trop Med Int Health* 6(2): 92-8

Waller KL, Muhle RA, Ursos LM, Horrocks P, Verdier-Pinard D, Sidhu AB, Fujioka H, Roepe PD, Fidock DA (2003) Chloroquine resistance modulated in vitro by expression levels of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter. *J Biol Chem* 278(35): 33593-601

Walter RD (1991) Folate metabolism as a target for chemotherapy of malaria. In: *Biochemical Protozoology* (eds GH Coombs & MJ North) Taylor & Francis, London, pp. 560-568

Wang P, Brooks DR, Sims PF, Hyde JE (1995) A mutation-specific PCR system to detect sequence variation in the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 71(1): 115-25

Wang P, Read M, Sims PF, Hyde JE (1997a) Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Mol Microbiol* 23(5): 979-86

Wang P, Lee CS, Bayoumi R, Djimde A, Doumbo O, Swedberg G, Dao LD, Mshinda H, Tanner M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE (1997b) Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum* monitored by sequence analysis of dihydropteroate synthetase and dihydrofolate reductase alleles in an large number of field samples of diverse origins. *Mol Biochem Parasitol* 89(2): 161-77

Ward SA (1988) Mechanisms of chloroquine resistance in malarial chemotherapy. *Trends*

Pharmacol Sci 9(7): 214-62

Warhurst DC, Williams JE (1996) ACP Broadsheet no 148. July 1996. Laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Pathol* 49(7): 533-8

Warhurst DC (2001) A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *New Engl J Med* Editorial 344(4): 299-302

Watkins WM, Sixsmith DG, Chulay JD, Spencer HC (1985) Antagonism of sulfadoxine and pyrimethamine antimalarial activity in vitro by p-aminobenzoic acid, p-aminobenzoylglutamic acid and folic acid. *Mol Biochem Parasitol* 14(1): 55-61

Watkins WM, Moboso M (1993) Treatment of *Plasmodium falciparum* malaria with pyrimathamine-sulfadoxine: selsective pressure is a function of long elemination half-life. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87(1) : 75-8

Wellems TE, Panton LJ, Gluzman IY, Do Rosario VE, Gwadz RW, Walker-Jonah A, Krogstad DJ (1990) Chloroquine resistance not linked to medr-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. *Nature* 345(6272): 253-5

Wernsdorfer WH, Payne D (1991) The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther* 50: 95-121

Wernsdorfer WH (1994) Epidemiology of drug resistance in malaria: a crucial interaction. *Acta Trop* 56: 143-56

Wernsdorfer WH, Noedl H (2003) Molecular marker for drug resistance in malaria: use in treatment, diagnosis and epidemiology. *EHP Library Malaria Bulletin* 72: 17-30

Wernsdorfer WH (2004) Coartemether (artemether and lumefantrin): an oral antimalarial drug. *Expert Rev Infect Ther* 2(2): 181-96

Wellems TE, Plowe CV (2001) Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis* 184(6): 770-6

White NJ (1994) Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of artemisinin and derivates. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88(1): S41-43

White NJ (2002) The assessment of antimalarial drug efficacy. *Trends Parasitol* 18:458-64

Whitty CJM, Allan R, Wiseman V, Ochola S, Nakyanzi-Mugisha MV, Vonhm B, Mwita M, Miaka C, Oloo A, Premji Z, Burgess C, Mutabingwa TK (2004) Averting a malaria disaster in Africa – where does the buck stop? *Bull World Health Org* 82(5): 381-85

WHO 1997, World malaria situation in 1994. *Weekly Epidemiological Record* 36: 269-274

Wichmann O, Jelinek T, Peyerl-Hoffmann G, Mühlberger N, Grobusch MP, Gascon J, Matteelli A, Hatz C, Laferi H, Schulze M, Burchard G, Da Cunha S, Beran J, McWhinney P, Kollaritsch H, Kern P, Cuadros J, Alifrangis M, Gjoerup I (2003) Molecular surveillance

of the antifolate-resistant mutation I164L in imported african isolates of *Plasmodium falciparum* in Europe: sentinel data from TropNetEurop. *Malaria J* 2: 17-23

Wilairatana P, Kyle DE, Looareesuwan S, Chinwongprom K, Amradee S, White NJ, Watkins WK (1997) Poor efficacy of antimalarial biguanide-dapsone combinations in the treatment of acute, uncomplicated falciparum malaria in Thailand. *Ann Trop Med Parasitol* 91: 125-32

Wilson CM, Volkman SK, Thaithong S, Martin RK, Kyle DE, Milhous WK, Wirth DF (1993) Amplification of pfmdr 1 associated with mefloquine and halofantrine resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Mol Biochem Parasitol* 57(1): 151-60

Winkle S, Kulturgeschichte der Seuchen (1997), Kapitel: Malaria, S. 707ff, Artemis & Winkler, Düsseldorf für KOMET, 707-81

Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR (2002) Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis* 2 (4): 209-18

Wünsch S, Sanchez CP, Gekle M, Große-Wortmann L, Wiesner J, Lanzer M (1998) Differential stimulation of the Na/H exchanger determines chloroquine uptake in *Plasmodium falciparum J Cell Biol* 140 (2): 335-345

WHO: www.who.int/country/lao

Yahon A, Cabantchik ZI, Ginsburg H (1984) Identification of the acidic compartment of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes as the target of the antimalarial drug chloroquine. *EMBO J* 3(11): 2695-700

Yahon A, Cabantchik ZI, Ginsburg H (1985) Susceptibility of human malaria parasites to chloroquine is pH dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(9): 2784-8

Yang H, Liu D, Yang Y, Huang K, Dong Y, Yang P, Liao M, Zhang C (1997) In vitro sensitivity of *Plasmodium falciparum* to eight antimalarials in China-Myanmar and China-Lao PDR border areas. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 28(3): 460- 5

Yang Y, Aduga I, Dong Y, Zhang Z, Warhurst DC (2002) Selection of wild type (86^N) pfmdr1 gene in absence of chloroquine pressure: emerging pattern in China-Myanmar border (unveröffentlicht)

Zalis MG, Pang L, Silveira MS, Milhous WK, Wirth DF (1998) Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from Amazon region of Brazil: evidence for quinine resistance. *Am J Trop Med Hyg* 58: 630-37

Zhang Y, Asante KS, Jung A (1986) Stage-dependant inhibition of chloroquine on *Plasmodium falciparum J Parasitol* 72 (6): 830-6

Zhang Y (1987) Malaria: an intra-erythrocytic neoplasm ? *Parasitol Today* 3(6): 190-2

Zhang Y, Meshnick SR (1991) Inhibition of *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthetase and growth in vitro by sulfa drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 35(2): 267-71

Zhang H, Paguio M, Roepe PD (2004) The antimalarial drug resistance protein *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter binds chloroquine. *Biochemestry* 43(26): 8290-6

Zolg JW, Plitt JR, Chen GX, Palmer S (1989) Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 36 (3): 253-62

Zolg JW, Chen GX, Plitt JR (1990) Detection of pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* by mutation-specific polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 39(2): 257-65

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:
Entwicklungszyklus der Plasmodien nach H.C. Jeffrey & R.M. Leach,
aus: Urban & Fischer 2003, Roche Lexikon Medizin, 5. Auflage 4

Abbildung 2:
Weltkarte der Resistenz, aus: Wongsrichanalai C, Pickard AL,
Wernsdorfer WH, Meshnick SR (2002) Epidemiology of
drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis* 2 (4): 209-18 11

Abbildung 3: Karte von Laos 37

PCR

Abbildung 4: Speziesnachweis *Plasmodium falciparum* 66
Abbildung 5: Speziesnachweis *Plasmodium vivax* 67
Abbildung 6: Pfmdr – Codon 86 – einfache PCR 68
Abbildung 7: Pfmdr – Codon 86 –Apo I – einfache PCR 69
Abbildung 8: Pfmdr – Codon 86 – Afl III – einfache PCR 69
Abbildung 9: Pfmdr – Codon 86 – nested PCR 70
Abbildung 10: Pfmdr – Codon 86 – Apo I – nested PCR 70
Abbildung 11: Pfmdr – Codon 86 – Afl III – nested PCR 71
Abbildung 12: Pfmdr – Codon 1042 71
Abbildung 13: Pfmdr – Codon 1042 – Ase I 72
Abbildung 14: Pfmdr – Codon 1246 72
Abbildung 15: Pfmdr – Codon 1246 EcoR V 73
Abbildung 16: Pfcrt – Codon 76 73
Abbildung 17: Pfcrt – Codon 76 – Apo I 74
Abbildung 18: DHFR – Primer M3 + F\ 75
Abbildung 19: DHFR – Primer M4 + F 75
Abbildung 20: DHFR – Codon 16 – Nla III 76
Abbildung 21: DHFR – Codon 51 – Tsp5091 77
Abbildung 22: DHFR – Codon 59 – Xmn I 77
Abbildung 23: DHFR – Codon 108 – Alu I 78
Abbildung 24: DHFR – Codon 108 – Alu I 79
Abbildung 25: DHFR – Codon 108 – Bsr I – 522bp 79

Abbildung 26: DHFR – Codon 108 – Bsr I – 326bp 80
Abbildung 27: DHFR - Codon 108 – BstN I – 522bp 80
Abbildung 28: DHFR – Codon 108 – BstN I – 326bp 81
Abbildung 29: DHFR – Codon 164 – Dra I 82
Abbildung 30: DHPS – Primer K und K\ 82
Abbildung 31: DHPS – Primer L und L\ 83
Abbildung 32: DHPS – Codon 436 – Mnl I 83
Abbildung 33: DHPS – Codon 436 – MspA I 84
Abbildung 34: DHPS – Codon 437 – Mwo I 85
Abbildung 35: DHPS - Codon 437 – Ava II 85
Abbildung 36: DHPS - Codon 540 – Fok I 86
Abbildung 37: DHPS – Codon – 581 – Bsl I 87
Abbildung 38: DHPS – Codon 581 – BstU I 87
Abbildung 39: DHPS – Codon 613 – Bsa WI 88
Abbildung 40: DHPS – Codon 613 – Mwo I 88

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name:	Nicole Isabelle Melanie Berens
Geburt:	08.12.1977 in München

Schulausbildung

09/84-06/97	Grundschule Karlshöhe, Hamburg Gymnasium AKG, Bensheim in Hessen Gymnasium Michaeli, München (Abitur)

Studium

04/98-09/04	Humanmedizin in München
10/03-09/04	Praktisches Jahr: - Teaching Hospital Tribhuvan University, Kathmandu, Nepal: General Surgery - Krankenhaus München Schwabing, LMU, München - Dr. von Haunersches Kinderspital, LMU München

Berufserfahrung

Pflegepraktika	
03/99-04/99	Psychiatrie, Bezirkskrankenhaus Haar
09/99-10/99	Kinderchirurgie, v. Haunersches Kinderspital
Famulaturen	
02/01-03/01	Hämatologie & Onkologie, AKA, Hamburg
03/01-04/01	Anästhesie, Praxis-Klinik Gierisch, München
02/02-03/02	Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin, Tropeninstitut der LMU, München
03/02-04/02	Unfallchirurgie, Klinikum Rechts der Isar, TU
09/02-10/02	Pädiatrie, Public Health Projekt "Subidkhali Child Health Care" (Integrated Child Health Organization), Bangladesch
02/03-03/03	Pädiatrie, Klinikum Harlaching, München
11/05	Laborpraktikum an der Université Paris XI, Villejuif, INSERM
seit 01.01. 2005	Wissenschaftliche Angestellte im Forschungszentrum der Haunerschen Kinderklinik, LMU, assistenzärztliche Mitarbeit in der Stoffwechsel- und Notfallambulanz

Veröffentlichungen und Kongresse

09/02	Third European Congress on Tropical Medicine and Infectious Diseases, Lissabon: Poster
02/03	7. Kongreß für Infektiologie und Tropenmedizin, Berlin: Poster
03/03	Infection 2003; 31 (Suppl 1): 139; P 154
09/03	Berens *et al.* (2003) Trop Med Int Health 8(9):775-82