

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

Vorstand:  
Professor Dr. med. Thomas Löscher

*Plasmodium falciparum:  
Resistenzbestimmung durch molekulare Resistenzmarker  
sowie in vivo Sensitivitätstests*

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

Vorgelegt von Babett Schwöbel  
aus Erfurt

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Löscher

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Apfelbacher  
Prof. Dr. H. Ostermann

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. habil. T. Jelinek

Dekan Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Januar 2004

Teile der vorliegenden Arbeit wurde bereits veröffentlicht:

Schwöbel B, Jordan S, Vanisaveth V, Petsouvanh R, Phompida S, von Sonnenburg F, Christophel EM, Jelinek T. "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. 2003 Jan 8(1):19-24

Schwöbel B, Alifrangis M, Salanti A, Jelinek T. *In vitro* and *in vivo* mutations of *Plasmodium falciparum* cytochrome b associated to atovaquone/proguanil resistance: rapid diagnostic by *in vivo* resistance markers. Malar J 2003,2: 5.

Behrens N, Schwöbel B, Jordan S, Vanisaveth V, Phetsouvanh R, Christophel EM, Phompida S, Jelinek T. *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 2003 Sept8(9): 775-82.



---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1. Einleitung</b> .....	8
1.1. Malaria – Verbreitung und Erreger.....	8
1.2. Das Genom von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	9
1.3. Behandlung der Malaria.....	10
1.4. Resistenz.....	11
1.4.1. Definition.....	11
1.4.2. Resistenzmechanismen.....	11
1.4.3. Ursachen der Resistenzentwicklung.....	12
1.4.4. Bestimmungsmethoden für Resistenz.....	13
1.4.5. Verbreitung von Resistenzen gegen Antimalariamittel.....	15
1.4.6. Wirkmechanismus und Resistenz der Chinoline.....	17
1.4.7. Wirkmechanismus und Resistenz der Antifolate.....	18
1.4.8. Wirkmechanismus von Antibiotika.....	19
1.4.9. Wirkmechanismus von Artemisinin und Derivaten.....	19
1.4.10. Wirkmechanismus und Resistenz von Atovaquon.....	20
1.5. Malarone®: ein neues Kombinationspräparat zur Prophylaxe und Therapie der unkomplizierten Malaria tropica.....	21
<b>2. Problemstellung und Zielsetzung</b> .....	23
2.1. In vivo Resistenzstudien in Laos.....	23
2.2. Resistenzmarker für die Therapie mit Atovaquon/Proguanil (Malarone®).....	23
<b>3. Material und Methoden</b> .....	25
3.1. in vivo Sensitivitätsstudie.....	25
3.1.1. Studiengebiet.....	25
3.1.2. Protokoll der Sensitivitätsstudien.....	25
3.2. <i>In-vitro</i> -Kultivierung von <i>Plasmodium falciparum</i> .....	29
3.2.1. Kultivierung.....	29
3.2.2. Resistenzinduktion.....	30
3.3. Molekularbiologische Methoden.....	30
3.3.1. DNA-Extraktion.....	30
3.3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	31
3.3.3. Trennung und Nachweis von DNA.....	31
3.3.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	32
3.3.5. Ligation.....	32
3.3.6. Transformation von <i>E. coli</i> .....	32

3.3.7. Selektion rekombinanter Klone.....	33
3.3.8. Plasmidextraktion.....	33
3.3.9. Sequenzierung.....	34
3.3.10. Auswertung der Nukleotidsequenzen und Sequenzvergleich.....	34
3.3.11. Restriktionsenzymverdau.....	35
3.3.12. PCR-RFLP Methodik zur Mutationsanalyse.....	35
3.3.13. Analyse von Gensequenzen nach Restriktionsenzymen.....	36
3.4. Material.....	36
3.4.1. Material für die <i>in-vivo</i> Feldstudie.....	36
3.4.2. <i>Plasmodium falciparum</i> Isolate.....	38
3.4.3. Chemikalien, Kits, Lösungen.....	38
3.4.4. Geräte und Software.....	42
3.4.5. Sonstiges.....	43
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
4.1. Sensitivitätsstudien.....	44
4.1.1. Attapeu.....	44
4.1.2. Luang Namtha.....	47
4.2. <i>In-vitro</i> -Resistenzinduktion.....	50
4.3. Klonierung.....	50
4.4. Sequenzierung des Cytochrom-b-Genes.....	51
4.4.1. Mutationen des Cytochrom-b-Genes der <i>in-vitro</i> -Kulturen.....	51
4.4.2. Mutationen des Cytochrom-b-Genes des <i>in-vivo</i> -Therapieversagers (TN352).....	52
4.5. Daten von TropNetEurop.....	52
4.6. PCR-RFLP-Methodik für Polymorphismen an Kodon 268.....	53
4.6.1. Enzymauswahl und Primerdesign.....	53
4.6.2. Optimierung der „nested PCR“.....	55
4.6.3. Restriktion.....	60
4.7. PCR-RFLP-Methodik für Polymorphismen an Kodon 133.....	61
4.7.1. Enzymauswahl und Primerdesign.....	62
4.7.2. Optimierung der „nested PCR“.....	64
4.7.3. Restriktion.....	65
4.8. Untersuchung der Proben aus Laos.....	67
4.8.1. Kodon 268 Polymorphismen.....	67
4.8.2. Kodon 133 Polymorphismen.....	68

<b>5. Diskussion</b> .....	70
5.1. Methodische Aspekte.....	70
5.1.1. Durchführung und Nutzen von <i>in-vivo</i> -Sensitivitätstest.....	70
5.1.2. Induktion von <i>in-vitro</i> -Resistenz.....	71
5.1.3. Untersuchung von Genotypen zur Resistenzbestimmung.....	73
5.2. Resistenzlage in Laos – Auswertung der <i>in-vivo</i> -Sensitivitätsstudien.....	74
5.3. Mutationen am Cytochrom-b-Gen von <i>Plasmodium falciparum</i> bei <i>in-vitro</i> - und <i>in-vivo</i> -Resistenz zu Atovaquon.....	78
5.4. Molekulare Resistenzmarker für die Therapie mit Atovaquon bzw. Atovaquon/Proguanil.....	82
5.5. Prävalenz von Kodon 268 und Kodon 133 Polymorphismen in Laos.....	83
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	85
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	88
<b>Lebenslauf</b> .....	98
<b>Publikationen</b> .....	99
<b>Danksagung</b> .....	100

## 1. *Einleitung*

### 1.1. *Malaria – Verbreitung und Erreger*

Die Malaria gehört zu den häufigsten Infektionskrankheiten weltweit.

Etwa 40% der Weltbevölkerung in fast 100 Ländern der Welt leben in Gebieten möglicher Malariaübertragung. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt die Anzahl der akuten Erkrankungen auf 300.000-500.000 Fälle pro Jahr. Damit gehört die Malaria zu den häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität in tropischen Ländern.

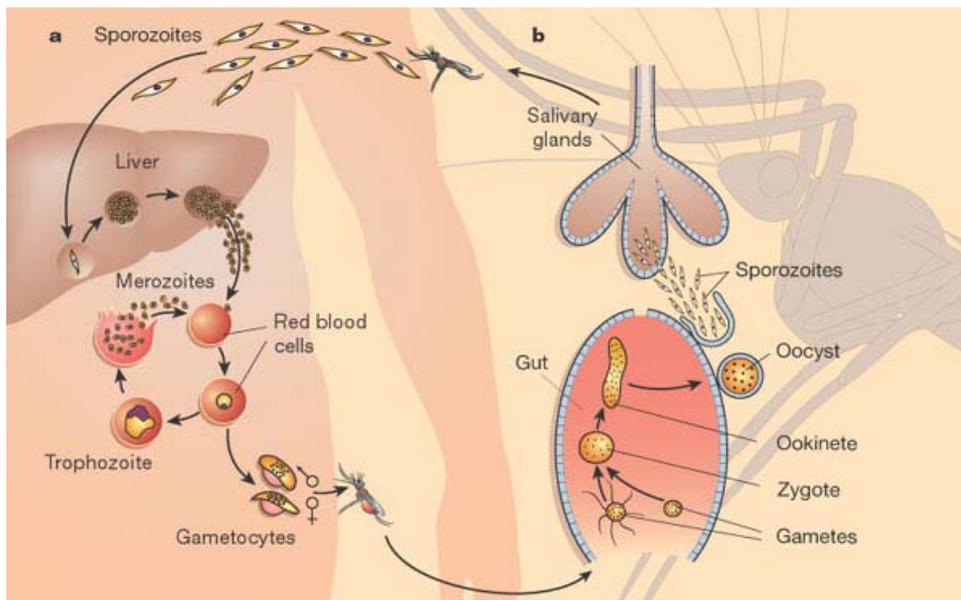
Malaria wird durch Protozoen der Gattung Plasmodium (Ordnung *Haemosporidae*, Stamm *Apicomplexa*) ausgelöst. Die vier humanpathogenen Spezies *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium malariae* verursachen verschiedene klinische Manifestationen. *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria tropica, ist hauptsächlich für die Mortalität der Malaria verantwortlich. Die weltweite Zahl der Todesfälle wird auf 1,5 – 2 Millionen jährlich geschätzt, 90% entfallen auf Afrika, betroffen sind vor allem Kinder.

Die Krankheit war bereits im Altertum bekannt. Hippokrates beschreibt 400 v. Chr. sowohl die klinischen Symptome der verschiedenen Malariaerkrankungen als auch den Zusammenhang zwischen Fieber, Jahreszeit und Umgebung. Vor etwa 100 Jahren wurden verschiedene Erregerstadien des Parasiten entdeckt und erstmals der Lebenszyklus beschrieben. Man erkannte, dass die weibliche Stechmücke der Gattung *Anopheles* der Hauptwirt des Malariaerregers ist und diesen bei der Blutmahlzeit auf den Mensch überträgt. Der Zyklus der Parasiten verläuft als sexueller Zyklus (Sporogonie) in der Überträgermücke und als asexueller Zyklus (Schizogonie) im Menschen.

Die nach einem Stich in den Menschen gelangten Sporozoiten wandern in die Leber, befallen Hepatozyten und entwickeln sich zu Gewebsschizonten. Diese reifen innerhalb der nächsten 2 Wochen und setzen 10 000 bis 30 000 Merozoiten frei. In die Blutbahn gelangt befallen sie dort Erythrozyten. In einem 48-Stunden-Rhythmus entwickeln sich die Merozoiten über Trophozoiten zu Schizonten. Diese teilen sich in 16-32 Merozoiten, welche beim Platzen der Erythrozyten freigesetzt werden und erneut Zellen infizieren. Dieses massive Ausschütten von Fremdeiweiß ist für die typischen Symptome der Malaria, Fieber, Kopfschmerz, Übelkeit, Erbrechen, verantwortlich. Einige Merozoiten verwandeln sich in Gametozyten, die Geschlechtsform der Parasiten. Werden sie beim erneuten Stich

der Mücke aufgenommen, kommt es zur geschlechtlichen Vermehrung (Sporogonie) im Darm der Mücke. Die dabei entstehenden Sporozoiten gelangen in die Speicheldrüse der Mücke, um beim nächsten Stich erneut den Menschen zu infizieren und den Kreislauf zu schließen.

**Abbildung 1:** Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*



In Hochendemiegebieten kann sich bei Jugendlichen und Erwachsenen nach wiederholter Infektion eine Semiimmunität gegen *Plasmodium falciparum* entwickeln, die zu mildereren oder asymptomatischen Krankheitsverläufen führt. Der Erwerb einer Semiimmunität ist mit einer hohen Kindersterblichkeit in Endemiegebieten verbunden. Genetische Variationen, die zu unterschiedlichen Phänotypen der Erythrozyten führen, scheinen im Zusammenhang mit der Verbreitung und dem Schutz vor Malariaerkrankungen zu stehen. Zu diesen erythrozytären Anämien gehören die Sichelzellanämie, der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel, Thalassämien und das Persistieren des Hämoglobin F.

Obwohl spezifische Antigene der unterschiedlichen Erregerstadien (Sporozoiten, Leberschizonten, Merozoiten, Erythrozyten-Oberflächenantigene) beschrieben und untersucht wurden, ist noch kein Impfstoff zum Schutz vor Malaria tropica verfügbar [9].

### 1.2. Das Genom von *Plasmodium falciparum*

Das Genom von *Plasmodium falciparum* setzt sich aus 14 linearen Chromosomen mit insgesamt 23 Megabasen (Mb) Kern-DNA und ca. 5300 Genen zusammen. Zusätzlich

enthält es 2 extrachromosomale Elemente: ein mitochondriales Fragment von 6 kb und ein plastidartiges zirkuläres Element von 35 kb, welches dem Apicoplasten zugeordnet werden konnte und prokaryotischen (Algen) Ursprungs ist [99]. Ein internationales Projekt zur Sequenzierung des vollständigen Plasmodium falciparum Genoms (3D7-Klon) wurde 1996 gestartet und die sequenzierten Teile successive im Netz veröffentlicht. 2002 war die Sequenzierung aller 14 Chromosomen abgeschlossen und steht für Forschungsprojekte zur Verfügung [31]. Erwartet werden neue Impulse für die Impfstoff- und Medikamentenentwicklung.

### 1.3. *Behandlung der Malaria*

Schutz vor einer Infektion bieten die sogenannte Expositionsprophylaxe (lange, helle Kleidung und Verwendung von Repellentien) sowie die Chemoprophylaxe durch entsprechende Malariamedikamente. Zur Behandlung und Prophylaxe der Malaria stehen eine begrenzte Zahl von Chemotherapeutika zur Verfügung. Tabelle 1 gibt einen Überblick über verbreitete Mittel und deren Verwendung.

**Tabelle 1:** Chemotherapeutika zur Behandlung der Malaria (Auswahl)

Wirkstoff	Therapie	Einnahmedauer	Prophylaxe
Chinin	komplizierte Malaria	3 x täglich 7 Tage	Keine Prophylaxe
Chloroquin	unkomplizierte Malaria	3 Tage	Prophylaxe, 1x wöchentlich
Pyrimethamin/ Sulfadoxin	unkomplizierte Malaria	Einmaldosis	Prophylaxe, 1x wöchentlich
Mefloquin	unkomplizierte Malaria	3 x täglich 24 h	Prophylaxe, 1x wöchentlich
Amodiaquin	unkomplizierte Malaria	3 Tage	
Halofantrin	unkomplizierte Malaria	3 x täglich 1 Tag	Keine Prophylaxe
Artemisinin-Derivate	Malaria tropica	7 Tage	Keine Prophylaxe
Artemether/ Lumefantrin	unkomplizierte Malaria	2 x täglich 3 Tage	Keine Prophylaxe
Atovaquon/ Proguanil	unkomplizierte Malaria	3 Tage	Prophylaxe, 1x täglich
Doxycyclin	In Kombination		Prophylaxe, 1x täglich
Proguanil/ Chloroquin			Prophylaxe, 2x täglich
Primaquin	Eradikationstherapie der Malaria tertiana	1 x täglich 14 Tage	

## **1.4. Resistenz**

### **1.4.1. Definition**

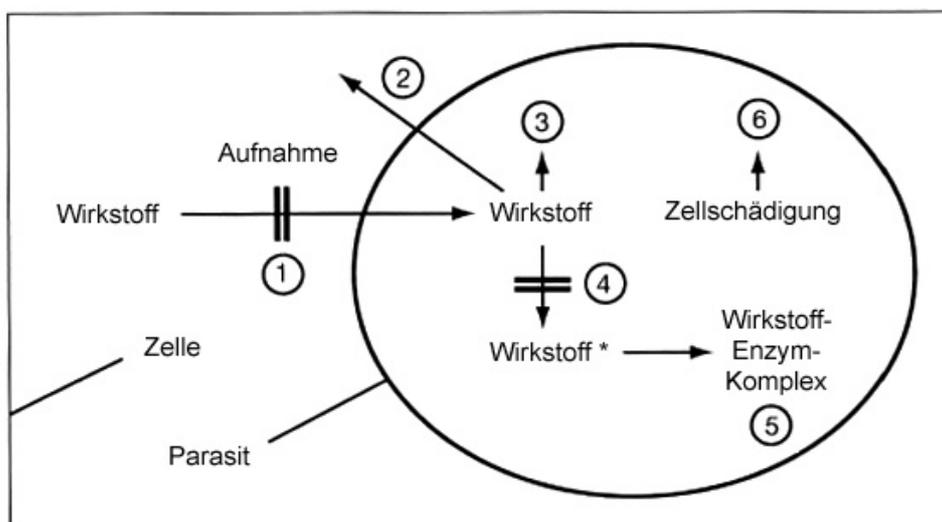
Zunehmende Resistenz von *Plasmodium falciparum* gegen Standardtherapeutika stellt heute die größte Herausforderung bei der Bekämpfung der Malaria dar. Resistenz ist definiert als Fähigkeit einer Parasitenpopulation, trotz Einnahme und Absorption einer adäquaten Wirkstoffmenge zu überleben und sich zu vermehren. Der Wirkstoff muss dabei für den Zeitraum, der für eine normale antiparasitäre Wirkung notwendig ist, den Wirkort (Parasit oder infizierter Erythrozyt) erreichen. Damit besteht ein Unterschied zu der Bezeichnung des Therapieversagers. Während Resistenz häufig zu Therapieversagern führt, wird nicht jeder Therapieversager durch einen resistenten Erreger verursacht. Viele Faktoren, wie z.B. unzureichende Dosierung, fehlende Compliance, verminderte Wirkstoffqualität, Wechselwirkung mit anderen Medikamenten, verminderte Absorption oder unzureichende Metabolisierung von Prodrugs können ein Versagen der antiparasitären Therapie verursachen.

Verstärkt wird das Problem der Resistenz durch das Auftreten multiresistenter Erreger. *Multi drug resistance* (MDR) von *Plasmodium falciparum* wird definiert als Resistenz gegen mehr als 2 verschiedene Klassen von Malariamedikamenten. Im allgemeinen handelt es sich bei den ersten beiden Wirkstoffklassen um 4-Aminochinoline (wie z.B. Chloroquin) und die Antifolate (wie z.B. Sulfadoxin/Pyrimethamin).

### **1.4.2. Resistenzmechanismen**

Um den Parasiten zu schädigen, muss der Wirkstoff den Parasiten in der Wirtszelle finden und den Angriffsort erreichen. Normalerweise müssen dafür Zellmembranen passiert und der Wirkstoff oftmals am Wirkort aktiviert werden. Nach Angriff am Zielort muss der Parasit ausreichend geschädigt sein um vom Immunsystem eliminiert zu werden oder spontan zu sterben. Jeder dieser Schritte gibt dem Parasiten die Möglichkeit einzugreifen und Resistenzmechanismen zu entwickeln.

**Abbildung 2:** Schematische Darstellung von Resistenzmechanismen (nach Borst, 1995<sup>[6]</sup>)



Durch den Verlust von Transportsystemen oder Veränderungen von Membranstrukturen kommt es zur verminderter Aufnahme (1) in die Zelle. Beispiele sind Mutationen am P-glycoprotein (Pgh), einem transmembranalen Transporter aus der Familie der „Adenin nucleotide binding Cassette“-(ABC)-Transporter. Der Wirkstoff gelangt in die Zelle, wird aber verstärkt wieder ausgeschleust (2), inaktiviert (3) oder die Umwandlung in den aktiven Metaboliten gehemmt (4). Durch Mutationen kommt es zu einer Veränderung der Zielstruktur (5), z.B. kann durch einen Aminosäurewechsel an der Bindungsstelle des angegriffenen Enzyms die Bindungsaffinität der Wirksubstanz herabgesetzt werden. Oder der Parasit findet alternative Wege um trotz Enzymhemmung zu überleben. Schließlich können auch effizientere Methoden der Reparatur von Zellschäden zu Resistenz führen (6).

### 1.4.3. Ursachen der Resistenzentwicklung

Punktmutationen, die Resistenzen verursachen können, finden spontan ohne Medikamenteneinfluss statt (gebräuchliche Antimalariamittel sind nicht mutagen). Einzelne veränderte Parasiten mit geringen genetischen Variationen können in geringer Zahl in der Gesamtpopulation vorkommen. Zeigen sie unter Medikamentendruck Vorteile, kommt es zu einer Selektion der „fittesten“ Parasiten, die dann die Wildtyppopulation teilweise oder vollständig verdrängen. Die Entwicklung und Ausbreitung von resistenten Erregern wird von vielen weiteren Faktoren beeinflusst. Dazu gehören

Einnahmegewohnheiten, Wirkstoffeigenschaften, Immunstatus sowie Vektoreigenschaften [100].

Wirkstoffe mit langer Halbwertszeit, wie z.B. Mefloquin, verbleiben auch nach Behandlung der Primärinfektion in subtherapeutischer Konzentration im Blut. Sekundärinfektionen können durch niedrige Substanzspiegel „gewöhnt“ werden. Wirkstoffe mit kurzer Halbwertszeit (z.B. Artemisinin) verlangen Compliance der Patienten hinsichtlich der Einnahmedauer, um die gesamte Parasitenpopulation des Patienten zu eliminieren [36]. Genauso erhöht eine unkontrollierte Medikamenteneinnahme ohne genaue Diagnose den Medikamentendruck und ermöglicht die Selektion von resistenten Parasiten (Beispiel: Verwendung von Chloroquin im Speisesalz).

Eine kompetente Immunantwort verstärkt die Wirkung einer Therapie. So kann ein semiimmuner Patient trotz abnehmender Sensitivität des Parasiten gegenüber dem Medikament geheilt werden, während ein nicht immuner erkrankt und die Parasitenpopulation weiter verbreitet werden kann. Daher führt das Auftreten von resistenter Malaria bei nicht immunen Bevölkerungsgruppen wie Vertriebenen oder Fremdarbeitern zu einer Manifestation und Verbreitung von Resistenz.

Der Grad der Transmission beeinflusst die Entwicklung und Verbreitung von Resistenz, wobei die genaue Rolle wahrscheinlich multifaktoriell ist. Ein erhöhtes Risiko zur Resistenzentwicklung wurde sowohl für Gebiete mit intensiver als auch mit moderater Transmission postuliert. Die Beobachtung, dass Resistenz bisher verstärkt in Gebieten mit schwacher Transmission aufgetreten ist (Thailand, Brasilien), spricht für die „low-transmission“ Hypothese [35,51].

Schließlich können auch Vektoreigenschaften die Resistenzentwicklung beeinflussen. Zum Beispiel scheinen Chloroquin-resistente Parasiten in einigen Anophelesarten Reproduktionsvorteile gegenüber sensitiven Populationen aufzuweisen [77,97].

#### **1.4.4. Bestimmungsmethoden für Resistenz**

##### ***In-vivo-Sensitivitätstests***

Wichtigste Methode und sogenannter „Goldstandard“ sind auch heute noch *in-vivo*-Sensitivitätstests. Sie geben genaue Informationen über die Wirksamkeit eines Mittels im Studiengebiet und schließen wirtsspezifische Faktoren wie Immunität mit ein. Um eine

Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen, wurde von der WHO 1965 ein standardisierter Test eingeführt. Therapieergebnisse wurden auf Grundlage parasitologischer Merkmale als sensitiv (S) oder resistent mit unterschiedlichem Schweregrad (RI, RII, RIII) eingestuft. Während bei dem 7-Tage-Test schnell Informationen über RII und RIII Resistenz erhalten werden, kann dabei nicht zwischen sensitiv und RI-Resistenz unterschieden werden. Das ist bei einem 28-Tage-Test möglich, allerdings muss dann die Möglichkeit von Neuinfektionen beachtet werden. 1996 wurde ein neues Protokoll für Gebiete mit starker Transmission veröffentlicht mit stärkerem Fokus auf klinische Ergebnisse (Klassifikation in frühe und späte Therapieversager sowie adäquate klinische Therapieantwort). Dieses Protokoll wurde auch für Gebiete mit niedriger Transmission angepasst. Dieses vorläufige Protokoll (Draft, March 2001) war Grundlage für die Sensitivitätsstudien in Laos 2001/2002. Die Behandlung und Nachverfolgung von einer statistisch ausreichenden Anzahl an Patienten über mindestens 14 Tage ist allerdings zeit-, personal- und kostenaufwendig. Für Medikamente mit langen Halbwertszeiten werden sogar Nachverfolgungszeiträume von 28 bis zu 63 Tagen empfohlen, um auch späte Therapieversager (RI-Resistenz) zu erfassen. Um Rekrudeszenzen sicher als Resistenz zu bestimmen, sind Plasmaspiegelbestimmungen der Medikamente notwendig, die bisher in Endemiegebieten nur selten durchführbar sind.

### ***In-vitro-Methoden***

Zur schnelleren Bestimmung von Resistenzen in endemischen Gebieten wurden *in-vitro*-Methoden entwickelt. Parasiten aus Patientenblut werden im Labor kultiviert und *in vitro* auf Sensitivität zu Malariamedikamenten getestet. Damit kann unabhängig von Einfluss des Wirtsorganismus die Sensitivität des Parasiten zum Medikament getestet werden. Außerdem sind Aussagen über Kreuzresistenzen und synergistische Wirkungen verschiedener Substanzen möglich. Da immer nur ein Teil der isolierten Stämme in Kultur anwächst und getestet werden kann, gibt das Ergebnis nicht das tatsächliche Populationsmuster im Studiengebiet wieder <sup>[87]</sup>. Außerdem fehlen wirtsspezifische Einflüsse, so dass die Ergebnisse, vor allem in hochendemischen Gebieten, nur ungenügend mit *in-vivo*-Wirksamkeiten korrelieren. Ein weiterer Nachteil ist der technische und finanzielle Aufwand der *in-vitro*-Kultivierung, der eine routinemäßige Anwendung unter Feldbedingungen erschwert.

### ***Bestimmung molekularer Resistenzmarker***

Die Entdeckung, dass Resistenzen gegenüber verschiedenen Malariamitteln mit Punktmutationen auf dem *Plasmodium falciparum* Genom korrelieren, führte zur

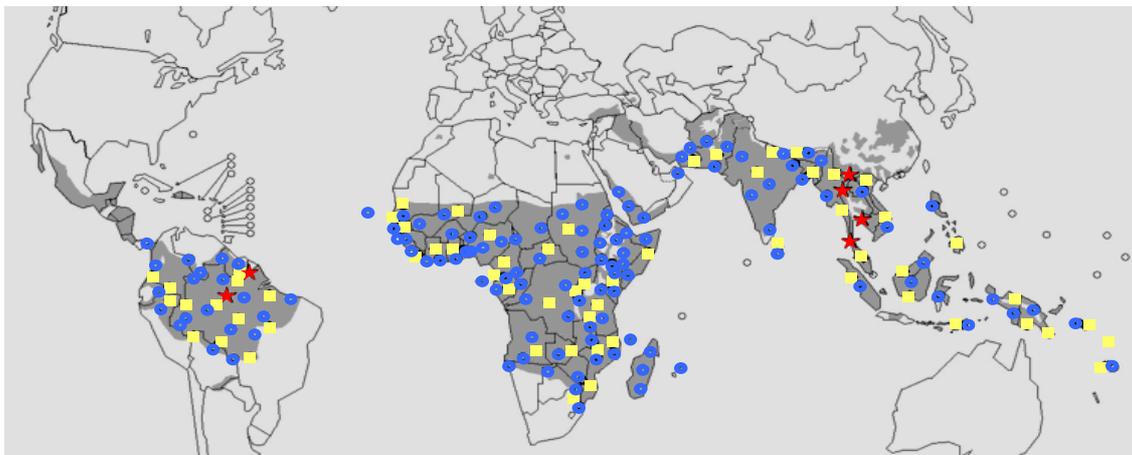
Entwicklung von Methoden, um die Prävalenz dieser Mutationen zu untersuchen. Die Bestimmung spezifischer Genotypen erfolgt entweder über allelspezifische PCR oder als Kombination von PCR und Restriktions-Fragment-Längen-Analyse (PCR-RFLP). Bei allelspezifischer PCR sind die eingesetzten Primer entweder für den Wildtyp oder die Mutation spezifisch und ein Produkt entsteht nur, wenn DNA-Vorlage und Primer vollständig übereinstimmen. Diese Methode verlangt eine strenge Optimierung, um Unterschiede von einem Nukleotid zu detektieren. Bei der PCR-RFLP-Analyse werden die relevanten Genabschnitte unabhängig vom Genotyp amplifiziert und anschließend mit verschiedenen Enzymen verdaut, die spezifisch nur den Wildtyp oder die Mutation schneiden. Dadurch ist die Methode robuster, schnell etablierbar und für Analysen großer Probenmengen geeignet. Der große Vorteil dieser Methode liegt in der einfachen Bereitstellung der zu untersuchenden Proben auf Filterpapier.

Die Aussagekraft von molekularen Resistenzmarkern wurde durch Genotypisierung von Proben aus Sensitivitätsstudien und Vergleich mit *in-vivo*-Ergebnissen untersucht. Obwohl nicht in allen Feldstudien eine eindeutige Korrelation zwischen *in-vivo*-Ergebnis und Genotyp des Parasiten nachweisbar war, konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz resistenzassoziierter Mutationen ein wertvolles Mittel ist, um Vorhersagen über die mögliche Effektivität einer Malariatherapie zu treffen [12,13,18,39,40]. Im Rahmen regelmäßiger Untersuchungen molekularer Resistenzmarker in einem Studiengebiet können die Ergebnisse als Frühwarnsystem für Veränderungen der Resistenzsituation genutzt werden. Weiterhin können auch Resistenzentwicklungen von Substanzen verfolgt werden, die nicht mehr zur Therapie eingesetzt werden. Als Fernziel kann der Ersatz von *in-vivo*-Sensitivitätsstudien durch molekularbiologische Methoden für die regelmäßige Überwachung der Resistenzsituation in Endemiegebieten formuliert werden.

#### **1.4.5. Verbreitung von Resistenzen gegen Antimalariamittel**

Resistenzen von *Plasmodium falciparum* sind gegen fast alle Standardtherapeutika beschrieben, wobei die geographische Verbreitung je nach Medikament stark variiert. Abbildung 3 zeigt die weltweite Verteilung von resistenten Stämmen.

**Abbildung 3:** Medikamentenresistenz gegen *Plasmodium falciparum*



Quelle: WHO

- Chloroquin Resistenz
- Sulfadoxin/Pyrimethamin Resistenz
- ★ Multi-resistenz gegen Mefloquin, teilweise verminderte Sensitivität zu Chinin

Chloroquinresistenz tritt heute in allen Malaria-endemischen Gebieten auf, mit Ausnahme von Mittelamerika und den Karibischen Inseln. Ende der 50iger Jahre wurde sie erstmals sowohl in Asien an der thailändisch-kambodschanischen Grenze als auch in Kolumbien beschrieben. In Afrika wurden 1978 die ersten Resistenzen entdeckt.

Resistenz gegen Sulfadoxin/Pyrimethamin wurde erstmals Ende der 60iger Jahre an der thailändisch-kambodschanischen Grenze entdeckt. Heute findet man in großen Teilen Südostasiens, Südchinas und im Amazonasbecken hochgradige Resistenz. In Afrika beobachtet man seit Ende der 80iger Jahre eine abnehmende Sensitivität gegen Sulfadoxin/Pyrimethamin, die sich von Ostafrika nach Westafrika ausdehnt mit unterschiedlicher Intensität in den einzelnen Ländern.

Mefloquinresistenz wurde zuerst in den späten 80iger Jahren an der thailändisch-kambodschanischen Grenze beobachtet. Einige Fälle von Mefloquinresistenz wurden auch aus dem Amazonasbecken berichtet, aber Grad und Verbreitung sind weit geringer als in Südostasien.

Klinische Resistenz zu Chinin wird seit den 60iger Jahren vor allem von der thailändisch-kambodschanischen Grenze berichtet, wo Chinin seit dem nur noch in Kombination mit einem Antibiotikum verabreicht wird. Resistenz zu Chinin-Monotherapie tritt heute sporadisch in Südostasien und Westozeanien auf.

#### 1.4.6. Wirkmechanismus und Resistenz der Chinoline

Eines der ältesten bekannten Mittel zur Behandlung von Malaria ist Chinin aus der Rinde des südamerikanischen Chinarindenbaumes (*Cinchona*). Chinarinde wurde im 17. Jahrhundert in Europa eingeführt, 1820 wurde das Alkaloid Chinin aus der Rinde isoliert. Chinin wirkt auf das intraerythrozytäre Stadium der Erreger und zusätzlich fiebersenkend. Es ist Mittel der Wahl bei komplizierter Malaria.

Chloroquin, ein 4-Aminochinolin-Derivat von Chinin, wurde in Deutschland synthetisiert und wird seit den 40iger Jahren weltweit als Mittel der ersten Wahl bei unkomplizierter Malaria eingesetzt. Weitere dem Chloroquin verwandte Substanzen sind Amodiaquin zur Behandlung der unkomplizierten Malaria und Primaquin, ein 8-Aminochinolin, das zur Eradikationstherapie von *Plasmodium vivax* und *ovale* verwendet wird. Dem Chinin verwandt sind weiterhin Mefloquin, ein 4-Chinolinmethanol zur Behandlung der unkomplizierten Malaria, Halofantrin, das wegen kardiotoxischer Nebenwirkungen nur noch begrenzt eingesetzt wird sowie Lumefantrin.

Der Wirkmechanismus der ältesten Klasse von Malariamedikamenten ist auch heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Gesichert ist, dass die Chinoline im Lysosom der Parasiten akkumulieren und dort mit dem Hämoglobinabbau interferieren. Man nimmt an, dass sie durch Komplexbildung mit Ferriprotoporphyrin IX die Polymerisation zum unschädlichen  $\beta$ -Hematin und die Ablagerung im Malariapigment hemmen. Durch freies Ferriprotoporphyrin IX kommt es dann zu oxidativer Schädigung des Parasiten. Diskutiert wird auch eine Hemmung des GSH-abhängigen Hämabbaus [23,56,60,91].

Resistenzen gegen Chloroquin entwickelten sich sehr langsam (nach ca 12 Jahren [100]), was auf einen komplexen, multifaktoriellen Mechanismus hinweist. Chloroquin-resistente Parasiten zeigen verminderte Akkumulation von Chloroquin im Lysosom. In Analogie zu Krebszellen fokussierten Resistenzuntersuchungen auf ein „multi drug resistance“ (*mdr*)-Gen des Parasiten. *Pfmdr* 1 kodiert für ein Protein (Pgh 1), das auf der lysosomalen Membran lokalisiert ist. Mutationen am Kodon 86, 184, 1042 und 1246 von *Pfmdr* 1 wurden mit Chloroquinresistenz assoziiert. Korrelationen mit *in-vivo*-Daten wurden in einigen Studien beschrieben [18,28,63,88,102], in anderen aber nicht bestätigt [10,19,59,61]. Stärkere Assoziation mit *in-vivo*-Resistenz zeigen Mutationen am *Pfcrt*-Gen, das für ein Transportprotein in der Lysosomenmembran kodiert. Vor allem der Ersatz von Lysin durch Threonin am Kodon 76 scheint zu einer Grundresistenz zu führen, die dann durch Mutationen am *Pfmdr*-Gen moduliert wird [18,72]. Man nimmt an, dass Mutationen am *Pfcrt* zu einem stärkeren Export von Chloroquin aus der Vakuole führen und gleichzeitig

pH-Veränderungen bewirken. Der daraus resultierende Verlust an „Fitness“ der mutierten Parasiten könnte durch eine zusätzliche Mutation am Kodon 86 der *Pfmdr*-Gens teilweise ausgeglichen werden.

### **1.4.7. Wirkmechanismus und Resistenz der Antifolate**

Kombinationspräparate aus einem Sulfonamid-Antibiotikum und einem Dihydrofolatsäure-Inhibitor werden seit den 60iger Jahren zur Behandlung der unkomplizierten Malaria eingesetzt. Häufige Kombinationen sind Sulfadoxin/Pyrimethamin (Fansidar®), Sulfalen/Pyrimethamin, Sulfamethoxazol/Trimethoprim (Cotrimoxazol) und Chlorproguanil/Dapson (Lapdap).

Antifolate hemmen die Synthese von Tetrahydrofolat, einem Cofaktor für den Transport von C1-Molekülen, der essentiell ist für die Synthese von Purinbasen (dTMP) und Proteinen (Methionin). Im Unterschied zum Menschen können Plasmodien aufgenommene Folsäure nicht verwerten und sind auf *de novo* Synthese angewiesen.

Sulfonamide und Sulfone sind Analoga von p-Aminobenzoesäure und wirken als kompetitive Inhibitoren der Dihydropteroatsynthase (DHPS), einem Schlüsselenzym der Biosynthese von Folaten. Inhibitoren der Dihydrofolatreduktase (DHFR) hemmen die Umwandlung von Dihydrofolat in Tetrahydrofolat. Zu dieser Gruppe gehören Biguanide und Diaminopyrimidine wie Pyrimethamin, Chlorproguanil und Trimethoprim. DHFR- und DHPS-Inhibitoren wirken synergistisch und werden in Kombination eingesetzt.

#### **Resistenz gegen DHFR-Inhibitoren**

Medikamentenresistenz von *P. falciparum* gegen Pyrimethamin ist mit Punktmutationen auf dem *dhfr*-Gen assoziiert worden. Es konnte gezeigt werden, dass ein Aminosäurewechsel an Position 108 von Serin zu Asparagin zu ausgeprägter Resistenz gegen Pyrimethamin führt und mit leicht abgeschwächter Wirkung von Cycloguanil assoziiert ist. Dagegen scheint der Wechsel zu Threonin an Position 108 gemeinsam mit der Mutation an Position 16 von Alanin zu Valin zu einer Resistenz gegen Cycloguanil zu führen. Weitere Mutationen an den Positionen 51 (Asn->Ile), 59 (Cys->Arg) und 164 (Ile->Leu) verstärken die Ausbildung eines resistenten Phänotyps. Vierfach-Mutationen zeichnen sich durch verstärkte Resistenz gegen Biguanide und Diaminopyrimidine aus [71].

#### **Resistenz gegen DHPS-Inhibitoren**

Untersuchungen *in vitro* zeigten, dass Resistenzen gegen DHPS-Inhibitoren über Punktmutationen im für DHPS kodierenden Gen *dhps* vermittelt wird. Mutationen, die an

folgenden Positionen zu Aminosäurewechsell am Enzym führen, sind mit *in-vitro*-Resistenz gegen Sulfonamide verbunden: 436 (Ser/Ala->Phe), 437 (Ala->Gly), 540 (Gly->Lys), 581 (Ala->Gly) und 613 (Ala->Thy/Ser). Dabei zeigt sich ein kumulativer Effekt der Mutationen auf die Erhöhung des IC<sub>50</sub>. Als dominante Mutation scheint sich, wenn auch nicht so deutlich wie bei *dhfr*, der Wechsel an Position 437 herauszustellen [71].

#### **1.4.8. Wirkmechanismus von Antibiotika**

Tetracyclin und Derivate werden zur Prophylaxe und in Kombination mit z.B. Chinin zur Behandlung der Malaria eingesetzt. Als Angriffsort wird der Apicoplast beschrieben, ein Zellorganell mit einem zirkulären 35 kb Plastid und prokaryotischem Transkriptions- und Translationssystem. Untersuchungen auf der Ebene der t-RNA zeigten unter Medikamentenwirkung verminderte t-RNA-Spiegel von mitochondrial kodierten Genen (Cytochrom-Oxidase I, Cytochrom b) und plastid-kodiertem RNA-Polymerase-Gen [44].

#### **1.4.9. Wirkmechanismus von Artemisinin und Derivaten**

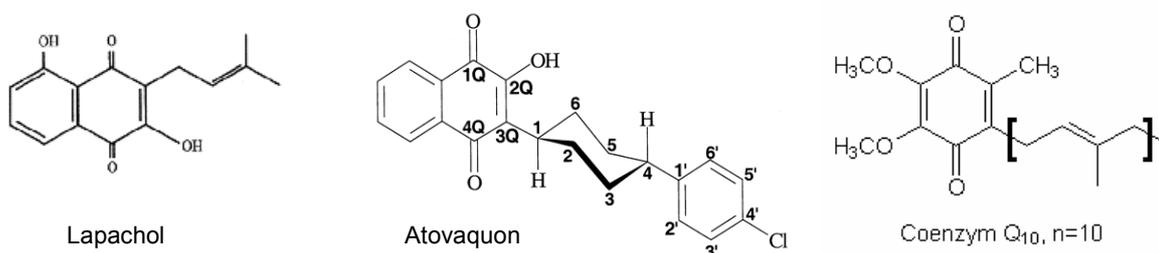
Pflanzenauszüge von *Artemisia annua* (Quingasu) wurden in China traditionell zur Behandlung von Malariaerkrankungen eingesetzt. Als wirksame Komponente wurde Artemisinin, ein Sequiterpenlaktone, isoliert. Artemisinin und deren Derivate (Artesunate, Arteether, Artemether) werden zur Behandlung der komplizierten Malaria eingesetzt und zeichnen sich durch schnelle antiparasitäre Wirkung aus. Artemisinin-Derivate wirken auf alle Blutstadien der Malariaerregers einschließlich der Gametozyten. Sie sind aber nicht hypnozoizidal [64]. In Deutschland ist die Kombination von Artemether/Lumafantrine (Riamet®) zur Behandlung der unkomplizierten Malaria zugelassen.

Artemisinin und seine Derivate sind Endoperoxide und verfügen über eine intramolekulare Peroxidbrücke. Bei der Aktivierung der Substanzen im Lysosom durch Eisen im Hämkomplex kommt es zur Spaltung der Peroxidbrücke und Entstehung von alkylierenden Radikalen. Diese führen durch Alkylierung von Proteinen und Membranbestandteilen zur irreparablen Schädigung der Zelle. Resistenzen gegen Artemisinin und dessen Derivate wurden noch nicht beschrieben. Allerdings weisen *in-vitro*-Tests von Isolaten aus der Grenzregion China/Laos und China/Myanmar auf abnehmende Sensitivität hin [101].

### 1.4.10. Wirkmechanismus und Resistenz von Atovaquon

Atovaquon ist ein Hydroxynaphtochinon, das in Europa in Kombination mit Proguanil als Malarone® zur Therapie und Prophylaxe der unkomplizierten Malaria zugelassen ist. Atovaquon (2-[trans-4-(4'-chlorophenyl)cyclohexyl]-3-hydroxy-2,4-naphtochinon) ist von einem Naturstoff abgeleitet. Lapachol, der Inhaltsstoff des Indischen grünen Teebaumes, ist wie Atovaquon ein 2-Hydroxynaphtochinon und zeigt antiparasitäre Wirkung. Die Antimalarialwirkung von Naphtochinonen wurde bereits Ende der 40iger Jahre beschrieben. Darauf aufbauend entwickelten die Wellcome Laboratories in den 80iger Jahren den Wirkstoff Atovaquon. In *in-vitro*-Studien zeigte sich eine breite antiparasitäre Wirkung unter anderem gegen *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium* species. Atovaquon wirkt auf die Blutformen des Malariaerregers, zeigt sich aber auch effektiv gegen präerythrozytäre Stadien (Leberformen), Sexualformen und Insektenstadien des Parasiten [3,15,16,27,29].

**Abbildung 4:** Chemische Struktur von Lapachol, Atovaquon und Ubichinon



Untersuchungen zum Wirkmechanismus ergaben eine Hemmung des mitochondrialen Elektronentransportes sowie einen Kollaps des Membranpotentials durch Atovaquon<sup>[30,76]</sup>. Aufgrund dieser Beobachtungen und der Strukturverwandtschaft zu Ubichinon wurde ein Angriff am Cytochrom b postuliert. Für Inhibitoren mit ähnlicher Struktur, wie z.B. Stigmatellin, wurde gezeigt, dass sie an der Ubihydrochinon (Q<sub>0</sub>)-Bindungsstelle des Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Komplexes angreifen und den Elektronentransport hemmen. Punktmutationen an der Q<sub>0</sub>-Bindungsstelle führen zu Resistenzen bei verschiedenen Mikroorganismen<sup>[17]</sup>. Für *Pneumocystis carinii* wurden 2 Mutationen im Bereich der Q<sub>0</sub>-Bindungsstelle beschrieben, die mit Therapieversagen von Atovaquone assoziiert sind<sup>[90]</sup>. Bei *in vitro* resistenten *Toxoplasma gondii* Stämmen wurden Mutationen am Kodon 129 und 254 beschrieben, die zu Atovaquonresistenz führen. Atovaquon resistente Stämme von *Plasmodium yoelii* wurden durch Behandlung von infizierten Mäusen mit

subtherapeutischen Dosen von Atovaquon erhalten. Alle resistenten Stämme wiesen einfache oder doppelte Punktmutationen in der Nähe der Q<sub>0</sub>-Bindungsstelle auf, unter anderem eine Substitution von Tyrosin durch Cystein am Kodon 268 [75]. Bei einer ähnlichen Studie mit *Plasmodium berghei* wurden 3 Mutationen beschrieben, die mit Resistenz zu Atovaquon verbunden waren. Ein Aminosäurewechsel an Position 133 oder 144 zusätzlich zu einer Mutation am Kodon 284, führte zu erhöhtem Resistenzniveau [79]. Bei einem thailändischen Patienten mit Therapieversagen nach Behandlung mit Atovaquon und Pyrimethamin wurde ein Aminosäurewechsel am Kodon 268 des Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Komplexes von Tyrosin zu Serin nachgewiesen. Das Isolat zeigte *in vitro* eine 10.000fache Erhöhung der IC<sub>50</sub> gegenüber einem sensitiven Referenzstamm [43,47].

### **1.5. Malarone®: ein neues Kombinationspräparat zur Prophylaxe und Therapie der unkomplizierten *Malaria tropica***

Malarone® ist ein Kombinationspräparat aus 2 Malariamedikamenten mit unterschiedlichem Wirkmechanismus (Atovaquon und Proguanil). Seit 1997 ist Malarone® zur Therapie der unkomplizierten Malaria zugelassen. Im Mai 2001 wurde die Zulassung auch auf die Prophylaxe erweitert. Damit stellt Malarone eine gut verträgliche Alternative zu Lariam® (Mefloquin) für Reisen in Gebiete mit hochgradiger Medikamentenresistenz dar. Es wird weiterhin als „stand by“-Medikament bei Reisen in Gebiete mit geringem Malariarisiko empfohlen.

Die Wirksamkeit für die Behandlung der unkomplizierten Malaria wurde in mehreren Studien belegt. Wenn Atovaquon als Monotherapie verwendet wird, kommt es initial zu einem erfolgreichen Therapieergebnis. Allerdings wurden bei 1/3 der behandelten Patienten Rekrudeszenzen festgestellt [47]. Um die Heilungsrate zu verbessern, wurden Kombinationstherapien mit verschiedenen Antimalariamitteln getestet. Zur Auswahl eines geeigneten Partners wurden Interaktionen verschiedener Kombinationen *in vitro* untersucht, wobei Proguanil und Tetracyclin synergistische Wirkung mit Atovaquon zeigten [8]. In anschließenden Sensitivitätsstudien *in vivo* wurden mit der Kombination Atovaquon/Proguanil Heilungsraten von 99-100% erreicht, wobei es sich in verschiedenen Endemiegebieten und Altersgruppen als wirksam erwies [1,7,46,48,52]. Studien zur Wirksamkeit als Prophylaxemittel wurden sowohl in Afrika als auch bei nichtimmunen Reisenden aus Europa durchgeführt. Dabei zeigte Malarone® eine Wirksamkeit von 95-100% [37,45,55,78].

Trotz synergistischer Wirkung der Kombination wurden beim Menschen bisher 4 Therapieversager mit Atovaquon/Proguanil beschrieben. Ein Austausch von Tyrosin durch Asparagin am Kodon 268 des Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Gens wurde bei einem Malariapatienten in England beschrieben, der nach seiner Rückkehr aus Nigeria mit Malarone® (Atovaquon/Proguanil) behandelt wurde und 4 Wochen später Rekrudeszenzen zeigte. Von 2 Patienten in Göteborg mit Therapieversagen nach 3 bzw. 28 Tagen konnte nur bei einem Fall mit spätem Therapieversagen eine Mutation am Kodon 268 nachgewiesen werden mit Austausch von Thyrosin durch Serin [25].

## **2. Problemstellung und Zielsetzung**

Bei zunehmender Resistenz von Malariaerregern gegen Standardtherapeutika ist eine genaue Kenntnis der Resistenzlage Voraussetzung sowohl für eine adäquate Therapie der Bevölkerung im Endemiegebiet als auch für die Therapie und Prophylaxe von Reisenden in Endemiegebiete. Neben *in-vivo*-Sensitivitätsstudien werden auch vermehrt molekularbiologische Methoden eingesetzt, um Entwicklungen der Resistenzlage zu überwachen und Änderungen, die Therapieanpassungen erfordern, frühzeitig zu erkennen.

### **2.1. *In-vivo*-Resistenzstudien in Laos**

Ziel dieser Studie war es, die Effektivität der empfohlenen Malariatherapie in 2 Endemiegebieten in Laos zu testen. Obwohl Berichte aus benachbarten Ländern Multiresistenzen gegen die gebräuchlichsten Malariamedikamente aufzeigen, liegen kaum Daten zur Wirksamkeit der verwendeten Medikamente vor. Keine Alternativtherapien wurden bisher getestet, falls ein Wechsel der Standardtherapie nötig wäre. Daher sollte im Rahmen dieser Untersuchungen neben den Mitteln der Wahl, Chloroquin und Sulfadoxin/Pyrimethamin, auch die Kombination von Chloroquin und Sulfadoxin/Pyrimethamin sowie Mefloquin getestet werden.

Das genetische Material der Isolate, das als Blutproben auf Filterpapier erhalten wurde, sollte für Genotypisierungsreaktionen zur Verfügung stehen. Speziell war die Evaluierung eines neu zu etablierenden Resistenzmarkers geplant.

### **2.2. Resistenzmarker für die Therapie mit Atovaquon/Proguanil (Malarone®)**

Atovaquon/Proguanil ist ein Kombinationspräparat, das einerseits im Rahmen der Reisemedizin zur Malariaprophylaxe verwendet wird aber auch zur Behandlung von Reiserückkehrern mit unkomplizierter *falciparum* Malaria. Erste Resistenzen nach Malarone®-Behandlung wurden bereits beschrieben und mit Mutationen auf dem Cytochrom b Gen assoziiert. Zur Untersuchung resistenzassoziierter Mutationen sollten *in-vitro*-Resistenzen induziert und die relevanten Genabschnitte anschließend sequenziert werden. Diese Daten wurden mit bekannten Mutationen nach Therapieversagen *in vivo* verglichen. Im Verlauf der Arbeit wurde im Institut in München eine klinische Resistenz zu Atovaquon/Proguanil diagnostiziert und dieses Isolat mit in die Untersuchungen eingeschlossen. Das Ziel war die Identifizierung von Schlüsselmutationen, die für das Auftreten von Resistenzen verantwortlich sind, und der Aufbau einer Methodik, beruhend

auf PCR und Restriktionsfragmenlängenanalyse (PCR-RFLP), zur schnellen und sicheren Analyse von molekularen Resistenzmarkern für die Behandlung mit Atovaquon/Proguanil. Die Evaluierung der Methode sollte anhand der Feldisolate aus Laos erfolgen, wobei gleichzeitig Aussagen über die Prävalenz der identifizierten Mutationen in Regionen ohne spezifischen Medikamentendruck erwartet wurden.

### **3. *Material und Methoden***

#### **3.1. *in-vivo-Sensitivitätsstudie***

##### **3.1.1. *Studiengebiet***

Die Demokratische Volksrepublik Laos befindet sich in Südostasien und wird durch den Mekong im Westen und Gebirgszüge im Norden und Osten dominiert. Das Land hat eine Fläche von 236.800 km<sup>2</sup> und ist in 18 Provinzen geteilt. Studiengebiete waren die Provinzen Attapeu und Luang Namtha. Für beiden Regionen lagen bisher keine Daten zur Resistenzlage bei Malariatherapie vor.

Die Provinz Attapeu mit ca. 95.000 Einwohnern befindet sich im Südosten des Landes und grenzt an Vietnam und Kambodscha. Während der Regenzeit sind große Flächen überflutet und nur Dörfer an der Hauptstraße erreichbar. Obwohl Verteilungsprogramme für Moskitonetze existieren, wurden hier in einigen Dörfern bis zu 20% positive Malariaausstriche diagnostiziert. Malariaerkrankungen treten saisonal auf mit einem Höhepunkt im Juli/August während der Regenzeit.

Luang Namtha liegt im Nordwesten des Landes mit Grenzen zu China (Yunnan Provinz) und Myanmar. Die ca. 130.000 Einwohner gehören etwa 30 verschiedenen ethno-linguistischen Gruppen an. Außer dem flußreichen Distrikt Nale ist diese Region überwiegend gebirgig und die Studiendörfer lagen auf 1000 – 2000 m Höhe. Malariaübertragung findet ganzjährig statt mit einem Höhepunkt während der Regenzeit.

##### **3.1.2. *Protokoll der Sensitivitätsstudien***

Die Studien wurden durchgeführt auf Grundlage des WHO Protokolls „Assessment of therapeutic efficacy of antimalarial drugs for uncomplicated malaria“ für Gebiete mit niedriger oder mittlerer Malaria Übertragung (Draft March 2001). In Absprache mit dem Gesundheitsministerium in Laos wurde eine variierte Version speziell für die Bedingungen in Laos erstellt.

**Einschlusskriterien:** Alter ab 1 Jahr

*Plasmodium falciparum* Monoinfektion

Initiale Parasitendichte von mindestens 1.000 asexuellen Parasiten/ $\mu$ l

Fieber in der Vorgeschichte

Fieber (axillar) < 39,5°C

Kann über 14 Tage verfolgt werden

Schriftliche Einwilligung zur Studie

**Ausschlusskriterien:** Schwangerschaft

Initiale Parasitendichte von mehr als 50.000 Parasiten/ $\mu$ l, während der Studie auf 100.000 erhöht

Andere fiebrige Erkrankungen außer Malaria

Mischinfektionen mit anderen *Plasmodium* Spezies

Anzeichen von schwerer oder zerebraler Malaria (wie im Protokoll aufgeführt)

Andere Symptome einer schweren Erkrankung (wie im Protokoll aufgeführt)

**Screening und Diagnostik**

Von jedem Patienten wurden folgende Daten aufgenommen: Name, Alter, Geschlecht, Körpertemperatur (axillar), Fieber in der Vorgeschichte, eingenommene Medikamente, vor allem Malariamittel (Tablettenanzahl und Einnahmedauer). Das Screening erfolgte mit dem Malaria Schnelltest Paracheck (Orchid, Indien). Dieser immuno-chromatografische Test beruht auf dem Nachweis von *P. falciparum histidine-rich protein II* (HRP-II) im Kapillarblut. Gleichzeitig wurde von jedem Patienten ein Objektträger mit Ausstrich und dickem Tropfen angefertigt. Der Ausstrich wurde mit Methanol fixiert, getrocknet und anschließend gemeinsam mit dem dicken Tropfen mit Giemsa (5%, pH 7,2) 30 Minuten gefärbt. Die Parasitämie wurde bestimmt durch Auszählen der asexuellen Parasiten gegen die Anzahl der Leukozyten im dicken Tropfen. Die Berechnung basiert auf der angenommenen mittleren Leukozytenkonzentration von 8000 Leukozyten/ $\mu$ l. Die Anzahl der asexuellen Parasiten wurde gegen 200 Leukozyten ermittelt. Bei einer Parasitenzahl < 10 wurde weitergezählt bis 500 Leukozyten erreicht wurden. Die Parasitämie wurde mit folgender Formel berechnet:

Parasitämie (pro  $\mu$ l) = Anzahl der Parasiten x 8000 / Anzahl der Leukozyten.

Für spätere molekularbiologische Untersuchungen wurde von *P. falciparum* positiven Patienten eine Blutprobe (4-6 Tropfen) auf Filterpapier gegeben, getrocknet und einzeln in verschließbaren Plastiktüten verpackt. Während der Studie in Attapeu wurden zusätzlich am Provinz-Krankenhaus sowie am Distrikt-Krankenhaus in Xaisettha Serumproben genommen. Die Kodierung der Proben erfolgte über die Screeningnummer (PatID). Diese Nummern setzten sich zusammen aus einem Buchstaben, der für den entsprechende Distrikt kodiert und einer fortlaufenden 3stelligen Nummer beginnend mit 001 (z.B. H001 für Attapeu Provinz-Krankenhaus). Bei Aufnahme der Patienten in die Studie wurde die Screeningnummer übernommen.

### **Behandlung**

Die Zuordnung zum Studienmedikament erfolgte randomisiert mit Hilfe der sogenannten „Briefumschlagmethode“. Die Reihenfolge der Studienmedikamente wurde vor Beginn per Zufall ermittelt. Ein Aufkleber mit dem Namen des entsprechenden Medikamentes wurde in einen Briefumschlag getan, die Umschläge verschlossen und der Reihe nach numeriert. Wurde ein neuer Patient aufgenommen, so wurde der nächste Umschlag geöffnet und das entsprechende Medikament verabreicht.

Die Dosierung der Studienmedikamente erfolgte nach Körpergewicht. Für alle Medikamente wurden detaillierte Dosierungslisten erstellt. Chloroquin war auch als Sirup vorhanden, alle anderen Tabletten für Kinder wurden zerdrückt und mit Zucker verabreicht.

**Tabelle 2:** Dosierung der Studienmedikamente in mg pro kg Körpergewicht

Studienmedikament	Dosierung pro kg Körpergewicht	
Chloroquin (CQ) Tabletten/Sirup	Tag 0	10 mg/kg
	Tag 1	10 mg/kg
	Tag 2	5 mg/kg
Sulfadoxin/Pyrimethamin (S/P)	Tag 0	1,25 mg Pyrimethamin + 25 mg Sulfadoxin
CQ + S/P	Tag 0	10 mg/kg Chloroquine + S/P equivalent 1,25 mg Pyrimethamin + 25 mg Sulfadoxin
	Tag 1	10 mg/kg Chloroquine
	Tag 2	5 mg/kg Chloroquine
Mefloquin (MQ)	Tag 0	15 mg/kg
	Tag 1	10mg/kg

### ***Follow-up***

Alle Studienpatienten wurden über 14 Tage verfolgt. Eine ärztliche Untersuchung mit Fiebermessung erfolgte an den Tagen 1, 2, 3, 7, und 14; mikroskopische Blutuntersuchungen an den Tagen 2, 3, 7 und 14. Alle klinischen und parasitologischen Befunde wurden in der Patientenakte (*patient record form*) dokumentiert. Der Anteil an Patienten, die nicht bis zum Ende verfolgt werden konnten („drop-out“), sollte 10% nicht übersteigen. Unter folgenden Bedingungen wurden Patienten nicht als „drop-out“, sondern als Ausschluss klassifiziert:

Rücknahme des Einverständnisses

Wohnortwechsel vom Studienort fort

Administration von Malariamedikamenten während der Nachverfolgung von 3. Seite  
Diagnose einer Mischinfektion mit anderer Plasmodium Spezies während der Nachverfolgung

### ***Klassifikation der therapeutischen Ergebnisse***

Die therapeutische Antwort wurde in folgende Kategorien eingeteilt:

#### ***Frühe Therapieversager „Early treatment failure“ (ETF):***

Parasitendichte an Tag 2 > als an Tag 0

Parasitendichte an Tag 3 >25% von Tag 0

Parasitämie an Tag 3 mit Fieber >37.5°C

#### ***Späte klinische Therapieversager „Late clinical failure“ (LCF):***

Symptome schwerer Malaria bzw. andere ernste Symptome nach Tag 3 bei vorhandener Parasitämie

Vorhandene Parasitämie mit Fieber >37.5°C zwischen Tag 4 und Tag 14, ohne die Kriterien für ETF zu erfüllen

#### ***Späte parasitologische Therapieversager „Late parasitological failure“ (LPF):***

Vorhandene Parasitämie an den Untersuchungstagen 7 oder 14 ohne die Kriterien für ETF oder LCF zu erfüllen

#### ***Klinisch und parasitologisch adequates Therapieergebnis „Adequate clinical and parasitological response“ (ACPR):***

keine Parasitämie an Tag 14 und keine Symptome von ETF, LCF oder LPF bis Tag 14.

### ***Alternative Behandlung der Therapieversager***

Das Gesundheitsministerium (CMPE) legte folgende Alternativtherapie fest:

bei schwerer oder komplizierter Malaria      Chinin i.v. oder Artesunate i.m.

Chloroquin Therapieversager	S/P
S/P Therapieversager	Chinin oral oder Artesunate oral
Kombination CQ + S/P	Chinin oral oder Artesunate oral
Mefloquin Therapieversager	Chinin oral oder Artesunate oral

### ***Dateneingabe und Statistik***

Die Dateneingabe und Auswertung erfolgte mit EpiInfo Version 6.04 Software. Für die Studie in Attapeu ist eine Studiendatei mit allen Angaben zu den Studienpatienten vorhanden (Attapeu.rec). In Namtha wurden sowohl Studiendaten (NT.rec) als auch Screeningdaten (NTscreen.rec) aufgenommen. Alle EpiInfo Dateien sind auch als MDB Dateien vorhanden.

## ***3.2. In-vitro-Kultivierung von Plasmodium falciparum***

### ***3.2.1. Kultivierung***

Die Kultivierung der Blutformen von *Plasmodium falciparum* erfolgte nach der Methode von Trager und Jensen <sup>[85]</sup> mit einem Hämatokrit von 5%. Die Kultivierung erfolgte in Kulturflaschen mit 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup> Grundfläche und einem Volumen von 5 bzw. 15 ml Medium. Alle 1-2 Tage wurde ein Ausstrich angefertigt, mit DiffQuick gefärbt und mikroskopisch ausgewertet, um Zustand und Dichte der Kultur zu bestimmen. Gleichzeitig erfolgte ein Mediumwechsel. Die erforderliche Gasatmosphäre von 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 90% N<sub>2</sub> wurde durch Begasung und anschließendes Verschließen der Kulturflaschen gewährleistet. Die Kultur wurde bei einer Parasitämie von 1-5% (Anzahl parasitierter Erythrozyten im Bezug zur Gesamtanzahl an Erythrozyten) gehalten. Das Verdünnen erfolgte mit einer 5%igen Erythrozytensuspension in komplettem Medium.

Kulturen können durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff gelagert werden (Kryokonservierung). Dafür werden mindesten 10 ml Kultur mit einer Parasitämie von 5-10% oder mehr zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Erythrozytensediment zu gleichen Teilen mit Kryoprotektlösung aufgeschwemmt, aliquotiert und im flüssigen Stickstoff versenkt. Zum Auftauen wird das Stabilat vorsichtig im Wasserbad bei 37°C erwärmt, in 3,5%iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt, zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment 2 mal mit komplettem Medium gewaschen und zu einer 5%igen Erythrozytensuspension gegeben.

### **3.2.2. Resistenzinduktion**

Die Resistenzinduktion folgte einem stufenweisen Protokoll in Anlehnung an Korsinczky et al, 2000<sup>[43]</sup> mit kontinuierlich ansteigenden Konzentrationen an Atovaquon bzw. Atovaquon/Cycloguanil im Kulturmedium. Die Substanzen wurden in sterilem Wasser gelöst und die Stammlösung bei -20°C gelagert. Daraus wurde bei jedem Mediumwechsel eine frische, wirkstoffhaltige Mediumlösung hergestellt. Für die Kombination Atovaquon/Cycloguanil wurden die Substanzen im Verhältnis 8,33:1 (m/m) zugegeben. Als Ausgangsstamm wurde der Laborstamm K1 (Thailand) verwendet, welcher Resistenzen gegen Sulfadoxin, Pyrimethamin und Chloroquin aufweist <sup>[84]</sup>. Die Ausgangskultur wurde bei etwa 2% Parasitämie in 8 Kulturflaschen aufgeteilt und bis zu einer Parasitämie von ca. 5% kultiviert. Eine der Flaschen wurde als Elternstamm kryokonserviert sowie einige µl auf Filterpapier aufbewahrt. Von den übrigen Flaschen wurde eine als unbehandelte Kontrolle weitergeführt. Je 3 Kulturflaschen wurden mit Atovaquon bzw. Atovaquon/Cycloguanil behandelt. Es wurde mit einer Konzentration von  $5 \times 10^{-9}$  M Atovaquon begonnen. Wenn die Kultur nach anfänglicher Schwächung wieder normale Morphologie und Wachstumszyklen zeigte und über 2 Wochen stabil war, erfolgte eine Erhöhung der Medikamentenkonzentration im Medium in den Schritten  $1 \times 10^{-8}$ ,  $2 \times 10^{-8}$ ,  $5 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $2 \times 10^{-7}$  M. Nach jedem Schritt wurde jeweils eine Flasche kryokonserviert sowie Filterpapierproben erhalten, eine Flasche mit der letzten Konzentration weitergeführt bis mit der nächst höheren Konzentration eine stabile Kultur erhalten wurde sowie 3 Flaschen mit der nächsten Konzentrationsstufe kultiviert.

### **3.3. Molekularbiologische Methoden**

#### **3.3.1. DNA-Extraktion**

Als Ausgangsmaterial für die DNA-Extraktion dienten Blutproben (5-10 µl) auf Whatman Filterpapier, die getrocknet wurden und auch bei längerem Transport haltbar sind. Von jeder Probe wurde ein ca. 5 mm großer Kreis ausgeschnitten. Die DNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe einer chelatbildenden Matrix (InstaGene<sup>TM</sup>Matrix). Zu einem Blutspot auf Filterpapier wurden 200 µl Matrixsuspension gegeben, die Mischung 30 Sekunden gevortext und für 10-15 Minuten bei 100°C auf dem Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde 2 Minuten bei 12.000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und erneut 2 Minuten bei 12.000 U/min zentrifugiert, um Reste der Matrix zu beseitigen. Der Überstand enthielt die extrahierte DNA und wurde bei -20°C aufbewahrt.

### 3.3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Sie wurde verwendet für die Sequenzierung und zur Mutationsanalyse mittels Restriktionsenzymen. Für analytische PCR's wurde Taq Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) eingesetzt, für präparative Zwecke die Pfu Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*), welche eine Proof-reading-Funktion besitzt.

Für die Sequenzierung des Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Genes wurde ein Genabschnitt entsprechend der der Vorschrift von Korsinczky et al. 2000 [43] amplifiziert.

Ein Reaktionsansatz zu 20 µl setzte sich wie folgt zusammen:

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Primer CYTb 1 (2 µM)	5 µl	1 µM
CYTb 2 (2µM)	5 µl	1 µM
PCR Puffer (10x)	2 µl	1x
dNTP's (je 2 mM)	2 µl	0.2 mM
Pfu Polymerase	0.5 µl	
Aqua dest.	4.5 µl	
DNA-Template	1µl	

Der Ansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und 5 Minuten bei 94°C initial denaturiert. Die Amplifizierung erfolgte in 40 Zyklen mit folgendem Temperaturprofil: 94°C für 50 Sekunden, 45°C für 50 Sekunden, 70°C für 60 Sekunden sowie einer abschließenden Elongationsphase von 70°C für 5 Minuten.

### 3.3.3. Trennung und Nachweis von DNA

Die Trennung und der Nachweis von DNA erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurden in Abhängigkeit von den zu erwartenden Fragmentlängen 1,5 – 3%ige Agarosegele hergestellt. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle bis zur klaren Lösung geschmolzen. Der auf etwa 65°C abgekühlten Lösung wurde Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 0,4 µg/ml) hinzugefügt und das Gel gegossen. 8-10 µl der Proben wurden mit 3 µl DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Als Längenstandard wurden 50 bzw. 100 bp DNA-Marker verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TAE-Puffer bei 60-100 V. Die Detektion

erfolgte unter UV-Licht (302 nm), die fotografierten Gele wurden mit dem Programm GRABBIT ausgewertet und archiviert.

#### **3.3.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion erfolgte mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) entsprechend dem Herstellerprotokoll. Die DNA wurde mit 20 µl 10mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,5 eluiert.

#### **3.3.5. Ligation**

Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR®2.1-TOPO eingefügt. Der Vektor verlangt einen A-Überhang am 3'-Ende des Produktes, der von Taq, nicht aber von Pfu produziert wird. Daher wurden 20 µl DNA-Extrakt mit 1 µl Taq Polymerase, 2 µl PCR-Puffer und 2 µl dNTP's (2 mM) 15 Minuten bei 95°C und 10 Minuten bei 72°C inkubiert. 2 µl der Reaktionslösung wurden sofort anschließend mit 0,5 µl Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,6 M MgCl<sub>2</sub>) und 0,5 µl TOPO Vektor vermischt, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und auf Eis gestellt.

#### **3.3.6. Transformation von *E. coli***

Zur Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli* Zellen (One Shot® TOP10) verwendet. Unter sterilen Bedingungen wurden 2 µl Ligationslösung mit 25 µl kompetenter Zellen vorsichtig vermischt und 15-30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Mischung genau 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad erwärmt („Hitzeschock“) und erneut 2 Minuten auf Eis gestellt. Dann wurden 250 µl SOC-Medium zu der Mischung gegeben und 1 Stunde bei 37°C unter starkem Schütteln inkubiert. Von dieser Suspension wurden 25 µl bzw. 250 µl auf je einer LB-AMP-Agarplatte ausplattiert, die mit 50 µl X-Gal Lösung vorbehandelt wurde. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **3.3.7. Selektion rekombinanter Klone**

Klone mit aufgenommener Fremd-DNA wurden anhand ihrer Koloniefärbung erkannt („Blau-Weiß-Selektion“), die dadurch entsteht, dass die eingebaute Fremd-DNA den kodierenden Bereich des lacZ-Gens unterbricht und deshalb – im Gegensatz zu Klonen mit Vektor ohne eingebaute Fremd-DNA – keine funktionsfähige Galaktosidase gebildet werden kann. Das zugesetzte X-Gal wird von funktionstüchtiger Galaktosidase zu Galaktose und dem blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-Indol gespalten, so dass Bakterien mit Plasmid ohne eingebaute Fremd-DNA blau erscheinen, während Bakterien mit eingebauter Fremd-DNA farblos (weiß) bleiben.

Die ausgewählten Kolonien wurden zusätzlich durch eine PCR mit den Vektorprimern M13forward und M13reverse auf eingebaute Ziel-DNA überprüft. Die Bakterienzellen wurden mit einer Pipettenspitze in ein PCR-Gefäß übertragen und mit einer Mischung aus 1 µl jedes Primers (20 µM), 10 µl Qiagen Hotstart Master Mix und 10 µl Aqua dest versetzt. Die Amplifizierung erfolgte unter folgenden Bedingungen: 15 Minuten Denaturierung bei 95°C, 30 Zyklen zu 95°C für 30 Sekunden, 55°C für 30 Sekunden und 72°C für 2 Minuten und abschließende Elongation bei 72°C für 2 Minuten. Der amplifizierte Genabschnitt betrug 200 bp Vektorsequenz plus die eingebaute Sequenz von 939 bp. Das PCR-Ergebnis wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

### **3.3.8. Plasmidextraktion**

Zur Herstellung einer Flüssigkultur wurden Zellen einer positiven Kolonie mit einer Pipettenspitze in 20 ml LB-Medium mit 100 mg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 4 ml der Zellsuspension wurden 10 Minuten bei 2000-3000 U/min zentrifugiert und das Pellet direkt zur Plasmid Extraktion verwendet oder bei – 20°C aufbewahrt. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit Silicagelsäulen von Qiagen (QIAprep Spin Plasmid Kit) entsprechend dem Herstellerprotokoll. Die Elution des Plasmids erfolgte mit 50 µl 10mM Tris-HCl Puffer, pH 8,5. Zur Überprüfung der Extraktion wurde 1 µl Eluat in einem 20 µl Ansatz mit 1 µl EcoRI verdaut. EcoRI schneidet 11 bp vor und 6 bp nach der eingebaute Fremd-DNA.

### **3.3.9. Sequenzierung**

DNA wurde mit der Didesoxynukleotid-Methode nach Sanger et al., 1977 sequenziert [66]. Dabei kam der Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix zur Anwendung. Dieser enthält Ampli Taq DNA Polymerase, Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP's) und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP's) im geeigneten Puffer. Wird ein ddNTP eingebaut, kann die Polymerase keine weiteren Nukleotide anhängen und bricht die Reaktion ab. Das passiert statistisch an jeder Position des DNA-Stranges. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt mittels vollautomatischer Kapillar-Elektrophorese (ABI Prism 310 Genetic Analyser). Die 4 mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten ddNTP's werden durch Laserstrahlung angeregt und können so detektiert werden.

Die Sequenzierungs-PCR erfolgte mit den Primer CYTb1, CYTb2, CYTb3 und CYTb4. 0,5 – 2 µl DNA Lösung wurden im 10 µl Reaktionsansatz mit 2 µl Big Dye Lösung, 2 µl Big Dye Puffer und 2 µl Primer (0,8 µM) im Thermocycler amplifiziert (10 Sekunden 96°C, 25 Zyklen: 10 Sekunden 96°C, 5 Sekunden 50°C, 4 Minuten 60°C; anschließend 4°C). Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Ethanol/Natriumacetat-Prezipitation abgetrennt. Zum Reaktionsgemisch wurden 25 µl 96%iges Ethanol und 1 µl einer 3 mM NaAc Lösung, pH 5,2 gegeben und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde die Lösung bei 15.000 U/min 20 Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und der Rückstand mit 170 µl 70%igem Ethanol gewaschen und 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Die präzipitierte DNA wurde in 12 µl Template Suppression Buffer suspendiert, 2 Minuten bei 95°C denaturiert und im Genetic Analyser analysiert. Einige Proben wurden zu MWG (Ebersberg) geschickt und dort sequenziert. Von MWG wurden ABI-Dateien zur Auswertung erhalten.

### **3.3.10. Auswertung der Nukleotidsequenzen und Sequenzvergleich**

Die Auswertung der Nukleotidsequenzen erfolgte mit Seqman Software von DNASTar. Alignments verschiedener Sequenzen wurden mit dem Programm MULTALIGN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/>) durchgeführt [11].

### 3.3.11. Restriktionsenzymverdau

Restriktionsendonukleasen wurden verwendet zur Kontrolle von Plasmiden sowie zum Nachweis von bekannten Punktmutationen. In einem 20 µl Reaktionsansatz wurden ca. 5 µl DNA mit 2 µl 10 x Puffer, 1 U Restriktionsenzym und Aqua dest versetzt. Die Mischung wurde für 2-12 Stunden bei der für das Enzym empfohlenen Temperatur inkubiert (Brutschrank oder Wasserbad). Die Analyse der DNA-Fragmente erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese.

**Tabelle 3:** Restriktionsenzyme mit verwendetem Puffer und Inkubationstemperatur

Enzym	Inkubationstemperatur	Puffer-Nummer
AlwN I	37°C	NEB 4
EcoR I	37°C	NEB EcoR I Puffer
Hind III	37°C	NEB 2
Hinf I	37°C	NEB 2
Nsi I	37°C	NEB Nsi I Puffer
Ssp I	37°C	NEBSsp I Puffer
Tsp509 I	65°C	NEB 1

### 3.3.12. PCR-RFLP Methodik zur Mutationsanalyse

Mit der PCR-RFLP Methodik (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) werden bekannte Punktmutationen nachgewiesen. Mittels PCR wird der zu untersuchende Genabschnitt amplifiziert. Zur Erhöhung der Sensitivität wird eine sogenannte *nested* PCR durchgeführt wurde. Dabei wurde 1 µl DNA-Template in einer ersten PCR amplifiziert. 0,5-2 µl Reaktionsprodukt werden dann in einer zweiten PCR eingesetzt. Das Primerpaar der zweiten PCR bindet innerhalb der Sequenz der ersten Amplifizierung. Dadurch können falsche Amplifikationsprodukte der ersten Runde ausgesondert und die Spezifität erhöht werden. Die doppelte Amplifizierung erhöht die Sensitivität der Methode.

Anschließend wird das PCR-Produkt mit Restriktionsenzymen geschnitten, deren Erkennungssequenz spezifisch nur für den Wildtyp oder eine Mutation ist. Die Detektion erfolgt über die verschiedenen Bandenlängen der geschnittenen oder ungeschnittenen DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese.

### 3.3.13. Analyse von Gensequenzen nach Restriktionsenzymen

Die Analyse von Gensequenzen nach Schnittstellen von Restriktionsenzymen erfolgte mit dem Programm *Restriction Analysis* von TAIR (<http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/RestrictionMapper.pl>).

## 3.4. Material

### 3.4.1 Material für die *in-vivo*-Feldstudie

#### Studienausrüstung:

Personenwaage	
Elektronische Fieberthermometer	Hartmann, Heidenheim
Mikroskop	Olympus
Mechanische Zähler zum mikroskopieren	Diagonal, Münster
Objektträgerboxen für horizontale und vertikale Aufbewahrung	Nunc, Wiesbaden
Giemsa Färbelösung	Merck, Darmstadt
Puffertabletten pH 7,2	Meck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Messzylinder 100 ml	Brand, Wertheim
Transferpipetten Kunststoff 5 ml	Brand, Wertheim
Färbeküvetten Assistent	Karl Hecht AG, Sondheim
Färbegestelle Assistent	Karl Hecht AG, Sondheim
Kurzzeitwecker	Diagonal, Münster
Immersionsöl	Merck, Darmstadt

#### Screening-Verbrauchsmaterial

Einmalhandschuhe	Kimberly-Clark, Belgien
Hämolanzetten steril	Feather, Japan
Tupfer	Hartmann, Heidenheim
Descoderm Desinfektionsspray	D. Schumacher AG, Melsungen
Paracheck Dipstick Tests	Orchid, Indien
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Filterpapier Whatman #917	Whatmann, Maidstone, UK
Butterfly Nadeln BD Valu-Set	BD Helsingborg, Schweden

Monovetten Sarstedt	Sarstedt, Nürnberg
Adapter Sarstedt	Sarstedt, Nürnberg
Kunststoffbeutel mit Verschuß, ca. 5x7 cm	Nunc, Wiesbaden

### **Studienmedikamente**

Chloroquin (Chloroquinphosphat 150 mg Base)	PHARMAMED, Malta
Sulfadoxin/Pyrimethamin (500 mg/25 mg)	PHARMAMED, Malta
Mephaquin® (250 mg Mefloquin)	mepha, Schweiz

**Alle weiteren Medikamente** wurden in Vientiane, Laos erhalten:

Paracetamol Tabletten  
Amoxicillin Tabletten  
Vitamin C Tabletten  
Vitamin B Tabletten  
Artesunate Tabletten  
Artesunate zur Injektion (i.m.)  
Chinin Tabletten  
Chinin zur Infusion  
Dextrose  
Injektionsnadeln steril  
Infusionsbesteck steril

### **Allgemein**

Screeninglisten  
Patientenbögen (record form)  
Patientenkarten  
Aufkleber mit Bezeichnung des Studienmedikamentes  
A5 Briefumschläge  
Dositabellen für Studienmedikamente

### ***3.4.2. Plasmodium falciparum Isolate***

Laborstamm K1	Prof. T. Löscher, München
TN352	TropNetEurop, Dr. Jelinek, München/Berlin
ATVNG01	LSHTM, Dr. Warhurst, London, UK
ATV-2, ATV-3, ATV-4	Dr. Cheng, Melbourne, Australien

### ***3.4.3. Chemikalien, Kits, Lösungen***

#### **Chemikalien**

Agar	Difco, Augsburg
Agarose:	Bioenzyme
Ampicillin	SIGMA, St. Luis, USA
Atovaquon	GlaxoSmith Kline, München
Bromphenolblau	SIGMA, St. Luis, USA
Cycloguanil	Dr. D. Warhurst, London, UK
Diff-Quick Fix	DADE Behring, Marburg
DMSO	SIGMA, St. Luis, USA
DNA-Marker: 50 bp, 100 bp	Invitrogen corporation, San Diego, USA
dNTPs	Qbiogene. Heidelberg
EDTA	SIGMA, St. Luis, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	SIGMA, St. Luis, USA
Ficoll 400	SIGMA, St. Luis, USA
Gentamycin	SIGMA, St. Luis, USA
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco, Augsburg
Hepes	SIGMA, St. Luis, USA
Hypoxanthin	SIGMA, St. Luis, USA
InstaGene™ Matrix	Bio-Rad, München
KCl	Roth, Karlsruhe
MgSO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	SIGMA, St. Luis, USA
NaCl	Merck, Darmstadt

NaHCO <sub>3</sub> 7,5%	Seromed, Berlin
NaOH-Lösung 5 M	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Orange P	SIGMA, St. Luis, USA
RPMI	SIGMA, St. Luis
Sondergas (90% N <sub>2</sub> , 5% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> )	Linde AG, München
Sorbitol (D-Sorbit)	Fluka Chemie, Deisenhofen
Sucrose	SIGMA, St. Luis, USA
Taq Polymerase	Qbiogene, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris/HCl	Merck, Darmstadt
Trypton	Difco, Augsburg
X-Gal	Roth, Karlsruhe

### **Kits**

QIAEX II Gel Extraction Kit	QUIAGEN; Hilden
QIAprep Spin Plasmid Kit	QUIAGEN, Hilden
	QUIAGEN, Hilden
	enthält HotStarTaq DNA Polymerase, PCR Puffer und dNTPs für eine Enkonzentration von 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> and 200 µM von jedem dNTP
BigDye® Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA

### **Puffer**

10 x TAE-Puffer	0,4 M Tris; 0,2 M Natriumacetat, 0,001 M EDTA; pH 7,5
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0

### **Lösungen**

#### Orange-Puffer

Sucrose	4,00 g
Orange G	0,035 g
H <sub>2</sub> O (Aqua dest)	ad 10 ml

### Blaupuffer

Ficoll 400	1,50 g
10% SDS-Lösung	1,00 ml
0,5 M EDTA	2,00 ml
Bromphenolblau	2,60 mg
TE-Puffer	ad 10 ml

X-Gal-Lösung	2,5% 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-Galactopyranosid in DMSO
--------------	---

### Kryoprotektlösung (steril)

Glycerol	280,0 ml
Sorbitol (D-Sorbit)	30,0 g
NaCl	6,50 g
Aqua dest	ad 1000 ml

### Medien

#### LB-Medium (steril)

Hefeextrakt	0.5%
NaCl	1%
Trypton	1%

#### LB-Amp-Agar

Hefeextrakt	0.5%
NaCl	1%
Trypton	1%
Agar	1,5%
Ampicillin	50 µg/ml

#### SOC-Medium

Hefeextrakt	0,5%
Trypton	2%
KCl	2,5 mM
NaCl	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glucose	20 mM

Steriles RPMI-Medium inkomplett

RPMI	10,40 g
Glukose	2,00 g
Gentamycinsulfat	0,05 g
Hepes	5,94 g
Hypoxanthine	0,03 g
Aqua dest	ad 1000 ml

2 Stunden rühren und mit NaOH auf pH 7,2 einstellen, anschließend sterilfiltrieren. Das Medium ist bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mehrere Monate haltbar.

Komplettes Medium

Das sterilfiltrierte Kulturmedium wurde vor Gebrauch mit 10-20% Humanserum (Blutgruppe AB rhes. positive) und 2,8 ml  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung 7,5% versetzt. Dieses Medium war dann ca 1 Woche verwendbar, pH-Änderungen wurden durch Farbumschlag des enthaltenen Indikators nach violett sichtbar.

Humanes Serum

Plasma, Blutgruppe AB, wurde vom Bayerischen Roten Kreuz erhalten. Zur Herstellung von Serum wurde das Plasma in 50 ml Röhrchen aliquotiert, zum Gerinnen mit 0,5 ml einer 1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung versetzt und im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Zur vollständigen Gerinnung wurden die Röhrchen bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht gelagert und anschließend bei 4000 U/min 2 Stunden zentrifugiert. Das Serum wurde bis zum Gebrauch bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Erythrozyten, Blutgruppe AB rhes. Positiv

Frische Erythrozyten, die nicht zur Transfusion geeignet waren, wurden von Bayerischen Roten Kreuz erhalten. Das Erythrozytenkonzentrat wurde 2 mal mit inkompletten und 1 mal mit kompletten Medium gewaschen (2000 U/min, 5 min). Das Konzentrat wurde bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert und 4 Wochen verwendet.

**Oligonukleotide (Primer):** MWG, Ebersberg

Primersequenz 5' -> 3'

---

CYTb1	CTCTATTAATTTAGTTAAAGCACA
CYTb2	ACAGAATAATCTCTAGCACC
CYTb4	ATTTTAAATGCTGTATCATACCCT
CYTb3	AGCAGTAATTTGGATATGTGGAGG
CYTb5	GGTTTACTTGGAACAGTTTTTAACAATG
CYTb6	TGAATGGTACTTTCTACCAGTT
CYTb7	GTACCTGAATGGTACTTTCTACAATAT
CYTb8	TTAGTAATTACAGTTGCACCCCAATgAC
CYTb9	TAGTAATTACAGTTGCACCCCAAAAgC
CYTb10	GCACACTTAATAAAACCCATGTCCAT
CYTb11a	TAGTAATTACAGTTGCACCCCAATCAC
CYTb11b	TAATTACAGTTGCACCCCAACAgC

**Restriktionsenzyme** New England BioLabs, Beverly, USA

AlwN I  
EcoR I  
Hind III  
Hinf I  
Nsi I  
Ssp I  
Tsp509 I

#### **3.4.4. Geräte**

ABI Prism 310 Genetic Analyser	Pekin Elmer, Wellesley, USA
Autoklav Tecnomara	Integra Biosciences Tecnomara Deutschland GmbH, Fernwald
Brutschrank	
B5090E	Heraeus Instruments, Hanau
B5042E	Heraeus Instruments, Hanau

Gelelektrophoresekammern	
DNA sub cell	Bio-Rad, München
PEQLab 40-1214	PEQLab, Erlangen
Mikrowelle Privileg 8017E	Quelle, Fürth
PH-Meter	Sartorius, Göttingen
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Laminar Flow	Keßler + Luch GmbH, Giessen
PCR-Maschinen	
Uno II	Biometra, Göttingen
TGradient	Biometra, Göttingen
Primus96	MWG, Ebersberg
UVP GelWorks, Gelanalyse- und-dokumentationssystem	OmniLab, Mettmenstetten, Schweiz
Vortexer MS1 Minishaker	IKA-Werke, Staufen
Waagen	
Kern 440-33	Kern & Sohn, Balingen
Sartorius 3716 MP	Sartorius, Göttingen
Sartorius BP210 D	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifugen	
Tischzentrifuge EBA 12	Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen
Rotana/S	Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen
Sorvall RC 5B Plus	DuPont, Bad Homburg

#### **3.4.5. Sonstiges**

Sterilfilter BottleTop	Becton & Dickinson, USA
Sterilfilter	Schleicher & Schüll, Dassel
Kulturflaschen	Nunc, Wiesbaden

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Sensitivitätsstudien

#### 4.1.1. Provinz Attapeu

Die 4armige *in-vivo*-Sensitivitätsstudie wurde von August bis Oktober 2001 in der Provinz Attapeu im Südosten der VR Laos durchgeführt. Studienstandorte wurden im Provinzkrankenhaus in Attapeu, und in den Distriktkrankenhäusern in Phou Vong und Xaysettha eingerichtet. Die Rekrutierung der Patienten erfolgte überwiegend auf Dorfebene, eingeschlossen wurden 16 Dörfer aus 5 Distrikten der Provinz. Es wurden 1773 Patienten untersucht, davon hatten 265 (15%) eine mikroskopisch diagnostizierte Infektion mit *Plasmodium falciparum*. 159 Patienten wurden in die Studie aufgenommen, wovon 119 die parasitologischen Einschlusskriterien von 1000 - 100.000 Parasiten/ $\mu$ l am Tag 0 erfüllten. 38 Patienten hatten eine Parasitendichte von 400 -1000 Parasiten/ $\mu$ l, 8 Patienten weniger als 400 Parasiten/ $\mu$ l und 2 Patienten zeigten initial mehr als 100.000 Parasiten/ $\mu$ l. Die Auswertung der *in-vivo*-Sensitivitätsstudie erfolgte für die 119 Patienten mit 1000 - 100.000 Parasiten/ $\mu$ l. Die Daten aller Patienten stehen für molekularbiologische Untersuchungen zur Verfügung.

Die Altersverteilung zeigt 32% in der Gruppe der 1-5jährigen, wobei auf die Chloroquin-Gruppe mit 36,4% der höchste Anteil fällt und auf die S/P-Gruppe mit 27% der niedrigste. Die durchschnittliche Parasitämie an Tag 0 betrug 11.255 asexuelle Parasiten pro  $\mu$ l und war am höchsten in der Chloroquin-Gruppe und am niedrigste in der Behandlungsgruppe CQ+S/P. Eine ungleiche Verteilung zeigte sich auch bei dem Anteil weiblicher Patienten, der mit 22% in der Mefloquin-Gruppe (gesamt 42%) niedriger war. Fieber war kein häufiges Symptom, nur 19,3% der Patienten hatten mehr als 37,5°C Körpertemperatur axillar. Die Basisdaten sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Von den 119 Patienten konnten 107 über 14 Tage verfolgt werden, 5 wurden ausgeschlossen und 7 beim Nachverfolgen verloren.

Unter Chloroquin-Behandlung traten 45% Therapieversager auf, davon wurden 3 (10%) als ETF und 10 (35%) als LPF eingestuft. Das Risiko eines Versagens der Antimalariatherapie war in der Chloroquin-Gruppe mehr als doppelt so hoch verglichen mit der S/P-Gruppe und dreimal so hoch verglichen mit der Kombinationstherapie (RR=2,5; 95%CI 1,03-6,12; RR=2,96; 95%CI 1,01-7,18). Unter S/P-Behandlung traten

17,9% Rekrudeszenzen auf und 82,2% reagierten sensitiv. Ein ähnliches Ergebnis wurde mit der Kombinationstherapie von CQ und S/P erzielt (16,7% Rekrudeszenz, 83,3% ACPR). Es konnte kein Vorteil der Kombinationstherapie von CQ und S/P gegenüber S/P Monotherapie nachgewiesen werden (RR=1,01; 95%CI 0,8-1,3). Bei Behandlung mit Mefloquin traten im 14tägigen Beobachtungszeitraum keine Rekrudeszenzen auf. In Tabelle 6 ist das relative Risiko für eine erfolgreiche Behandlung mit den verschiedenen Studienmedikamente gegenübergestellt. Verglichen mit Chloroquin war es unter der Kombinationstherapie 1,5 mal höher und unter Mefloquin-Behandlung 1.8 mal höher (siehe Tabelle 5).

Die Verringerung der Parasitämie am Tag 3 war in der Chloroquin-Gruppe signifikant niedriger als in den anderen Behandlungsgruppen. 46% der Patienten hatten keine mikroskopisch nachweisbaren Parasiten, verglichen mit 70% in der S/P-Gruppe, 69% und der Kombinationsgruppe und 82% unter Mefloquin-Behandlung. Kein Unterschied war zwischen S/P-Monotherapie und S/P+CQ-Kombination nachweisbar (RR=1,01; 95%CI 0,7-1,4).

Die Analyse des Therapieergebnisses in der Altersgruppe von 1-5 Jahren ergab 37% Therapieversager verglichen mit 13% in der Gruppe der älteren Kinder und Erwachsenen. Damit zeigten Kinder unter 6 Jahren gegenüber dem Rest der Patienten ein dreimal höheres Risiko für Therapieversager (RR=2,97; 95%CI 1,4-6,3). Die vorhandenen Patientenzahlen erlaubten keine Analyse nach Behandlungsgruppen.

**Tabelle 4:** Studie Attapeu: Basisdaten der Studienpopulation,  $N = 119$

	gesamt	Chloroquin	S/P	Kombination	Mefloquin
im Dorf rekrutiert	79%	85%	73%	72%	85%
Anteil weiblich	42%	49%	50%	45%	22%
Alter Durchschnitt [Jahre]	12.8	10.7	15.5	15.5	9.0
Alter median [Jahre]	8	7	9	10	8
Anteil Kinder 1-5 Jahre	32%	36%	27%	31%	33%
durchschnittliche Parasitämie/ul Tag 0	11,255	13,673	10,609	9,247	11,175

**Tabelle 5:** Studie Attapeu: Therapieergebnis der Studienmedikamente,  $N = 119$

	<i>Chloroquin</i>	<i>S/P</i>	<i>Kombination</i>	<i>Mefloquin</i>
Gesamt $N = 119$	33	30	29	27
Ausgeschlossen	2	0	2	1
Drop out	2	2	3	0
Abgeschlossen $N = 107$	26	28	24	26
Sensitiv (ACPR)	16 55,2%	23 82,1%	20 83,3%	26 100%
Therapieversager	23 44,8%	5 17,9%	4 16,7%	0 0%
ETF	3 10,3%	1 3,6%	1 4,2%	0 0%
LPF	10 34,5%	4 14,3%	3 12,5%	0 0%

**Tabelle :6** Studie Attapeu: Vergleich der Therapieergebnisse pro Behandlungsarm:  
 Relatives Risiko (95%CI) für erfolgreiche Therapie, (Spalten gegen Reihen)

	Chloroquin	S/P	CQ+S/P	Mefloquin
CQ	1	1.49 (1.03-2.16)	1.51 (1.04-2.19)	1.81 (1.31-2.52)
S/P		1	1.01 (0.79-1.30)	1.22 (1.02-1.45)
CQ+S/P			1	1.20 (1.00-1.44)
MQ				1

**Tabelle 7:** Studie Attapeu: Gesamtvergleich der Therapieergebnisse in der Altersgruppe von 1-5 Jahren mit Patienten von mehr als 5 Jahren

Altersgruppe	$n$	Therapieversager	%	Relatives Risiko	95%CI
1-5 Jahre	35	13	37.1	2.97	1.4-6.3
>5 Jahre	72	9	12.5	1.0	-

Mantel-Haenzel:  $\chi^2 = 8,67$   $p = 0,0032$

#### 4.1.2. Luang Namtha

Die Studie wurde von November 2001 bis Februar 2002 in der nordwestlichen Provinz Luang Namtha durchgeführt, in der Grenzregion von Laos zu China (Yunnan-Provinz) und Myanmar. Geplant war eine 3armige Studie mit Chloroquin (CQ), Sulfadoxin/Pyrimethamin (S/P) und der Kombination von beiden. Wegen zu geringer Fallzahlen wurde auf die Kombinationstherapie verzichtet. Screening und Patientenrekrutierung erfolgte vor allem auf Dorfebene. 1792 Patienten in 39 Dörfern wurden untersucht. Die mikroskopische Untersuchung ergab 127 (7,1%) Infektionen mit *Plasmodium falciparum* und 23 (1,3%) mit *Plasmodium vivax*, wovon 13 Patienten eine Mischinfektion von *falciparum* und *vivax* aufwiesen. Im Distrikt Viengphoukha wurden außerdem 4 Fälle von *Plasmodium malariae* diagnostiziert.

Basisdaten der Studienpopulation sind in Tabelle 8 zusammengestellt. 82 Patienten wurden in die Studie eingeschlossen, davon erfüllten 63 Patienten die parasitologischen Einschlusskriterien von 1000-100.000 Parasiten/ $\mu$ l und 19 Patienten hatten eine initiale Parasitämie von 400 –1.000 Parasiten/ $\mu$ l. 91% wurden auf Dorfebene rekrutiert. Die Altersverteilung ergab 35% der Patienten in der Altersgruppe von 1-5 Jahren, 39% in der Gruppe von 6-14 Jahren und 26% älter als 14 Jahre. 77 Patienten konnten über 14 Tage komplett verfolgt werden, 4 wurden ausgeschlossen und ein Patient konnte nicht nachverfolgt werden.

Ein Vergleich der Therapieversager in Abhängigkeit von der Ausgangsparasitämie an Tag 0 zeigt 35,6% in der Gruppe 1.000 – 100.000 Parasiten/ $\mu$ l gegenüber 33,3% in der Gruppe mit weniger als 1.000 Parasiten/ $\mu$ l am Tag 0 (Tabelle 9). Aufgrund der weitgehenden Übereinstimmung wurden beide Gruppen gemeinsam analysiert und ausgewertet.

Das Therapieergebnis wurde entsprechend der WHO-Kategorien als ETF, LCF, LPF oder ACPR klassifiziert (Tabelle 10). In der Chloroquin-Gruppe reagierten 47% der Patienten sensitiv (ACPR) und 53% mit Therapieversagen. Davon wurden 3 Patienten (8%) als ETF, 3 (8%) als LCF und 13 (36%) als LPF eingestuft. Unter S/P-Behandlung zeigten sich 18% Therapieversager, während 82% bei 14tägiger Nachverfolgung keine Rekrudeszenzen zeigten. Unter den 7 Patienten mit Therapieversagen wurde ein ETF und 6 LPF festgestellt. Von den 2 Patienten, die mit der Kombination von CQ und S/P behandelt wurden, reagierte einer sensitiv, der andere als LPF.

Betrachtet man das Ergebnis in der Gruppe der Kinder von 1-5 Jahren, so ergeben sich 48% Therapieversagen bei kleinen Kindern im Gegensatz zu 28% bei älteren Kindern und Erwachsenen (Tabelle 11).

**Tabelle 8:** Studie Luang Namtha: Basisdaten zur Studienpopulation,  $N = 82$ 

	gesamt	Chloroquin	S/P	Kombination
Aufgenommene Patienten	82	39	41	2
Im Dorf rekrutiert	91,5%	92,3%	90,2%	50,0%
Anteil weiblich	47,6%	38,5%	56,1%	50,0%
Alter Durchschnitt [Jahre]	10,8 $\pm$ 10,6	12,3 + 10,3	9,6 + 11,0	4,5 + 5,0
Alter Median [Jahre]	8,0	10,0	7,0	4,5
Altersgruppen				
1 – 5 Jahre	35,4%	30,8%	39,0%	50,0%
6 – 14 Jahre	39,0%	33,3%	43,9%	50,0%
>14 Jahre	25,6%	35,9%	17,1%	-
Ausgangsparasitämie Tag 0				
400 – < 1,000/ $\mu$ l	23,2%	23,1%	24,4%	-
1,000 – 100,000/ $\mu$ l	76,8%	76,9%	75,6%	100,0%

**Tabelle 9:** Luang Namtha: Therapieergebnis in Abhängigkeit von unterschiedlichen Ausgangsparasitämien

Parasitämie an Tag 0 [Parasiten/ $\mu$ l]	gesamt	sensitiv		Therapieversager	
	$N$	$N$	%	$N$	%
400 - <1,000	18	12	66,7	6	33,3
1,000 - 100,000	59	38	64,4	21	35,6
gesamt	77	50	64,9	27	35,1

**Tabelle 10:** Therapieergebnis der Studienmedikamente,  $N = 82$ 

	<i>Chloroquin</i>		<i>S/P</i>		<i>Kombination</i>
Gesamt $N = 82$	39		41		2
Ausgeschlossen	2		2		0
Drop out	1		0		0
Abgeschlossen $N = 107$	36		39		2
Sensitiv (ACPR)	17	47,2%	32	82,1%	1
Therapieversager	19	52,8%	7	17,9%	1
ETF	3	8,3%	1	2,6%	0
LCF	3	8,3%	0	0,0%	0
LPF	13	36,1%	6	15,4%	1

**Tabelle 11:** Luang Namtha: Gesamtvergleich des Therapieergebnisses in der Altersgruppe von 1-5 Jahren mit Patienten von mehr als 5 Jahren ( $N = 77$ )

Altersgruppe	$n$	Therapieversager	%	Relatives Risiko	95%CI
1-5 Jahre	27	13	48,1%	1,72	0,95-3,11
>5 Jahre	50	14	28,0%	1.00	-

Mantel-Haenzel:  $\chi^2 = 3,09$   $p = 0,079$

#### 4.2. *In-vitro-Resistenzinduktion*

Ausgangskonzentrationen von  $2 \times 10^{-8}$  und  $1 \times 10^{-8}$  M Atovaquon führten zum Absterben der Kulturen. Daher wurde die Konzentration weiter erniedrigt und mit  $5 \times 10^{-9}$  M wurde eine Gewöhnung der Parasiten erreicht. Diese Kultur war über mindestens 14 Tage stabil, bis sie mit der nächsten Stufe behandelt wurde. Endpunkt waren Kulturen, die  $2 \times 10^{-7}$  M Atovaquon allein bzw. in Kombination mit Cycloguanil überlebten. Folgende Stufen konnten erreicht werden und wurden kryopkonserviert für spätere Kultivierung und molekularbiologische Untersuchungen:

**Tabelle 12:** Maximal tolerierte Konzentrationen nach Resistenzinduktion

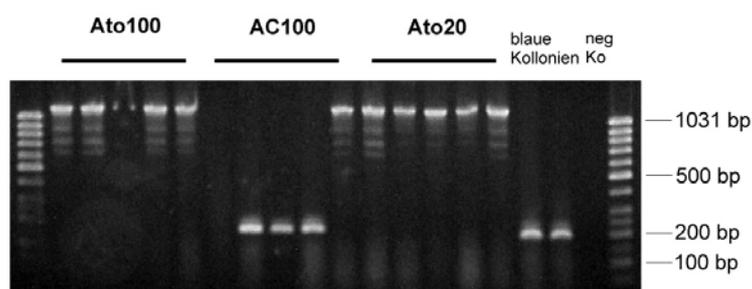
Name	Substanz	Maximal tolerierte Konzentration (bezogen auf Atovaquon)	
Ato10	Atovaquon	$10^{-8}$ M	= 10 nM
AC10	Atovaquon/Cycloguanil	$10^{-8}$ M	= 10 nM
Ato20	Atovaquon	$2 \times 10^{-8}$ M	= 20 nM
AC20	Atovaquon/Cycloguanil	$2 \times 10^{-8}$ M	= 20 nM
Ato50	Atovaquon	$5 \times 10^{-8}$ M	= 50 nM
AC50	Atovaquon/Cycloguanil	$5 \times 10^{-8}$ M	= 50 nM
Ato100	Atovaquon	$10^{-7}$ M	= 100 nM
AC100	Atovaquon/Cycloguanil	$10^{-7}$ M	= 100 nM
Ato200	Atovaquon	$2 \times 10^{-7}$ M	= 200 nM
AC200	Atovaquon/Cycloguanil	$2 \times 10^{-7}$ M	= 200 nM

#### 4.3. *Klonierung*

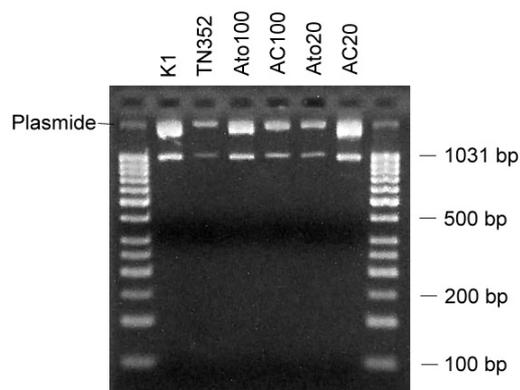
Nach erfolgter Ligation und Klonierung wurden 5 bis maximal 8 weiße Kolonien pro Ansatz ausgewählt und mittels PCR auf eingebaute Fremd-DNA überprüft. Die Abbildungen der Agarosegelelektrophorese zeigen bei ca. 200 bp eine Bande mit Vektorsequenz ohne DNA-Einbau und bei ca. 1140 bp eine Bande, wenn die Zielsequenz von 939 bp erfolgreich in den Vektor eingebaut wurde. Für jeden Klonierungsansatz konnte mindestens ein positiver Klon nachgewiesen werden, der dann zur Vermehrung und Plasmidextraktion verwendet wurde. Nach der Extraktion erfolgte eine weitere Überprüfung durch Verdau mit EcoRI. Abbildung 6 zeigt, dass für alle extrahierten

Plasmide die eingebaute DNA nachgewiesen werden konnte (939 bp + 18 bp Vektorsequenz).

**Abbildung 5:** Kontroll-PCR ausgewählter Kolonien mit Vektorprimern: 200 bp Banden zeigen Vektorsequenz, Banden >1031 bp sind Fragmente mit eingebauter DANN-Sequenz



**Abbildung 6:** Vektor Kontrolle nach Verdau mit EcoRI



#### 4.4. Sequenzierung des Cytochrom-b-Genes

##### 4.4.1. Mutationen des Cytochrom-b-Genes der *in-vitro*-Kulturen

Für die Klonierung und Extraktion wurden *in-vitro*-Stämme ausgewählt, die folgende Medikamentenkonzentrationen im Kulturmedium überlebten:

Atovaquon	$2 \times 10^{-8}$ M, $1 \times 10^{-7}$ M, $2 \times 10^{-7}$ M
Atovaquon/Cycloguanil	$2 \times 10^{-8}$ M, $1 \times 10^{-7}$ M, $2 \times 10^{-7}$ M (Atovaquonkonzentration im Medium)

Für alle Stämme wurde eine Mutation an Position 399 festgestellt. Der Nukleotidwechsel von G zu T führte zu einem Aminosäureaustausch an Kodon 133 von Methionin (ATG) zu Isoleucin (ATT). Die Sequenzierung der Kultur Ato200 ( $2 \times 10^{-7}$  M Atovaquon) zeigte als einzige eine zusätzliche Mutation an Position 813 mit einem Aminosäurewechsel von Leucin (TTA) zu Phenylalanin (TTC) an Kodon 271 des Cytochrom-b-Genes.

#### ***4.4.2. Mutationen des *cyt b*-Genes des *in-vivo*-Therapieversagers (TN352)***

Von dieser Probe wurden 2 Klone zur Plasmidvermehrung und Extraktion ausgewählt. Die Sequenzierung der präzipitierten Proben erfolgte durch MWG, Ebersberg, mit identischem Ergebnis. Die Proben zeigten eine Mutation an Position 803 des Cytochrom-b-Genes, das zu einem Aminosäurewechsel an Kodon 268 von Thyrosin (TAT) zu Serin (TCT) führte.

#### ***4.5. Daten von TropNetEurop***

Im Rahmen des Netzwerkes wurden von 2001 bis 2002 (12 Monate) 8 Patienten mit Rekrudeszenzen nach Malarone-Therapie gemeldet. Alle Infektionen erfolgten in Westafrika. Von insgesamt 581 gemeldeten Fällen mit Falciparum-Malaria wurden 150 Patienten mit Malarone® behandelt. Aus Westafrika wurden 312 importierte Malariafälle gemeldet, wovon 79 mit Malarone behandelt wurden. Bisher wurden Blutproben von 6 Patienten auf Mutationen des Cytochrom-b-Genes untersucht, 5 davon zeigten Rekrudeszenzen nach Malarone®-Therapie. Die Sequenzierung zeigte für alle 5 Fälle eine Mutation am Kodon 268 des Cytochrom b Gens mit einem Aminosäurewechsel von Thyrosin zu Serin bzw. Asparagin. Infektionsland, Untersuchungsort und Ergebnis der Sequenzierung sind in Tabelle 13 aufgelistet. Bisher wurden die Ergebnisse aus London, München und Göteborg veröffentlicht.

**Tabelle 13:** Gemeldete Therapieversager nach Malarone®-Therapie innerhalb von TropNetEurop

Untersuchungs- ort	Status	Infektionsland	Prophylaxe	Cytochrom-b-Gen C268 Wildtyp TAT Tyr
London <sup>[26]</sup>	Immigrant	Nigeria	keine	Mutation c286 AAT Asn
München <sup>[68]</sup>	Tourist	Mali	CQ + Proguanil	Mutation c268 TCT Ser
Kopenhagen	Tourist	Kamerun	CQ + Proguanil	Mutation c268 TCT Ser
Göteborg <sup>[25]</sup>	Tourist	Elfenbeinküste	CQ + Proguanil	Wildtyp c268 TAT Tyr
Göteborg <sup>[25]</sup>	Tourist	Elfenbeinküste	CQ + Proguanil	Mutation c268 TCT Ser
Göteborg <sup>[25]</sup>	Immigrant	Elfenbeinküste	CQ + Proguanil	Mutation c268 TCT Ser kein Therapieversagen
Stockholm	Immigrant	Nigeria	keine	? noch zu analysieren
Berlin	Tourist	Gambia	keine	?
München	Immigrant	Togo	keine	?

Diese 5 molekular bestätigten Resistenzfälle stellen 6,3% der Patienten aus Westafrika dar, die in diesem Zeitraum mit Malarone behandelt wurden, bzw. 3,3% aller mit Malarone behandelten Patienten.

#### **4.6. PCR-RFLP-Methodik für Polymorphismen an Kodon 268**

Die Methode sollte in der Lage sein, den Wildtyp (TAT) und die 2 bekannten Mutationen (TCT und AAT) am Kodon 268 des Cytochrom-b-Gens zu unterscheiden und spezifisch nachzuweisen. Für die erste Runde der nested PCR wurden die Primer CYTb1 und CYTb2 von der Sequenzierungsreaktion verwendet. Für die zweite Runde wurden neue Primer entwickelt.

##### **4.6.1. Enzymauswahl und Primerdesign**

Die Analyse der Cytochrom-b-Sequenz auf Restriktionsschnittstellen ergab kein Enzym, das die Polymorphismen am Kodon 268 unterscheiden konnte. Daraufhin wurden in Nachbarschaft der Mutation Nukleotide ausgetauscht, um Erkennungssequenzen für spezifisch schneidende Enzyme zu schaffen. Für den Wildtyp (TAT) konnte bei Ersatz von A durch T an Position 808 eine spezifische Restriktion mit Nsi I eingeführt werden. Für die Mutation 1 (TCT) wurde durch Austausch von T durch G an Position 799 eine

Erkennungssequenz für AlwNI geschaffen. Für die Mutation 2 (AAT) erfolgten 2 Nukleotidwechsel, von T nach A an Position 800 und von C nach A an Position 798. Die damit erhaltene Erkennungssequenz für Sspl ist bei Wildtyp und Mutation 1 vorhanden, nicht aber bei Mutation 2 (AAT). Auf der Grundlage dieser Sequenzen wurden Primersequenzen ausgewählt. Neben den neuen Primern wurden die Sequenzprimer CYTb2 und CYTb3 verwendet. Um eine optimale Hybridisierung der Primer während der PCR zu erreichen, sollten beide Primer des verwendeten Paares eine annähernd gleiche Schmelztemperatur aufweisen. Die Schmelztemperatur wurde durch folgende Formel in Annäherung berechnet:

$$T_M = 69,3 + 0,41 \times \text{GC-Gehalt(\%)} - 650/\text{Sequenzlänge.}$$

**Tabelle 14:** Aufstellung der Primerpaare und Vergleich der Schmelztemperaturen für die Mutationsanalyse an Kodon 268

Neuer Primer	Länge	Schmelz- temperatur	verwendeter 2. Primer	Schmelz- temperatur
CYTb5	28 bp	59,3°C	CYTb3	59,3°C
CYTb6	22 bp	54,7°C	CYTb2	53,2°C
CYTb7	25 bp	56,4°C	CYTb2	53,2°C

Die PCR-Produkte, die unter Verwendung der neu entwickelten Primer amplifiziert wurden, sind nachfolgend aufgelistet. Dabei sind Primersequenzen durch Fettdruck herausgehoben, Kodon 268 unterstrichen, Nukleotidwechsel durch kleine Buchstaben angezeigt und die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme grau unterlegt.

Für den Nachweis des Wildtyps (TAT), amplifiziert mit CYTb3 und CYTb5 (384 bp)

**AGCAGTAATTTGGATATGTGGAGG**ATATACTGTGAGTGATCCTACAATAAAACGATTTTT  
 TGACTACATTTTATCTTACCATTTATTGGATTATGTATTGTATTTATACATATATTTTCTTACA  
 TTTACATGGTAGCACAAATCCTTTAGGGTATGATACAGCATTAAAAATACCCTTTTATCCAA  
 ATCTATTAAGTCTTGATGTTAAAGGATTAATAATGTTATAATTTTATTTCTAATACAAAGTTT  
 ATTTGGAATTATACCTTTATCACATCCTGATAATGCTATCGTAGTAAATACATATGTTACTCC  
 ATCTCAAATTGTACCTGAATGGTACTTTCTACCATTTT**ATGCAT****TGTTAAAAACTGTTCCAA**  
**GTAACC**

Restriktion durch Nsi I; Erkennungssequenz: **ATGCAT**

Für den Nachweis der Mutation 1 (TCT), amplifiziert mit CYTb6 und CYTb2 (171 bp)

**TGAATGGTACTTTCTACCAgTTCTG**CAATGTTAAAACTGTTCCAAGTAAACCAGCTGAT  
TTAGTAATTGTATTATTATCATTACAATTATTATTCTTATTAGCAGAACAAAGAAGTTTAAACA  
ACTATAATTCAATTTAAAATGATTTTT**GGTGCTAGAGATTATTCTGT**

Restriktion durch AlwN I; Erkennungssequenz: **CAGnnnCTG**

Für den Nachweis der Mutation 2 (AAT), amplifiziert mit CYTb7 und CYTb2 (174 bp)

**ACCTGAATGGTACTTTCTACaATaTAAT**IGCAATGTTAAAACTGTTCCAAGTAAACCAGCT  
GATTTAGTAATTGTATTATTATCATTACAATTATTATTCTTATTAGCAGAACAAAGAAGTTTAA  
CAACTATAATTCAATTTAAAATGATTTTT**GGTGCTAGAGATTATTCTGT**

Restriktion durch Ssp I; Erkennungssequenz: **AATATT**

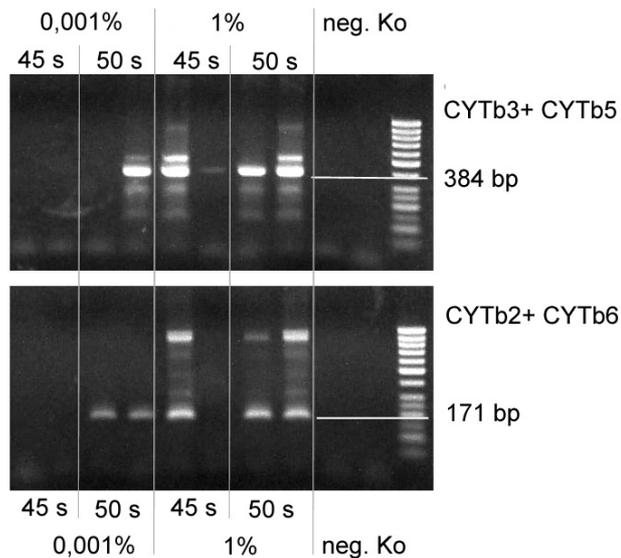
#### 4.6.2. Optimierung der „nested PCR“

Um robuste Protokolle für eine möglichst sensitive und spezifische Amplifizierung der zu untersuchenden Genabschnitte zu erhalten, wurden die Parameter Zyklenzahl, Annealingtemperatur, Primerkonzentration, DNA-Menge und Extensionstemperatur optimiert. Um eine einfache Handhabung der Methode im Labor zu gewährleisten, sollte die 2. PCR-Reaktion mit allen 3 Primerpaaren unter gleichen Amplifikationsbedingungen durchgeführt werden. Zur Optimierung wurde DNA des Laborstammes K1 verwendet. 5 µl einer 1%igen Kultur (Anzahl der parasitierten Erythrozyten bezogen auf Gesamtanzahl der Erythrozyten) wurden extrahiert und die Lösung mit destilliertem Wasser in 10er Schritten verdünnt. Die erhaltenen DNA-Lösungen entsprechen einer 0,1%igen bis 0,00001%igen Ausgangskultur. Es wurde jeweils 1 µl DNA-Lösung in einem 20 µl PCR-Ansatz verwendet.

Die erste Runde der nested PCR folgte dem Protokoll für die Sequenzierung (siehe S. 28) mit einer Annealingtemperatur von 45°C. Eine Erhöhung der Annealingtemperatur bewirkt bei der Primerhybridisierung (*Annealing*) in der Regel eine Steigerung der Spezifität der Primer. Ist die Temperatur zu hoch, entsteht kein Produkt mehr. Ein Vergleich der Produkte bei 45°C und 50°C Annealingtemperatur in der ersten PCR zeigte höhere Ausbeute bei 50°C in der nested PCR mit den Primerpaaren CYTb3/CYTb5 und CYTb2/CYTb6. Die PCR-Reaktion der zweiten Runde wurde mit einem Ansatz analog dem der ersten Runde durchgeführt und unter folgenden Bedingungen amplifiziert: 95°C/15 min, [95°C/30 s, 55°C/30 s, 70°C/30 s] 30 Zyklen, 70°C/5 min. Aufgrund der kleineren Produkte (200-400 bp) wurden kurze Temperaturschritte von 30 Sekunden gewählt. Die

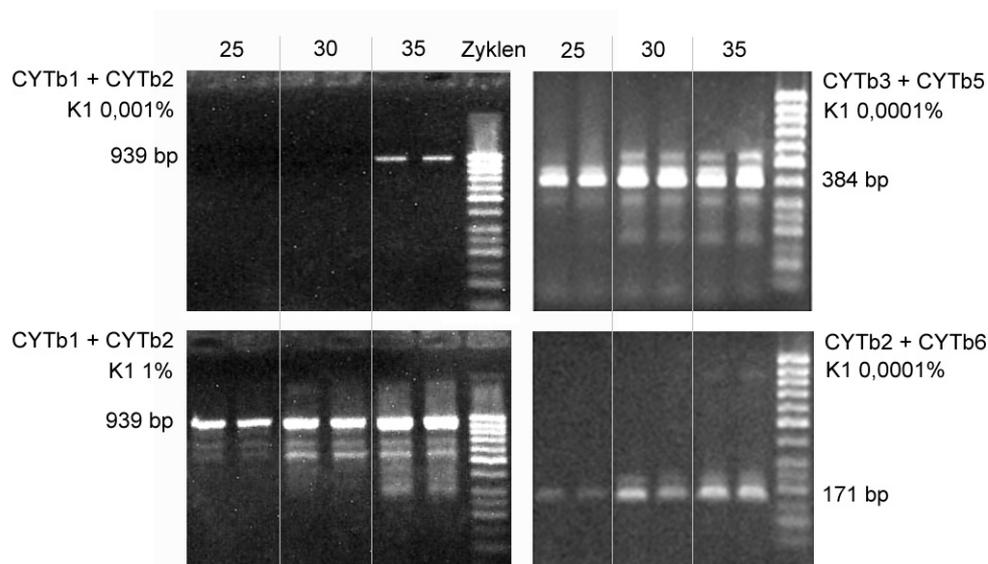
gewählte Annealingtemperatur von 55°C orientierte sich an den errechneten Schmelztemperaturen der Primer von 53°C bis 59°C.

**Abbildung 7:** PCR-Produkte der zweiten Runde mit verschiedenen Annealingtemperaturen in der ersten PCR (K1 1% und 0,001%)



In einem nächsten Schritt wurde die Zyklenzahl der ersten PCR optimiert. Bei Erhöhung der PCR-Zyklen kann sowohl die Menge der Ziel-DNA aber auch überproportional die Anzahl der unerwünschten Nebenprodukte ansteigen. Ein Vergleich der Ergebnisse bei 25, 30 und 35 Zyklen der ersten PCR ergab vor allem bei niedrigen Ausgangskonzentrationen an DNA die stärkste Bande bei 35 Zyklen. Starke Nebenbanden wurden mit den Primern CYTb3/CYTb5 erhalten, allerdings unabhängig von der Zyklenzahl. Alle weiteren Optimierungsschritte wurden bei einer Zyklenzahl von 35 für die äußere PCR durchgeführt.

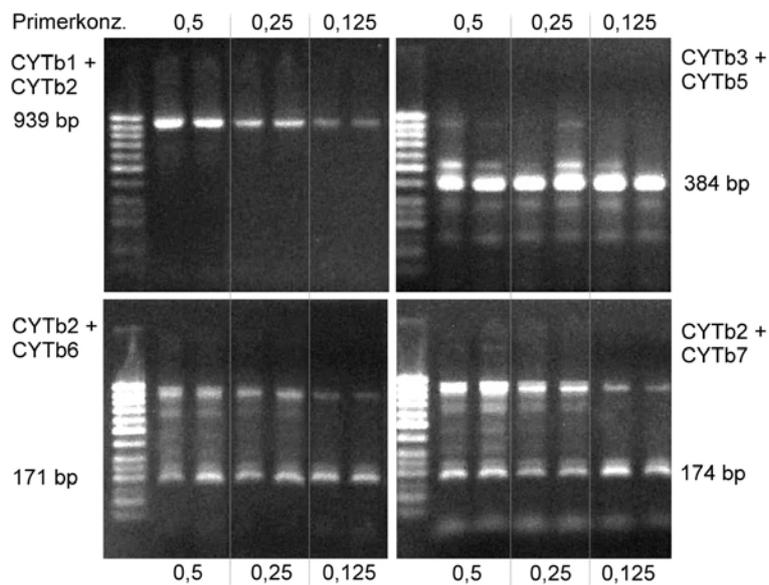
**Abbildung 8:** Amplifizierungsprodukte der ersten und zweiten PCR mit variierten Zyklenzahlen in der ersten PCR



Bei einer nested PCR werden durch den Einsatz von PCR-Produkt aus der ersten Runde als Ausgangsmaterial für die 2. Amplifizierung neben DNA auch die Primer der ersten Runde übertragen. Diese können zur verstärkten Bildung von unerwünschten Nebenprodukten beitragen. Daher erfolgte eine Optimierung mit abnehmender Primerkonzentration von  $0,5 \mu\text{M}$  bis zu  $0,125 \mu\text{M}$  in der ersten PCR. Die Ergebnisse der zweiten Runde zeigten bei einer Primerkonzentration von  $0,125 \mu\text{M}$  weniger Nebenprodukte sowie die stärkste Bande des gewünschten Produktes. In einem weiteren Versuch wurden in der ersten Runde  $0,05 \mu\text{M}$  gegen  $0,1 \mu\text{M}$  Primer verglichen. Dabei zeigte sich vor allem bei niedrigen DNA-Ausgangskonzentrationen eine deutliche Verringerung der Bandenintensität mit  $0,05 \mu\text{M}$  Primerkonzentration.

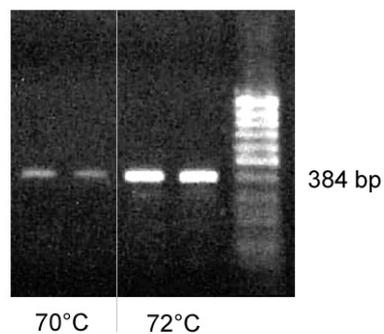
Bei einer Verringerung der Primerkonzentration in der 2. Runde auf  $0,125 \mu\text{M}$  kam es zu einer deutlichen Verringerung der Menge an Ziel-DNA im Vergleich zu  $0,5 \mu\text{M}$ . Als endgültige Primerkonzentrationen wurde  $0,125 \mu\text{M}$  für die äußere PCR und  $0,5 \mu\text{M}$  für die PCR's der zweiten Runde gewählt.

**Abbildung 9:** PCR-Produkte der ersten und zweiten Runde bei 3 verschiedenen Primerkonzentrationen in der ersten PCR



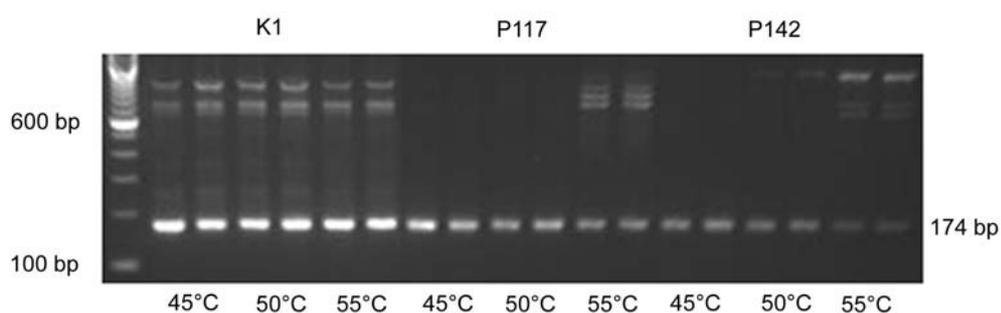
Im dritten Schritt der PCR erfolgt nach Anlagerung der Primer (Annealing) die Kettenverlängerung (Extension) durch die Taq-Polymerase. Zur Ermittlung der optimalen Temperatur wurde die PCR mit dem Primerpaar CYTb3/CYTb5 bei einer Extensionstemperatur von 70°C bzw. 72°C für jeweils 30 Sekunden ausgeführt. Bei 72°C wurden stärkere Banden erhalten und diese Temperatur für weitere PCR-Reaktionen gewählt.

**Abbildung 10:** K1 0,00001% amplifiziert mit variiertem Extensionstemperatur, Primerpaar CYTb3/CYTb5



Bei der Evaluierung der Methode anhand der Filterpapierproben aus Laos zeigten sich starke Sensitivitätsunterschiede bei den 3 verschiedenen PCR der zweiten Runde. Da besonders mit der Primerkombination CYTb2/CYTb7 weniger positive PCR erhalten wurden, erfolgte eine zusätzliche Optimierung der Annealingtemperatur. Aufgrund der 2 Nuklidwechsel in der Primersequenz von CYTb7 kann es zu einer verminderten Anlagerung kommen. Um die Sensitivität zu erhöhen, wurden Annealingtemperaturen von 45°C und 50°C im Gegensatz zu 55°C getestet. Die Abbildung zeigt deutlich, dass es bei den Feldisolaten (P117 und P142) bei niedrigeren Temperaturen zu stärkeren Zielbanden und abnehmenden unerwünschten Nebenbanden kommt. Diese Temperatur wurde im Protokoll für die Amplifizierung mit dem Primerpaar CYTb2/CYTb7 beibehalten.

**Abbildung 11:** PCR-Produkte mit dem Primerpaar CYTb2/CYTb7 bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen von K1 und den Proben P117 und P142 (Studie Luang Namtha)



Zusammengefasst konnten die folgenden optimierten PCR-Parameter ermittelt werden:

### 1. PCR

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
Primer CYTb1/CYTb2 (je 0,5 µM)	5 µl	0,125 µM
PCR Puffer (10x)	2 µl	1x
dNTP's (je 2 mM)	2 µl	0,2 mM
Taq Polymerase 5 U/µl	0,1 µl	0,025 U/µl
Aqua dest.	9,9 µl	
DNA-Template	1 µl	

Temperaturprotokoll:

1. Schritt	94°C	5 min	
2. Schritt	94°C	50 s	} 35 Zyklen
3. Schritt	50°C	50 s	
4. Schritt	70°C	60 s	
5. Schritt	70°C	5 min	

**2. PCR**

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
Primermischung (je 2 µM)	5 µl	0,5 µM
PCR Puffer (10x)	2 µl	1x
dNTP's (je 2 mM)	2 µl	0,2 mM
Taq Polymerase 5 U/µl	0,1 µl	0,025 U/µl
Aqua dest.	9,9 µl	
DNA-Template	1µl	

Temperaturprotokoll:

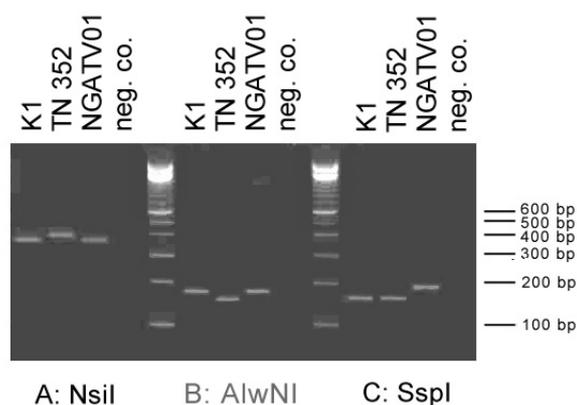
	CYTb3/CYTb5 und CYTb2/CYTb6			CYTb2/CYTb7		
1. Schritt	94°C	5 min		94°C	5 min	
2. Schritt	95°C	30 s	} <b>30</b> Zyklen	95°C	30 s	} <b>35</b> Zyklen
3. Schritt	<b>55°C</b>	30 s		<b>45°C</b>	30 s	
4. Schritt	72°C	30 s		72°C	30 s	
5. Schritt	72°C	5 min		72°C	5 min	

**4.6.3. Restriktion**

Die Amplifikate der zweiten PCR-Runde wurden mit dem entsprechendem Enzym über Nacht verdaut. Als Kontrollproben wurden K1, TN352 und NGATV01 verwendet. Die zu erwartenden Bandenlängen nach Restriktion und Gelelektrophorese sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Ein direkter Nachweis der Mutation 1 TCT erfolgt durch Restriktion mit AlnW I. Nsi I schneidet immer dann, wenn keine Mutation 1 vorliegt. Eine Restriktion durch Ssp I zeigt an, dass keine Mutation 2 vorliegt.

**Tabelle 15:** Fragmentlängen der Kodon 268 Polymorphismen nach Restriktion

Kontrollen	Kodon 268	Wildtyp 1	Mutation 1	Mutation 2 2
		CYTb3/CYTb5	CYTb2/CYTb6	CYTb2/CYTb7
		Nsi I	AlwN I	Ssp I
K1 (WT)	TAT	359 + 25 bp	171 bp	150 + 24 bp
TN352 (MT1)	TCT	384 bp	147 + 24 bp	150 + 24 bp
NGATV01 (MT2)	AAT	359 + 25 bp	171 bp	174 bp

**Abbildung 12:** Fragmentmuster der Kontrollen K1, TN352 und NGATV01 nach PCR und Verdau mit Nsi I, AlnW I und Ssp I

#### 4.7. PCR-RFLP-Methodik für Polymorphismen an Kodon 133

Es wurden bisher unter Laborbedingungen bei Medikamentendruck 2 Mutationen beschrieben, die an Kodon 133 zu einem Aminosäureaustausch von Methionin (ATG) zu Isoleucin führen, *ATA* und *ATT*. Theoretisch kann Isoleucin auch durch ATC codiert werden, wobei diese Mutation von G zu C an Position 399 noch nicht beschrieben wurde. Um alle möglichen Genotypen detektieren zu können, wurden Restriktionsenzyme zum Nachweis des Wildtyps und der 3 möglichen Isoleucin-Kodierungen ermittelt. Die Optimierung der PCR erfolgte nur für die bisher bekannten Mutationen an Kodon 133, da dafür auch Kontrollproben zur Verfügung standen.

#### 4.7.1. Enzymauswahl und Primerdesign

Bei der Analyse der Cytochrom-b-Sequenz auf Restriktionsschnittstellen wurde ein Enzym ermittelt, Tsp509 I, das spezifisch die Mutation ATT erkennt. Durch Austausch von Nukleotiden in der Nähe der Mutation wurden Schnittstellen für weitere spezifisch schneidende Enzyme erhalten. Für den Wildtyp (ATG) wurde durch den Wechsel von T zu C an Position 403 eine Erkennungssequenz für Hinf I erhalten. Für die Mutation ATA wurde eine spezifische Restriktion mit Hind III eingeführt. Dabei erfolgten 2 Nukleotidwechsel, von T zu C an Position 402 und von A zu T an Position 404. Auf der Grundlage dieser Sequenzen wurden die Primer CYTb8 und CYTb9 entwickelt. Als 2. Primer für die Amplifikationen stand CYTb1 zur Verfügung mit einem GC-Gehalt von 25% und einer Schmelztemperatur von 52,5°C. Um Primerpaare mit annähernd gleichen Schmelztemperaturen zu erhalten, wurden Sequenzen mit einer Länge von 17 bp ausgewählt und einer Schmelztemperatur von 52,8°C. Diese relativ kurzen Primersequenzen führten in der RFLP-Analyse zu Fragmentunterschieden von 16 – 20 bp. Bei entsprechenden Elektrophoresebedingungen sind diese Unterschiede detektierbar, können aber bei hohem Probendurchsatz zu Fehlablesungen führen. Für robuste Methoden sollten sich die Fragmente in mindestens 20 bp unterscheiden. Diese Vorgabe wurde erreicht durch Verlängerung der Primersequenzen, Design eines neuen Primers CYTb10 und Verwendung der daraus folgenden Primerpaarungen CYTb8/CYTb10 und CYTb9/CYTb10.

Zum Nachweis der möglichen Mutation ATC wurden 2 Enzyme gefunden. Durch den Wechsel von T zu G an Position 403 entsteht eine Erkennungssequenz für TspRI. Der Austausch von 2 Nukleotiden, T durch C an Position 402 und A durch G an Position 204, ermöglicht die Restriktion mit PvuI I. Die entsprechenden Primer wurden als CYTb11a und CYTb11b bezeichnet.

**Table 16:** Aufstellung der Primerpaare und Vergleich der Schmelztemperaturen für die Mutationsanalyse an Kodon 133

Primer	Länge	GC-Gehalt	Schmelztemperatur
CYTb8	28 bp	39,3%	62,2°C
CYTb9	27 bp	40,7%	61,9°C
CYTb10	26 bp	38,5%	60,1°C
CYTb11a	27 bp	40,7%	61,9°C
CYTb11b	24 bp	45,8%	61,0°C

Die mit diesen Primern zu amplifizierenden Produkte sind nachfolgend aufgelistet. Dabei sind Primersequenzen durch Fettdruck herausgehoben, Kodon 133 unterstrichen, Nukleotidwechsel durch kleine Buchstaben angezeigt und die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme grau unterlegt.

CYTb8/CYTb10 für den Nachweis des Wiltyps ATG (393 bp)

***GCACACTTAATAAAACCCATGTCCATT***GAACATAAACTTATGGAATTACGGATTCCTTTTA  
GGAATAATATTTTTATTCAAATTATAACAGGTGTATTTTTAGCAAGTCGATATACACCAGAT  
GTTTCATATGCATATTATAGTATAACAACACATTTAAGAGAATTATGGAGTGGATGGTGT  
AGATACATGCACGCAACAGGTGCTTCTCTTGTATTTTTATTAACATATCTTCATATTTAAGA  
GGATTAAATACTCATATATGTATTTACCATTATCATGGATATCTGGATTGATTTATTTATGA  
TATTTATTGTAAGTCTTTCGTTGGTTATGTCTTACCATGGGGTCAAAT***GAGTcATTGGGGT***  
***GCAACTGTAATTAATA***

Restriktion durch Hinf I; Erkennungssequenz **GAnTC**

CYTb9/CYTb10 für den Nachweis der Mutation 1, ATA (392 bp)

***GCACACTTAATAAAACCCATGTCCATT***GAACATAAACTTATGGAATTACGGATTCCTTTTA  
GGAATAATATTTTTATTCAAATTATAACAGGTGTATTTTTAGCAAGTCGATATACACCAGAT  
GTTTCATATGCATATTATAGTATAACAACACATTTAAGAGAATTATGGAGTGGATGGTGT  
AGATACATGCACGCAACAGGTGCTTCTCTTGTATTTTTATTAACATATCTTCATATTTAAGA  
GGATTAAATACTCATATATGTATTTACCATTATCATGGATATCTGGATTGATTTATTTATGA  
TATTTATTGTAAGTCTTTCGTTGGTTATGTCTTACCATGGGGTCAAAT***AAGcTtTTGGGGTG***  
***CAACTGTAATTAATA***

Restriktion durch Hind III; Erkennungssequenz **AAGCTT**

Beide Produkte enthalten die notwendige Erkennungssequenz für Tsp509I und können für den Nachweis der Mutation 2, ATT verwendet werden.

Bsp. CYTb8/CYTb10 (393 bp)

***GCACACTTAATAAAACCCATGTCCATT***GAACATAAACTTATGGAATTACGGATTCCTTTTA  
GGAATAATATTTTTATTCAAATTATAACAGGTGTATTTTTAGCAAGTCGATATACACCAGAT  
GTTTCATATGCATATTATAGTATAACAACACATTTAAGAGAATTATGGAGTGGATGGTGT  
AGATACATGCACGCAACAGGTGCTTCTCTTGTATTTTTATTAACATATCTTCATATTTAAGA  
GGATTAAATACTCATATATGTATTTACCATTATCATGGATATCTGGATTGATTTATTTATGA  
TATTTATTGTAAGTCTTTCGTTGGTTATGTCTTACCATGGGGTCAA***AATTAGTcATTGGGGTG***  
***CAACTGTAATTAATA***

Restriktion durch Tsp509I; Erkennungssequenz **AATT**

Für den Nachweis der Mutation ATC sind folgende Produkte möglich:

Primer CYTb10/CYTb11a (392 bp)

**GCACACTTAATAAAAACCCATGTCCATTGAACATAAACTTATGGAATTACGGATTCCTTTA  
GGAATAATATTTTTATTCAAATTATAACAGGTGTATTTTTAGCAAGTCGATATACACCAGAT  
GTTTCATATGCATATTATAGTATAACAACACATTTAAGAGAATTATGGAGTGGATGGTGT  
AGATACATGCACGCAACAGGTGCTTCTCTTGTATTTTTATTAACATATCTTCATATTTAAGA  
GGATTAAATACTCATATATGTATTTACCATTATCATGGATATCTGGATTGATTTATTTATGA  
TATTTATTGTAAGTCTTCGTTGGTTATGTCTTACCATGGGGTCAA**ATCAGTgATTGGGGT**  
**GCAACTGTAATTA**CTA**

Restriktion durch TspRI; Erkennungssequenz **nnCAsTGnn**

Primer CYTb10/CYTb11b (389 bp)

**GCACACTTAATAAAAACCCATGTCCATTGAACATAAACTTATGGAATTACGGATTCCTTTA  
GGAATAATATTTTTATTCAAATTATAACAGGTGTATTTTTAGCAAGTCGATATACACCAGAT  
GTTTCATATGCATATTATAGTATAACAACACATTTAAGAGAATTATGGAGTGGATGGTGT  
AGATACATGCACGCAACAGGTGCTTCTCTTGTATTTTTATTAACATATCTTCATATTTAAGA  
GGATTAAATACTCATATATGTATTTACCATTATCATGGATATCTGGATTGATTTATTTATGA  
TATTTATTGTAAGTCTTCGTTGGTTATGTCTTACCATGGGGTCAA**ATCAGcTgTTGGGGTG**  
**CAACTGTAATTA****

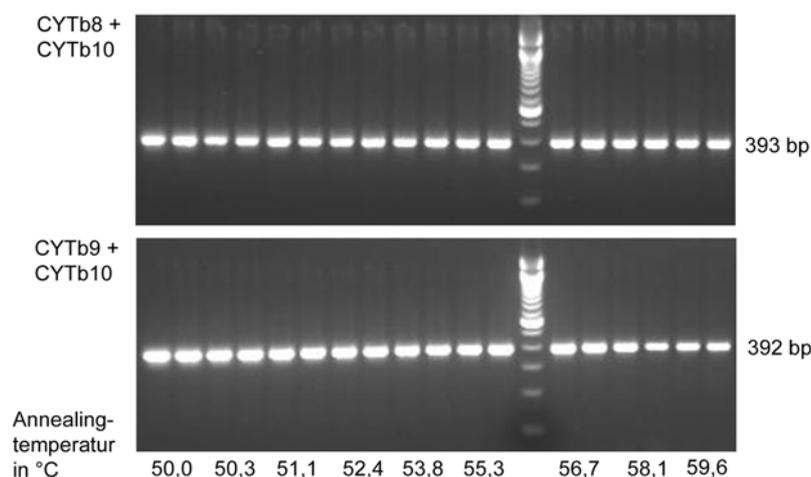
Restriktion durch Pvu II; Erkennungssequenz **CAGCTG**

#### 4.7.2. Optimierung der „nested PCR“

Die Optimierung orientierte sich am Protokoll für die 268 Mutation. Mit den Primerpaaren CYTb1/CYTb8 (17bp) und CYTb1/CYTb9 (17bp) wurden beim Vergleich dreier Annealintemperaturen (45°C, 50°C, 55°C) bei 55°C die stärksten Banden erhalten. Der Verdau mit Tsp509 I, Hind III und Hinf I ergab die theoretisch ermittelten Bandenlängen für die verschiedenen Genotypen. Bei einer Gradienten-PCR mit Annealingtemperaturen von 50-60°C wurde für die Paare CYTb8/CYTb10 und CYTb9/CYTb10 die optimale Temperatur ermittelt. Dafür wurde extrahierte DNA von K1 in verschiedenen Konzentrationen benutzt, jeweils mit doppeltem Ansatz. Die Abbildung des Agarosegels zeigt die Amplifizierungsbanden mit einer Verdünnung der Ausgangs-DNA von 1:10.000. Annealingtemperaturen im Bereich von ca. 50-60°C zeigten etwa gleich starke

Bandenlängen mit etwas schwächerer Intensität bei 58-60°C für die PCR CYTb9/CYTb10. Damit kann für beide Reaktionen die Temperatur von 55° aus dem Protokoll für 268-Mutationen übernommen werden.

**Abbildung 13:** Gradienten-PCR mit Annealingtemperaturen von 50-60°C für die Primerpaare CYTb8/CYTb10 und CYTb9/CYTb10



#### 4.7.3. Restriktion

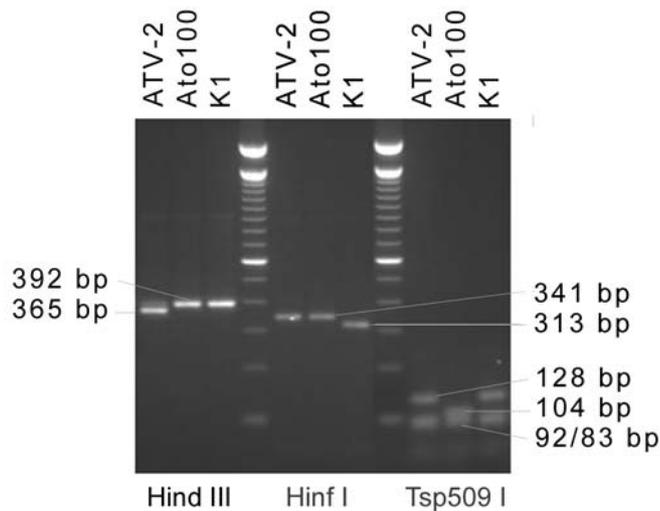
Der Verdau der amplifizierten Produkte erfolgte mit den Enzymen Tsp509 I, Hinf I und Hind III. Die Erkennungssequenz für Tsp509 I, AATT, kommt häufig in den amplifizierten Produkten vor, so dass jedes Produkt unabhängig von Kodon 268 Polymorphismen mehrfach geschnitten wird. Für die Restriktionsanalyse mit Tsp509 I kann jedes der beiden oben beschriebene PCR-Produkte verwendet werden. Mutationsspezifische Unterschiede zeigen sich in der Länge des größten Fragmentes. Während beim Wildtyp (ATG) und der Mutation 1 (ATA) das größte Fragment 128 bp lang ist, ist bei Vorhandensein der Mutation 2 (ATT) eine zusätzliche Restriktion möglich und das größte Fragment zählt 104 bp. Auch Hinf I schneidet sowohl Wildtyp als auch Mutation, allerdings ergeben sich unterschiedliche Fragmentlängen. Nur der Wildtyp wird zweimal geschnitten mit einer resultierenden Fragmentlänge von 313 bp, während bei Vorhandensein einer Mutation Fragmente von 341 bp entstehen. Hind III dagegen schneidet nur bei Vorhandensein der Mutation 1 (ATA). Die zu erwartenden Bandenlängen sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

**Tabelle 17:** Fragmentlängen der Kodon 133 Polymorphismen nach Restriktion

Kontrollen	Kodon 133	Hinf I	Hind III	Tsp509 I
ATV-2-4 (MT1)	ATA	<b>341</b> +52	<b>365</b> +27	<b>128</b> +92+83+38+44+8(7)
Ato20-200 (MT2)	ATT	<b>341</b> +52	<b>392</b>	<b>104</b> +92+83+38+44+24+8(7)
K1 (WT)	ATG	<b>313</b> +52+28	<b>392</b>	<b>128</b> +92+83+38+44+8(7)

Das Fragmentmuster nach Verdau der Kontrollen ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

**Abbildung 14:** Kontrollen ATV-2, Ato100 und K1 nach PCR und Verdau mit Hind III, Hinf I und Tsp509 I



Für die Detektion der möglichen, bisher noch nicht beschriebenen Mutation ATC am Kodon 133 stehen die Enzymen TspRI und PvuII mit folgendem Fragmentmuster zur Verfügung:

**Tabelle 18:** Fragmentlängen nach Restriktion mit TspR I und PvuI I

Kodon 133	CYTb10/Cytb11a TspR I	CYTb10/Cytb11b PvuI I
ATG, ATA, ATI	392	389
ATC	371 + 21	367 + 22

#### 4.8. Untersuchung der Proben aus Laos

Bei der Studie in Attapeu wurden 272 Filterpapier von Patienten erhalten, die einen positiven *P. falciparum* Schnelltest aufwiesen. Diese Proben wurden für verschiedene Genotypisierungsreaktionen eingesetzt. Rechnet man alle Proben zusammen, für die in mindestens einer der Genotypisierungsreaktionen ein positives PCR-Ergebnis erhalten wurde, ergibt sich eine Gesamtmenge von 226. In Luang Namtha wurden 136 Filterpapiere nach positiven Malariaschnelltest erhalten. PCR-basierte Untersuchungen ergaben eine Gesamtzahl an PCR-positiven Proben von 112, womit sich eine zu untersuchende Gesamtmenge von 338 Proben aus Laos ergibt. Diese Blutproben wurden auf Polymorphismen an den Kodons 268 und 133 des Cytochrom-b-Gens untersucht.

##### 4.8.1. Kodon 268 Polymorphismen

Die Sensitivität der PCR sowie des Verdau zeigte Unterschiede in Abhängigkeit vom verwendeten Primerpaar und ist mit 95% bis 94% am größten mit CYTb3/CYTb5 sowie am schwächsten mit CYTb2/CYTb7 (84% bis 82%). Bei den Proben aus Attapeu wurden für alle 3 Reaktionen bessere Ergebnisse erzielt mit einer maximalen Ausbeute von 97,8% für CYTb3/CYTb5 und Verdau mit Nsi I.

**Tabelle 19:** Sensitivität der PCR sowie des Enzymverdau in Abhängigkeit vom verwendeten Primerpaar

			Wildtyp 1		Mutation 1		Mutation 2	
			CYTb3/CYTb5		CYTb2/CYTb6		CYTb2/CYTb7	
			PCR	Verdau	PCR	Verdau	PCR	Verdau
Attapeu	<i>N</i> = 226	<i>n</i>	221	221	215	215	204	200
		%	97,8	97,8	95,1	95,1	90,3	88,5
Namtha	<i>N</i> = 112	<i>n</i>	100	97	93	92	80	78
		%	89,3	86,6	83,0	82,1	71,4	69,6
gesamt	<i>N</i> =338	<i>n</i>	321	318	307	307	284	278
		%	95,0	94,1	90,1	90,8	84,0	82,2

Bei der Restriktion mit Nsi I wurden 100% geschnitten, alle Proben zeigten die Wildtypsequenz, mit AlnW I wurde keine Probe geschnitten, womit keine TCT Mutation detektiert werden konnte. Beim Verdau mit Ssp I wurden alle Proben geschnitten, d.h. keine AAT Mutation war vorhanden. Damit ergab die Analyse der Polymorphismen an Kodon 368 für alle verdauten Proben die Wildtypsequenz TAT (Tabelle 20).

**Tabelle 20:** Ergebnisse des Restriktionsverdau mit Nsi I, AlnW I und Ssp I

	<i>Wildtyp 1:</i>		<i>Mutation 1:</i>		<i>Mutation 2:</i>	
	<i>Nsi I</i>		<i>AlnW I</i>		<i>Ssp I</i>	
	<i>N</i>	geschnitten	<i>N</i>	geschnitten	<i>N</i>	geschnitten
<i>Attapeu</i>	221	221	215	0	200	200
<i>Namtha</i>	97	97	92	0	78	78
<b><i>gesamt</i></b>	318	318	307	0	278	278

#### 4.8.2. Kodon 133 Polymorphismen

Die Sensitivität der PCR der zweiten Runde war für beide verwendeten Primerpaare etwa gleich und lag zwischen 93% und 94%. Bei der Restriktion wurden Sensitivitäten von 92% bis 94% erreicht. Mit den Proben aus Attapeu wurden für PCR und Restriktion Sensitivitäten von 95% bis 96% erreicht im Vergleich zu 83% bis 90% bei den Filterpapieren aus Luang Namtha (Tabelle 21).

**Tabelle 21:** Sensitivität der PCR sowie des Enzymverdaus in Abhängigkeit vom verwendeten Primerpaar und Restriktionsenzym

			CYTb8/ CYTb10	Verdau Hinf I	CYTb9/ CYTb10	Verdau Hind III	Verdau Tsp509 I
Attapeu	<i>N</i> = 226	<i>n</i>	217	215	217	217	217
		%	96,0	95,1	96,0	96,0	96,0
Namtha	<i>N</i> = 112	<i>n</i>	99	99	101	99	94
		%	88,4	88,4	90,2	88,4	83,4
gesamt	<i>N</i> = 338	<i>n</i>	316	313	318	316	311
		%	93,5	92,6	94,1	93,5	92,0

Alle Proben wurden bei der Restriktion mit Hinf I geschnitten und zeigten mit Bandenlängen von 313 bp Wildtypsequenz. Mit Hind III wurde keine Probe geschnitten und daher keine ATA Mutation detektiert. Der Verdau mit Tsp509 I ergab für alle 311 Proben die größte Bande bei 128 bp, womit keine ATT Mutation (104 bp) ermittelt werden konnte.

**Tabelle 22:** Ergebnisse des Restriktionsverdaus mit Nsi I, AlnW I und Ssp I

	<i>Wildtyp: Hinf I</i>			<i>Mut. 1: Hind III</i>		<i>Mut. 2: Tsp509 I</i>		
	<i>N</i>	geschnitten		<i>N</i>	geschnitten	<i>N</i>	geschnitten	
		313 bp	341 bp		365 bp		104 bp	128 bp
<b>Attapeu</b>	214	214	0	217	0	217	0	217
<b>Namtha</b>	99	99	0	99	0	94	0	94
<b>gesamt</b>	313	313	0	316	0	311	0	311

Mut. = Mutation

## 5. *Diskussion*

### 5.1. *Methodische Aspekte*

#### 5.1.1. *Durchführung und Nutzen von in-vivo-Sensitivitätstest*

Grundlage der Studien in Laos war das Protokoll der WHO „Assessment of therapeutic efficacy of antimalarial drugs for uncomplicated malaria for areas with low or moderate transmission“ (Draft March 2001). Dieses Protokoll befindet sich derzeit in Überarbeitung. Auf einer Konferenz der WHO in Genf im Dezember 2001 wurden die Protokolle für *in-vivo*-Sensitivitätstests in Gebieten mit starker Transmission sowie Gebieten mit mittlerer oder schwacher Transmission diskutiert und Vorschläge für eine Revision erarbeitet [96].

Für Laos wurde das Protokoll in Zusammenarbeit mit dem Gesundheitsministerium und der WHO an lokale Bedingungen angepasst. Das Mindestalter wurde von 6 auf 12 Monate angehoben, um eine sichere Medikamenteneinnahme bei Kleinkindern zu gewährleisten. In der Provinz Luang Namtha wurden, wahrscheinlich saisonal bedingt, sehr geringe Parasitendichten diagnostiziert. Um eine statistisch ausreichende Patientenzahl zu erreichen, wurde hier die initiale Parasitendichte auf 400 Parasiten/ $\mu$ l herabgesetzt. Die Auswertung der Therapieergebnisse erfolgte getrennt für Patienten mit mehr oder weniger als 1000 Parasiten/ $\mu$ l an Tag Null. Da sich aber kein signifikanter Unterschied zwischen beide Gruppen zeigte, konnten beide gemeinsam diskutiert werden. Die maximale Parasitendichte am Tag Null wurde vor Beginn der Studien von 20.000/ $\mu$ l im Protokoll auf 50.000/ $\mu$ l erhöht. Nach der ersten Screeningwoche im Studiengebiet Attapeu zeigten sich gehäuft Fälle von unkomplizierter Malaria mit Parasitämien über 50.000/ $\mu$ l, die laut Protokoll von der Studie ausgeschlossen werden mussten. Da dies zu einer Verschiebung der Ergebnisse führen könnte, wurde das Einschlusskriterium auf maximal 100.000 Parasiten/ $\mu$ l erhöht. Diese Erfahrungen wurden auch auf der Konferenz der WHO bestätigt, die für ein revidiertes Protokoll eine Begrenzung der initialen Parasitendichte auf 100.000 Parasiten/ $\mu$ l für Gebiete mit mittlerer oder schwacher Transmission vorschlug.

Das verwendete WHO Protokoll bestimmte Nachverfolgungsperioden von 28 Tagen, die auch auf 14 Tage verkürzt werden konnten. Aus logistischen Gründen entschieden wir uns in Laos für einen 14tägigen Follow-up. In den untersuchten Gebieten nimmt die Bevölkerung, vor allem die ethnischen Minderheiten, kaum Gesundheitsfürsorge in Krankenhäusern oder Gesundheitsstationen in Anspruch. Daher erfolgte sowohl Screening, als auch Behandlung und Follow-up der Patienten überwiegend in ihren

Dörfern (Attapeu 79%, Luang Namtha 92%). Aufgrund der schwierigen Infrastruktur und dem schlechten Zustand der Straßen in der Regenzeit war daher nur ein 14tätiger Follow-up technisch durchführbar. Die Studien erfassten damit vorwiegend schwere und mittlere Resistenzen (RII, RIII) der Studienmedikamente. Bei leichten Resistenzen (RI) können Rekrudeszenzen erst 14-56 Tage nach Therapiebeginn entdeckt werden. Dem trägt auch die WHO Konferenz Rechnung. Das revidierte Protokoll schlägt medikamentenabhängige Nachverfolgungsperioden in Abhängigkeit von der Halbwertszeit der Substanzen bzw. ihrer aktiven Metaboliten im Wirtsorganismus vor. Für CQ wurden 28 Tage, für S/P 42 Tage und für Mefloquin 63 Tage diskutiert [96].

Bei der Bewertung der Studienergebnisse beider *in-vivo*-Studien ist es wichtig, die relative kurze Nachverfolgungsperiode von 14 Tagen zu berücksichtigen. Die Ergebnisse spiegeln ein realistisches Bild der Resistenzlage bezogen auf schwere und mittlere Resistenzen (RII, RIII) wieder. Um zusätzliche Informationen über vorhandene Teilimmunität innerhalb der Studienpopulation zu erhalten, können die Ergebnisse der nichtimmunen Kinder (1-5 Jahre) mit denen der älteren Kinder und Erwachsenen verglichen werden. Bei nichtimmunen Patienten führen Resistenzen gegen das Medikament fast immer zu Therapieversagen. Bei vorhandener Immunität dagegen unterstützt das Immunsystem die reduzierte Wirkung des Medikamentes und trotz vorhandener Resistenz wird der Patient geheilt. Daher zeigen die Ergebnisse bei Kindern auch in Gebieten mit mittlerer und schwacher Transmission deutlicher die tatsächliche Resistenzsituation.

Um die Studien zu verwirklichen, wurden jeweils innerhalb von 3 Monaten in Attapeu 1773 Patienten untersucht und 119 (6,7%) in die Studie aufgenommen, in Luang Namtha 1792 Patienten für 82 (4,6%) Studienpatienten. Das Studienteam bestand aus 4 bis zu 10 Personen, die die Patienten im Krankenhaus aber vor allem in den Dörfern therapierten und betreuten. Dies gibt einen Hinweis auf die zeit-, personal- und kostenaufwendige Durchführung von *in-vivo*-Resistenzstudien. Um regelmäßig die Daten zu aktualisieren und direkt auf Veränderungen reagieren zu können, sind schnellere und kostengünstigere Methoden zur Resistenzbestimmung notwendig.

### **5.1.2. Induktion von *in-vitro*-Resistenz**

Da Malarone® vor allem aus finanziellen Gründen nicht als Standardtherapeutika in endemischen Gebieten eingesetzt wird, liegen derzeit wenig Daten von Resistenzfällen nach Malarone®-Behandlung vor. Aber das sporadische Auftreten von *in-vivo*-Resistenzen bei Reiserückkehrern nach Europa zeigt, dass sich Resistenzen sehr schnell entwickeln können. Für die Untersuchung der zugrundeliegenden Resistenzmechanismen können *in-*

*in vitro*-Methoden zur Resistenzinduktion eingesetzt werden. Hierbei werden bei Laborstämmen unter Medikamentendruck Resistenzen induziert und resistente Parasitenpopulationen selektiert. Grundsätzlich gibt es hierfür 2 Möglichkeiten, die Infektion des Menschen zu simulieren.

- (a) Man arbeitet mit dem humanpathogenen Erreger *Plasmodium falciparum*, der in Blutkultur mit humanen Erythrozyten kultiviert wird. Nachteil ist hierbei, dass keine wirtsspezifischen Reaktionen berücksichtigt werden. Parasiten mit Mutationen, die zu einer Schwächung der Überlebensfähigkeit führen, werden *in vivo* durch das Immunsystem vernichtet. In *in-vitro*-Kultur können sie bei optimalen Kulturbedingungen überleben und sich unter Medikamentendruck bei vorhandenem Selektionsvorteil vermehren.
- (b) Um wirtsspezifische Reaktionen zu berücksichtigen, können Resistenzen im Mausmodell induziert werden. Als Erreger werden *Plasmodium berghei* oder *P. lasmodium yoelii* verwendet. Dabei muss diskutiert werden, inwieweit die Vorgänge bei den verschiedenen Plasmodium spezies gegenseitig übertragbar sind. Z.B. zeigen Wirksamkeitsstudien von antiplasmodialen Substanzen, dass Ergebnisse im Mausmodell nicht immer auf den Menschen übertragbar sind.

Wir haben uns für *Plasmodium falciparum* in Laborkultur entschieden, um mit dem humanpathogenen Erreger zu arbeiten und Tierversuche zu vermeiden. Als Ausgangsstamm wurde K1 verwendet, ein Standardlaborstamm, der in Thailand isoliert wurde und Resistenzen gegen Chloroquin und Pyrimethamin zeigt [84,26]. Dem Kulturmedium wurde Atovaquon allein oder in Kombination mit Cycloguanil zugesetzt. Cycloguanil ist der aktive Metabolit von Proguanil, dem Kombinationspartner in Malarone®. Das Verhältnis von Atovaquon zu Cycloguanil von 8,33 wurde berechnet auf der Grundlage eines Verhältnisses von 2,5:1 in Malarone®-Tabletten und einer 30%igen Metabolisierung von Proguanil zu Cycloguanil [21,66]. Beginnend bei einer Atovaquonkonzentration im Medium von 5 nM konnte sie schrittweise gesteigert werden bis zu 200 nM Atovaquon bzw. Atovaquon/Cycloguanil, welche die Kulturen tolerierten. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Wahl von K1, einem mehrfach resistenten Laborstamm, die Resistenzentwicklung erleichterte. Rathod et. al (1997) [65] zeigten, dass unterschiedliche Parasitenstämme Resistenz zu Atovaquon sowie einer weiteren Substanz mit anderem Wirkmechanismus mit unterschiedlicher Häufigkeit entwickelten. Bei geringer Ausgangsparasitämie waren alle Stämme sensitiv gegenüber den getesteten Substanzen, Kreuzresistenzen waren nicht vorhanden. Bei steigender Ausgangsparasitämie zeigten solche Stämme eine schnellere und häufigere

Resistenzentwicklung, die bereits zu herkömmlichen Malariamitteln hochgradig resistent waren. Obwohl die Ursachen nicht bekannt sind, scheinen Stämme mit vorhandener Resistenz verstärkt Anlagen zu besitzen, um zu strukturell und mechanistisch völlig anderen Substanzen Resistenzmechanismen zu entwickeln. Studien zur Resistenzinduktion *in vitro* bei *Plasmodium falciparum* sollten daher vorrangig mit den Laborstämmen W2 [54], Dd2 [33], K1 oder FCR3 [42] durchgeführt werden.

### **5.1.3. Untersuchung von Genotypen zur Resistenzbestimmung**

Die Bestimmung molekularer Resistenzmarker beruht auf der PCR-RFLP Methode. Proben werden im Endemiegebiet auf Filterpapier gesammelt, getrocknet, in ein Untersuchungslabor transportiert und dort analysiert. Die DNA wird extrahiert, der zu untersuchende Genabschnitte amplifiziert und der Genotyp durch Restriktionsanalyse bestimmt. Die Sensitivität der Analyse ist unter anderem von der Stabilität der DNA abhängig. Hierbei haben Trocknung und Lagerung der Filterpapierproben den größten Einfluss [24]. Eine vergleichende Untersuchung dieser Bedingungen zeigte, dass im Gegensatz zu Blutproben, die durchgängig bei 4°C aufbewahrt wurden, die Verwendung von Filterpapier zu einer 10fachen Sensitivitätsabnahme führte. In einem Beobachtungszeitraum von 30 Tagen war kein Unterschied zwischen 4°C und 20°C Lagertemperatur festzustellen. Zu einem 100fachen Sensitivitätsverlust führte die Lagerung bei 30°C und 60% Luftfeuchtigkeit. Schnelles Trocknen bei Sonnenlicht steigerte die Sensitivität um 10% verglichen mit längerem Trocknen bei 20°C. Ultraviolettes Licht durch direkte Sonneneinstrahlung schien nicht zu DNA-Abbau zu führen. Interessanterweise hatte bei diesen Untersuchungen auch das verwendete Filterpapier Einfluss. Bei unseren Studien verwendeten wir Whatman Paper #917 sowie in Luang Namtha zusätzlich in Laos erhältliches Filterpapier. Es ist möglich, dass die generell geringere Sensitivität bei diesen Proben auch durch die Eigenschaften des hier verwendeten Papiers bedingt ist. Die Trocknung erfolgte bei Sonnenlicht, die Proben wurden einzeln in verschließbare Tüten mit Trockenmittel (Silikagel) verpackt, nach München transportiert und hier bei -20°C gelagert. Ein Teil der Proben aus Namtha wurde erst 6 Monate später nach München gebracht. In Laos erfolgte die Lagerung dieser Proben bei Raumtemperatur und ohne Trockenmittel. Ein Abbau der DNA unter diesen Bedingungen ist wahrscheinlich und könnte zu einer geringeren Anzahl an positiven PCR-Reaktionen führen und die geringere Sensitivität der Methode bei diesen Proben erklären.

Zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität der Untersuchungen werden geschachtelte, sogenannte „nested PCR“ eingesetzt [74]. Durch ein zweites Paar von Primern, das innerhalb der Sequenz des ersten Primerpaars anlagert, können falsche Amplifizierungsprodukte der ersten Runde ausgesondert werden. Die zweifache Amplifizierung erhöht außerdem die Sensitivität der Methode aber auch die Kontaminationsgefahr, so dass besonders sorgfältiges Arbeiten an definierten Arbeitsplätzen für die verschiedenen Schritte notwendig ist. Die RFLP- Methode verlangt spezifische Schnittstellen, die durch Nukleotidwechsel der Primersequenz eingebracht werden können. Diese Sequenzfehler können durch schlechteres Anlagern an die Ausgangs-DNA zu einer Abnahme der Sensitivität führen. Bei der Evaluierung wurde dies bei dem Primer CYTb7 deutlich, der 2 Nukleotidwechseln aufweist, und bei der Evaluierung (CYTb2/CYTb7) nur 84% Sensitivität zeigte im Vergleich zu 90% bzw. 95% mit den anderen Primerpaaren. Außerdem besteht vermehrt die Gefahr unerwünschter Anlagerungen und Amplifikationen. Obwohl bei abnehmenden Annealingtemperaturen diese Anlagerungen statistisch häufiger auftreten, konnte in diesem Fall durch Temperatursenkung die Intensität der Nebenbanden verringert werden.

Die Optimierungsexperimente zeigten, dass die Erhöhung der Zyklenzahl in der ersten PCR auch zu verstärkten DNA-Banden in der zweiten Runde führte. Durch den Übertrag von DNA-Lösung aus der ersten in die zweite PCR-Reaktion können aber auch äußere Primer mit überführt werden. Diese scheinen speziell bei den Primerkombinationen CYTb2/CYTb6 und CYTb2/CYTb7 zu ungewünschten Nebenprodukten zu führen. Durch Konkurrenz der Produkte kam es gleichzeitig zu verminderter Amplifizierung des gewünschten Produktes. Eine Verringerung der Primerkonzentration in der ersten PCR führte hier zur Verminderung von Nebenbanden und einer verstärkten Ausbeute an der gewünschten Bande. Dies ist wichtig, da von der Reaktionslösung 25% in die Restriktionsanalyse eingesetzt werden, wo es dann zu einer weiteren Verdünnung (1:4) der DNA kommt. Bei sehr schwachen PCR-Banden ist daher trotz positiver PCR eine Auswertung nach Enzymverdau nicht mehr möglich.

### **5.2. Resistenzlage in Laos – Auswertung der *in-vivo*-Sensitivitätsstudien**

Laos gehört zu den ärmsten Ländern der Welt, die Hälfte der ca. 5 Millionen Einwohner lebt unterhalb der Armutsgrenze (World Bank 1999). Offizielle Statistiken geben 200.000 bis 300.000 Malariaerkrankungen im Jahr an und 300 bis 500 Todesfälle. Dies gibt nur teilweise die Malariasituation im Land wieder. Untersuchungen von öffentlicher Seite zeigten, dass nur 14% der Befragten bei einer Erkrankung staatliche Gesundheitshilfe in

Anspruch genommen haben. Sehr wenig Daten waren zur Resistenzsituation bekannt, aber eine abnehmende Tendenz der Wirksamkeit von Chloroquin erkennbar [20,32,81]. Nationale Empfehlungen gaben Chloroquin als Mittel der ersten Wahl und Sulfadoxin/Pyrimethamin als Mittel der zweiten Wahl für die Behandlung der unkomplizierten Malaria in Laos an. Dies steht im Widerspruch zu Erfahrungen aus Nachbarländern, wo starke Resistenzen gegen Chloroquin und auch Sulfadoxin/Pyrimethamin berichtet werden und Therapieempfehlungen geändert wurden. In 2 Studien wurde die *in-vivo*-Sensitivität von Standardtherapeutika in 2 Malariaendemiegebieten in Laos untersucht. Die Studienprovinz Attapeu im Südwesten des Landes grenzt an Vietnam und Kambodscha. Das 2. Studiengebiet befand sich in der nordöstlichen Provinz Luang Namtha in der Grenzregion zu China und Myanmar. In beiden Studien wurde die Wirksamkeit von Chloroquin und S/P untersucht, die Mittel der ersten Wahl für die Behandlung der unkomplizierten Malaria in Laos sind. Sulfadoxin/Pyrimethamin erwies sich in beiden Studien in ca. 80% der Fälle sensitiv (Attapeu 81%, Namtha 82%). Chloroquin zeigte Wirksamkeiten um 50% im 14tägigen Follow-up mit 55% in Attapeu und 47% in Namtha. Diese Ergebnisse korrelieren mit Daten aus Vang Vieng in Zentrallaos, wo unter Chloroquin -Behandlung bei 28tägigem Follow-up 54% der Fälle sensitiv reagierten [59]. Damit zeigte sich ein relativ stabiles Resistenzmuster innerhalb von Laos, das zu der Resistenzsituation in den angrenzenden Ländern kontrastiert [94]. In der Provinz Yunnan, China, wurden 9% *in-vivo*-Sensitivität zu Chloroquin gefunden [38] sowie *in-vitro*-Resistenzen von 95%-100% [101]. Studien in Myanmar zeigten *in-vivo*-Sensitivitäten von ca. 50% sowohl für Chloroquin als auch für Sulfadoxin/Pyrimethamin (bei 14tägigem Follow-up) [22,73]. Damit scheinen höhergradige Resistenzen in Grenzgebieten keinen Einfluss auf die Resistenzentwicklung in Laos zu haben. Vor allem die Wirkung von Sulfadoxin/Pyrimethamin ist effektiver im Vergleich zu den Nachbarländern. Eine Ursache könnte der seltene Gebrauch als Antimalariamittel im Laos sein. Obwohl es offiziell als Mittel der zweiten Wahl angegeben wird, ist sein Einsatz in Krankenhäusern und auf dem privaten Sektor nicht sehr verbreitet. Damit konnte es noch nicht zu einer Selektion potentiell resistenter Stämme in den Endemiegebieten kommen. Dass auch hier bereits resistenzassoziierte Mutationen in der Parasitenpopulation vorhanden sind, zeigen molekularbiologische Untersuchungen der Proben der Studie in Attapeu [4]. Die Bestimmung der Resistenzmarker ergab eine Prävalenz der 108-Asn-Mutation sowie der 59-Arg-Mutation auf dem *dhfr*-Gen von mehr als 80% unter den sensitiven Isolaten und 100% bei Therapieversagern nach S/P-Behandlung. Auf dem *dhps*-Gen wurde die 437-Mutation bei mehr als 25% der sensitiven Isolate und bei 60 -86% der resistenten Isolate gefunden. In geringerem Ausmaß waren

auch *dhps*-Mutationen an den Positionen 436, 540 und 581 nachweisbar sowie *dhfr*-Mutationen an Position 51. Bei fast allen analysierten Resistenzmarkern war eine erhöhte Prävalenz bei den Proben erkennbar, die nicht auf die Studientherapie ansprachen. Unter Medikamentendruck ist daher im Studiengebiet eine Selektion der resistenten Stämme und damit ein rascher Abfall der therapeutischen Wirksamkeit zu erwarten. Damit stellt Sulfadoxin/Pyrimethamin trotz der aktuell ermittelten Wirksamkeit von ca. 80% *in vivo* keine Alternative dar, um Chloroquin als Mittel der ersten Wahl bei der Behandlung der unkomplizierten Malaria in Laos zu ersetzen.

Auf einer Technical Consultation der WHO über Strategien der Malariatherapie [96] wurde als kostengünstige Alternative zu Chloroquin die Kombination von Chloroquin und Sulfadoxin/Pyrimethamin diskutiert. Durch die gemeinsame Administration soll die weitere Ausbreitung von Resistenzen gegen Sulfadoxin/Pyrimethamin verzögert und durch die zusätzliche Gabe von Chloroquin eine bessere Kontrolle der klinischen Symptome innerhalb der ersten Tage und dadurch eine höhere Compliance der Patienten erreicht werden. Um die Wirksamkeit einer solchen Kombinationstherapie in Laos zu untersuchen, wurde in Attapeu ein Studienarm mit der Kombination behandelt. Hinsichtlich der therapeutischen Wirksamkeit zeigte sich kein Vorteil gegenüber der Monotherapie mit Sulfadoxin/Pyrimethamin (83% vs. 82% ACPR; RR=1,01, 95%CI 0,8-1,3). Dieses Ergebnis bestätigt Daten aus vorangegangenen Studien [5,14,50]. Als weiterer Vorteil wurde die antipyretische Wirkung von Chloroquin diskutiert. Tarimo et al. 2002 [80] zeigten eine signifikant stärkere fiebersenkende Wirkung durch die Kombination von Chloroquin und Sulfadoxin/Pyrimethamin verglichen mit Sulfadoxin/Pyrimethamin allein. Die Fieberreduktion entsprach der Wirkung von gleichzeitiger Gabe von S/P und Paracetamol. Diesen Effekt konnten wir in unserer Patientenpopulation nicht beurteilen, da nur 19% der Studienpatienten am Tag 0 Fiebersymptome (>37,5°C) zeigten. Aufgrund der spezifischen Wirkung von Sulfadoxin/Pyrimethamin auf Trophozoiten im späten Stadium wird von einer Chloroquin-Koadministration eine schnellere parasitenreduzierende Wirkung erwartet [93]. Wir untersuchten die Verringerung der Parasitämie unter Studientherapie am Tag 3. In unserer Studie war die Parasitenreduktion unter Chloroquin-Behandlung signifikant geringer als mit Sulfadoxin/Pyrimethamin oder Sulfadoxin/Pyrimethamin und Chloroquin. Die Kombination mit Chloroquin ergab aber keine Verbesserung der parasitenreduzierenden Wirkung gegenüber der Sulfadoxin/Pyrimethamin Monotherapie (RR=1,01; 95%CI 0,7-1,4). Dies wurde auch bei einem Vergleich von 7 Studien bestätigt, der zeigte, dass die Verringerung der Parasitenzahl am Tag 7 und 28 mit der Kombination nicht höher war als mit S/P-

Monotherapie<sup>[49]</sup>. Damit stellt die Kombinationstherapie von Sulfadoxin/Pyrimethamin mit Chloroquin keine therapeutische Alternative dar für die Malariabehandlung im Studiengebiet. Da eine Verzögerung der Resistenzentwicklung gegen Sulfadoxin/Pyrimethamin auf der Annahme beruht, dass in Kombination mit Chloroquin eine bessere parasitäre Kontrolle erreicht werden kann, und dadurch die Verbreitung resistenter Parasiten gehemmt wird, erscheint auch dieser positive Effekt einer Kombinationstherapie eher unwahrscheinlich.

Als weitere Alternative bei einem Wechsel der Therapieempfehlungen für Malaria wurde der Einsatz von Mefloquin als Monotherapie diskutiert. In Thailand wurde Mefloquin zuerst in fixer Kombination mit Sulfadoxin/Pyrimethamin eingeführt, was aber eine rasche Entwicklung und Ausbreitung von Resistenz zu Mefloquin nicht verhindern konnte. Für die Monotherapie wurde die therapeutische Dosis von 15 mg/kg Körpergewicht auf 25 mg/kg erhöht, wodurch die klinische und parasitologische Wirksamkeit verbessert werden konnte<sup>[83]</sup>. Sehr gute Heilungsraten wurden in Gebieten mit multiresistenter Falciparum-Malaria mit der Kombination von Mefloquin und Artesunate (3-Tage-Therapie) erreicht und scheinen sich seit der Einführung 1995 bis heute als stabil zu erweisen<sup>[53]</sup>. In Laos wurde Mefloquin aus Kostengründen bisher noch nicht eingesetzt und es lagen keine Daten zur Wirksamkeit *in vivo* in diesem Gebiet vor. Daher wurde die Effektivität der Monotherapie mit 25 mg/kg in der Provinz Attapeu getestet. Innerhalb der Nachverfolgungsperiode von 14 Tagen erwies sich Mefloquin in 100% der Fälle als wirksam. Damit war die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Therapie unter Mefloquinbehandlung 1,8 mal größer verglichen mit Chloroquin ( $1,31 < RR < 2,52$ ), und 1,2 mal verglichen mit Sulfadoxin/Pyrimethamin oder der Kombination Chloroquin + S/P ( $1,02 < RR < 1,45$ ;  $1,00 < RR < 1,44$ ). Berücksichtigt man allerdings die lange Halbwertszeit von Mefloquin (10-40 Tage), können innerhalb von 14 Tagen nur schwer- und mittelgradige Resistenzen erfasst werden. Zu einer klinischer Rekrudescenz beim Patienten kann es erst dann kommen, wenn die Plasmakonzentration unter die maximal tolerierbare Konzentration vorhandener resistenter Parasiten abgesunken ist und damit eine selektive Vermehrung der resistenten Population möglich ist. Einige Autoren schlagen daher Nachverfolgungsperioden von 42-56 Tagen vor, um auch geringgradigere Resistenzen unter Mefloquinbehandlung zu entdecken<sup>[73,82]</sup>.

Teilimmunität zum Schutz vor Malariaerkrankung entwickelt sich im Kindesalter nach häufiger Infektion. Sie ist ca. ab dem 5. Lebensjahr an wirksam und führt zu mildereren oder asymptomatischen Krankheitsverläufen. Während bei teilimmunen Erwachsenen auch Medikamente mit abnehmender Wirksamkeit zur Heilung führen können, zeigen Kinder

unter 5 Jahren häufiger Rekrudeszenzen. In Gebieten mit starker Transmission werden Sensitivitätsstudien daher nur bei kleinen Kindern durchgeführt. In Gebieten mit mittlerer oder saisonaler Transmission geben die Ergebnisse bei sehr jungen Patienten einen Hinweis auf die tatsächliche Resistenzlage. In der Studie in Attapeu gehörten 33% der ausgewerteten Patienten zur Altersgruppe der 1-5jährigen. Diese Gruppe zeigte in der Gesamtauswertung ein ca. dreifaches Risiko, auf die Studientherapie nicht adäquat anzusprechen (RR=2,97). Leider waren die Fallzahlen pro Studienarm zu gering, um die Ergebnisse pro Studienmedikament auszuwerten. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Studie in Luang Namtha mit einem 1,7fach erhöhten Risiko in der Altersgruppe der 1-5jährigen; einem Ergebnis, das statistisch nicht signifikant ist und daher nur einen Trend angibt. Diese Unterschiede weisen auf eine verschiedene Transmissionslage in den beiden untersuchten Gebieten hin. Während wir in Attapeu am Ende der Regenzeit und damit in den Monaten der höchsten Transmission Patienten rekrutierten, zog sich die anschließende Studie in Luang Namtha bis in die folgende Trockenzeit hinein.

### **5.3. Mutationen am Cytochrom-b-Gen von *Plasmodium falciparum* bei *in-vitro*- und *in-vivo*-Resistenz zu Atovaquon**

Der Wirkmechanismus von Atovaquon beruht auf einem Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials und der dadurch bewirkten Hemmung der parasitären Atmungskette<sup>[75]</sup>. Punktmutationen auf dem Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Gen von *P. falciparum* wurden mit Atovaquon-Resistenz assoziiert <sup>[43]</sup>. Unsere Untersuchungen verglichen Sequenzänderungen nach Resistenzinduktion *in vitro* bei Laborstämmen mit wahrscheinlich spontan auftretender Resistenz *in vivo*. Wir sequenzierten einen Abschnitt des Cytochrom-b-Genes von *Plasmodium falciparum*, Stamm K1, nach Behandlung mit Atovaquon allein oder in Kombination mit Cycloguanil, dem aktiven Metaboliten von Proguanil. Kulturen, die Mediumkonzentrationen von  $2 \times 10^{-8}$  bis  $2 \times 10^{-7}$  M Atovaquon oder Atovaquon plus Cycloguanil tolerierten, zeigten eine Punktmutation an Position 133 (ATG zuAT**7**) mit einem resultierenden Aminosäurewechsel von Methionin zu Isoleucin (M133I). Die Kultur, die  $2 \times 10^{-7}$  M Atovaquon überlebte, wies eine zusätzliche Mutation an Position 271 auf (TTA zu TT**C**) mit einem Aminosäurewechsel von Leucin zu Phenylalanin (L271F). Diese Mutation wurde nicht bei Behandlung mit Atovaquon plus Cycloguanil entdeckt. Die Mutation M133I wurde bereits zweimal in der Literatur beschrieben, bei atovaquonresistenten Stämmen von *Plasmodium berghei* (Mausmodell) und bei Laborstämmen von *Plasmodium falciparum* nach ähnlicher Behandlung mit Atovaquon <sup>[42,78]</sup>. Allerdings wurden sie bei diesen Experimenten jeweils durch einen Wechsel von G

zu A (**ATA**) hervorgerufen, im Unterschied zur ATT-Mutation bei unserem Stamm Ato200. Bei *Plasmodium falciparum* konnte die M133I Mutation als initiale Veränderung unter Medikamentendruck nachgewiesen werden, die wahrscheinlich zu einer sterischen Veränderung der Bindungsstelle führt und damit die Atovaquonbindung verringert. Tandemmutationen mit einem weiteren Wechsel in dem Bereich von Kodon 272 bis 280 führten zur Resistenzsteigerung. Obwohl diese Mutationen nicht im Bereich der vorhergesagten Bindungsstelle liegen, scheinen sie die Veränderung durch die M133I Mutation zu verstärken. Dieser Effekt zeigte sich auch bei unserer Linie Ato200 mit der Doppelmutation von M133I und L271F, eine Änderung, die wir nur bei der höchsten Atovaquonkonzentration nachweisen konnten. Eine Mutation an Kodon 271 (L271V) wurde schon bei einer Atovaquon-resistenten Linie von *Plasmodium yoelii* beschrieben, wo sie in Kombination mit der K272R Mutation auftrat [75].

Parallel zu den Untersuchungen an induzierter Resistenz sequenzierten wir einen Therapieversager nach Selbstbehandlung mit Malarone. Ein 28jähriger Reisender in Mali nahm nach positivem Malariaschnelltest (Malaquick®) die vorgeschriebene Dosis Malarone® ein. Vier Wochen später präsentierte er sich im Tropeninstitut München mit Fieber und 1,5% Parasitämie und wurde erfolgreich mit Riamet® (Lumefantrine and Artemether) behandelt. Eine Blutprobe auf Filterpapier wurde für molekularbiologische Untersuchungen erhalten. Die Sequenzierung des parasitären Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Genes ergab eine Punktmutation an Position 803 des Cytochrom-Genes, die zu einem Aminosäureaustausch am Kodon 268 von Thyrosin (TAT) zu Serin (TCT) führte. Die gleiche Mutation wurde auch bei einem dänischen Patienten nachgewiesen, der mit Malarone® behandelt wurde. Blutproben des Patienten vor Beginn der Behandlung zeigten keine Mutation am Parasitencytochrom. Nach Auftreten der Rekrudescenz konnte dann die Y268S Mutation nachgewiesen werden (Kim David, Michael Alifrangis).

Eine Mutation am Kodon 268 wurde erstmals bei einer atovaquonresistenten Linie von *Plasmodium yoelii* beschrieben [75]. Durch die Behandlung infizierter Mäuse mit Atovaquon wurden 4 resistente Parasitenlinien erhalten mit unterschiedlichen Punktmutationen auf dem Cytochrom-Gen im Bereich von Kodon 258 bis 272. Ein Vergleich der EC<sub>50</sub> ergab den stärksten Wirkungsabfall um Faktor 1700 bei der Mutation an Kodon 268 mit einem Wechsel von Thyrosin (TAT) zu Cystein (**TCT**). Beim Menschen wurde die erste mit Atovaquonresistenz assoziierte Mutation aus Thailand berichtet. Dieser Patient wurde im Rahmen einer Studie mit Atovaquon und Pyrimethamin behandelt. Das parasitäre Cytochrom-b-Gen wies die Y268S Mutation auf (TAT zu **TCT**) [43,47]. Fivelmann et al. beschrieben die erste molekular bestätigte Resistenz nach Malarone®-Therapie bei einem

Reiserückkehrer aus Nigeria [26]. Die Sequenzierung ergab ebenfalls eine Mutation am Kodon 268, allerdings wurde hier Thyrosin durch Asparagin ausgetauscht (TAT zu **AAT**) mit einem Nukleotidwechsel in Nachbarposition. Färnet et al. 2003 [25] berichteten von einer Mutter und 2 Kindern, die nach ihrer Rückkehr von der Elfenbeinküste an Falciparum-Malaria erkrankten. Während das eine Kind einen frühen Therapieversager aufwies (keine Verringerung der Parasitämie an Tag 2) aber keine Mutation am Cytochrom b nachweisbar war, zeigte das zweite Kind Rekrudescenz nach 28 Tagen sowie die Y268S Mutation auf den Cytochrom-b-Gen. Bei der Mutter wurde ebenfalls die Y268S Mutation nachgewiesen, die Behandlung mit Malarone® verlief allerdings erfolgreich. Bei ihr könnte eine Teilimmunität eine Rolle gespielt haben. Ein weiterer Fall wurde in Kopenhagen analysiert (Kim David, Michael Alifrangis). Ein Malariapatient nach Rückkehr aus Kamerun wurde mit Malarone® behandelt und entwickelte eine Rekrudescenz. Die Sequenzierung der Blutproben ergab vor Therapiebeginn einen Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Wildtyp und nach Rekrudescenz die Y268S-Mutation.

Der Vergleich dieser Fälle von Malarone®-Therapieversagen bei importierter Malaria nach Europa zeigt:

1. Späte Therapieversager (Rekrudescenzen) traten bei allen Patienten nach ca. 4 Wochen auf und Blutproben, die zu diesem Zeitpunkt genommen wurden, wiesen eine Mutation am Kodon 268 auf.
2. Bisher wurde ein Fall von frühem Therapieversagen berichtet. Hier bestand kein Zusammenhang mit Cytochrom-b-Mutationen. Da die Serumkonzentration an Atovaquon bestimmt wurde und oberhalb der vorgeschlagenen therapeutischen Grenze lag, kann eine verminderte Bioverfügbarkeit als Ursache ausgeschlossen werden. Damit müssen noch weitere Mechanismen für ein Fehlschlagen der Kombinationstherapie diskutiert werden.
3. Nur von 3 Patienten sind Isolate vor Beginn der Therapie vorhanden. Bei dem Patienten aus Kopenhagen lag vor Behandlungsbeginn der Wildtyp vor und nach Auftreten einer Rekrudescenz ein 268S-Mutationstyp. Bei 2 Patienten in Stockholm konnte bereits vor Beginn der Therapie ein 268S-Mutationstyp nachgewiesen werden, allerdings entwickelte nur einer der beiden Patienten eine Rekrudescenz.
4. Alle Patienten infizierten sich in Westafrika. Die Resistenzentwicklung war damit unabhängig vom Medikamentendruck, da Malarone® aus Kostengründen in Afrika nicht verbreitet eingesetzt wird. Die Analyse etablierter molekularer Resistenzmarker bei importierten Isolaten aus Afrika zeigte, dass in Westafrika eine signifikant höhere Prävalenz an resistenzassoziierten Mutationen im Vergleich zu den übrigen Regionen

vorherrschend [41]. Dieser hohe Anteil multiresistenter Genotypen könnte die Resistenzentwicklung zu mechanistisch neuen Substanzen wie Atovaquon erleichtern. Wie Rathod et al. bei Experimenten *in vitro* zeigten, ist die Frequenz der Resistenzinduktion von der vorhandenen Resistenz in der Vorgeschichte abhängig. So konnte Resistenz zu Atovaquon am leichtesten bei dem hochgradig multiresistenten Stamm W2 induziert werden, während bei den sensitiven Isolaten HB3 und D6 keine Resistenzinduktion möglich war [66].

Die mitochondriale DNA von Malariaparasiten ist ungewöhnlich gut konserviert und evolutionäre Veränderungen verlaufen offenbar langsamer als bei Kern-DNA [49]. Bei einem Vergleich des 6 kb DNA-Moleküles zweier *Plasmodium falciparum* Stämme aus verschiedenen geografischen Regionen (HB3 - Zentralamerika, Dd2 - Südostasien) wurde nur ein Nukleotidwechsel beschrieben [86]. Sharma et al. verglichen die Cytochrom-b-Sequenz von 14 indischen Isolaten und 5 bereits sequenzierten Laborstämmen [69]. Die 5 Laborstämme stimmten zu 100% überein, zwölf der indischen Isolate zeigten einander identische Sequenzen, ein Isolat wich in einem Nukleotid ab. Gegenüber den bekannten Laborstämmen ergab sich eine Übereinstimmung von 99,7%. Nur ein klinisches Isolat zeigte 1,3 - 1,9% Abweichung. Betrachtet man diese hohe Sequenzstabilität innerhalb der Spezies, so wird deutlich, dass neu entstehende Mutationen des Cytochrom-Genes für den Parasiten Selektionsvorteile bringen müssen. Einmal vorhanden, scheinen sich Mutationen schnell innerhalb des mitochondrialen Genoms durchzusetzen. Bei *Plasmodium falciparum* wurden ca. 20 Kopien pro Zelle entdeckt, die als lineare Tandem-Concatemere vorliegen [62]. Diese für Eukaryoten ungewöhnliche Struktur und die damit zusammenhängende Replikation wird als Ursache für eine schnelle Verbreitung einer vorteilhaften Mutation innerhalb des mitochondrialen Genoms diskutiert [75,98].

Obwohl Atovaquon nicht mutagen wirkt, kann man einen indirekten Effekt auf die Entstehung von Mutationen nicht ausschließen. Die Hemmung des mitochondrialen Elektronentransportes auf der Ebene des Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Komplexes müsste zu einer Akkumulation von Ubichinon führen, welches leicht in der Lage ist, Elektronen abzugeben und dadurch freie Sauerstoffradikale zu bilden. Untersuchungen zur Mutagenese zeigten, dass die Einwirkung oxidativen Stresses auf DNA genauso wie  $\gamma$ -Strahlung hauptsächlich zur Entstehung von 8-oxo-2-deoxy-Guanin-Nukleotiden (8-oxo-dG) führt [89]. 8-oxo-dG kann bei der Replikation sowohl mit Adenin als auch mit Cytosin Paarungen bilden und damit Punktmutationen verursachen [70]. Dieser Mechanismus könnte die Ursache für das

relativ schnelle Auftreten von resistenzassoziierten Mutationen unter Malarone®-Therapie darstellen.

#### **5.4. Molekulare Resistenzmarker für die Therapie mit Atovaquone bzw. Atovaquon/Proguanil**

Der Vergleich der Mutationen *in vitro* mit *in-vivo*-Veränderungen zeigt, dass die M133I-Mutation bisher immer bei *Plasmodium falciparum* unter Atovaquon-Selektionsdruck *in vitro* auftrat. Obwohl sie auch bei *Plasmodium berghei* infizierten Mäusen induziert werden konnte, wurde sie bei Infektionen des Menschen bisher noch nicht beschrieben. *In-vivo*-Therapieversager beim Menschen konnten mit einer Mutation am Kodon 268 assoziiert werden. Von 6 bisher beschriebenen Therapieversagern mit Atovaquon-Kombinationstherapie wiesen 5 eine Mutation am Kodon 268 auf. Sensitivitätsbestimmungen der resistenten Isolate ergaben eine Abnahme der Sensitivität gegenüber Atovaquon um einen Faktor 1.000 bei Y268N bzw. 10.000 bei Y268S [26,43]. Damit stellen Sequenzänderungen an dieser Position mögliche Resistenzmarker für Therapieversager unter Malarone®-Behandlung dar. Die Methode muss dabei zwischen 3 Genotypen unterscheiden, dem TAT Wildtyp, der TCT Mutation und der AAT Mutation. Ob die verschiedenen Mutationen auch unterschiedliche Phänotypen bedingen, lässt sich bisher noch nicht voraussagen. In beiden Fällen wird die volumige und hydrophobe Aminosäure Thyrosin durch linearkettige Aminosäuren (Asparagin oder Serin) substituiert. Die dadurch veränderten sterischen Bedingungen an der Ubichinon-Bindungsstelle scheinen zu einer verminderten Affinität von Atovaquon und damit zur Abnahme der hemmenden Wirkung zu führen. Ein Vergleich der  $IC_{50}$  lässt spekulieren, ob der Ersatz durch die kurzkettigere Aminosäure Serin gegenüber Asparagin einen weiteren Wirkungsabfall um Faktor 10 verursachen könnte. Um diese These zu bestätigen, sind weitere Untersuchungen an resistenten Isolaten nötig sowie Berechnungen zu Molekülwechselwirkungen am Proteinmodell.

Alle Therapieversager traten nach Infektionen in Westafrika auf, wo Malarone® bisher nicht als Standardtherapeutikum verwendet wird und daher kein Medikamentendruck vorhanden ist. Es ist möglich, dass bei häufigem Gebrauch im Endemiegebiet weitere Mutationen selektiert werden, die bisher nur unter *in vitro*-Bedingungen auftraten. Dabei ist entscheidend, ob die Mutation zu einem Verlust von wichtigen biologischen Funktionen führt, die ein Überleben im Wirtsorganismus erschweren oder unmöglich machen. Die häufigste *in-vitro*-Substitution bei *Plasmodium falciparum* ist M133I. Peters et al. [58] untersuchten die relative Fitness von Laborstämmen mit der M133I Einfach- bzw.

Doppelsubstitution mit G280D. Bei den Versuchen zeigte sich ein Fitnessverlust von 5-9% bei der Doppelsubstitution aber keine Verminderung gegenüber dem Wildtyp bei der Einfachmutation M133I. Ein weiterer Hinweis ist das Auftreten der M133I Substitution bei infizierten Mäusen. Hier wurde die Mutation im Wirtsorganismus induziert und zeigte unter Wirtsbedingungen Selektionsvorteile. Dies lässt die Vermutung zu, dass es unter Atovaquon-Medikamentendruck auch *in vivo* zu einer Selektion der M133I Mutation kommen kann, die dann ebenfalls einen möglichen Resistenzmarker für die Malarone®-Therapie darstellt. Für die Entwicklung einer PCR-RFLP- Methodik zur Detektion von M133I-Mutationen wurden 4 Genotypen ausgewählt: der Wildtyp ATG, die Mutationen ATA und ATT sowie die theoretisch mögliche Kodierungssequenz ATC. Damit werden alle 3 Sequenzen erfasst, die für Isoleucin kodieren. Da bisher aber nur 2 Mutationen beschrieben wurden, wird sich ein Screening von Malariaprobe vorerst auf die beiden bekannten 133 Mutationen konzentrieren.

Der Nutzen dieser Resistenzmarker und ihr Vorhersagewert bei epidemiologischen Überwachungen sowie im diagnostischen Einzelfall zur Therapieermittlung kann erst durch weitere Untersuchungen bei Therapieversagern ermittelt werden. Dies kann im Rahmen klinischer Studien erfolgen oder innerhalb von länderübergreifenden Netzwerken, die Daten und Blutproben von importierten Infektionen aus praktisch allen Endemiegebieten vor und nach Behandlung sammeln und auswerten.

### **5.5. Prävalenz von Kodon 268 und Kodon 133 Polymorphismen in Laos**

In Laos wurde Malarone® aus Kostengründen bisher noch nicht zur Malariatherapie eingesetzt. Eine Selektion resistenzassoziierter Mutationen kann daher ausgeschlossen werden. Anhand der Proben aus den 2 Feldstudien sollte die medikamentenunabhängige Prävalenz von Polymorphismen an Kodon 268 und 133 ermittelt werden. Von insgesamt 338 Filterpapieren mit nachgewiesener *P. falciparum* DNA konnten 82% auf eine Y268N Mutation und 94% auf eine Y268S Mutation untersucht werden. Alle Ergebnisse zeigten eine Wildtypsequenz am Kodon 268. Für Kodon 133 wurden 94% der Proben auf die ATA Mutation und 92% auf die ATT Mutation untersucht. Alle untersuchten Proben zeigten die Wildtypsequenz. Dies bestätigt stichprobenartige Ergebnisse aus Indien, die eine hohe Sequenzstabilität innerhalb des mitochondrialen Genoms und speziell des Cytochrom-b-Gens zeigten [69]. Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass von den ca. 20 Kopien innerhalb des Mitochondriums Stränge mit Punktmutationen existieren, bzw. einige Parasiten innerhalb der Population im Wirt Zufallsmutationen aufweisen, die aber erst unter Medikamentendruck einen Selektionsvorteil zeigen. Die Häufigkeit der 268

Mutationen *in vivo* und die relativ schnelle Resistenzentwicklung nach Therapieeinführung weist sie als eine „Sollbruchstelle“ aus. Hier stößt vielleicht die Methodik an ihre Grenzen. Liegt ein Genotyp im großen Überschuss vor, kann es bei der exponentiellen Vermehrung der PCR zu einer Verdrängung kommen und der weniger vorhandene Genotyp ist daneben nicht detektierbar. Andererseits kann auch die Wirkung von Atovaquon und die damit zusammenhängende Induktion von oxidativem Stress zu einer Häufung von Punktmutationen unter Therapie führen. Dies würde das Fallbeispiel aus Kopenhagen erklären, bei dem mittels Sequenzierung vor Therapiebeginn ein Wildtyp und nach Rekrudescenz eine Mutation bestimmt wurde. Dem widerspricht andererseits die Analyse der Patientenproben in Göteborg, die beide die Y268S Mutationen bereits vor Therapiebeginn aufwiesen [25]. Diese Infektionen erfolgten wie alle anderen bekannten Resistenzen gegen Malarone®-Therapie in Westafrika. Es wäre daher interessant, Daten zu 268 Polymorphismen aus dieser Region zu erhalten und nachzuforschen, ob geographische Unterschiede in der Prävalenz der Mutationen des Cytochrom-b-Gens bestehen.

## 6. Zusammenfassung

Die zunehmende Resistenz von Malariaerregern gegen Standardtherapeutika bei gleichzeitig abnehmenden Ressourcen für die Forschung und Entwicklung neuer Wirkstoffe erschwert eine erfolgreiche Therapie und Prophylaxe der Malaria tropica. Um die jeweils adäquate Therapie für ein Endemiegebiet zu ermitteln, sind genaue Daten zur Resistenzsituation nötig. Neben Feldstudien werden hierfür auch verstärkt molekularbiologische Methoden eingesetzt. Während *in-vivo*-Sensitivitätsstudien bei relativ aufwendiger Durchführung Basisdaten zur Resistenzsituation am Studienort liefern, können durch die regelmäßige Auswertung von molekularen Resistenzmarkern schneller Veränderungen im Resistenzmuster erfasst werden, die zu einer Anpassung der Therapieempfehlungen im Endemiegebiet führen. Die eingesetzten Methoden zum Nachweis von Resistenz sollten schnell, zuverlässig und kostengünstig sein. Hierbei wird sowohl eine epidemiologisch wirksame Technik gesucht, die in der Lage ist, Veränderungen der Resistenzsituation schon im Anfangsstadium zu erkennen, als auch ein Mittel, um therapieentscheidende Diagnostik im Individualfall durchzuführen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in 2 Endemiegebieten in Laos die Wirksamkeit der Standardtherapeutika Chloroquin und Sulfadoxin/Pyrimethamin untersucht. Daten aus den Nachbargebieten wiesen auf hochgradige Resistenz gegen diese Mittel hin, welche dort teilweise nicht mehr zur Therapie empfohlen werden. Die Ergebnisse, die im Norden und im Süden des Landes erhalten wurden, zeigten ein übereinstimmendes Resistenzmuster. Einflüsse aus benachbarten Staaten scheinen auch in den Grenzregionen keinen starken Einflug auf die Resistenzentwicklung in Laos auszuüben. Chloroquin zeigte in dem 14-Tage-Test eine Wirksamkeit von ca. 50% und kann daher nicht mehr als Mittel der ersten Wahl empfohlen werden. Mit Sulfadoxin/Pyrimethamin wurden ca. 20% Therapieversager ermittelt. Wegen der langen Halbwertszeit wurden jedoch nur hochgradige Resistenzen erfasst. Die höhere Versagerrate bei Kindern gegenüber Erwachsenen weist generell auf eine ernstere Resistenzsituation und vorhandene Teilimmunität im Untersuchungsgebiet hin. Als mögliche Optionen für einen Therapiewechsel wurde Mefloquin getestet, dass innerhalb von 14 Tagen eine Wirksamkeit von 100% zeigte. Auch hier werden längere Testperioden empfohlen, um geringgradige Resistenzen zu erfassen. Schließlich wurde die Kombination von Sulfadoxin/Pyrimethamin mit Chloroquin gegenüber der Monotherapie mit Sulfadoxin/Pyrimethamin untersucht. Innerhalb unseres Studienkollektivs konnte kein therapeutischer Vorteil der Kombination ermittelt werden. Neuere Empfehlungen von der

WHO und dem Gesundheitsministerium in Laos tragen dem Rechnung und fokussieren derzeit auf die Kombination Artesunat/Mefloquin, um eine adäquate Therapie für die Behandlung der unkomplizierten Malaria tropica in Laos zu gewährleisten.

Der Einsatz molekularer Resistenzmarker beruht auf robusten PCR-RFLP-Methoden zur Detektion von resistenzassoziierten Mutationen. Für Chloroquin und die Antifolate wurden solche Protokolle bereits entwickelt und anhand von Feldstudien evaluiert. Bei den hier beschriebenen Untersuchungen wurden mögliche Resistenzmarker für die Therapie mit Atovaquon/Proguanil (Malarone®) ermittelt, einem Mittel, das für die Prophylaxe und Therapie von Reisenden eingesetzt wird und relativ schnell zum Auftreten von Therapieversagern führte. Die Untersuchungen konzentrierten sich entsprechend dem Wirkmechanismus von Atovaquon auf Mutationen auf dem Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Gen, wobei induzierte Mutationen unter Medikamentendruck *in vitro* mit Veränderungen nach Atovaquon/Proguanil Therapie *in vivo* verglichen wurden.

Zur Resistenzinduktion wurden Kulturen von *Plasmodium falciparum in vitro* mit Atovaquon allein oder in Kombination mit Cycloguanil, dem aktiven Metaboliten von Proguanil, behandelt. Die anschließende Sequenzierung des Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Gens ergab einen Aminosäurewechsel von Methionin zu Isoleucin an Position 133 (M133I) sowie für die höchste Atovaquonkonzentration eine zusätzliche Mutation an Position 271 (L271F). Die Sequenzierung des gleichen Genabschnittes bei einem Therapieversager nach Malarone®-Therapie zeigte einen Aminosäurewechsel an Position 268 von Thyrosin zu Serin (Y268S). Mutationen an diesem Kodon wurden mittlerweile bei fünf von sechs Patienten nach Malarone®-Therapieversagen beschrieben und führten zu starkem Sensitivitätsabfall *in vitro*. Damit stellen die Kodon-268-Mutationen einen möglichen molekularen Resistenzmarker dar für die Vorhersage von Therapieversagen bei Therapie mit Atovaquon/Proguanil. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass die Einführung von Malarone in Endemiegebieten zu einem verstärkten Medikamentendruck und daraufhin zu einer Selektion der M133I Mutation führt, wie Modellversuche *in vitro* zeigen.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde eine PCR-RFLP Methodik entwickelt, um auch größere Probenmengen auf Polymorphismen am Kodon 268 und 133 des Cytochrom-Gens zu untersuchen. Dafür wurden Primer entworfen, die durch Nukleotidwechsel Angriffssequenzen für spezifisch schneidende Enzyme einbringen und die Protokolle optimiert. Es konnte gezeigt werden, dass mit dieser Methode jeweils 3 Genotypen eines Kodons spezifisch detektiert werden können. Hiermit steht ein Mittel zur Verfügung, um die Ausbreitung von Resistenzen gegen Atovaquon/Proguanil zu untersuchen und

Sensitivitätsverluste möglicherweise schon im Anfangsstadium zu erkennen. Die Korrelation mit klinisch diagnostizierter Resistenz sollte an einer epidemiologisch relevanten Anzahl von Wildstämmen evaluiert werden.

Um einerseits die Methode anhand von Feldisolaten zu evaluieren und andererseits Informationen über die Prävalenz der Genotypen in Endemiegebieten zu erhalten, wurden für diese Arbeit Blutproben aus den Studiengebieten in Nord- und Südlao untersucht. Die Anwendung der PCR-RFLP Methode für die Bestimmung von Polymorphismen an Kodon 268 sowie Kodon 133 zeigte für alle untersuchten Proben nur die Wildtypsequenz. Damit bestätigte sich die relativ starke Konservierung des mitochondrialen Genoms bei *Plasmodium species* bei fehlendem Selektionsdruck. Andererseits erhöht Atovaquon den oxidativen Stress am Wirkort und eine indirekte Wirkung auf die Entstehung von Mutationen unter Therapie sollte mit berücksichtigt werden. Schließlich erfolgte bei allen Therapieversagern mit Atovaquon/Proguanil die Infektion in Westafrika, wo bisher noch keine Proben routinemäßig auf Cytochrom-b-Polymorphismen untersucht wurden. Es ist nicht ausgeschlossen, dass geographische Unterschiede eine Rolle spielen. Daher sind weitere Untersuchungen an Isolaten aus verschiedenen Endemiegebieten, einschließlich Westafrika, nötig, um die Prävalenz dieser Mutationen im Feld und ihre Relevanz als molekulare Resistenzmarker zu bestimmen.

**7. Literaturverzeichnis**

1. **Anabwani G, Canfield CJ, Hutchinson DB.** Combination atovaquone and proguanil hydrochloride vs. halofantrine for treatment of acute *Plasmodium falciparum* malaria in children. *Pediatr Infect Dis J* 1999,18: 456-61.
2. **Baird JK.** Age-dependent characteristics of protection v. susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol* 1998,92: 367-90.
3. **Basco LK, Ramiliarisoa O, Le Bras J.** *In vitro* activity of atovaquone against the African isolates and clones of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 1995,53: 388-91.
4. **Behrens N, Schwöbel B, Jordan S, Vanisaveth V, Phetsouvanh R, Christophel EM, Phompida S, Jelinek T.** *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 in press*
5. **Bojang KA, Schneider G, Forck S, Obaro SK, Jaffar S, Pinder M, Rowley J, Greenwood BM, Darlow B, Vrbova H, Gibney S, Jolley D, Stace J, Alpers M.** A trial of Fansidar plus chloroquine or Fansidar alone for the treatment of uncomplicated malaria in Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998,92: 73-6
6. **Borst P, Ouellette M.** New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* 1995,49: 427-60.
7. **Bustos DG, Canfield CJ, Canete-Miguel E, Hutchinson DB.** Atovaquone-proguanil compared with chloroquine and chloroquine-sulfadoxine-pyrimethamine for treatment of acute *Plasmodium falciparum* malaria in the Philippines. *J Infect Dis* 1999,179: 1587-90.
8. **Canfield CJ, Pudney M, Gutteridge WE.** Interactions of atovaquone with other antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum in vitro*. *Exp Parasitol* 1995,80: 373-81.
9. **Carvalho LJ, Daniel-Ribeiro CT, Goto H.** Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects. *Scand J Immunol* 2002,56: 327-43.
10. **Chaiyaroj SC, Buranakiti A, Angkasekwinai P, Looressuwan S, Cowman AF.** Analysis of mefloquine resistance and amplification of *pfmdr1* in multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 1999,61: 780-3.
11. **Corpet F.** Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 1988,16: 10881-90.

12. **Curtis J, Duraisingh MT, Trigg JK, Mbwana H, Warhurst DC, Curtis CF.** 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* 1996,90: 678-80.
13. **Curtis J, Duraisingh MT, Warhurst DC.** *In vivo* selection for a specific genotype of dihydropteroate synthetase of *Plasmodium falciparum* by pyrimethamine-sulfadoxine but not chlorproguanil-dapsone treatment. *J Infect Dis* 1998,177: 1429-33.
14. **Darlow B, Vrbova H, Gibney S, Jolley D, Stace J, Alpers M.** Sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of acute malaria in children of Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg* 1982,31: 10-3.
15. **Davies CS, Pudney M, Matthews PJ, Sinden RE.** The causal prophylactic activity of the novel hydroxynaphthoquinone 566C80 against *Plasmodium berghei* infections in rats. *Acta Leiden* 1989,58: 115-28.
16. **Davies CS, Pudney M, Nicholas JC, Sinden RE.** The novel hydroxynaphthoquinone 566C80 inhibits the development of liver stages of *Plasmodium berghei* cultured in vitro. *Parasitology* 1993,106: 1-6.
17. **di Rago JP, Coppee JY, Colson AM.** Molecular basis for resistance to myxothiazol, mucidin (strobilurin A), and stigmatellin. Cytochrome b inhibitors acting at the center of the mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1989,264: 14543-8.
18. **Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, Dicko A, Su XZ, Nomura T, Fidock DA, Wellems TE, Plowe CV, Coulibaly D.** A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med* 2001,344: 257-63.
19. **Dorsey G, Kanya MR, Singh A, Rosenthal PJ.** Polymorphisms in the *Plasmodium falciparum* pfcrt and pfmdr-1 genes and clinical response to chloroquine in Kampala, Uganda. *J Infect Dis* 2001,183: 1417-20.
20. **Ebisawa I, Muto T, Kameko S, Mitsui G.** Response of Laotian malaria strains to chemotherapy. *Jpn J Exp Med* 1970,40: 151-7.
21. **Edstein MD, Looareesuwan S, Viravan C, Kyle DE.** Pharmacokinetics of proguanil in malaria patients treated with proguanil plus atovaquone. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1996,27: 216-20.
22. **Ejov MN, Tun T, Aung S, Sein K, Smithuis FM, Monti F, Grundl M, Oo AZ, Kyaw TT, Phe O, White NJ.** Response of *falciparum* malaria to different antimalarials in Myanmar. *Bull World Health Organ* 1999,77: 244-9.

23. **Famin O, Krugliak M, Ginsburg H.** Kinetics of inhibition of glutathione-mediated degradation of ferriprotoporphyrin IX by antimalarial drugs. *Biochem Pharmacol* 1999,58: 59-68.
24. **Farnert A, Arez AP, Correia AT, Bjorkman A, Snounou G, do Rosario V.** Sampling and storage of blood and the detection of malaria parasites by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999,93: 50-3.
25. **Farnert A, Lindberg J, Gil P, Swedberg G, Berqvist Y, Thapar MM, Lindegardh N, Berezcky S, Bjorkman A.** Evidence of *Plasmodium falciparum* malaria resistant to atovaquone and proguanil hydrochloride: case reports. *Bmj* 2003,326: 628-9.
26. **Fivelman QL, Butcher GA, Adagu IS, Warhurst DC, Pasvol G.** Malarone treatment failure and *in vitro* confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. *Malar J* 2002,1: 1.
27. **Fleck SL, Pudney M, Sinden RE.** The effect of atovaquone (566C80) on the maturation and viability of *Plasmodium falciparum* gametocytes *in vitro*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996,90: 309-12.
28. **Flueck TP, Jelinek T, Kilian AH, Adagu IS, Kabagambe G, Sonnenburg F, Warhurst DC.** Correlation of *in vivo*-resistance to chloroquine and allelic polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Uganda. *Trop Med Int Health* 2000,5: 174-8.
29. **Fowler RE, Billingsley PF, Pudney M, Sinden RE.** Inhibitory action of the anti-malarial compound atovaquone (566C80) against *Plasmodium berghei* ANKA in the mosquito, *Anopheles stephensi*. *Parasitology* 1994,108: 383-8.
30. **Fry M, Pudney M.** Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochem Pharmacol* 1992,43: 1545-53.
31. **Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Pertea M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DM, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM, Barrell B.** Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002,419: 498-511.

32. **Gay F, Bustos D, Traore B, Jardinel C, Southammavong M, Ciceron L, Danis MM.** *In vitro* response of *Plasmodium falciparum* to atovaquone and correlation with other antimalarials: comparison between African and Asian strains. *Am J Trop Med Hyg* 1997,56: 315-7.
33. **Guinet F, Dvorak JA, Fujioka H, Keister DB, Muratova O, Kaslow DC, Aikawa M, Vaidya AB, Wellems TE.** A developmental defect in *Plasmodium falciparum* male gametogenesis. *J Cell Biol* 1996,135: 269-78.
34. **Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K, Newbold C.** Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med* 1999,5: 340-3.
35. **Hastings IM.** Malaria control and the evolution of drug resistance: an intriguing link. *Trends Parasitol* 2003,19: 70-3.
36. **Hastings IM, Watkins WM, White NJ.** The evolution of drug-resistant malaria: the role of drug elimination half-life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002,357: 505-19.
37. **Hogh B, Clarke PD, Camus D, Nothdurft HD, Overbosch D, Gunther M, Joubert I, Kain KC, Shaw D, Roskell NS, Chulay JD.** Atovaquone-proguanil versus chloroquine-proguanil for malaria prophylaxis in non-immune travellers: a randomised, double-blind study. Malaria International Study Team. *Lancet* 2000,356: 1888-94.
38. **Hong-Ping G, Yao Z, Qian D, Jin-Hua Y, Kai-Xun J, Min Z.** The *in vivo* sensitivity of *Plasmodium falciparum* to chloroquine in the Red River basin, Yunnan, China. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1998,29: 692-5.
39. **Jelinek T, Kilian AH, Curtis J, Duraisingh MT, Kabagambe G, von Sonnenburg F, Warhurst DC.** *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* 1999,61: 125-30.
40. **Jelinek T, Ronn AM, Lemnge MM, Curtis J, Mhina J, Duraisingh MT, Bygbjerg IC, Warhurst DC.** Polymorphisms in the dihydrofolate reductase (DHFR) and dihydropteroate synthetase (DHPS) genes of *Plasmodium falciparum* and *in vivo* resistance to sulphadoxine/pyrimethamine in isolates from Tanzania. *Trop Med Int Health* 1998,3: 605-9.
41. **Jelinek T, Peyerl-Hoffmann G, Mühlberger N, Wichmann O, Wilhelm M, Schmider N, Grobusch MP, von Sonnenburg F, Gascon J, Laferl H, Hatz C, Alifrangis M, Burchard G, McWhinney P, Schulze M, Kollaritsch H, da Cunha S, Beöan J, Kern P, I, Cuadros J.** Molecular surveillance of drug resistance

- through imported isolates of *Plasmodium falciparum* in Europe. Trop Med Int Health 1998,3: 605-9. Malar J 2002,1: 11
42. **Jensen JB, Trager W.** *Plasmodium falciparum* in culture: establishment of additional strains. Am J Trop Med Hyg 1978,27: 743-6.
43. **Korsinczky M, Chen N, Kotecka B, Saul A, Rieckmann K, Cheng Q.** Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. Antimicrob Agents Chemother 2000,44: 2100-8.
44. **Lin Q, Katakura K, Suzuki M.** Inhibition of mitochondrial and plastid activity of *Plasmodium falciparum* by minocycline. FEBS Lett 2002,515: 71-4.
45. **Ling J, Baird JK, Fryauff DJ, Sismadi P, Bangs MJ, Lacy M, Barcus MJ, Gramzinski R, Maguire JD, Kumusumangsih M, Miller GB, Jones TR, Chulay JD, Hoffman SL.** Randomized, placebo-controlled trial of atovaquone/proguanil for the prevention of *Plasmodium falciparum* or *Plasmodium vivax* malaria among migrants to Papua, Indonesia. Clin Infect Dis 2002,35: 825-33.
46. **Llanos-Cuentas A, Campos P, Clendenes M, Canfield CJ, Hutchinson DB.** Atovaquone and proguanil hydrochloride compared with chloroquine or pyrimethamine/sulfadoxine for treatment of acute *Plasmodium falciparum* malaria in Peru. Braz J Infect Dis 2001,5: 67-72.
47. **Looareesuwan S, Viravan C, Webster HK, Kyle DE, Hutchinson DB, Canfield CJ.** Clinical studies of atovaquone, alone or in combination with other antimalarial drugs, for treatment of acute uncomplicated malaria in Thailand. Am J Trop Med Hyg 1996,54: 62-6.
48. **Looareesuwan S, Wilairatana P, Chalermarut K, Rattanapong Y, Canfield CJ, Hutchinson DB.** Efficacy and safety of atovaquone/proguanil compared with mefloquine for treatment of acute *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand. Am J Trop Med Hyg 1999,60: 526-32.
49. **McIntosh HM.** Chloroquine or amodiaquine combined with sulfadoxine-pyrimethamine for treating uncomplicated malaria. Cochrane Database Syst Rev 2001: CD000386.
50. **McIntosh MT, Srivastava R, Vaidya AB.** Divergent evolutionary constraints on mitochondrial and nuclear genomes of malaria parasites. Mol Biochem Parasitol 1998,95: 69-80.
51. **Molyneux DH, Floyd K, Barnish G, Fevre EM.** Transmission control and drug resistance in malaria: a crucial interaction. Parasitol Today 1999,15: 238-40.

52. **Mulenga M, Sukwa TY, Canfield CJ, Hutchinson DB.** Atovaquone and proguanil versus pyrimethamine/sulfadoxine for the treatment of acute falciparum malaria in Zambia. *Clin Ther* 1999,21: 841-52.
53. **Nosten F, van Vugt M, Price R, Luxemburger C, Thway KL, Brockman A, McGready R, ter Kuile F, Looareesuwan S, White NJ.** Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of *Plasmodium falciparum* malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study. *Lancet* 2000,356: 297-302.
54. **Oduola AM, Weatherly NF, Bowdre JH, Desjardins RE.** *Plasmodium falciparum*: cloning by single-erythrocyte micromanipulation and heterogeneity *in vitro*. *Exp Parasitol* 1988,66: 86-95.
55. **Overbosch D, Schilthuis H, Bienzle U, Behrens RH, Kain KC, Clarke PD, Toovey S, Knobloch J, Nothdurft HD, Shaw D, Roskell NS, Chulay JD.** Atovaquone-proguanil versus mefloquine for malaria prophylaxis in nonimmune travelers: results from a randomized, double-blind study. *Clin Infect Dis* 2001,33: 1015-21.
56. **Pandey AV, Bisht H, Babbarwal VK, Srivastava J, Pandey KC, Chauhan VS.** Mechanism of malarial haem detoxification inhibition by chloroquine. *Biochem J* 2001,355: 333-8.
57. **Perignon JL, Druilhe P.** Immune mechanisms underlying the premunition against *Plasmodium falciparum* malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994,89 Suppl 2: 51-3.
58. **Peters JM, Chen N, Gatton M, Korsinczky M, Fowler EV, Manzetti S, Saul A, Cheng Q.** Mutations in cytochrome b resulting in atovaquone resistance are associated with loss of fitness in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002,46: 2435-41.
59. **Pillai DR, Labbe AC, Vanisaveth V, Hongvangthong B, Pomphida S, Inkathone S, Zhong K, Kain KC.** *Plasmodium falciparum* malaria in Laos: chloroquine treatment outcome and predictive value of molecular markers. *J Infect Dis* 2001,183: 789-95.
60. **Platel DF, Mangou F, Tribouley-Duret J.** Role of glutathione in the detoxification of ferriprotoporphyrin IX in chloroquine resistant *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol* 1999,98: 215-23.
61. **Povoa MM, Adagu IS, Oliveira SG, Machado RL, Miles MA, Warhurst DC.** 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* 1998,88: 64-8.

62. **Preiser PR, Wilson RJ, Moore PW, McCready S, Hajibagheri MA, Blight KJ, Strath M, Williamson DH.** Recombination associated with replication of malarial mitochondrial DNA. *Embo J* 1996,15: 684-93.
63. **Price RN, Cassar C, Brockman A, Duraisingh M, van Vugt M, White NJ, Nosten F, Krishna S.** The *pfmdr1* gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand. *Antimicrob Agents Chemother* 1999,43: 2943-9.
64. **Price RN, Nosten F, Luxemburger C, ter Kuile FO, Paiphun L, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ.** Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *Lancet* 1996,347: 1654-8.
65. **Rathod PK, McErlean T, Lee PC.** Variations in frequencies of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997,94: 9389-93.
66. **Sabchareon A, Attanath P, Phanuaksook P, Chanthavanich P, Poonpanich Y, Mookmanee D, Chongsuphajaisiddhi T, Sadler BM, Hussein Z, Canfield CJ, Hutchinson DB.** Efficacy and pharmacokinetics of atovaquone and proguanil in children with multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998,92: 201-6.
67. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977,74: 5463-7.
68. **Schwöbel B, Alifrangis M, Salanti A, Jelinek T.** Different mutation patterns of atovaquone resistance to *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *in vivo*: rapid detection of codon 268 polymorphisms in the cytochrome b as potential *in vivo* resistance marker. *Malar J* 2003,2: 5.
69. **Sharma I, Rawat DS, Pasha ST, Biswas S, Sharma YD.** Complete nucleotide sequence of the 6 kb element and conserved cytochrome b gene sequences among Indian isolates of *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* 2001,31: 1107-13.
70. **Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP.** Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 1991,349: 431-4.
71. **Sibley CH, Hyde JE, Sims PF, Plowe CV, Kublin JG, Mberu EK, Cowman AF, Winstanley PA, Watkins WM, Nzila AM.** Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends Parasitol* 2001,17: 582-8.
72. **Sidhu AB, Verdier-Pinard D, Fidock DA.** Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfcr1* mutations. *Science* 2002,298: 210-3.
73. **Smithuis FM, Monti F, Grundl M, Oo AZ, Kyaw TT, Phe O, White NJ.** *Plasmodium falciparum*: sensitivity *in vivo* to chloroquine,

- pyrimethamine/sulfadoxine and mefloquine in western Myanmar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997,91: 468-72.
74. **Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN.** High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993,61: 315-20.
75. **Srivastava IK, Morrissey JM, Darrouzet E, Daldal F, Vaidya AB.** Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites. *Mol Microbiol* 1999,33: 704-11.
76. **Srivastava IK, Rottenberg H, Vaidya AB.** Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *J Biol Chem* 1997,272: 3961-6.
77. **Sucharit S, Surathin K, Tumrasvin W, Sucharit P.** Chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* in Thailand: Susceptibility of Anopheles. *J Med Assoc Thai* 1977,60: 648-54.
78. **Sukwa TY, Mulenga M, Chisdaka N, Roskell NS, Scott TR.** A randomized, double-blind, placebo-controlled field trial to determine the efficacy and safety of Malarone (atovaquone/proguanil) for the prophylaxis of malaria in Zambia. *Am J Trop Med Hyg* 1999,60: 521-5.
79. **Syafruddin D, Siregar JE, Marzuki S.** Mutations in the cytochrome b gene of *Plasmodium berghei* conferring resistance to atovaquone. *Mol Biochem Parasitol* 1999,104: 185-94.
80. **Tarimo DS, Minjas JN, Bygbjerg IC.** Sulfadoxine-pyrimethamine monotherapy in Tanzanian children gives rapid parasite clearance but slow fever clearance that is improved by chloroquine in combination therapy. *Trop Med Int Health* 2002,7: 592-8.
81. **Tawil NA.** Clearance of falciparum parasitaemia with a single dose sulfadoxine-pyrimethamine in Vientiane, Laos. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1978,9: 409-13.
82. **ter Kuile FO, Dolan G, Nosten F, Edstein MD, Luxemburger C, Phaipun L, Chongsuphajaisiddhi T, Webster HK, White NJ.** Halofantrine versus mefloquine in treatment of multidrug-resistant falciparum malaria. *Lancet* 1993,341: 1044-9.
83. **ter Kuile FO, Nosten F, Thieren M, Luxemburger C, Edstein MD, Chongsuphajaisiddhi T, Phaipun L, Webster HK, White NJ.** High-dose

- mefloquine in the treatment of multidrug-resistant falciparum malaria. *J Infect Dis* 1992,166: 1393-400.
84. **Thaithong S, Beale GH.** Resistance of ten Thai isolates of *Plasmodium falciparum* to chloroquine and pyrimethamine by *in vitro* tests. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981,75: 271-3.
85. **Trager W, Jensen JB.** Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976,193: 673-5.
86. **Vaidya AB, Morrissey J, Plowe CV, Kaslow DC, Wellems TE.** Unidirectional dominance of cytoplasmic inheritance in two genetic crosses of *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol* 1993,13: 7349-57.
87. **Viriyakosol S, Siripoon N, Zhu XP, Jarra W, Seugorn A, Brown KN, Snounou G.** *Plasmodium falciparum*: selective growth of subpopulations from field samples following *in vitro* culture, as detected by the polymerase chain reaction. *Exp Parasitol* 1994,79: 517-25.
88. **von Seidlein L, Duraisingh MT, Drakeley CJ, Bailey R, Greenwood BM, Pinder M.** Polymorphism of the Pfmdr1 gene and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* in The Gambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997,91: 450-3.
89. **Wagner JR, Hu CC, Ames BN.** Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992,89: 3380-4.
90. **Walker DJ, Wakefield AE, Dohn MN, Miller RF, Baughman RP, Hossler PA, Bartlett MS, Smith JW, Kazanjian P, Meshnick SR.** Sequence polymorphisms in the *Pneumocystis carinii* cytochrome b gene and their association with atovaquone prophylaxis failure. *J Infect Dis* 1998,178: 1767-75.
91. **Wellems TE.** Plasmodium chloroquine resistance and the search for a replacement antimalarial drug. *Science* 2002,298: 124-6.
92. **Wernsdorfer WH, Chongsuphajaisiddhi T, Salazar NP.** A symposium on containment of mefloquine-resistant falciparum malaria in Southeast Asia with special reference to border malaria. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1994,25: 11-8.
93. **White NJ, Nosten F, Looareesuwan S, Watkins WM, Marsh K, Snow RW, Kokwaro G, Ouma J, Hien TT, Molyneux ME, Taylor TE, Newbold CI, Ruebush TK, 2nd, Danis M, Greenwood BM, Anderson RM, Olliaro P.** Averting a malaria disaster. *Lancet* 1999,353: 1965-7.
94. **WHO.** Report: Informal consultation on monitoring resistance to antimalarial drugs in the Mekong region. Phnom Penh, Cambodia, 2000

95. **WHO**. Monitoring antimalarial drug resistance. Geneva, Switzerland, 2001
96. **WHO**. The use of antimalarial drugs: Report of an informal consultation Geneva, Switzerland, 2001
97. **Wilkinson RN, Noeypatimanondh S, Gould DJ**. Infectivity of falciparum malaria patients for anopheline mosquitoes before and after chloroquine treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1976,70: 306-7.
98. **Wilson RJ, Williamson DH**. Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997,61: 1-16.
99. **Wilson RJ, Williamson DH, Preiser P**. Malaria and other Apicomplexans: the "plant" connection. *Infect Agents Dis* 1994,3: 29-37.
100. **Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR**. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis* 2002,2: 209-18.
101. **Yang HL, Liu DQ, Yang YM, Huang KG, Dong Y, Yang PF, Liao MZ, Zhang CY**. *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* 1997,28: 460-4.
102. **Zalis MG, Pang L, Silveira MS, Milhous WK, Wirth DF**. Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from the Amazon region of Brazil: evidence for quinine resistance. *Am J Trop Med Hyg* 1998,58: 630-7.

## ***Lebenslauf***

Name	Babett Schwöbel
geboren	am 23. Mai 1972 in Erfurt
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Adresse	Säbenerstr. 9 81547 München Tel: 089 – 62 00 97 69 babett.schwoebel@gmx.de

### Ausbildung

1978 - 1988	Polytechnische Oberschule in Erfurt und Heiligenstadt
1988 - 1990	Gymnasium in Heiligenstadt
Juni 1990	Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife
1990-1991	Au pair und Sprachunterricht in Frankreich
Oktober 1991 – April 1996	Studium der Pharmazie mit Staatsexamen an der Humboldt-Universität zu Berlin sowie ein Auslandssemester in Frankreich
Juni 1996 – Oktober 1997	Praktika in Industrie, Forschung, Krankenhausapotheke und öffentlicher Apotheke
Februar 1998	Approbation als Apothekerin

### Berufliche und wissenschaftliche Tätigkeit

März 1998 – September 1999	Apothekerin in öffentlichen Apotheken in Berlin und Schongau
Oktober 1999 – Oktober 2000	Promotion bei Frau Prof. K. Becker-Brandenburg, Zentrum für Infektionsforschung Würzburg, und Prof. G. Bringmann, Organische Chemie Universität Würzburg
November 2000 – April 2003	Promotionswechsel an das Institut für Infektions- u. Tropenmedizin der LMU München über das Thema: „ <i>Plasmodium falciparum</i> - Resistenzbestimmung durch molekulare Resistenzmarker sowie <i>in-vivo</i> -Sensitivitätstests“ Betreuer: Prof. T. Löscher und PD. Dr. T. Jelinek
seit Mai 2003	Leiterin des Bereichs Quality Management/Compliance bei essex pharma GmbH München

## **Publikationen**

Davioud-Charvet E, Delarue S, Biot C, Schwöbel B, Boehme CC, Mussigbrodt A, Maes L, Sergheraert C, Grellier O, Schirmer RH and Becker K. A prodrug form of a Plasmodium falciparum glutathione reductase inhibitor conjugated with a 4- anilinoquinoline. J Med Chem. 2001 Nov 22;44(24):4268-76

Bringmann G, Messer K, Schwöbel B, Brun R. Habropetaline A, an Antimalarial Naphthylisoquinoline Alkaloid from *Triphyophyllum peltatum*. Phytochemistry 2003 Feb 62(3):345-9

Schwöbel B, Jordan S, Vanisaveth V, Petsouvanh R, Phompida S, von Sonnenburg F, Christophel EM, Jelinek T. "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. 2003 Jan 8(1):19-24

Schwöbel B, Alifrangis M, Salanti A, Jelinek T. *In vitro* and *in vivo* mutations of *Plasmodium falciparum* cytochrome b associated to atovaquone/proguanil resistance: rapid diagnostic by *in vivo* resistance markers. Malar J 2003 Mar 19 2(1): 5.

Behrens N, Schwöbel B, Jordan S, Vanisaveth V, Phetsouvanh R, Christophel EM, Phompida S, Jelinek T. *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 2003 Sept 8(9): 775-82.

Dittrich S, Schwöbel B, Jordan S, Vanisaveth V, Phetsouvanh R, Christophel EM, Phompida S, Jelinek T. "Distribution of two forms of *Plasmodium falciparum* erythrocytic binding antigen-175 (eba-175) gene in Lao PDR." Malar J. 2003 Jul 22 2(1):23

Peyerl-Hoffmann G, Schwöbel B, Jordan S, Vanisaveth V, Petsouvanh R, Phompida S, Christophel EM, von Sonnenburg F and Jelinek T. "Serological Investigation of the prevalence of anti dengue immunoglobulin M and immunoglobulin G antibodies in Attapeu Province, South Laos." Clinic Microbiol Infect. *in press*

Schwöbel B, Jordan S, Vanisaveth V, Petsouvanh R, Phompida S, Christophel EM and Jelinek T. "Chloroquine and sulfadoxine/pyrimethamine for treatment of uncomplicated *P. falciparum* malaria on the Lao-China and Lao-Myanmar border." *submitted*

Peyerl-Hoffmann G, Schwöbel B, Jordan S, Vanisaveth V, Petsouvanh R, Christophel EM, Phompida S and Jelinek T. "Seroprevalence of antibodies against *Leptospira* in outpatients of two hospitals in Attapeu province, South Laos." *Submitted*

## *Danksagung*

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

Herrn PD Dr. med Tomas Jelinek danke ich ganz herzlich für die Betreuung dieser Arbeit, die Realisation der Auslandsaufenthalte sowie seine Unterstützung bei Stipendienanträgen und Kongressteilnahmen.

Frau Dr. Eva-Maria Christophel, WHO, gilt mein besonderer Dank für Ihre fachliche und persönliche Unterstützung der Studien in Laos.

Die Realisation der Feldstudien in Laos wäre nicht möglich gewesen ohne die Bereitschaft und Mitarbeit des Zentrums für Malariologie, Parasitologie und Entomologie, Vientiane, Laos. Mein besonderer Dank an Dr. Rattanaxay Petsouvanh und Dr Viengxay Vanisaveth.

Ein Teil der molekularbiologischen Arbeiten habe ich in Kopenhagen in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Alifrangis durchgeführt. Sein Fachwissen, seine Geduld und sein Enthusiasmus haben viel zum Gelingen des Projektes beigetragen.

Einen Dank allen Angestellten des Institut für Infektions- und Tropenmedizin, die immer mit Hilfe und Rat zur Seite standen, besonders an Gaby Peyerl-Hoffmann und Erna Fleischmann für praktische Unterstützung und Motivation.

Ganz besonders danke ich meinen lieben Eltern für Ihre Unterstützung und ihr Verständnis während Studium und Promotion. Es ist schön zu wissen, dass ich mich immer auf sie verlassen kann.

Lieben Dank meinen Freund Thomas für sein Verständnis für die vielen Wochenenden, die ich im Labor bei den Malariakulturen verbracht habe. Ihm und meinem Bruder vielen Dank, dass sie weder Mühen noch Wege gescheut haben, mich bei allen Auslandsaufenthalten vor Ort zu besuchen.

Ich freue mich, dass der Kleine schon bei der Prüfung mit dabei war, ganz ruhig hielt und mich so fest unterstützt hat.