

Aus der Abteilung für Infektions- und Tropenmedizin

Leiter: Prof. Dr. med. FRCP. M. Hölscher

an der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reincke

**Molekulare Marker für Resistenzen von Antimalariamitteln in Südwest-Äthiopien  
im zeitlichen Verlauf: regionale Beobachtung im Zeitraum von 2006 bis 2013**

Dissertation

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

vorgelegt von

Alexander Heuchert

aus Freiburg im Breisgau

2019

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. Nicole Berens-Riha, MSc
Mitberichterstatter:	PD Dr. Dimitrios Frangoulidis PD Dr. Stefan Odenbreit
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. Michael Pritsch
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	27.06.2019

---

**Teile der vorgelegten Dissertation wurden bereits veröffentlicht:**

Heuchert A, Abduselam N, Zeynudin A, Eshetu T, Löscher T, Wieser A, Pritsch M, Berens-Riha N. Molecular markers of anti-malarial drug resistance in southwest Ethiopia overtime: regional surveillance from 2006 to 2013. Malar J. 2015 May 19;14:208.

**Teile der vorgelegten Dissertation wurden bereits auf einem Kongress vorgestellt:**

Poster:

Heuchert A, Abduselam N, Zeynudin A, Eshetu T, Löscher T, Wieser A, Pritsch M, Berens-Riha N. Molecular markers of antimalarial drug resistance in southern Ethiopia over time: regional surveillance from 2004 to 2013. 103. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit. Düsseldorf, Deutschland, 2014

Programmheft der 103. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit, 14.-15. März 2014, Düsseldorf, Deutschland, Seite 52, Po6



---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Malaria.....	1
1.2	Erreger, Übertragung und Vermehrungszyklus .....	1
1.3	Symptome und Klinische Manifestationen.....	4
1.4	Diagnostik.....	5
1.5	Therapie .....	6
1.6	Studienort Äthiopien .....	7
1.7	Artemisinin-based Combination Therapy (ACT) .....	9
1.8	Chloroquin .....	11
1.9	Molekulare Marker.....	13
1.9.1	<i>Plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter ( <i>pfcr1</i> ) .....	14
1.9.2	<i>Plasmodium falciparum</i> multi-drug resistance gene 1 ( <i>pfmdr1</i> ) .....	15
1.9.3	<i>Plasmodium falciparum</i> ATPase6 SERCA-type gene ( <i>pfATP6</i> ).....	16
1.9.4	PF3D7_1343700 kelch propeller domain (K13-propeller) .....	16
1.9.5	<i>Plasmodium vivax</i> multi-drugresistance gene 1 ( <i>pvmdr1</i> ).....	17
1.10	Fragestellung .....	19
2	Materialien und Methoden .....	20
2.1	Materialien und Primer .....	20
2.2	Proben.....	24
2.3	DNA Amplifikation.....	25
2.3.1	Extraktion .....	25
2.3.2	Konventionelle PCR.....	26
2.3.2.1	<i>Plasmodium</i> Spezifizierung .....	26
2.3.2.2	<i>pfcr1</i> .....	29
2.3.2.3	<i>pfATP6</i> .....	31
2.3.2.4	K13-propeller.....	32
2.3.2.5	<i>pvmdr1</i> .....	34
2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	35
2.3.4	Real-Time PCR.....	37
2.3.5	DNA-Sequenzierung .....	39
2.4	Auswertung .....	42
3	Ergebnisse .....	43

---

3.1	Ergebnisse der <i>Plasmodium</i> Spezifizierung .....	43
3.1.1	Mikroskopie.....	43
3.1.2	Nested PCR.....	43
3.2	Ergebnisse <i>pfprt</i> .....	46
3.3	Ergebnisse <i>pfmdr1</i> .....	47
3.4	Ergebnisse <i>pfATP6</i> .....	50
3.5	Ergebnisse K13-propeller .....	51
3.6	Ergebnisse <i>pvmdr1</i> .....	53
4	Diskussion .....	58
5	Konklusion .....	64
6	Zusammenfassung .....	66
7	Abkürzungsverzeichnis.....	68
8	Abbildungsverzeichnis.....	70
9	Tabellenverzeichnis.....	71
10	Literaturverzeichnis .....	72
11	Danksagung .....	80
12	Eidesstattliche Versicherung .....	81

## 1 Einleitung

### 1.1 Malaria

Malaria, aus dem Italienischen „mal aria“ („schlechte Luft“), ist eine von parasitären Einzellern, sogenannten *Plasmodien*, verursachte Infektionskrankheit. Der Name kommt daher, dass man früher die „schlechte Luft“ in Sumpfgebieten mit der Krankheit in Verbindung brachte. Heute weiß man, dass die Übertragung dieser weltweit verbreiteten Krankheit örtlich an das endemische Vorkommen des Übertragungsvektors, der *Anopheles*-Mücke, gebunden ist. Obwohl sie in den Industrienationen eher eine untergeordnete Rolle spielt, zählt Malaria zu den führenden Gesundheitsproblemen weltweit. Schätzungsweise 3,4 Milliarden Menschen leben in Malariarisikogebieten, davon ungefähr ein Drittel in Hochrisikogebieten (>1 Fall/1000 Einwohner). Die Hochrisikogebiete konzentrieren sich hauptsächlich auf das subsaharische Afrika und Südostasien. Man nimmt an, dass im Jahre 2015 ca. 212 Millionen Malariafälle auftraten, ungefähr 429.000 davon mit tödlichem Ausgang. Von diesen Todesfällen nehmen Kinder unter 5 Jahren den größten Anteil ein [1].

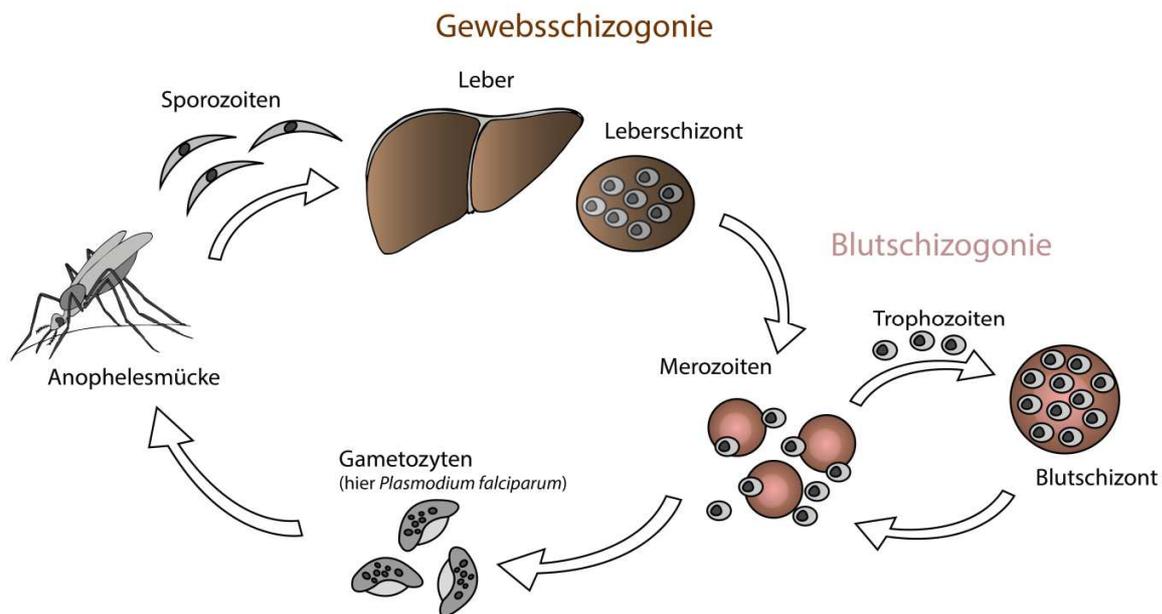
### 1.2 Erreger, Übertragung und Vermehrungszyklus

Inhaltlich bezieht sich der Abschnitt 1.2 zu einem großen Teil auf das Lehrbuch „Tropenmedizin in Klinik und Praxis mit Reise- und Migrationsmedizin“ (Löscher 2010) [2].

Die Malaria, welche den menschlichen Organismus befällt, kann durch sechs verschiedene Spezies, alle der Gattung der *Plasmodien* angehörend, hervorgerufen werden. Diese Spezies sind: *Plasmodium (P.) falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale curtisi*, *Plasmodium ovale wallikeri*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium knowlesi*. *P. knowlesi* ist eine Zoonose, das ursprüngliche Reservoir sind Makaken, eine Affenart, in Südostasien. *P. falciparum* und *P. vivax* sind weltweit die wichtigsten humanen Malariaerreger [1, 3]. Während das *P. falciparum* aufgrund der gravierenderen klinischen Symptome und der hohen Mortalität oft in den Vordergrund rückt und hauptsächlich Gegenstand der Forschung ist, wird das globale Ausmaß der *P. vivax* Malaria immer wieder unterschätzt. Dennoch, *P. vivax* stellt den weltweit am weitesten verbreiteten Erreger für Malaria dar

und scheint eine häufigere Ursache schwer verlaufender Malaria zu sein als früher angenommen [4, 5].

Um sich zu vermehren folgen Plasmodien einem parasitären Zyklus, welcher bei den verschiedenen Plasmodienspezies einige Eigenheiten aufweist [5, 6]. Hier soll eine generelle Übersicht vermittelt werden.



**Abbildung 1: Skizzenhafte Darstellung des Malariazyklus bei *P. falciparum* im Menschen:** Stark vereinfacht zeigen sich die Stadien der Gewebsschizogonie, Blutschizogonie sowie der extrakorporale Abschnitt. Nicht dargestellt sind die Bildung von Hypnozoiten bei *P. vivax/ovale* sowie andere Arten der Übertragung. Sporozoiten aus der Speicheldrüse der Anophelesmücke infizieren nach einem Stich eine Leberzelle. Die infizierten Leberzellen reifen als Leberschizonten, eine Vielzahl von Merozoiten beinhaltend, heran. Der Leberschizont rupturiert und gibt die Merozoiten ins Blut ab. Dort infizieren diese Erythrozyten. Die Erythrozyten reifen als Blutschizont heran. Diese geben nach Ruptur wiederum Merozoiten in das Blut ab, welche erneut Erythrozyten befallen können. Ein Teil der Merozoiten differenziert sich zu Gametozyten. Diese können in der Magensäure der Anopheles, nach Aufnahme durch einen erneuten Stich, persistieren und durch sexuelle Fortpflanzung neue Sporozoiten zeugen. Für eine detailliertere Beschreibung verweise ich auf Abschnitt 1.2, Urheber der Illustration: Lucia Bader, Alexander Heuchert, München, Deutschland.

Nach dem Stich einer infizierten Anopheles Mücke, dem Vektor, begeben sich die Sporozoiten aus der Speicheldrüse des Insekts zusammen mit dessen Speichel in den Blutkreislauf des Menschen. Sporozoiten sind das für den Menschen infektiöse Stadium der Plasmodien, welche in der Mücke heranreifen. Von dort gelangen diese in die Leber, wo sie Parenchymzellen infiltrieren. Der Zyklus der Gewebsschizogonie beginnt. Der Sporozoit, nun intrazellulär, beginnt sich zu teilen und wächst zu einem vielkernigen Leberschizonten heran. Nach 8-12 Tagen Reifung der Wirtszelle, die zu diesem Zeitpunkt einer „Schizontenhülle“ gleicht, rupturiert diese. Hierbei werden tausende Merozoiten, ein einzelner Kern mit etwas Zytoplasma aus dem Schizonten, in die Lebergefäße abgegeben. Dort dringen diese in Erythrozyten ein und leiten das Stadium der Blutschizogonie ein.

Bei *P. vivax* sowie bei den *P. ovale* Spezies können Sporozoiten als sog. Hypnozoiten in den Leberzellen überdauern, zu einem späteren Zeitpunkt die Schizogonie beginnen, und somit so genannte Malariarezidive verursachen. Die Auslöser eines Rezidivs sind Gegenstand der Forschung.

In den Erythrozyten bildet der Malariaparasit zunächst einen Trophozoiten. Dieser reift heran, teilt sich und wird zu einem vielkernigen Blutschizonten, je nach Plasmodiumspezies 8-30 Kerne. Die nun vergrößerte Blutzelle rupturiert und setzt wiederum Merozoiten, zusammen mit anderen Zellbestandteilen, in den Blutkreislauf frei. Dieser schlagartige Prozess ist für das für Malaria typische Fieber und die Fieberintervalle verantwortlich und läuft je nach Plasmodium Spezies mehr oder weniger synchron ab. So nimmt die Malaria tropica eher einen unregelmäßigen Verlauf. Bei einer Infektion mit *P. vivax* bzw. *P. ovale* kommt es, nach anfänglichen Unregelmäßigkeiten, zu Fieberschüben alle 48 Stunden, daher der Name Malaria tertiana. *P. malariae* wiederum verursacht die Malaria quartana mit Fieberschüben ungefähr alle 72 Stunden. Die durch die Zellruptur frei gewordenen Merozoiten können nun wiederum andere Erythrozyten infizieren, um sich zuerst als Trophozoit und später als Schizont weiter asexuell zu vervielfachen. Ein kleiner Teil der sich im Blutkreislauf befindlichen Merozoiten ist jedoch in der Lage, sich zu einem sexuellen Stadium zu differenzieren. Die sogenannten Gametozyten, zu welchen die weibliche Makrogametozyte und ihr männlicher Gegenpart - die Mikrogametozyte - zählen, können ihre sexuelle Fortpflanzung nur in der Anopheles Mücke vollziehen. Dies geschieht, wenn eine weibliche Anopheles Mücke ihre Blutmahlzeit von einem Infizierten Individuum aufnimmt und damit auch Gametozyten einverleibt. Asexuelle Stadien werden im Verdauungssys-

tem der Mücke eliminiert, die Gametozyten sind jedoch in der Lage zu persistieren und sich sexuell fortzupflanzen. Im Magen der Überträgermücke angekommen, entwickeln sich die Gametozyten zu Gameten. Der männliche Mikrogametozyt wird aktiv und teilt seinen Kern in 4-8 Nuclei, welche in fadenförmigen Zellauswüchsen durch den Prozess der Exflagellation ausgeschickt werden, um weibliche Makrogametozyten zu befruchten. Nach der Befruchtung entwickeln sich diese zu einem wurmförmigen Stadium. Diese sogenannten Ookineten sind, wie der Name schon sagt, beweglich, wandern also zur Magenwand, wo sie diese penetrieren und unter der elastischen Membran zum Erliegen kommen. Hier ändert die Ookinete wieder ihre Form und kapselt sich zu einer runden Oozyste ab, welche nun auf Grund von meiotischer und anschließend mitotischer Teilungen zu tausenden Sporozoiten heranreift. Letztere wandern nun bevorzugt in die Speicheldrüse des Insekts ein und können von dort beim nächsten Stich in den Menschen gelangen [2, 6].

### 1.3 Symptome und Klinische Manifestationen

Malaria ist eine Infektionskrankheit, die sich neben dem typischen Auftreten von Fieber und allgemeiner Symptomatik mit verschiedenen Organ-Manifestationen präsentieren kann, die je nach Malariaart, Wirt und Endemiegebiet variieren. Jedes Fieber unklarer Genese ist malariaverdächtig, wenn der Patient anamnestisch in einem Malaria-endemischen Gebiet verweilt. Die Symptome liegen allgemein einer systemischen Entzündungsreaktion zu Grunde, welche auf die zeitlich mehr oder minder synchron ablaufende Ruptur infizierter Erythrozyten zurückzuführen ist. Hierbei werden neben Merozoiten auch intrazelluläre proinflammatorische Strukturen freigesetzt, welche in der Lage sind, eine allgemeine Entzündungsreaktion auszulösen. Man unterscheidet klinisch zwischen einem unkomplizierten und einem komplizierten Verlauf, der lebensbedrohlich ist. Insbesondere *P. falciparum* und *P. knowlesi* können schwere Verläufe auslösen, aber auch *P. vivax* kann, öfter als früher angenommen, für eine schwer verlaufende Malaria verantwortlich sein. Die unkomplizierte Malaria, mit ihrem Leitsymptom des Fiebers, pflegt mit allgemeiner Symptomatik und wenig charakteristischen Befunden einherzugehen. Dies sind beispielsweise eine beginnende Anämie, eine Thrombozytopenie, eine Splenomegalie oder eine leichte Form eines Ikterus, z.B. ein Sklerenikterus.

Patienten mit komplizierter Malaria sind in der Regel intensivpflichtig. Übliche Komplikationen der schweren Malaria, welche einzeln oder zusammen auftreten können, sind: Niereninsuffizienz, respiratorische Insuffizienz und schwere Anämie. Insbesondere bei der Malaria tropica können Infarzierungen zu den genannten Organversagen und einer zerebralen Beteiligung mit neurologischer Symptomatik führen [2, 4, 5, 7].

### 1.4 Diagnostik

Zum Nachweis einer Malaria steht eine Reihe von Methoden zur Verfügung. Der Goldstandard der Akutdiagnostik stellt immer noch die Mikroskopie dar. Hierfür werden ein dicker Tropfen und ein dünner Ausstrich von Patientenblut hergestellt, gefärbt und mikroskopisch untersucht. Der dicke Tropfen dient dem sensitiven Nachweis von Erregern, der Blutausstrich der Speziesdifferenzierung. Ein Nachteil der Mikroskopie ist ihre Abhängigkeit vom Untersucher. Vor allem für Regionen oder Situationen, in denen nicht auf ein Labor mit geschultem Personal zurückgegriffen werden kann, stehen Malaria-Schnelltests zur Verfügung, die jedoch keine sichere Speziesdifferenzierung erlauben. Speziell bei Malaria, die nicht durch *P. falciparum* verursacht wurde, ist eine Unterscheidung je nach Test nicht möglich oder fehlerhaft [8]. Eine weit sensitivere und objektivere Methode stellt der Erregernachweis durch PCR dar, wobei neben konventioneller PCR auch Real-time Systeme zur Verfügung stehen. Der Nachteil hier sind die hohen Kosten und die Unentbehrlichkeit eines Labors. Aufgrund der Zeitaufwendigkeit der Aufbearbeitung der Proben, z.B. im Hinblick auf die Extraktion, und bei der PCR Durchführung, wird dieses Verfahren in der Akutdiagnostik jedoch nicht empfohlen, wobei schnell durchzuführende Real-time PCRs diskutiert werden [9, 10]. Die Therapie der Malaria ist schnellstmöglich zu beginnen, wenige Stunden können den Verlauf entscheiden [11]. Gut geeignet ist das Tool jedoch zur ergänzenden Diagnostik oder spezifischen Fragestellungen. Beispielsweise zur Therapiekontrolle, zum Nachweis einer asymptomatischen submikroskopischen Parasitämie oder bei der Unterscheidung zwischen einer Neuinfektion und einer so genannten Rekrudescenz. Letzteres stellt ein spätes Therapieversagen dar (late treatment failure), bei der die Parasitämie zwischenzeitlich unter die Nachweisgrenze (Mikroskopie negativ) fällt und

nach frühestens sieben Tagen wieder nachweisbar wird [12]. In klinischen Studien wird meist ein Follow-up von 28 bis 42 Tagen empfohlen [9, 13].

### 1.5 Therapie

Die Behandlung einer Malaria erfolgt, neben supportiven Maßnahmen, medikamentös. Es existiert eine Vielzahl von Pharmaka, welche Aktivität gegen Malaria vorweisen. Der hier vermittelte Therapieüberblick bezieht sich einzig und allein auf die Angaben der Therapieempfehlung der WHO für endemische Länder wie Äthiopien und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Die Therapie der Wahl (First-Line) für eine unkomplizierte *P. falciparum* Malaria stellt ein Medikament aus der Gruppe der Artemisinin-Kombinations-Therapie (ACT)-Präparate dar, hier speziell Artemether-Lumefantrin. Für die Behandlung einer schweren Malaria oder nach Therapieversagen der First-Line-Therapie empfiehlt die WHO das Artemisinin-Derivat Artesunat, soweit erhältlich. In Äthiopien kommt Chinin, ein älteres Alternativpräparat, zur Anwendung. Chinin zählt zu den Aminoalkoholen und wird zur Vermeidung von Resistenzbildung mit einem Antibiotikum kombiniert [14]. Hier sind Tetracycline, Doxycycline oder Clindamycin geeignete Präparate.

Gegen die von *P. vivax* verursachte Malaria tertiana wird in Äthiopien das Aminochinolin Chloroquin eingesetzt. Die von der WHO empfohlene Kombination mit Primaquin zur Vermeidung von Rezidiven ist nicht etabliert, da Tests auf G6PD-Mangel, aufgrund von mangelndem Knowhow sowie unzureichenden finanziellen Mitteln, nicht durchgeführt werden können. Primaquin wird empfohlen, da es als einziges Medikament auf hepatozytäre Hypnozoiten wirkt, eine hepatozelluläre Ruheform der *Malaria tertiana*, welche nach Monaten bis Jahren Malariarezidive verursachen kann. Bei Chloroquin-Resistenz wird der Einsatz von ACTs empfohlen [3, 15, 16].

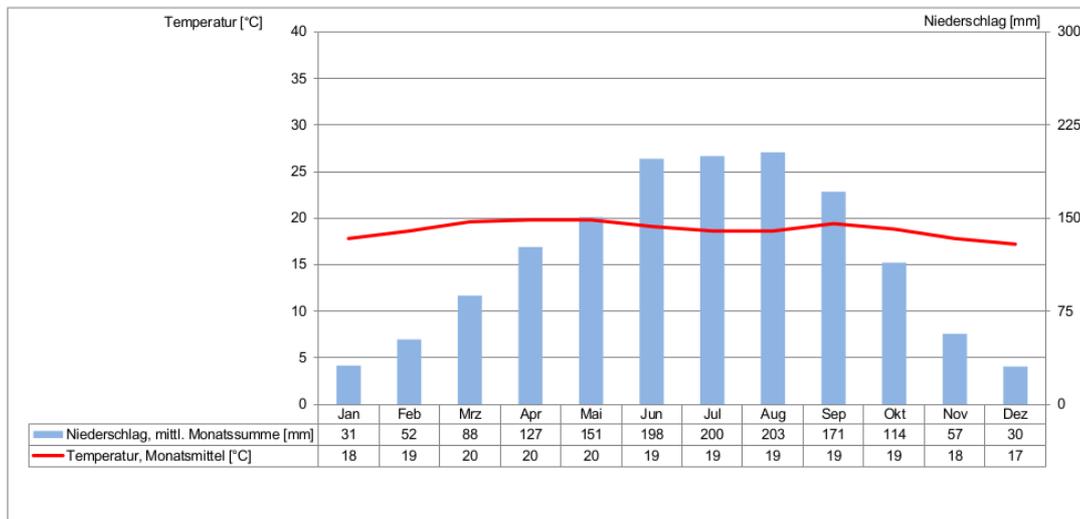
## 1.6 Studienort Äthiopien

Äthiopien ist ein von sechs Ländern umschlossener Binnenstaat am Horn von Afrika. Die das Land umgebenden Nachbarländer sind Eritrea, Dschibuti, Somalia, Kenia, Südsudan und Sudan. Die Hauptstadt Addis Ababa liegt im Zentrum des Landes. Mit seinen ungefähr 91,73 Millionen Einwohnern [17], auf einer Fläche von 1 100 000 km<sup>2</sup>, ist Äthiopien einer der bevölkerungsreichsten Staaten Afrikas, welcher trotz Äquatornähe wenige Regionen mit klassisch tropischem Klima aufweist. Dies liegt an der Höhenlage eines Großteils von Äthiopien, mehr als die Hälfte des Landes liegt über 1.500 m ü. NHN. Die Universitätsstadt Jimma, Ausgangspunkt der Probensammlung, liegt circa 355 km südwestlich von der Hauptstadt Addis Ababa und befindet sich in einer Höhe von c.a. 1.700m ü. NHN [18]. Die meisten Malariafälle treten nach Ende der Regenzeit zwischen Oktober und Dezember auf. Ein zweiter kleinerer Peak ereignet sich zwischen April und Mai [19]. Dieser erklärt sich durch moderaten Regen und wärmere Temperaturen im März im Vergleich zu den trockenen kälteren Vormonaten und sehr starken Regenfällen ab Juni. Moderater Regen begünstigt die Brutbedingungen, zu starker Regen zerstört den Großteil der Larven [20, 21]. Dies gilt insbesondere für *P. falciparum*. *P. vivax* Infektionen treten mehr oder weniger das ganze Jahr über auf, da sich *P. vivax* unter niedrigeren Temperaturen in der Mücke entwickeln kann und zudem Rezidive auftreten [22, 23]. Abbildung 2 zeigt die monatlichen Niederschlagsmengen (Referenzzeitraum 1991-2005) in Jimma, Äthiopien. Äthiopien ist ein Land voller kultureller und ethnischer Vielfalt. Um die 80 verschiedenen Sprachen werden in diesem ostafrikanischen Land gesprochen. Amtssprache ist Amharisch. Der größte Teil der Erwerbstätigen in Äthiopien stammt aus dem Sektor der Land- und Forstwirtschaft. Hauptexportgüter sind Kaffee, Häute und Felle. [24-27]. Dies ist wichtig zu erwähnen, da Menschen in ländlichen Gegenden einer erhöhten Ansteckungsgefahr für Malaria ausgesetzt sind.

## Klimadiagramm von Jimma (Dschimma), Provinz Jimma / Äthiopien

Koordinaten: geographische Breite: 7° 40' N, geographische Länge: 36° 50' E

Stationshöhe: 1577 m über NN



**Abbildung 2: Klimadiagramm von Jimma, Provinz Jimma, Äthiopien.** (Referenzzeitraum für Niederschlag 1991-2005). Niederschlagsreichste Zeit von April bis September [28].

1% der Bevölkerung Äthiopiens leben in Malaria-endemischen Gebieten mit hoher Transmission (>1 Fall/1000 Einwohner), 66% in Gebieten mit niedriger Malaria-Transmission (0-1 Fall/1000 Einwohner) und 33% in malaria-freien Gebieten. Die beiden Plasmodiumspezies, die hauptsächlich in diesem Land vorkommen, sind *P. falciparum* mit 56% und *P. vivax* mit 44%. Äthiopien zählt zu den Ländern mit der höchsten Durchseuchung von *P. vivax*. Zusammen mit Indien, Indonesien und Pakistan trägt Äthiopien zu 80% der *P. vivax* Fälle weltweit bei. Die hauptsächlich vorkommenden *Anopheles* Arten sind: *An. arabiensis*, *An. pharoensis*, *An. funestus* und *An. nili* [3]. Diese Angaben beziehen sich auf das ganze Land, regionale Unterschiede sind nicht berücksichtigt. Eine Studie aus dem Bezirk Seka in der Jimma Region beschreibt jedoch *An. gambiae* (69,7%) als am häufigsten vorkommende Spezies, gefolgt von *An. coustani* (22,7%) und *An. pharoensis* (7,6%) [29]. In einer anderen Veröffentlichung, den Bezirk Kersa der Region Jimma betreffend, zeigte sich eine vergleichbare Verteilung der vorher genannten drei Spezies [30]

## 1.7 Artemisinin-based Combination Therapy (ACT)

Artemisinin, ein Sesquiterpenlacton mit Aktivität gegen Malaria [31], wird aus den Blättern des Einjährigen Beifußes (*Artemisia Annua*) gewonnen und ist Teil der gegenwärtigen First-Line-Therapie unkomplizierter Malaria tropica. Es wird von der World Health Organisation (WHO) seit 2001 empfohlen [32]. Aus der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) stammend wurde dieser Arzneistoff im Zuge des so genannten „Project 523“, Ende der 60er- Anfang der 70er-Jahre des 20. Jahrhunderts, für die moderne Pharmakotherapie wiederentdeckt. Über 5000 der aus der TCM entsprungenen Arzneimittel wurden ausfindig gemacht und getestet [33, 34]. 2015 erhielt die chinesische Forscherin Youyou Tu hierfür den Medizin-Nobelpreis.

Die meisten klinisch wichtigen Artemisinin Derivate werden im menschlichen Körper zu Dihydroartemisinin umgewandelt [35]. Ihre intrazelluläre Zielstruktur stellt - so glaubt man heute - das ATPase6 SERCA-type Protein dar. Dabei handelt es sich um eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, welche in der Membran des sarco/endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist. Das molekulare Target der Artemisinine befindet sich, im Gegensatz zu vielen anderen Antimalariamitteln, demnach außerhalb der Nahrungsvakuole des Parasiten und stellt einen eigenständigen Angriffspunkt dar [36].

Wichtige Vertreter der Artemisinine - bezüglich der weltweiten Kontrolle von Malaria - sind die Derivate Artemether und Artesunate sowie Arteether, Artelinate und das oben genannte Dihydroartemisinin [37, 38]. Artemisinine sind geeignete Malariamittel aufgrund folgender Eigenschaften:

1. Artemisinine können über verschiedene Applikationsformen, oral wie auch parenteral, verabreicht werden [39, 40].
2. Es handelt sich um ein sehr schnell und potent wirksames Medikament [41].
3. Sie sind auch gegen die unreifen Stadien der Gametozyten effektiv und besitzen somit die Eigenschaft, das Transmissionspotential zu verringern [42].
4. Sie wirken gegen Chloroquin-resistente Plasmodien Stämme, vorausgesetzt, diese haben keine Artemisininresistenz erworben [43].

Derzeitig werden Artemisinin-Derivate mit einem zweiten Malaria-Medikament kombiniert, welches an anderen Zielstrukturen angreift und eine längere Halbwertszeit aufweist als sein „Mitspieler“. Daraus resultiert die Kombinationstherapie ACT. Kombinationstherapien spielen unter anderem auch bei HIV und mykobakteriellen Erkrankungen (wie zum Beispiel der Tuberkulose) eine wichtige Rolle. Eine Kombinationstherapie hat folgende Vorteile:

1. Auf der einen Seite kann man die Wirksamkeit der Therapie erhöhen, auch wenn eines der Medikamente in Monotherapie keine ausreichende Wirkung mehr erzielt [44].
2. Auf der anderen Seite kann die Behandlungsdauer verkürzt werden [35].
3. Daraus resultiert eine höhere Compliance und eine Risikoverringerng, resistente Parasiten zu selektieren [45].

Trotz der oben genannten Vorteile geben Resistenzentwicklungen gegen Artemisinine, wie sie an der thailändisch- kambodschanischen Grenze seit 2008 beschrieben werden, Grund zur Besorgnis [46, 47]. Weitere Länder, in denen Resistenzen dieser Art entdeckt wurden, sind Myanmar und Vietnam [3]. Eine nachgewiesene Artemisinin-Resistenz ist folgendermaßen definiert:  $\geq 5\%$  der Patienten tragen PfKelch13 (siehe unten) resistenz-assoziierte Mutationen, alle jene hatten entweder eine persistierende Parasitämie in der Mikroskopie an Tag 3 oder eine Halbwertszeit der Parasitenclearance Kurve von  $\geq 5$  Stunden nach Therapie [13]. Bei Gabe von ACTs wird ein verlangsamtes Ansprechen der Therapie (verlängerte Parasitenclearance) als Resistenzverdacht für die Artemisininkomponente gewertet [13, 48].

Einer der großen Nachteile des gut verträglichen Mittels [49] sind die hohen finanziellen Kosten, welche nicht zuletzt den teuren Produktionskosten des Artemisinins selbst anzurechnen sind. Zudem entstehen massive Preisschwankungen aufgrund unterschiedlicher Ernteerfolge. Daraus folgt, dass viele malaria-endemische Gebiete sich diese Therapie nicht in einem flächendeckendem Ausmaß leisten können. Abhilfe schaffen Spenden von

Stiftungen wie zum Beispiel die Bill & Melinda Gates Foundation, aber auch Vorschläge für billigere Syntheseverfahren werden diskutiert [50, 51].

Ein Vertreter der ACTs ist Artemether/Lumefantrin (AL), das als Coartem® erhältlich ist. AL wurde offiziell ab 2004 in Äthiopien als First-Line-Therapie empfohlen und teilweise eingeführt [52]. In der Region Jimma folgte die breite Einführung von AL einer klinischen Malaria-Studie, die gemeinsam mit der LMU 2006 durchgeführt wurde [53]. Die Gesundheitszentren in Äthiopien verfügen über AL, viele Patienten suchen jedoch kein Gesundheitszentrum auf, die Wege sind oft sehr weit, und kaufen preiswertes Chloroquin in den nächstgelegenen Apotheken. Diese so genannte Selbstmedikation führt zur unüberwachten Einnahme von oftmals unwirksamen Medikamenten mit allen bekannten Folgen [54].

### 1.8 Chloroquin

Chloroquin, der Familie der 4-Aminoquinoline zugehörig [32], wurde erstmals 1934 von Mitarbeitern der Bayer AG synthetisiert. Seine überlegene antiplasmodiale Wirkung ließ es schnell zu einem der wichtigsten Medikamente in der Malariabekämpfung des 20. Jahrhunderts werden und verdrängte damit andere weniger wirksame Mittel wie Sontoquin, ein 3-methyl Derivat von Chloroquin, oder Mepacrin, welche bis Mitte des 20. Jahrhunderts weit verbreitete Anwendung in der Malariatherapie fanden. Die gute Wirksamkeit und Verträglichkeit von Chloroquin nährte die Hoffnung auf eine Eradikation der Malaria. Der weltweite, oft ungeschulte Einsatz dieser Monotherapie setzte Plasmodien Stämme einem enormen Selektionsdruck aus. Ende der 1950er Anfang der 1960er Jahre wurden die ersten resistenten *P. falciparum* Stämme entdeckt, zunächst in Südamerika dann in Südostasien. Die ersten Resistenzen in *P. vivax* fand man erst 1989 bei Australiern, welche Papua-Neuguinea bereisten bzw. dort lebten [55, 56]. Weiter konnte *in vivo* Therapieversagen in über 20 Ländern beobachtet werden, unter ihnen auch Äthiopien [57]. Leider fehlte in diesen Daten meist die Messung der Chloroquin-Konzentrationen im Probandenblut. Andere Gründe für das Therapieversagen, wie z.B. unzureichende Plasmakonzentrationen des Medikamentes bei fehlerhafter Einnahme, kommen gleichermaßen wie eine Resistenzentwicklung des Parasiten in Betracht. Eine Blutkonzentration von > 100ng/ml wurde als minimal effektive Konzentration (MEC) von Chloroquin vorgeschlagen [58]. Fälle

von durch laborchemische Messung der Chloroquin Konzentration bestätigten Resistenzen wurde unter anderem in Äthiopien, Brasilien, Malaysia, Myanmar, Papua-Neuguinea, Peru, den Salomonen und Thailand berichtet [32]. *Ex vivo* (Parasiten direkt vom infizierten Patienten) bzw. *in vitro* (Parasiten in Kultur) Testverfahren helfen Ergebnisse von *in vivo* Studien zu objektivieren. Eine Fülle von beeinflussenden Faktoren macht jedoch den direkten Vergleich verschiedener Labore schwierig. Diese Faktoren sind z.B. unterschiedliche Voranwendung von Antimalariamitteln, Mischinfektionen, unterschiedliche Verarbeitungszeiten, unterschiedliche Lagerungsbedingungen sowie uneinheitliche Protokolle und fehlende Standardisierungen der verschiedenen Testverfahren [59]. Aufgrund dessen sind *P. vivax ex-vivo* Daten in Afrika rar, gerade bezüglich Äthiopien liegen meines Wissens keine vor.

Chloroquin reichert sich in der Nahrungsvakuole des Malaria-Parasiten an. Dort, so nimmt man an, beeinflusst es Entgiftungsprozesse des Häms, ein Bestandteil des Hämoglobins, was zum Tod des Parasiten führt. Ein erhöhter Efflux und damit eine verringerte Akkumulation des Medikaments in der Nahrungsvakuole scheint ein Grund für Resistenzen zu sein [60-62].

Neben oben genannter Wirkung wird Chloroquin bei rheumatischen Erkrankungen eingesetzt, zeigt eine breite antivirale Wirkung sowie antitumorale Aktivität. Zudem wird in der Behandlung von Amöbenabszessen und des chronischen Q-Fiebers auf dieses vielseitige Medikament zurückgegriffen. Eine erwähnenswerte Nebenwirkung, ist die Chloroquin-Retinopathie. Hier sind regelmäßige augenärztliche Kontrollen v.a. bei längerer Anwendung ratsam. Zudem sollte bedacht werden, dass Chloroquin QT-Zeit verlängernd wirkt. Gerade in Kombination mit anderen QT-Zeit verlängernden Medikamenten kann es hier zu einer lebensgefährlichen proarrhythmischen Wirkung kommen. [63-69]

Die Entdeckung neuer wirksamerer Chloroquin-Derivate sowie die klinische und die molekularbiologische Surveillance von Chloroquin-Resistenzen in Malaria endemischen Gebieten sind Gegenstand aktueller Forschungen [70].

## 1.9 Molekulare Marker

Molekulare Marker sind kurze DNA-Abschnitte mit bekannter Position im Genom. Sie werden in der Molekularbiologie vielfältig eingesetzt. Auch in der medizinischen Forschung finden sie eine weit verbreitete Anwendung. In der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte molekulare Marker im Genom der Plasmodien untersucht, die mit einer Resistenzentwicklung der Parasiten gegenüber Malariamedikamenten assoziiert werden. Molekulare Marker dienen nicht der Beurteilung individueller Risiken oder Therapieoptionen, sie können Trends in der Parasitenpopulation anzeigen und helfen bei der Wahl regionaler oder nationaler Therapieregime. Die Etablierung eines Markers verläuft in mehreren Schritten. Durch das heutige „Whole Genome Sequencing“ ist es um einiges leichter geworden, Polymorphismen in resistenten Plasmodienstämmen zu finden. Meist wurden Labor- oder Wildstämme *in vitro* durch kontinuierlichen Kontakt mit dem Medikament resistent gezüchtet und dann analysiert. In Folge werden dann auch Parasiten aus Patienten auf die gefundenen Marker untersucht. Hier ist es am besten gleichzeitig eine *in vitro* Untersuchung des Parasitenstammes durchzuführen, um das Ansprechen des Medikamentes überprüfen zu können. Da Malariapatienten je nach Endemiegebiet eine unterschiedlich hohe Teilimmunität besitzen, sind die reinen *in vivo* (klinischen) Daten oft nicht aussagekräftig. Ein Patient mit Teilimmunität kann auch mit einem an sich unwirksamen Medikament parasitenfrei werden. In dieser Art unverfälschte klinische Daten erhält man nur bei Studien mit Kindern unter 5 Jahren oder mit Nicht-Immunen aus Nicht-Endemiegebieten. Es ist also durchaus möglich, dass klinische Daten und *in vitro* Daten bzw. molekulare Daten nicht gut korrelieren. Molekulare Daten können daher frühzeitig Veränderungen in der Parasitenpopulation durch medikamentösen Selektionsdruck aufzeigen, die durch Teilimmunität in der Bevölkerung verschleiert werden. Je nach Validität des Markers ist ein frühes Umdenken der Therapieoptionen, gerade für vulnerable Teile der Bevölkerung wie Kinder und Schwangere, die ihre Immunität weitestgehend verlieren, möglich.

Folgende Marker werden in dieser Arbeit untersucht:

- (i) der *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcr*t),
- (ii) das *Plasmodium falciparum* multi-drug resistance gene 1 (*pfmdr*1),
- (iii) das *Plasmodium falciparum* ATPase6 SERCA-type gene (*pfATP6*),
- (iv) die PF3D7\_1343700 kelch propeller domain (K13-propeller) und
- (v) das *Plasmodium vivax* multi-drug resistance gene 1 (*pvmdr*1).

In Tabelle 2 auf Seite 18 sind die fünf Resistenzmarker mit den jeweils entsprechenden Malaria-Wirkstoffen zusammengefasst.

### **1.9.1 *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcr*t)**

Das *pfcr*t Gen befindet sich auf Chromosom 7 des Parasiten. Es kodiert für ein Transmembranprotein, welches sich in der Membran der Nahrungsvakuole des Parasiten befindet [71]. Die Nahrungsvakuole ist die Zellorganelle, die von zentraler Bedeutung für den Malariaerreger, bei der Hämoglobinaufnahme und Verstoffwechslung von Hämoglobin aus dem Wirtserythrozyten, ist [72]. *Pfcr*t wird vor allem in Bezug auf Chloroquinresistenzen beschrieben, jedoch scheint er auch mit einer Reihe von Resistenzen gegenüber anderen Malariamedikamenten in Verbindung zu stehen, wie z.B. Artemisinin, Chinin und Amodiaquin [73-75].

Der bekannteste Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) ist der Austausch der Aminosäure Lysin durch Threonin an Codon 76 (K76T). Auf Ebene der Nukleinbasen kommt es hier zu einem Austausch eines Adenins (A) durch ein Cytosin (C) an zweiter Stelle des Codons, AAA wird zu ACA. Diese Mutation gilt allgemein als die wichtigste, wenn nicht sogar die *Conditio sine qua non* für eine Chloroquinresistenz und ist assoziiert mit Mutationen in benachbarten Codons. Verschiedene Haplotypen über die Spanne von Codon 72 bis 76 sind beschrieben und variieren regional. Zu erwähnende Haplotypen sind CVMNK, SVMNT, CVMNT und CVIET, siehe Diskussion Seite 58. Bei CVMNK handelt es sich um

den weltweit identischen Wildtyp, SVMNT wurde mit Resistenz auf Amodiaquin in Verbindung gebracht, CVIET ist der in Afrika vorherrschende resistente Haplotyp [71, 76-79]. Tabelle 1 zeigt die drei in dieser Arbeit beobachteten Haplotypen von Codon 72 bis 76 mit korrespondierender Aminosäuresequenz. Die Wiedereinführung des Wildtyps ist nach Aussetzen der Chloroquintherapie und Einführung von zunächst Sulfadoxin/Pyrimethamin und später ACTs 2004 bzw. 2007 in Kenia und Malawi beobachtet worden [32, 80-84].

**Tabelle 1: Ausgewählte Haplotypen von Codon 72 bis 76 des *pfcr* Gens**

Aminosäure (1-letter code)	Aminosäure (3-letter code)	Nukleinbasensequenz
CVMNK	Cys-Val-Met-Asn-Lys	TGT-GTA-ATG-AAT-AAA
CVMNT	Cys-Val-Met-Asn-Thr	TGT-GTA-ATG-AAT-ACA
CVIET	Cys-Val-Ile-Glu-Thr	TGT-GTA-ATT-GAA-ACA

### 1.9.2 *Plasmodium falciparum* multi-drug resistance gene 1 (*pfmdr1*)

Das *pfmdr1* Gen ist auf Chromosom 5 lokalisiert. Es kodiert für das P-glycoprotein homologue 1 [85, 86]. Sowohl bestimmte SNPs als auch eine vermehrte Anzahl von Genkopien scheint mit der Veränderung der Wirksamkeit von Pharmaka wie Chloroquin, Mefloquin, Artesunat, Halofantrin, Chinin, Artemisinin und Lumefantrin in Verbindung zu stehen [87-90]. Beobachtungen bezüglich der Genkopienanzahl scheinen in Asien von größerer Bedeutung zu sein, innerhalb des afrikanischen Kontinents spielen sie eher eine untergeordnete Rolle [91, 92].

Diese Arbeit beschränkt sich deshalb auf die Untersuchung der Punktmutationen N86Y (AAT→TAT) und Y184F (TAT→TTT) des *pfmdr1* Gens, die in Zusammenhang mit Resistenzen gegenüber Artemether-Lumefantrin diskutiert werden [91, 93-95]. Eine Assoziation konnte jedoch für Codon 184 nicht immer bestätigt werden [96].

*Pfmdr1* Y86 wurde gemeinsam mit *pfcr* T76 mit Chloroquin-Resistenz in Verbindung gebracht, die Ergebnisse waren jedoch kontrovers. Es wird ein modulierender, die Resistenz verstärkender, jedoch nicht Resistenz verleihender Effekt von Y86 bei Anwesenheit von T76 angenommen. Nach Einführung von AL, nicht aber Artesunat-Amodiaquin, war viele-

rorts die Selektion des Wildtyps N86 zu beobachten. Dies könnte ein Hinweis auf eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Lumefantrin bedeuten [32]. Die Surveillance von Codon 86 scheint daher ein geeignetes Tool zu sein, um den Gebrauch von AL auf der einen und Chloroquin auf der anderen Seite einzuschätzen.

### **1.9.3 *Plasmodium falciparum* ATPase6 SERCA-type gene (*pfATP6*)**

PfATP6 ist, so glaubt man, die einzige  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase im parasitären Genom des *Plasmodium falciparum*. Die strukturelle Ähnlichkeit von Artemisininen zu dem SERCA Inhibitor Thapsigargin gab Anhalt zur These, *pfATP6* sei deren Hauptwirkort. Diese Annahme ist durch Experimente an Oozyten des Glatten Krallenfrosches, *Xenopus laevis* gestützt [36]. Auch andere Quellen bestätigen *pfATP6* als Haupttarget von Artemisininen [43, 97]. Somit stellt *pfATP6* eine von der Nahrungsvakuole des Malariaparasiten unabhängige zytosolische Zielstruktur dar. Eine Großzahl von Polymorphismen im *pfATP6* Gen wurde beschrieben, die sich größtenteils als Spontanmutationen ohne Zusammenhang mit einer Artemisinin-Therapie herausstellten. *In vitro*-Resistenz gegen Artemisinine wurde für die Mutationen L263E und S769N nachgewiesen [32, 98, 99]. Ein Fall aus Senegal mit einer erhöhten  $\text{IC}_{50}$  gegenüber Artemisininen wurde beschrieben, bei dem eine Doppelmutation E431K (GAA→AAA), A623E (GCA→GAA) entdeckt wurde. [99-101]. Zum Zeitpunkt der Studie galten insbesondere die SNPs E431K (GAA→AAA), L402V (TTA→GTA), L263E (TTA→GAA), H243Y (CAT→TAT) als mögliche Marker. Neuere Studien zeigen keine Assoziation für E431K, eine Studie aus Tanzania beschreibt die Selektion von S769N unter ACTs [102, 103]. Der Fokus hat sich nach Entdeckung von Mutationen in der K13-propeller Kelch Domäne verschoben, Polymorphismen im *PfATP6* Gen sind in den Hintergrund gerückt.

### **1.9.4 PF3D7\_1343700 kelch propeller domain (K13-propeller)**

Anfang 2014 wurde die K13-propeller Kelch Domäne von Arley et al. als ein neues Markergens vorgeschlagen, welches mit einer Artemisininresistenz assoziiert ist. Es wurden eine Vielzahl von SNPs auf der Kelch-Domäne isoliert, welche mit einer reduzierten Empfindlichkeit der Parasiten gegenüber Artemisinin korreliert werden konnten. Die SNPs M476I (ATG→ATA) und D56V (GAT→GTG) ereigneten sich als erstes unter kontinuierlichem *in vitro* Selektionsdruck und verliehen den Plasmodien Artemisinin-Resistenz [104]. Die K13-propeller Kelch Domäne ist nun (Stand 2018) zu einem Artemisinin-Resistenz definierenden Unterpunkt der W.H.O. geworden, siehe Abschnitt 1.7 [13].

In anderen Organismen wie zum Beispiel dem Pfeilschwanzkrebs hängt das Kelch-Motiv mit einer Vielzahl von Prozessen zusammen. Manche sind mit der Aktinbildung und dem Zytoskelett assoziiert, andere nehmen Einfluss auf die Genexpression oder die Zellmorphologie, um nur ein paar Beispiele zu nennen [105]. Im *Plasmodium falciparum* zeigt der K13-propeller Ähnlichkeit zu den humanen KLHL12 und KLHL2 wie auch zu dKEAP1. Letzteres ist in Adaptionsprozesse bei oxidativem Stress eingebunden. KLHL12 und KLHL2 spielen beim Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau eine Rolle [104]. Die genaue Funktion des K13-propeller im *Plasmodium* Organismus bleibt Gegenstand der Forschung.

### **1.9.5 *Plasmodium vivax* multi-drugresistance gene 1 (*pvmdr1*)**

Bezüglich der Spezies *Plasmodium vivax*, ist *pvmdr1* das zu *pfmdr1* orthologe Gen. In dieser Arbeit stellt es den einzigen untersuchten Marker für diese *Plasmodium*art dar. Veränderungen im *Pvmdr1* stehen im Verdacht, das Ansprechen von Antimalariatherapien, vornehmlich Chloroquin, Amodiaquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin, zu verändern. Speziell die SNPs Y976F (TAC→TTC) und F1076L (TTT→CTT) scheinen hierbei eine zentrale Rolle einzunehmen [106-108]. Allerdings gibt es wiederum Studien aus Brasilien und Madagaskar, die Mutationen auf letzteren Genloci nicht mit einer vermehrten Chemoresistenz gegenüber Chloroquin in Verbindung bringen können. Der Wert als Resistenzmarker ist daher umstritten [109, 110].

## Einleitung

Dem ungeachtet zählt *Pvmdr1* jedoch zu den am meisten untersuchten Malariaresistenzgenen [111].

**Tabelle 2: Die in dieser Arbeit untersuchten Resistenzmarker sowie die Antimalariamittel/Wirstoffe, die mit den Markern in Zusammenhang stehen.**

<i>Plasmodium falciparum</i>				
	Resistenzmarker	Wirkstoffe	Untersuchte SNPs, in Klammern Punktmutation (3-letter Code)	Referenzen
	Pfcr1	<b>Chloroquin</b> , Artemisinin, Chinin, Amodiaquin	K76T (AAA→ACA)	Schneider et al. 2002 Sidhu et al. 2002 Djimde et al. 2001
	Pfmdr1	Artemether-Lumefantrin Halofantrin Mefloquin Chloroquin	N86Y (AAT→TAT) Y184F (TAT→TTT)	Roepe et al. 2009 Price et al. 2006 Pickard et al. 2003 Duraisingh et al. 2000
	Pfatp6	Artemisinin	L402V (TTA→GTA) E431K(GAA→AAA)	Cui et al. 2012 Menegon et al. 2008 Jambou et al. 2005
	13-kelch	Artemisinin	M476I (ATG→ATA) N531I (AAT→ATT)	Ariey et al. 2014
<i>Plasmodium vivax</i>				
	Pvmdr1	Chloroquin Amodiaquin Sulfadoxin- Pyrimethamin	Y976F (TAC→TTC) F1076L(TTT→CTT)	Marfurt et al. 2008 Suwanarusk et al. 2007 Brega et al. 2005

### 1.10 Fragestellung

Nach Einführung von ACTs gegen Malaria in endemischen Gebieten aufgrund von Resistenzen gegenüber den Vorgängerpräparaten wie Chloroquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin sind Veränderungen der molekularen Marker weltweit beschrieben worden [32]. Eine kontinuierliche Surveillance ermöglicht Rückschlüsse auf molekulare Mechanismen bezüglich früherer Therapien und offenbart Tendenzen unter der neuen Therapie. Diese Arbeit soll einen Überblick über den Wandel der molekularen Marker *pfcr1*, *pfmdr 1* und *pfATP6* in der Region Jimma in Südwest-Äthiopien vermitteln. Hierfür wurden eigens erhobene Daten vom Jahr 2013 mit schon bestehenden der Jahre 2004, 2006 und 2008/09 verglichen [112]. Die Daten aus dem Jahre 2008/09 wurden in einem anderen Zusammenhang 2014 teilveröffentlicht [77] und zur erneuten Auswertung von Frau PD Dr. med. Nicole Berens-Riha zur Verfügung gestellt. Daraufhin erfolgte unsere Veröffentlichung der bisher unveröffentlichten Daten zusammen mit einer Analyse über die Zeit im Jahre 2015 [112]. Zusätzlich wurden erstmals die Marker K13-propeller von *P. falciparum* sowie *pvmdr1* von *P. vivax* in der Region Jimma von mir untersucht.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien und Primer

Tabelle 3: Materialien

Bezeichnung	Hersteller
<b>Chemikalien</b>	
Agarose GTQ	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose High Resolution	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland
AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase with Buffer and MgCl <sub>2</sub>	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc, Foster City, USA
Apol + NE-Puffer 3.1	New England BioLabs® Inc, Ipswich, USA
Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems™, Foster City, USA
BlueJuice™ Gel LoadingBuffer	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad, USA
BSA, Molecular Biology Grade	New England BioLabs® Inc, Ipswich, USA
Chelex® InstaGene™ Matrix	Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, USA
dNTP Solution Mix	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
DyeEx 2.0 Spin Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
GelRed®	Genaxxonbioscience, Ulm, Deutschland
Hi-Di™-Formamid	Applied Biosystems™, Foster City, USA
LiChrosolv®	Merck Milipore, Burlington, USA
Natriumhypochloritlösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Real-Time qPCR Mastermix	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

## Materialien und Methoden

---

Rotiphorese® TAE-Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® TAE-Puffer light	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

## Laborgeräte

---

### PCR-Geräte

Real-Time PCR System, CFX96™ Thermozykler, TProfessional Basic DNA-Sequenzierungsgerät 3730 DNA Analyzer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA Biometra®, Göttingen, Deutschland  Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc, Foster City, USA
---	--

### Pipetten

Eppendorf Research®, 0.5-10µl PIPETMAN® P20, P200, P1000	Eppendorf AG., Hamburg, Deutschland Gilson, Inc., Middleton, USA
---	---

### Sonstiges

Elektrophorese-Kammer	PeqLabBiotechnologie GmbH, ab 2015 VWR Life Science Competence Center, Er- langen, Deutschland
Magnetrührer, MR Hei-Standard	HeidolphInstrumente GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Mikrowelle Privileg 8017E Thermomixer, MKR-13	Whirlpool Corporation, Benton Harbor, USA DITABIS Digital Biomedical Imaging Sys- tems AG, Pforzheim, Deutschland
Tischwaage, Kern 440-33	KERN & SOHN GmbH, Balingen- Frommern, Deutschland
Ultraviolet Transilluminator	UVP Products Ltd., Cambridge, U.K.
Vortexmischer, Vortex 4 basic	IKA®, Staufen, Deutschland
Zentrifuge, Biofuge® pico	HERAEUS, Hanau, Deutschland

### Laborbedarf

---

96-Loch optische Titerplatte, Multiplate™	Bio-Rad Laboratories, Inc. , Hercules, USA
Einweg-Laborhandschuhe, Nitril® 3000	Meditrade GmbH, Kiefersfelden, Deutschland
Filterpapier, Standart-Whatman Cellulose	GE Healthcare, München, Deutschland
Chromatography paper 3MM	
Microseal® B Adhesive Seals	Bio-Rad Laboratories, Inc. , Hercules, USA
Mikroröhrchen 1.5 ml	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Mikro-Schraubenröhre 2 ml, PP	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
PCR-Röhrchen 0.2 ml, G001	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Pipettenspitzen	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Ultrafree- DA Centrifugal Filter Unit	Merck Milipore, Burlington, USA

### Software

---

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, USA
BioEditSequenceAlignment Editor	Tom Hall, Carlsbad, USA
CFX Manager™ Software	Bio-Rad Laboratories, Inc. , Hercules, USA
DNASIS MAX (3.0)	MiraiBio Group, Irvine, USA
	UVP Products Ltd., Cambridge, U.K.
EndNote™ X7	Thomson Reuters, Toronto, Kanada
Grabit®	
Office 2007	Microsoft, Albuquerque, USA
GIMP 2.8	Spencer Kimball, Peter Mattis und das GIMP-Entwicklerteam, USA

**Primer**

In Tabelle 4 sind die Primer aufgeführt, die in dieser Arbeit Anwendung fanden. Sie wurden von Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland, synthetisiert.

**Tabelle 4: Primer**

Target	Primer	Publikation
Spezies	<p>Nest 1 <i>Plasmodium</i>genus                      Forward: rPLU5: 5'-CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC-3'                      Reverse: rPLU6: 5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3'</p> <p>Nest 2 <i>Plasmodium falciparum</i>                      rFAL1: 5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT-3'                      rFAL2: 5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3'</p> <p>Nest 2 <i>Plasmodium vivax</i>                      rVIV1: 5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3'                      rVIV2: 5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3'</p> <p>Nest 2 <i>Plasmodium ovale</i>                      rOVA1: 5'-ATCTCTTTTGGCTATTTTTTAGTATTGGAGA-3'                      rOVA2: 5'GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG-3'</p> <p>Nest 2 <i>Plasmodium malariae</i>                      rMAL1: 5'-ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC-3'                      rMAL2: 5'-AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA-3'</p>	Snounou et al. 1993a [113]
<i>pfcr</i>	<p>Nest 1:                      Forward: TCRP1: 5'-CCGTTAATAATAAATACACGCAG-3'                      Reverse: TCRP2: 5'-CGGATGTTACAAACTATAGTTACC-3'</p> <p>Nest 2:                      Forward: TCRD1: 5'-TGTGCTCATGTGTTTAACTT-3'                      Reverse: TCRD2: 5'-CAAACTATAGTTACCAATTTTG-3'</p>	Djimde et al. 2001 [73]
<i>pfmdr1</i>	<p><u>Codon 86</u>                      Forward: 86F: 5'-TGTATGTGCTGTATTATCAGGAGGAAC-3'                      Reverse: 86R: 5'AATTGTAATAAACCTATAGATACTAATGA TAA-TATTATAGG-3'</p> <p>Asn (wt) probe:                      5'-6 FAM-ACCTAAATTCATGTTCTTT-MGB-NFQ-3'</p> <p>Tyr (mut) probe:                      5'-YakYel-ACCTAAATACATGTTCTTT-MGB-NFQ-3'</p> <p><u>Codon 184</u>                      Forward: 184F:                      5'-AAGATGGACAATTTTCATGATAATAATCCT-3'</p>	Purfield et al 2004 [114]

	<p>Reverse: 184R: 5'-AATACATAAAGTCAAACGTGCATTTTTTA-3'</p> <p>Tyr (wt) probe: 5'-6-FAM-CTTTTTAGGTTTATATATTTGGT-MGB-NFQ-3'</p> <p>Phe (mut) probe: 5'-YakYel-CTTTTTAGGTTTATTTATTTGGT-MGB-NFQ-3'</p> <p>Zu beachten ist, dass die 5' Enden der „Mutationssonden“ mit dem Fluoreszenzfarbstoff Yakima Yellow versehen sind, nicht wie in Purfield et al (2004) mit VIC. Yakima Yellow ist eine gut bekannte, preiswertere Alternative zu VIC.</p>	
<i>pfATP6</i>	<p>Forward: ATP1: 5'- CCGCTATTGTATGTGGTAGATG-3' Reverse: ATP2: 5'-ATTCCTCTTAGCACCCTCCT-3'</p>	Menengon et al. 2008 [100]
K13-propeller Domäne	<p>Nest1: Forward: K13-1: 5'-CGGAGTGACCAAATCTGGGA-3' Reverse: K13-4: 5'-GGGAATCTGGTGGTAACAGC-3'</p> <p>Nest2: Forward: K13-2: 5'-GCCAAGCTGCCATTCATTTG -3' Reverse: K13-3: 5'-GCCTTGTTGAAAGAAGCAGA -3'</p>	Ariey et al. 2014 [104]
<i>pvmDr</i>	<p>Forward: PvmDrF: 5'-GCTGTCAGCACATATTAACAGAGA-3' Reverse: PvmDrR: 5'-TGCCTACTGGTTTGGTTCC-3'</p>	Hauseigene Entwicklung

## 2.2 Proben

### Studienorte und Proben

Die Probenerhebung fand in fünf verschiedenen medizinischen Gesundheitszentren statt: Choche Health Center, Limu Shay Health Center, Didisa Health Center, Jimma Health Center und das Shanan Gibe Hospital. Diese befinden sich allesamt um die Stadt Jimma in der gleichnamigen Provinz, welche ca. 355 km südlich von Addis Ababa, der Hauptstadt Äthiopiens, liegt. Für die Probensammlung wurde der Zeitraum zwischen März und Juni 2013 gewählt. Die meisten Malariafälle treten, wie oben erklärt, nach der Regenzeit zwischen Oktober und Dezember und im Frühjahr zwischen April und Mai auf [18].

Die Studie war in den Ablauf der klinischen Routine der Malariadiagnostik integriert. Bei einem Malariaverdachtsfall wurde eine mikroskopische Untersuchung des Blutes mittels dickem Tropfen und Blutaussstrich durchgeführt. Die Präparate wurden nach Giemsa gefärbt und von geschultem Personal vor Ort mit einem Lichtmikroskop spezifiziert. Nur mik-

roskopisch malaria-positive Patienten wurden in die Studie eingeschlossen, hier jedoch alle, d.h. Patienten mit *P. falciparum*, *P. vivax* und Mischinfektionen wurden rekrutiert. Die Teilnahme war freiwillig, eine unterschriebene Einverständniserklärung des Patienten oder Erziehungsberechtigten wurde erfasst. Ethikanträge wurden von der Universität Jimma und der Universität München, LMU, bewilligt.

Die Proben wurden in Folge anonymisiert verarbeitet, eine Rückverfolgung und Korrelation mit klinischen Daten war weder möglich noch gewünscht. Das zur Verfügung stehende Budget schloss eine klinische Studie mit Follow-up der Patienten aus. Die Gewinnung von *ex vivo* Daten war mangels Laborausstattung am Studienort nicht möglich. Die Studie diente ausschließlich der molekularen Surveillance.

Bei den Studien-Proben handelt es sich um kapilläres Blut, welches mit Hilfe der Fingerstich-Methode auf Filterpapier aufgebracht wurde. Hierfür sticht man mit einer Lanzette in eine Fingerbeere und fängt die wenigen austretenden Blutstropfen mit einem Stück Filterpapier ab. Die Filterpapiere wurden an der Luft getrocknet und anschließend in luftdichte Plastikbeutel verpackt. Während der wenigen Wochen Lagerung in Äthiopien waren die Filterpapiere der Zimmertemperatur ausgesetzt. Für die restlichen Untersuchungen wurden die Filterpapiere fachgerecht in das Tropeninstitut der Ludwigs Maximilians Universität (LMU) nach München transportiert und bei  $-20\text{C}^{\circ}$  bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

## 2.3 DNA Amplifikation

### 2.3.1 Extraktion

Für die Extraktion nach dem Vorbild von Kain et al. 1991 [115] habe ich eine InstaGene<sup>TM</sup> Matrix (z.B. Chelex von BioRad<sup>TM</sup>) verwendet. Hierfür wischte ich unmittelbar vor der Extraktion die Arbeitsoberfläche, Schere und Pinzette mit 0.5%iger Natriumhypochloritlösung (NaOCl) ab, um diese von DNasen sowie verunreinigenden DNA Bestandteilen zu befreien. Um das Kontaminationsrisiko weiter zu senken und zum Schutz vor einer potentiellen, wenn auch unwahrscheinlichen, Infektion verwendete ich hier wie in allen folgenden Methoden Einweg-Laborhandschuhe. Als erster Schritt wurde die InstaGene<sup>TM</sup> Matrix mit Hilfe eines Magnetrührers für ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur bewegt. Danach schnitt ich die Blutstropfen aus dem Filterpapier aus und gab sie in vorher gekennzeichnete 1,5 ml

Eppendorf®-Gefäße mit Safe-Lock. Jedes Röhrchen versetze ich nun mit 100 µl InstaGene™ Matrix, durchmischte es für 30 Sekunden gründlich mit Hilfe eines Vortexmischers und erwärmte es dann in einem Heizblock für 15 Minuten auf 100°C. Anschließend durchmischte ich noch einmal kurz mit einem Vortexmischer und zentrifugierte für 2 min bei 10.000 U/min. Danach pipettierte ich den Überstand in ein neues 1,5 ml Röhrchen. Nun zentrifugierte ich erneut bei 10.000 U/min für 2 min. Darauffolgend habe ich den Überstand für weitere Verfahren bei –20°C in 0,5 ml-Röhrchen aliquotiert und eingefroren.

### 2.3.2 Konventionelle PCR

#### 2.3.2.1 Plasmodium Spezifizierung

Um die in den Probenextrakten enthaltenen Parasiten auf ihre Art zu spezifizieren, zog ich eine konventionelle nested Polymerase Chain Reaction (PCR) heran. Diese spezielle Art von PCR involviert 2 Primerpaare, für zwei aufeinanderfolgende PCR-Läufe. In der ersten PCR (auch outer PCR, also äußere PCR oder Nest 1 genannt) wird mit dem Primerpaar 1 eine spezifische Sequenz aus der extrahierten DNA amplifiziert. Das PCR-Produkt wird nun in der zweiten PCR mit dem Primerpaar 2 (inner PCR, also innere PCR oder Nest 2) eingesetzt. Diese Primer binden innerhalb der schon amplifizierten Sequenz und vervielfältigen den gewünschten Abschnitt. Hierdurch kann die Ausbeute des PCR Produkts erhöht werden, nicht zuletzt durch das Minimieren von unspezifischen Primer Target Bindungen. Das hier angewendete Verfahren beruht auf artspezifischen Unterschieden in der Sequenz der kleinen Untereinheit der ribosomalen RNA der Parasiten [113, 116, 117]. In der Nest 1 PCR wird ein so genannter genus-spezifischer Abschnitt amplifiziert, deren Primerbindungsstellen alle Plasmodienarten gemein haben. Die Nest 2 vervielfältigt dann species-spezifische Sequenzen, da sich innerhalb des genus-spezifischen Abschnitts deutliche Unterschiede in der Sequenz zwischen den Arten ausgebildet haben [113, 118]. Unter Berücksichtigung der endemischen Verteilung der verschiedenen *Plasmodienarten* in Äthiopien testete ich auf *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium malariae*. Das Gesamtvolumen einer Einzelreaktion von 20 µl setzte sich wie in Tabelle 5 aufgeführt zusammen. Tabelle 6 zeigt die Einstellungen für das verwendete PCR-

Programm. Für die konventionellen PCRs wurde der Thermozykler, TProfessional Basic von der Firma Biometra® aus Göttingen, Deutschland benutzt.

**Tabelle 5: Spezifizierung Einzelreaktion**

Reagenz (Konzentration Stammlösung)	Volumen (Endkonzentration)
H <sub>2</sub> O	13,42 µl
Puffer (10x)	2,00 µl (1x)
Mg <sup>2+</sup> (25 mM)	2,00 µl (2,5 mM)
dNTPs (10 mM)	1,00 µl (0,05 mM)
Primer 1+2 (10 µM/Primer)	0,50 µl (0,25 µM/Primer)
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,08 µl (0,02 U/µl)
Template	1,00 µl

Das Programm des Thermozyklers ergab sich wie folgt:

**Tabelle 6: Programm Thermozykler Spezifizierung**

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	5min
2	58°C	2min
3	72°C	2min
4	94°C	1min
5	58°C	2min
6	72°C	5min
7	20°C	10min
8	8°C	pause

(Schritt 2-4 25x)

Da es sich um eine Nested-PCR handelte, verwendete ich im ersten Zyklus in der Nest 1 die Primer rPLU5 (5`-CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC-3`) und rPLU6 (5` TTAAAATTG TTGCAGTTAAAACG -3`), in der Nest 2 dann, entsprechend für die jeweilige *Plasmodium* Art, rFAL1(5`-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT-3`) und rFAL2 (5`-

ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3`), mit einer Produktlänge von 205 bp, für *Plasmodium falciparum*, rVIV1 (5`-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3`) und rVIV2 (5`- ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA -3`), mit einer Produktlänge von 117 bp, für *Plasmodium vivax* und rMAL1(5`-ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC- 3`) und rMAL2 (5`-AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA- 3`), mit einer Produktlänge von 144 bp, für *Plasmodium malariae* [113, 116]. Bei negativem Resultat wiederholte ich die PCR, diesmal mit einem Templatevolumen von 5 µl. Die Erhöhung des Templatevolumens bezieht sich nicht nur auf die Spezifizierung sondern auf alle genannten PCRs. Die Auswertung erfolgte mittels Gelelektrophorese. Verwendet wurde ein 2% Agarosegel (Agarose GTQ). Zum Sichtbarmachen der Banden wurde der Fluoreszenzfarbstoff GelRed® den Gelen hinzugegeben. GelRed® ist laut Hersteller ein ultrasensitiver, extrem stabiler nicht cancerogener Farbstoff, welcher in Nukleinsäuren interkaliert und die Eigenschaft besitzt unter ultraviolettem Licht zu fluoreszieren. Es wurde eine Laufzeit von 60 min bei einer Spannung von 100 V gewählt. Eine nähere Beschreibung findet sich im Abschnitt 2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese auf Seite 35.

**Tabelle 7: Primer Nested PCR Spezifizierung**

Primer Nest 1 Spezifizierung	
rPLU5	(5`- CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC -3`)
rPLU6	(5`- TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG -3`)
Primer Nest 2 Spezifizierung	
rFAL1( <i>plasmodium falciparum</i> )	(5`-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT -3`)
rFAL2( <i>plasmodium falciparum</i> )	(5`-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC -3`)
rVIV1 ( <i>plasmodium vivax</i> )	(5`-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3`)
rVIV2 ( <i>plasmodium vivax</i> )	(5`- ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA -3`)
rMAL1 ( <i>plasmodium malariae</i> )	(5`- ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC -3`)
rMAL2 ( <i>plasmodium malariae</i> )	(5`- AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA -3`)

### 2.3.2.2 *pfcr*

Um die *pfcr* K76T Mutation zu untersuchen, nahm ich hier eine konventionelle nested PCR zur Hilfe [73, 119]. Im Unterschied zu Berens et al. 2003 wählte ich anstatt eines Reaktionsvolumens von 50 µl, ein Reaktionsvolumen von 20 µl. Dies lieferte verlässliche Ergebnisse und erlaubte zudem materielle Einsparungen. Bei der Verringerung handelt es sich jedoch um das Reaktionsvolumen. Wie bei allen hier behandelten PCRs wurde das Templatevolumen zunächst auf 1 µl festgelegt. Bei nicht erfolgtem Bandennachweis erfolgte ein zweiter Durchlauf mit 5 µl Templatevolumen. Das Reaktionsvolumen von 20 µl setzte sich für die Nest1 als auch für die Nest2 wie folgt zusammen:

Tabelle 8: *pfcr* Einzelreaktion

Reagenz (Konzentration Stammlösung)	Volumen (Endkonzentration)
H <sub>2</sub> O	12,30 µl
Puffer (10x)	2,00 µl (1x)
Mg <sup>2+</sup> (25 mM)	2,00 µl (2,5 mM)
dNTPs (10 mM)	1,00 µl (0,5 mM)
Primer 1+2 (10 µM/Primer)	1,60 µl (0,8 µM/Primer)
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,10 µl (0,025 U/µl)
Template	1,00 µl

Das Programm des Thermozykler ergab sich wie folgt:

Tabelle 9: Programm Thermozykler *pfcr*

Schritt	Temperatur	Zeit
1	94°C	2,5 min
2	94°C	30 sec
3	56°C	30 sec
4	60°C	1 min
5	60°C	3 min
6	8°C	pause

(Schritt 2-4 44x)

Die verwendeten Primer der Nest 1 und der Nest 2 Reaktion des *pfcr1* Gens sind in

Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 10: Primer *pfcr1***

<b>Primer Nest 1 <i>pfcr1</i></b>	
TCRP1	(5'-CCGTTAATAATAAATACACGCAG- 3')
TCRP2	(5' –CGGATGTTACAAAACCTATAGTTACC- 3')
<b>Primer Nest 2 <i>pfcr1</i></b>	
TCRD1	(5' –TGTGCTCATGTGTTTAAACTT- 3')
TCRD2	(5' –CAAAACCTATAGTTACCAATTTTG- 3')

Das 145 bp lange Amplifikat unterzog ich nun einer Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analyse. Das hierbei verwendete Restriktionsenzym ApoI, für Herstellerinformationen verweise ich auf Tabelle 3, kann Punktmutationen in der Position 76 nachweisen, indem es den Wildtyp (Lysin) an dieser Stelle schneidet, es resultieren ein 111 bp und ein 34 bp langes Stück [73, 119]. Der Ansatz pro Röhrchen für den Enzymverdau setzte sich wie folgt zusammen:

**Tabelle 11: Enzymverdau Einzelreaktion**

<b>Reagenz (Konzentration Stammlösung)</b>	<b>Volumen (Endkonzentration)</b>
H <sub>2</sub> O	1,40 µl
NE-Puffer 3.1	1,00 µl
NaCl (100 mM)	NaCl (7,7 mM)
Tris-HCl (50 mM)	Tris-HCl (3,8 mM)
Mg Cl <sub>2</sub> (10 mM)	Mg Cl <sub>2</sub> (0,8 mM)
BSA (100 µg/ml)	BSA (7,7 µg/ml)
Apo I (10 U/µl)	0,50 µl (0,4 U/µl)
BSA (20 mg/ml)	0,10 µl (0,15 mg/ml)
PCR-Produkt	10µl

Ich pipettierte je 3 µl des Ansatzes und 10 µl PCR-Produkt in einem PCR Röhrchen zusammen und stellte den Verdau für ca. 12 Stunden über Nacht bei 60°C ins Wasserbad. Die 145 bp bzw. die 111 bp Bande machte ich in einem 2% Agarosegel sichtbar (die 34 bp Bande ist meist nicht von Primerdimeren zu unterscheiden). Hierfür verwendete ich eine spezielle Agarose (High Resolution Agarose) und wählte eine Laufzeit von 3 Stunden bei einer Spannung von 70 V, um den Bandenunterschied optimal sichtbar zu machen. Eine nähere Beschreibung findet sich im Abschnitt 2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese auf Seite 35.

### 2.3.2.3 *pfATP6*

Dem Sequenzvorgang, siehe Seite 39, war eine konventionelle PCR vorangestellt. Eine Sequenzierung wurde durchgeführt, um bereits beschriebene und ggf. neue SNPs zu entdecken, Enzyme für eine RFLP sind bisher nicht etabliert und würden nur bereits bekannte SNPs erfassen. Das Reaktionsvolumen von 20 µl setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 12: *pfATP6* Einzelreaktion

Reagenz (Konzentration Stammlösung)	Volumen (Endkonzentration)
H <sub>2</sub> O	11,42 µl
Puffer (10x)	2,00 µl (1x)
Mg <sup>2+</sup> (25 mM)	2,40 µl (3mM)
dNTPs (10 mM)	1,60 µl (0.8mM)
Primer 1+2 (10 µM/Primer)	0,50 µl (0,25µM/Primer)
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,08 µl (0,02 U/µl)
Template	2,00 µl

Das Programm im Thermozykler war wie folgt:

Tabelle 13: Programm Thermozykler *pfATP6*

Schritt	Temperatur	Zeit
1	94°C	5 min
2	94°C	30 sec
3	55°C	45 sec
4	72°C	2 min
5	72°C	8 min
6	8°C	pause

(Schritt 2-4 40x)

Für die konventionelle PCR, wie auch für die anschließende Sequenzierung, benutzte ich folgende Primer: ATP1-forward (5' –CCGCTATTGTATGTGGTAGATG- 3') und ATP2-reverse (5' –ATTCCTCTTAGCACCACTCCT- 3') [100]. Hieraus resultierte eine Produktlänge von 769 bp. Für nähere Informationen zu den verschiedenen Arbeitsschritten der Agarose-Gelelektrophorese verweise ich auf Abschnitt 2.3.3.

#### 2.3.2.4 K13-propeller

Dem Sequenziervorgang, siehe Seite 39, war eine konventionelle nested PCR vorangestellt. Auch hier wurde eine Sequenzierung durchgeführt, um bereits beschriebene und neue SNPs zu entdecken. Dieser ganz neue Genkandidat ist während der laufenden Studie dem Protokoll hinzugefügt worden, da die entsprechende Publikation erst im Januar 2014 erschien [104]. Das Reaktionsvolumen von 20 µl setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 14: K13-propeller Einzelreaktion

Reagenz (Konzentration Stammlösung)	Volumen (Endkonzentration)
H <sub>2</sub> O	12.90 µl
Puffer (10x)	2.00 µl (1x)
Mg <sup>2+</sup> (25 mM)	2.00 µl (2,5 mM)
dNTPs (10 mM)	1.00 µl (0,5 mM)
Primer 1+2 (10 µM/Primer)	1.00 µl (0,5 µM/Primer)
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0.10 µl (0,025 U/µl)
Template	1.00 µl

Das Programm im Thermozykler war wie folgt:

Tabelle 15: Programm Thermozykler K13-Propeller

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	5 min
2	95°C	1min
3	56.8°C	1min
4	72°C	2 min
5	72°C	10 min
6	8°C	pause

(Schritt 2-4 40x)

Als Primer zog ich für die Nest 1PCR K13-1 (5'-CGGAGTGACCAAATCTGGGA-3') und K13-4 (5'-GGGAATCTGGTGGTAACAGC-3'), sowie für die Nest 2 PCR K13-2 (5'-GCCAAGCTGCCATTCATTTG -3') und K13-3 (5'-GCCTTGTTGAAAGAAGCAGA-3') heran [104]. In der Nest 2 PCR resultierte somit eine Produktlänge von 831bp, das die Codone 432 bis 709 umspannte. Für die anschließende Sequenzierung verwendete ich die Nest 2 Primer. Für nähere Informationen zu den verschiedenen Arbeitsschritten der Agarose-Gelelektrophorese verweise ich auf Abschnitt 2.3.3.

Tabelle 16 Primer K13-propeller

Primer Nest 1 K13-propeller	
K13-1	(5'-CGGAGTGACCAAATCTGGGA-3')
K13-4	(5'-GGGAATCTGGTGGTAACAGC-3')
Primer Nest 2 K13-propeller	
K13-2	(5'-GCCAAGCTGCCATTCATTTG -3')
K13-3	(5'-GCCTTGTTGAAAGAAGCAGA-3')

### 2.3.2.5 *pvmDr1*

Dem Sequenziervorgang, siehe Seite 39, war eine konventionelle PCR vorangestellt. Das Reaktionsvolumen von 20 µl setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 17: Einzelreaktion *pvmDr1*

Reagenz (Konzentration Stammlösung)	Volumen (Endkonzentration)
H <sub>2</sub> O	11.90 µl
Puffer (10x)	2.00 µl (1x)
Mg <sup>2+</sup> (25 mM)	2.00 µl (2,5 mM)
dNTPs (10 mM)	1.00 µl (0,5 mM)
Primer 1+2 (10 µM/Primer)	1.00 µl (0,5 µM/Primer)
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0.10 µl (0.025 U/µl)
Template	2.00 µl

Das Programm im Thermozykler war wie folgt:

**Tabelle 18: Programm Thermozykler *pvmDr1***

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	5 min
2	95°C	1 min
3	52°C	1 min
4	72°C	2 min
5	72°C	10 min
6	8°C	pause

(Schritt 2-4 40x)

Für die konventionelle PCR sowie für die anschließende Sequenzierung benutzte ich folgende hauseigene Primer, die für dieses Projekt von mir und meiner Betreuerin Dr. Berens-Riha designed wurden: PvmDrF (5'-GCTGTCAGCACATATTAACAGAGA-3') und PvmDrR (5'-TGCCTACTGGTTTGGTTCC-3'). Das daraus resultierende PCR Produkt war 490 bp lang. Für nähere Informationen zu den verschiedenen Arbeitsschritten der Agarose-Gelelektrophorese verweise ich auf Abschnitt 2.3.3.

### 2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung sowie zum Sichtbarmachen der, in der konventionellen PCR gewonnen, DNA-Fragmente wendete ich das Verfahren der Gelelektrophorese an. Dies ist ein gut erprobtes elektrobiochemisches Standardverfahren, welches sich die Wanderung von geladenen Teilchen im elektrischen Feld zu Nutze macht. Im Gel wandern Die DNA-Fragmente, abhängig von Größe sowie Ladung, unterschiedlich weit. Große weniger negativ geladene Teilchen wandern langsamer zur Anode als kleinere bzw. negativer geladene Teilchen [120]. Als Trägersubstanz wendete ich hier Agarosegele. Zur Herstellung eines zweiprozentigen Agarosegels ging ich wie folgt vor. Zunächst wog ich 2 g Agarosegelpulver ab. Für die Gele nach Enzymverdau verwendete

ich High Resolution Agarose, das sich speziell für kurze Bandenabschnitte eignet. Für die übrigen Gele benutze ich Agarose CTQ. In einem Erlenmeyerkolben gab ich 100 ml Pufferlösung zum Agarospulver hinzu. Für die Gele, aus denen Banden für die Sequenzierung ausgeschnitten werden sollten, nahm ich TAE-Puffer light, für die restlichen Gele TAE-Puffer. Nun erhitze ich die Lösung in einer Mikrowelle, bis sie anfang zu sieden. Auf diese Weise löste sich das Pulver vollständig auf. Ich ließ das Gel in einem Wasserbad unter wiederholtem Schwenken auf Handwärme (c.a. 60°C) abkühlen und pipettierte 10 µl GelRed® hinzu. GelRed® ist ein interkalierendes, fluoreszierendes Färbemittel, welches die Nukleinsäuren später im Gel unter UV-Licht sichtbar macht. Nun goss ich das noch flüssige Gel in den Gelträger und brachte die Kämme für die Geltaschen an. Nach Erkalten und vor Gebrauch entfernte ich die Kämme vorsichtig.

Für die zur Sequenzierung bestimmten Gele verwendete ich 1,25-prozentige Agarosegele. Ein 1,25-prozentiges Gel ist großporiger als ein zwei-prozentiges Gel, erlaubt also eine bessere Mobilisierung von DNA-Fragmenten in der Gelaufreinigung zur anschließenden Sequenzierung. Folglich nahm ich hier 1,25 g Agarosepulver (Agarose CTQ) auf 100 ml Puffer. Um ein reineres Produkt zur Weiterverarbeitung zu erhalten, verwendete ich TAE-Puffer light.

### **Auftragen der PCR-Produkte:**

Die PCR-Produkte versetze ich mit Ladepuffer (2-3 µl BlueJuice™ pro Tube). Das Gel in der Gelkammer wurde mit derselben Pufferlösung bedeckt, die für das Gel verwendet wurde. Die PCR-Produkte pipettierte ich nun in die Geltaschen ein. Jedes Gel wurde in äußeren Geltaschen mit 100bp DNS-Leiter skaliert. Für die Gele des Enzymverdaus wählte ich eine Spannung von 70 V sowie eine Laufzeit von 3 Stunden. Für alle restlichen Gele lieferte eine Spannung von 100 V sowie eine Laufzeit von 60 Minuten zufriedenstellende Ergebnisse. Die Banden wurden mit UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert, sowie mit der Grabit® Software elektronisch archiviert.

### 2.3.4 Real-Time PCR

Zur Erhebung der Prävalenz der *pfmdr1* SNPs N86Y und Y184F benutze ich eine von Purfield und Nelson etablierte Real-Time PCR mit leichten Modifikationen [114]. Hierbei handelte es sich um eine Endpunktgenotypisierung mit Hydrolysesonden wie sie z.B. unter dem Markennamen TaqMan™ bekannt ist. Dieses Verfahren funktioniert mit Hilfe von Gensonden, welche an ihrem 5' Ende mit dem Farbstoff 6-carboxyfluorescein (FAM), in diesem Falle die Sonde für den Wildtyp, oder mit dem Farbstoff Yakima Yellow® (YakYel), in diesem Falle die Sonde für die Mutation, markiert sind. Diese Sonden sind nach Anregung in der Lage ein Fluoreszenzsignal abzugeben. Das 3' Ende ist mit einem „Minor Groove Binder“ (MGB™) sowie einem nicht-fluoreszierender „Quencher“ (NFQ), (to quench engl. für löschen), verbunden. Solange sich der „Quencher“ in unmittelbarer räumlicher Nähe zur Sonde befindet, löscht dieser das Signal des Farbstoffes aus. Wird nun die Sonde während des Amplifikationsprozesses durch Bindung an die DNA vom Quencher abgespalten, kommt es zu einem Fluoreszenzsignal, das vom PCR-Gerät gemessen wird. Die Abspaltung geschieht durch die hydrolytische Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase, Die unterschiedlich gelabelten Sonden senden unterschiedliche Fluoreszenzsignale aus, was eine Diskriminierung von Wildtyp und Mutante in einer Probe ermöglicht (Emissionswellenlänge für 6FAM 517 nm und für YakYel 549 nm).

Eine wichtige Rolle spielt der MGB™. Dieser ermöglicht es, die Gensonden kürzer zu designen und sie dadurch spezifischer zu machen. Das Problem bei zu kurzen Gensonden ist, dass diese aufgrund der kleineren Anzahl von Wasserstoffbrücken oft nicht fest genug an die komplementäre Einzelstrang-DNA binden, um die notwendige Schmelztemperatur zu erreichen. Die Schmelztemperatur muss jedoch vergleichsweise hoch sein, um zu gewährleisten, dass die Gensonde während der Elongation noch an den Komplementärstrang bindet, damit die Taq-Polymerase die Sonde abspalten kann. Ein MGB™ bindet nun, unabhängig von der Gensondenlänge, an den Komplementärstrang, wodurch auch kürzere Gensonden eine stärkere Bindung und somit eine höhere Schmelztemperatur erreichen. Eine kurze Gensonde mit höherer Spezifität ist in dieser Arbeit von großem Vorteil, da sie hier genutzt werden, um SNPs nachzuweisen und sich deshalb die Sequenzen nur um eine Base unterscheiden. [121-123]

Das Reaktionsvolumen von 20 µl setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 19: Real-Time PCR Einzelreaktion

Reagenz	Konzentration Stammlösung	Einzelreak. (Endkonzentration)
H <sub>2</sub> O		2,00 µl
Mastermix		10,00 µl
Primer F	10 µM	1,00 µl (0,5 µM)
Probe mt	5 µM	1,00 µl (0,25 µM)
Primer R	10 µM	1,00 µl (0,5 µM)
Probe wt	5 µM	1,00 µl (0,25 µM)
GesamtvolumenMastermix		16,00 µl
Template		4,00 µl
Kombination		20,00 µl

Programm im BioRadCFX96™Realtimergerät:

Tabelle 20: Programm Realtimergerät

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	9min
2	95°C	10sec
3	58°C	10sec
4	65°C	55sec
5	8°C	Pause

(Schritt 2-4 40x)

Primer und Sonden für *pfmdr1* 86 sowie für *pfmdr1* 184 sind in Tabelle 21 aufgeführt. Das PCR Produkt für *pfmdr1* 86 war 134 bp, das für *pfmdr1* 184 war 181 bp lang. Die Auswertung der Ergebnisse machte ich mit Hilfe der BioRad CFX Manager 2.0 Software.

**Tabelle 21: Primer und Sonden *pfmdr1* Real-Time PCR**

Primer und Sonden <i>pfmdr1</i> Real-Time PCR	
Forward Primer 86F	(5' –TGTATGTGCTGTATTATCAGGAGGAAC- 3')
Reverse Primer 86R	(5' –AATTGTAATAAACCTATAGATACTAATGATAATATTATAGG- 3')
Sonde Asn wt	(5' 6FAM-ACCTAAATTCATGTTCTTT-MGB-NFQ 3')
Sonde Tyr mt	(5' YakYel-ACCTAAATACATGTTCTTT-MGB-NFQ 3')
Forward Primer 184F	(5' –AAGATGGACAATTCATGATAATAATCCT- 3')
Reverse Primer 184R	(5'-AATACATAAAGTCAAACGTGCATTTTTTA- 3')
Sonde Tyr wt	(5'6FAM-CTTTTATAGGTTTATATATTTGGT-MGB-NFQ 3')
Sonde Phe mt	(5'YakYel-CTTTTATAGGTTTATTTATTTGGT-MGB-NFQ3')

### 2.3.5 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde mit Hilfe des „Cycle Sequencings“ durchgeführt, ein an Sanger et al. 1977 angelehnte Methode [124]. Das Verfahren macht sich eine Kettenabbruchreaktion mittels Didesoxynukleotiden zu Hilfe. Das Fehlen einer Hydroxygruppe gegenüber der Desoxynukleotide führt zum Kettenabbruch. In verschiedenen sonst gleichen Ansätzen mit allen vier Desoxynukleotiden und jeweils einem Didesoxynukleotid versehen, machte man sich die unterschiedlichen Längen der Kettenabbruchsfragmente zu Nutze, um auf die Nukleotid-Abfolge des untersuchten DNA Moleküls zu schließen. Beim „Cycle Sequencing“ handelt es sich um eine Weiterentwicklung, bei der mittels speziell markierter Didesoxynukleotiden eine Sequenzierung automatisiert geschieht. Dies erfolgte mit Hilfe des BigDye® Terminator 3.1 und dem DyeEx® 2.0 Spin Kit. Das Verfahren entnahm ich den Anweisungen der jeweiligen Kits. Hierfür schnitt ich zunächst die zu sequenzierenden Banden aus einem 1.25-prozentigem TAE-light Agarosegel mit einem sterilen Skalpell aus, brachte sie in Ultrafree®-DA Filter ein und zentrifugierte diese für den Filtrierungsprozess bei 5000 g für 10 Minuten. Dies führte ich mit den Gelen der konventionellen PCR der Marker *pfATP6*, K13-propeller und *pvmdr1* durch. Das aufgereinigte Produkt unterzog ich einer Cycle-Sequencing-Reaktion. Das Endvolumen von 5 µl setzte sich hierbei zusammen aus:

- 2.0µl DNA-Template
- 1.5 µl Sequenzierpuffer
- 1.0 µl Primer 10µM (jeweils entweder Forward- oder Reverseprimer)
- 0.5 µl BigDye® 3.1

Das hierfür verwendete Programm im Thermozykler setzte sich aus 25 Zyklen zusammen. Ein Zyklus beinhaltete die Abfolge von 96°C für 30 Sekunden, danach 50°C für 15 Sekunden und zum Schluss 60°C für 4 Minuten. Um die Produkte der Sequenzierreaktion weiter aufzureinigen, verwendete ich das DyeEx® 2.0 Spin Kit von QIAGEN®. Zu diesem Zweck versetzte ich das Sequenzierprodukt (5 µl) mit 15 µl LiChrosolv® Lösungsmittel. Nun drehte ich die DyeEx® Filter eine Vierteldrehung auf, durchmischte sie, öffnete sie unten, setzte sie auf die Auffangröhrchen und ließ sie anschließend bei 2.700 U/min für 3 Minuten zentrifugieren. Die Auffangröhrchen wurden verworfen, die DyeEx® Filter setzte ich auf neu bereitgestellte Röhrchen, wo ich ihnen dann die Sequenzierreaktion schräg auf das DyeEx® Gel im Filter zupipettierte. Daraufhin wurde wieder bei 2700 U/min für 3 Minuten zentrifugiert. Die Filter verwarf ich. Im Röhrchen befanden sich 20 µl des aufgereinigten Produktes. Zur Fällung wurde zu letzterem 60 µl Ethanol (96%) hinzugegeben, das Ganze 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 3 Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, führte ich folgenden Schritt 2-mal durch. Ich gab 40 µl Ethanol (70%) hinzu, zentrifugierte bei 13.000 U/min für 3 Minuten und verwarf den Überstand. Nach dem zweiten Mal ließ ich die Röhrchen für 3 Stunden bei Raumtemperatur trocknen. Anschließend gab ich 12 µl H<sub>2</sub>O und 13 µl Hidi-Formamid zur Eluierung hinzu und pipettierte das Endvolumen von 25 µl in eine optische 96-Loch-Titerplatte. Der Endschritt, die maschinelle optische Auswertung des „Cycle Sequencing“, wurde anschließend vom „Sequencing Service LMU Biozentrum, Großhaderner Str. 2-4, 82152 Martinsried“ durchgeführt. Bei dem dafür verwendeten Gerät handelte es sich um einen 3730 DNA Analyzer von Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc, Foster City, USA.

Es folgen die entsprechenden Parameter der im LMU Biozentrum durchgeführten Läufe:

DC\_Laser\_Power\_Setting 25.0 mW  
Oven\_Temperature 60 °C  
PreRun\_Voltage 15.0 kV  
DC\_PreRun\_Time 180 sec  
Injection\_Voltage 1.5 kV  
DC\_Injection\_Time 15 sec  
First\_ReadOut\_Time 300 msec  
Second\_ReadOut\_Time 300 msec  
Run\_Voltage 8.5 kV  
Voltage\_Number\_Of\_Steps 40 steps  
Voltage\_Step\_Interval 15 sec  
Voltage\_Tolerance 0.6 kV  
Current\_Stability 30 uA  
DC\_Ramp\_Delay 600 sec  
DC\_Data\_Delay 405 sec  
DC\_Run\_Time 5640 sec

## 2.4 Auswertung

Um die Gensequenzen zu analysieren, verwendete ich die Computerprogramme Bioedit und DNASIS MAX (Version 3.0). Für den Vergleich mit den im Labor erhaltenen Genabschnitten bezog ich Referenzsequenzen aus dem „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI). Bei den Referenzsequenzen handelt es sich um (Pubmed Gene ID): *pfprt* XM\_001348968.1, *pfmdr1* 3D7AL844501.1, *pfATP6* AB121059.1, K13-propeller XM\_001350122.1, *pvmdr1* EU333975.1. Im direkten Vergleich der Laborsequenzen mit den Referenzsequenzen konnten SNPs ausfindig gemacht werden. Eine sichere Aussage ist nur bei guter Qualität der Sequenz und Auswertung beider Stränge möglich. Die Ähnlichkeit der Laborsequenzen mit anderen bekannten Sequenzen untersuchte ich mit Hilfe des „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST).

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Ergebnisse der *Plasmodium* Spezifizierung**

##### **3.1.1 Mikroskopie**

Der Goldstandard der Malariadiagnostik, insbesondere der Akutdiagnostik, stellt noch immer die Lichtmikroskopie dar. Zur Spezifizierung werden nach einer speziellen Färbemethode, der Giemsa-Färbung, die Zellen des Blutes betrachtet und nach mikroskopisch erkennbaren Formen des Malariaparasiten untersucht.

Von den 338 gesammelten Proben ergab die Mikroskopie nach der Giemsa Färbung 197 *Plasmodium falciparum*, 98 *Plasmodium vivax* und 27 gemischte *Plasmodium* Infektionen. Diese Art der Spezifizierung wurde vor Ort in Äthiopien durchgeführt. Bei 16 malaria-positiven Proben wurde das Ergebnis der Speziesdifferenzierung nicht für die Studie vermerkt, das Ergebnis der Mikroskopie war nicht mehr nachvollziehbar.

##### **3.1.2 Nested PCR**

Eine sensitivere, jedoch zeitaufwendigere Methode zur Malaria-Spezifizierung ist die molekularbiologische Aufarbeitung mittels PCR Verfahren.

Die Spezifizierung auf *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium malariae* der mikroskopisch als malaria-positiv befundeten Proben führte ich mit Hilfe einer konventionellen nested PCR durch [113, 116]. Die nested PCR ermöglicht in diesem Fall die Amplifikation einer genus- und mehrerer speziesspezifischer Sequenzen in zwei Läufen und verringert das Risiko von unspezifischen Amplifikaten, siehe Methoden. In Abbildung 3 und Abbildung 4 auf Seite 45 sind Ergebnisse zweier repräsentativer Experimente aufgeführt.

Hieraus ergaben sich aus den 338 gesammelten mikroskopisch malaria-positiven Proben 271 molekularbiologisch malaria-positive Proben. Neun, der 16 Proben, deren Ergebnis der Mikroskopie in Äthiopien nicht vermerkt war, zeigten ein positives Ergebnis in der PCR. Bei den 271 Proben handelte es sich, der PCR Methode zur Folge, um 177 *Plasmodium falciparum*, 80 *Plasmodium vivax* und um 14 gemischte *Plasmodium falciparum/vivax* Infektionen. Es konnten keine *Plasmodium malariae*-positiven Proben nachgewiesen wer-

## Ergebnisse

---

den. Auch nach der Erhöhung des Templatevolumens von 1 µl auf 5 µl blieben 67 mikroskopisch als malaria-positiv befundene Proben negativ. Wiederum 68 positive Ergebnisse der Mikroskopie stimmten bezüglich der Spezies nicht mit denen der Nested PCR überein. Die Resultate werden in Tabelle 22 gezeigt.

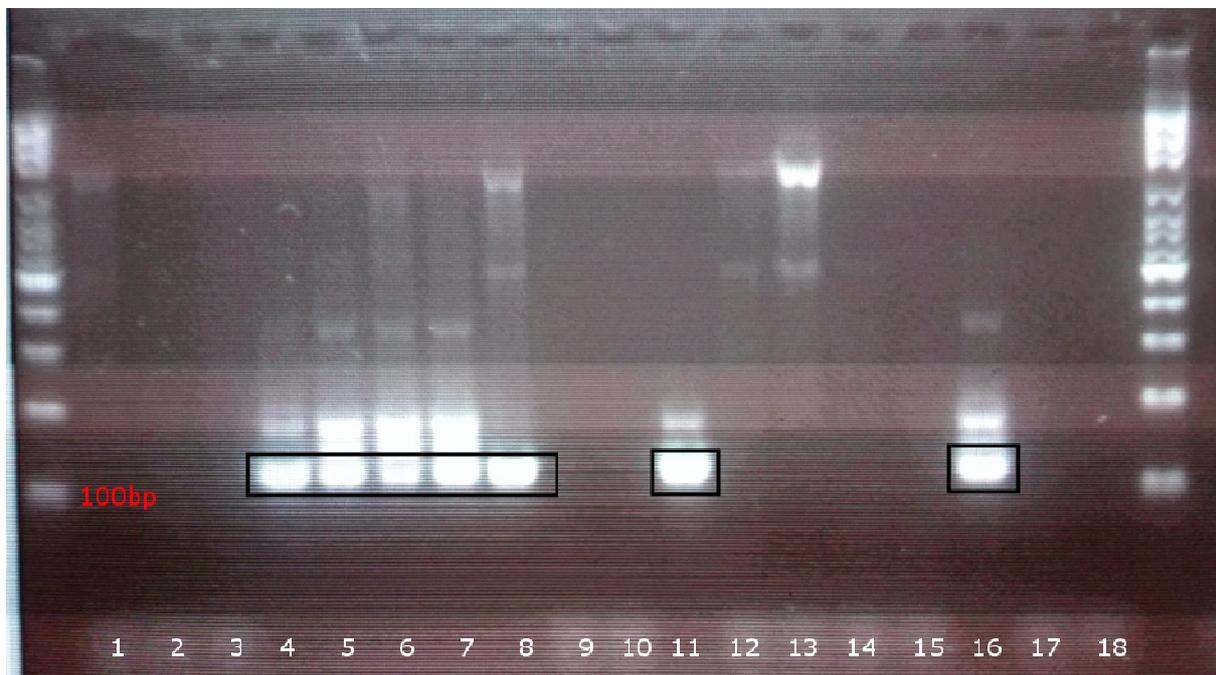
**Tabelle 22: Inkongruenz der Ergebnisse der in der Arbeit verwendeten Spezifizierungsmethoden, Lichtmikroskopie und Nested PCR.** Es wird nur Bezug auf die 271 PCR-positiven Proben genommen, nicht die Gesamtzahl der insgesamt gesammelten 338 Proben.

Mikroskopie	PCR			
	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	Gemischt	Gesamt
<i>P. falciparum</i>	136	14	10	<b>160</b>
<i>P. vivax</i>	16	58	3	<b>77</b>
Gemischt	23	2	-	<b>25</b>
Unspezifiziert	2	6	1	<b>9</b>
Gesamt	<b>177</b>	<b>80</b>	<b>14</b>	<b>271</b>

Die Sensitivität der PCR gegenüber der Mikroskopie ergibt sich daraus wie folgt: für *P. falciparum* Monoinfektion 76,8%, für *P. vivax* Monoinfektion 72,5% und gemischte Infektionen 0%. Speziell die 19 PCR-positiven *P. falciparum* Infektionen (mono- und gemischt), die mikroskopisch als *P. vivax* eingestuft und entsprechend mit Chloroquin behandelt wurden, geben Anlass zur Sorge, da die Therapie bei Chloroquin-resistenten Stämmen schlecht oder gar nicht anschlägt. Die falsch positiven Ergebnisse sind mit 20,1% ebenfalls alarmierend. Dies bedeutet zum einen die Unterlassung der richtigen Therapie bei falscher Diagnose, was im Falle anderer fieberhafter Erkrankungen tödlich sein kann, zum anderen eine Übertherapie der Malaria, d.h. die Einnahme von Malariapräparaten ohne Grund. Dies kann zu unnötigen Nebenwirkungen und Misstrauen des Patienten in die lokale medizinische Versorgung führen. Zur weiteren Arbeit mit den Filterpapierextrakten verließ ich mich auf die Ergebnisse der PCR.



**Abbildung 3: PCR Nachweis von *Plasmodium falciparum* in Patientenproben. Ein repräsentatives Experiment mit 7 Proben, 3 Positivkontrollen sowie einer Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) ist dargestellt.** Das Gel ist durch eine 100 bp DNA Leiter markiert. Bei den durch schwarze Rechtecke markierten Banden handelt es sich um ein 205 bp langes Amplifikat, flankiert durch die Primer rFAL1/rFAL2. Amplifiziert wurde hier ein Genabschnitt einer für *P. falciparum* spezifischen Untereinheit ribosomaler RNA. 1-7: Patientenproben; 8: Positivkontrolle für *P. falciparum*; 9: Positivkontrolle für *P. vivax*, wie erwartet negativ, da es sich hier um die Spezifizierung für *P. falciparum* handelte 10: Positivkontrolle für *P. malariae*, wie erwartet negativ, da es sich hier um die Spezifizierung für *P. falciparum* handelte 11: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O).



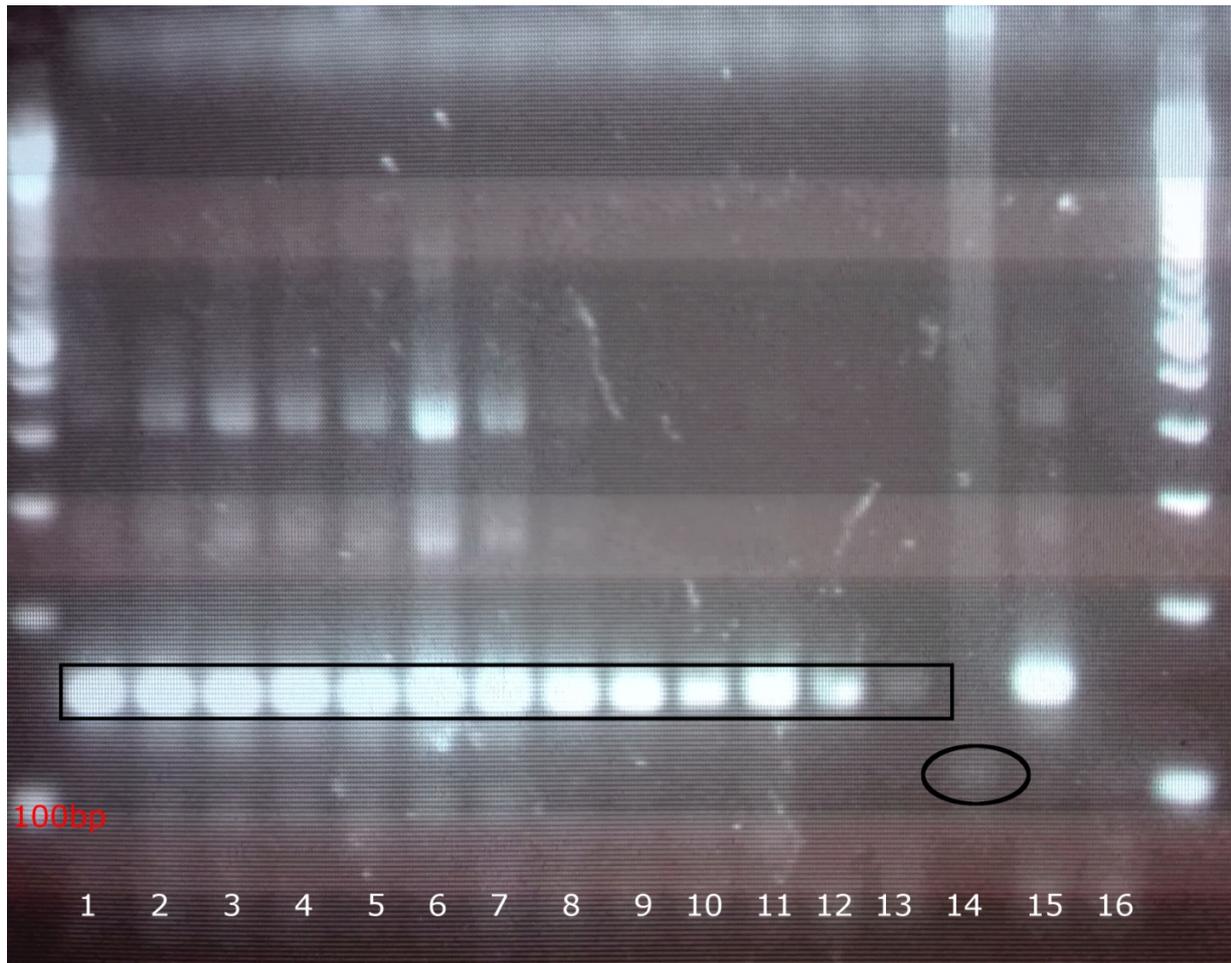
**Abbildung 4: PCR Nachweis von *Plasmodium vivax* in Patientenproben. Ein repräsentatives Experiment mit 14 Proben, drei Positivkontrollen und einer Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) ist dargestellt.** Das Gel ist durch eine 100 bp DNA Leiter markiert. Bei den durch schwarze Rechtecke gekennzeichneten Banden handelt es sich um ein 117 bp langes Amplifikat, flankiert durch die Primer rVIV1/rVIV2. Amplifiziert wurde hier ein Genabschnitt einer für *P. vivax* spezifischen Untereinheit ribosomaler DNA. 1-4: Patientenproben; 15: Positivkontrolle für *P. falciparum*, wie erwartet negativ, da es sich um die *P. vivax* Spezifizierung handelt 16: Positivkontrolle für *P. vivax*; 17: Positivkontrolle für *P. malariae*, wie erwartet negativ, da es sich um die *P. vivax* Spezifizierung handelt; 18: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O).

### 3.2 Ergebnisse *pfcr*

Das *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfcr*) Gen ist mit verschiedenen Medikamentenresistenzen *P. falciparum* Parasiten assoziiert. Die hier untersuchte Mutation auf Codon 76 (K76T) ist vor allem im Bezug auf Chloroquin-Resistenzen beschrieben [73-75].

Ich untersuchte 191 Proben, 177 *P. falciparum* und 14 gemischte Infektionen, auf die K76T Mutation des *pfcr* Gens mit Hilfe einer konventionellen Nested PCR und einer darauffolgenden RFLP-Analyse. In Abbildung 5 ist ein Gel nach Enzymverdau aufgezeigt. Bei 159 dieser Proben gelang es mir, den *pfcr* Marker zu amplifizieren. Nach dem Enzymverdau konnte ich 152 davon als 76T Mutationen, 7 als 76K Wildtypen identifizieren. Es traten keine Mischinfektionen auf. Bei Mischinfektionen handelt es sich um Wildtyp und Mutation in ein und derselben Probe. Die Mutationsprävalenz betrug 95.6%. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 auf Seite 57 noch einmal dargestellt.

Zur Kontrolle des Enzymverdaus wurden stichprobenartig 14 der Proben sequenziert. Nebenbefundlich konnte man erkennen, dass von Codon 72-76 zu 50% der Haplotyp CVIET und zu 50% der Haplotyp CVMNT vorhanden war. Eine C72S Mutation (TGT→AGT) war in diesen Proben nicht nachzuweisen. Aufgrund der geringen Anzahl der sequenzierten Proben sind die Ergebnisse nicht repräsentativ für die Studienpopulation [125].



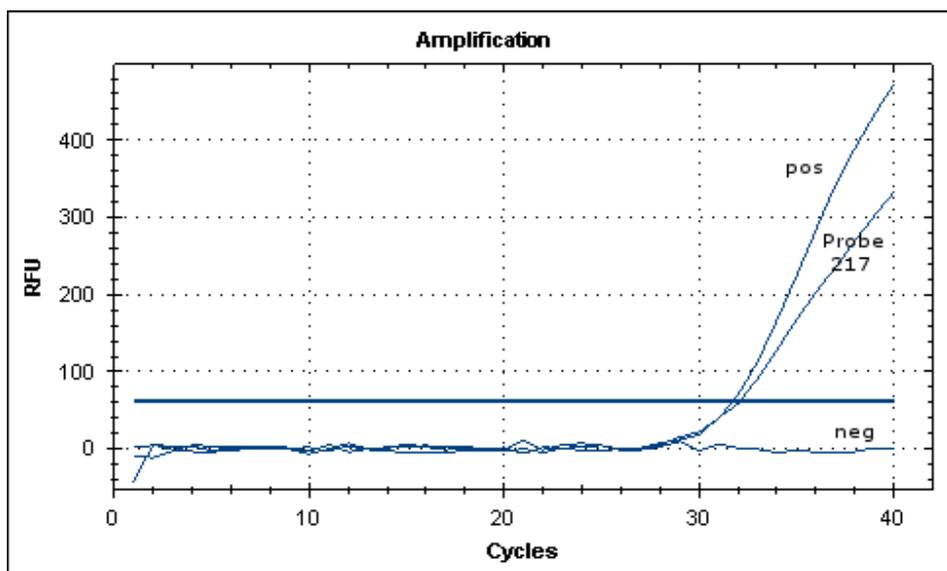
**Abbildung 5: Gel nach Enzymverdau von *pfprt* Codon 76. Ein repräsentatives Experiment mit 15 Proben ist dargestellt.** Das Gel ist durch ein 100 bp DNA Leiter markiert. Bei den Kennzeichnungen 1-13 handelt es sich um ein 145 bp Fragment, welches die Mutation nachweist. 14: hier zeigt sich eine schwach positive Bande eines 111 bp langen Fragments, was für den Wildtyp spricht. Die 34 bp Bande ist nicht sichtbar. 15: Positivkontrolle. 16:Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O)

### 3.3 Ergebnisse *pfmdr1*

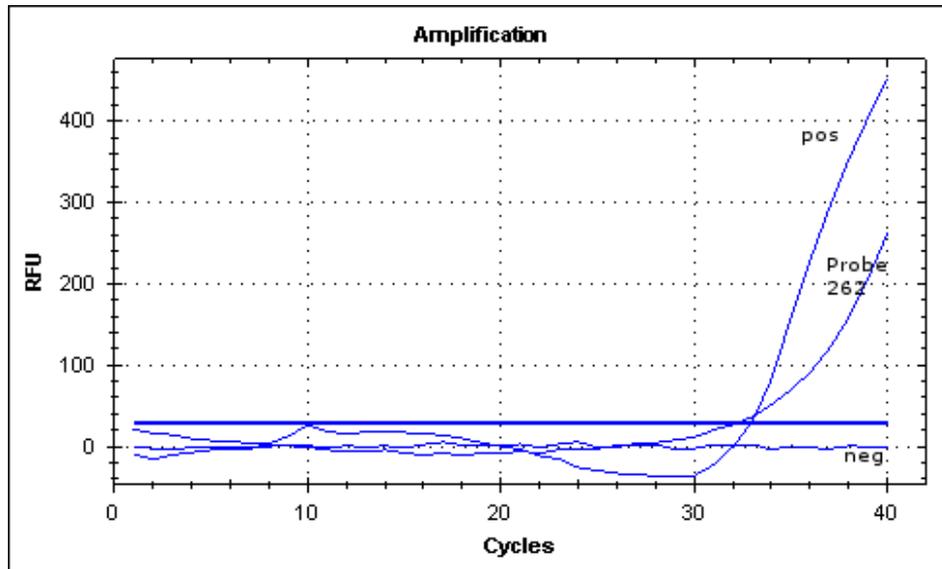
Punktmutationen (SNPs) auf den Codonen 86 und 184 des *Plasmodium falciparum* multidrug resistance (*pfmdr*) Gens werden im Bezug auf Resistenzen gegenüber Artemether-Lumefantrin diskutiert [91, 93-95].

Zur Ermittlung der Mutationen im *pfmdr1* Gen N86Y und Y184F, griff ich auf eine Real-Time PCR zurück [114]. In Abbildung 5 und 6 sind Amplifikationskurven dieser gezeigt. Da zur vollständigen Einsicht und Auswertung die CFX Manager™ Software notwendig ist, sollen diese nur einen orientierenden Eindruck vermitteln. Als Negativprobe diente H<sub>2</sub>O,

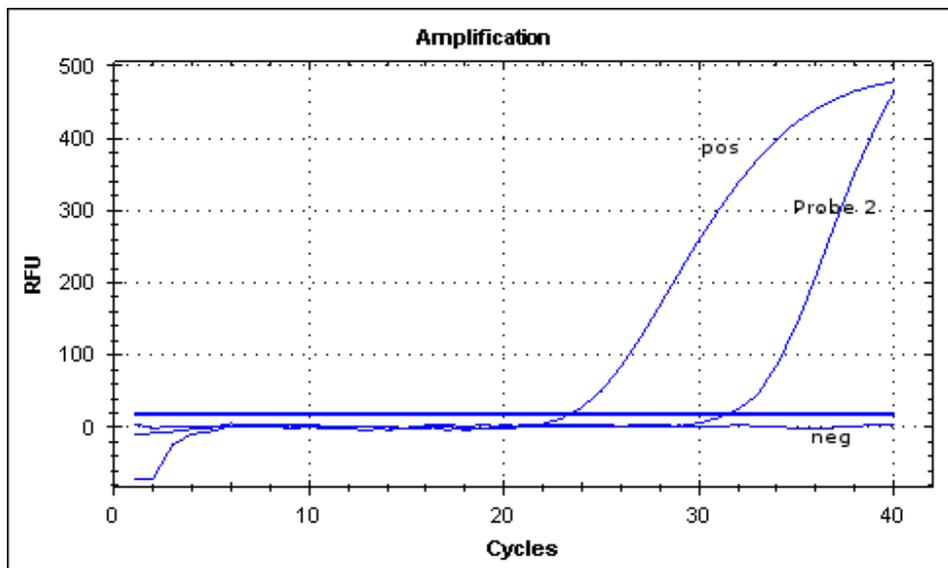
als Positivkontrolle wurde eine *P. falciparum*-positive Probe mit bekannter Mutation bzw. bekanntem Wildtyp gewählt. Den *pfmdr1* 86 Marker betreffend gelang es mir aus den 191 *P. falciparum*-positiven Proben, (Mono- und Mischinfektionen) zwei N86Y Mutationen und 161 Wildtypen zu identifizieren. Dies legte eine Mutationsprävalenz von 1,2% offen. Bezüglich des *pfmdr1* 184 Markers stellten sich 171 Proben als Mutationen heraus. Es wurden keine Wildtypen festgestellt, was eine Mutationsprävalenz von 100% für *pfmdr1* 184 bedeutet. 28 Proben konnten *pfmdr1* N86Y betreffend nicht differenziert werden. Weiter blieben 20 Proben nicht differenzierbar hinsichtlich des *pfmdr1* Y184F. Die Proben blieben hier auch nach Templateerhöhung entweder negativ oder zeigten unverwertbare Amplifikationskurven. Am ehesten ist hier von einer Inhibition der rt-PCR durch Hämoglobinrückstände auszugehen, die mit der durchgeführten Extraktionsmethode nicht auszuschließen ist. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 auf Seite 57 noch einmal dargestellt.



**Abbildung 6: Amplifikationskurven der Real-Time PCR zum Nachweis von Wildtypen 86N des *pfmdr1* Gens bei *Plasmodium falciparum*.** Aufgetragen sind die „relative fluorescence units“ (RFU) auf der y-Achse und die Anzahl der PCR-Zyklen (Cycles) auf der x-Achse. Bei der RFU handelt es sich um eine Messeinheit der Intensität der Fluoreszenz in diesem Falle von den Sonden 6FAM. Hier wurde ein „Threshold“ (dicke blaue horizontale Linie) von 67,3 RFU gewählt. Die Amplifikationskurve der Probe 217 zeigt einen deutlich positiven Verlauf, was die Fluoreszenzzunahme durch die Wildtypsonde 6FAM betrifft. Die Positivkontrolle, pos, zeigt sich als positiv. Die Negativkontrolle, neg, zeigte sich in diesem Durchlauf als negativ. Zur vollständigen Auswertung ist die CFX Manager™ Software notwendig.



**Abbildung 7: Amplifikationskurven der Real-Time PCR zum Nachweis der Mutation 86Y des *pfmdr1* Gens bei *Plasmodium falciparum*.** Aufgetragen sind die „relative fluorescence units“ (RFU) auf der y-Achse und die Anzahl der PCR-Zyklen (Cycles) auf der x-Achse. Bei der RFU handelt es sich um eine Messeinheit der Intensität der Fluoreszenz in diesem Falle von der Sonde YakYel. Hier wurde ein „Threshold“ (dicke blaue horizontale Linie) von 35,7 RFU gewählt. Die Amplifikationskurve der Probe 262 zeigt einen deutlich positiven Verlauf, was die Fluoreszenzzunahme durch die Mutationssonde YakYel betrifft. Die Positivkontrolle (pos) zeigt sich als positiv. Die Negativkontrolle (neg) zeigte sich als negativ. Zur vollständigen Auswertung ist die CFX Manager™ Software notwendig

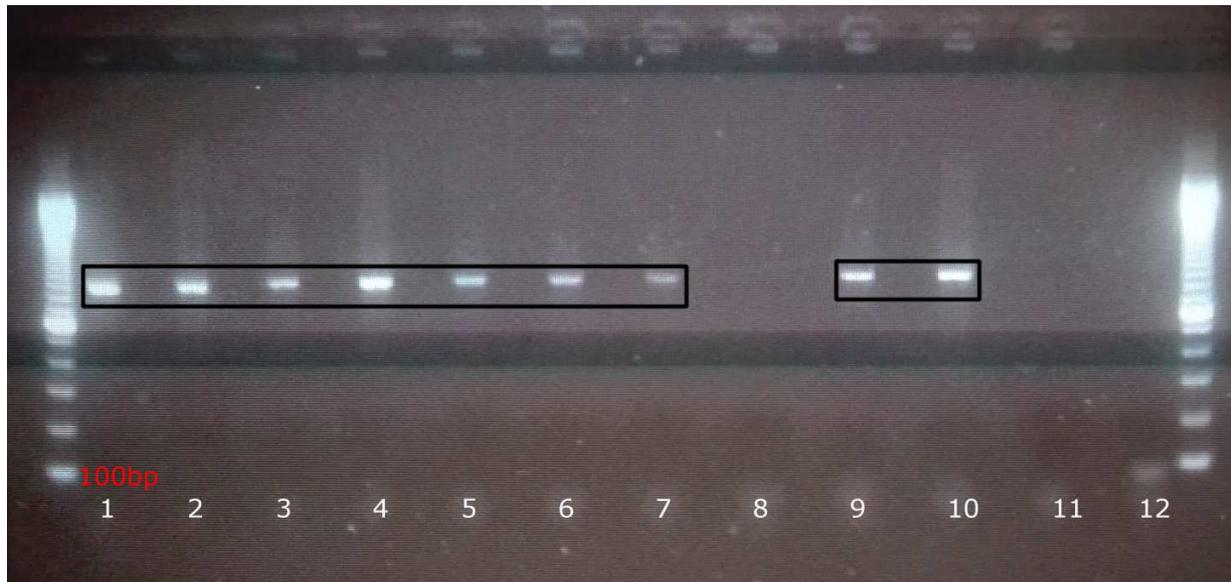


**Abbildung 8: Amplifikationskurven der Real-Time PCR zum Nachweis der Mutation Y184F auf dem *pfmdr1* Gen bei *Plasmodium falciparum*.** Aufgetragen sind die „relative fluorescence units“ (RFU) auf der y-Achse gegen die Anzahl der PCR-Zyklen (Cycles) auf der x-Achse. Bei der RFU handelt es sich um eine Messeinheit der Intensität der Fluoreszenz in diesem Falle von der Sonde YakYel. Hier wurde ein „Threshold“ (dicke blaue horizontale Linie) von 21,2 RFU gewählt. Die Amplifikationskurve der Probe 2 zeigte einen deutlich positiven Verlauf, was die Fluoreszenzzunahme durch die Mutationssonde YakYel betrifft. Die Positivkontrolle (pos) zeigt sich als positiv. Die Negativkontrolle (neg) zeigte sich als negativ. Zur vollständigen Auswertung ist die CFX Manager™ Software notwendig

### 3.4 Ergebnisse *pfATP6*

*Plasmodium falciparum* ATPase6 SERCA-type gene (*pfATP6*) ist, so glaubt man, die einzige  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase im parasitären Genom. Verschiedene Polymorphismen scheinen mit Unterschieden in der Wirksamkeit von Artemisininen bei *P. falciparum* Infektionen verknüpft zu sein.

Da die Bedeutung dieses molekularen Markers seit Studienbeginn weiter abgenommen hatte, ein neuer Marker (K-13 propeller siehe S.16) jedoch hinzugekommen war, entschied ich mich aus Budgetgründen für die Untersuchung einer Stichprobe von 50 *Plasmodium falciparum* positiven Proben. Zur Untersuchung der *pfATP6* Mutationen wendete ich eine konventionelle PCR mit anschließendem „Cycle Sequencing“ an. Hier beobachtete ich 9 E431K Mutationen und 39 Wildtypen, was eine Mutationsprävalenz von 18.8% ergab, zwei Proben zeigten so unvollständige Sequenzen, dass man diese nicht auswerten konnte. Die Mutation L402V konnte nicht gefunden werden. Die Sequenzen waren oft zu kurz, um eine aufschlussreiche Einsicht über die Mutationen H243Y und L263E zu erhalten, für nur je sieben Proben konnte ich den Wildtyp ermitteln. Die Mutation A623E konnte in keiner der Sequenzen beurteilt werden. Wie sich vor kurzem, lange nach Abschluss der Laborarbeiten herausstellte, lag ein systematischer Fehler bei der Sequenzierung von Sequenzen > 300 bp vor, was die Genabschnitte von *pfATP6* und der *K-13 propeller* Domäne betraf. Die Gelaufreinigungsmethode mit Ultrafree®-DA Filter nach der konventionellen PCR zur Beseitigung von Gelresten funktioniert bei Sequenzen > 300 bp erfahrungsgemäß nicht ausreichend gut für die Sequenzierungsmethode (Telefonat mit Firma Eurofins, Ebersberg, Deutschland). Die geringe Anzahl der erfolgreich sequenzierten *pfATP6* Proben schließt jeden Anspruch auf Repräsentativität der meisten Polymorphismen aus, einzig E431K wurde für einen Vergleich mit den Vorjahren herangezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 auf Seite 57 noch einmal veranschaulicht.



**Abbildung 9: Gel nach konventioneller PCR von *pfATP6* vor Sequenzierung.** Das Gel ist mit einer 100 bp DNA Leiter skaliert. Die Markierungen zeigen positive Banden von einer Amplifikatslänge von 769 bp. Die Banden wurden mittels sterilen Skalpell ausge schnitten und zur Sequenzierung aufgearbeitet. Nicht markierte Banden sind unspezifisch. 1-11: Patientenproben; Probe 8 und 11 konnten nicht dargestellt werden 12: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O).

### 3.5 Ergebnisse K13-propeller

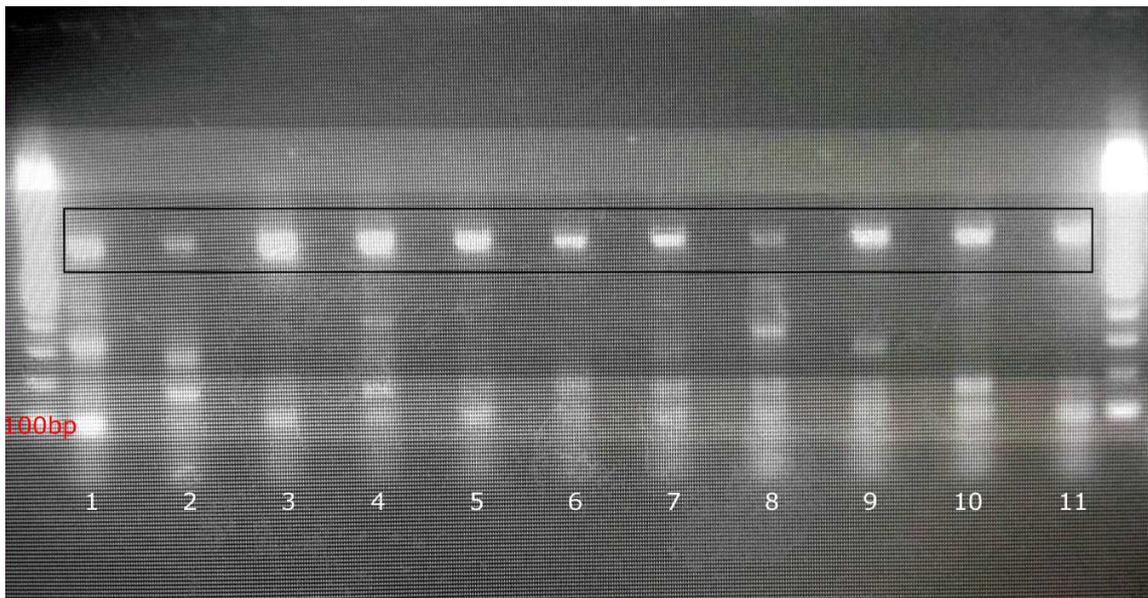
Die K13-propeller Kelch Domäne von *Plasmodium falciparum* ist ein neuer molekularer Marker, welcher mit Artemisininresistenz in Kambodscha assoziiert wird. Die Publikation kam nach Beginn der Studie heraus, das Protokoll wurde aufgrund der Wichtigkeit des Markers erweitert [104]. Aufgrund des Budgets konnte nur eine Stichprobe untersucht werden.

Für die Untersuchung der K13-propeller Domäne machte ich von einer konventionellen Nested PCR mit darauffolgendem „Cycle Sequencing“ Gebrauch. Die Abbildung 10 auf Seite 52 zeigt ein Gel nach der konventionellen PCR. Die dort markierten Banden wurden anschließend ausgeschnitten und für den Sequenzierungsprozess aufgearbeitet. Eine Stichprobe von 25 *Plasmodium falciparum*-positiven Proben wurde ausgewählt. Die niedrige Probenzahl muss bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Es handelt sich hier um die ersten Sequenzierungsdaten von diesem Marker in der Region Jimma in Äthiopien. Die Qualität der ermittelten Sequenzen war unterschiedlich gut. Dies lag wie in Abschnitt 3.4 beschrieben wahrscheinlich an der Gelaufreinigungsmethode. Den-

## Ergebnisse

---

noch ließ sich das Stück zwischen Codon 443 und Codon 693 beurteilen. Hier fanden wir keine der in Ariey et al. 2014 [104] beschriebenen Mutationen. Insbesondere nicht die Mutation M476I, welche mit Artemisinin-Resistenz assoziiert wurde [104]. Jedoch zeigte sich in einer Sequenz eine neue, nicht vorher beschriebene N531I (AAT→ATT) Mutation, siehe Seite 53 . Auch hier besteht kein Anspruch auf Repräsentativität für die Region Jimma. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 auf Seite 57 noch einmal aufgeführt.



**Abbildung 10: konventionelle PCR der K13 Domäne, Gel nach nested PCR vor Sequenzierung**, DNA-Leiter 100 bp links, mit schwarzem Rechteck markierte Banden (831bp) wurden später zur Sequenzierung ausgeschnitten. Bei den nicht im schwarzen Rechteck markierten Banden handelt es sich um unspezifische Banden. Die Negativkontrolle des Durchlaufes ist nicht abgebildet.

### Sequenz der N531I Mutation

Die Sequenz wurde mit der NCBI Sequence XM\_001350122.1 des *Plasmodium falciparum* 3D7 kelch Proteins verglichen. 3D7 ist ein sensibler Laborstamm. An Codon 531 zeigte sich eine non-synonyme Mutation, die in einem Aminosäureaustausch von Asparagin zu Isoleucin führte.

Base Pair:	1330	1340	1350	1360	1370
Sequenz 1 <sup>1</sup> :	TTAGTATTTT	GTATAGGTGG	ATTTGATGGT	GTAGAATATT	TAAATTCGAT
Sequenz 2 <sup>2</sup> :	TTAGTATTTT	GTATAGGTGG	ATTTGATGGT	GTAGAATATT	TAAATTCGAT
1380	1390	1400	1410	1420	1430
GGAATTATTA	GATATTAGTC	AACAATGCTG	GCGTATGTGT	ACACCTATGT	CTACCAAAAA
GGAATTATTA	GATATTAGTC	AACAATGCTG	GCGTATGTGT	ACACCTATGT	CTACCAAAAA
1440	1450	1460	1470	1480	1490
AGCTTATTTT	GGAAGTGCTG	TATTGAATAA	TTTCTTATAC	GTTTTTGGTG	GTAATAACTA
AGCTTATTTT	GGAAGTGCTG	TATTGAATAA	TTTCTTATAC	GTTTTTGGTG	GTAATAACTA
1500	1510	1520	1530	1540	1550
TGATTATAAG	GCTTTATTTG	AAACTGAGGT	GTATGANCNT <sup>4</sup>	TTAAGAGATG	TATGGTATGT
TGATTATAAG	GCTTTATTTG	AAACTGAGGT	GTATGATCGT	TTAAGAGATG	TATGGTATGT
1560	1570	1580	1590		
TTCAAGTAAT	TTAAATATNC	CTAGAAGAAA	TATTTGTGGT <sup>3</sup>		
TTCAAGTAAT	TTAAATATAC	CTAGAAGAAA	TAATTGTGGT		

<sup>1</sup>Sequenz 1: Sequenz aus Äthiopien mit Mutation N531I

<sup>2</sup>Sequenz 2: Plasmodium falciparum 3D7 kelch protein, putative partial mRNA

<sup>3</sup>In rot die Mutation an Base 1592 im Codon 531: T → A; AAT → ATT; N (Asparagin) → I (Isoleucin)

<sup>4</sup>In blau bei Sequenzierung nicht erkannte Basen bzw. nicht übereinstimmende Basen im Vergleich beider Stränge (Forward und Reverse): N

### 3.6 Ergebnisse pvmdr1

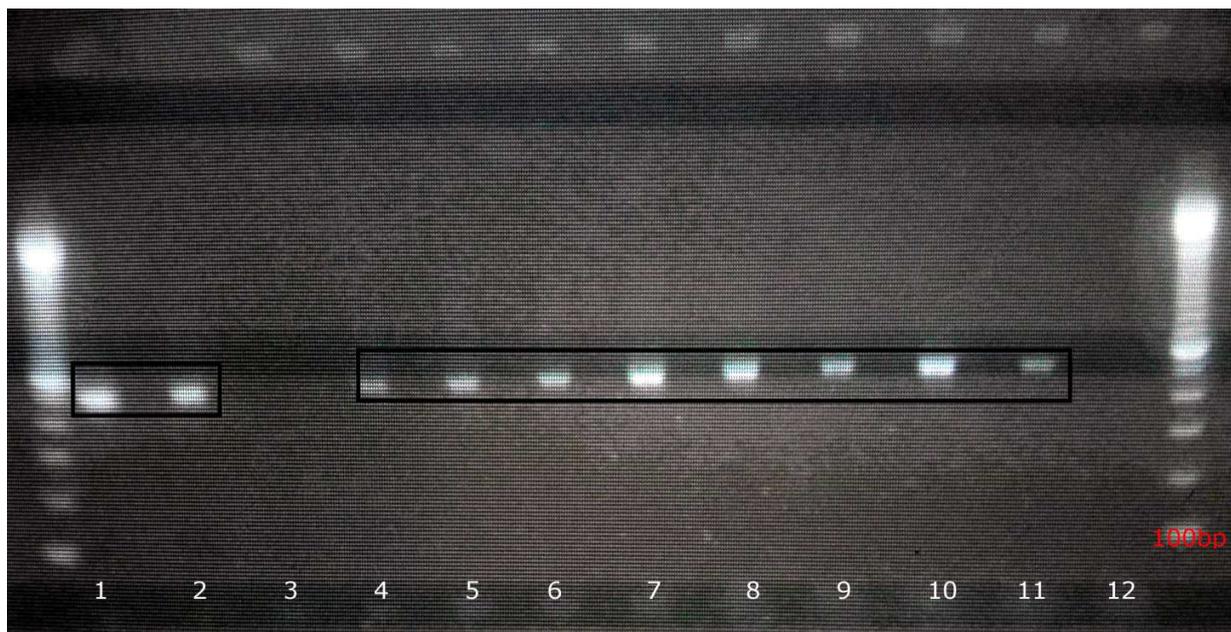
Das *pvmdr1* Gen stellt insofern eine Ausnahme dar, da es der einzige in dieser Arbeit behandelte Resistenzmarker ist, der im Genom der Plasmodienart *Plasmodium vivax* vorkommt.

Wie schon erwähnt, wurden 80 Proben, via Nested PCR, als *Plasmodium vivax* spezifiziert. Es gelang mir jedoch nur, die Banden aus 25 dieser Proben durch konventionelle PCR im Agarosegel sichtbar zu machen. Dies kann unter anderem an den niedrigeren Parasitämien liegen, wie sie bei der von *Plasmodium vivax* verursachten Malaria tertiana im Gegensatz zur *Plasmodium falciparum* Malaria tropica vorkommen. Daher schlossen wir die Mischinfektionen von der Untersuchung aus, da wir hier noch niedrigere Parasitämien annahmen und zudem mögliche Kreuzreaktionen mit *P. falciparum* vermeiden wollten. Aufgrund der schlechten Anbindung der Primer an die Sequenzen vermuteten wir regionale Polymorphismen, die beim Primerdesign aufgrund mangelnder Daten zu Vivax-

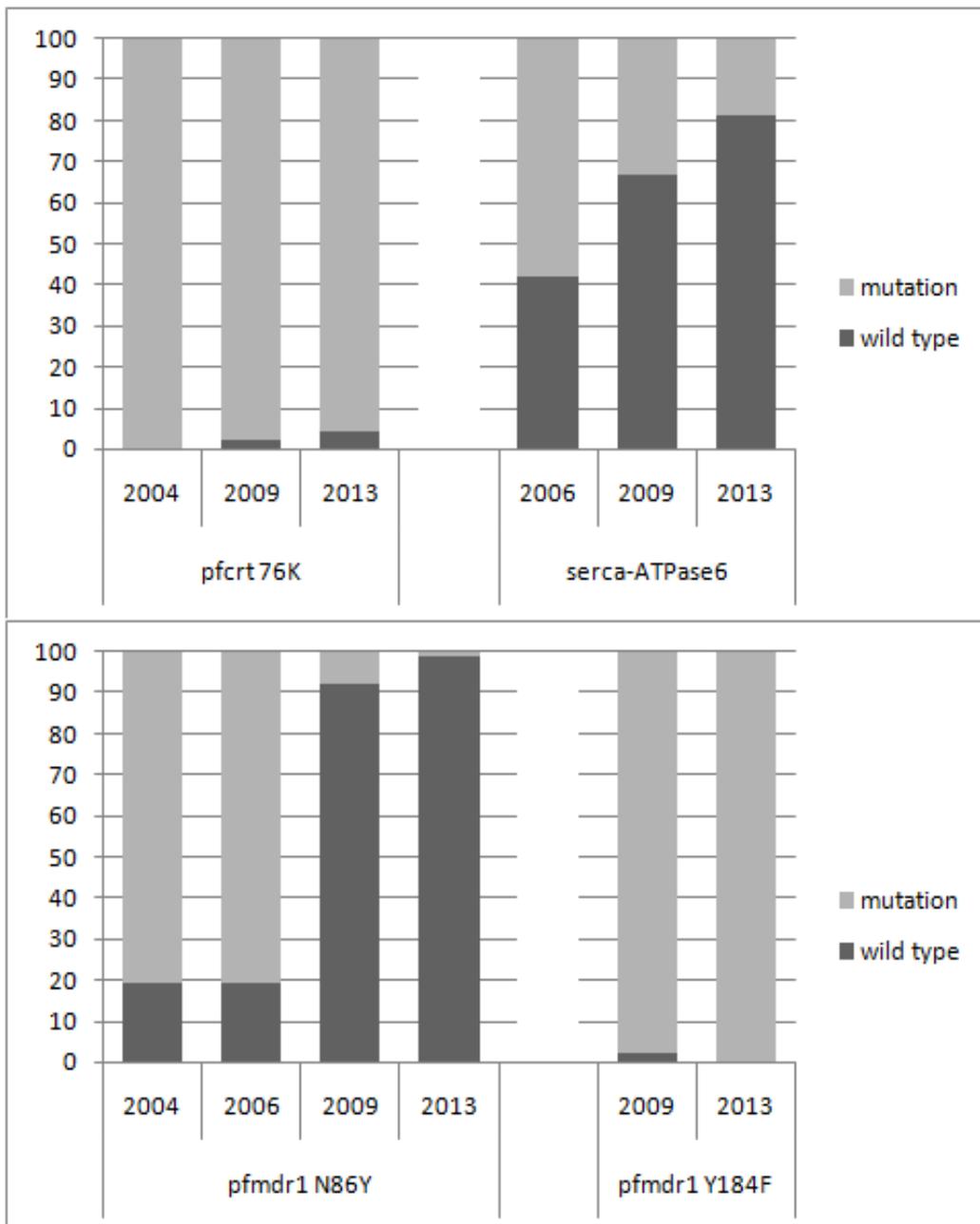
## Ergebnisse

---

Sequenzen aus Äthiopien nicht berücksichtigt werden konnten. Nach der Gelelektrophorese schnitt ich die 25 Banden aus und bereitete den Sequenzierungsvorgang wie oben erklärt vor. Für die Sequenzierung wurden dieselben Primer verwendet. Für Codon 976 und 1076 konnten zwei bzw. fünf Sequenzen nicht eindeutig differenziert werden. Eine Sequenz wurde nicht abgelesen. Aus den verbliebenen Sequenzen konnte ich 16 Mutationen und 6 Wildtypen vom Typ Y976F (TAC→TTC) und 19 Mutationen und 0 Wildtypen vom Typ F1076L (TTT→CTT) nachweisen. Daraus ließen sich eine Mutationsprävalenz von 72.7% für die Y976F Mutation und 100% für die F1076L Mutation folgern. Die niedrige Anzahl an erfolgreich sequenzierten Proben ist nicht repräsentativ für das Studienkollektiv, weist jedoch auf eine Tendenz hin. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 auf Seite 57 noch einmal dargestellt.



**Abbildung 11: Gel eines Nachweises von *pvmdr1* mittels konventioneller PCR vor Sequenzierung**, skaliert wurde mit einr 100 bp DNA-Leiter, 1-10 sind Patientenproben, 1,2,4,5,6,7,8,9, und 10 und zeigen eine positive Bande des 490 bp langen Amplifikats, diese wurden zur weiteren Sequenzierung ausgeschnitten. Bei 3 gelang kein Nachweis. 11: Positivkontrolle; 12: Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O)



**Schaubild 1: Prävalenz der untersuchten Mutationen im zeitlichen Verlauf.** Molekularen Marker im Wandel mit Blick auf die Einführung von ACT im Jahr 2006 in der Region Jimma, Äthiopien. Die y-Achse zeigt die Prävalenz der untersuchten Proben in %. Für das SNP *pfcr1* 76K zeigte sich im Jahre 2013 eine Mutationsprävalenz von 95,6%. Die SERCA 431K Mutation fiel von 58,3% 2006 auf 18,8% 2013. Die Probenzahl war jedoch klein. Veränderungen im *pfmdr1* Gen waren beachtlich. 2006 dominierte die 86Y Mutation mit 85,7%. Hier wurden Proben aus Mischinfektionen zusammen mit Wildtypen herangezogen. Der Wildtyp alleine war nur in 14,3% nachweisbar. 2009 zeigte sich die 86Y Mutation bei 9,2%, 2013 bei 1,2%. Die Prävalenz von *pfmdr1* 184F war hoch in 2009 und verblieb vorherrschend [18, 112, 119, 126]. Ergänzend folgt Tabelle 23.

## Ergebnisse

**Tabelle 23: Ergänzende tabellarische Darstellung zu Schaubild 1.** Aufgeführt sind noch einmal die Prävalenzen mit 95% Konfidenzintervall mit continuity correction nach Newcombe und Wilson [127, 128] von 4 SNPs der verschiedenen Marker *pfcr1*, *pfATP6* und *pfmdr1* über die Zeit von 2004 bis 2013. Zu beachten ist die niedrige Anzahl der untersuchten Proben für *pfATP6*.

<b><i>Pfcr1</i> K76T</b>				
Jahr	2004	2006	2009	2013
n/m (%;	69/69 (100,0;	Keine Daten	243/249 (97,6;	152/159 (95,6;
95% CI)	93,4-100,0)		94,6-99,0)	90,8-98,1)
<b><i>pfATP6</i> E431K</b>				
Jahr	2004	2006	2009	2013
n/m (%;	Keine Daten	7/12 (58,3;	15/45 (33,3;	9/48 (18,8;
95% CI)		28,6-83,5)	20,4-49,1)	9,4-33,1)
<b><i>pfmdr1</i> N86Y</b>				
Jahr	2004	2006	2009	2013
n/m (%;	56/69 (81,2;	84/98 (85,7;	23/251 (9,2;	2/163 (1,2;
95% CI)	69,6-89,2	76,9-91,7)*	6,0-13,6)*	0,2-4,8)*
<b><i>Pfmdr1</i> Y184F</b>				
Jahr	2004	2006	2009	2013
n/m (%;	Keine Daten	Keine Daten	227/228 (99,6;	171/171 (100,0;
95% CI)			97,2-99,9)	97,3-100,0)

\*Die Änderung der Prävalenz von 2006 auf 2009 und von 2009 auf 2013 ist jeweils signifikant auf dem 5% Niveau für *pfmdr1* N86Y.

## Ergebnisse

**Tabelle 24: Prävalenz von Wildtyp und Mutation verschiedener Gene in *P. falciparum* und *P. vivax* in Jimma, Äthiopien 2013.** Die Spezifizierung mittels konventioneller PCR ergab 177 *Plasmodium falciparum*, 80 *Plasmodium vivax* und um 14 gemischte *Plasmodium falciparum/vivax* Infektionen. Fett markiert ist die verwertbare Anzahl der untersuchten Proben. Zu beachten ist, dass es, besonders was K13-propeller, *pfATP6* und *pvmdr* angeht zu einer Einschränkung des Untersuchungsumfangs kam. Grund hierfür waren eine stichprobenartige Auswahl sowie technische Schwierigkeiten.

Gene	Codon	Wild type N (%)	Mutation N (%)
<b><i>Plasmodium falciparum</i></b>			
<i>K13-propeller</i>	M476I	25/ <b>25</b> (100.0)	0/ <b>25</b> (0)
	N531I	24/ <b>25</b> (96.0)	1/ <b>25</b> (4.0)
<i>pfATP6</i>	L402V	32/ <b>32</b> (100.0)	0/ <b>32</b> (0.0)
	E431K	39/ <b>48</b> (81.2)	9/ <b>48</b> (18.8)
<i>pfmdr 1</i>	N86Y	161/ <b>163</b> (98.8)	2/ <b>163</b> (1.2)
	Y184F	0/ <b>171</b> (0.0)	171/ <b>171</b> (100.0)
<i>pfCRT</i>	K76T	7/ <b>159</b> (4.4)	152/ <b>159</b> (95.6)
<i>pfCRT+pfmdr1</i> <sup>1</sup>	K76T, N86Y	5/ <b>159</b> (3.1)	1/ <b>159</b> (0.6)
<b><i>Plasmodium vivax</i></b>			
<i>pvmdr</i>	Y976F	6/ <b>22</b> (22.3)	16/ <b>22</b> (72.7)
	F1076L	0/ <b>19</b> (0)	19/ <b>19</b> (100.0)

<sup>1</sup>entweder beide Wildtyp oder beide Mutation

#### 4 Diskussion

Aus den in meiner Arbeit ermittelten Ergebnissen, im Vergleich zu Daten aus 2004, 2006 und 2008/9, lassen sich Veränderungen der Mutationsprävalenzen molekularer Marker, welche mit Resistenzen bezüglich der Malariatherapie in Verbindung stehen, in Südwest-Äthiopien beobachten [18, 77, 112, 119, 126]. Die Anzahl der untersuchten Proben ist für einige Marker zu gering, um Anspruch auf Repräsentativität zu besitzen. Darauf wird im Einzelnen noch eingegangen.

Da 2006 die Einführung der ACT in der Region Jimma stattfand, lassen sich die Daten zeitlich in vor und nach ACT Einführung unterteilen. AL wurde damals zusammen mit einer klinischen Malaria-Studie, die gemeinsam mit der LMU durchgeführt wurde, eingeführt [53].

*Das Gen *pfcr** wird vor allem mit Resistenzen gegen Chloroquin assoziiert, jedoch scheint es auch mit einer Reihe von Resistenzen gegenüber anderen Malariamedikamenten in Verbindung zu stehen, wie z.B. Artemisinin, Chinin und Amodiaquin [73-75].

Die Prävalenz der *pfcr* K76T Mutation blieb relativ konstant über den Beobachtungszeitraum. Im Jahre 2004 [126] lag sie bei 100%, 2008/9 bei 97.6% (243/249) [77, 112] und 2013 bei 95.6% (152/159) [112]. Der Abwärtstrend von 100% (95% CI 93,4-100.0) auf 95.6% (95% CI 90,8-98,1) war statistisch nicht signifikant. Diese Kontinuität könnte nach meinen Überlegungen an mehreren Gründen liegen. Zum einen könnte es daran liegen, dass nichtempfohlene Pharmaka zur Malariatherapie, allen voran Chloroquin, aus Kostengründen oder logistischen Beschaffungsproblemen weiterhin zum Einsatz kommen. Zum anderen ist es möglich, dass viele Fälle einer *falciparum* Malaria nicht als solche erkannt und falsch therapiert werden. Wird sie beispielsweise für eine durch das *P. vivax* verursachte Malaria tertiana gehalten, kann es sein, dass sie mit Chloroquin behandelt wird. *P. falciparum* käme also weiterhin mit diesem Medikament in Kontakt. Chloroquin wird in Äthiopien zur Therapie der unkomplizierten *vivax* Malaria empfohlen [3, 129]. Die Gefahr der möglichen „Fehltherapie“ spiegelt sich im Vergleich der in dieser Arbeit erhobenen Daten mittels PCR-Spezifisierung mit denen der im Vorfeld durchgeführten mikroskopischen Spezifizierung wieder. Hier zeigte sich unter anderem, dass 194 Ergebnisse der mikroskopischen Spezifizierung nicht mit denen der spezifischeren PCR-Methode übereinstimmten.

Ganz besonders ist hier zu erwähnen, dass sich 19 mikroskopisch als *Plasmodium vivax* befundene Proben nach der PCR-Spezifizierung als 16 *Plasmodium falciparum* und 3 gemischte (*falciparum* und *vivax*) Infektionen herausstellten, das sind 5,6% (n=338) des Studienkollektivs. Die Patienten dieser Proben wurden folglich mit Chloroquin behandelt, obwohl sie ACT hätten erhalten sollen.

Beachtenswert ist, dass eine im Jahre 2014 veröffentlichte Studie aus Südost-Äthiopien, mit einem vergleichbarem Aufbau, unterschiedliche Ergebnisse lieferte [111]. Die Studie fand in Omo Nada, BalaWajo, ArbaMinch und Harar statt. Die Autoren stellten eine Prävalenz der Mutation 76T, auf dem *pfcr1* Gen, von 13.5% (23/170) im Süden und 32% (8/25) im Osten von Äthiopien fest. Es wurde eine Selektion von Chloroquin-sensiblen Parasitenstämmen festgestellt. Interessanterweise gaben sie einen vollständigen Rückzug von Chloroquin als Therapie einer *falciparum* Malaria in der untersuchten Region an, der Wechsel auf ein ACT Therapieregime erfolgte laut Angaben im Paper im Jahr 2004. In der Sequenz von Codon 72-76 konnten sie in 95.9% der Fälle den auf Chloroquin sensiblen Haplotyp CVMNK verzeichnen. Während der Mutant CVIET nicht auftrat, präsentierte sich der Haplotyp SVMNT mit 4.1%. Die hier sequenzierten Proben aus der Region Jimma wiederum zeigten 50% den Haplotyp CVIET und zu 50% den Haplotyp. CVMNT, 2013. Dies steht im Gegensatz zu 2009, als zu 100% der Haplotyp CVIET auftrat. Aufgrund der sehr niedrigen Anzahl der von mir sequenzierten Proben (n=14) muss auf eine statistische Auswertung verzichtet werden. Bei Betrachtung dieser regionalen Unterschiede, zwischen der Region um Jimma und den südlich gelegeneren Regionen um Omo Nada, BalaWajo, ArbaMinch und Harar, bleibt zu sagen, dass diese Ergebnis nach weiteren Untersuchungen verlangen [111, 112].

Analog zu oben Genanntem zeigte sich in Malawi sowie in Kenya eine Verschiebung der Prävalenzen zu Gunsten des Wildtyps des *pfcr1* Gens nach Rückzug der Chloroquintherapie [80-82].

Hinsichtlich des *pfmdr1* Gens konnten wir signifikante Veränderungen seit Einführung der ACTs beobachten. Die Selektion der Polymorphismen Y86N (TAT→AAT) und Y184F (TAT→TTT) auf dem *pfmdr1* Gen wird mit dem Einsatz von Artemether-Lumefantrin assoziiert [91, 93-95]. Unter Chloroquin ist hingegen eine Selektion der Mutation N86Y zu beobachten.

Die Daten dieser Studie bestätigten den Negativtrend für die Mutation N86Y. Die Mutationsprävalenz von N86Y fiel von 81,2% im Jahre 2004 [126] und 85,7 % (95% CI 76,9-91,7) 2006 [18] auf 9,2% (95% CI 6,0-13,6) im Jahre 2008/9 [77, 112] und 1,2% (95% CI 0,2-4,8) in 2013 [112].

Der deutliche Abfall von 2006 zu 2013 war hochsignifikant ( $P < 0.001$ , Wilcoxon rank-sum test). Hier wird der mögliche Einfluss von ACT auf die Mutationsprävalenz dieses Markers deutlich, da der plötzliche Abfall von 84,5% auf 7,6% zeitlich mit der Einführung der ACTs in dieser Region übereinstimmt. Vergleicht man den Haplotyp *pfmdr1* 184 mit Daten aus 2008/9, bleibt die Prävalenz der *pfmdr1* Y184F Mutation unverändert hoch. Leider existieren nach meinem Wissen keine früheren Daten zu letzterem molekularem Marker vor dem Einsetzen von ACTs in dieser Region. In einer früheren Studie wurde die Ursache des Selektionsdrucks dem Partnermedikament Lumefantrin zugeschrieben. Dennoch wurde auch eine leichte Verringerung des Ansprechens auf Artemisinine bei Parasiten beobachtet, die den Wildtyp 86N in sich tragen [93, 130, 131]. Das sich hier bietende Bild passt zu Beobachtungen aus anderen Malaria endemischen Gebieten, wo die Behandlung mit Artemether-Lumefantrin, ein ACT, den *pfmdr1* 86N Wildtyp und die *pfmdr1* 184F Mutation selektierte [91, 94]. Erst 2014 zeigte eine Studie aus Mozambique ein vergleichbares Verteilungsmuster. Zwischen den Zeiträumen 2003-2005 und 2010-2012 nahm hier die Prävalenz des Wildtyps N86 von 19,5% auf 73,2% zu, sowie die des Mutanten 184F von 19,6% auf 22,7%, nachdem im Jahre 2009 Artemether-Lumefantrin in Mozambique eingeführt wurde [132].

Ergebnisse wie diese könnten zur optimalen Wahl, Kombination oder zum dauerhaft bzw. vorübergehendem Wechsel der Partnermedikamente in der ACT einer bestimmten Region beitragen. Geeignet wären z.B. zwei Medikamente, die in entgegengesetzte Richtungen selektieren und somit keinen unidirektionalen Selektionsdruck darbieten. Durch dieses, bildlich gesprochen, gegenseitige „Bremsen“ würde eine Resistenzentwicklung womöglich um ein Vielfaches langsamer voranschreiten [77].

SNPs auf dem *pfATP6* Gen werden im Zusammenhang mit Veränderungen der Wirksamkeit von Artemisininen beschrieben [99-101].

Innerhalb des *pfATP6* Gens, sank die Prävalenz des E431K (GAA→AAA) Polymorphismus von 58.3% [18] im Jahre 2006 auf 33.3% in 2008/9 [112] und 18.8% in 2013. Aufgrund der geringen Probenzahl läßt sich der Trend nicht statistisch erfassen. Zusammen mit A632E konnte der E431K SNP in anderen Forschungsarbeiten mit einer reduzierten Empfindlichkeit zu Artemisininen in Verbindung gebracht werden [99]. Da die A632E Mutation äußerst selten in Südwest-Äthiopien vorzukommen scheint (1/24 (4.2%) in 2006 und 0/33 (0%) in 2008/9 [112]), wurde diese bei der Analyse nicht berücksichtigt. Der statistisch nicht signifikante Rückgang der *pfATP6* E431K Mutation unter ACT könnte einerseits dazu herangezogen werden, um der Annahme, E431K sei mit einer Erhöhung der Artemisininresistenz assoziiert, zu widersprechen. Andererseits darf man den Effekt des Partnermedikaments Lumefantrin nicht außer Acht lassen. Folglich kann es sein, dass dieses für den Wildtyp selektiert. Für beide Möglichkeiten sind weitere Belege benötigt.

Die Ergebnisse der anderen untersuchten *pfATP6* Codone 243, 263 und 402 haben ebenfalls keinen Anspruch auf Repräsentativität. Wie in den Ergebnissen erwähnt, stellte sich nach Abschluss der Studie ein systematischer Fehler bei der Sequenzierung längerer Sequenzen heraus. Zudem verlor dieser Marker zunehmend an Bedeutung, insbesondere nach Entdeckung der K13-Propeller Kelch Domäne (siehe unten).

Anfang 2014 wurde die K13-propeller Kelch Domäne als neuer molekularer Marker vorgeschlagen, welcher Artemisininresistenz *in vitro* zu determinieren vermag [104].

Meine Sequenzierungsergebnisse der K13-Propeller Domäne, erfassten nicht die komplette Sequenz (Sequenzlänge von 831 bp). Wie eben erwähnt, ergaben sich Probleme bei der Sequenzierung längerer Sequenzen, die während der Studie nicht gelöst wurden. Aus Budgetgründen musste außerdem auf eine Sequenzierung aller *P. falciparum* Proben verzichtet werden. Es sind nur Aussagen über den Abschnitt zwischen Codon 432 und Codon 709 möglich. Hier fand ich keine der in Ariey *et al.* beschriebenen Mutationen. Insbesondere zeigten sich keine Mutationen am Codon 476, die, wie am Codon 56, Artemisinin-Resistenzen verleihen könnte [104]. Jedoch konnten wir aus dem Extrakt einer Probe eine neue, vorher noch nicht beschriebene N531I Mutation isolieren. Da diese non-synonyme

Mutation bisher nicht charakterisiert wurde, lassen sich keine Aussagen bezüglich einer möglichen Resistenzbeeinflussung treffen.

Bis dato liegen keine Daten bezüglich einer klinischen Artemisinin-Resistenz aus Äthiopien vor. Spätes Therapieversagen (nach Tag 7, so genannte Rekrudeszenzen) unter ACT sind beschrieben [16, 133-135]. Hierfür wird jedoch ein Nichtansprechen der Partnermedikation Lumefantrin verantwortlich gemacht. Frühes Therapieversagen bzw. verzögertes Ansprechen der Therapie (Hinweis auf Artemisinin-Resistenz) wurde bisher nicht berichtet, sollte jedoch dringend weiter abgeklärt werden, zumal die hiesigen „Health Center“ subjektiv von einem verzögerten Ansprechen der Therapie mit ACT berichten (persönliche Kommunikation mit äthiopischen Ärzten vor Ort).

Mutationen im *Pvmdr1* Gen stehen unter dem Verdacht, das Ansprechen von Antimalariatherapien bei *Plasmodium vivax*, vornehmlich Chloroquin, Amodiaquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin, zu verändern [106-108].

Im folgenden Abschnitt ist die niedrige Samplegröße von 25 Proben zu beachten.

Die Sequenzierungsdaten des *pvmdr1* Markers aus der Region um Südwestäthiopien zeigten die Mutationsprävalenzen der Genloci Y976F und F1076L von 72.7% (16/22) und 100.0% (19/19). Eine Selektion dieser Marker in Gebieten mit Chloroquinresistenz sowie eine herabgesetzte Empfindlichkeit für Chloroquin *in vitro* für Y976F ist beschrieben [106-108]. Unsere Resultate korrelieren gut mit dem langjährigen Gebrauch von Chloroquin, jedoch nicht mit regionalen klinischen Daten aus anderen Studien. Die Raten für ein Therapieversagen in klinischen Studien, die zwischen 2006 und 2014 durchgeführt wurden, variieren zwischen 2,0 bis 13,8 % im Südwesten Äthiopiens und sind damit im Schnitt relativ niedrig [136-140]. Unsere Samplegröße ist zu gering, um Anspruch auf Repräsentativität zu haben, ansonsten müsste man sich fragen, ob der Marker geeignet ist Aussagen bezüglich einer Resistenzentwicklung zu treffen. Ein Umstellen der Therapie auf beispielsweise ACT erscheint aufgrund der klinischen Daten derzeit nicht notwendig. Mekonnen und Kollegen beschrieben eine Mutationsprävalenz von Y976F von 32.6% (70/215) und hatten keine Mutationen im Codon 1076 gefunden. Die Proben wurden 2009 im Osten und 2011 im Süden von Äthiopien gesammelt. Weiter schlägt der Autor vor, unter Berücksichtigung von Daten aus früheren Studien aus Brasilien und Madagaskar, die oben genannte Mutation F1076L sei eher eine geographische Variante als ein Resistenzmarker

[109-111]. Dies erscheint aufgrund unserer Resultate unwahrscheinlich. Diese regionalen Unterschiede sind jedoch äußerst interessant und fordern weitere Forschungsaktivitäten mit höheren Fallzahlen, um jene intensiver zu untersuchen. Zudem sollte speziell für *P. vivax* nach weiteren Resistenzmarkern geforscht werden.

## 5 Konklusion

Für die vorliegende Studie wurde Vollblut auf Filterpapier von 338 Patienten aus der Region Jimma, Äthiopien, erfasst. Die Proben wurden von den medizinischen Mitarbeitern der im Einleitungsteil genannten medizinischen Einrichtungen und mir gesammelt. Einen Teil der Mitarbeiter instruierte ich selbst. Unterstützung fand ich hierbei von den Mitarbeitern des Department of Medical Laboratory Sciences der Universität Jimma. Nach mikroskopischer und molekularer Spezifizierung mittels PCR wurden die Resistenzmarker-Gene, *pfprt*, *pfmdr1*, *pfATP6*, K13-propeller und *pvmdr1*, welche mit Resistenzen gegenüber Malariamedikamenten assoziiert sind, mittels molekularer Diagnostik untersucht und mit Daten vor und nach der Einführung von der „Artemisinin-based Combination Therapy“ verglichen. Diese Marker betreffen die Malariaparasiten *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax*. Es stellte sich, unter anderem, Folgendes heraus: Der Wildtyp des *pfmdr1* auf Codon 86 scheint zumindest in dieser Region einen Selektionsvorteil zu haben, da es nach ACT Einführung zu einer deutlichen Rückselektion des Wildtypes kam. Keine signifikanten Änderungen konnten auf Codon 76 des *pfprt* Gens verzeichnet werden. Die Ergebnisse lassen auf einen fortgesetzten Gebrauch von Chloroquin auch gegen *P. falciparum* schließen und würden die offizielle Wiedereinführung Chloroquins verbieten. Der Einsatz von AL ab 2006 korreliert beeindruckend mit der Selektion bereits beschriebener Marker. Die ersten Sequenzierungsergebnissen hinsichtlich der K13-kegelpropeller Domäne zeigten keine der zuvor beschriebenen Mutationen aus Asien, was mit dem immer noch guten klinischen Ansprechen von AL korreliert. Insbesondere wurden noch keine Hinweise auf eine Artemisininresistenz berichtet.

Bezüglich des Malariaparasiten *Plasmodium vivax* wurde das *pvmdr1* Gen untersucht. Mutationen auf *pvmdr1*, die mit Resistenzen gegenüber Chloroquin in Verbindung zu stehen scheinen, zeigten eine hohe Prävalenz in der Region um Jimma, Äthiopien. Chloroquin wird in Äthiopien als First-Line-Therapie bei einer *P. vivax* Malaria empfohlen und eingesetzt [129]. Die Untersuchung eines größeren Kollektivs zusammen mit klinischen und *in vitro* Daten wäre hier empfehlenswert, um die Bedeutung des Resistenzmarkers zu analysieren. Die veröffentlichten klinischen Daten aus dieser Region lassen auf keine größeren Resistenzprobleme schließen [136-140].

## Konklusion

---

Valide molekulare Marker dienen nicht der Beurteilung individueller Risiken oder Therapieoptionen, sie können Trends in der Parasitenpopulation anzeigen und helfen bei der Wahl regionaler oder nationaler Therapieregime [112].

## 6 Zusammenfassung

Malaria, eine durch einzellige Parasiten, den *Plasmodien*, verursachte Infektionskrankheit, stellt in den endemischen Entwicklungsländern, trotz verschiedenster Therapieformen, immer noch ein großes Problem dar. Einer der Gründe dafür ist das Therapieversagen von Malaria-Medikamenten. Eine große Rolle beim Therapieversagen dieser Medikamente spielen Arzneimittelresistenzen, welche die Strategien zur Eindämmung der Malaria gefährden. Da bekannt ist, dass Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) mit Arzneimittelresistenzen assoziiert werden, bildet die kontinuierliche Erfassung von schon bekannten molekularen Markern und die Entdeckung neuer unbekannter Mutationen einen wichtigen Teil der Überwachungs-Strategie der Malaria. Zusammen mit der Einführung der „Artemisinin-based-Combination Therapy“ (ACT), einer Kombinationstherapie, die auf Derivaten des Pflanzenstoffes Artemisinin basiert, konnte weltweit die Selektion bestimmter Mutationsmuster beobachtet werden. Absicht dieser Arbeit war es, diese Veränderungen über eine Zeitspanne von mehreren Jahren in Südwestäthiopien zu analysieren. Es wurden die Marker *pfprt*, *pfmdr1*, *pfATP6*, K13-propeller und *pvmr1* herangezogen. Hierfür wurden, im Zeitraum von März bis Juni 2013, 338 Vollblutproben auf Filterpapier von mikroskopisch für Malaria-positiv befundenen Patienten in Südwestäthiopien gesammelt. In die Studie eingeschlossen waren *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* und gemischte Infektionen. Die molekular-biologische Untersuchung der SNPs wurde von mir mittels konventioneller oder real-time PCR, Restriktionsfragmentlängen-polymorphismus-Analyse oder Sequenzierung durchgeführt. Anschließend verglich ich die Ergebnisse mit solchen aus den Jahren 2004, 2006 und 2008/9.

Durch molekulare Spezifizierung konnte ich 177 Proben als *P. falciparum*, 80 als *P. vivax* und 14 als gemischte Infektionen bestätigen. Das *P. falciparum* betreffend untersuchte ich Mutationen in den Genen *pfprt*, *pfmdr1*, *pfATP6* und PF3D7\_1343700 kelch propeller Domäne (K13-propeller).

Die Ergebnisse lassen einen fortgesetzten Gebrauch von Chloroquin auch gegen *P. falciparum* vermuten. Die Mutation im *pfprt* Gen auf Codon 76K blieb konstant hoch (Mittelwert 97,7%, SD 2,2)). Die Veränderungen waren nicht signifikant. Das Vorkommen der *pfmdr1* 86 T Mutation hingegen fiel 2013 auf 1,2% (2/163), verglichen mit 9,2% im Jahre 2008/9 und 85,7% im Jahre 2006 ( $p < 0.001$ ). Beobachtet man die Daten aus 2008/9, blieb die

*pfmdr1* 184 F Mutation auch 2013 weiterhin hochprävalent bei 100% (172/172). Die Selektion des Wildtypes Y86 und der Mutation 184F wurde unter AL mehrfach beschrieben und korreliert gut mit der Einführung von AL ab 2006 in der Region Jimma. Es konnte keine Mutation im mit Artemisinin-Resistenz assoziierten Codon 476 des K13-propeller Gens gefunden werden. Die Sequenzierung zeigte jedoch eine neue, vorher nicht beschriebene Mutation N531I in einer Probe. Bei niedriger Prävalenz und mangelnden klinischen Daten ist eine bisher nicht beschriebene Mutation nicht beurteilbar bezüglich ihrer Relevanz. Die Ergebnisse korrelieren gut mit klinischen Daten, die weiterhin ein gutes Ansprechen von AL beschreiben.

Bezüglich des *Plasmodium vivax* verriet die Daten aus der erstmaligen Sequenzierung des *pvmdr1* Gens in der Region Jimma eine Prävalenz der 976F und 1076L Mutation von jeweils 72.7% (16/23) und 100% (19/19) in den untersuchten Proben, was gut mit dem langjährigen Gebrauch von Chloroquin gegen *P. vivax* korreliert. Diese Mutationen werden unter Chloroquin selektioniert. Hinweise für hohe klinische Resistenzraten bei *P. vivax* in der Region bestehen jedoch nicht, was die Frage aufwirft, wie valide diese Resistenzmarker sind. Die Probenanzahl in dieser Studie erlaubte jedoch keinen Anspruch auf Repräsentativität.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse unterstreichen, dass zusätzlich zur klinischen Überwachung eine regelmäßige molekulare Surveillance zur Optimierung von Therapieerfolg, Therapieregimen und zur Eindämmung der Krankheit Malaria von großer Wichtigkeit ist.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ACT	Artemisinin-based Combination Therapy
AL	Arthemeter/Lumefantrin
An.	<i>Anopheles</i>
Asn	Asparagin
bp	Basenpaare
BSA	bovine serumalbumin
Bzw.	beziehungsweise
c.a.	zirka
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
MEC	minimal effektive Konzentration
min	Minuten
mut	Mutation
m ü. NHN	Meter über Normalhöhennull
PCR	Polymerase Chain Reaktion, Polymerase-Kettenreaktion
<i>pfATP</i>	<i>plasmodium falciparum</i> ATPase
<i>pfcr1</i>	<i>plasmodium falciparum</i> chloroquine resistance transporter
<i>pfmdr</i>	<i>plasmodium falciparum</i> multi-drug resistance protein
Phe	Phenylalanin
<i>pvmr</i>	<i>plasmodium vivax</i> multi-drug resistance protein
SD	Standardabweichung
sec	Sekunden
SERCA	Sarcoplasmatic Endoplasmatic Reticulum Calcium ATPase
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus
Sog.	Sogenannt
SP	Sulfadoxin/Pyrimethamin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
Tyr	Tyrosin

## Abkürzungsverzeichnis

---

WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Skizzenhafte Darstellung des Malariazyklus bei <i>P. falciparum</i> im Menschen	2
Abbildung 2: Klimadiagramm von Jimma, Provinz Jimma, Äthiopien	8
Abbildung 3: PCR Nachweis von <i>Plasmodium falciparum</i> in Patientenproben	45
Abbildung 4: PCR Nachweis von <i>Plasmodium vivax</i> in Patientenproben	45
Abbildung 5: Gel nach Enzymverdau von <i>pfprt</i> Codon 76	47
Abbildung 6: Amplifikationskurven der Real-Time PCR zum Nachweis von Wildtypen 86N des <i>pfmdr1</i> Gens bei <i>plasmodium falciparum</i>	48
Abbildung 7: Amplifikationskurven der Real-Time PCR zum Nachweis der Mutation 86Y des <i>pfmdr1</i> Gens bei <i>plasmodium falciparum</i>	49
Abbildung 8: Amplifikationskurven der Real-Time PCR zum Nachweis der Mutation Y184F auf dem <i>pfmdr1</i> Gen bei <i>Plasmodium falciparum</i>	49
Abbildung 9: Gel nach konventioneller PCR von <i>pfATP6</i> vor Sequenzierung	51
Abbildung 10: konventionelle PCR der K13 Domäne, Gel nach nested PCR vor Sequenzierung	52
Abbildung 11: Gel eines Nachweises von <i>pvmr1</i> mittels konventioneller PCR vor Sequenzierung	54
Schaubild 1: Prävalenz der untersuchten Mutationen im zeitlichen Verlauf	55

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausgewählte Haplotypen von Codon 72 bis 76 des <i>pfcr</i> Gens .....	15
Tabelle 2: Die in dieser Arbeit untersuchten Resistenzmarker sowie die Antimalariamittel/Wirstoffe, die mit den Markern in Zusammenhang stehen... 18	18
Tabelle 3: Materialien .....	20
Tabelle 4: Primer .....	23
Tabelle 5: Spezifizierung Einzelreaktion.....	27
Tabelle 6: Programm Thermozykler Spezifizierung.....	27
Tabelle 7: Primer Nested PCR Spezifizierung.....	28
Tabelle 8: <i>pfcr</i> Einzelreaktion .....	29
Tabelle 9: Programm Thermozykler <i>pfcr</i> .....	29
Tabelle 10: Primer <i>pfcr</i> .....	30
Tabelle 11: Enzymverdau Einzelreaktion .....	30
Tabelle 12: <i>pfATP6</i> Einzelreaktion .....	31
Tabelle 13: Programm Thermozykler <i>pfATP6</i> .....	32
Tabelle 14: K13-propeller Einzelreaktion.....	33
Tabelle 15: Programm Thermozykler K13-Propeller .....	33
Tabelle 16 Primer K13-propeller.....	34
Tabelle 17: Einzelreaktion <i>pvm</i> <i>mdr1</i> .....	34
Tabelle 18: Programm Thermozykler <i>pvm</i> <i>mdr1</i> .....	35
Tabelle 19: Real-Time PCR Einzelreaktion .....	38
Tabelle 20: Programm Realtimegerät.....	38
Tabelle 21: Primer und Sonden <i>pfmdr1</i> Real-Time PCR.....	39
Tabelle 22: Inkongruenz der Ergebnisse der in der Arbeit verwendeten Spezifizierungsmethoden .....	44
Tabelle 23: Ergänzende tabellarische Darstellung zu Schaubild 1 .....	56
Tabelle 24: Prävalenz von Wildtyp und Mutation verschiedener Gene in <i>P. falciparum</i> und <i>P. vivax</i> in Jimma, Äthiopien 2013.....	57

## 10 Literaturverzeichnis

1. W.H.O., *World malaria report : 2016*. 2016.
2. Löscher, T. and G.-D. Burchard, *Tropenmedizin in Klinik und Praxis mit Reise- und Migrationsmedizin*. 4 ed. 2010: Thieme. 1148.
3. W.H.O., *World malaria report : 2013*. 2013.
4. Quispe, A.M., et al., *Plasmodium vivax Hospitalizations in a Monoendemic Malaria Region: Severe Vivax Malaria?* Am J Trop Med Hyg, 2014.
5. Price, R.N., et al., *Vivax malaria: neglected and not benign*. Am J Trop Med Hyg, 2007. **77**(6 Suppl): p. 79-87.
6. Shortt, H.E., *Life-cycle of the mammalian malaria parasite*. Br Med Bull, 1951. **8**(1): p. 7-9.
7. Breman, J.G. *Clinical manifestations of malaria*. 2014 [cited 2014 April 28]; Available from: [http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-of-malaria?source=search\\_result&search=malaria&selectedTitle=1~150](http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-of-malaria?source=search_result&search=malaria&selectedTitle=1~150).
8. CDC. *Malaria Diagnosis (U.S.) – Rapid Diagnostic Test*. April 26, 2018 Mai 28, 2018]; Available from: [https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis\\_treatment/rdt.html](https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/rdt.html).
9. W.H.O., *Guidelines for the treatment of malaria. Third edition*. 2015.
10. Hawkes, M. and K.C. Kain, *Advances in malaria diagnosis*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2007. **5**(3): p. 485-95.
11. Boggild, A., et al., *Summary of recommendations for the diagnosis and treatment of malaria by the Committee to Advise on Tropical Medicine and Travel (CATMAT)*. Can Commun Dis Rep, 2014. **40**(7): p. 133-143.
12. W.H.O., *Guidelines for the treatment of malaria*. 2006.
13. W.H.O., *Status report on artemisinin and ACT resistance*. 2017.
14. Achan, J., et al., *Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria*. Malar J, 2011. **10**: p. 144.
15. W.H.O., *Guidelines For The Treatment Of Malaria*. 2010: Switzerland.
16. Eshetu, T., et al., *Open-label trial with artemether-lumefantrine against uncomplicated Plasmodium falciparum malaria three years after its broad introduction in Jimma Zone, Ethiopia*. Malar J, 2012. **11**: p. 240.
17. The World Bank. *Ethiopia Country At A Glance*. 2012 [cited 2014 April 22]; Available from: <http://www.worldbank.org/en/country/ethiopia>.
18. Eshetu, T., et al., *Different mutation patterns of Plasmodium falciparum among patients in Jimma University Hospital, Ethiopia*. Malar J, 2010. **9**: p. 226.
19. Ayele, D.G., T.T. Zewotir, and H.G. Mwambi, *Prevalence and risk factors of malaria in Ethiopia*. Malar J, 2012. **11**: p. 195.
20. Paaismans, K.P., et al., *Unexpected high losses of Anopheles gambiae larvae due to rainfall*. PLoS One, 2007. **2**(11): p. e1146.
21. Imbahale, S.S., et al., *A longitudinal study on Anopheles mosquito larval abundance in distinct geographical and environmental settings in western Kenya*. Malar J, 2011. **10**: p. 81.
22. Lo, E., et al., *Transmission dynamics of co-endemic Plasmodium vivax and P. falciparum in Ethiopia and prevalence of antimalarial resistant genotypes*. PLoS Negl Trop Dis, 2017. **11**(7): p. e0005806.

23. White, N.J., *Determinants of relapse periodicity in Plasmodium vivax malaria*. Malar J, 2011. **10**: p. 297.
24. Herz, D., *Äthiopien verstehen*. 2006, Studienkreis für Tourismus und Entwicklung
25. Auswaertiges Amt. *Äthiopien*. 2014 [cited 2014 April 5]; Available from: [http://www.auswaertiges-amt.de/DE/Aussenpolitik/Laender/Laenderinfos/01-Nodes\\_Uebersichtsseiten/Aethiopien\\_node.html](http://www.auswaertiges-amt.de/DE/Aussenpolitik/Laender/Laenderinfos/01-Nodes_Uebersichtsseiten/Aethiopien_node.html).
26. Embassy of Ethiopia in Berlin, G. *Country Profile*. 2010 [cited 2014 April 21]; Available from: [http://www.aethiopien-botschaft.de/country\\_profile\\_en.html](http://www.aethiopien-botschaft.de/country_profile_en.html).
27. Embassy of Ethiopia, B. *Geography*. 2017; Available from: [http://aethiopien-botschaft.de/?page\\_id=181](http://aethiopien-botschaft.de/?page_id=181).
28. Deutscher Wetterdienst. *Klimadaten ausgewählter Wetterstationen: Äthiopien*. [cited 2018 May 5]; Available from: [https://www.dwd.de/DE/leistungen/klimadatenwelt/afrika/ac/aethopien/aethiopien\\_node.html](https://www.dwd.de/DE/leistungen/klimadatenwelt/afrika/ac/aethopien/aethiopien_node.html).
29. Taye, B., et al., *Seasonal Dynamics, Longevity, and Biting Activity of Anopheline Mosquitoes in Southwestern Ethiopia*. J Insect Sci, 2016. **16**.
30. Lelisa, K., et al., *Anopheline mosquitoes behaviour and entomological monitoring in southwestern Ethiopia*. J Vector Borne Dis, 2017. **54**(3): p. 240-248.
31. Qinghaosu\_Antimalaria\_CoordinatiTeg\_Research\_group, *Antimalaria studies on Qinghaosu*. Chin Med J (Engl), 1979. **92**(12): p. 811-6.
32. W.H.O., *Global report on antimalarial efficacy and drug resistance: 2000-2010*. 2010: Geneva.
33. Li, Y., *Qinghaosu (artemisinin): Chemistry and pharmacology*. Acta Pharmacol Sin, 2012. **33**(9): p. 1141-1146.
34. Zhang, J.-F., *A Detailed Chronological Record of Project 523 and the Discovery and Development of Qinghaosu (Artemisinin)*. 2005: Yang Cheng Evening News Publishing Company.
35. Kremsner, P.G. and S. Krishna, *Antimalarial combinations*. Lancet, 2004. **364**(9430): p. 285-94.
36. Eckstein-Ludwig, U., et al., *Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum*. Nature, 2003. **424**(6951): p. 957-61.
37. Krishna, S., et al., *Artemisinins: their growing importance in medicine*. Trends Pharmacol Sci, 2008. **29**(10): p. 520-7.
38. Meshnick, S.R., *Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity*. Int J Parasitol, 2002. **32**(13): p. 1655-60.
39. Hien, T.T., *An overview of the clinical use of artemisinin and its derivatives in the treatment of falciparum malaria in Viet Nam*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1994. **88 Suppl 1**: p. S7-8.
40. Krishna, S., et al., *Bioavailability and preliminary clinical efficacy of intrarectal artesunate in Ghanaian children with moderate malaria*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(2): p. 509-16.
41. ter Kuile, F., et al., *Plasmodium falciparum: in vitro studies of the pharmacodynamic properties of drugs used for the treatment of severe malaria*. Exp Parasitol, 1993. **76**(1): p. 85-95.

42. Price, R.N., et al., *Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility*. Lancet, 1996. **347**(9016): p. 1654-8.
43. Krishna, S., A.C. Uhlemann, and R.K. Haynes, *Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance*. Drug Resist Updat, 2004. **7**(4-5): p. 233-44.
44. Nosten, F., et al., *Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of Plasmodium falciparum malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study*. Lancet, 2000. **356**(9226): p. 297-302.
45. White, N.J., *Preventing antimalarial drug resistance through combinations*. Drug Resist Updat, 1998. **1**(1): p. 3-9.
46. Noedl, H., et al., *Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia*. N Engl J Med, 2008. **359**(24): p. 2619-20.
47. Dondorp, A.M., et al., *Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria*. N Engl J Med, 2009. **361**(5): p. 455-67.
48. Stepniewska, K., et al., *In vivo parasitological measures of artemisinin susceptibility*. J Infect Dis, 2010. **201**(4): p. 570-9.
49. Hien, T.T. and N.J. White, *Qinghaosu*. Lancet, 1993. **341**(8845): p. 603-8.
50. Hale, V., et al., *Microbially derived artemisinin: a biotechnology solution to the global problem of access to affordable antimalarial drugs*. Am J Trop Med Hyg, 2007. **77**(6 Suppl): p. 198-202.
51. Paddon, C.J., et al., *High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin*. Nature, 2013. **496**(7446): p. 528-32.
52. Ghebreyesus, T.A., *National Strategic Plan For Malaria Prevention Control And Elimination In Ethiopia 2011 – 2015* 2010, Federal Ministry of Health of Ethiopia.
53. Gurkov, R., et al., *Ototoxicity of artemether/lumefantrine in the treatment of falciparum malaria: a randomized trial*. Malar J, 2008. **7**: p. 179.
54. Deressa, W., A. Ali, and F. Enqusellassie, *Self-treatment of malaria in rural communities, Butajira, southern Ethiopia*. Bull World Health Organ, 2003. **81**(4): p. 261-8.
55. CDC. *Drug Resistance in the Malaria-Endemic World*. 2015; Available from: [https://www.cdc.gov/malaria/malaria\\_worldwide/reduction/drug\\_resistance.html](https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/reduction/drug_resistance.html).
56. Slater, A.F., *Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in Plasmodium falciparum*. Pharmacol Ther, 1993. **57**(2-3): p. 203-35.
57. Baird, J.K., *Resistance to therapies for infection by Plasmodium vivax*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(3): p. 508-34.
58. Baird, J.K., et al., *Whole blood chloroquine concentrations with Plasmodium vivax infection in Irian Jaya, Indonesia*. Am J Trop Med Hyg, 1997. **56**(6): p. 618-20.
59. Goncalves, L.A., P. Cravo, and M.U. Ferreira, *Emerging Plasmodium vivax resistance to chloroquine in South America: an overview*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2014. **0**.
60. Chou, A.C., R. Chevli, and C.D. Fitch, *Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for identification as the chloroquine receptor of malaria parasites*. Biochemistry, 1980. **19**(8): p. 1543-9.
61. Saliba, K.J., P.I. Folb, and P.J. Smith, *Role for the plasmodium falciparum digestive vacuole in chloroquine resistance*. Biochem Pharmacol, 1998. **56**(3): p. 313-20.

62. Pulcini, S., et al., *Mutations in the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter, PfCRT, enlarge the parasite's food vacuole and alter drug sensitivities*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 14552.
63. Savarino, A., et al., *Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases?* Lancet Infect Dis, 2003. **3**(11): p. 722-7.
64. Yan, Y., et al., *Anti-malaria drug chloroquine is highly effective in treating avian influenza A H5N1 virus infection in an animal model*. Cell Res, 2013. **23**(2): p. 300-2.
65. Sotelo, J., E. Briceno, and M.A. Lopez-Gonzalez, *Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Ann Intern Med, 2006. **144**(5): p. 337-43.
66. Kim, J., et al., *Identification of anti-malarial compounds as novel antagonists to chemokine receptor CXCR4 in pancreatic cancer cells*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31004.
67. Solomon, V.R. and H. Lee, *Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies*. Eur J Pharmacol, 2009. **625**(1-3): p. 220-33.
68. Shenoy, V.P., et al., *Hepato-pulmonary amebiasis: a case report*. Braz J Infect Dis, 2010. **14**(4): p. 372-3.
69. Yelve, K., et al., *Syncope in a patient being treated for hepatic and intestinal amoebiasis*. BMJ Case Rep, 2012. **2012**.
70. Yeo, S.J., et al., *Anti-malarial effect of novel chloroquine derivatives as agents for the treatment of malaria*. Malar J, 2017. **16**(1): p. 80.
71. Fidock, D.A., et al., *Mutations in the P. falciparum digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance*. Mol Cell, 2000. **6**(4): p. 861-71.
72. Rudzinska, M.A., W. Trager, and R.S. Bray, *Pinocytotic uptake and the digestion of hemoglobin in malaria parasites*. J Protozool, 1965. **12**(4): p. 563-76.
73. Djimde, A., et al., *A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria*. N Engl J Med, 2001. **344**(4): p. 257-63.
74. Schneider, A.G., et al., *A point mutation in codon 76 of pfcr of P. falciparum is positively selected for by Chloroquine treatment in Tanzania*. Infect Genet Evol, 2002. **1**(3): p. 183-9.
75. Sidhu, A.B., D. Verdier-Pinard, and D.A. Fidock, *Chloroquine resistance in Plasmodium falciparum malaria parasites conferred by pfcr mutations*. Science, 2002. **298**(5591): p. 210-3.
76. Dittrich, S., et al., *Falciparum malaria in the north of Laos: the occurrence and implications of the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter (pfcr) gene haplotype SVMNT*. Trop Med Int Health, 2005. **10**(12): p. 1267-70.
77. Venkatesan, M., et al., *Polymorphisms in Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter and multidrug resistance 1 genes: parasite risk factors that affect treatment outcomes for P. falciparum malaria after artemether-lumefantrine and artesunate-amodiaquine*. Am J Trop Med Hyg, 2014. **91**(4): p. 833-43.
78. Wootton, J.C., et al., *Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in Plasmodium falciparum*. Nature, 2002. **418**(6895): p. 320-3.
79. Warhurst, D.C., *Polymorphism in the Plasmodium falciparum chloroquine-resistance transporter protein links verapamil enhancement of chloroquine sensitivity with the clinical efficacy of amodiaquine*. Malar J, 2003. **2**: p. 31.

80. Mita, T., et al., *Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter gene mutation K76T following the discontinuance of chloroquine use in Malawi.* Am J Trop Med Hyg, 2003. **68**(4): p. 413-5.
81. Kublin, J.G., et al., *Reemergence of chloroquine-sensitive Plasmodium falciparum malaria after cessation of chloroquine use in Malawi.* J Infect Dis, 2003. **187**(12): p. 1870-5.
82. Mwai, L., et al., *Chloroquine resistance before and after its withdrawal in Kenya.* Malar J, 2009. **8**: p. 106.
83. Mang'era, C.M., et al., *Changes in genotypes of Plasmodium falciparum human malaria parasite following withdrawal of chloroquine in Tiwi, Kenya.* Acta Trop, 2012. **123**(3): p. 202-7.
84. Mace, K.E., et al., *Adherence to treatment with artemether-lumefantrine for uncomplicated malaria in rural Malawi.* Clin Infect Dis, 2011. **53**(8): p. 772-9.
85. Foote, S.J., et al., *Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of P. falciparum.* Cell, 1989. **57**(6): p. 921-30.
86. Cowman, A.F., et al., *A P-glycoprotein homologue of Plasmodium falciparum is localized on the digestive vacuole.* J Cell Biol, 1991. **113**(5): p. 1033-42.
87. Pickard, A.L., et al., *Resistance to Antimalarials in Southeast Asia and Genetic Polymorphisms in pfmdr1.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003. **47**(8): p. 2418-2423.
88. Price, R.N., et al., *Mefloquine resistance in Plasmodium falciparum and increased pfmdr1 gene copy number.* The Lancet, 2004. **364**(9432): p. 438-447.
89. Price, R.N., et al., *Molecular and pharmacological determinants of the therapeutic response to artemether-lumefantrine in multidrug-resistant Plasmodium falciparum malaria.* Clin Infect Dis, 2006. **42**(11): p. 1570-7.
90. Price, R.N., et al., *The pfmdr1 gene is associated with a multidrug-resistant phenotype in Plasmodium falciparum from the western border of Thailand.* Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(12): p. 2943-9.
91. Dokomajilar, C., et al., *Selection of Plasmodium falciparum pfmdr1 alleles following therapy with artemether-lumefantrine in an area of Uganda where malaria is highly endemic.* Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(5): p. 1893-5.
92. Holmgren, G., A. Bjorkman, and J.P. Gil, *Amodiaquine resistance is not related to rare findings of pfmdr1 gene amplifications in Kenya.* Trop Med Int Health, 2006. **11**(12): p. 1808-12.
93. Sisowath, C., et al., *In vivo selection of Plasmodium falciparum pfmdr1 86N coding alleles by artemether-lumefantrine (Coartem).* J Infect Dis, 2005. **191**(6): p. 1014-7.
94. Sisowath, C., et al., *The role of pfmdr1 in Plasmodium falciparum tolerance to artemether-lumefantrine in Africa.* Trop Med Int Health, 2007. **12**(6): p. 736-42.
95. Happi, C.T., et al., *Selection of Plasmodium falciparum multidrug resistance gene 1 alleles in asexual stages and gametocytes by artemether-lumefantrine in Nigerian children with uncomplicated falciparum malaria.* Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(3): p. 888-95.
96. Imwong, M., et al., *Exploring the contribution of candidate genes to artemisinin resistance in Plasmodium falciparum.* Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(7): p. 2886-92.
97. Krishna, S., et al., *Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of in vitro resistance.* Trends Mol Med, 2006. **12**(5): p. 200-5.

98. Uhlemann, A.C., et al., *A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinin*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(7): p. 628-9.
99. Jambou, R., et al., *Resistance of Plasmodium falciparum field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6*. The Lancet, 2005. **366**(9501): p. 1960-1963.
100. Menegon, M., et al., *Detection of novel point mutations in the Plasmodium falciparum ATPase6 candidate gene for resistance to artemisinins*. Parasitol Int, 2008. **57**(2): p. 233-5.
101. Cui, L., et al., *Lack of association of the S769N mutation in Plasmodium falciparum SERCA (PfATP6) with resistance to artemisinins*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(5): p. 2546-52.
102. Chilogola, J., et al., *Occurrence of pfatpase6 Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Artemisinin Resistance among Field Isolates of Plasmodium falciparum in North-Eastern Tanzania*. Malar Res Treat, 2015. **2015**: p. 279028.
103. Nguetse, C.N., et al., *Molecular markers of anti-malarial drug resistance in Central, West and East African children with severe malaria*. Malar J, 2017. **16**(1): p. 217.
104. Arieu, F., et al., *A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria*. Nature, 2014. **505**(7481): p. 50-5.
105. Adams, J., R. Kelso, and L. Cooley, *The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(1): p. 17-24.
106. Brega, S., et al., *Identification of the Plasmodium vivax mdr-like gene (pvmdr1) and analysis of single-nucleotide polymorphisms among isolates from different areas of endemicity*. J Infect Dis, 2005. **191**(2): p. 272-7.
107. Suwanarusk, R., et al., *Chloroquine resistant Plasmodium vivax: in vitro characterisation and association with molecular polymorphisms*. PLoS One, 2007. **2**(10): p. e1089.
108. Marfurt, J., et al., *Molecular markers of in vivo Plasmodium vivax resistance to amodiaquine plus sulfadoxine-pyrimethamine: mutations in pvdhfr and pvmdr1*. J Infect Dis, 2008. **198**(3): p. 409-17.
109. Barnadas, C., et al., *Plasmodium vivax resistance to chloroquine in Madagascar: clinical efficacy and polymorphisms in pvmdr1 and pvcr-t genes*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(12): p. 4233-40.
110. Gama, B.E., et al., *Characterisation of pvmdr1 and pvdhfr genes associated with chemoresistance in Brazilian Plasmodium vivax isolates*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104**(7): p. 1009-11.
111. Mekonnen, S.K., et al., *Return of chloroquine-sensitive Plasmodium falciparum parasites and emergence of chloroquine-resistant Plasmodium vivax in Ethiopia*. Malar J, 2014. **13**: p. 244.
112. Heuchert, A., et al., *Molecular markers of anti-malarial drug resistance in southwest Ethiopia over time: regional surveillance from 2006 to 2013*. Malar J, 2015. **14**: p. 208.
113. Snounou, G., et al., *Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections*. Mol Biochem Parasitol, 1993a. **58**(2): p. 283-92.
114. Purfield, A., et al., *A new method for detection of pfmdr1 mutations in Plasmodium falciparum DNA using real-time PCR*. Malar J, 2004. **3**: p. 9.

115. Kain, K.C. and D.E. Lanar, *Determination of genetic variation within Plasmodium falciparum by using enzymatically amplified DNA from filter paper disks impregnated with whole blood*. J Clin Microbiol, 1991. **29**(6): p. 1171-4.
116. Snounou, G., et al., *The importance of sensitive detection of malaria parasites in the human and insect hosts in epidemiological studies, as shown by the analysis of field samples from Guinea Bissau*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1993b. **87**(6): p. 649-53.
117. Zaman, S., et al., *The detection of Plasmodium falciparum and P. vivax in DNA-extracted blood samples using polymerase chain reaction*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2001. **95**(4): p. 391-7.
118. Singh, B., et al., *A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies*. Am J Trop Med Hyg, 1999. **60**(4): p. 687-92.
119. Berens, N., et al., *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. **8**(9): p. 775-82.
120. Rassow, J., et al., *Agarose- und Polyacrylamid-Gelelektrophorese*, in *Duale Reihe Biochemie 2. Auflage*. 2008, Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart. p. 494.
121. Kutyavin, I.V., et al., *3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(2): p. 655-61.
122. Livak, K.J., *Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay*. Genet Anal, 1999. **14**(5-6): p. 143-9.
123. Scientific, T.F. *Real-Time PCR (qPCR) Basics*.
124. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
125. Huang, B., et al., *Prevalence of crt and mdr-1 mutations in Plasmodium falciparum isolates from Grande Comore island after withdrawal of chloroquine*. Malar J, 2016. **15**(1): p. 414.
126. Schunk, M., et al., *High prevalence of drug-resistance mutations in Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in southern Ethiopia*. Malar J, 2006. **5**: p. 54.
127. Newcombe, R.G., *Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods*. Stat Med, 1998. **17**(8): p. 857-72.
128. Wilson, E.B., *Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference*. Journal of the American Statistical Association, 1927. **22**(158): p. 209-212.
129. Ministry of Health, Federal Democratic Republic of Ethiopia, *National Malaria Guidelines Third Edition*. 2012.
130. Duraisingh, M.T., et al., *The tyrosine-86 allele of the pfmdr1 gene of Plasmodium falciparum is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin*. Mol Biochem Parasitol, 2000. **108**(1): p. 13-23.
131. Duraisingh, M.T., et al., *Increased sensitivity to the antimalarials mefloquine and artemisinin is conferred by mutations in the pfmdr1 gene of Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol, 2000. **36**(4): p. 955-61.
132. Lobo, E., et al., *Prevalence of pfmdr1 alleles associated with artemether-lumefantrine tolerance/resistance in Maputo before and after the implementation of artemisinin-based combination therapy*. Malar J, 2014. **13**.

133. Mekonnen, S.K., et al., *Efficacy of artemether-lumefantrine therapy for the treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in Southwestern Ethiopia*. Malar J, 2015. **14**: p. 317.
134. Ebstie, Y.A., et al., *Assessment of therapeutic efficacy and safety of artemether-lumefantrine (Coartem®) in the treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria patients in Bahir Dar district, Northwest Ethiopia: an observational cohort study*. Malaria Journal, 2015. **14**: p. 236.
135. Teklemariam, M., et al., *Therapeutic efficacy of artemether-lumefantrine against uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in a high-transmission area in northwest Ethiopia*. PLoS ONE, 2017. **12**(4): p. e0176004.
136. Assefa, M., T. Eshetu, and A. Biruksew, *Therapeutic efficacy of chloroquine for the treatment of Plasmodium vivax malaria among outpatients at Hossana Health Care Centre, southern Ethiopia*. Malar J, 2015. **14**: p. 458.
137. Ketema, T., et al., *Chloroquine-resistant Plasmodium vivax malaria in Serbo town, Jimma zone, south-west Ethiopia*. Malar J, 2009. **8**: p. 177.
138. Ketema, T., K. Getahun, and K. Bacha, *Therapeutic efficacy of chloroquine for treatment of Plasmodium vivax malaria cases in Halaba district, South Ethiopia*. Parasit Vectors, 2011. **4**: p. 46.
139. Teka, H., et al., *Chloroquine-resistant Plasmodium vivax malaria in Debre Zeit, Ethiopia*. Malar J, 2008. **7**: p. 220.
140. Beyene, H.B., et al., *Efficacy of Chloroquine for the Treatment of Vivax malaria in Northwest Ethiopia*. PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0161483.

## **11 Danksagung**

Vorweg möchte ich allen danken, die mich bei diesem Projekt unterstützt haben.

Ganz besonders gilt der Dank meine Doktormutter Frau Dr. med. Nicole Berens-Riha für ihre umfassende Unterstützung, ihren lehrreichen Rat und ihre einfallsreichen Beiträge bezüglich dieser Arbeit. Weiter möchte ich Herrn Dr. med. Michael Pritsch für zusätzliche wertvolle Anregungen danken.

Danken möchte ich auch meinem Herrn Professor Dr. med. Thomas Löscher.

Ein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern der Health-Center, welche zur Datenerhebung beigetragen haben sowie der Belegschaft der parasitologischen Abteilung des „Jimma University Hospital“.

Nicht zuletzt geht mein Dank an meine Mutter Frau Valentina Reichenbach und meinen Vater Herrn Jürgen Heuchert für ihre Geduld, Unterstützung und Inspiration schon mein ganzes Leben lang.

## Eidesstattliche Versicherung

Alexander, Heuchert

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Molekulare Marker für Resistenzen von Antimalariamitteln in Südwest-Äthiopien im zeitlichen Verlauf: regionale Beobachtung im Zeitraum von 2006 bis 2013“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 29.08.2019

---

Ort, Datum

Alexander Heuchert

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand