

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen
Abteilung Innere Medizin VII, Tropenmedizin
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. P. G. Kremsner

Genetische Analyse der Rückkehr
Chloroquin-sensitiver *P. falciparum*
Parasiten nach Lambaréné, Gabun

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Nicola Nadine Lehnert

aus
Hannover

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Professor Dr. P. G. Kremsner

2. Berichtstatter: Professor Dr. T. Iftner

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Malaria	3
1.1.1	Definition	3
1.1.2	Epidemiologie	3
1.1.3	Erreger	4
1.1.4	Pathogenese und Klinik	6
1.1.5	Diagnostik	8
1.1.6	Therapie	8
1.1.7	Bekämpfungsstrategien	9
1.2	Chloroquin	10
1.2.1	Historische Aspekte	10
1.2.2	Pharmakologie	11
1.2.3	Chloroquin-Resistenz	12
1.3	Situation in Lambaréné, Gabun	16
1.4	Fragestellung	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Patientengut	18
2.2	DNA-Extraktion	20
2.3	Polymerase-Kettenreaktion	20
2.4	Sequenzierung	21
2.5	Bestimmung der Chloroquin-Resistenz	22
2.5.1	Molekulargenetischer Nachweis der Resistenzmutation K76T im <i>pfcr</i> t-Gen	22
2.5.2	Molekulargenetische Bestimmung Resistenz-assoziiierter Mutationen im <i>pfcr</i> t-Gen	23
2.5.3	Chloroquin-Resistenz- <i>in vitro</i> -Bestimmung	25
2.6	Darstellung des <i>msp2</i> -Lokus	25
2.7	Analyse der Haplotypen	26
2.8	Parasitenkultur	29
2.8.1	Kontinuierliche Kultur	30
2.8.2	DNA-Extraktion aus Parasitenkulturen	30
2.9	Statistische Auswertung	31

3	Ergebnisse	32
3.1	Bestimmung der Chloroquin-Resistenzlage	32
3.1.1	Molekulargenetischer Nachweis	32
3.1.2	<i>in vitro</i> -Testung	34
3.2	Charakterisierung des <i>pfcr1</i> -Gens	35
3.3	Charakterisierung des <i>msp2</i> -Lokus	37
3.3.1	Darstellung des <i>3D7</i> - und <i>FC27</i> -Allels	37
3.3.2	Restriktionsverdau	37
3.3.3	Sequenzanalyse	38
3.4	Analyse der Haplotypen	43
3.4.1	Rohdaten	45
3.4.2	Analyse der aktuellen resistenten Population	51
3.4.3	Analyse der sensitiven Isolate	52
3.4.4	Analyse der resistenten Haplotypen über die Jahre	54
4	Diskussion	59
4.1	Rückkehr der Chloroquin-Sensitivität im weltweiten Vergleich	59
4.2	Genetischer Mechanismus der Rückkehr Chloroquin-sensitiver Parasiten nach Lambaréné	63
4.3	Einfluss des Chloroquin-Selektionsdruckes auf die lokale resistente Population	66
4.4	Diversität des <i>msp2</i> -Lokus in Lambaréné	73
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	76
5	Zusammenfassung	78
A	Patientendaten	80
B	Sequenzen	83
	Abkürzungsverzeichnis	108
	Tabellenverzeichnis	109
	Abbildungsverzeichnis	109
	Literaturverzeichnis	110

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Malaria

1.1.1 Definition

Malaria bezeichnet eine durch Protozoen der Gattung *Plasmodium* verursachte Infektionskrankheit. Bekannt sind vier humanpathogene Plasmodienspezies: *Plasmodium falciparum*, Erreger der Malaria tropica, der schwersten Malariaform, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax*, beide Erreger der Malaria tertiana, sowie *Plasmodium malariae*, Erreger der Malaria quartana. Die Übertragung findet über den Stich der weiblichen Anophelesmücke statt.

1.1.2 Epidemiologie

Jährlich treten etwa 200 – 350 Millionen Fälle von Malaria auf, etwa 90% davon in Afrika. Die meisten dieser Infektionen werden durch *Plasmodium falciparum*, den zugleich gefährlichsten Malariaerreger, verursacht. Weitere betroffene Regionen sind Südostasien, Ozeanien, Mittel- und Südamerika. Insgesamt findet sich Malaria in über hundert Ländern, die zusammen die Hälfte der Weltbevölkerung beherbergen (siehe Abbildung 1.1). 2006 starben geschätzte 600 000 – 1 200 000 Menschen an Malaria, 90% der Fälle waren Kinder unter fünf Jahren [WHO (2008b)]. Auch die wirtschaftlichen Auswirkungen sind immens. In den Hauptendemiegebieten sinkt Schätzungen zufolge das jährliche Wirtschaftswachstum allein auf Grund von Malaria um 1,3% pro Jahr [RBM].

In Deutschland wurden im Jahre 2008 547 Malariafälle gemeldet, zum überwiegenden Teil von Reiserückkehrern aus Endemiegebieten. Zwei der Erkrankten (0,4%)

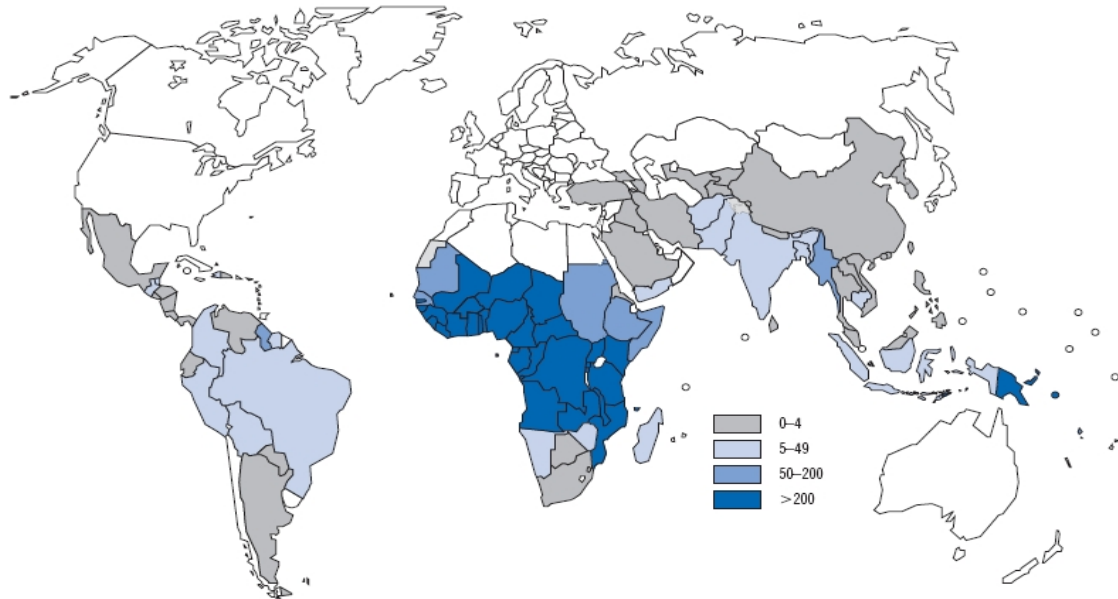


Abbildung 1.1: Malariainzidenz weltweit.

Bildquelle: WHO (2008b). Angegeben ist die Inzidenz pro 1000 Einwohnern, Stand 2006.

verstarben. [Robert Koch-Institut (2009)]

1.1.3 Erreger

Allgemeines Plasmodien gehören zur Klasse der *Haematozoa* aus dem Stamm der *Alveolata*, Unterstamm *Apicomplexa*. Sie zeichnen sich durch einen obligaten Wirtswechsel zwischen Wirbeltieren (Zwischenwirte) und Arthropoden (Endwirte) aus. Im Falle von *P. falciparum* sind dies der Mensch und die weibliche Anophelesmücke, weitere Erregerreservoirare existieren nicht. Während der Entwicklung durchlaufen sie einen Generationswechsel von ungeschlechtlicher Schizogonie, geschlechtlicher Gamogonie und ungeschlechtlicher Sporogonie. Die Schizogonie und die erste Phase der Gamogonie laufen hierbei im Wirbeltier ab, die Fortsetzung der Gamogonie sowie die anschließende Sporogonie finden im Arthropoden statt. [Lucius und Loos-Frank (1997)]

Entwicklungszyklus Im Folgenden wird speziell auf den Entwicklungszyklus der humanpathogenen Plasmodienspezies eingegangen (siehe auch Abbildung 1.2.) Die infektiösen Sporoziten werden von der weiblichen Anophelesmücke beim Akt des Blutsaugens auf den Menschen übertragen. Auf dem Blutweg gelangen sie innerhalb kurzer Zeit zur Leber, wo sie sich in den Hepatozyten zu großen, mehrkernigen Schizonten entwickeln (exoerythrozytäre Schizogonie). Diese zerfallen zu mehreren

tausend Merozoiten, welche die Erythrozyten invadieren. Die Leberphase dauert je nach Spezies etwa ein bis zwei Wochen; während dieser Zeit ist der Mensch symptomfrei. Im Falle einer Infektion mit *P. ovale* oder *P. vivax* entstehen aus den Sporozoiten neben den Leberschizonten auch Ruhestadien, sogenannte Hypnozoiten, welche über Jahrzehnte persistieren und zu Malariarückfällen führen können.

Nach der Erythrozyteninvasion wachsen die Merozoiten zunächst zu Ringformen heran, welche über ein Trophozoitenstadium schließlich zu Schizonten reifen (erythrozytäre Schizogonie). Diese bilden jeweils 6 – 36 Merozoiten, welche nach dem Platzen des Erythrozyten in die freie Blutbahn gelangen und neue Erythrozyten befallen. So laufen mehrere dieser Schizogoniezyklen nacheinander ab, welche zwischen 48 (*P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*) und 72 Stunden (*P. malariae*) dauern. Während dieser Phase wird der Infizierte symptomatisch, die Fieberschübe sind wahrscheinlich mit dem Zerfall von Erythrozyten assoziiert. Da bei *P. malariae*, *P. ovale* und *P. vivax* die Zyklen synchronisiert ablaufen, treten die Fieberschübe in regelmäßigen Abständen auf („Wechselfieber“). Bei *P. falciparum* hingegen sind unregelmäßige oder kontinuierliche Fieberverläufe („*Continua*“) häufig .

Nach einigen Schizogoniezyklen entwickelt sich ein Teil der Plasmodien zu sexuellen Formen: weibliche Makrogamonten und männliche Mikrogamonten. Bei einem erneuten Stich einer Anophelesmücke gelangen diese in den Mitteldarm der Mücke, wo sich der Makrogamont zu einem reifen Makrogameten, der Mikrogamont zu bis zu acht begeißelten Mikrogameten differenziert. Nach Befruchtung des Makrogameten durch einen Mikrogameten entsteht der diploide Ookinet. Dies ist das Stadium der sexuellen Rekombination, welche demnach nur in der Mücke, nicht jedoch im Menschen stattfindet. Der Ookinet durchwandert das Magenepithel und setzt sich unter der Basalmembran fest, wo er sich zur Oozyste umwandelt. Aus dieser entstehen unter multiplen Kernteilungen mehrere tausend haploide Sporozoiten, welche über die Hämolymphe in die Speicheldrüsen der Mücke wandern. Von dort aus können sie bei einem erneuten Stich wieder auf einen menschlichen Wirt übertragen werden. [Kayser et al. (2005)]

Genom Das Genom von *P. falciparum* ist inzwischen vollständig sequenziert [Gardner et al. (2002)] und unter www.plasmodb.org [PlasmoDB] frei zugänglich. Es besteht aus 14 Chromosomen mit insgesamt etwa 23 Megabasen sowie zwei extrachromosomalen Elementen, dem mitochondrialen Genom mit etwa 5,9 Kilobasen und dem Genom des sogenannten Apicoplasten mit etwa 35 Kilobasen. Insgesamt werden um die 5300 Gene kodiert, wobei sich Gene, die an der antigenen Variation

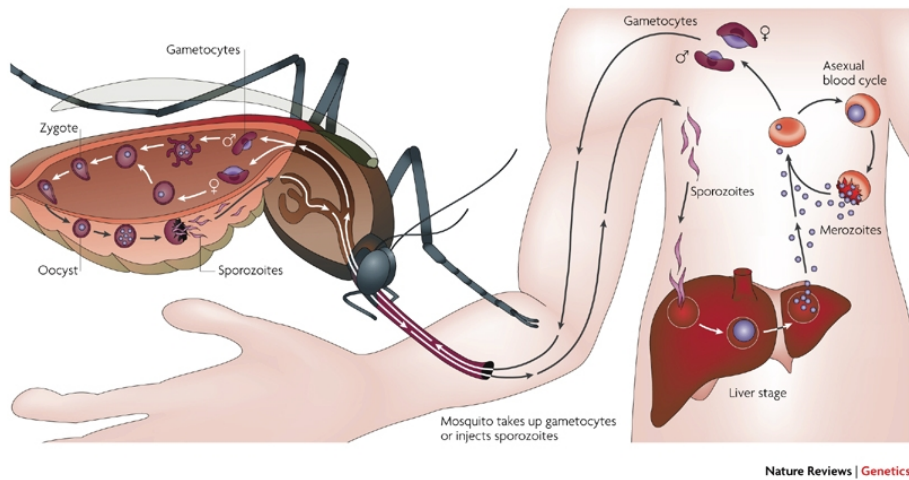


Abbildung 1.2: Lebenszyklus von *P. falciparum*.
Bildquelle: Su et al. (2007).

beteiligt sind, besonders in den subtelomeren Regionen befinden. Auffällig ist des Weiteren der extrem hohe A/T-Gehalt der Basenzusammensetzung.

1.1.4 Pathogenese und Klinik

Infektion mit *P. falciparum* Nach einer Inkubationszeit von ein bis zwei Wochen zeigen sich unspezifische Initialsymptome wie Kopf- und Gliederschmerzen, allgemeine Abgeschlagenheit sowie subfebrile Temperaturen. Im Rahmen der erythrozytären Schizogoniezuklen kommt es schließlich zu Fieberanfällen mit hohen Temperaturen, die meist asynchron verlaufen. Es finden sich normochrome Anämie und Thrombozytopenie, regelmäßig tritt eine Splenomegalie auf, teilweise auch eine Hepatomegalie. Bleibt es bei dieser Symptomatik, so spricht man von einer unkomplizierten *Malaria tropica*. Bei fehlender antiparasitärer Therapie entwickelt sich bei Nichtimmunen jedoch häufig eine komplizierte *Malaria tropica*. Nach den Kriterien der WHO ist dies der Fall, wenn sich eines oder mehrere folgender Symptome finden: zerebrale Malaria, schwere Anämie, akutes Nierenversagen, Lungenödem und ARDS, Elektrolyt- und Blutgasverschiebungen (v.a. metabolische Azidose), Dehydratation und Hypovolämie, Kreislaufschock, schwere gastrointestinale Störungen, Hypoglykämie, disseminierte intravasale Gerinnung, Hyperpyrexie, Hyperparasitämie, Hämoglobinurie („Schwarzwasserfieber“), schweres Erbrechen. Die Letalität ist hoch, bei unbehandelten Nichtimmunen beträgt sie bis zu 20%. [Knobloch (1996)]

Die Pathogenese der schweren *Malaria tropica* liegt vor allem im Phänomen der Zytoadhärenz von *P. falciparum* begründet. Der sich im Erythrozyten entwickelnde

Parasit ist in der Lage, Proteine auf die Oberfläche auszuschleusen, mit denen sich der infizierte Erythrozyt an die Endothelien v.a. postkapillärer Venulen in verschiedenen Geweben anheftet. Zudem kommt es zur Verklumpung infizierter mit nicht infizierten Erythrozyten („Rosetting“). Die Sequestrierung in peripheren Geweben hat für den Parasiten den Vorteil, dass ein Teil der Population der Milzpassage und so der dortigen Elimination entgeht. Für den Wirt hat dies eine Störung der lokalen Mikrozirkulation mit den daraus resultierenden oben genannten Organschäden zur Folge. Das wahrscheinlich wichtigste Adhärenzprotein ist das sogenannte *P. falciparum erythrozyte membrane proteine 1* PfEMP1, das von der hochvariablen Genfamilie der *var*-Gene kodiert wird. Es existieren insgesamt etwa 60 verschiedene *var*-Gene, von denen jedoch zu einem Zeitpunkt immer nur eines exprimiert wird. Da diese Gene zudem einer hohen Rekombinationsrate unterliegen, gelingt es dem Parasiten der menschlichen Immunantwort auszuweichen. [Hiepe et al. (2006)]

Infektion mit *P. malariae*, *P. ovale* oder *P. vivax* Infektionen mit anderen humanpathogenen Malariaerregern verlaufen meist gutartig, da diese Plasmodien-spezies weder zur Zytoadhärenz befähigt sind, noch solch hohe Parasitämien wie *P. falciparum* verursachen können. Nach einer Inkubationszeit von zwei bis vier Wochen beginnt die Erkrankung mit grippeähnlichen Symptomen, denen rhythmische Fieberanfälle folgen. Es entwickelt sich eine Splenomegalie, gelegentlich auch eine mäßig ausgeprägte Anämie. Todesfälle sind insgesamt selten, sie können durch eine spontane Milzruptur sowie im Rahmen eines nephrotischen Syndroms, das als Folge einer Immunkomplex-Glomerulonephritis nach wiederholten Infektionen mit *P. malariae* entstehen kann, auftreten. [Knobloch (1996)]

Immunität In endemischen Gebieten erkranken vor allem Kinder zwischen sechs Monaten und fünf Jahren an schwerer Malaria. Ältere Kinder verfügen bereits über eine Teilimmunität, während jüngere Kinder noch durch diaplazentare Antikörper der Mutter geschützt sind. Teilimmunität entwickelt sich nur, wenn das Immunsystem durch ständige Neuinfektionen dauerhaft stimuliert wird. Bleiben diese Neuinfektionen aus – z.B. bei saisonaler Übertragung –, so bildet sich die gewonnene Immunität wieder zurück. Diese Teilimmunität, auch „klinische Immunität“ genannt, schützt zudem lediglich vor einem schweren Krankheitsverlauf, nicht vor der Infektion als solcher. Während der ersten Schwangerschaft geht die Teilimmunität ebenfalls zurück, da die Parasiten massenhaft in der Plazenta adherieren. Sie benutzen dafür ein spezifisches PfEMP1-Protein, zu dem der Körper bis dato keinen Kontakt hatte

und demnach über keine Antikörper verfügt. Mit der Anzahl folgender Schwangerschaften geht die Gefahr der plazentaren Malaria zurück. [Hiepe et al. (2006)]

1.1.5 Diagnostik

Neben der klinischen Diagnose erfolgt der ätiologische Nachweis der Plasmodien in der Regel im Blutaussstrich. Am sensitivsten ist hier der sogenannte „dicke Tropfen“, bei dem ein dicker, unfixierter Blutstropfen gefärbt und mikroskopiert wird. Zur genauen Speziesbestimmung ist ein dünner Ausstrich notwendig. Mittlerweile stehen auch Schnelltests zur Verfügung, mit denen spezifische Antigene im Blut nachgewiesen werden können. Ein Serologischer Antikörperrnachweis hat bei der Primärdiagnostik nur untergeordnete Bedeutung, da bei Erstinfizierten die Serokonversion frühestens nach etwa einer Woche eintritt. [Kayser et al. (2005), Meyer (2007)]

1.1.6 Therapie

Die folgenden Therapieempfehlungen wurden von der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit erarbeitet [DTG Leitlinien]. Sie zielen demnach auf die Malariabehandlung in entwickelten Ländern, wo sowohl ein breites Medikamentenspektrum als auch die Möglichkeit intensivmedizinischer Betreuung zur Verfügung stehen.

Therapie der Malaria tertiana und quartana Behandelt wird in der Regel mit Chloroquin *per os*. Bei Malaria tertiana wird zudem über 14 Tage Primaquin zur Abtötung von Hypnozoiten gegeben. Zuvor sollte hier ein Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel ausgeschlossen werden, da bei diesen Patienten die Gefahr einer hämolytischen Anämie unter Primaquin-Behandlung besteht. Die Behandlung kann ambulant erfolgen.

Therapie der unkomplizierten Malaria tropica Patienten aus Gebieten ohne Chloroquin-Resistenz können ebenfalls mit Chloroquin *per os* behandelt werden; dies stellt jedoch die Ausnahme dar. Bei allen anderen Patienten erfolgt die Therapie *per os* mit Mefloquin, Atovaquon-Proguanil oder Artemether-Lumefantrin. Die Behandlung sollte stationär durchgeführt werden.

Therapie der komplizierten Malaria tropica Die Behandlung kann mit Chinin *i.v.* oder mit Artesunat *i.v.* erfolgen, wobei letzteres in Deutschland noch nicht

zugelassen ist. In jedem Fall sollte sie auf einer intensivmedizinischen Station stattfinden. Bei Besserung des Zustandes kann auf orale Therapie umgestiegen werden. Zusätzlich zur Chiningabe sollte über eine Woche Doxycyclin verabreicht werden, um Rekrudeszenzen vorzubeugen. In jedem Fall sollten supportive Maßnahmen zur Symptomkontrolle durchgeführt werden.

Bei der Behandlung von Kindern muss beachtet werden, dass Atovaquon-Proguanil erst ab 11 kg, Artemether-Lumefantrin erst ab 35 kg Körpergewicht zugelassen sind. Doxycyclin ist bei Kindern vor dem achten Lebensjahr kontraindiziert. Bei schwangeren Patientinnen muss bedacht werden, dass Kontraindikationen für Atovaquon-Proguanil, Artemether-Lumefantrin, Primaquin und Doxycyclin bestehen.

1.1.7 Bekämpfungsstrategien

Nachdem die 1955 von der WHO ins Leben gerufene Malaria-Eradikationskampagne vierzehn Jahre später für gescheitert erklärt worden war, wurde 1998 ein erneuter Versuch gestartet, die Malaria auf globaler Ebene zu bekämpfen: In Zusammenarbeit der WHO, des UNICEF-Kinderhilfswerkes, der Weltbank und des Entwicklungsprogrammes der Vereinten Nationen entstand die *Roll Back Malaria Partnership*. Ziel ist die Senkung der Malaria-assoziierten Mortalität bis 2010 um 50%, bis 2015 um 75% [Nabarro und Tayler (1998)]. Ein Hauptansatzpunkt sind präventive Maßnahmen. Hier sind die Vektorkontrolle, vor allem durch gezielten Einsatz von Insektiziden innerhalb der Wohnhäuser, sowie persönliche Schutzmaßnahmen wie Insektizid-imprägnierte Bettnetze zu nennen [Harris (1993), Kleinschmidt et al. (2009), Noor et al. (2009)]. Auch wurden Studien zum *intermittent preventive treatment* durchgeführt. Diese Strategie zielt auf den Schutz der besonders gefährdeten Bevölkerungsgruppen – Kleinkinder und Schwangere. Indem sie in regelmäßigen Abständen ein Antimalariamedikament (in der Regel Sulfadoxin-Pyrimethamin) erhalten, sollen sie vor schweren Malariaepisoden geschützt werden [Rogerson et al. (2000), Schellenberg et al. (2001)]. Ein weiterer Ansatz ist die effektive Chemotherapie im Erkrankungsfall. Gut wirksame Medikamente sollen insbesondere den ärmeren Bevölkerungsschichten schnell, günstig und in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Die WHO drängt hier auf den Einsatz von Artemisinin-basierten Kombinationstherapien (*ACTs*). Auch wird die Entwicklung neuer Antimalariamedikamente gefördert. Zu diesem Zwecke wurde die *Medicines for Malaria Venture* gegründet, eine Kooperation aus staatlichen Einrichtungen, Stiftungen und der Phar-

maindustrie. Weitere Bemühungen bestehen in der Entwicklung eines Impfstoffes. [RBM]

1.2 Chloroquin

1.2.1 Historische Aspekte

Nachdem 1908 die chemische Struktur von Chinin aufgeklärt worden war, wurde intensiv versucht, weitere effektivere antiplasmodiale Substanzen zu finden. Dies führte in den 20er Jahren zur Entwicklung von Pamaquin. 1934 entdeckte der Deutsche Hans Andersag Chloroquin, das zunächst unter dem Namen Resochin[®] produziert wurde. Während des Zweiten Weltkrieges wurde von der deutschen Wehrmacht jedoch das strukturell verwandte Sontochin eingesetzt [O'Neill et al. (1998)]. Erst gegen Kriegsende wurde von den Amerikanern der Wert von Chloroquin entdeckt, welches von da an in großem Stil zum Einsatz kam. Die 1955 gestartete Malaria-Eradikationskampagne der WHO setzte unter anderem auf die Wirksamkeit von Chloroquin. Auch nachdem diese Kampagne 1969 aufgegeben worden war, wurde Chloroquin in großem Maßstab weiter verwendet: nach Schätzungen der WHO wurden teilweise allein in Afrika mehr als 190 Tonnen Chloroquin pro Jahr verwendet [Wellems und Plowe (2001)]. Erste Resistenzen in *P. falciparum* wurden 1960/61 in Kolumbien/Venezuela sowie an der Grenze zwischen Thailand und Kambodscha bekannt, unbestätigte Meldungen weisen sogar bis auf das Jahr 1957 zurück. Im Laufe des nächsten Jahrzehntes breiteten sie sich innerhalb von Südostasien und Südamerika aus. 1977 wurden die ersten resistenten Stämme aus Tansania und Kenia gemeldet. Weitere zehn Jahre später fanden sich Resistenzen auf dem gesamten afrikanischen Kontinent [Payne (1987)] (siehe auch Abbildung 1.3).

Resistente *P. vivax*-Stämme traten erst 1989 in Papua-Neuguinea auf [Wellems und Plowe (2001)]. Trotz der quasi weltweit gravierenden Resistenzlage wird Chloroquin vielerorts weiterhin verwendet. Dies lässt sich unter anderem damit begründen, dass semiimmune Personen in einem Teil der Fälle dazu in der Lage sind, auch resistente Parasiten abzutöten [Wellems und Plowe (2001)]. Dennoch ist Chloroquin zur Therapie von *P. falciparum*-Malaria – mit Ausnahme von Mittelamerika – momentan kein adäquates Medikament [DTG Leitlinien].

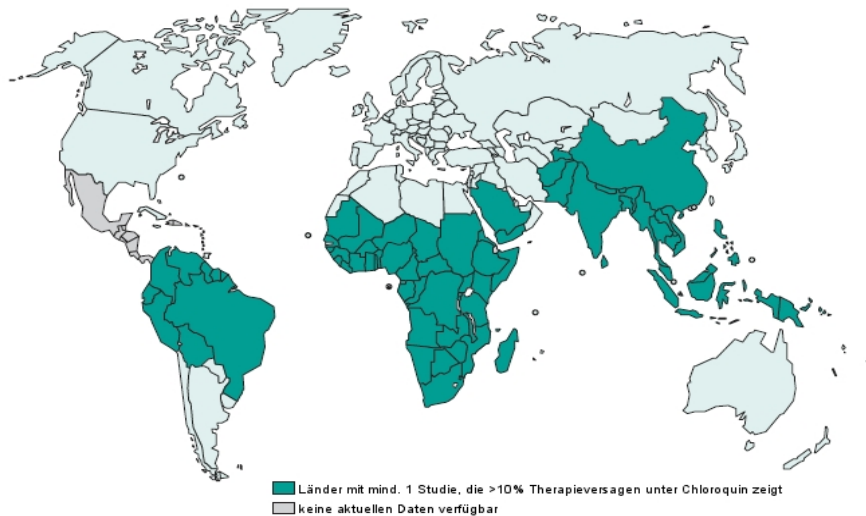


Abbildung 1.3: Chloroquin-Resistenzlage weltweit.
 Bildquelle: adaptiert nach WHO (2006).

1.2.2 Pharmakologie

Chloroquin gehört zu den 4-Aminoquinolinen und ist strukturell dem Chinin verwandt. Der exakte Name lautet 7-Chlor-4-(4-diethylamino-1-methylbutylamino)-chinolin (siehe Abbildung 1.4).

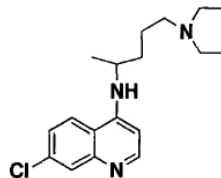


Abbildung 1.4: Strukturformel von Chloroquin.
 Bildquelle: O'Neill et al. (1998).

Chemisch gesehen stellt es eine diprotonische schwache Base dar, weshalb es in sauren Kompartimenten akkumuliert [O'Neill et al. (1998)]. Im Falle von *Plasmodium* konnte gezeigt werden, dass es sich insbesondere in der Nahrungsvakuole (pH 5,0) der Parasiten anreichert [Aikawa (1972)] – ein Prozess, der als essentiell für die antiplasmodiale Wirkung von Chloroquin angesehen wird. Chloroquin wirkt schizontozid auf die Blutformen aller bekannten Plasmodienspezies bei nur geringer Toxizität für den Wirt [O'Neill et al. (1998)]. Es kann sowohl zur Prophylaxe als auch zur Therapie eingesetzt werden [Meyer (2007)]. Der antiplasmodiale Wirkmechanismus von Chloroquin und anderen Quinolinen wie Chinin und Mefloquin liegt in der Interaktion mit dem Häm-Stoffwechsel des Parasiten [Sullivan et al. (1996)].

Während der erythrozytären Phase des Lebenszyklus ernähren sich Plasmodien vor allem von Aminosäuren, die sie durch proteolytischen Abbau von Hämoglobin gewinnen. Das dabei frei werdende Häm ist in gelöster Form toxisch, weshalb es in der Nahrungsvakuole des Parasiten zu unlöslichem Hämozoin (sogenanntes Malaria-pigment) polymerisiert wird [Goldberg und Slater (1992)]. Auf Grund des Fehlens von Hämoxygenase können Plasmodien – im Gegensatz zum Menschen – Häm nicht durch Sprengung des Porphyrinringes weiter abbauen [Slater et al. (1991)]. Chloroquin inhibiert die plasmodiale Detoxifikation von Häm, indem es mit einem Häm-Molekül einen Komplex bildet und sich so an das wachsende Häm-Polymer anlagert, was zum Kettenabbruch führt (siehe Abbildung 1.5). Dies resultiert in der Vergiftung des Parasiten durch freies Häm [Sullivan et al. (1996)].

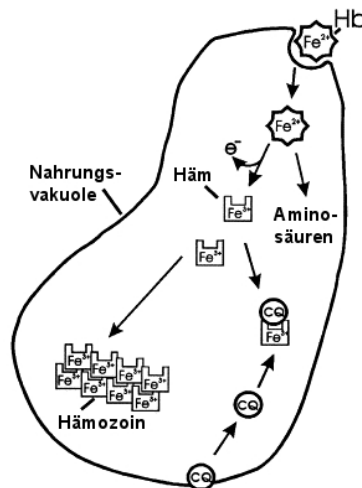


Abbildung 1.5: Wirkmechanismus von Chloroquin.

Bildquelle: adaptiert nach Foley und Tilley (1998). (Abkürzungen: Hb = Hämoglobin, Fe = Eisen, e^- = Elektron, CQ = Chloroquin)

1.2.3 Chloroquin-Resistenz

1.2.3.1 Definition

Chloroquin-Resistenz kann als *in vivo*- oder *in vitro*-Resistenz definiert werden. Bei ersterem wird bewertet, ob ein Patient nach Therapie frei von asexuellen Plasmodienformen ist. Wie bereits erwähnt, können allerdings im Falle von Semiimmunität auch resistente Parasiten unter Anwesenheit von Chloroquin so weit eliminiert werden, dass zumindest die klinischen Symptome abklingen [Wellems und Plowe (2001)].

Eine exaktere Definition ermöglicht die *in vitro*-Testung. Ein *P. falciparum*-Stamm gilt als resistent, wenn er zum einen eine Chloroquin-Konzentration von

100 nM in Kultur überlebt, zum anderen die Resistenz durch Zugabe von 1 μ M Verapamil wieder aufgehoben wird [Martin et al. (1987), Wellems und Plowe (2001)]. Diese Eigenschaft korreliert streng mit dem Vorhandensein der K76T-Mutation im *pfcr*-Gen [Fidock et al. (2000)].

1.2.3.2 Genetische Ursache

Auf der Suche nach dem Genotyp zum Phänotyp wurde ein Kreuz zwischen dem resistenten Stamm *Dd2* und dem sensitiven Stamm *HB3* durchgeführt [Wellems et al. (1990)]. Die Analyse der Nachkommen konnte den Resistenzloкус auf ein 400 kb großes Stück auf Chromosom 7 festlegen [Wellems et al. (1991)]. Eine genauere Darstellung dieses Stückes mittels einer Karte von Mikrosatellitenmarkern engte den entscheidenden Bereich auf etwa 36 kb ein [Su et al. (1997)], in dem schließlich ein einzelnes Gen identifiziert werden konnte, das perfekt mit dem resistenten Phänotyp korrelierte: das Gen kodierend für den demnach benannten *P. falciparum chloroquine resistance transporter* (*pfcr*) [Fidock et al. (2000)]. *pfcr* stellt ein Protein von 424 Aminosäuren und etwa 48,6 kDa dar, in dem weltweit bis zu 15 Aminosäure-Polymorphismen gefunden wurden, die mit dem resistenten Phänotyp assoziiert sind [Cooper et al. (2005)]. Während sensitive Stämme in der Regel keine dieser Punktmutationen aufweisen, zeigen resistente Stämme stets eine bestimmte Auswahl dieser Mutationen, welche spezifisch für die Region bzw. der Zuordnung zu einer der „Gründermutationen“ (siehe Abschnitt 1.2.3.4) ist. In südostasiatisch-afrikanischen Stämmen sind es vorwiegend folgende acht: M74I, N75E, K76T, A220S, Q271E, N326S, I356T und R371I. Die Mutation K76T ist in weltweit allen resistenten Feldisolaten zu finden, weshalb sie als ausschlaggebend für den resistenten Phänotyp angesehen wird [Fidock et al. (2000), Wootton et al. (2002)]. Das gemeinsame Auftreten mit weiteren Mutationen könnte nötig sein, um die ursprüngliche Funktion des Proteins zu erhalten [Fidock et al. (2000)]. Die Bedeutung des *pfcr*-Gens für die Chloroquin-Resistenz wurde von Sidhu et al. (2002) mittels eines Transfektionsexperiments, in dem ursprünglich sensitive Stämme durch Einbau des mutanten *pfcr*-Allels zum resistenten Phänotyp wechselten, eindrucksvoll unterstrichen.

Mit Chloroquin-Resistenz in Verbindung gebracht wurden ebenfalls Punktmutationen im *P. falciparum multidrug*-Gen *pfmdr1* auf Chromosom 5 [Foote et al. (1990)]. Mittlerweile wird jedoch davon ausgegangen, dass diese höchstens den Ausprägungsgrad der Resistenz modulieren [Reed et al. (2000), Djimdé et al. (2001)].

1.2.3.3 Rolle des Chloroquin-Resistenz-Transporters

Der *P. falciparum chloroquine resistance transporter* ist ein Transmembranprotein, das in der Membran der Nahrungsvakuole des Parasiten lokalisiert wurde und sich demnach direkt am Wirkort von Chloroquin befindet [Fidock et al. (2000)]. Es besitzt 10 Transmembrandomänen, wobei die entscheidende Position 76 in der ersten Transmembrandomäne auf luminaler Seite zu liegen kommt [Martin und Kirk (2004)]. Während sich bei sensitiven Parasiten an Position 76 die positiv geladene Aminosäure Lysin befindet, wird diese in resistenten Feldisolaten durch die ungeladene Aminosäure Threonin [Fidock et al. (2000)] ersetzt. Im Labor konnten zudem resistente Stämme mit Asparagin oder Isoleucin (ebenfalls ungeladen) an Position 76 erzeugt werden [Cooper et al. (2002)]. Als Grundlage der Chloroquin-Resistenz wird postuliert, dass resistente Stämme weniger Chloroquin in ihrer Nahrungsvakuole akkumulieren als der Wildtyp [Saliba et al. (1998)]. Über den hierzu führenden Mechanismus wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt, u.a. auf Grund eines erhöhten pH-Wertes in der Nahrungsvakuole [Yayon (1985)] oder durch energieabhängigen Efflux [Krogstad et al. (1992)]. Die *charged drug leak*-Hypothese geht davon aus, dass Chloroquin, welches in der sauren Nahrungsvakuole vor allem doppelt positiv geladen vorliegt, im Falle der sensitiven *pfcr*-Variante von der ebenfalls positiv geladenen Aminosäure Lysin abgestoßen und so am Efflux gehindert wird. In resistenten Parasiten hingegen ist Lysin an Position 76 durch eine ungeladene Aminosäure ersetzt, so dass Chloroquin dem Konzentrationsgradienten folgend die Nahrungsvakuole verlassen kann [Bray et al. (2005)]. Cooper et al. (2007) sehen Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen Chloroquin und *pfcr*.

Die natürliche Funktion des *pfcr* ist weitgehend unklar [Cooper et al. (2005)].

1.2.3.4 *Selective Sweeps*

Chloroquin-resistente *P. falciparum*-Stämme entstanden weltweit nur an wenigen einzelnen Orten [Wellems und Plowe (2001)]. Es wird heute von mindestens fünf „Gründermutationen“ ausgegangen: Kolumbien, Peru, Südostasien, Papua-Neuguinea und die Philippinen [Wootton et al. (2002), Chen et al. (2003)]. Von hier aus verbreitete sich das resistente *pfcr*-Allel weltweit, von Südostasien gelangte es auch nach Afrika (siehe Abbildung 1.6).

Der immense Selektionsvorteil des resistenten *pfcr*-Allels führte zu einer stark reduzierten Variabilität der chromosomalen Region um das *pfcr*-Gen in resistenten Parasiten; dieses Phänomen wird als *selective sweep* bezeichnet. Der konservierte



Abbildung 1.6: Ausbreitung der Chloroquinresistenz.

Bildquelle: Hayton und Su (2008). Gezeigt werden Entstehungsort und -jahr der *pfcr*t K76T-Gründermutationen sowie die Ausbreitungsrichtungen Chloroquin-resistenter Stämme.

Bereich ist spezifisch für die jeweilige Gründerregion und wird charakterisiert durch die Resistenz-assoziierten Mutationen des *pfcr*t-Gens sowie durch die Allele dortiger Mikrosatelliten. Wootton et al. (2002) konnten zeigen, dass ein Chromosomenstück von etwa 200 kb in den meisten resistenten Stämmen derselben Gründerregion identisch ist, wobei der Grad der Konservierung mit zunehmender Entfernung zum *pfcr*t-Gen abnimmt. Konkret bedeutet dies, dass der Großteil der resistenten Isolate in Afrika und Südostasien um das *pfcr*t-Gen herum die gleiche DNA-Sequenz besitzt. Dieses *linkage disequilibrium* (überzufällig häufige Assoziation von Allelen) in Nachbarschaft des *pfcr*t-Gens ist ein Charakteristikum resistenter Parasiten; sensitive Parasiten zeigen in diesem Chromosomenbereich eine ähnlich hohe Diversität wie in anderen unselektionierten Bereichen des Genoms.

1.2.3.5 Auswirkungen auf die Weltgesundheit

Verschiedene Studien haben versucht die Auswirkungen der sich ausbreitenden Chloroquinresistenz auf die Weltgesundheit zu quantifizieren. Die Zahlen schwanken zwischen einer zwei- bis elffachen Zunahme der Malaria-spezifischen Mortalität. Unberücksichtigt sind dabei indirekte Auswirkungen von häufigeren und schwereren Malariaepisoden, beispielsweise eine erhöhte Empfänglichkeit für andere Erkrankungen infolge Malaria-bedingter Anämie oder ein erniedrigtes Geburtsgewicht auf Grund einer Malariainfektion während der Schwangerschaft [Trape (2001), Björkman und Bhattarai (2005)].

1.2.3.6 Rückkehr von Chloroquin-Sensitivität

Mit steigender Rate an Therapieversagen unter Chloroquinbehandlung änderten nach und nach viele Länder ihre Therapieleitlinien und ersetzten Chloroquin als Mittel der ersten Wahl durch andere Medikamente [Laufer und Plowe (2004)]. In den folgenden Jahren meldeten verschiedene Studien einen Rückgang der Chloroquin-Resistenz *in vitro*, der mit dem gesunkenen Selektionsdruck in Zusammenhang gebracht wurde [Schwenke et al. (2001), Thanh et al. (2001)]. Folgestudien, die die Chloroquin-Resistenz *in vitro*, *in vivo* sowie die Frequenz des resistenten Genotyps K76T untersuchten, zeigten jedoch stets ein unverändert hohes Resistenzniveau [Borrmann et al. (2002), Nguyen et al. (2003)].

Ein Rückgang des genetischen Resistenzmarkers K76T konnte erstmals 2003 aus Malawi berichtet werden [Kublin et al. (2003), Mita et al. (2003)], das 1993 als erstes Land auf dem afrikanischen Kontinent den offiziellen Einsatz von Chloroquin gestoppt hatte [Bloland et al. (1993)]. Die Frequenz des resistenten Genotyps war von 85% im Jahr 1992 auf 0% im Jahr 2001 gesunken [Kublin et al. (2003)]. Laufer et al. (2006) veröffentlichten die erste klinische Studie nach dem Chloroquin-Stopp, die eine 100%ige Wirksamkeit von Chloroquin zur Behandlung von unkomplizierter Malaria tropica in Malawi zeigte. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass prinzipiell eine Rückkehr von Chloroquin-Sensitivität möglich ist, falls der durch Chloroquin-Einsatz ausgeübte Selektionsdruck drastisch reduziert wird. Dies legt einen Fitnessnachteil resistenter Parasiten unter Abwesenheit von Chloroquin nahe [Kublin et al. (2003)].

1.3 Situation in Lambaréné, Gabun

Lambaréné liegt im west-zentralafrikanischen Land Gabun in der Provinz Moyen-Ogooué. Die Stadt zählt um die 20 000 Einwohner und beheimatet das 1913 von Albert Schweitzer gegründete Spital. Das Klima ist warm und feucht mit zwei Regenzeiten, einer kleinen von September bis Oktober und einer großen von Februar bis Mai [FISL]. Malaria ist dort hyperendemisch mit stabiler Transmission, die prädominante Spezies ist *P. falciparum* [Wildling et al. (1995)].

Chloroquin-resistente *P. falciparum*-Stämme wurden erstmals 1983 in Gabun *in vitro* nachgewiesen [Burchard et al. (1984)]. Trotz der stetigen Ausbreitung der Chloroquinresistenz in folgenden Jahren, wurden erst 2003 die nationalen Therapierichtlinien von Chloroquin auf Artesunat plus Amodiaquin als Medikation der ersten

Wahl zur Behandlung der unkomplizierten *Malaria tropica* umgestellt. Zur Behandlung von schwerer *Malaria tropica* werden Quinin oder Artesunatderivate verwendet [Dondorp et al. (2005)], [WHO (2008a)]. In Lambaréné wurde Chloroquin bereits seit 1993 zunehmend aus der lokalen Therapiepraxis gestrichen, nachdem in mehreren Studien ein hohes Resistenzniveau nachgewiesen worden war [Kremsner et al. (1993), Kremsner et al. (1994), Winkler et al. (1994)]. Zwischen den Jahren 1995 und 2002 wurde mehrfach die Parasitenpopulation in Lambaréné auf die Resistenzmutation *pfcr*t 76T untersucht, wobei zu jedem Zeitpunkt eine Prävalenz des resistenten Allels von 100% festgestellt wurde [Binder et al. (2002), Borrmann et al. (2002), Mayengue et al. (2007)].

1.4 Fragestellung

Seit in Malawi nach jahrelangem Verzicht auf Chloroquin eine umfassende Rückkehr Chloroquin-sensitiver *P. falciparum*-Stämme beobachtet werden konnte, herrscht eine wissenschaftliche Kontroverse darüber, ob dieses Phänomen weltweit replizierbar sei. Die Klärung dieser Frage ist von zentraler Bedeutung für die potentielle therapeutische Verwendung von Chloroquin in der Zukunft. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob in Lambaréné, Gabun, wo Chloroquin im Jahre 2003 aus den nationalen Therapieleitlinien entfernt wurde, wieder Chloroquin-sensitive Stämme unter der aktuellen lokalen Parasitenpopulation zu finden sind. Lambaréné stellt hierfür einen besonders interessanten Studienort dar, da zum einen die zuletzt gemessene Resistenzlage ausgesprochen hoch (100%) war, zum anderen aufgrund der kontinuierlichen Arbeit am Albert-Schweitzer-Krankenhaus eine relativ konsequente Umsetzung der Therapierichtlinien angenommen werden kann.

Des Weiteren ist der genetische Mechanismus der Rückkehr sensitiver Stämme bislang völlig unbekannt. Dieser Fragestellung soll durch Aufklärung des genetischen Hintergrundes neuauftretener sensitiver Stämme nachgegangen werden. Hierzu soll die chromosomale Nachbarschaft des *pfcr*t-Gens in den sensitiven Isolaten sowie in einer lokalen resistenten Vergleichspopulation mittels Sequenzierung von Mikrosatellitenmarkern näher charakterisiert werden.

Schließlich soll die Untersuchung resistenter Isolate aus den Jahren 1995/96, 2002 und 2005 – 07 eine mögliche Veränderung in der lokalen resistenten Population in Zusammenhang mit der Änderung der nationalen Therapierichtlinien beleuchten.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Patientengut

Die verwendeten Patientenproben stammen alle aus Studien, die in den Jahren 1995 – 2007 von der Medical Research Unit am Albert-Schweitzer-Hospital in Lambaréné, Gabun durchgeführt wurden. Es handelt sich um mit *P. falciparum* infizierte Patienten, die in und um Lambaréné (Umkreis ca. 60 km) wohnen. Für alle Studien liegt ein positives Votum der Ethik-Kommission der Internationalen Stiftung des Albert-Schweitzer-Hospitals vor; von den Studienteilnehmern wurde ein informiertes Einverständnis eingeholt, im Falle von minderjährigen Patienten geschah dies durch die gesetzlichen Betreuer. Die genauen Patientendaten finden sich im Anhang in den Tabellen A.1–A.6.

1/95C-Fall-Kontroll-Studie Diese Studie wurde in den Jahren 1995/96 am Albert-Schweitzer-Hospital in Lambaréné unter Leitung von Peter G. Kremsner durchgeführt [Kun et al. (1998)]. Eingeschlossen wurden Kinder älter als 6 Monate mit unkomplizierter oder schwerer Malaria. Für diese Arbeit wurden 48 Proben aus dem Zeitraum April 1995 bis November 1996 verwendet (siehe Tabelle A.1).

Fall-Kontroll-Studie 2002 Diese Studie wurde 2002 am Albert-Schweitzer-Hospital in Lambaréné unter Leitung von Francine Ntoumi durchgeführt [Mayengue et al. (2007)]. Eingeschlossen wurden Kinder älter als 6 Monate mit unkomplizierter oder schwerer Malaria. Für diese Arbeit wurden 48 Proben aus dem Zeitraum November bis Dezember 2002 verwendet (siehe Tabelle A.2).

Ferroquin-Toleranz-Studie Diese Studie wurde in den Jahren 2005/06 in Lambaréné und Fougamou unter Leitung von Bertrand Lell durchgeführt. Eingeschlossen wurden männliche Erwachsene mit asymptomatischen *P. falciparum*-Infektionen. Während des gesamten Beobachtungszeitraumes wurde regelmäßig Blut entnommen. Für diese Arbeit wurde von allen 82 Patienten die erste Probe verwendet; diese stammten aus der Zeit April 2005 bis September 2006 (siehe Tabelle A.3).

Antigen-Diversitäts-Studie Hier wurden Proben aus der eigentlichen Antigen-Diversitäts-Studie [Dal-Bianco et al. (2007)] sowie der Asymptomatischen Studie zusammengefasst. Beide Studien wurden zwischen 2005 und 2007 in Lambaréné und Umgebung unter Leitung von Christian Supan durchgeführt. Eingeschlossen wurden männliche Erwachsene mit asymptomatischen *P. falciparum*-Infektionen. Während des gesamten Beobachtungszeitraumes wurde regelmäßig Blut entnommen. Für diese Arbeit wurden 19 Proben aus dem Zeitraum Juli 2006 bis März 2007 verwendet; Proben des gleichen Patienten mit einem Abstand von mindestens 21 Tagen wurden als unterschiedliche Infektionen gewertet (siehe Tabelle A.4).

***Intermittent Preventive Treatment in Infants (IPTi)*-Studie** Diese Studie wurde zwischen 2002 und 2007 am Albert-Schweitzer-Hospital in Lambaréné unter Leitung von Martin Grobusch durchgeführt [Grobusch et al. (2007)]. Eingeschlossen wurden gesunde Kinder, die zum Studienbeginn nicht älter als 3 Monate waren; die Beobachtungsphase erstreckte sich bis zum Ende des 30. Lebensmonats. Bei jeder Krankenhausaufnahme auf Grund einer symptomatischen Malariaepisode wurde Blut entnommen. Für diese Arbeit wurden 26 Proben aus dem Zeitraum Januar 2006 bis März 2007 verwendet; Proben aus unterschiedlichen Krankenhausaufnahmen (Abstand mindestens 21 Tage) des gleichen Patienten wurden als unterschiedliche Infektionen gewertet (siehe Tabelle A.5).

Sulfadoxin-Pyrimethamin (SP)-Wirksamkeitsstudie Diese Studie wurde im Jahre 2007 am Albert-Schweitzer-Hospital in Lambaréné unter Leitung von Sadou Issifou durchgeführt. Eingeschlossen wurden Kinder zwischen 6 und 59 Monaten mit unkomplizierter Malaria. Bei Studienbeginn, im Falle einer erneuten fieberhaften Symptomatik und bei Studienende wurde Blut entnommen. Für diese Arbeit wurden 38 Proben aus dem Zeitraum März bis Juli 2007 verwendet; Proben des gleichen Patienten mit einem Abstand von mindestens 21 Tagen wurden als unterschiedliche Infektionen gewertet (siehe Tabelle A.6).

2.2 DNA-Extraktion

Die verwendete DNA lag entweder als Vollblutprobe oder getrocknete Blutprobe auf Filterpapier vor. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAamp[®] DNA Mini Kit bzw. Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, BRD) nach Herstellerprotokoll. Die Konzentration der extrahierten DNA wurde photometrisch mit dem ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) bestimmt. Anschließend wurde die extrahierte DNA bei -20°C konserviert.

2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) [Mullis et al. (1986), Saiki et al. (1988)], eine technisierte *in vitro* Amplifikation kurzer DNA-Sequenzen, war die grundlegende Methode dieser Arbeit. Sie wurde zum Nachweis bestimmter Allele (*merozoite surface protein 2 (msp2)*) sowie als Ausgangsbasis für Restriktionsverdau (*msp2*, *pfcr1*) und Sequenzierung (*msp2*, *pfcr1*, Mikrosatelliten) eingesetzt. In den meisten Fällen wurde ein *nested*-Verfahren angewandt, bei dem zunächst ein etwas größeres Fragment als die Zielsequenz amplifiziert wird, welches dann als Ausgangsmaterial für die eigentliche PCR verwendet wird. Durch diese zweischrittige PCR kann sowohl Effizienz als auch Spezifität verbessert werden.

Soweit nicht anders angegeben wurden für den PCR-Reaktionsansatz 0,2 mM dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 μM *forward* und 0,5 μM *reverse* Primer, 1,5 U Taq-Polymerase und 5 μl DNA in einem Gesamtvolumen von 50 μl verwendet. Im Falle einer *nested*-PCR wurde im 2. Amplifikationsschritt anstelle von DNA 5 μl des PCR-Produktes des 1. Amplifikationsschritts eingesetzt. Die PCR-Reagenzien wurden von QIAGEN, die Primer von Operon (Köln, BRD) bezogen. Sämtliche PCR-Reaktionen liefen in den Geräten Biometra Uno II Thermal Cycler (Biometra, Göttingen, BRD) oder MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, München, BRD), Sequenzierungs-PCRs wurden zudem im MJ Research PTC-200 (GMI, Ramsey, USA) durchgeführt.

Nach der PCR-Reaktion wurden die amplifizierten Fragmente mit dem interkalierenden Farbstoff SYBR Green angefärbt und elektrophoretisch auf 1,5%igen Agarosegelen aufgetrennt. Letztere wurden durch Lösung von 1,5 g Agarose (Lonzy, Rockland, USA) in 100 ml TBE-Puffer (89,2 mM TRIS, 90 mM Borsäure und 2,6 mM EDTA in 1 l Aqua_{dest.}) hergestellt. Als Färbemischung wurden für 5 μl PCR-Produkt 1 μl SYBR Green (Biozym, Hess. Oldendorf, BRD) und 2,5 μl Ladepuffer (40% Glycerol, 0,1% Farbstoff, 10 mM EDTA) verwendet.

2.4 Sequenzierung

Zur Sequenzierung verwendeten wir die Kettenabbruchmethode nach Sanger [Sanger et al. (1977)]. Hierbei kommt eine spezielle Sequenzierungs-PCR zum Einsatz, welche im Ansatz nur jeweils einen Primer (*forward* oder *reverse*), sowie zusätzlich zu dNTPs auch fluoreszenzmarkierte ddNTPs enthält. Der Einbau eines ddNTPs in die Sequenz führt zum Kettenabbruch – es entstehen gleichsinnige Fragmente, die nach unterschiedlichen Längen auf ein fluoreszenzmarkiertes ddNTP enden. Nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung und Anregung durch Laser wird ein Sequenzchromatogramm erzeugt.

Im Folgenden wird der allgemeine Ablauf des Verfahrens beschrieben:

1. PCR: Amplifikation der betreffenden Sequenz mittels PCR.
2. Gelelektrophorese: Anfärbung der erhaltenen Fragmente mit SYBR Green und gelelektrophoretische Auftrennung. Ausschneiden der spezifischen Banden.
3. Gelextraktion: Extraktion der DNA aus den ausgeschnittenen Gelstücken mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Machery-Nagel, Düren, BRD) nach Herstellerprotokoll. Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung mit dem ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer.
4. Sequenzierungs-PCR: für den Reaktionsansatz wurden $0,5 \mu\text{l}$ Primer (*forward* oder *reverse*), $1 \mu\text{l}$ BigDye[®] Terminator (enthält Taq-Polymerase, dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs), $2 \mu\text{l}$ BigDye[®] Buffer (beides Applied Biosystems, Warrington, UK) und eine von der Sequenzlänge abhängige Menge DNA in einem Gesamtvolumen von $10 \mu\text{l}$ verwendet. Für jede Sequenz wurde die Reaktion einmal in Vorwärts- (*forward primer*), einmal in Rückwärts-Richtung (*reverse primer*) durchgeführt. Die Reaktion lief in 25 Zyklen ab, jeweils bestehend aus 10 sek Denaturierung bei 94°C , 5 sek Annealing bei 50°C und 4 min Extension bei 60°C . Für die Sequenzierungs-PCR wurden die Geräte Biometra Uno II Thermal Cycler (Biometra), MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad) sowie MJ Research PTC-200 (GMI) verwendet.
5. Aufreinigung: 2 g Sephadex G50 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) wurden in 30 ml LiChroSolv[®]-H₂O (Merck, Darmstadt, BRD) 30 min bei Raumtemperatur zum Quellen gebracht. Anschließend wurde die Suspension auf eine 96well-Säulenplatte aufgetragen, pro Säule wurden $300 \mu\text{l}$ verwendet; die Platte

wurde daraufhin 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert, das abzentrifugierte Wasser verworfen. Die erhaltenen Sephadex-Säulen wurden mit der Sequenzierungs-PCR-Reaktion beladen und erneut 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert; die aufgefangene Reaktion wurde der eigentlichen Sequenzierung zugeführt.

6. Sequenzierung: Erstellung des spezifischen Sequenzchromatogramms durch den *Abi Prism 3000 Gene Analyzer* (Applied Biosystems).
7. Sequenzanalyse: Die erhaltenen Sequenzdateien wurden mit Hilfe der *BioEdit-Software*, Version 7.0.9 (Ibis Biosciences, Carlsbad, USA) dargestellt, per Hand aligniert und analysiert.

2.5 Bestimmung der Chloroquin-Resistenz

2.5.1 Molekulargenetischer Nachweis der Resistenzmutation K76T im *pfcr*-Gen

Die Chloroquin-Resistenz der Parasitenstämme wurde molekulargenetisch durch Nachweis der für die Resistenz verantwortlichen Mutation K76T im *P.falciparum chloroquine resistance transporter (pfcr)*-Gen bestimmt. Hierzu wurde ein Kombinationsverfahren aus PCR-Amplifikation des *pfcr*-Lokus und anschließendem allelspezifischen Restriktionsverdau nach Djimdé et al. (2001) gewählt. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde die Resistenzmutation in einigen Proben zusätzlich durch Sequenzierung der erhaltenen PCR-Fragmente nachgewiesen. Hierdurch konnten zudem die Resistenz-assoziierten Mutationen M74I und N75E bestimmt werden, welche sich ebenfalls im sequenzierten Fragment befanden. Als Referenzen wurden die Laborstämme *3D7* (sensitiv) und *Dd2* (resistent) verwendet.

Zunächst wurde in einer *nested*-PCR ein 145 bp langes Fragment um Position 76 amplifiziert. Primer (siehe Tabelle 2.1) und Reaktionsbedingungen wurden übernommen von Djimdé et al. (2001).

Primer	Sequenz	Primer	Sequenz
F1	CCGTTAATAATAAATACACGCAG	R1	CGGATGTTACAAAACATATAGTTACC
F2	TGTGCTCATGTGTTAAACTT	R2	CAAAACTATAGTTACCAATTTTG

Tabelle 2.1: Primer *pfcr*-K76T-PCR.

Angabe der Primersequenzen in 5'-3'-Richtung. F1 und R1 bezeichnen *forward* bzw. *reverse* Primer des 1., F2 und R2 die entsprechenden Primer des 2. Amplifikationsschrittes.

Die Reaktionsbedingungen für den 1. Amplifikationsschritt bestanden aus 3 min initialer Denaturierung bei 94°C; 45 Zyklen mit je 30 sek Denaturierung bei 94°C, 30 sek Annealing bei 56°C und 1 min Extension bei 60°C; 3 min finale Extension bei 60°C. Der 2. Schritt lief unter 5 min initialer Denaturierung bei 95°C; 30 Zyklen mit je 30 sek Denaturierung bei 92°C, 30 sek Annealing bei 48°C und 30 sek Extension bei 65°C; 3 min finale Extension bei 65°C.

Das amplifizierte Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease *ApoI* (Fermentas, St. Leon-Rot, BRD) nach Herstellerprotokoll verdaut. Das 145 bp lange Fragment wurde im Falle des Wildtypallels 76K in zwei Fragmente von 111 bp und 34 bp Länge geschnitten, das mutante Allel 76T blieb ungeschnitten. Der Verdau wurde mit SYBR Green angefärbt und auf 2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, so dass sensitive von resistenten Allelen differenziert werden konnten.

Die unverdauten Fragmente der sensitiven sowie eines Teils der resistenten Stämme wurden sequenziert (Verfahren wie beschrieben unter 2.4).

2.5.2 Molekulargenetische Bestimmung Resistenz-assoziiierter Mutationen im *pfcr*-Gen

Die Bestimmung der Resistenz-assoziierten Mutationen im *pfcr*-Gen A220S, Q271E, N326S, I356T und R371I erfolgte mittels eines dem K76T-Nachweis (Abschnitt 2.5.1) analogen Verfahrens. Primer (siehe Tabelle 2.2) und Reaktionsbedingungen wurden übernommen von Djimdé et al. (2001). Als Referenzstämme dienten wie zuvor *3D7* (sensitiv) und *Dd2* (resistent, *pfcr*-Allel Typ Südostasien/Afrika). Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde ein Teil der Proben zusätzlich sequenziert.

In einer *nested*-PCR wurden Fragmente um die jeweiligen Positionen amplifiziert. Der erste Amplifikationsschritt war hierbei für die Mutationen 220, 271 sowie für 326, 356, 371 identisch; im zweiten Schritt wurden spezifische Primer verwendet (siehe Tabelle 2.2).

Die Reaktionsbedingungen des 1. Amplifikationsschrittes waren für beide PCRs identisch: 5 min initiale Denaturierung bei 95°C; 45 Zyklen mit je 30 sek Denaturierung bei 92°C, 1 min Annealing bei 46°C und 1,5 min Extension bei 65°C; 15 min finale Extension bei 65°C. Der 2. Amplifikationsschritt bestand für A220S, Q271E, N326S und I356T aus 5 min initialer Denaturierung bei 95°C; 20 Zyklen mit je 30 sek Denaturierung bei 92°C, 30 sek Annealing bei 46°C und 45 sek Extension bei 65°C; 5 min finale Extension bei 65°C. Für R371I wurde die Annealingtemperatur auf 48°C erhöht, die Extensionszeit pro Zyklus auf 30 sek verkürzt bei ansonsten

Primer	Sequenz
2xx F1	CCCAAGAATAAACATGCGAAAC
2xx R1	ACAATTATCTCGGAGCAGTT
3xx F1	CCTTGGCATTGTTTCCT
3xx R1	CCAAAGTTACGAAATCTAATAATCTTGG
220 F2	TATTTATTTATTTATATATTTTGTTCCTGCCATTAAGG
220 R2	ACAATTATCTCGGAGCAGTT
271 F2	GGCACATTCATTTATTTATTTTCTTTCCTAATTAATGAATACGTT
271 R2	GGCTATGGTATCCTTTTTCC
326 F2	CCTTTTTATTCTTACATAGCTGGTTATTGAATTATCAC
326 R2	TGGCATTGTTTCCTTCT
356 F2	ATATATATGGCTAAGAATTTAAAGTAATAAGCAGTTGCT
356 R2	AATTATCGACAAAATTTCTACC
371 F2	TATTTATTTTACTTTTTAATTTTATAGGGTGATGTCCTAA
371 R2	AAGTTACGAAATCTAATAATCTTGGTTC

Tabelle 2.2: Primer *pfert*-PCR Resistenz-assoziierte Mutationen. Angabe der Primersequenzen in 5'-3'-Richtung. F1 und R1 bezeichnen *forward* bzw. *reverse* Primer des 1., F2 und R2 die entsprechenden Primer des 2. Amplifikationsschrittes.

gleichen Bedingungen.

Die amplifizierten Fragmente wurden mit Restriktionsendonukleasen (Fermentas), welche spezifisch jeweils ein Allel schnitten, nach Herstellerprotokoll verdaut. Folgende Enzyme wurden verwendet:

A220S: Verdau mit *BglI*. Das 145 bp lange Fragment wurde im Falle der Wildtypvariante in zwei Fragmente von 105 bp und 40 bp Länge geschnitten.

Q271E: Verdau mit *XmnI*. Das 111 bp lange Fragment wurde im Falle der mutanten Variante in zwei Fragmente von 61 bp und 50 bp Länge geschnitten.

N326S: Verdau mit *MseI*. Das 68 bp lange Fragment wurde im Falle der Wildtypvariante in zwei Fragmente von 44 bp und 24 bp Länge geschnitten.

I356T: Verdau mit *AlwNI*. Das 100 bp lange Fragment wurde im Falle der mutanten Variante in zwei Fragmente von 60 bp und 40 bp Länge geschnitten.

R371I: Verdau mit *AflII*. Das 80 bp lange Fragment wurde im Falle der Wildtypvariante in zwei Fragmente von je 40 bp Länge geschnitten.

Der Verdau wurde mit SYBR Green angefärbt und auf 2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, so dass Wildtyp- von mutanten Allelen differenziert werden konnten.

Die unverdauten Fragmente der sensitiven sowie einiger ausgewählter resistenter Stämme wurden sequenziert (Verfahren wie beschrieben unter 2.4).

2.5.3 Chloroquin-Resistenz-*in vitro*-Bestimmung

Um die Korrelation zwischen genotypischer und phänotypischer Chloroquin-Resistenz zu zeigen wurde zusätzlich eine Chloroquin-Resistenz-*in vitro*-Bestimmung durchgeführt. Getestet wurden die Laborstämme *Dd2* (*pfcr* 76T) und *NF54* (76K) sowie der Feldstamm aus der Antigen-Diversitäts-Studie *MOA* (76T). Hierzu wurden die Stämme über einen gewissen Zeitraum kultiviert (siehe Abschnitt 2.8) und nach einer Phase beständigen Wachstums mikroskopisch die Parasitämie bestimmt. Jede Kultur wurde nun in zwei Kulturen mit einer Parasitämie von jeweils 0,5% gesplittet. Eine Kultur erhielt Standardmedium, die Zwillingskultur Medium mit einem Chloroquin-Anteil von 100 μ M (Chloroquindiphosphatsalz, Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD); die Kulturen wurden bei 37°C und 5% CO₂- bei niedrigem O₂-Anteil der Luft gehalten. An den Tagen 1, 2 und 3 wurde mikroskopisch die Parasitämie bestimmt. Hierzu wurden so viele Gesichtsfelder ausgezählt, bis mindestens 500 Erythrozyten gezählt wurden. Waren alle gezählten Zellen nicht infiziert, so wurde der gesamte Ausstrich auf infizierte Zellen gescreent, um auch sehr geringe Parasitämien festzustellen. Primärer Endpunkt war die Parasitämie an Tag 3.

2.6 Darstellung des *m*sp2-Lokus

Das *merozoite surface protein 2* (*m*sp2) ist ein hochpolymorphes Oberflächenantigen der Merozoiten, das als Vakzinekandidat gehandelt wird. Bei diesem *single-copy*-Gen lassen sich die zwei Hauptallelgruppen *3D7* und *FC27* unterscheiden, die Differenzen in der Repeatzusammensetzung in der zentralen Region des Gens zeigen [Smythe et al. (1991)]. Hier wurde eben diese zentrale Region amplifiziert, Primer (siehe Tabelle 2.3) und Reaktionsbedingungen wurden übernommen von Ntoumi et al. (2000). Zur Alleldifferenzierung wurden im 1. Schritt beide Allele gemeinsam amplifiziert, der 2. Schritt war allelspezifisch. Im Falle eines anschließenden Restriktionsverdaus wurden im 2. Schritt Primer eingesetzt, die beide Allele amplifizierten.

Die Reaktionsbedingungen waren für sämtliche Amplifikationsschritte: 5 min initiale Denaturierung bei 94°C; 40 Zyklen mit je 10 sek Denaturierung bei 94°C, 30 sek Annealing bei 57°C und 30 sek Extension bei 72°C; 2 min finale Extension bei 72°C.

Primer	Sequenz
<i>msp2</i> F1	ATGAAGGTAATTAACAATTGTCTATTATA
<i>msp2</i> R1	ATATGGCAAAAGATAAAACAAGTTGCTG
<i>FC27</i> F2	GCAAAATGAAGGTTCTAATACTAATAG
<i>FC27</i> R2	GCTTTGGGTCCTTCTTCAGTTGATTC
<i>3D7</i> F2	GCAGAAAGTAAGCCTTCTACTGGTGCT
<i>3D7</i> R2	GATTTGTTTCGGCATTATTATGA
<i>FC27+3D7</i> F2	AACGAATTCATAAACAATGCTTATAATATGAGT
<i>FC27+3D7</i> R2	GATGAATTCTAGAACCATGCATATGTCCATGTT

Tabelle 2.3: Primer *msp2*-PCR.

Angabe der Primersequenzen in 5'-3'-Richtung. F1 und R1 bezeichnen *forward* bzw. *reverse* Primer des 1., F2 und R2 die entsprechenden Primer des 2. Amplifikationsschrittes.

Restriktionsverdau Die Methode der *msp2*-Genotypisierung durch Restriktionsverdau wurde adaptiert nach Felger et al. (1999). Als Ausgangsmaterial wurde die zentrale Region des *msp2*-Gens in einer allelunspezifischen *nested*-PCR amplifiziert. Die erhaltenen Fragmente wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Alu1*, *Dde1*, *Hinf1*, *Rsa1* (New England Biolabs, Frankfurt am Main, BRD) nach Herstellerprotokoll einfach verdaut. Die verdauten Proben wurden mit SYBR Green angefärbt und auf 2%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. So konnten spezifische Schnittmuster erzeugt werden.

Sequenzierung Verfahren wie beschrieben unter Abschnitt 2.4.

2.7 Analyse der Haplotypen

Unter einem Haplotyp wird allgemein die genetische Zusammensetzung eines Chromosoms, aber auch eine spezifische Kombination bestimmter Marker verstanden [Su et al. (2007)]. Im Folgenden wird als Haplotyp die genetische Zusammensetzung der chromosomalen Region um das Resistenzgen *pfert* auf Chromosom 7 (Länge dieses Chromosomenstückes etwa 100 kb) bezeichnet, definiert durch die Allelabfolge dortiger Mikrosatellitenmarker. Mikrosatelliten sind kurze (100–300 bp) DNA-Sequenzen, welche über mindestens eine Repeatregion verfügen – meist bestehend aus Tandem- oder Triplettrepeats –, weshalb sie auch als *simple sequence repeats* (*SSRs*) bezeichnet werden. Bei *P. falciparum* sind die häufigsten Repeats $(T)_n$, $(TA)_n$ und $(TAA)_n$ [Su und Wellems (1996)]. Die Anzahl dieser Repeats und damit die Länge des Mikrosatelliten sind sehr variabel, so dass Mikrosatelliten hochpolymorphe Marker darstellen.

In dieser Arbeit sollte die Bestimmung der Mikrosatellitenallele durch Amplifikation des Markers und anschließender Sequenzierung zur Ermittlung der Repeatanzahl erfolgen. In einer Vorversuchsreihe wurden folgende 26 Mikrosatelliten auf mögliche Eignung gescreent: *BM25*, *PE14D*, *PE87*, *B5M129*, *B5M97*, *B5M77*, *1H6*, *3E7*, *2E10*, *B5M47*, *9B12*, *PE12A*, *ps590.7*, *2H4*, *7A11*, *B5M32*, *PE14E*, *PE14F*, *PE45B*, *B5M92*, *B7M43*, *B7M82*, *ps90.30*, *pj1*, *C13M30*, *BM7*. Diese Mikrosatelliten verteilten sich auf ein ca. 400 kb langes Chromosomenstück um das *pfert*-Gen; ihre Zusammenstellung erfolgte angelehnt an Wootton et al. (2002) sowie unter Zuhilfenahme des NCBI Map Viewer (www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview). Die entsprechenden Primer wurden übernommen von Su et al. (1999). Die in selbiger Arbeit angegebenen Reaktionsbedingungen führten jedoch zu keiner effizienten Amplifikation aus unseren Feldisolaten, so dass die Bedingungen adaptiert werden mussten. Eine Effizienzsteigerung konnte durch Erhöhung der Zykluszahl, Spezifizierung der Annealingtemperatur mittels einer Gradienten-PCR (hier läuft die Annealingtemperatur über einen Temperaturgradienten) oder Implementierung einer *nested*-PCR erreicht werden. In letzterem Fall wurden geeignete Primer unter Zuhilfenahme des veröffentlichten Genoms des *3D7*-Stammes [Gardner et al. (2002)], frei zugänglich auf www.plasmodb.org [PlasmoDB], sowie des NCBI Blast-Programmes (*basic local alignment search tool*, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) erstellt.

Zur Definition der Haplotypen ausgewählt wurden schließlich folgende sechs Mikrosatelliten: *PE14D* (Entfernung zum *pfert*-Gen: -45 kb), *B5M77* (-18 kb), *3E7* (-11 kb), *9B12* (+2 kb), *7A11* (+21 kb), *PE14F* (+57 kb). Es wurde hierbei auf eine möglichst gleichmäßige Abdeckung der Region *up*- und *downstream* des *pfert*-Gens (insgesamt 107 kb) sowie auf eine weitgehend symmetrische Anordnung der Marker geachtet. Der Haplotyp eines Stammes wurde als die Kombination der Allele aller Mikrosatellitenmarker sowie der Position 76 des *pfert*-Gens (76K oder 76T) definiert (siehe auch Abbildung 3.9). In Unterkohorten wurden zusätzlich der Mikrosatellit *B5M47* (-0 kb) auf Grund seiner Lage im *pfert*-Lokus untersucht.

Nach Wootton et al. (2002) repräsentiert der resistente Stamm *FCR3* (Herkunft Südostasien) den typischen afrikanischen resistenten Haplotypen. *FCR3* wurde daher als resistenter Referenzstamm gewählt wurde. Sensitive Stämme sind im Allgemeinen sehr divers, weshalb hier kein sensitiver Referenzstamm bestimmt wurde.

Die ausgewählten Mikrosatelliten wurden in einer einfachen bzw. *nested*-PCR amplifiziert. Wie bereits erwähnt wurden die Primer der einfachen PCRs sowie des 2. Amplifikationsschrittes im Falle von *nested*-PCRs übernommen von Su et al. (1999); die Primer des 1. Amplifikationsschrittes wurden selbst entwickelt (siehe Tabelle

2.4). Soweit nicht anders angegeben wurden die PCR-Reaktionen unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 2 min initiale Denaturierung bei 94°C; 45 Zyklen mit je 20 sek Denaturierung bei 94°C, 20 sek Annealing bei 51°C und 30 sek Extension bei 60°C; 2 min finale Extension bei 60°C. Im Falle einer *nested*-PCR wurde die Zykluszahl in beiden Schritten auf 30 reduziert.

Primer		Sequenz		Sequenz
PE14D	F1	GGATATTATGATTCAATAAAATC	R1	GATCATTTCATGACTAGC
PE14D	F2	TGTAATGAATGATTCTAATACCAC	R2	TTGGACCATGCTTCACAG
B5M77	F	TAAAGTCTTTCAATACATATG	R	GAAATAATTTTCATATACACAC
3E7	F1	GATCGAAGTACAGATAGAAT	R1	GTGCAAGATATAATAAAAAGTTG
3E7	F2	AAGAATGAAAGTATTTTTAGC	R2	CCCCTTCAAAAAGGAAATAACAC
B5M47	F	ATGACGAGCGTTATAGAGAA	R	ATACATATGGGTATACATATA
9B12	F	ATATATTCCAGTATGTTCCG	R	AATGATACAATGGGATTTAC
7A11	F1	GTAAGTGAATGTGTACTTG	R2	CTCTTCTCTGAGTAAATATG
7A11	F2	ATGTGTAAGGAGATAGTATA	R2	CAACTTTCTCTTTTTAAATATTAC
PE14F	F1	GCTGGAAC TAATTGTTTGT	R1	AGTATGAACATTTTGTACAT
PE14F	F2	CTGTGGATAATGATATTC	R2	GTCCATTGAAAAGATAGG

Tabelle 2.4: Primer Mikrosatelliten-PCR.

Angabe der Primersequenzen in 5'-3'-Richtung. F1 und R1 bezeichnen *forward* bzw. *reverse* Primer des 1., F2 und R2 die entsprechenden Primer des 2. Amplifikationsschrittes. Sind nur F und R angegeben, so handelt es sich um eine einfache PCR, F und R bezeichnen hier *forward* bzw. *reverse* Primer.

Die amplifizierten Fragmente wurden mit SYBR Green angefärbt, auf 1,5%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und der Sequenzierung zugeführt. Das Sequenzierverfahren erfolgte wie beschrieben auf Seite 21. Es folgen Details zu den einzelnen Mikrosatelliten:

PE14D *PE14D* wurde in einer *nested*-PCR amplifiziert. Die Annealingtemperatur wurde in beiden Amplifikationsschritten auf 58°C erhöht, ansonsten waren die Reaktionsbedingungen wie oben genannt.

B5M77 *B5M77* wurde wie oben beschrieben amplifiziert.

3E7 *3E7* ließ sich beim Großteil der Proben wie oben beschrieben amplifizieren. Zur Erhöhung der Effizienz wurde für nicht erfolgreich sequenzierte Proben eine *nested*-PCR eingeführt. Aufgrund des sehr großen Fragmentes, das im 1. Schritt amplifiziert wurde, wurden die Reaktionsbedingungen wie folgt verändert: der 1.

Amplifikationsschritt lief unter 3 min initialer Denaturierung; 30 Zyklen mit je 30 sek Denaturierung bei 94°C, 30 sek Annealing bei 56°C und 3 min Extension bei 60°C; 10 min finale Extension bei 60°C. Der 2. Amplifikationsschritt bestand aus 2 min initialer Denaturierung bei 94°C; 30 Zyklen mit je 20 sek Denaturierung bei 94°C, 20 sek Annealing bei 56°C und 30 sek Extension bei 60°C; 2 min finale Extension bei 60°C.

9B12 *9B12* wurde wie oben beschrieben amplifiziert.

7A11 Bei einem Teil der Proben konnte *7A11* durch Erhöhung der Annealingtemperatur auf 56°C bei ansonsten gleichen Bedingungen amplifiziert werden. Für die ausstehenden Proben wurde eine *nested*-PCR entwickelt. Im 1. Amplifikationsschritt wurden die Bedingungen wie folgt adaptiert: 3 min initiale Denaturierung bei 94°C; 30 Zyklen mit je 30 sek Denaturierung bei 94°C, 30 sek Annealing bei 53°C und 1 min Extension bei 60°C; 3 min finale Extension bei 60°C. Im 2. Schritt wurden die gleichen Bedingungen wie für die einfache PCR verwendet, wobei die Zykluszahl auf 30 reduziert wurde.

PE14F *PE14F* wurde in einer *nested*-PCR amplifiziert. Die Annealingtemperatur wurde in beiden Amplifikationsschritten auf 58°C erhöht, ansonsten waren die Reaktionsbedingungen wie oben genannt.

B5M47 *B5M47* wurde in einer kombinierte PCR mit *forward* Primer der *B5M47*-PCR und dem *reverse* Primer des 2. Amplifikationsschrittes der *pfert*-K76T-PCR (siehe Abschnitt 2.5.1) amplifiziert. Die Reaktionsbedingungen wurden wie folgt verändert: 3 min initiale Denaturierung bei 94°C; 45 Zyklen mit je 30 sek Denaturierung bei 94°C, 30 sek Annealing bei 48°C und 1 min Extension bei 60°C; 3 min Extension bei 60°C. Im Sequenzanhang wird die nach dieser Methode erhaltene Sequenz als *B5M47x* bezeichnet.

2.8 Parasitenkultur

Parasiten wurden zum einen kultiviert, um ein beständiges Reservoir an Referenz-DNA zu haben, zum anderen zur Durchführung der Chloroquin-Resistenz-*in vitro*-Bestimmung (siehe 2.5.3). Folgende Stämme wurden in Kultur gehalten: die Laborstämme *3D7*, *Dd2*, *FCR3*, *NF54* sowie der Feldstamm *MOA*.

2.8.1 Kontinuierliche Kultur

Die Parasiten wurden bei 37°C und 5% CO₂-Anteil bei niedrigem O₂-Gehalt der Luft kultiviert. Die Kulturbedingungen wurden adaptiert nach Trager und Jensen (1976). Das Kulturmedium wurde auf Basis von RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) hergestellt, dem 1/10 10x AlbuMAX-II-Lösung (GIBCO Invitrogen, Auckland, Neuseeland), 24 mM HEPES-Puffer (Sigma-Aldrich), 2 µl L-Glutamin (Sigma-Aldrich) und 105 µM Gentamycin (Invitrogen, Paisley, UK) zugesetzt wurden. Das fertige Kulturmedium wurde bei 4°C gelagert. In den Kulturflaschen wurde dem Medium Erythrozytenkonzentrat mit einem Hämatokrit von 50% im Verhältnis 1 : 10 zugesetzt, um einen endgültigen Hämatokrit von 5% zu erzielen.

Die Kulturen wurden im unsynchronisierten Zustand gehalten; für die Langzeitkultur wurden Parasitämien zwischen 1 und 2% angestrebt. Alle zwei Tage wurde ein Teil der Kultur auf einem Objektträger ausgestrichen, mit Giemsa-Lösung angefärbt und mikroskopisch die Parasitämie bestimmt. Die Giemsa-Lösung wurde durch 1 : 5 Verdünnung von Giemsa-Stammlösung (Sigma-Aldrich) mit undestilliertem Wasser hergestellt. Die Färbung wurde nach folgender Prozedur durchgeführt:

1. dünner Ausstrich eines Tropfens der sedimentierten Erythrozyten aus der Parasitenkultur auf einem Objektträger; Lufttrocknen des Ausstriches.
2. Fixation des Ausstriches durch Inkubation in 99,9%igem Methanol für eine Minute bei Raumtemperatur; Lufttrocknen des Ausstriches.
3. Färbung des Ausstriches in Giemsa-Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur; anschließend Abspülen der Lösung und Lufttrocknen des Ausstriches.

Bei 100facher Vergrößerung in Ölimmersion wurden jeweils 300 – 500 Erythrozyten ausgezählt. Bei mehr als 2 Prozent infizierter Zellen wurden die Kulturen gesplittet und frisches Erythrozytenkonzentrat zugegeben. Bei geringeren Parasitämien wurde lediglich das Kulturmedium gewechselt sowie der CO₂-Gasdruck erneut auf 5% gesetzt.

2.8.2 DNA-Extraktion aus Parasitenkulturen

Um einen möglichst hohen DNA-Gehalt zu erzielen, wurden Kulturen im Trophozitenstadium (vorherrschend) bei Parasitämien von 5 – 8% verwendet. Zunächst wurde ein Teil der jeweiligen Kultur in ein Falcon Tube überführt und das Medium

abzentrifugiert. Die DNA-Extraktion aus dem erhaltenen Erythrozytenkonzentrat wurde durchgeführt wie beschrieben auf Seite 20.

2.9 Statistische Auswertung

Die Prävalenz des sensitiven *pfcr1*-Allels zwischen den Jahreskohorten wurde anhand des exakten Tests nach Fisher (*2-tailed*) verglichen. 95%-Konfidenzintervalle wurden mit exakten Grenzen nach Clopper-Pearson berechnet.

Der Konservierungsgrad eines Markers wurde als Quotient aus Anzahl Proben mit dem dominanten Allel / Gesamtprobenzahl berechnet, damit entsprechend der Prävalenz des dominanten Allels. Analog wurde der Konservierungsgrad des Haplotypen definiert. Zur Untersuchung der Entwicklung der Prävalenz des dominanten Allels bzw. Haplotypens zwischen den Jahreskohorten wurde eine logistische Regression durchgeführt und mittels χ^2 -Test auf Signifikanz geprüft.

Zur Erfassung der Diversität an einem Locus wurde die erwartete Heterozygotie (H_e) ermittelt, welche die Wahrscheinlichkeit angibt, dass man bei blindem Ziehen von zwei Proben aus der untersuchten Population ein Paar verschiedener Allele erhält. Diese Art der Diversitätsbestimmung berücksichtigt die relative Häufigkeit jedes einzelnen Allels und liefert auch bei unterschiedlichen Gesamtprobenzahlen vergleichbare Ergebnisse. Es gilt $H_e = [n/(n-1)] [1 - \sum p_i^2]$, wobei n die Gesamtprobenanzahl und p_i die Frequenz des i ten Allels darstellt [Nash et al. (2005)]. Hohe H_e -Werte zeigen also ein hohes Maß an Diversität am entsprechenden Locus an, wobei stets $0 \leq H_e \leq 1$. Die Varianz σ^2 von H_e wurde berechnet als $\sigma^2 = 2(n-1)/n^3 \{2(n-2) [\sum p_i^3 - (\sum p_i^2)^2]\}$. 95%-Konfidenzintervalle wurden approximativ ermittelt. Die erwartete Heterozygotie jedes Markers wurde auf einen signifikanten Unterschied gegenüber einem H_e -Wert von 0,8 – entsprechend dem H_e -Wert unselektionierter Marker in afrikanischen *P. falciparum*-Parasiten [Anderson et al. (2000)] – geprüft; hierzu wurde ein Z-Test inklusive Bonferroni-Adjustierung angewandt. Eine mögliche Entwicklung von H_e eines Mikrosatelliten zwischen den Jahreskohorten wurde durch lineare Regression dargestellt und mittels F-Test auf Signifikanz untersucht.

Im Falle der sensitiven Probe SP15 wurde für beide Hypothesen – Nullhypothese, dass der Haplotyp von SP15 einen vollständig sensitiven bzw. Alternativhypothese teilweise resistenten Hintergrund hat, die *Odds* inklusive 95%-Konfidenzintervalle mit exakten Grenzen nach Clopper-Pearson berechnet.

Bei allen Testverfahren wurden p -Werte $< 0,05$ als signifikant gewertet.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Chloroquin-Resistenzlage

3.1.1 Molekulargenetischer Nachweis

Screening Zur Bestimmung der aktuellen Resistenzlage gegenüber Chloroquin wurde die Population der Jahre 2005 – 07 betrachtet. Diese Population wurde mittels folgender Studien untersucht: Ferroquin-Toleranz-Studie (2005/06), IPTi-Studie (2006), Antigen-Diversitäts-Studie (2006/07) und SP-Wirksamkeitsstudie (2007). Insgesamt wurden 159 Proben mittels PCR-Amplifikation des *pfcr*-Lokus und anschließend allelspezifischen Restriktionsverdau auf das Vorliegen der Resistenzmutation *pfcr* K76T gescreent.

Für einen Teil der hier verwendeten Proben der 1/95C-Studie (1995/96) und der Fall-Kontroll-Studie 2002 sowie für 119 weitere Proben aus diesen beiden Studien war bereits von Pembe Mayengue das Vorliegen von 100% *pfcr* 76T gezeigt worden; es war hierfür das gleiche Verfahren angewandt worden. Bei 33 Proben aus der 1/95C-Studie stand dieser Datenpunkt noch aus, dies wurde in dieser Arbeit nachgeholt.

Von den insgesamt 159 untersuchten Proben aus den Jahren 2005 – 07 waren 144 PCR-positiv für den *pfcr*-Lokus. Hierunter fanden sich vier sensitive Isolate: eines aus der Ferroquin-Toleranz-Studie (Patienten-ID TDU28) und drei aus der SP-Wirksamkeitsstudie (Patienten-ID SP15, SP21, SP26), wobei eine Probe (SP26) eine Mischinfektion sensitiv/resistent enthielt. Um eine klare statistische Auswertung zu gewährleisten, wurde letztgenannte Probe als zwei getrennte Proben gewertet. Da einwandfrei der Nachweis erbracht worden war, dass in dieser Probe mindestens zwei unterschiedliche Isolate enthalten waren, erschien dieses Vorgehen angemessen. Die

Gesamtprobenzahl erhöhte sich hierdurch auf 160, die Zahl PCR-positiver Proben auf 145. Abbildung 3.1 zeigt exemplarisch den Restriktionsverdau der sensitiven Isolate sowie eines resistenten Stammes.

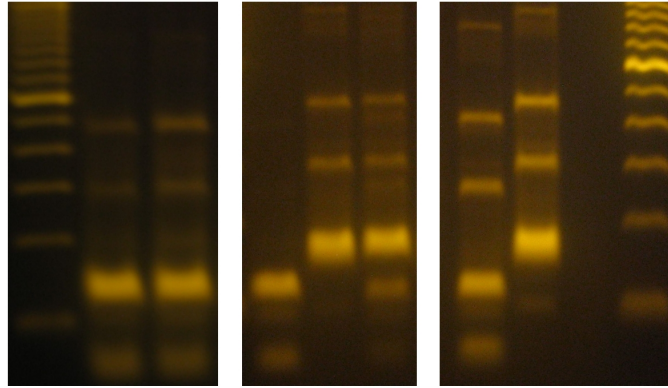


Abbildung 3.1: Screening der Feldisolate auf die Resistenzmutation *pfert* K76T. Gezeigt werden die Gele, auf denen die sensitiven Isolate durch Verdau nachgewiesen wurden; von links nach rechts TDU28 (sensitiv), SP15 (sensitiv), SP21 (sensitiv), SP23 (resistent), SP26 (sensitiv/resistent), *3D7* (Positivkontrolle sensitiv), *Dd2* (Positivkontrolle resistent), Negativkontrolle. Die DNA-Leitern auf beiden Seiten zeigen Marker im Abstand von 100 bp, die unterste Marke hat die Größe 100 bp. Deutlich ist der Größenunterschied zwischen den sensitiven (geschnitten) und den resistenten (ungeschnitten) PCR-Fragmenten.

Aufgetrennt nach Jahren ergibt dies ein sensitives Isolat in 49 PCR-positiven Proben im Jahre 2005 (entsprechend einer Prävalenz sensitiver Parasiten von 2%), kein sensitives Isolat in 41 Proben 2006 (0%) sowie drei sensitive Isolate in 55 Proben 2007 (5%) (siehe Tabelle 3.1). Von den 33 zusätzlich untersuchten Proben der 1/95C-Studie waren 32 PCR-positiv, diese waren alle resistent. Insgesamt fanden sich also keine sensitiven Parasiten in 215 untersuchten Proben der Jahre 1995 – 2002 (0%).

Jahreskohorte	2005	2006	2007	2005 – 07
Probenanzahl	52	53	55	159
PCR-positiv	49	41	55	144
CQ-resistent	48 (98%)	41 (100%)	52 (95%)	141 (97%)
CQ-sensitiv	1 (2%)	0 (0%)	3 (5%)	4 (3%)

Tabelle 3.1: Chloroquin-resistente Proben der Jahre 2005 – 07. Angegeben ist die Anzahl untersuchter, PCR-positiver, Chloroquin (CQ)-resistenter sowie Chloroquin-sensitiver Proben in der jeweiligen Jahreskohorte.

Verifikation Zur Bestätigung der durch das Screeningverfahren erhaltenen Ergebnisse wurden die unverdauten Fragmente aller sensitiven sowie zufällig ausgewählter

resistenter Isolate sequenziert. In allen Fällen konnte das Vorliegen des zu erwartenden Allels gezeigt werden. Bei der resistent/sensitiven Mischinfektion konnte im Chromatogramm an der entsprechenden Stelle eine Überlagerung der resistenten mit der sensitiven Basensequenz beobachtet werden, wobei die Peaks beider Allele klar abgrenzbar waren (siehe Abbildung 3.2).

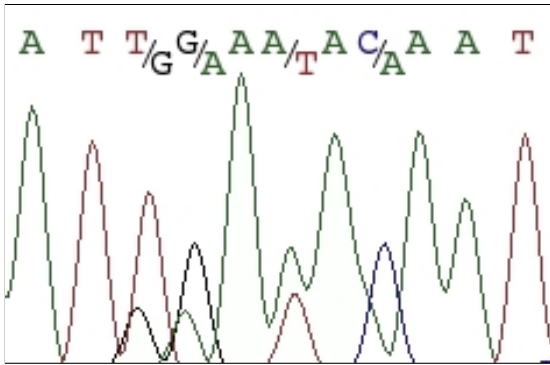


Abbildung 3.2: Chromatogramm: SP26 *pfert*-Allel, Positionen 74, 75, 76

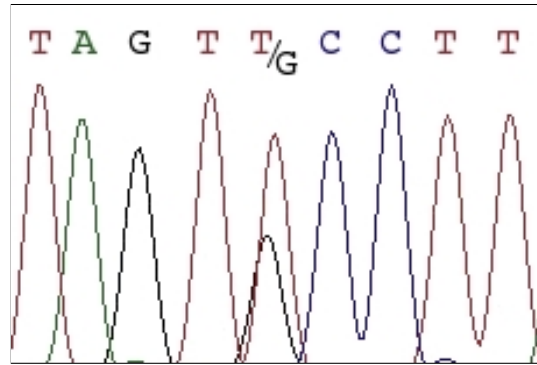


Abbildung 3.3: Chromatogramm: SP26 *pfert*-Allel, Position 220

Statistische Auswertung Eine signifikante Zunahme sensitiver Parasiten konnte sowohl für den Vergleich der Jahre 1995 – 2002 und 2005 – 07 ($p = 0,026$) als auch für den Vergleich 1995 – 2002 und 2007 ($p = 0,008$) gezeigt werden.

3.1.2 *in vitro*-Testung

Bei einem ausgewählten, molekulargenetisch resistenten Feldisolat (Patienten-ID MOA) wurde die Chloroquin-Resistenz zusätzlich *in vitro* getestet. Dieser Versuch konnte leider bei keinem der sensitiven Isolate durchgeführt werden, da hier keine Parasitenkulturen eingefroren worden waren. Als Kontrollen wurden die Laborstämme *NF54* (sensitiv) und *Dd2* (resistent) verwendet.

Zu Versuchsbeginn am Tag 0 betrug die Parasitämie aller sechs Kulturen 0,5% infizierte Erythrozyten. Am primären Endpunkt Tag 3 waren die Parasitämien bei *Dd2* auf 3,0% und bei *Dd2* + 100 nM CQ auf 2,1% angestiegen; bei *NF54* auf 0,9% angestiegen und bei *NF54* + 100 nM CQ auf 0% gefallen; bei *MOA* auf 0,8% und bei *MOA* + 100 nM CQ auf 1,2% gestiegen.

Das Feldisolat *MOA* ist demnach sowohl molekulargenetisch als auch dem Verhalten *in vitro* nach Chloroquin-resistent.

3.2 Charakterisierung des *pfcr*t-Gens

Zur näheren Beleuchtung des genetischen Hintergrundes der neu aufgetretenen sensitiven Stämme wurde genutzt, dass im *pfcr*t-Gen weitere Punktmutationen auftreten können, die mit dem resistenten Genotyp assoziiert sind (siehe auch Abschnitt 1.2.3.2). Im Falle, dass die sensitiven Isolate aus ehemals resistenten Stämmen durch einfache Rückmutation an Position 76 zur Wildtypvariante entstanden seien, würde man erwarten, die Resistenz-assoziierten Mutationen noch aufzufinden. Verfügten die sensitiven Isolate jedoch über das ursprüngliche *pfcr*t-Allel, so müssten die Resistenz-assoziierten Mutationen fehlen. Das Vorliegen der Resistenz-assoziierten Mutationen A220S, Q271E, N326S, I356T und R371I wurde in allen sensitiven sowie zufällig ausgewählten resistenten Isolaten aus den Jahren 2005 – 07 mittels einem dem Nachweis der K76T-Mutation analogen Verfahren untersucht. Zur Verifikation durchgeführte stichprobenartige Sequenzierungen bestätigten die erhaltenen Ergebnisse. Zusätzlich wurden die Mutationen M74I und N75E direkt per Sequenzierung nachgewiesen.

Resistente Isolate Die Mutationen M74I und N75E wurden – auf Grund der Nähe zur entscheidenden Mutation K76T – bei 48 Proben untersucht; alle 48 verfügten über das resistente Allel. Bei 18 Proben wurden zudem die übrigen fünf Resistenz-assoziierten Mutationen bestimmt. An den Positionen 220, 271 sowie 371 lag bei allen Proben das resistente Allel vor, während an Position 326 bei allen das Wildtypallel zu finden war. An Position 356 besaßen alle Proben das resistente Allel, zwei Proben zeigten jedoch zusätzlich den Wildtyp.

Das dominante *pfcr*t-Allel der aktuellen resistenten Population in Lambaréné war demnach: $I_{74}E_{75}\underline{T}_{76}S_{220}E_{256}N_{326}T_{356}I_{371}$. Anzumerken ist allerdings die mit 18 vollständig untersuchten Proben relativ geringe Probenanzahl.

Sensitive Isolate Die sensitiven Monoinfektionen SP15, SP21 und TDU28 zeigten keine der Resistenz-assoziierten Mutationen, das sensitive *pfcr*t-Allel stellte sich demnach folgendermaßen dar: $M_{74}N_{75}\underline{K}_{76}A_{220}Q_{256}N_{326}I_{356}R_{371}$. Bei der sensitiv/resistenten Mischinfektion SP26 fanden sich an allen Positionen außer 326 sowohl das mutante als auch das Wildtypallel. Dies war im Verdau wie auch im Sequenzchromatogramm feststellbar, wo an entsprechender Stelle die Peaks beider Varianten klar abgrenzbar waren (siehe Abbildungen 3.2 und 3.3). An Position 326 lag nur das Wildtypallel vor. Eine Übersicht der *pfcr*t-Allele der sensitiven Proben

bietet Tabelle 3.2.

	74	75	76	220	271	326	356	371
<i>Dd2</i> (CQR)	I	E	T	S	E	S	T	I
Wildtyp (CQS)	M	N	K	A	Q	N	I	R
TDU28	M	N	K	A	Q	N	I	R
SP15	M	N	K	A	Q	N	I	R
SP21	M	N	K	A	Q	N	I	R
SP26	M/I	N/E	K/T	A/S	Q/E	N	I/T	R/I

Tabelle 3.2: Resistenz-assoziierte Mutationen in den sensitiven Proben.

Angegeben sind die vorliegenden Aminosäuren an den polymorphen Positionen (74 – 371) innerhalb des *pfcr*-Gens für die sensitiven Isolate; zudem wird als Vergleich die entsprechende Aminosäuresequenz des Chloroquin-sensitiven (CQS) Wildtyps sowie des Chloroquin-resistenten (CQR) Stammes *Dd2* aufgeführt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die neuauftretenden sensitiven Monoinfektionen alle das vollständige Wildtypallel des *pfcr*-Gens besaßen. Für den sensitiven Stamm in der Mischinfektion SP26 lag dieser Schluss ebenfalls nahe. Abbildung 3.4 zeigt einen Ausschnitt der alignierten *pfcr*-Allele aller sensitiven Isolate.

QCR	[Dd2	TAATTGAAACAATTTTGGCT
		TDU28	TAATGAATAAAAATTTTGGCT
		SP15	TAATGAATAAAAATTTTGGCT
		SP21	TAATGAATAAAAATTTTGGCT
CQS]	SP26	TAATGAATAAAAATTTTGGCT
			 74 75 76

Abbildung 3.4: Alignment der *pfcr*-Loci der sensitiven Isolate.

Gezeigt wird ein 20 bp Ausschnitt der *pfcr*-Sequenz des Chloroquin-resistenten (CQR) Referenzstammes *Dd2* sowie der Chloroquin-sensitiven (CQS) Isolate TDU28, SP15, SP21, SP26; deutlich sind die Unterschiede an den vier Punktmutationen entsprechend den Aminosäurepositionen 74, 75 und 76.

Vergleich sensitive und resistente Isolate Bei ausschließlicher Betrachtung der Monoinfektionen (in Bezug auf das *pfcr*-Allel) zeigte sich, dass sich resistente und sensitive Stämme an allen untersuchten polymorphen Positionen innerhalb des *pfcr*-Gens unterschieden mit Ausnahme von Position 326, an der in sensitiven wie resistenten Proben die Wildtypform vorlag. Tabelle 3.3 zeigt das *pfcr*-Allel resistenten und sensitiver Stämme im Vergleich.

	74	75	76	220	271	326	356	371
CQS ($n = 3$)	M	N	K	A	Q	N	I	R
CQR ($n = 16$)	I	E	T	S	E	N	T	I

Tabelle 3.3: Vergleich des *pfcr*-Allels in sensitiven und resistenten Stämmen. Angegeben sind die vorliegenden Aminosäuren an den Positionen der Resistenz-assoziierten Mutationen (74 – 371) sowie an Position 76 in Chloroquin-sensitiven (CQS) und -resistenten (CQR) Stämmen. Gesicherte Mischinfektionen wurden ausgeschlossen, n gibt die Probenanzahl an.

3.3 Charakterisierung des *m*sp2-Lokus

Zur weiteren Aufklärung des genetischen Hintergrundes der neu aufgetretenen sensitiven Parasiten wurden der hochpolymorphe Marker *merozoite surface protein 2* (*m*sp2) (zentrale Region) sowohl in den sensitiven Isolaten als auch in der aktuellen resistenten Population in Lambaréné untersucht.

156 Proben aus den Jahren 2005 – 07 wurden auf das vorliegende Allel (*3D7* oder *FC27*) untersucht; bei Unterkohorten wurde der Locus zudem durch Restriktionsverdau oder Sequenzierung weitergehend analysiert.

3.3.1 Darstellung des *3D7*- und *FC27*-Allels

Alle Proben der Ferroquin-Toleranz-Studie, der IPTi-Studie sowie 30 Proben des SP-Wirksamkeitsstudie wurden per PCR auf das vorliegende Allel (*3D7* oder *FC27*) des *m*sp2-Lokus untersucht; für 18 Proben der Antigen-Diversitäts-Studie lagen diese Daten bereits vor.

Von den insgesamt 156 untersuchten Proben waren 106 (68%) PCR-positiv. Hiervon zeigten 43 (41%) das *3D7*-, 88 (83%) das *FC27*-Allel, wobei in 25 (24%) Proben beide Allele vorlagen. Aufgetrennt nach Jahren betrug das Allelverhältnis *FC27/3D7* im Jahre 2005 15,5, 2006 1,9 und 2007 1,1. Es kam demnach über die Jahre zu einer relativen Zunahme des *3D7*-Allels, wobei absolut stets das *FC27*-Allel eine höhere Prävalenz hatte.

Unter den sensitiven Isolaten zeigte SP21 das *3D7*-Allel, SP15 und TDU 28 das *FC27*-Allel; die sensitiv/resistente Mischinfektion SP26 verfügte über beide Allele.

3.3.2 Restriktionsverdau

Zur genaueren Darstellung der vorliegenden Allele wurde ein Restriktionsverdau von 43 *FC27*-positiven Proben aus Ferroquin-Toleranz- und Antigen-Diversitäts-Studie durchgeführt. Es zeigte sich, dass in jedem Verdau (*AluI*, *DdeI*, *HinfI*, *RsaI*) ein

bestimmtes Schnittmuster vorherrschend war, einzelne Proben unterschieden sich demnach vor allem durch die genauen Längen der Fragmente. Da diese auf Grund von Laufgeschwindigkeitsunregelmäßigkeiten bei SYBR Green-Färbung nicht exakt zu erfassen waren, verließen wir diese Methode zu Gunsten der Sequenzierung.

3.3.3 Sequenzanalyse

Aufgrund der vergleichsweise ungenauen Auflösung eines Restriktionsverdau wurden die *msp2*-Loci des Weiteren per Sequenzierung dargestellt. Sequenziert wurden alle *msp2*-PCR-positiven Proben der IPTi- und der SP-Wirksamkeitsstudie, sowie neun Proben (inklusive des sensitiven Isolats TDU28) aus der Ferroquin-Toleranz-Studie. Von zwei Proben der Antigen-Diversitäts-Studie lagen bereits *msp2*-Sequenzen vor, welche in die Auswertung eingeschlossen wurden.

Gewertet wurde stets nur die im Chromatogramm dominante Sequenz. In einem Fall konnten bereits auf dem Gel zwei Banden abgegrenzt werden; hier wurden beide Banden getrennt sequenziert und in die Auswertung aufgenommen. Die Analyse erfolgte – im Gegensatz zu den anderen in dieser Arbeit dargestellten Sequenzen – in der Aminosäuresequenz, dem für den *msp2*-Lokus in der Literatur vorherrschenden Modus, was den anschließenden Vergleich mit anderen Arbeiten erleichterte.

Bei der Beurteilung zweier Sequenzen als allelgleich bzw. -ungleich wurde eine nicht lesbare Base (dieses Problem tritt bei der Sequenzierung gelegentlich auf und ist in der Nukleinsäuresequenz als N bzw. in der Aminosäuresequenz als X gekennzeichnet) nicht als Unterschied gewertet. Da dies hauptsächlich die diversere Gruppe der *3D7*-Allele betraf, handelt es sich hierbei um einen konservativen Ansatz. Für die Gegenüberstellung der in beiden Allelgruppen gefundenen Fragmentlängen wurden ausschließlich Allele mit vollständig erhaltenen Primersequenzen eingeschlossen.

Erfolg der Sequenzierung Alle 40 *FC27*-positiven Proben konnten sicher und mit qualitativ überzeugendem Ergebnis sequenziert werden. Hingegen mussten von den 34 *3D7*-positiven Proben 4 (12%) ausgeschlossen werden, da sich in diesen Proben zwei oder mehr Sequenzen so stark überlagerten, dass eine sichere Auswertung der dominanten Sequenz nicht möglich war.

Charakterisierung der *FC27*-Allele Die Alignierung der *FC27*-Sequenzen zeigte einen einheitlichen, streng modularen Sequenzaufbau bestehend aus fünf verschiedenen Modulen (siehe Tabelle 3.4). Allele unterschieden sich in der Anzahl Wieder-

holungen eines Moduls sowie in Aminosäurepolymorphismen.

Modul	Länge [AS]	Anzahl (x)	Sequenz
1	16	1	ANEGSNTN*V*A*AP*
2	32	1 oder 3	A*T*A***Q*STNSASTSTTNNGESQTT*P*A
3	7	1	ADTPTAT
4	12	0 – 5	*SNS*S*PITTT
5	34	1	ESSSSGNAPNKTDGKGEESEKQNELNESTEEGPK

Tabelle 3.4: Modulaufbau der *FC27*-Allele.

Angegeben ist die Länge des jeweiligen Moduls in Aminosäuren (AS), die mögliche Anzahl Wiederholungen des Moduls in den untersuchten Proben sowie die Sequenz des Moduls; * zeigt einen Aminosäurepolymorphismus an dieser Position an; die Nummerierung 1 – 5 der Module bezieht sich auf ihre Abfolge in 5-’3’-Richtung.

Die Reihenfolge 1 – 5 der Module blieb stets erhalten. Module lagen jeweils vollständig vor mit Ausnahme einer Sequenz (SP26), die eine Deletion von 4 Aminosäuren Länge in Modul 2 (Position 27 – 30) aufwies. Bei ausschließlicher Betrachtung der Sequenzlänge (entsprechend der Anzahl Wiederholungen von Modul 2 und 4 sowie der möglichen Deletion in Modul 1) fielen die 40 *FC27*-Sequenzen in insgesamt sieben verschiedene Gruppen (siehe Tabelle 3.5 sowie Abbildung 3.5). Die mit 28 Proben (70%) größte Gruppe zeigte eine Länge von 137 Aminosäuren.

Gruppe	Modul 2	Modul 4	Länge [AS]	Isolate	Allele
1	1	2	113	2	1
2	1	3	125	2	2
3	1 _{del}	4	133	1	1
4	1	4	137	28	15
5	1	5	149	4	1
6	3	0	153	1	1
7	3	1	165	2	1

Tabelle 3.5: Gruppen der *FC27*-Allele.

Angegeben sind die sieben verschiedenen Gruppen der *FC27*-Allele mit der jeweiligen Anzahl Wiederholungen von Modul 2 und 4, der Länge in Aminosäuren (AS), der Anzahl Isolate sowie der Anzahl sequenzverschiedener Allele pro Gruppe. *del* zeigt eine Deletion in diesem Modul an.

Zusätzlich zu den Unterschieden in der Anzahl Wiederholungen der Module 2 und 4 fanden sich in den verschiedenen Allelen Polymorphismen einzelner Aminosäuren. Diese traten nur an wenigen bestimmten Positionen auf (Tabelle 3.6).

Bei Alleldifferenzierung nach Aminosäuresequenz fanden sich 22 distinkte Allele in 40 untersuchten Proben, entsprechend einer Diversität von $H_e = 0,96$. Wurden Allele nur nach Fragmentlänge unterschieden, halbierte sich die Diversität auf 0,43.

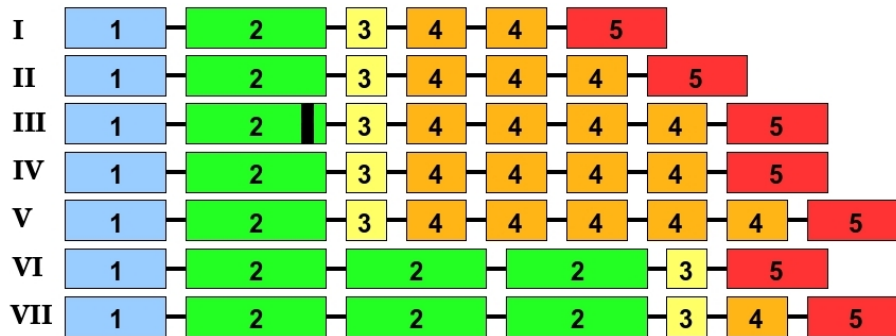


Abbildung 3.5: Modularer Aufbau der *FC27*-Allele.

Gezeigt werden die sieben verschiedenen Gruppen der *FC27*-Allele. Römische Ziffern geben die Gruppen-, arabische Ziffern die Modulnummer an; der schwarze Balken in Modul 2, Gruppe III symbolisiert eine Deletion.

Modul	Länge [AS]	Anzahl Polymorphismen	Positionen
1	16	4	9, 11, 13, 16
2	32	8	2, 4, 6, 7, 8, 10, 29, 31
3	7	0	—
4	12	3	1, 4, 6
5	34	0	—

Tabelle 3.6: Aminosäure-Polymorphismen in den *FC27*-Allelen.

Angegeben sind Länge in Aminosäuren, Anzahl sowie Positionen der Polymorphismen in den Modulen 1 – 5.

Charakterisierung der *3D7*-Allele Im Gegensatz zu den *FC27*-Allelen waren die *3D7*-Allele nur unter Inkaufnahme zahlreicher *mismatches* zu alignieren. Es fand sich kein einheitlicher modularer Aufbau, lediglich die Regionen der Primeransatzstellen waren relativ konserviert. Diversität wurde vor allem in einer Repeatregion generiert, in der sich verschiedene Motive von wenigen Basenpaaren Länge wiederholten. Diese Motive waren von Allel zu Allel unterschiedlich, auffiel ihr Reichtum an den Aminosäuren Glycin, Serin und Alanin.

Die Population der *3D7*-Allele erwies sich als sehr divers. Unter den 30 sequenzierten Proben traten 26 verschiedene Allele auf, entsprechend einer Diversität von 0,98. Bei Alleldefinition über die Fragmentlänge blieb die Diversität bei 0,98.

Vergleich beider Allelklassen Bereits beschrieben wurde der unterschiedliche Sequenzaufbau beider Allelklassen. Ein direkter Vergleich der jeweiligen Diversität erfolgte über die Allelauswertung nach Aminosäuresequenz sowie über die Fragmentlängenvarianz (siehe Tabelle 3.7 sowie Abbildungen 3.6 und 3.7).

Bei Alleldefintion nach Sequenz zeigten beide Allelklassen eine ähnlich hohe Di-

	Diversität nach Sequenz			Diversität nach Länge		
	Proben	Allele	H_e	Proben	Allele	H_e
<i>3D7</i>	30	26	0,98	18	15	0,98
<i>FC27</i>	40	22	0,96	33	6	0,43

Tabelle 3.7: Vergleich der Diversität der *3D7*- und *FC27*-Allele.

Angegeben sind für den Diversitätsvergleich bei Alleldefinition nach Aminosäuresequenz sowie nach Fragmentlänge jeweils die Anzahl Proben, die Anzahl Allele sowie die über den H_e -Wert berechnete Diversität innerhalb von *3D7*- und *FC27*-Klasse. Die Probenanzahl beim Diversitätsvergleich nach Länge ist etwas geringer, da hier nur Proben mit vollständig vorliegender *forward* und *reverse* Primersequenz gewertet wurden.

versität mit H_e -Werten von 0,98 (*3D7*) bzw. 0,96 (*FC27*). Jedoch fiel auf, dass in der *3D7*-Gruppe 80% der Proben ein einmalig vorkommendes Allel hatten, während dies in der *FC27*-Gruppe nur für 33% der Proben der Fall war.

Im Vergleich der Fragmentlängen war die *3D7*-Klasse ($H_e = 0,98$) mehr als doppelt so divers wie die *FC27*-Klasse ($H_e = 0,43$) (*FC27*). Abbildung 3.6 und 3.7 machen deutlich, dass in der Gruppe der *3D7*-Allele viele Fragmentlängen in niedriger Frequenz vorlagen, während sich die *FC27*-Allele auf wenige Längen verteilten, wobei der Großteil der Allele die gleiche Länge von 137 Aminosäuren aufwies.

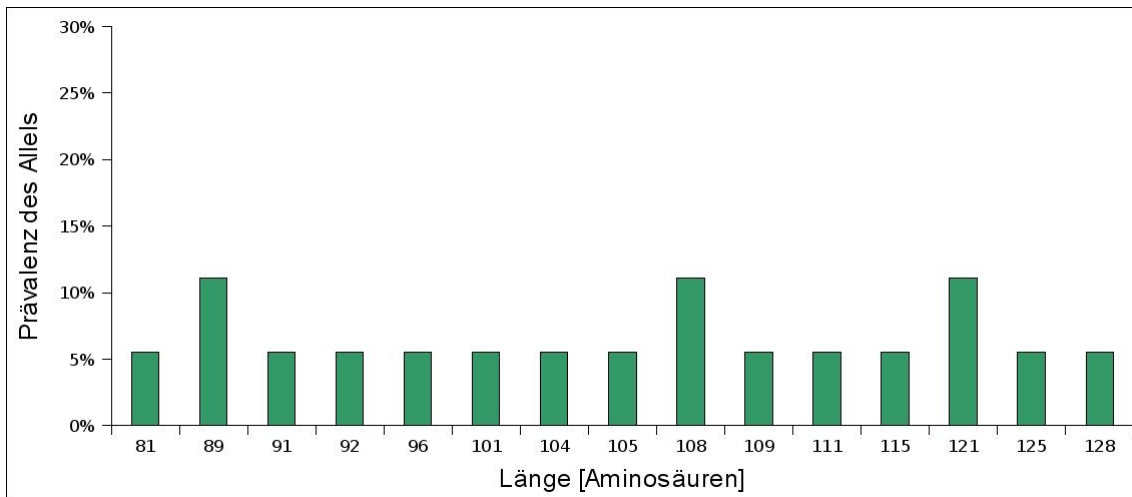


Abbildung 3.6: Verteilung der Fragmentlängen der *3D7*-Allele.

Gezeigt werden die Prävalenzen der verschiedenen Allele (definiert über die Länge in Aminosäuren) innerhalb der *3D7*-Allelklasse. Die Prozentangaben differieren etwas von vorigem Abschnitt, da hier nur Proben mit vollständig vorliegender *forward* und *reverse* Primersequenz gewertet wurden.

Analyse und Einordnung der sensitiven Isolate Die Sequenzierung der *msp2*-Loci der sensitiven Isolate sollte in erster Linie dazu dienen, diese mit den lokal vorherrschenden Allelen in der resistenten Population zu vergleichen. Es sollte geklärt

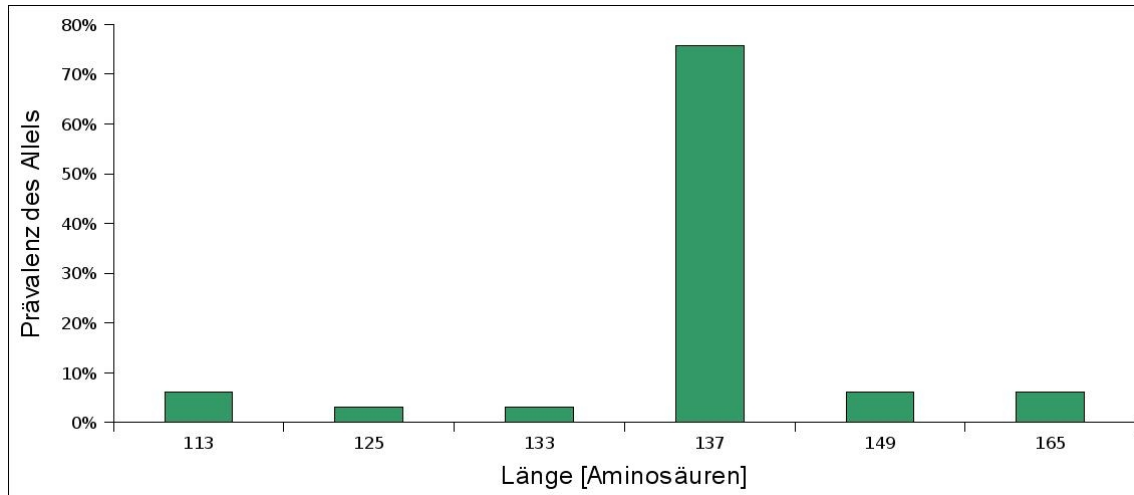


Abbildung 3.7: Verteilung der Fragmentlängen der *FC27*-Allele

Gezeigt werden die Prävalenzen der verschiedenen Allele (definiert über die Länge in Aminosäuren) innerhalb der *FC27*-Allelklasse. Die Prozentangaben differieren etwas von vorigem Abschnitt, da hier nur Proben mit vollständig vorliegender *forward* und *reverse* Primersequenz gewertet wurden; aus diesem Grunde ist auch das Allel der Länge 153 Aminosäuren in dieser Abbildung nicht vertreten.

werden, ob sich identische Sequenzen in der resistenten Population fänden, sowie ob die sensitiven Allele zu einer lokal dominanten Gruppe gehörten. Im Folgenden wird einzeln auf die *msp2*-Sequenz(en) jedes sensitiven Isolates eingegangen.

SP15 zeigte ein *FC27*-Allel, das identisch zu drei Sequenzen der aktuellen resistenten Population. Zudem gehörte es zu der lokal dominanten Gruppe (siehe Tabelle 3.5, Gruppe 4), welche 70% aller *FC27*-Sequenzen umfasste.

SP21 zeigte ein *3D7*-Allel, das sich in keiner anderen Probe fand. Allerdings ist anzumerken, dass allgemein der Großteil der *3D7*-Allele als Unikate vorlag.

SP26 zeigte sowohl ein *FC27*- als auch ein *3D7*-Allel, welche beide einmalig waren. Das *FC27*-Allel zeigte als einzige Sequenz eine Deletion von 4 Aminosäuren in Modul 2 und war damit alleiniges Mitglied seiner Gruppe (siehe Tabelle 3.5, Gruppe 3).

TDU28 zeigte ein *FC27*-Allel, welches identisch zu einer weiteren Sequenz war. Diese beiden Sequenzen bildeten eine eigene Gruppe (siehe Tabelle 3.5, Gruppe 1), die mit 114 Aminosäuren das kleinste aller Allele darstellte.

Korrelation Restriktionsverdau und Sequenzierung Nach der Sequenzierung wurden für alle *FC27*-Proben Schnittkarten mit den zuvor im Restriktionsver-

dau verwendeten Endonukleasen erstellt. Es zeigte sich, dass die Schnittstellen der Enzyme *AluI*, *HinfI* und *RsaI* alle an hochkonservierten Positionen in Modul 2, Modul 5 sowie *downstream* von Modul 5 (für den Restriktionsverdau wurde ein etwas größeres Fragment amplifiziert) lagen. *DdeI* schnitt lediglich eine der sequenzierten Proben, die Schnittstelle lag *upstream* von Modul 1 (siehe Abbildung 3.8).

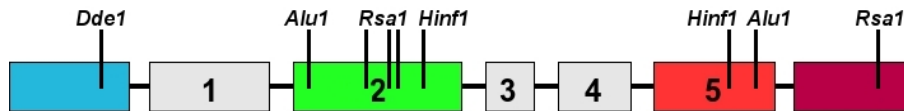


Abbildung 3.8: Schnittmuster der *FC27*-Allele.

Gezeigt ist das allgemeine Schnittmuster der *FC27*-Allele in Bezug auf die einzelnen Module. Arabische Ziffern geben die Modulnummern an, die Schnittstellen in den einzelnen Modulen sind mit jeweiliger Restriktionsendonuklease aufgeführt.

Da die Schnittstellen in den untersuchten Proben identisch waren (mit Ausnahme des *DdeI*-Verdaus), konnte eine Alleldifferenzierung mittels Restriktionsverdau nur erfolgen, wenn sich die Allele in der Anzahl Wiederholungen von Modulen unterschieden. Da hier jedoch 70% der *FC27*-Proben die gleiche Modulzusammensetzung zeigten, scheint zumindest in dieser Population ein Restriktionsverdau keine adäquate Allelerfassung zu ermöglichen.

Der *msp2*-Lokus als Marker für Diversität Die Alleldarstellung einer größeren Anzahl Proben ermöglicht es, den *msp2*-Lokus als Marker für Diversität innerhalb der untersuchten Population zu verwenden. In insgesamt 70 erhaltenen Sequenzen konnten wir 48 verschiedene Allele (*3D7* und *FC27*) differenzieren, wobei interessanterweise die Allelzahl für die Analyse der Aminosäure- und der Nukleinsäuresequenz identisch war. Der H_e -Wert betrug 0,98 mit einem 95%-Konfidenzintervall von [0,976; 0,992] und war signifikant höher ($p < 0,0001$) als der H_e -Wert neutraler Marker afrikanischer *P. falciparum*-Stämme (0,8). Bei Allelunterscheidung nur unter Bewertung der Fragmentlänge erhielten wir 21 verschiedene Allele in 51 Proben (die geringere Probenanzahl beruht darauf, dass hier nur Proben mit vollständiger *forward* und *reverse* Primersequenz gewertet wurden) entsprechend einem H_e -Wert von 0,76.

3.4 Analyse der Haplotypen

Wie beschrieben unter Abschnitt 2.7 wird in dieser Arbeit der Ausdruck „Haplotyp“ für die genetische Zusammensetzung des Chromosomenstückes um das *pfert*-Gen

verwendet. Aufgrund des in Abschnitt 1.2.3.4 erläuterten *selective sweeps* wird davon ausgegangen, dass alle resistenten Isolate aus Afrika und Südostasien weitgehend den gleichen Haplotypen haben. Als Referenz für die untersuchten resistenten Parasiten aus Lambaréné wurde daher der resistente südostasiatische Laborstamm *FCR3* verwendet. Im Gegensatz hierzu zeigen sensitive Stämme sehr diverse Haplotypen.

Durch die Analyse der Haplotypen sollten vor allem drei Punkte geklärt werden: Erstens, der Ähnlichkeitsgrad zwischen den sensitiven Haplotypen und denen der resistenten Population zwecks möglicher Rückschlüsse auf die Herkunft der sensitiven Isolate; zweitens, der Grad der Diversität bzw. Konservierung in der momentanen resistenten Population und die Frage nach der Existenz eines lokal dominanten Haplotypen; drittens die Entwicklung von Diversität bzw. Konservierung innerhalb der resistenten Population über die Jahre, insbesondere vor und nach der Änderung der nationalen Therapieleitlinien 2003.

Wir definierten den Haplotypen (Größe 107 kb) über die Kombination der sechs Mikrosatelliten *PE14D* (Entfernung zum *pfert*-Gen: -45 kb), *B5M77* (-18 kb), *3E7* (-11 kb), *9B12* (+2 kb), *7A11* (+21 kb), *PE14F* (+57 kb) sowie der Position 76 des *pfert*-Gens (76K oder 76T) (siehe Abbildung 3.9).

		kb	-45	-18	-11	0	+2	+21	+57	
		Telomer	PE14D	B5M77	3E7	<i>pfert</i>	9B12	7A11	PE14F	Zentromer
CQR	FCR3		8/10	11	12/7/12	76T	13	8	11	
CQS	3D7		10/15	13	14/5/13	76K	11	4	8	

Abbildung 3.9: Haplotypen der Stämme *FCR3* und *3D7*.

Gezeigt sind die sechs den Haplotyp definierenden Mikrosatelliten *PE14D*, *B5M77*, *3E7*, *9B12*, *7A11* und *PE14F* sowie die Resistenzmutation *pfert* K76T. Unterhalb der Abbildung des Chromosoms ist die entsprechende Sequenz in den Laborstämmen *FCR3* (resistent) und *3D7* (sensitiv) symbolisiert inkl. Angabe der Repeatzahl an den jeweiligen Mikrosatelliten.

Die Haplotyp-definierenden Mikrosatelliten wurden in 47 bzw. 48 Proben aus den Jahren 1995/96 (1/95C-Studie) und 2002 (Fall-Kontroll-Studie 2002) untersucht. Zur Darstellung der aktuellen resistenten Population wurden 76 Proben aus den Jahren 2005 – 07 verwendet, die sich wie folgt aus den verschiedenen Studien rekrutierten: 12 Proben aus der Ferroquin-Toleranz-Studie, 22 aus der IPTi-Studie, 15 aus der Antigen-Diversitäts-Studie und 27 aus der SP-Wirksamkeitsstudie. Die große Zahl an aktuellen Proben war nötig, da auf Grund der geringeren Konzentration an Plasmodien-DNA von einem Teil der Proben keine vollständigen Haplotypen bestimmt werden konnten. In die Analyse der einzelnen Mikrosatelliten wurden je-

weils alle für diesen Mikrosatelliten positiven Proben einbezogen, während für die Haplotypenanalyse nur Proben, die auf allen Mikrosatelliten positiv waren, verwendet wurden. Des Weiteren wurden die Haplotypen aller vier sensitiven Isolate dargestellt. Bei einem Großteil der aktuellen Proben sowie allen sensitiven Isolaten wurde zudem der Mikrosatellit *B5M47* (-0 kb) untersucht, um den Grad an Konservierung in unmittelbarer Nachbarschaft der Resistenzmutation K76T zu ermitteln. Dieser Marker wurde jedoch nicht zur Definition des Haplotypen verwendet.

Die Mikrosatellitenallele wurden durch PCR-Amplifikation des Markers und anschließende Sequenzierung ermittelt. Ein Allel wurde hierbei über die Repeatlänge des Mikrosatelliten definiert (siehe Abbildung 3.10).

QCR	[FCR3	GGATATATATATATATATATATATATA-----TTTT
		TDU28	GGATATATATATATATATATATATA-----TTTT
CQS	[SP15	GGATATATATATATATATATATATA-----TTTT
		SP21	GGATATATATATATATATATATATATATATATA--TTTT
CQR	[SP20	GGATATATATATATATATATATATATATA-----TTTT
		SP23	GGATATATATATATATATATATATATATA-----TTTT

Abbildung 3.10: Beispiel für Mikrosatellitenanalyse.

Gezeigt wird ein Alignment des ersten Repeats des Mikrosatelliten *3E7*, von oben nach unten: Allele von *FCR3* (resistent (CQR)), drei sensitiven (CQS) Isolaten, zwei resistenten Isolaten. Die Allele sind durch unterschiedliche Repeatlängen charakterisiert.

3.4.1 Rohdaten

Im Folgenden wird eine Übersicht über die untersuchten Proben gegeben. Als Referenz ist jeweils der resistente Laborstamm *FCR3* aufgeführt. Angegeben werden die Repeatmotive der Mikrosatelliten, darunter die Repeatanzahl in den untersuchten Proben. — bedeutet unerfolgreiche Sequenzierung bzw. unsaubere Sequenz.

Repeat	<i>PE14D</i> (TAC) _m (TAA) _n	<i>B5M77</i> (TA) _n	<i>3E7</i> (TA) _l (T) _m (TA) _n	<i>9B12</i> (TA) _n	<i>7A11</i> (TTATA) _n	<i>PE14F</i> (TAA) _n
FCR3	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
M1	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
M2	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
M4	8 / 10	14	—	14	5	11
M8	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	—
M30	9 / 15	11	12 / 7 / 12	13	8	9
M36	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
M37	7 / 15	14	—	14	8	11
M43	8 / 10	—	12 / 7 / 12	13	8	—
M48	8 / 14	14	—	14	5	10
M56	—	11	12 / 7 / 12	13	4	11
M59	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
M64	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
M65	11 / 11	11	12 / 7 / 12	13	8	11
M67	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
M72	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
M77	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
M80	10 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	10
M83	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
M94	—	11	12 / 7 / 12	13	8	15
M96	7 / 16	11	12 / 7 / 12	13	8	11
S21	9 / 14	14	12 / 7 / 12	13	8	11
S23	8 / 10	11	12 / 7 / 12	15	4	10
S25	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	2*	9
S28	8 / 10	11	14 / 9 / 10	13	8	15
S35	8 / 10	10	19 / 5 / 10	14	5	11
S37	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	12
S44	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
S45	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
S50	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
S52	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
S54	10 / 10	11	12 / 7 / 12	13	5	11
S55	11 / 11	11	12 / 7 / 12	13	8	15
S59	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
S60	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
S62	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
S65	9 / 15	11	12 / 7 / 12	13	8	15
S67	8 / 10	11	12 / 7 / 12	15	8	15
S71	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
S75	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
S78	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	7	11
S79	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
S80	9 / 11	11	12 / 7 / 12	13	8	15
S84	—	11	12 / 7 / 12	13	8	15
S86	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
S90	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
S95	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
S96	—	11	12 / 7 / 12	13	8	11

Tabelle 3.8: Mikrosatellitendaten der resistenten Isolate aus der 1/95C-Studie.

*Austausch eines Nukleotids in einem Repeatmotiv.

Repeat	<i>PE14D</i> (TAC) _m (TAA) _n	<i>B5M77</i> (TA) _n	<i>3E7</i> (TA) _l (T) _m (TA) _n	<i>9B12</i> (TA) _n	<i>7A11</i> (TTATA) _n	<i>PE14F</i> (TAA) _n
FCR3	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
N1	12 / 14	11	12 / 7 / 12	13	8	15
N2	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	9
N3	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	7	11
N4	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
N5	8 / 12	11	12 / 7 / 12	13	8	15
N7	9 / 15	11	12 / 7 / 12	13	2*	15
N8	10 / 11	11	12 / 7 / 12	13	8	15
N10	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
N12	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
N13	8 / 10	11	12 / 7 / 12	14	5	11
N14	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
N15	4 / 15	11	12 / 7 / 12	13	8	15
N17	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
N18	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
N19	8 / 10	11	12 / 7 / 12	14	5	11
N20	9 / 15	11	12 / 7 / 12	13	4	10
N21	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	14
N22	—	11	12 / 7 / 12	13	9	15
N23	10 / 12	11	12 / 7 / 12	13	8	7
N24	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
N25	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
N26	8 / 13	13	12 / 7 / 12	13	8	11
N27	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	8
N28	10 / 15	11	12 / 7 / 12	13	8	15
N29	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	9	11
N30	10 / 13	11	12 / 7 / 12	13	8	11
N33	—	11	12 / 7 / 12	13	5	11
N34	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	10
N35	8 / 10	11	12 / 7 / 12	—	5	11
N36	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	14
N37	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
N39	8 / 9	11	12 / 7 / 12	13	8	15
N40	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
N43	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
N44	8 / 17	11	12 / 7 / 12	14	7	11
N48	6 / 14	11	12 / 7 / 12	13	8	15
N49	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	4	10
N50	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	9
N51	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
N52	8 / 10	11	12 / 7 / 12	14	8	15
N53	9 / 15	8	17 / 5 / 10*	13	8	10
N54	8 / 10	11	12 / 7 / 12	14	5	11
N55	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	4	11
N56	12 / 12	17	12 / 7 / 12	13	8	11
N59	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
N60	8 / 10	11	12 / 7 / 12	15	4	11
N61	8 / 10	11	12 / 7 / 12	15	4	11
N63	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15

Tabelle 3.9: Mikrosatellitendaten der resistenten Isolate aus der 2002-Studie.

*Austausch eines Nukleotids in einem Repeatmotiv.

Repeat	<i>PE14D</i> (TAC) _m (TAA) _n	<i>B5M77</i> (TA) _n	<i>3E7</i> (TA) _l (T) _m (TA) _n	<i>9B12</i> (TA) _n	<i>7A11</i> (TTATA) _n	<i>PE14F</i> (TAA) _n
FCR3	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
FED4	8 / 10	11	12 / 7 / 12	14	5	11
FED11	9 / 11	11	12 / 7 / 12	13	8	15
FED12	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	9	15
FED15	9 / 12	—	12 / 7 / 12	13	8	10
TDR20	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	7	9
TDR24	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	9	15
TDU2	—	11	12 / 7 / 12	13	9	15
TDU4	11 / 12	11	—	13*	8	—
TDU8	10 / 13	11	12 / 7 / 12	13	8	15
TDU22	11 / 12	10	13 / 5 / 10	13	4	9
TDU25	—	11	12 / 7 / 12	13	8	11
TDU37	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	8

Tabelle 3.10: Mikrosatellitendaten der resistenten Isolate aus der Ferroquin-Toleranz-Studie.

*Austausch eines Nukleotids in einem Repeatmotiv.

Repeat	<i>PE14D</i> (TAC) _m (TAA) _n	<i>B5M77</i> (TA) _n	<i>3E7</i> (TA) _l (T) _m (TA) _n	<i>9B12</i> (TA) _n	<i>7A11</i> (TTATA) _n	<i>PE14F</i> (TAA) _n
FCR3	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
EBA 1	8 / 10	11	12 / 7 / 12	—	8	—
EBA 2	8 / 10	11	12 / 7 / 12	—	5	14
EOF	8 / 10	11	12 / 7 / 12	—	—	—
EJN	8 / 10	11	12 / 7 / 12	14	8	11
MAF	11 / 12	11	12 / 7 / 12	—	—	8
MLP 1	—	11	12 / 7 / 12	13	8	6
MLP 2	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
MMP	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
MMY	8 / 10	—	—	—	—	10
MOA	10 / 13	14*	9 / 5 / 13	13	8	13
MOL	8 / 10	11	9 / 7 / 9	13	8	15
NGA	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
NGD	8 / 10	11	12 / 7 / 12	—	8	15
NYA	8 / 10	11	—	—	8	11
PGA	—	11	12 / 7 / 12	—	4	10

Tabelle 3.11: Mikrosatellitendaten der resistenten Isolate aus der Antigen-Diversitäts-Studie.

*Austausch eines Nukleotids in einem Repeatmotiv.

Repeat	<i>PE14D</i> (TAC) _m (TAA) _n	<i>B5M77</i> (TA) _n	<i>3E7</i> (TA) _l (T) _m (TA) _n	<i>9B12</i> (TA) _n	<i>7A11</i> (TTATA) _n	<i>PE14F</i> (TAA) _n
FCR3	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
L1547 a2d0	8 / 10	11	12 / 7 / 12	14	—	11
L1568 a1d2	8 / 10	—	—	—	8	15
L1725 a1d0	7 / 14	11	12 / 7 / 12	13	8	15
L1882 a1d0	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	7
L1884 a1d0	8 / 10	11	12 / 7 / 12	—	8	11
L1928 a1d0	8 / 10	11	12 / 7 / 12	14	5	15
L2010 a4d0	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	9	11
L2021 a2d0	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
L2168 a1d0	8 / 11	11	12 / 7 / 12	13	8	11
L2200 a2d0	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
L2302 a1d0	10 / 12	11	12 / 7 / 12	13	8	15
L2302 a2d2	8 / 10	16	16 / 5 / 15	13	9	7
L2332 a2d0	9 / 9	11	12 / 7 / 12	13	8	10
L2332 a3d0	8 / 10	11	12 / 7 / 12	14	5	11
L2332 a4d0	9 / 17	11	12 / 7 / 12	13	8	11
L2334 a2d0	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
L2368 a1d2	8 / 10	11	—	—	9	9
L2374 a1d0	8 / 10	—	—	—	8	—
L2382 a2d2	8 / 10	—	—	—	—	—
L2382 a3d0	9 / 11	11	12 / 7 / 12	—	8	10
L2382 a4d0	—	11	12 / 7 / 12	13	8	15
L2202 a4d0	—	11	12 / 7 / 12	13	5	10

Tabelle 3.12: Mikrosatellitendaten der resistenten Isolate aus der IPTi-Studie.

Repeat	<i>PE14D</i> (TAC) _m (TAA) _n	<i>B5M77</i> (TA) _n	<i>3E7</i> (TA) _l (T) _m (TA) _n	<i>9B12</i> (TA) _n	<i>7A11</i> (TTATA) _n	<i>PE14F</i> (TAA) _n
FCR3	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
SP1	8 / 10	11	12 / 7 / 12	—	5	9
SP2	10 / 15	11	12 / 7 / 12	13	7	15
SP3	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	5	11
SP4	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
SP5	6 / 12	11	14 / 5 / 12	13	5	10
SP6	10 / 15	11	12 / 7 / 12	13	7	10
SP7	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	8
SP8	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	5	11
SP9	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
SP10	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
SP11	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
SP12	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
SP13	—	11	—	13	5	15
SP14	8 / 10	11	9 / 7 / 9	13	8	15
SP16	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
SP17	6 / 12	11	12 / 7 / 12	13	8	7
SP18	8 / 10	11	12 / 7 / 12	14	5	11
SP19	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
SP20	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15
SP22	8 / 10	11	—	13	9	11
SP23	12 / 12	11	12 / 7 / 12	13	8	10
SP24	12 / 12	11	12 / 7 / 12	13	8	—
SP25	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
SP27	8 / 10	11	—	13	8	—
SP28	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	9	11
SP29	12 / 13	11	12 / 7 / 12	13	6	10
SP15T	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	15

Tabelle 3.13: Mikrosatellitendaten der resistenten Isolate der SP-Wirksamkeitsstudie.

Repeat	<i>PE14D</i> (TAC) _m (TAA) _n	<i>B5M77</i> (TA) _n	<i>3E7</i> (TA) _l (T) _m (TA) _n	<i>9B12</i> (TA) _n	<i>7A11</i> (TTATA) _n	<i>PE14F</i> (TAA) _n
FCR3	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	8	11
SP15	8 / 10	11	17 / 5 / 10	18	5	10
SP21	6 / 10	19	6 / 7 / 15	—	5	12
SP26	8 / 10	11	12 / 7 / 12	13	5	11
TDU28	8 / 16*	10	12 / 5 / 10	8	6	13

Tabelle 3.14: Mikrosatellitendaten der sensitiven Isolate.

*Austausch eines Nukleotids in einem Repeatmotiv.

3.4.2 Analyse der aktuellen resistenten Population

Um einen Vergleichspunkt für die sensitiven Haplotypen zu haben, wurde zunächst die aktuelle lokale resistente Population an Hand von 76 Proben aus den Jahren 2005 – 07 dargestellt (siehe Tabellen 3.10–3.13). Das Allel bzw. der Haplotyp mit der jeweils höchsten Prävalenz wird als „dominant“ bezeichnet.

3.4.2.1 Auswertung der Mikrosatelliten

An den Mikrosatelliten *PE14D*, *B5M77*, *3E7*, *9B12* und *7A11* lag das *FCR3*-Allel dominant vor mit Prävalenzen zwischen 65 und 96%. Bei *PE14F* dominierte ein anderes Allel mit einer Prävalenz von 35%, wobei das *FCR3*-Allel mit 32% das zweithäufigste Allel darstellte; in diesem Falle wurden beide Allele als konserviert betrachtet. Die Diversität stieg mit zunehmendem Abstand zum *pfcr3*-Gen *up-* wie *downstream*, die Konservierung, entsprechend der Prävalenz des dominanten Allels, verhielt sich gegenteilig (Ausnahme *B5M77*). Des Weiteren war der Grad an Konservierung *upstream* deutlich höher als in der Region *downstream* des *pfcr3*-Gens, die Diversität war analog *upstream* geringer als *downstream*. Eine Synopsis von Diversität und Konservierung der Haplotyp-definierenden Mikrosatelliten in den Jahren 2005 – 07 bietet Tabelle 3.15.

	<i>PE14D</i>	<i>B5M77</i>	<i>3E7</i>	<i>9B12</i>	<i>7A11</i>	<i>PE14F</i>
Abstand <i>pfcr3</i> [kb]	-45	-18	-11	+2	+21	+57
Probenanzahl	69	71	66	61	71	69
Proben mit kons. Allel	49	68	60	55	46	46
Konservierung	71%	96%	91%	90%	65%	67%
Allelanzahl	14	4	6	2	6	9
Diversität (H_e)	0,49	0,08	0,17	0,18	0,55	0,76

Tabelle 3.15: Konservierung und Diversität in den Jahren 2005 – 07.

Angegeben sind Anzahl untersuchter Proben, Proben mit dem konservierten Allel, Anzahl verschiedener Allele sowie die daraus berechnete Konservierung und Diversität (als erwartete Heterozygotie H_e) an den Haplotyp-definierenden Mikrosatelliten.

Statistische Auswertung Siehe Abschnitt 3.4.4.1, Seite 57.

Auswertung des ergänzenden Mikrosatelliten *B5M47* Zur weiteren Erfassung des Grades an Konservierung in unmittelbarer Umgebung des *pfcr3*-Lokus wurde bei 54 Proben der aktuellen resistenten Population *B5M47*, welcher nur etwa

100 bp *upstream* der Resistenzmutation K76T liegt, sequenziert. Dieser Mikrosatellit verfügt über einen $(TA)_n$ -Repeat, bei *FCR3* liegen hier 16 Wiederholungen vor.

Von den untersuchten 54 resistenten Proben besaßen 51 das *FCR3*-Allel. Zwei Proben hatten ein Allel mit 12 Repeats, eine Probe zeigte ein Allel mit 17 Repeats. Insgesamt ergab dies eine Konservierung von 94% und eine Diversität von 0,11.

3.4.2.2 Auswertung der Haplotypen

Der Fokus lag auf der Frage nach der Existenz eines lokal dominanten Haplotypen in der aktuellen resistenten Population. Wenn dem so sei, sollten mögliche Unterschiede zum *FCR3*-Haplotyp aufgezeigt sowie die Prävalenz dieses Haplotypen in der Population ermittelt werden.

Es zeigte sich, dass ein Haplotyp dominant vorlag, der sich vom *FCR3*-Haplotypen am Mikrosatelliten *PE14F* unterschied. An diesem Marker lag anstelle des *FCR3*-Allels (11 Repeats) das lokal dominante Allel (15 Repeats) vor. Insgesamt fand sich der lokal dominante Haplotyp in 9 von 49 Proben (18%). Der *FCR3*-Haplotyp lag in 7 Proben (14%) vor und stellte so den zweithäufigsten Haplotypen dar. Beide wurden als konserviert betrachtet, der Konservierungsgrad betrug demnach 33%. Eine abstrahierte Darstellung des lokal dominanten Haplotypen zeigt Abbildung 3.11.

kb	-45	-18	-11	0	+2	+21	+57	
Telomer	PE14D	B5M77	3E7	pfert	9B12	7A11	PE14F	Zentromer
CQR FCR3	8/10	11	12/7/12	76T	13	8	11	
CQR lokal	8/10	11	12/7/12	76T	13	8	15	

Abbildung 3.11: Lokal dominanter resistenter Haplotyp.

Gezeigt sind der Haplotyp des resistenten (CQR) Referenzstammes *FCR3* (resistent) und der lokal dominante resistente Haplotyp inkl. Angabe der Repeatzahl an den jeweiligen Mikrosatelliten.

3.4.3 Analyse der sensitiven Isolate

In den sensitiven Isolaten wurden alle sechs haplotypdefinierenden Mikrosatelliten (siehe Tabelle 3.14) sowie *B5M47* untersucht. Der Vergleich der sensitiven Mikrosatellitenallele mit denen der resistenten Population zeigte, dass SP21 und TDU28 einen von der resistenten Population komplett verschiedenen Haplotypen besaßen. Auch unterschieden sie sich untereinander an jedem einzelnen Mikrosatelliten. SP15

besaß an den zwei am weitesten *upstream* gelegenen Mikrosatelliten *PE14D* und *B5M77* das *FCR3*-Allel und war demnach auf diesem Chromosomenstück identisch zum lokal dominanten resistenten Haplotyp. An den direkt das *pfert*-Gen flankierenden Mikrosatelliten *3E7* und *9B12* sowie an den weiter *downstream* gelegenden Markern *7A11* und *PE14F* zeigte er jedoch andere Allele (siehe Abbildung 3.12). Die sensitiv-resistente Mischinfektion SP26 besaß mit Ausnahme des Markers *7A11* den *FCR3*-Haplotyp, was darauf hindeutet, dass der Haplotyp des in der Probe enthaltenen resistenten Stammes sequenziert wurde.

kb		-45	-18	-11	0	+2	+21	+57	
Telomer		PE14D	B5M77	3E7	<i>pfert</i>	9B12	7A11	PE14F	Zentromer
CQR	lokal	8/10	11	12/7/12	76T	13	8	15	
CQS	SP15	8/10	11	17/5/10	K76	8	5	10	
CQS	SP21	6/10	19	6/7/15	K76		5	12	
CQS	TDU28	8/16	10	12/5/10	K76	8	6	13	

Abbildung 3.12: Haplotypen der sensitiven Monoinfektionen.

Gezeigt sind die Haplotypen der sensitiven (CQS) Monoinfektionen SP15, SP21 und TDU28 im Vergleich zum lokal dominanten resistenten (CQR) Haplotyp inkl. Angabe der Repeatzahl an den jeweiligen Mikrosatelliten. Die Sequenzierung des Markers *9B12* im Isolat SP21 war nicht erfolgreich, das entsprechende Feld ist daher grau hinterlegt. Auf eine Darstellung des Haplotypen von SP26 wurde verzichtet, da hier der sensitive Haplotyp auf Grund der Mischinfektion nicht abgrenzbar war.

Statistische Auswertung Auf Grund der Tatsache, dass der Haplotyp des sensitiven Isolats SP15 an den am weitesten *upstream* gelegenen Mikrosatelliten *PE14D* und *B5M77* identisch zum lokal dominanten resistenten Haplotypen war, sich an den weiter *downstream* gelegenen Mikrosatelliten jedoch von diesem unterschied, stellte sich die Frage, mit welcher Wahrscheinlichkeit der Stamm SP15 das durch *PE14D* und *B5M77* repräsentierte Chromosomenstück durch Kreuzung von einem resistenten Stamm erhalten hat bzw. mit welcher Wahrscheinlichkeit es per Zufall in der sensitiven Population entstanden ist. Als Ausgangsdatenlage wurde hierbei für die resistente Population die in dieser Arbeit untersuchten resistenten Proben aus Lambaréné der Jahre 1995/96, 2002 und 2005 – 07 (siehe auch Abschnitt 3.4.4), für die sensitive Population – mangels einer ausreichend großen Anzahl sensitiver Stämme in Lambaréné – die sensitiven afrikanischen Stämme aus der Publikation von Wootton et al. (2002) genommen, wobei nur Proben mit vollständigem Haplotyp

(*PE14D + B5M77*) beachtet wurden.

Die Odds, dass SP15 das *PE14D-B5M77*-Chromosomenstück von einem resistenten Stamm erhalten hat, beträgt 107 mit einem 95%-Konfidenzintervall von [19;4265]. Es ist demnach 107 mal wahrscheinlicher, dass dieses Chromosomenstück einen resistenten Ursprung hat.

Auswertung des ergänzenden Mikrosatelliten *B5M47* Am direkt im *pfcr3*-Gen liegenden Mikrosatelliten *B5M47* zeigten SP15 und TDU28 ein Allel mit 13 Repeats. SP21 besaß interessanterweise das *FCR3*-Allel, ebenso SP26. Bei letzterem ist dieses Ergebnis jedoch wahrscheinlich auf das in dieser Mischinfektion enthaltene resistente Isolat zurückzuführen.

3.4.4 Analyse der resistenten Haplotypen über die Jahre

Zur Darstellung der Entwicklung der einzelnen Mikrosatellitenallele sowie der Haplotypen über die Jahre wurden die sechs den Haplotypen definierenden Mikrosatelliten in Kohorten aus den Jahren 1995/96 und 2002 sequenziert (siehe Tabellen 3.9 und 3.8). Es sollten vor allem die Prävalenzen der dominanten Allele bzw. des dominanten Haplotypen in der aktuellen resistenten Population mit denen in früheren Populationen verglichen werden, um so eine mögliche Zu- oder Abnahme der Konservierung aufzuzeigen. Des Weiteren sollte die Diversitätsentwicklung beurteilt werden. Im Folgenden werden daher die Daten der Populationen der Jahre 1995/96 und 2002 direkt denen der aktuellen resistenten Population (2005 – 07) gegenüber gestellt.

3.4.4.1 Auswertung der Mikrosatelliten

Sowohl in den Jahren 1995/96 als auch 2002 fanden sich die gleichen dominanten Allele wie in der aktuellen resistenten Population. Dies war mit Ausnahme von *PE14F* das *FCR3*-Allel. Am Marker *PE14F* lag zu allen Zeitpunkten ein Allel mit 15 Repeats dominant vor, jedoch war das *FCR3*-Allel stets das zweithäufigste Allel mit nur geringfügig kleineren Prävalenzen. Es scheint daher die Situation am besten wiederzugeben, wenn beide Allele als konserviert betrachtet werden.

Konservierungsgrad der einzelnen Mikrosatelliten entwickelte sich über die Jahre unterschiedlich. An den am weitesten *downstream* gelegenen Markern *7A11* und *PE14F* fand sich über die Jahre eine deutliche Abnahme der Konservierung (bei *PE14F* nahm die Prävalenz sowohl des dominanten wie des *FCR3*-Allels ab). An den übrigen Mikrosatelliten änderte sich der Grad an Konservierung kaum bzw. nahm im

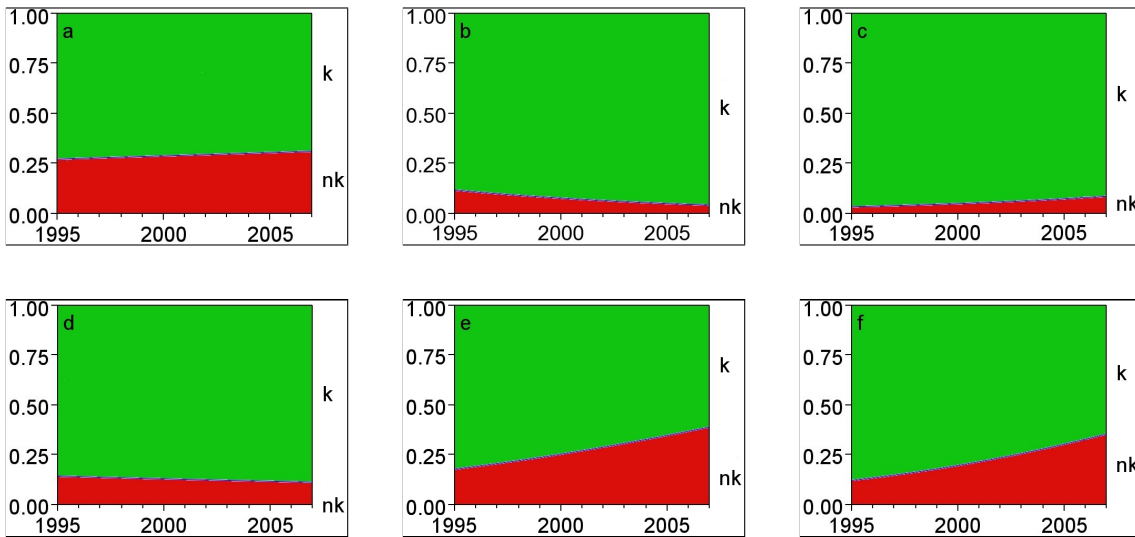


Abbildung 3.13: Entwicklung des Konservierungsgrades der Mikrosatelliten
Gezeigt sind graphische Darstellungen der Konservierungsentwicklung in den Mikrosatelliten (a) *PE14D*, (b) *B5M77*, (c) *3E7*, (d) *9B12*, (e) *7A11* und (f) *PE14F*. Die x-Achse gibt die Zeit in Jahren, die y-Achse den relativen Anteil der nicht-konservierten Allele an der Gesamtpopulation an. In grün ist der relative Anteil des konservierten Allels (k), in rot der der Gesamtheit aller nicht-konservierten Allele (nk) dargestellt. Die Gerade wurde aus der logistischen Regression der Konservierungsentwicklung berechnet, wobei hier eine positive Steigung eine Abnahme der Konservierung anzeigt.

Fall von *B5M77* (*upstream* gelegen) sogar etwas zu. Insgesamt lässt sich also sagen, dass die chromosomale Region *upstream* sowie direkt an das *pfcr1*-Gen angrenzend über die Jahre konserviert blieb, während die Region *downstream* Veränderungen in Richtung schwächerer Konservierung durchlief.

Die Diversität verhielt sich ähnlich – sie nahm an den Markern *7A11* und *PE14F* über die Jahre deutlich zu, sank für *B5M77* etwas ab und zeigte ansonsten nur kleinere Veränderungen.

Eine Übersicht über die Mikrosatellitendaten der Jahre 1995/96, 2002 und 2005–07 bietet Tabelle 3.16, die Entwicklung des Konservierungsgrades der Mikrosatelliten ist in Abbildung 3.13 dargestellt.

Verlauf der erwarteten Heterozygotie (H_e) Zur Darstellung des Diversitätsverlaufes über den gesamten Haplotypen wurde für jeden einzelnen Marker die erwartete Heterozygotie (H_e) zu allen Untersuchungszeitpunkten berechnet. Es wird zum einen deutlich, dass die Diversität mit zunehmendem Abstand zum *pfcr1*-Gen zunimmt, zum anderen, dass generell die Diversität im Bereich *downstream* des *pfcr1*-Gens höher ist als *upstream*. Letzteres trifft insbesondere für die Population von 2005–07 zu. Des Weiteren muss angemerkt werden, dass die Unterschiede zwischen

Marker	Population	1995/96	2002	2005 – 07
PE14D	Probenanzahl	43	46	69
	Allelanzahl	9	14	14
	Diversität (H_e)	0,45	0,55	0,50
	Proben mit dom. Allel	32	31	49
	Konservierung	74%	67%	71%
B5M77	Probenanzahl	46	48	71
	Allelanzahl	3	4	4
	Diversität (H_e)	0,20	0,12	0,08
	Proben mit dom. Allel	41	45	68
	Konservierung	89%	94%	96%
3E7	Probenanzahl	44	48	66
	Allelanzahl	3	2	6
	Diversität (H_e)	0,09	0,04	0,17
	Proben mit dom. Allel	42	47	60
	Konservierung	95%	98%	91%
9B12	Probenanzahl	47	47	61
	Allelanzahl	3	3	2
	Diversität (H_e)	0,24	0,27	0,18
	Proben mit dom. Allel	41	40	55
	Konservierung	87%	85%	90%
7A11	Probenanzahl	47	48	71
	Allelanzahl	5	6	6
	Diversität (H_e)	0,31	0,51	0,55
	Proben mit dom. Allel	39	33	46
	Konservierung	83%	69%	65%
PE14F	Probenanzahl	45	48	69
	Allelanzahl	5	7	9
	Diversität (H_e)	0,63	0,69	0,76
	Proben mit dom. Allel	21	20	24
	Prävalenz dom. Allel	47%	42%	35%
	Proben mit <i>FCR3</i> -Allel	18	18	22
	Prävalenz <i>FCR3</i> -Allel	40%	38%	32%
	Konservierung	87%	79%	67%

Tabelle 3.16: Mikrosatellitendaten der Jahre 1995/96, 2002 und 2005 – 07.

Angegeben sind für jeden Mikrosatellitenmarker die Anzahl untersuchter Proben, verschiedener Allele und Proben mit dem dominanten Allel sowie die daraus berechnete Diversität (als erwartete Heterozygotie H_e) und Konservierung in den Jahren 1995/96, 2002 und 2005 – 07. Im Falle, dass das *FCR3*-Allel nicht das dominante Allel darstellt, ist zusätzlich die Anzahl Proben mit dem *FCR3*-Allel sowie dessen Prävalenz aufgeführt.

den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten nicht sehr umfangreich waren (siehe Abbildung 3.14).

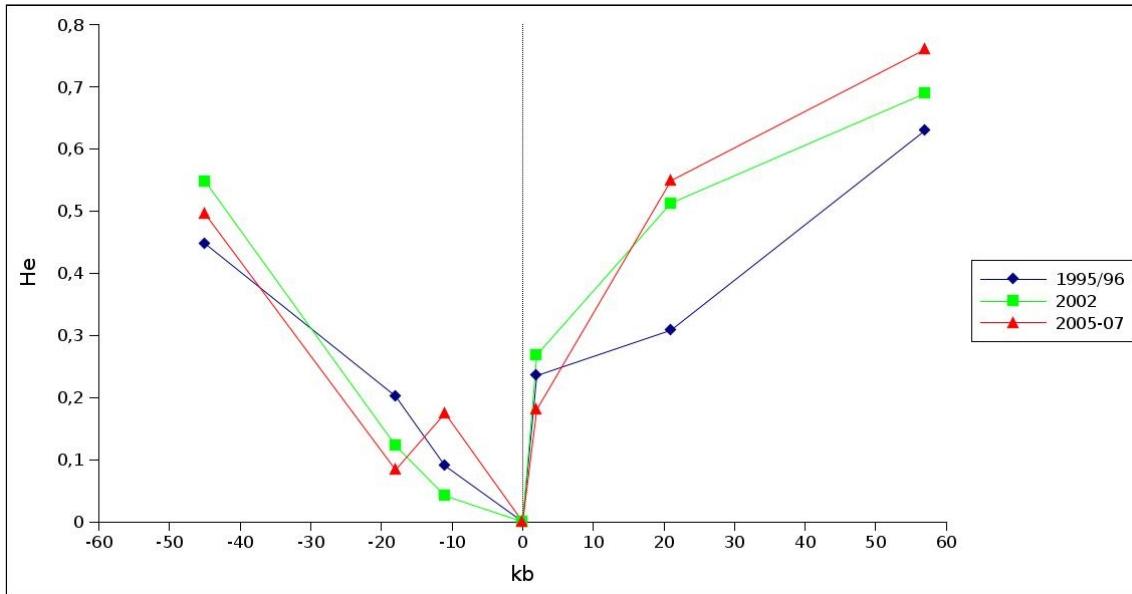


Abbildung 3.14: Verlauf der erwarteten Heterozygotie (H_e) über den Haplotypen. Gezeigt sind die H_e -Werte der Populationen von 1995/96, 2002 und 2005 – 07 in Relation zum Abstand vom *pfert*-Locus. Jeder Punkt entspricht der Position eines Mikrosatelliten, - deutet downstream-, + upstream-Richtung vom *pfert*-Gen (Position 0 kb) an.

Statistische Auswertung Für den Marker *7A11* lag eine signifikante Reduktion des Konservierungsgrades von 1995/96 nach 2005 – 07 vor ($p = 0,035$), ebenso für den Marker *PE14F* ($p = 0,018$). Für alle anderen Mikrosatelliten fand keine signifikante Entwicklung über die Jahre statt.

Die Betrachtung des H_e -Wertes ergab, dass mit Ausnahme von *PE14F* in der Jahrekohorte 2005 – 07 alle Mikrosatelliten zu allen Zeitpunkten einen signifikant kleineren H_e -Wert ($p \leq 0,05$) als 0,8 (H_e -Wert unselektionierter Marker in afrikanischen *P. falciparum*) besaßen. Diese Marker zeigten also eine signifikant reduzierte Variabilität, was bedeutet, dass die von ihnen abgedeckte chromosomale Region noch im Bereich des *selective sweeps* liegt. Eine signifikante Entwicklung von H_e über die Jahre konnte nur für *B5M77* nachgewiesen werden, hier nahmen die H_e -Werte von 1995/96 nach 2005 – 07 allerdings signifikant ab ($p = 0,037$).

3.4.4.2 Auswertung der Haplotypen

Bei der Auswertung der Haplotypen in den Jahren 1995/96 und 2002 zeigte sich der gleiche dominante Haplotyp wie in der aktuellen resistenten Population. Die

Prävalenz des *FCR3*-Haplotypen war zu allen Zeitpunkten nur geringfügig kleiner.

Die Konservierung des Haplotypen nahm von 1995/96 nach 2005 – 07 stetig ab. Die stärkste Entwicklung fand hierbei zwischen 1995/96 und 2002 statt. Eine Übersicht der Haplotypenanalyse der Jahre 1995 – 2007 bietet Tabelle 3.17.

Population	1995/96	2002	2005 – 07
Probenanzahl	38	45	49
Proben mit dom. Haplotyp	14	10	9
Prävalenz dom. Haplotyp	37%	22%	18%
Proben mit <i>FCR3</i>-Haplotyp	8	4	7
Prävalenz <i>FCR3</i>-Haplotyp	21%	9%	14%
Konservierung	61%	33%	33%

Tabelle 3.17: Haplotypdaten der Jahre 1995/96, 2002 und 2005 – 07.

Angegeben sind die Anzahl Proben mit vollständigem Haplotyp, die Anzahl Proben mit dem dominanten Haplotyp sowie die daraus berechnete Konservierung in den Jahren 1995/96, 2002 und 2005 – 07. Zusätzlich ist die Anzahl Proben mit dem *FCR3*-Haplotyp sowie dessen Prävalenz aufgeführt.

Statistische Auswertung Es zeigte sich eine signifikante Abnahme des Konservierungsgrades des Haplotypens ($p = 0,015$).

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Rückkehr der Chloroquin-Sensitivität im weltweiten Vergleich

Rückkehr der Chloroquin-Sensitivität im weltweiten Vergleich Wir konnten in dieser Arbeit – erstmals seit der Änderung der nationalen Therapierichtlinien im Jahre 2003 – wieder *P. falciparum*-Stämme mit dem Wildtypallel des *pfcr*-Gens in Lambaréné, Gabun, nachweisen. Chloroquin-sensitive Parasiten fanden sich in 3% der untersuchten Proben aus dem Zeitraum 2005 – 07 bzw. 5% der Proben im Jahre 2007. Aus diesen Daten geht jedoch nicht hervor, ob es sich bei der gefundenen Rückkehr sensitiver Parasiten um einen andauernden Trend handelt, ob sich die Resistenzlage auf weiterhin hohem Niveau einpendeln, oder ob der geringe Anteil sensitiver Parasiten wieder vollkommen zurückgehen wird.

Weltweit finden sich bisher nur wenige molekulargenetisch bestätigte Berichte eines Rückgangs des Chloroquin-Resistenzniveaus nach offiziellem Stopp des Chloroquin-Gebrauchs. Die Idee, Chloroquin könne durch Absinken des Selektionsdruckes wieder wirksam werden, wurde erstmals von Jacquier et al. (1985) aufgrund ihrer *in vivo*-Beobachtungen in Vietnam geäußert. Diese Beobachtungen konnten jedoch nicht bestätigt werden. Auch spätere *in vitro*-Studien aus Lambaréné, Gabun [Schwenke et al. (2001)] und Vietnam [Huong et al. (2001), Thanh et al. (2001)], die von einem Rückgang des Chloroquin-Resistenzniveaus berichteten, wurden in Nachfolgearbeiten wiederlegt [Borrmann et al. (2002), Nguyen et al. (2003)]. Im Falle der gabunesischen Studie von Schwenke et al. (2001) war die falsch-niedrig ermittelte Resistenz der Proben auf eine mangelnde Qualität der vorgefertigten WHO-Kulturplatten zurückzuführen. Borrmann et al. (2002) zeigten auf ordnungs-

gemäß dosierten Kulturplatten eine 100%ige Resistenz *in vitro* von Proben aus dem gleichen Studiengebiet. Zudem konnten sie sowohl *in vivo* als auch mittels molekulargenetischer Bestimmung der *pfcr*t 76T-Mutation ein Resistenzniveau von 100% nachweisen.

Schließlich konnte in Malawi, wo 1993 die Therapieempfehlungen von Chloroquin auf Sulfadoxin-Pyrimethamin umgestellt worden waren, der erste molekulargenetisch bestätigte Rückgang Chloroquin-resistenter Parasiten verzeichnet werden. Während 1992 noch 85% der Isolate das resistente *pfcr*t-Allel 76T zeigten, sank dieser Anteil bis zum Jahr 2000 auf 13% [Kublin et al. (2003)] bzw. 2% [Mita et al. (2003)]. Laufer et al. (2006) führten 2006 eine erste klinische Studie mit Chloroquin zur Behandlung von unkomplizierter *P. falciparum*-Malaria in Malawi durch, die eine Wirksamkeit von 99% zeigte.

Ein ähnlicher Trend wie in Malawi, wenn auch in weit geringerem Ausmaß, zeichnete sich in Hainan, China, ab. Nach dem Chloroquin-Stopp 1979 sank dort die Prävalenz des 76T-Allels von 90% im Zeitraum 1978 – 81 auf 54% im Jahre 2001 [Wang et al. (2005)]. Ganz aktuell wird ein Rückgang der 76T-Prävalenz auch aus Tansania (Chloroquin-Stopp 2001; Prävalenz 76T 2003 94%, 2007 70% [Alifrangis et al. (2009)]) und Sambia (Chloroquin-Stopp 2002; Prävalenz 76T 2002 ~90%, 2006/07 54% [Chaponda et al. (2008) *unpublished*]) berichtet. Aus Tansania liegt zudem eine Studie an seziierten Mosquitos vor, die ebenfalls einen Rückgang Chloroquin-resistenter Parasiten nach dem Chloroquin-Stopp feststellen konnte [Temu et al. (2006)]. Mwai et al. (2009) verfolgten die Prävalenz der Resistenzmutation in Kenia vor und nach dem Chloroquin-Stopp im Jahre 1999 und konnten einen Rückgang des 76T-Allels von 94% 1993 auf 63% 2006 verzeichnen. Interessanterweise sank hier das Resistenzniveau bereits vor Änderung der Therapierichtlinien ab, so dass die Autoren vermuteten, dass Chloroquin auf Grund mangelnder Wirksamkeit schon vor dem offiziellen Stopp an Popularität verloren hatte. Dasselbe Phänomen – der Rückgang des resistenten Allels in Abwesenheit von Medikamentendruck – konnte in kleinerem Maßstab in einer Studie aus dem Sudan gezeigt werden, die den Verlauf der Prävalenz der 76T-Mutation während Trocken- und Regenzeit verfolgte. Die Prävalenz des resistenten Allels nahm im Laufe der Regenzeit zu, um dann über die Trockenzeit – die Phase niedriger Malariatransmission und damit niedrigem Medikamenteneinsatz – wieder abzufallen [Abdel-Muhsin et al. (2004)]. Eine analoge Studie aus Gambia kam zum gleichen Ergebnis [Ord et al. (2007)]. Ein weiterer Aspekt dieser beiden Arbeiten ist jedoch die rasche Zunahme des resistenten Allels – im Laufe einer Regenzeit, d.h. innerhalb von Monaten – unter Selektionsdruck

durch den Einsatz von Chloroquin. Dieses sehr dynamische Verhalten sollte im Hinterkopf behalten werden, wenn die Wiedereinführung von Chloroquin in Gebieten mit rückläufiger Resistenzlage diskutiert wird.

Daneben gibt es auch Beispiele, die eine Fixation von Resistenzgenen innerhalb einer Population berichten, obwohl das entsprechende Medikament bereits seit Jahren nicht mehr eingesetzt wurde. So zeigte in Thailand rund 30 Jahre nach der Verbannung von Chloroquin aus den nationalen Therapierichtlinien das resistente *pfert*-Allel 76T immer noch eine Prävalenz von 100% [Anderson et al. (2005), Nash et al. (2005)]. Ebenfalls eine 100%ige Fixierung des 76T-Allels lag in Peru zwölf Jahre, in Osttimor fünf Jahre nach offiziellem Chloroquin-Stopp vor [Bacon et al. (2009), de Almeida et al. (2009)]. Mögliche Erklärungen hierfür bieten der fortgeführte Einsatz von Chloroquin in Nachbarländern sowie gegen *P. vivax*-Malaria. Zudem kann die niedrigere Transmission, welche häufigere Selbstfertilization („*inbreeding*“) und damit eine niedrigere Rekombinationsrate zur Folge hat [Conway et al. (1999)], angeführt werden. Die Resistenzgene gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin *dihydrofolate reductase* (*dhfr*) und *dihydropteroate synthetase* (*dhps*) waren in Venezuela acht Jahre nach Änderung der Leitlinien weiterhin fixiert [McCollum et al. (2007)].

Mögliche Erklärungen für die in Gabun beobachtete Entwicklung Vergleicht man die Resistenzentwicklung in Lambaréné nun mit den anderen Berichten zunehmender Chloroquin-Sensitivität, so springt ins Auge, dass das Ausmaß der Entwicklung deutlich geringer war. Während in Malawi die Prävalenz des sensitiven *pfert*-Allels in vergleichbarem Zeitraum von 15% auf 74% zunahm [Kublin et al. (2003)], stieg sie in Lambaréné lediglich von 0% auf 5%. Für diesen Umstand gibt es einige mögliche Erklärungen.

Zunächst war die Ausgangsmenge sensitiver Parasiten zum Zeitpunkt des offiziellen Chloroquin-Stopps in Lambaréné deutlich geringer. In wiederholten Studien wurde eine Prävalenz der 76T-Mutation von 100% gemessen [Binder et al. (2002), Mayengue et al. (2007)]. Auch im Nachbarstaat Republik Kongo lag das Resistenzniveau bei 100% [Mayengue et al. (2005)], was die Wahrscheinlichkeit der Einwanderung sensitiver Parasiten aus dem Umland verringert. Im Gegensatz dazu starteten Malawi, Kenia, Tansania und Sambia, die zudem benachbart liegen, mit einem Resistenzniveau zwischen 85% und 94%. Auch in Hainan lag die Prävalenz resistenter Parasiten mit 90% in dieser Größenordnung; hier war außerdem die Zeitspanne seit dem Chloroquin-Stopp deutlich größer. Zwar heißt ein gemessenes Resistenzniveau von 100% nicht, dass überhaupt keine sensitiven Parasiten in der Population zu

finden sind, sondern lediglich, dass ihre Prävalenz unterhalb der Messgenauigkeit liegt. Überträgt man jedoch das von Wootton et al. (2002) aufgestellte Modell, welches die Ausbreitungsgeschwindigkeit eines selektierten Resistenzallels abhängig von der Ausgangsmenge dieses Allels innerhalb der Population berechnet, auf die momentane Situation – die negative Selektion des Resistenzallels bzw. die positive Selektion des sensitiven Allels unter fehlendem Medikamentendruck –, so kann man folgenden Schluss ziehen: Geht der Anteil der sensitiven Parasiten an der Gesamtpopulation zum Startzeitpunkt gegen Null, so steigt die Anzahl Generationen, die nötig sind, um eine bestimmte Prävalenz sensitiver Stämme zu erreichen, bei konstantem Selektionskoeffizienten gegen Unendlich.

Ein weiterer Unterschied zwischen Gabun und den ostafrikanischen Staaten Malawi, Kenia, Tansania und Sambia liegt in der Wahl der Medikamente, die Chloroquin in den nationalen Therapierichtlinien ersetzen. Während in den vier letztgenannten Staaten Sulfadoxin-Pyrimethamin bzw. später Artemether-Lumefantrin empfohlen wurde, wurde in Gabun die Kombination Artesunat plus Amodiaquin Medikation der ersten Wahl [WHO (2008a)]. Amodiaquin ist dem Chloroquin strukturell verwandt, beide gehören zur Gruppe der 4-Aminoquinoline. Mehrere Studien konnten inzwischen zeigen, dass Amodiaquin für das Chloroquin-resistente Allel *pf-crt* 76T selektiert [Holmgren et al. (2006), Djimdé et al. (2008), Mwai et al. (2009)]. Weder für Lumefantrin noch für Artemisininderivate liegen ähnliche Berichte vor. Der Einsatz von Amodiaquin in Gabun könnte daher den postulierten Selektionsvorteil Chloroquin-sensitiver Parasiten in Abwesenheit von Chloroquin verringern und so deren Ausbreitung entgegenstehen. Diese Vermutung wird von Beobachtungen aus Kamerun gestützt, wo Chloroquin ebenfalls durch Amodiaquin bzw. später Amodiaquin plus Artesunat als Medikament der ersten Wahl abgelöst wurde. Nach Änderung der Therapierichtlinien wurde hier sogar eine leichte Zunahme der Resistenz gegenüber Chloroquin verzeichnet [Basco und Ringwald (2007)].

Ein Faktor, der ebenfalls die Ausbreitung sensitiver Stämme beeinflussen sollte, ist die Rigorosität der Umsetzung der neuen Therapieleitlinien. Aus Malawi wurde ein sehr konsequenter Stopp des Chloroquin-Einsatzes berichtet [Laufer und Plowe (2004)]. In Gabun liegen dazu bisher kaum Daten vor. Dies wäre eine interessante Fragestellung für zukünftige Arbeiten.

Konsequenzen der wiedererlangten Chloroquin-Sensitivität Aufgrund der weiterhin sehr niedrigen Prävalenz sensitiver Stämme in Lambaréné, Gabun, steht es hier außer Frage, Chloroquin in naher Zukunft wieder in irgendeiner Form in die

Therapie der *Malaria tropica* einzuschließen. In Ländern mit einer drastischen Rückkehr der Chloroquin-Sensitivität – zum jetzigen Zeitpunkt trifft dies nur auf Malawi zu – könnte der Einsatz von Chloroquin in Form einer Kombinationstherapie jedoch eine denkbare Option darstellen, da Chloroquin ein günstiges, gut verträgliches und gegen sensitive Parasiten äußerst effektives Medikament darstellt [Laufer und Plowe (2004)].

In Malawi durchgeführte *in vivo*-Studien mit Chloroquin als Mono- [Laufer et al. (2006)] bzw. Kombinationstherapie [Bell et al. (2008)] konnten zum einen die Effizienz von Chloroquin, besonders aber auch die fehlende Selektion resistenter Parasiten nach Therapie zeigen. Trotz solch optimistisch stimmender Ergebnisse ist jedoch Vorsicht geboten. Nkhoma et al. (2007) ermittelten in Feldproben aus Malawi, die nicht in Blantyre gewonnen worden waren, eine Prävalenz der 76T-Mutation von 2 – 4%. Juliano et al. (2007) untersuchten Feldisolate aus Malawi, die in der PCR lediglich für das sensitive *pfcr*t-Allel 76K positiv waren, mit einem sensitiveren Verfahren zur Detektion von Subpopulationen und konnten in 25% der Proben zusätzlich die Mutante 76T nachweisen. Sollte dies ein in Malawi verbreitetes Phänomen darstellen, wäre es verwunderlich, dass Laufer et al. (2006) und Bell et al. (2008) keine Selektion resistenter Parasiten unter Chloroquintherapie feststellen konnten. Beachtenswert ist eine Langzeitstudie an einem senegalesischen Dorf, welches einer Reihe von Therapiewechseln unterlaufen war: von Chloroquin wurde zunächst auf Quinin, nach einigen Jahren wieder auf Chloroquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin als Erst- bzw. Zweittherapeutikum umgestellt. Trotz streng leitliniengetreuer Behandlung hatten sich bereits nach einem Zeitraum von einem Jahr nach Wiedereinführung von Chloroquin die resistenten Allele *pfcr*t 76T sowie die *dhfr*-Dreifachmutante im Dorf ausgebreitet. Die Autoren warnten daher vor einer leichtfertigen Wiederaufnahme der Chloroquintherapie in Malawi [Noranate et al. (2007)].

4.2 Genetischer Mechanismus der Rückkehr Chloroquin-sensitiver Parasiten nach Lambaréné

Als mögliche genetische Mechanismen einer Rückkehr sensitiver Parasiten in eine vormals resistente Population bieten sich in erster Linie zwei Alternativen. Die erste Möglichkeit wäre eine Rückmutation ursprünglich resistenter Stämme aus der lokalen Population an Position 76 des *pfcr*t-Gens zum sensitiven Allel *pfcr*t 76K. Es wurde gezeigt, dass die Aminosäure an Position 76 allein ausschlaggebend für

den resistenten Phänotyp ist. Auch wurde mit dem sudanesischen Isolat *106/1* ein phänotypisch sensitiver Stamm gefunden, der mit Ausnahme von Position 76 alle Resistenz-assoziierten Mutationen des *pfcr*-Gens aufwies [Fidock et al. (2000)]. Dieser stellt wahrscheinlich ein Beispiel für einen ehemals resistenten Stamm, der durch Punktmutation an Position 76 wieder sensitiv wurde, dar.

Die zweite Möglichkeit für die Rückkehr sensitiver Parasiten wäre ein Einwandern sensitiver Stämme von außen. In diesem Falle besäßen die neuen sensitiven Parasiten ein *pfcr*-Allel ohne jegliche Resistenz-assoziierten Mutationen; die das *pfcr*-Gen flankierenden chromosomalen Regionen würden eine hohe Diversität aufweisen – im Gegensatz zu der hohen Konservierung, die resistente Stämme hier typischerweise zeigen. Eventuell würden weitere Marker, wie beispielsweise der *msp2*-Lokus, auf eine Herkunft außerhalb von Lambaréné hindeuten.

Ausschluss der Rückmutation resistenter Parasiten zum sensitiven Wildtyp Durch Sequenzierung des *pfcr*-Gens zeigte sich, dass alle in Lambaréné neu aufgetretenen sensitiven Isolate das komplette Wildtypallel $M_{74}N_{75}\underline{K}_{76}A_{220}Q_{256}N_{326}I_{356}R_{371}$ besaßen. Im Gegensatz dazu wies das *pfcr*-Allel der lokalen resistenten Stämme die typischen Mutationen an Position 74, 75, 76, 220, 256 und 371 auf. An Position 326 lag lediglich die Wildtypvariante vor, an Position 356 fand sich mehrheitlich die Mutante. Insgesamt stellte sich das lokale resistente Allel demnach wie folgt dar: $I_{74}E_{75}\underline{T}_{76}S_{220}E_{256}N_{326}T/I_{356}I_{371}$ (siehe auch Abschnitt 4.3). Hieraus lässt sich schließen, dass die gefundenen sensitiven Parasiten nicht durch eine Rückmutation an Position 76 aus ehemals resistenten Stämmen entstanden sind. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen aus Malawi, die ebenfalls ausschließlich vollständig sensitive *pfcr*-Allele gefunden hatten [Kublin et al. (2003), Mita et al. (2004)].

Rückkehr der Sensitivität durch Einwandern und Einkreuzen sensitiver Parasiten Die starke Konservierung des resistenten Haplotypen aufgrund des *selective sweeps* zu Zeiten des weitverbreiteten Chloroquin-Einsatzes [Wootton et al. (2002)] ermöglicht die Differenzierung des genetischen Hintergrundes resistenter und sensitiver Parasiten mittels Sequenzierung von Mikrosatelliten. Die Untersuchung der aktuellen lokalen resistenten Population ergab die Dominanz eines Haplotypen, der lediglich ab etwa 20 kb *downstream* des *pfcr*-Gens vom *FCR3*-Haplotypen differierte. *FCR3* war von Wootton et al. (2002) als Prototyp des afrikanischen resistenten Haplotypen identifiziert worden und wurde daher in dieser Arbeit als Refe-

renzstamm gewählt (siehe auch Abschnitt 4.3).

In dieser Arbeit wurden nun erstmals neben dem *pfert*-Lokus auch die den Lokus flankierenden chromosomalen Regionen von neu aufgetretenen Chloroquinsensitiven Parasiten untersucht, was es ermöglichte, einen genaueren Blick auf ihre Herkunft zu werfen. Mittels Analyse von Mikrosatellitenmarkern wurden ihre Haplotypen dargestellt. Zwei der drei sensitiven Monoinfektionen zeigten Haplotypen, die sich vollkommen von den in der resistenten Population gefundenen unterschieden. Dies legt nahe, dass es sich hier um von außen immigrierte Parasiten handelte, die noch kaum mit der lokalen Population rekombiniert hatten. Unterstützt wird diese Interpretation durch die Ergebnisse der Untersuchung der *msp2*-Allele. Hier verfügten beide über Allele, die sich ansonsten in keiner bzw. nur einer Probe der resistenten Population fanden. In letztgenanntem Fall lag das Allel (ein *FC27*-Allel) zwar ebenfalls in einem resistenten Isolat vor, jedoch unterschied es sich grundlegend von den übrigen Allelen der *FC27*-Klasse, so dass angenommen werden kann, dass es kein typisches lokales Allel darstellte.

Ein bemerkenswerter Haplotyp fand sich im sensitiven Isolat SP15. Dieser war bis etwa 20 kb *upstream* des *pfert*-Lokus (Mikrosatelliten *PE14D* und *B5M77*) identisch zum lokal dominanten resistenten Haplotypen, danach divergierten die Sequenzen. Wir vermuten, dass dies das Ergebnis eines *crossing overs* zwischen einem sensitiven Parasiten und einem Stamm der lokalen resistenten Population darstellte. Interessanterweise war diese *upstream*-Region in den untersuchten resistenten Parasiten deutlich stärker konserviert als die Region *downstream*; der Mikrosatellit *B5M77* zeigte mit einer Prävalenz des *FCR3*-Allels von 96% innerhalb der aktuellen resistenten Population den höchsten Konservierungsgrad aller Mikrosatelliten. Die hohe Prävalenz der *upstream*-Region des lokal dominanten Haplotypen in der resistenten Population erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass der dazu identische Teil des SP15-Haplotypen wirklich von einem lokalen resistenten Parasiten abstammte. Eine statistische Auswertung dieser Fragestellung zeigte, dass die Hypothese, dass die Mikrosatelliten *PE14D* und *B5M77* im SP15-Haplotypen von einem resistenten Parasiten abstammen, über hundertfach wahrscheinlicher ist, als dass diese Kombination durch Rekombination innerhalb sensibler Stämme entstanden ist.

Das *msp2*-Allel von SP15, ein *FC27*-Allel, gehörte zu einer Gruppe von *FC27*-Allelen mit gleicher Repeatstruktur, die 70% aller *FC27*- und 40% aller *msp2*-Allele umfasste und damit die lokal dominante *msp2*-Variante darstellte (siehe auch Abschnitt 4.4). Zudem war es sequenzidentisch zu den *FC27*-Allelen einiger Parasiten aus der aktuellen resistenten Population. Das Vorliegen zu SP15 sequenzidentischer

msp2-Allele in der lokalen resistenten Population erhält gerade durch die hohe Diversität des *msp2*-Lokus besonderes Gewicht. Interessanterweise zeigte eine *msp2*-Untersuchung an Parasiten aus Lambaréné der Jahre 2000/01 ebenfalls die Dominanz derselben *msp2*-Variante, zudem besaßen drei der sequenzierten *FC27*-Allele die gleiche Sequenz wie SP15 [Mayengue et al. (2004)], was den Verdacht erhärtet, dass SP15 wirklich über ein Lambaréné-*msp2*-Allel verfügte (siehe auch Abschnitt 4.4). Das Vorliegen des lokal dominanten *msp2*-Allels und des *upstream*-Teils des lokal dominanten resistenten Haplotypen zusammen mit einem sensitiven *pfcr*t-Allel sowie einem typisch sensitiven Haplotypen *downstream* des Lokus unterstützt die Hypothese, dass es sich bei SP15 um den Tochterstamm eines immigrierten sensitiven Parasiten und eines lokalen resistenten Parasiten handelte.

Insgesamt ist also folgendes Szenario denkbar: Durch Absinken des Chloroquin-Selektionsdruckes konnten sensitive Stämme nach Lambaréné einwandern. Anschließend etablierten sich diese durch Einkreuzen in die lokale resistente Population. Letztgenannter Punkt ist insbesondere zu beachten bei der Einschätzung einer möglichen Expansion des sensitiven Allels. Das Auftreten sensitiver eingekreuzter Stämme bedeutet, dass sich nach Kreuzung eines sensitiven mit einem lokalen resistenten Stamm sensitive Nachkommen durchsetzen konnten. Dies legt eine gewisse Stabilität des sensitiven Allels in der momentanen Population nahe, so dass zumindest ein Erhalt des Status quo, möglicherweise auch eine weitere Zunahme der Prävalenz sensitiver Parasiten erwartet werden kann.

4.3 Einfluss des Chloroquin-Selektionsdruckes auf die lokale resistente Population

Bringt ein bestimmtes Genallel einen hohen Selektionsvorteil mit sich, so kann es sich in einer Population stark ausbreiten und zu reduzierter Variabilität eigentlich neutraler Regionen in seiner Umgebung führen. Solche *selective sweeps* wurden im Falle von *P. falciparum* für das Resistenzgen gegen Chloroquin *pfcr*t [Wootton et al. (2002), Nash et al. (2005)], Pyrimethamin *dhfr* [Nair et al. (2003), Roper et al. (2004)] und Sulfadoxin *dhps* [Roper et al. (2003), McCollum et al. (2007), Pearce et al. (2009)] gezeigt. Der Variabilitätsreduktion wirkt sexuelle Rekombination entgegen, welche wiederum größer ist im Falle höherer Malariatransmission [Conway et al. (1999)]. In dieser Arbeit wurde das Ausmaß der Konservierung um das *pfcr*t-Gen in der resistenten Population von Lambaréné, Gabun, zu drei verschiedenen

Zeitpunkten – 1995/96, 2002 und 2005 – 07 – untersucht. Besondere Aufmerksamkeit verdient hier die Fragestellung, ob und wie sich der reduzierte Selektionsdruck durch den nationalen Chloroquin-Stopp auswirkte.

Ausbildung eines lokal dominanten resistenten Haplotypen Nach Wootton et al. (2002) brachte ein asiatischer Stamm – vom Typ des Stammes *FCR3* – den resistenten *pfcr*-Haplotypen nach Afrika, wo er sich über den ganzen Kontinent ausbreitete. *FCR3* unterscheidet sich vom häufig zitierten resistenten Stamm *Dd2* (ebenfalls asiatischer Herkunft) an den von uns untersuchten Mikrosatelliten lediglich für *7A11* sowie an Position 356 des *pfcr*-Gens. Da der Großteil der asiatischen Stämme über das *Dd2-pfcr*-Allel verfügt, während die meisten afrikanischen Stämme das *FCR3-pfcr*-Allel zeigen, postulierten Wootton et al. (2002), dass der asiatische Stamm, der das resistente *pfcr*-Allel nach Afrika brachte, zuvor einer Mutation an Position 356 unterlegen war.

Interessanterweise zeigte sich, dass in der von uns untersuchten Population nicht der *FCR3*-Haplotyp vorherrschte, sondern ein Haplotyp – im Folgenden Lambaréné-Haplotyp genannt, welcher sich am Mikrosatelliten *PE14F*, dem am weitesten *downstream* gelegenen Marker, vom *FCR3*-Haplotypen unterschied. Allerdings war die Prävalenz des *FCR3*-Haplotypen an allen drei Untersuchungszeitpunkten nur wenig geringer. Da der Lambaréné-Haplotyp bereits 1995/96 dominant vorlag, ist davon auszugehen, dass es sich um eine relativ frühe Mutante des eingewanderten *FCR3*-artigen Stammes handelte. Es wäre also denkbar, dass Lambaréné von zwei verwandten resistenten Haplotypen bevölkert wurde bzw., dass sich kurz nach Einwandern des resistenten *FCR3*-Haplotypen diese zweite Variante abzweigte, die sich etwas erfolgreicher als der Mutterstamm vermehrte und so zu höherer Prävalenz innerhalb der Population gelangte.

In diesem Zusammenhang verdient auch die Analyse der genauen *pfcr*-Allelsequenzen in den verschiedenen Stämmen bzw. Populationen besondere Beachtung (Anmerkung: nur Position 76 des *pfcr*-Gens, nicht jedoch die Resistenz-assoziierten Mutationen waren in die Definition des Haplotypen mit aufgenommen worden). Es zeigte sich, dass die in Lambaréné gefundenen *pfcr*-Allele nicht mit dem *FCR3*-Allel übereinstimmten. Die Unterschiede lagen hierbei in den Positionen 326 und 356. Während *FCR3 S₃₂₆I₃₅₆* zeigt, besaßen alle untersuchten resistenten Proben aus Lambaréné *N₃₂₆T₃₅₆*. Zwei Proben enthielten zusätzlich die Kombination *N₃₂₆I₃₅₆*. Die Zahl untersuchter Proben war allerdings relativ klein, zudem stammten alle aus den Jahren 2005 – 07; eine Verallgemeinerung dieser Daten auf die gesamte Lam-

baréné-Population muss daher unter gewissem Vorbehalt stattfinden. Auffällig ist des Weiteren, dass das dominante Lambaréné-*pfert*-Allel in keinem der von Wootton et al. (2002) untersuchten resistenten Stämme weltweit auftrat. Djimdé et al. (2001) und Kublin et al. (2003) konnten jedoch in resistenten Parasiten aus Mali bzw. Malawi an den Positionen 326 und 356 sowohl das Wildtypallel als auch die afrikanische Resistenz-assoziierte Mutation nachweisen. Insgesamt deutet dies also auf eine gewisse Variabilität innerhalb des *pfert*-Lokus hin – auch nach weitgehender Fixation des Haplotypen (siehe auch Seite 69).

Ausmaß des *selective sweeps* in Lambaréné Auf Grund des ehemals durch Chloroquin ausgeübten Selektionsdruckes ist zu erwarten, dass resistente Parasiten in chromosomaler Nachbarschaft des *pfert*-Gens weitgehend konserviert sind. Wir konnten feststellen, dass in der untersuchten Population die Variabilität über den Verlauf des gesamten Haplotyps deutlich reduziert war. An den äußeren Mikrosatelliten zeigte sich hierbei eine höhere Diversität als an den innen gelegenen, was dadurch erklärt werden kann, dass das *linkage disequilibrium* mit zunehmender Entfernung zum selektionierten Locus abnimmt [Wootton et al. (2002)]. Die erwartete Heterozygotie H_e als Maß für Diversität [Nash et al. (2005)] war in den Jahren 1995 – 2002 für alle Mikrosatelliten, 2005 – 07 für alle außer *PE14F* signifikant kleiner als der Referenzwert für unselektionierte Mikrosatelliten afrikanischer *P. falciparum*-Populationen (Anderson et al. (2000)). Die Größe des *selective sweeps* in Lambaréné betrug demnach konservativ betrachtet zu den Zeitpunkten 1995/96 und 2002 mindestens 102 kb, 2005 – 07 mindestens 66 kb.

Nash et al. (2005) hatten das Ausmaß des *selective sweeps* in zwei Ländern mit hoher (Thailand) bzw. niedriger (Laos) Selektion verglichen. Während in Thailand 195 – 268 kb um den *pfert*-Lokus signifikant reduzierte Variabilität zeigten, waren es in Laos nur 34 – 69 kb. Der *selective sweep* in Lambaréné scheint sich hier zwischen diesen Ländern einzuordnen.

Bemerkenswert ist des Weiteren, dass keiner der untersuchten Mikrosatelliten monoallelisch vorlag, unabhängig davon, ob die genaue Sequenz oder lediglich die Länge des Mikrosatelliten gewertet wurde. Zu möglichen Differenzen bei Alleldefinition über die Sequenz versus die Länge lässt sich sagen, dass Unterschiede generell nur bei Mikrosatelliten mit mehreren Repeatregionen, in unserem Fall *3E7* und *PE14D*, zu erwarten wären. Jedoch waren auch für solche Marker die H_e -Werte bei Sequenz- und Längenauswertung nicht signifikant verschieden. Im Gegensatz zur hier untersuchten Population zeigten bei Wootton et al. (2002) drei Mikrosatelliten

nur ein Allel unter resistenten afrikanisch/asiatischen Parasiten. Nash et al. (2005) stellten fest, dass in direkter Umgebung des *pfcr*t-Lokus in Thailand mehrere Mikrosatelliten monoallelisch vorlagen, nicht jedoch in Laos.

Ein interessanter Aspekt ist zudem, dass der in Intron 1 des *pfcr*t-Gens gelegene Mikrosatellit *B5M47*, der von uns in einer Subkohorte der Population 2005 – 07 untersucht worden war, drei verschiedene Allele und einen H_e -Wert von 0,11 aufwies. Dies legt nahe, dass Mikrosatelliten innerhalb des *pfcr*t-Gens weiterhin eine gewisse Variabilität zeigen und noch evolvieren können, wenn die flankierenden Regionen bereits fixiert sind. Zu diesem Schluss waren auch Vinayak et al. (2006) und DaRe et al. (2007) gekommen, die Mikrosatelliten innerhalb von Intron 2 und 3 des *pfcr*t-Gens analysiert hatten.

Entwicklung von Diversität und Konservierungsgrad über die Jahre Bei Betrachtung der Veränderung von Konservierung und Diversität innerhalb der resistenten Population von Lambaréné im Laufe der Jahre, fällt vor allen Dingen auf, dass sich keine drastischen Änderungen vollzogen. Besonders interessant in Hinblick auf die Entwicklung rückkehrender Chloroquin-Sensitivität wäre hier der Vergleich der Populationen 2002 und 2005 – 07, einerseits da 2003 Chloroquin aus den nationalen Therapierichtlinien gestrichen wurde, andererseits da in den Jahren 2005 – 07 erstmals seit langem wieder sensitive Parasiten in Lambaréné auftraten. Jedoch erwiesen sich diese beiden Populationen als sehr ähnlich, Änderungen fanden sich vor allem im Vergleich zur Population von 1995/96. Generell lagen zu allen Untersuchungszeitpunkten die gleichen dominanten Mikrosatellitenallele sowie der gleiche lokal dominante resistente Haplotyp vor. Breite und Tiefe des *selective sweeps* waren 1995/96 tendenziell etwas ausgeprägter, ansonsten unter den Populationen ähnlich.

Bei Untersuchung der einzelnen Mikrosatelliten zeigten sich jedoch einige Entwicklungen in Richtung schwächerer Konservierung, die sich alle am *downstream*-Ende des *selective sweeps* abspielten. Sowohl für *7A11* als auch für *PE14F* nahm die Konservierung von 1995 nach 2007 signifikant ab ($p < 0,05$), zudem zeigte sich ein deutlicher Trend in Richtung höherer Diversität. Die Mikrosatelliten *upstream* sowie in direkter Nachbarschaft des *pfcr*t-Lokus wiesen nur unsignifikante Schwankungen auf; eine Ausnahme bildete hier der *upstream* gelegene Mikrosatellit *B5M77*, dessen Diversität über die Jahre signifikant zurückging. Des Weiteren fand sich eine signifikante ($p < 0,05$) Konservierungsreduktion des dominanten Haplotyps.

Asymmetrie des *selective sweeps* Ein weiteres Charakteristikum des *selective sweeps* in Lambaréné ist die auffallende Asymmetrie, die an allen Untersuchungszeitpunkten, besonders akzentuiert jedoch in der aktuellen resistenten Population, vorlag. So zeigte die Region *downstream* des *pfcr1*-Lokus stets eine deutlich größere Variabilität als die *upstream*-Region. Dies traf für den internen Vergleich jedes Paares etwa gleich weit vom *pfcr1*-Gen entfernter Mikrosatelliten zu, wobei die Unterschiede in den weiter außen gelegenen Paaren *B5M77*₋₁₈/*7A11*₊₂₁ und *PE14D*₋₄₅/*PE14F*₊₅₇ größer waren.

Interessanterweise konnten Nair et al. (2003), Nash et al. (2005) und Pearce et al. (2005) ebenfalls feststellen, dass die Variabilität *upstream* des selektionierten Lokus stärker reduziert war als *downstream* – sowohl bei Betrachtung des *pfcr1*- als auch des *dhfr*-Gens. Hierfür wurden verschiedene Erklärungsmöglichkeiten in Betracht gezogen. Modellsimulationen von *selective sweeps* deuteten darauf hin, dass das Ausmaß der Variabilitätsreduktion rein stochastisch häufig eine asymmetrische Form annimmt [Kim und Stephan (2002)]. Nash et al. (2005) zeigten in einem Folgeexperiment, dass in unmittelbarer Umgebung (6 kb) des *dhfr*-Lokus die Rekombinationsraten *upstream* geringer waren als *downstream*. Pearce et al. (2005) zogen eine höhere Rekombinationsrate in Abhängigkeit von Nähe zu Telomer oder Zentromer in Erwägung, was jedoch zumindest für *dhfr* verworfen werden musste, da es sich in der Mitte zwischen Telomer und Zentromer befindet; zudem hatten Su et al. (1999) eine relativ gleichmäßige Verteilung von meiotischen *crossing overs* über die Chromosomen nachgewiesen. Eine weitere Idee war ein möglicher ebenfalls selektionierter Locus im *upstream*-Bereich; dies wurde jedoch mangels einer zweiten Stelle reduzierter Variabilität als unwahrscheinlich eingestuft [Pearce et al. (2005)].

Unsere Hypothese zur Erklärung dieses Phänomens stellt quasi das Gegenteil des letztgenannten Vorschlags dar: Kein auf Konservierung selektionierter Locus *upstream* sondern ein auf Diversität selektionierter Locus *downstream* könnte die asymmetrische Form des *selective sweeps* um das resistente *pfcr1*-Allel verursacht haben. Tatsächlich befindet sich 105 kb *downstream* des *pfcr1*-Gens ein Cluster von *var*-Genen [PlasmoDB].

var-Gene stellen eine *multicopy* Genfamilie dar, die für eines der Hauptantigene von *P. falciparum*, das *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1* (*PfEMP1*), kodieren [Su et al. (1995)]. Sie sind ausgesprochen divers [Kyes et al. (1997)] und stehen unter starkem Druck von Seiten des menschlichen Immunsystems [Bull et al. (1998)]. Um dem Immunsystem zu entkommen, *switchen* Parasiten von einem *var*-Gen zum anderen [Roberts et al. (1992), Smith et al. (1995)], zudem untergehen die

var-Gene einer extrem hohen Rekombination [Taylor et al. (2000)].

Hill und Robertson (1966) hatten allgemein formuliert, dass die reduzierte Variabilität um ein selektioniertes Resistenzgen auch benachbarte Antigene betreffen könne und somit die Fitness des Parasiten gegenüber dem Immunsystem verringern würde. Fowler et al. (2006) hatten dies auf die Beziehung zwischen dem *pfcr*-Gen und den angrenzenden *var*-Genen bezogen und versucht zu zeigen, dass die Gruppe dieser *var*-Gene in resistenten Parasiten stärker konserviert sei als in sensitiven Parasiten.

Zusammenfassend wäre also denkbar, dass unter Selektionsdruck von Chloroquin sowie von Seiten des Immunsystems diejenigen Parasiten die größte Fitness zeigen, die am *pfcr*-Lokus konserviert, am benachbarten *var*-Gencluster jedoch möglichst divers sind; dies würde zu der beobachteten Asymmetrie des *selective sweeps* mit einer höheren Variabilität *down-* als *upstream* des *pfcr*-Gens führen. Mit Abnahme des Chloroquindruckes wäre zu erwarten, dass nunmehr der Druck, der vom Immunsystem auf die *var*-Gene ausgeübt wird, ausschlaggebend sei und daher eine Zunahme der Variabilität überproportional in der *downstream*-Region auftreten würde – genau diese Entwicklung konnte in Lambaréné festgestellt werden. Abschließend anzumerken ist, dass sich diese Hypothese spezifisch auf den *pfcr*-Lokus bezieht; die Asymmetrie des *selective sweeps* um den *dhfr*-Lokus lässt sich hiermit nicht erklären, da dieses Gen aufgrund seiner mittigen Lage zwischen Zentromer und Telomer in ähnlicher Entfernung *up-* wie *downstream var*-Gencluster aufweist.

Möglicher *fitness cost* resistenter Parasiten Kublin et al. (2003) hatten auf Grund ihrer Beobachtungen in Malawi einen *fitness cost* Chloroquin-resistenter Parasiten bei Abwesenheit von Chloroquin postuliert. Worauf dieser *fitness cost* beruhen soll, ist bis heute jedoch Gegenstand von Spekulation. Bennett et al. (2004) konnten zeigen, dass Parasiten mit dem resistenten *pfcr*-Allel einen im Vergleich zu sensitiven Parasiten erniedrigten pH-Wert in ihrer Nahrungsvakuole aufwiesen, wobei nicht geklärt wurde, ob sich dies in irgendeiner Weise auf die Fitness der Parasiten auswirkte. Fowler et al. (2006) hatten vermutet, dass im Rahmen des *selective sweeps* konservierte *var*-Gene die Fitness resistenter Parasiten reduzieren könnten. Durch die in unserer Arbeit aufgezeigte Asymmetrie des *selective sweeps* sowie insbesondere die Zunahme der Asymmetrie unter Abnahme des Chloroquin-Selektionsdruckes erhält diese Hypothese weitere Unterstützung. Die Untersuchung der *var*-Genkonservierung in Korrelation zur Ausdehnung des *selective sweeps* wäre ein interessanter Ansatz für zukünftige Arbeiten.

Schlussfolgerungen aus der Analyse der resistenten Population Insgesamt lassen sich vor allem drei Dinge festhalten.

Erstens fiel auf, dass die Konservierung um das resistente *pfcr*t-Allel in Lambaréné ausgesprochen hoch war – auch noch in den Proben der Jahre 2005 – 07. Anhand der Haplotypenanalyse konnte eine Abnahme der Konservierung über die Jahre nachgewiesen werden, wobei das Ausmaß dieser Entwicklung relativ gering war. Es ist unklar, ob zwischen der beobachteten Abnahme an Konservierung in resistenten Parasiten und dem Auftreten sensitiver Stämme in den Jahren 2005 – 07 ein Zusammenhang besteht. Mehlotra et al. (2005) und Pearce et al. (2005) hatten ebenfalls von einem Rückgang an Konservierung in resistenten Parasiten berichtet (in ersterem Fall übrigens ebenfalls in der Region *downstream* des *pfcr*t-Gens), interessanterweise in einer Epoche, als das jeweils untersuchte Resistenzgen (*pfcr*t bzw. *dhfr*) noch in der Ausbreitung begriffen war. In keiner der beiden Situationen war die Diversifizierung des Haplotypen demnach mit einer Rückkehr sensitiver Parasiten verbunden. Pearce et al. (2005) vermutete, dass es vielmehr zu einem Gleichgewicht zwischen Selektion und Rekombination gekommen sei. Dies wäre auch eine mögliche Erklärung für die in Lambaréné beobachtete Entwicklung.

Insbesondere, da – zweitens – das Gros der Veränderungen zwischen 1995/96 und 2002 stattfand, während zwischen 2002 und 2005 – 07 nur Weniges an Diversifizierung hinzukam. Dies mag einerseits auf den etwas kürzeren Zeitraum zurückzuführen sein, zeigt aber andererseits, dass die Änderung der nationalen Therapierichtlinien im Jahre 2003 die Konservierung des resistenten Haplotypen innerhalb der Population kaum beeinflusste. Es wäre denkbar, dass das lokale Einstellen der Chloroquin-Therapie in Lambaréné Anfang der Neunziger Jahre Auslöser einer seit 1995/96 andauernden Entwicklung in Richtung zunehmender Diversifizierung war, jedoch bleibt dies Gegenstand von Spekulation.

Der dritte Punkt ist die auffällige Asymmetrie des *selective sweeps* in Lambaréné, besonders aber der auftretenden Veränderungen. Ein signifikanter Rückgang des Konservierungsgrades fand sich ausschließlich im *downstream*-Bereich des *pfcr*t-Gens, auch der Rückgang der Haplotypkonservierung ist vor allem auf gesteigerte Diversität der *downstream*-Mikrosatelliten *7A11* und *PE14F* zurückzuführen. Dies steht im Einklang mit der Hypothese eines möglichen auf Diversität selektierten Locus in dieser Richtung – möglicherweise das dortige *var*-Gencluster. Die Aufklärung der gegenseitigen Beeinflussung von hochselektionierten Resistenzgenen und variablen Antigenen in *P. falciparum* wäre, nicht zuletzt im Angesicht zukünftig sich entwickelnder Resistenzen, ein wichtiges Forschungsprojekt.

4.4 Diversität des *msp2*-Lokus in Lambaréné

Lokaler *msp2*-Genpool im Verlauf der Jahre Die Analyse von 73 Proben aus den Jahren 2005 – 07 zeigte, dass das *FC27*-Allel mit 83% deutlich häufiger vorlag als das *3D7*-Allel (41%). Diese Ergebnisse sind konsistent mit vorigen Studien in Lambaréné, die ebenfalls eine Dominanz des *FC27*-Allels festgestellt hatten [Mayengue et al. (2004), Missinou et al. (2004)]. Interessanterweise hatten Kun et al. (1998) in Proben aus den Jahren 1995/96 mehr *3D7*- als *FC27*-Allele gefunden (72% bzw. 54%), was möglicherweise auf eine stetige Zunahme der *FC27*-Allele seit diesem Zeitpunkt hindeutet. Anzumerken wäre hierbei, dass wir bei Aufschlüsselung der aktuellen Population nach einzelnen Jahren eine Zunahme der *3D7*-Prävalenz von 2005 nach 2007 verzeichnen konnten.

Ein Fragmentlängenvergleich zeigte die Dominanz eines *FC27*-Allels der Länge 137 Aminosäuren; seine Prävalenz lag bei 70% der *FC27*-positiven und 40% aller Proben. Mayengue et al. (2004) hatten ebenfalls die Dominanz dieses Allels festgestellt, hier lag die Prävalenz bei 35% aller Proben. Trotz der ausgesprochen hohen Diversität des *msp2*-Lokus (siehe auch Seite 75) lässt sich demnach – zumindest für die *FC27*-Allelgruppe – das dominante Vorliegen einer bestimmten Fragmentlänge (137 Aminosäuren) in Lambaréné feststellen. In diesem Kontext ist auch die Beobachtung interessant, dass einige der *FC27*-Allele der Jahre 2005 – 07 sequenzgleich waren zu Allelen, die von Mayengue et al. (2004) in Lambaréné-Proben der Jahre 2000/01 beschrieben worden waren. Dies deutet auf eine gewisse Konstanz bestimmter Allele über die Jahre hin.

Diversitätsvergleich der *3D7*- und *FC27*-Allelgruppe Die Diversität des *msp2*-Lokus wurde nur bei Allelunterscheidung auf Grund der exakten Aminosäuresequenz korrekt erfasst. Hierbei zeigten beide Allelgruppen eine ähnliche hohe Diversität mit H_e -Werten von 0,98 für die *3D7*- bzw. 0,96 für die *FC27*-Gruppe. Allerdings wies die *3D7*-Gruppe einige Merkmale höherer Diversität auf, wie beispielsweise eine größere Anzahl Proben, die einmalige Allele besaßen. Zudem waren die einzelnen Allele innerhalb der *3D7*-Gruppe meist sehr weit voneinander entfernt, während die *FC27*-Allele sich oft nur an einzelnen Aminosäuren unterschieden.

Bei Diversitätsermittlung ausschließlich nach der Länge der Fragmente wurde die Diversität der *FC27*-Gruppe unterschätzt. Die H_e -Werte lagen hier für *3D7* bei 0,98, für *FC27* nur bei 0,43. Dieser Unterschied lässt sich darauf zurückführen, dass der Großteil der *3D7*-Allele als Unikate vorlag, sich die *FC27*-Allele hingegen auf

einige wenige Längen verteilten und etwa 3/4 der Proben die gleiche Länge aufwiesen. Ein ähnliches Bild hatte sich ebenso bei Mayengue et al. (2004) gezeigt. Der Grund für diese unterschiedliche Verteilung der Fragmentlängen ist in der andersartige Allelstruktur beider Gruppen zu sehen: Während die *FC27*-Allele einem streng modularen Aufbau folgten, war der Aufbau der *3D7*-Allele weit freier und weniger geordnet gestaltet. Längendifferenzen der *FC27*-Allele wurden durch eine unterschiedliche Anzahl Wiederholungen zweier Module der Längen 32 bzw. 12 Aminosäuren generiert (in dieser Arbeit als Modul 2 bzw. 4 gekennzeichnet). Die Bedeutung dieser zwei Module war bereits zuvor beschrieben worden [Smythe et al. (1991), Felger et al. (1994), Felger et al. (1997)] und scheint weltweit konserviert zu sein [Ferreira und Hartl (2007)].

Um die Diversität der Lambaréné-*FC27*-Allele in einen weltweiten Rahmen zu setzen, verglichen wir die Anzahl verschiedener Modulrepeats. In 40 Lambaréné-*FC27*-Allelen lag Modul 2 ein- oder dreimal, Modul 4 null- bis fünfmal vor. Die von Ferreira und Hartl (2007) in 195 weltweit gesammelten *FC27*-Proben (davon 65 aus Afrika) erfassten Möglichkeiten betragen für ersteres Modul ein- bis viermal, für letzteres ebenfalls null- bis fünfmal. Dies zeigt die Lamabaréné-Population als im weltweiten Vergleich sehr divers.

Interessanterweise befand sich die überwiegende Mehrheit der SNPs bzw. der Aminosäurepolymorphismen, die für die weitere Alleldifferenzierung verantwortlich zeichneten, in eben beschriebenen repetitiven Modulen. Ferreira und Hartl (2007) konnten durch Sequenzanalyse verschiedene Haplotypen abgrenzen: 15 unterschiedliche Haplotypen für Modul 2, 13 für Modul 4. Im Vergleich dazu fanden sich in Lambaréné 11 Haplotypen für Modul 2, wobei 5 hiervon nicht in der Arbeit von Ferreira und Hartl (2007) auftraten. Modul 4 zeigte sich in Lambaréné weniger divers mit lediglich 5 Haplotypen. Abschließend ist anzumerken, dass auch Ferreira und Hartl (2007) das außerordentlich Potenzial zur Sequenzvariation innerhalb der *3D7*-Gruppe hervorhoben.

Vergleich verschiedener Methoden zur Allelerfassung Aufgrund seiner hohen Diversität wird der *msp2*-Lokus gerne zur Genotypisierung von Feldisolaten verwendet [Prescott et al. (1994)]. Hier stehen als Methoden – neben der bloßen Unterscheidung in *3D7*- oder *FC27*-Allele durch eine spezifische PCR – Größenbestimmung der PCR-Fragmente mittels Gelelektrophorese, Restriktionsverdau sowie Sequenzierung zur Verfügung. Auf Grundlage dieser Arbeit soll im Folgenden kurz auf die Schwierigkeiten der jeweiligen Methode eingegangen werden.

Die Unterscheidung nach Fragmentlängen scheint zur Differenzierung von *3D7*-Allelen ein recht adäquates Mittel zu sein, zumindest in der von uns untersuchten Population konnten wir kaum *3D7*-Allele unterschiedlicher Sequenz aber gleicher Länge feststellen. Jedoch fanden wir unter den *FC27*-Allelen nur sieben verschiedene Fragmentlängen. 70% der *FC27*-Allele zeigten hier die gleiche Länge, beinhalteten nach Sequenzauswertung jedoch 15 distinkte Allele. Insgesamt scheint also diese Methode – insbesondere in Populationen, in denen eine Fragmentlänge stark dominant vorliegt – keine ausreichende Alleldifferenzierung zu ermöglichen.

Wir konnten mit dem Restriktionsverdau durch die Endonukleasen *Alu1*, *Dde1*, *Hinf1* und *Rsa1* keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielen. Hier stellte sich das grundsätzliche Problem, dass die verwendeten Enzyme an keinem der Aminosäurepolymorphismen der von uns untersuchten *FC27*-Allele eine Schnittstelle besaßen. So konnte auch mittels Restriktionsverdau nicht zwischen *FC27*-Allelen gleicher Modulzusammensetzung (damit gleicher Länge) jedoch unterschiedlicher Aminosäurepolymorphismen differenziert werden.

Die Sequenzierung von Allelen stellt sicherlich das genaueste Verfahren zur Allelunterscheidung dar. Insbesondere im Falle der *FC27*-Allelgruppe scheint sie als einzige Methode eine adäquate Erfassung der Diversität zu bieten. Auf Grund des hohen technischen sowie finanziellen Aufwands ist diese Methode unter Feldbedingungen jedoch in der Regel nicht durchführbar.

Der *msp2*-Lokus als unabhängiger Diversitätsmarker Neben der Charakterisierung einzelner Isolate lässt sich der *msp2*-Lokus auch als Diversitätsmarker einer Population verwenden. Es muss hier jedoch kurz auf die Unterschiede zu Mikrosatelliten, welche ebenfalls gerne als Diversitätsmarker eingesetzt werden, hingewiesen werden. Zum einen ist der Modus der Diversitätsgenerierung grundsätzlich verschieden. Mikrosatelliten stellen kurze Repeats weniger Basenpaare dar, im Falle von *P. falciparum* meist $(T)_n$ oder $(TA)_n$ [Su und Wellems (1996)]. Der *msp2*-Lokus teilt sich in zwei dimorphe Gruppen [Smythe et al. (1991)], Allele innerhalb einer Gruppe unterscheiden sich in Modulaufbau und SNPs. Zum anderen handelt es sich bei Mikrosatelliten in der Regel um neutrale Marker [Su und Wootton (2004)], während das *msp2*-Gen ein vom Immunsystem auf Diversität selektioniertes Antigen darstellt [Hughes und Hughes (1995), Escalante et al. (1998)].

In der von uns untersuchten Population in Lambaréné konnten wir für den *msp2*-Lokus (auf Basis der Nukleinsäuresequenz) eine erwartete Heterozygotie (H_e) von 0,98 ermitteln, entsprechend einer außerordentlich hohen Diversität. Im Vergleich

dazu lag der H_e -Wert am innerhalb des *pfcr*-Gens befindlichen Mikrosatelliten *B5M47* bei 0,11 in annähernd derselben Population. Unselektionierte Mikrosatelliten zeigten H_e -Werte von 0,76 – 0,80 in afrikanischen Parasiten [Anderson et al. (2000)], diese Werte lagen signifikant unterhalb des H_e -Wertes für den *msp2*-Lokus ($p < 0,0001$). Diese Daten stehen in Einklang mit einer starken Selektion des *msp2*-Lokus in Lambaréné in Richtung höherer Diversität.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Wir konnten zeigen, dass 2–4 Jahre nach Entfernen von Chloroquin aus den nationalen Therapierichtlinien wieder Chloroquin-sensitive Parasiten nach Lambaréné, Gabun zurückgekehrt sind. Jedoch stellen resistente Parasiten weiterhin die überwältigende Mehrheit der Population dar. Die Sensitivitätsentwicklung in Lambaréné ist demnach deutlich weniger stark ausgeprägt, als es in Malawi beobachtet wurde. Gründe hierfür mögen in der geringeren Ausgangsmenge sensibler Parasiten in Lambaréné und einer eventuell weniger rigorosen Minimierung der Chloroquinverwendung liegen. In jedem Fall ist der Wiedereinsatz von Chloroquin zur Malariabehandlung keine Option für die nähere Zukunft. Dennoch wäre regelmäßiges Screenen der lokalen Parasitenpopulation sinnvoll zur weiteren Verfolgung der Entwicklung. Auch wäre es interessant zu ermitteln, in welchem Umfang Chloroquin weiterhin erhältlich ist und konsumiert wird, um die Umsetzung der neuen Therapierichtlinien gegebenenfalls zu optimieren.

Durch Sequenzierung des *pfcr*-Allels der neu aufgetretenen sensitiven Isolate konnten wir nachweisen, dass diese über das vollständige Wildtypallel verfügten, womit eine Rückmutation vormals resistenter Parasiten als Entstehungsmechanismus ausgeschlossen wurde. Analyse der sensitiven Haplotypen erbrachte zwei verschiedene Varianten: Erstere unterschied sich vollkommen von der resistenten Population, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese von außerhalb eingewanderte sensitive Parasiten darstellte. Die zweite Variante zeigte einen Haplotyp, der bis 20 kb *upstream* des *pfcr*-Gens identisch zum lokal dominanten resistenten Haplotypen war, anschließend divergierten die Sequenzen. Hier liegt die Hypothese nahe, dass es sich um einen bereits in die lokale resistente Population eingekreuzten Parasiten handelte.

Die Haplotypenanalyse der resistenten Population erbrachte das Vorliegen eines dominanten Lambaréné-Haplotypen, welcher sich lediglich am 57 kb *downstream* des *pfcr*-Gens gelegenen Mikrosatelliten *PE14F* vom afrikanischen Haupthaploty-

pen unterschied. Die Konservierung des dominanten Haplotypen war allgemein sehr hoch, insbesondere war jedoch die *upstream* des *pfert*-Lokus gelegene Region stark konserviert. Dies stützt die oben formulierte Hypothese, dass der sensitive Parasit, der in der *upstream*-Region seines Haplotypens identisch zum lokalen resistenten Haplotypen ist, diesen Teil durch Einkreuzen in die lokale resistente Population erhalten hat. Eine statistische Auswertung dieser Fragestellung zeigte, dass die Hypothese des Einkreuzens für diesen Stamm über hundertfach wahrscheinlicher ist, als dass per Zufall ein sensitiver Stamm über einen teilweise resistenten Haplotypen verfügt.

Auch die Untersuchung des *msp2*-Lokus spricht für diese Hypothese. Während die eingewanderten Parasiten hier keine typischen Lambaréné-Allele zeigten, war das Allel des eingekreuzten Isolates sequenzgleich zu den Allelen einiger Parasiten der aktuellen resistenten Population als auch aus den Jahren 2000/01. Bei Alleldifferenzierung nach Fragmentlängen stellte dieses Allel das dominante Lambaréné-Allel dar, welches 40% der aktuellen Population umfasste. Wir vertreten also die Hypothese, dass durch Einwandern und anschließendes Einkreuzen sensitive Parasiten nach Lambaréné zurückgekehrt sind. Wir sind demnach die ersten, die ein Modell für den genetischen Mechanismus der Rückkehr von Chloroquin-Sensitivität in ehemals vollkommen resistente Populationen aufstellen konnten.

Die Konservierung des dominanten Haplotypen war allgemein sehr hoch, nahm aber von 1995/96 nach 2005–07 ab, wobei sich interessanterweise die größte Konservierungsreduktion bereits vor Änderung der nationalen Therapierichtlinien vollzogen hatte. Der Rückgang der Konservierung war nur schwach ausgeprägt, was mit der ebenfalls mäßigen Rückkehr sensitiver Parasiten in Einklang steht. Bei Betrachtung des Diversitätsverlaufes um den *pfert*-Lokus – also des Ausmaßes des *selective sweeps* – fiel eine ausgeprägte Asymmetrie auf: In der Region *upstream* des *pfert*-Gens zeigte sich eine deutlich niedrigere Diversität als *downstream*. Im Laufe der Jahre akzentuierte sich die beobachtete Asymmetrie. Dies wurde von uns mit einer auf Diversität zielenden Selektion des *downstream* gelegenen *var*-Genclusters, welches für eines der wichtigsten Antigene von *P. falciparum* kodiert, in Verbindung gebracht. Eine erhöhte Konservierung dieser Antigene könnte einen *fitness cost* resistenter Parasiten darstellen und so Ursache der Rückkehr sensitiver Parasiten unter Abwesenheit von Chloroquindruck darstellen. Es handelt sich hierbei jedoch lediglich um eine Hypothese, welche in zukünftigen Arbeiten näher beleuchtet werden sollte.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Die weltweite Ausbreitung Chloroquin-resistenter *Plasmodium falciparum* Stämme stellt ein großes Problem bei der Behandlung der Malaria tropica dar. Vor Kurzem wurde aus Malawi jedoch eine umfangreiche Rückkehr sensitiver Stämme berichtet, nachdem dort der Einsatz von Chloroquin vor Jahren erfolgreich unterbunden worden war. Diese Beobachtung wirft zwei grundlegende Fragen auf: erstens, ob es sich hierbei um ein weltweit reproduzierbares Phänomen handelt, und zweitens, welcher genetische Mechanismus dem zu Grunde liegt.

In dieser Arbeit wurde versucht, diesen Fragen an Hand der ehemals zu 100% resistenten Region von Lambaréné, Gabun, nachzugehen, wo Chloroquin im Jahre 2003 aus den nationalen Therapieleitlinien entfernt worden war. Wir untersuchten parasitäre DNA aus 145 Proben der Jahre 2005 – 07 auf das vorliegende Allel des *Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter (pfcr1)*, dem für Chloroquin-Resistenz verantwortlichen Gen. Mit insgesamt vier sensitiven Isolaten (3%) konnten wir einen signifikanten Anstieg der Sensitivität feststellen ($p = 0,026$).

Auf Grund eines *selective sweeps* sind in resistenten Parasiten neben dem *pfcr1*-Allel auch die benachbarten chromosomalen Regionen weitgehend konserviert. Mittels Analyse der Haplotypen – bestimmt durch Sequenzierung von Mikrosatellitenmarkern – konnte daher der jeweilige genetische Hintergrund von resistenten sowie sensitiven Stämmen charakterisiert werden. Eine Untersuchung von 132 resistenten Proben aus den Jahren 1995 – 2002 zeigte das Vorliegen eines lokal dominanten resistenten Haplotypen. Der Konservierungsgrad dieses Haplotypen war zu allen Zeitpunkten hoch, nahm im Laufe der Jahre jedoch ab. Im Gegensatz hierzu zeigten die sensitiven Isolate zwei verschiedene Varianten von Haplotypen – einen ohne jegliche Ähnlichkeiten zur lokalen resistenten Population und einen, der auf einer

Länge von mindestens 27 kb identisch zum lokal dominanten resistenten Haploypen war.

Diese Daten legen nahe, dass eine Abnahme des vormals durch Chloroquin ausgeübten Selektionsdruckes eine Rückkehr sensitiver Stämme nach Lambaréné ermöglichte – wenn auch nur in begrenztem Ausmaß. Durch Einkreuzen konnte sich das sensitive Allel in der lokalen resistenten Population etablieren.

Anhang A

Patientendaten

ID	Datum	ID	Datum	ID	Datum
M1	23.04.95	M80	26.11.96	S57	25.01.96
M2	11.11.95	M83	05.08.96	S59	06.06.96
M4	08.03.96	M94	14.11.96	S60	26.01.96
M8	28.06.95	M96	30.11.96	S62	20.05.96
M30	15.12.95	S21	20.04.95	S65	18.02.96
M36	29.09.95	S23	03.05.95	S67	28.02.96
M37	29.09.95	S25	04.05.95	S71	22.03.96
M43	08.08.95	S28	22.09.95	S75	15.04.96
M48	07.10.95	S35	28.06.95	S78	04.05.96
M56	05.02.96	S37	29.06.95	S79	08.05.96
M59	05.02.96	S44	17.07.95	S80	09.05.96
M64	09.05.96	S45	17.07.95	S84	18.07.96
M65	01.03.96	S50	16.10.95	S86	05.09.96
M67	04.04.96	S52	22.11.95	S90	26.09.96
M72	07.06.96	S54	04.12.95	S95	09.10.96
M77	12.07.96	S55	04.12.95	S96	10.10.96

Tabelle A.1: Verwendete Proben der 1/95C-Studie.
 Angegeben ist die Patientenidentifikationsnummer (ID) sowie das Entnahmedatum.

ID	Datum	ID	Datum	ID	Datum	ID	Datum
N1	01.11.02	N17	08.11.02	N29	12.11.02	N49	21.11.02
N2	01.11.02	N18	08.11.02	N30	12.11.02	N50	22.11.02
N3	01.11.02	N19	08.11.02	N33	15.11.02	N51	23.11.02
N4	02.11.02	N20	08.11.02	N34	15.11.02	N52	23.11.02
N5	03.11.02	N21	10.11.02	N35	15.11.02	N53	24.11.02
N7	03.11.02	N22	10.11.02	N36	15.11.02	N54	24.11.02
N8	03.11.02	N23	10.11.02	N37	15.11.02	N55	25.11.02
N10	04.11.02	N24	10.11.02	N39	16.11.02	N56	25.11.02
N12	04.11.02	N25	10.11.02	N40	19.11.02	N59	04.12.02
N13	04.11.02	N26	11.11.02	N43	21.11.02	N60	xx.12.02
N14	07.11.02	N27	11.11.02	N44	21.11.02	N61	18.12.02
N15	08.11.02	N28	12.11.02	N48	21.11.02	N63	19.12.02

Tabelle A.2: Verwendete Proben der 2002-Studie.

Angegeben ist die Patientenidentifikationsnummer (ID) sowie das Entnahmedatum.

ID	Datum	ID	Datum	ID	Datum	ID	Datum
TDU1	25.04.05	TDU22	26.06.05	FED3	30.09.05	TDR8	19.01.06
TDU2	20.04.05	TDU23	05.07.05	FED4	20.09.05	TDR9	30.01.06
TDU3	03.05.05	TDU24	05.07.05	FED5	03.10.05	TDR10	30.01.06
TDU4	20.04.05	TDU25	27.06.05	FED6	03.10.05	TDR11	13.02.06
TDU5	13.05.05	TDU26	12.06.05	FED7	06.10.05	TDR12	13.02.06
TDU6	13.05.05	TDU27	18.06.05	FED8	06.10.05	TDR13	19.02.06
TDU7	19.05.05	TDU28	14.07.05	FED9	11.10.05	TDR14	19.02.06
TDU8	16.05.05	TDU29	21.07.05	FED10	11.10.05	TDR15	23.02.06
TDU9	24.05.05	TDU30	21.07.05	FED11	10.10.05	TDR16	23.02.06
TDU10	24.05.05	TDU31	29.07.05	FED12	10.10.05	TDR17	12.03.06
TDU11	01.06.05	TDU32	29.07.05	FED13	17.10.05	TDR18	12.03.06
TDU12	01.06.05	TDU33	04.10.05	FED14	17.10.05	TDR19	16.03.06
TDU13	04.06.05	TDU34	04.10.05	FED15	16.10.05	TDR20	09.09.06
TDU14	04.06.05	TDU35	08.10.05	FED16	20.10.05	TDR21	20.03.06
TDU15	09.06.05	TDU36	08.10.05	TDR1	30.12.05	TDR22	20.03.06
TDU16	09.06.05	TDU37	05.10.05	TDR2	30.12.05	TDR23	24.03.06
TDU17	15.06.05	TDU38	11.10.05	TDR3	12.01.06	TDR24	21.03.06
TDU18	15.06.05	TDU39	14.10.05	TDR4	12.01.06	TDR25	03.04.06
TDU19	21.06.05	TDU40	14.10.05	TDR5	16.01.06	TDR26	03.04.06
TDU20	21.06.05	FED1	26.09.05	TDR6	16.01.06		
TDU21	30.06.05	FED2	26.09.05	TDR7	19.01.06		

Tabelle A.3: Verwendete Proben der Ferroquin-Toleranz-Studie.

Angegeben ist die Patientenidentifikationsnummer (ID) sowie das Entnahmedatum.

ID	Datum	ID	Datum	ID	Datum	ID	Datum
BOE	15.08.06	MAF	26.03.07	MMY	19.02.07	NP	07.07.06
EBA 1	19.02.07	MLP 1	12.02.07	MOA	03.08.06	NYA	19.02.07
EBA 2	12.03.07	MLP 2	19.03.07	MOL	12.03.07	NZA	07.07.06
EJN	19.02.07	MMP	19.02.07	NGA	19.02.07	PAG	07.03.07
EOF	19.03.07	MMR	22.08.06	NGD	19.02.07		

Tabelle A.4: Verwendete Proben der Antigen-Diversitäts-Studie.
 Angegeben ist die Patientenidentifikationsnummer (ID) sowie das Entnahmedatum.

ID	Datum	ID	Datum	ID	Datum
L1547 a2d0	02.01.06	L2021 a2d0	27.03.06	L2368 a1d2	23.01.06
L1568 a1d2	04.01.06	L2168 a1d0	27.02.07	L2374 a1d0	27.05.06
L1714 a3d2	15.01.06	L2200 a2d0	23.01.06	L2382 a2d2	11.09.06
L1725 a1d0	15.02.06	L2302 a1d0	11.01.06	L2382 a3d0	27.10.06
L1882 a1d0	05.05.06	L2302 a2d2	18.04.06	L2382 a4d0	08.12.06
L1884 a1d0	30.05.06	L2332 a2d0	31.07.06	L1629 a1d2	14.02.06
L1928 a1d0	16.03.06	L2332 a3d0	24.08.06	L2202 a4d0	01.04.06
L1960 a2d2	31.08.06	L2332 a4d0	25.09.06	L2321 a1d0	01.02.06
L2010 a4d0	12.05.06	L2334 a2d0	16.03.07		

Tabelle A.5: Verwendete Proben der IPTi-Studie.
 Angegeben ist die Patientenidentifikationsnummer (ID) sowie das Entnahmedatum.

ID	Datum	ID	Datum	ID	Datum
SP1	20.03.07	SP14	05.05.07	SP27	13.06.07
SP2	20.03.07	SP15	05.05.07	SP28	18.06.07
SP3	20.03.07	SP16	05.05.07	SP29	21.06.07
SP4	27.03.07	SP17	07.05.07	SP2 T	17.04.07
SP5	27.03.07	SP18	12.05.07	SP5 T	18.04.07
SP6	27.03.07	SP19	13.05.07	SP7 T	22.04.07
SP7	30.03.07	SP20	13.05.07	SP13 T	25.05.07
SP8	01.04.07	SP21	31.05.07	SP14 T	02.06.07
SP9	04.04.07	SP22	03.06.07	SP15 T*	21.05.07
SP10	05.04.07	SP23	07.06.07	SP18 T	09.06.07
SP11	21.04.07	SP24	10.06.07	SP19 T	10.06.07
SP12	23.04.07	SP25	13.06.07	SP20 T	10.06.07
SP13	27.04.07	SP26	13.06.07		

Tabelle A.6: Verwendete Proben der SP-Wirksamkeitsstudie.
 Angegeben ist die Patientenidentifikationsnummer (ID) sowie das Entnahmedatum.
 *für die Probe SP15 T wurde der genotypische Nachweis erbracht, dass es sich um eine andere Infektion als SP15 handelt

Anhang B

Sequenzen

<i>PE14D</i>	84
<i>B5M77</i>	87
<i>3E7</i>	90
<i>9B12</i>	96
<i>7A11</i>	99
<i>PE14F</i>	102
<i>B5M47</i>	105
<i>3D7</i>	106
<i>FC27</i>	107

Abkürzungsverzeichnis

Aqua _{dest.}	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
CQ	Chloroquin
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
<i>dhfr</i>	<i>dihydrofolate reductase</i>
<i>dhps</i>	<i>dihydropteroate synthetase</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
H_e	<i>expected heterozygosity</i> = erwartete Heterozygotie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ID	Identifikationsnummer
IPTi	<i>Intermittent Preventive Treatment in Infants</i>
<i>i.v.</i>	intravenös
kb	Kilobasen
KG	Körpergewicht
<i>msp2</i>	<i>merozoite surface protein 2</i>
<i>P.</i>	<i>Plasmodium</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> = Polymerase-Kettenreaktion
<i>pfert</i>	<i>P. falciparum chloroquine resistance transporter</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SP	Sulfadoxin-Pyrimethamin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Tabellenverzeichnis

2.1	Primer <i>pfert</i> -K76T-PCR	22
2.2	Primer <i>pfert</i> -PCR Resistenz-assoziierte Mutationen	24
2.3	Primer <i>msp2</i> -PCR	26
2.4	Primer Mikrosatelliten-PCR	28
3.1	Chloroquin-resistente Proben der Jahre 2005 – 07	33
3.2	Resistenz-assoziierte Mutationen in den sensitiven Proben	36
3.3	Vergleich des <i>pfert</i> -Allels in sensitiven und resistenten Stämmen	37
3.4	Modulaufbau der <i>FC27</i> -Allele	39
3.5	Gruppen der <i>FC27</i> -Allele	39
3.6	Aminosäure-Polymorphismen in den <i>FC27</i> -Allelen	40
3.7	Vergleich der Diversität der <i>3D7</i> - und <i>FC27</i> -Allele	41
3.8	Mikrosatellitendaten der resistenten Isolate aus der 1/95C-Studie	46
3.9	Mikrosatellitendaten der resistenten Isolate aus der 2002-Studie	47
3.10	Mikrosatellitendaten der resistenten Isolate aus der Ferroquin-Toleranz-Studie	48
3.11	Mikrosatellitendaten der resistenten Isolate aus der Antigen-Diversitäts-Studie	48
3.12	Mikrosatellitendaten der resistenten Isolate aus der IPTi-Studie	49
3.13	Mikrosatellitendaten der resistenten Isolate der SP-Wirksamkeitsstudie	50
3.14	Mikrosatellitendaten der sensitiven Isolate	50
3.15	Konservierung und Diversität in den Jahren 2005 – 07	51
3.16	Mikrosatellitendaten der Jahre 1995/96, 2002 und 2005 – 07	56
3.17	Haplotypdaten der Jahre 1995/96, 2002 und 2005 – 07	58
A.1	Verwendete Proben der 1/95C-Studie	80
A.2	Verwendete Proben der 2002-Studie	81
A.3	Verwendete Proben der Ferroquin-Toleranz-Studie	81
A.4	Verwendete Proben der Antigen-Diversitäts-Studie	82
A.5	Verwendete Proben der IPTi-Studie	82
A.6	Verwendete Proben der SP-Wirksamkeitsstudie	82

Abbildungsverzeichnis

1.1	Malariainzidenz weltweit	4
1.2	Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i>	6
1.3	Chloroquin-Resistenzlage weltweit	11
1.4	Strukturformel von Chloroquin	11
1.5	Wirkmechanismus von Chloroquin	12
1.6	Ausbreitung der Chloroquinresistenz	15
3.1	Screening der Feldisolate auf die Resistenzmutation <i>pfcr</i> K76T	33
3.2	Chromatogramm: SP26 <i>pfcr</i> -Allel, Positionen 74, 75, 76	34
3.3	Chromatogramm: SP26 <i>pfcr</i> -Allel, Position 220	34
3.4	Alignment der <i>pfcr</i> -Loci der sensitiven Isolate	36
3.5	Modularer Aufbau der <i>FC27</i> -Allele	40
3.6	Verteilung der Fragmentlängen der <i>3D7</i> -Allele	41
3.7	Verteilung der Fragmentlängen der <i>FC27</i> -Allele	42
3.8	Schnittmuster der <i>FC27</i> -Allele	43
3.9	Haplotypen der Stämme <i>FCR3</i> und <i>3D7</i>	44
3.10	Beispiel für Mikrosatellitenanalyse	45
3.11	Lokal dominanter resistenter Haplotyp	52
3.12	Haplotypen der sensitiven Monoinfektionen	53
3.13	Entwicklung des Konservierungsgrades der Mikrosatelliten	55
3.14	Verlauf der erwarteten Heterozygotie (H_e) über den Haplotypen	57

Literaturverzeichnis

- AM Abdel-Muhsin, MJ Mackinnon, E Ali, KA el Nassir, S Suleiman, S Ahmed, D Walliker und HA Babiker. Evolution of drug-resistance genes in *Plasmodium falciparum* in an area of seasonal malaria transmission in Eastern Sudan. *J Infect Dis*, **189**(7):1239–1244, 2004.
- M Aikawa. High-resolution autoradiography of malarial parasites treated with 3 H-chloroquine. *Am J Pathol*, **67**(2):277–284, 1972.
- M Alifrangis, JP Lusingu, B Mmbando, MB Dalgaard, LS Vestergaard, D Ishengoma, IF Khalil, TG Theander, MM Lemnge und IC Bygbjerg. Five-year surveillance of molecular markers of *Plasmodium falciparum* antimalarial drug resistance in Korogwe District, Tanzania: accumulation of the 581G mutation in the *P. falciparum* dihydropteroate synthase gene. *Am J Trop Med Hyg*, **80**(4):523–527, 2009.
- TJ Anderson, B Haubold, JT Williams, JG Estrada-Franco, L Richardson, R Mollinedo, M Bockarie, J Mokili, S Mharakurwa, N French, J Whitworth, ID Velez, AH Brockman, F Nosten, MU Ferreira und KP Day. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol*, **17**(10):1467–1482, 2000.
- TJ Anderson, S Nair, D Sudimack, JT Williams, M Mayxay, PN Newton, JP Guttmann, FM Smithuis, TH Tran, IV van den Broek, NJ White und F Nosten. Geographical distribution of selected and putatively neutral SNPs in Southeast Asian malaria parasites. *Mol Biol Evol*, **22**(12):2362–2374, 2005.
- DJ Bacon, AM McCollum, SM Griffing, C Salas, V Soberon, M Santolalla, R Haley, P Tsukayama, C Lucas, AA Escalante und V Udhayakumar. Dynamics of malaria drug resistance patterns in the Amazon basin region following changes in Peruvian national treatment policy for uncomplicated malaria. *Antimicrob Agents Chemother*, **53**(5):2042–2051, 2009.
- LK Basco und P Ringwald. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XXIV. Trends of in vitro antimalarial drug responses in Yaounde, Cameroon. *Am J Trop Med Hyg*, **76**(1):20–26, 2007.
- DJ Bell, SK Nyirongo, M Mukaka, EE Zijlstra, CV Plowe, ME Molyneux, SA Ward und PA Winstanley. Sulfadoxine-pyrimethamine-based combinations for malaria:

- a randomised blinded trial to compare efficacy, safety and selection of resistance in Malawi. *PLoS ONE*, **3**(2):e1578, 2008.
- TN Bennett, AD Kosar, LM Ursos, S Dzekunov, AB Singh Sidhu, DA Fidock und PD Roepe. Drug resistance-associated pfCRT mutations confer decreased Plasmodium falciparum digestive vacuolar pH. *Mol Biochem Parasitol*, **133**(1):99–114, 2004.
- RK Binder, S Borrmann, AA Adegnik, MA Missinou, PG Kremsner und JFJ Kun. Polymorphisms in the parasite genes for pfert and pfmdr-1 as molecular markers for chloroquine resistance in Plasmodium falciparum in Lambarene, Gabon. *Parasitol Res*, **88**(5):475–476, 2002.
- A Björkman und A Bhattarai. Public health impact of drug resistant Plasmodium falciparum malaria. *Acta Trop*, **94**(3):163–169, 2005.
- PB Bloland, EM Lackritz, PN Kazembe, JB Were, R Steketee und CC Campbell. Beyond chloroquine: implications of drug resistance for evaluating malaria therapy efficacy and treatment policy in Africa. *J Infect Dis*, **167**(4):932–937, 1993.
- S Borrmann, RK Binder, AA Adegnik, MA Missinou, S Issifou, M Ramharter, WH Wernsdorfer und PG Kremsner. Reassessment of the resistance of Plasmodium falciparum to chloroquine in Gabon: implications for the validity of tests in vitro vs. in vivo. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **96**(6):660–663, 2002.
- PG Bray, RE Martin, L Tilley, SA Ward, K Kirk und DA Fidock. Defining the role of PfCRT in Plasmodium falciparum chloroquine resistance. *Mol Microbiol*, **56**(2):323–333, 2005.
- PC Bull, BS Lowe, M Kortok, CS Molyneux, CI Newbold und K Marsh. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat Med*, **4**(3):358–360, 1998.
- GD Burchard, RD Horstmann, WH Wernsdorfer und M Dietrich. Plasmodium falciparum-malaria: resistance to chloroquine, but sensitivity to mefloquine in the Gabon. A prospective in-vitro study. *Tropenmed Parasitol*, **35**(1):1–4, 1984.
- EB Chaponda, C Shinondo, PE Thuma und S Mharakurwa. The prevalence of the pfert-76 point mutation on Plasmodium falciparum malaria infections of Lukasa urban district, Zambia. Abstract 988 ASTMH-Meeting, 2008.
- N Chen, DE Kyle, C Pasay, EV Fowler, J Baker, JM Peters und Q Cheng. pfert allelic types with two novel amino acid mutations in chloroquine-resistant Plasmodium falciparum isolates from the Philippines. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**(11):3500–3505, 2003.
- DJ Conway, C Roper, AM Oduola, DE Arnot, PG Kremsner, MP Grobusch, CF Curtis und BM Greenwood. High recombination rate in natural populations of Plasmodium falciparum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(8):4506–4511, 1999.

- RA Cooper, MT Ferdig, XZ Su, LM Ursos, J Mu, T Nomura, H Fujioka, DA Fidock, PD Roepe und TE Wellems. Alternative mutations at position 76 of the vacuolar transmembrane protein PfCRT are associated with chloroquine resistance and unique stereospecific quinine and quinidine responses in *Plasmodium falciparum*. *Mol Pharmacol*, **61**(1):35–42, 2002.
- RA Cooper, CL Hartwig und MT Ferdig. pfert is more than the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance gene: a functional and evolutionary perspective. *Acta Trop*, **94**(3):170–180, 2005.
- RA Cooper, KD Lane, B Deng, J Mu, JJ Patel, TE Wellems, X Su und MT Ferdig. Mutations in transmembrane domains 1, 4 and 9 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter alter susceptibility to chloroquine, quinine and quinidine. *Mol Microbiol*, **63**(1):270–282, 2007.
- MP Dal-Bianco, KB Köster, UD Kombila, JF Kun, MP Grobusch, GM Ngoma, PB Matsiegui, C Supan, CL Salazar, MA Missinou, S Issifou, B Lell und P Kremsner. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection in Gabonese adults. *Am J Trop Med Hyg*, **77**(5):939–942, 2007.
- JT DaRe, RK Mehlotra, P Michon, I Mueller, J Reeder, YD Sharma, M Stoneking und PA Zimmerman. Microsatellite polymorphism within pfert provides evidence of continuing evolution of chloroquine-resistant alleles in Papua New Guinea. *Malar J*, **6**:34, 2007.
- A de Almeida, AP Arez, PV Cravo und VE do Rosário. Analysis of genetic mutations associated with anti-malarial drug resistance in *Plasmodium falciparum* from the Democratic Republic of East Timor. *Malar J*, **8**:59, 2009.
- A Djimdé, OK Doumbo, JF Cortese, K Kayentao, S Doumbo, Y Diourté, A Dicko, XZ Su, T Nomura, DA Fidock, TE Wellems, CV Plowe und Coulibaly D. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med*, **344**(4):257–63, 2001.
- AA Djimdé, B Fofana, I Sagara, B Sidibe, S Toure, D Dembele, S Dama, D Ouloguem, A Dicko und OK Doumbo. Efficacy, safety, and selection of molecular markers of drug resistance by two ACTs in Mali. *Am J Trop Med Hyg*, **78**(3):455–461, 2008.
- A Dondorp, F Nosten, K Stepniewska, N Day, N White und South East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial (SEAQUAMAT) group. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet*, **366**(9487):717–725, 2005.
- DTG Leitlinien. *Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit*. URL <http://leitlinien.net>.

- AA Escalante, AA Lal und FJ Ayala. Genetic polymorphism and natural selection in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genetics*, **149**(1):189–202, 1998.
- I Felger, L Tavul, S Kabintik, V Marshall, B Genton, M Alpers und HP Beck. *Plasmodium falciparum*: Extensive Polymorphism in Merozoite Surface Antigen 2 Alleles in an Area with Endemic Malaria in Papua New Guinea. *Exp Parasitol*, **79**(2):106–116, 1994.
- I Felger, VM Marshal, JC Reeder, JA Hunt, CS Mgone und HP Beck. Sequence diversity and molecular evolution of the merozoite surface antigen 2 of *Plasmodium falciparum*. *J Mol Evol*, **45**(2):154–160, 1997.
- I Felger, A Irion, S Steiger und HP Beck. Genotypes of merozoite surface protein 2 of *Plasmodium falciparum* in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **93**(Suppl.1): 3–9, 1999.
- MU Ferreira und DL Hartl. *Plasmodium falciparum*: worldwide sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-2 (MSP-2). *Exp Parasitol*, **115**(1):32–40, 2007.
- DA Fidock, T Nomura, AK Talley, RA Cooper, SM Dzekunov, MT Ferdig, LMB Ursos, ABS Sidhu, B Naudé, KW Deitsch, XZ Su, JC Wootton, PD Roepe und Wellem TE. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell*, **6**(4):861–871, 2000.
- FISL. *Fondation Internationale de l'Hôpital Albert Schweitzer à Lambaréné*. URL <http://www.schweitzerlambarene.net>.
- M Foley und L Tilley. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance and prospects for new agents. *Pharmacol Ther*, **79**(1):55–87, 1998.
- SJ Foote, DE Kyle, RK Martin, AM Oduola, K Forsyth, DJ Kemp und Cowman AF. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **345**(6272):255–258, 1990.
- EV Fowler, M Chavchich, N Chen, JM Peters, DE Kyle, ML Gatton und Q Cheng. Physical linkage to drug resistance genes results in conservation of var genes among West Pacific *Plasmodium falciparum* isolates. *J Infect Dis*, **194**(7):939–948, 2006.
- MJ Gardner, N Hall, E Fung, O White, M Berriman, RW Hyman, JM Carlton, A Pain, KE Nelson, S Bowman, IT Paulsen, K James, JA Eisen, K Rutherford, SL Salzberg, A Craig, S Kyes, MS Chan, V Nene, SJ Shallom, B Suh, J Peterson, S Angiuoli, M Pertea, J Allen, J Selengut, D Haft, MW Mather, AB Vaidya, DM Martin, AH Fairlamb, MJ Fraunholz, DS Roos, SA Ralph, GI McFadden, LM Cummings, GM Subramanian, C Mungall, JC Venter, DJ Carucci, SL Hoffman, C Newbold, RW Davis, CM Fraser und B Barrell. Genome sequence of the

- human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **419**(6906):498–511, 2002.
- DE Goldberg und AFG Slater. The pathway of hemoglobin degradation in malaria parasites. *Parasitol Today*, **8**(8):280–283, 1992.
- MP Grobusch, B Lell, NG Schwarz, J Gabor, J Dornemann, M Potschke, S Oyakhirrome, GC Kiessling, M Necek, MU Langin, PK Klouwenberg, A Klopfer, B Namann, H Altun, ST Agnandji, J Goesch, M Decker, CL Salazar, C Supan, DU Kombila, L Borchert, KB Koster, P Pongratz, AA Adegnika, I Glasenapp, S Issifou und PG Kremsner. Intermittent preventive treatment against malaria in infants in Gabon—a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Infect Dis*, **196**(11):1595–1602, 2007.
- AD Harris. Malaria: keeping the mosquitoes at bay. *Lancet*, **342**(8870):506–507, 1993.
- K Hayton und XZ Su. Drug resistance and genetic mapping in *Plasmodium falciparum*. *Curr Genet*, **54**(5):223–239, 2008.
- T Hiepe, R Lucius und B (Hrsg.) Gottstein. *Allgemeine Parasitologie*. Parey, 2006.
- WG Hill und A Robertson. The effect of linkage on limits to artificial selection. *Genet Res*, **8**(3):269–294, 1966.
- G Holmgren, JP Gil, PM Ferreira, MI Veiga, CO Obonyo und A Björkman. Amodiaquine resistant *Plasmodium falciparum* malaria in vivo is associated with selection of pfert 76T and pfmdr1 86Y. *Infect Genet Evol*, **6**(4):309–314, 2006.
- MK Hughes und AL Hughes. Natural selection on *Plasmodium* surface proteins. *Mol Biochem Parasitol*, **71**(1):99–113, 1995.
- NM Huong, S Hewitt, TM Davis, LD Dao, TQ Toan, TB Kim, NT Hanh, VN Phuong, DH Nhan und LD Cong. Resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in a highly endemic area of southern Viet Nam: a study in vivo and in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **95**(3):325–329, 2001.
- P Jacquier, P Druilhe, H Felix, B Diquet und L Djibo. Is *plasmodium falciparum* resistance to chloroquine reversible in absence of drug pressure? *Lancet*, **2**(8449):270–271, 1985.
- JJ Juliano, JJ Kwiek, K Cappell, V Mwapasa und SR Meshnick. Minority-variant pfert K76T mutations and chloroquine resistance, Malawi. *Emerg Infect Dis*, **13**(6):872–877, 2007.
- FH Kayser, EC Böttger, RM Zinkernagel, O Haller, J Eckert und P Deplazes. *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, 2005.

- Y Kim und W Stephan. Detecting a local signature of genetic hitchhiking along a recombining chromosome. *Genetics*, **160**(2):765–777, 2002.
- I Kleinschmidt, C Schwabe, M Shiva, JL Segura, V Sima, SJ Mabunda und M Coleman. Combining indoor residual spraying and insecticide-treated net interventions. *Am J Trop Med Hyg*, **81**(3):519–524, 2009.
- J (Hrsg.) Knobloch. *Tropen- und Reisemedizin*. Gustav Fischer Verlag, 1996.
- PG Kremsner, S Winkler, C Brandts, W Graninger und U Bienzle. Curing of chloroquine-resistant malaria with clindamycin. *Am J Trop Med Hyg*, **49**(5):650–654, 1993.
- PG Kremsner, S Winkler, C Brandts, S Neifer, U Bienzle und W Graninger. Clindamycin in combination with chloroquine or quinine is an effective therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children from Gabon. *J Infect Dis*, **169**(2):467–470, 1994.
- DJ Krogstad, IY Gluzman, BL Herwaldt, PH Schlesinger und TE Wellems. Energy dependence of chloroquine accumulation and chloroquine efflux in *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol*, **43**(1):57–62, 1992.
- JG Kublin, JF Cortese, EM Njunju, RA Mukadam, JJ Wirima, PN Kazembe, AA Djimdé, B Kouriba, TE Taylor und CV Plowe. Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis*, **187**(12):1870–1875, 2003.
- JF Kun, RJ Schmidt-Ott, LG Lehman, B Lell, D Luckner, B Greve, P Matousek und PG Kremsner. Merozoite surface antigen 1 and 2 genotypes and rosetting of *Plasmodium falciparum* in severe and mild malaria in Lambaréné, Gabon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **92**(1):110–114, 1998.
- S Kyes, H Taylor, A Craig, K Marsh und C Newbold. Genomic representation of var gene sequences in *Plasmodium falciparum* field isolates from different geographic regions. *Mol Biochem Parasitol*, **87**(2):235–238, 1997.
- MK Laufer und CV Plowe. Withdrawing antimalarial drugs: impact on parasite resistance and implications for malaria treatment policies. *Drug Resist Updat*, **7**(4-5):279–288, 2004.
- MK Laufer, PC Thesing, ND Eddington, R Masonga, FK Dzinjalama, SL Takala, TE Taylor und CV Plowe. Return of chloroquine antimalarial efficacy in Malawi. *N Engl J Med*, **355**(19):1959–1966, 2006.
- R Lucius und B Loos-Frank. *Parasitologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 1997.
- RE Martin und K Kirk. The malaria parasite’s chloroquine resistance transporter is a member of the drug/metabolite transporter superfamily. *Mol Biol Evol*, **21**(10):1938–1949, 2004.

- SK Martin, AM Oduola und WK Milhous. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science*, **235**(4791):899–901, 1987.
- PI Mayengue, H Rieth, A Khattab, S Issifou, PG Kremsner, MQ Klinkert und F Ntoumi. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections and multiplicity of infection in matched peripheral, placental and umbilical cord blood samples from Gabonese women. *Trop Med Int Health*, **9**(9):949–958, 2004.
- PI Mayengue, M Ndounga, MM Davy, N Tandou und F Ntoumi. In vivo chloroquine resistance and prevalence of the pfert codon 76 mutation in *Plasmodium falciparum* isolates from the Republic of Congo. *Acta Trop*, **95**(3):219–225, 2005.
- PI Mayengue, Y Kalmbach, S Issifou, PG Kremsner und F Ntoumi. No variation in the prevalence of point mutations in the Pfcrt and Pfmdr1 genes in isolates from Gabonese patients with uncomplicated or severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasitol Res*, **100**(3):487–493, 2007.
- AM McCollum, K Mueller, L Villegas, V Udhayakumar und AA Escalante. Common origin and fixation of *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in a low-transmission area in South America. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**(6):2085–2091, 2007.
- RK Mehlotra, G Mattera, K Bhatia, JC Reeder, M Stoneking und PA Zimmerman. Insight into the early spread of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* infections in Papua New Guinea. *J Infect Dis*, **192**(12):2174–2179, 2005.
- Christian G Meyer. *Tropenmedizin: Infektionskrankheiten*. ecomed Medizin, 2007.
- MA Missinou, JF Kun und PG Kremsner. No change in parasite genotype during single episodes of *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese children. *Parasitol Res*, **93**(4):322–327, 2004.
- T Mita, A Kaneko, JK Lum, B Bwijo, M Takechi, IL Zungu, T Tsukahara, K Tanabe, T Kobayakawa und A Björkman. Recovery of chloroquine sensitivity and low prevalence of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter gene mutation K76T following the discontinuance of chloroquine use in Malawi. *Am J Trop Med Hyg*, **68**(4):413–415, 2003.
- T Mita, A Kaneko, JK Lum, IL Zungu, T Tsukahara, H Eto, T Kobayakawa, A Björkman und K Tanabe. Expansion of wild type allele rather than back mutation in pfert explains the recent recovery of chloroquine sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Malawi. *Mol Biochem Parasitol*, **135**(1):159–163, 2004.
- K Mullis, F Faloona, S Scharf, R Saiki, G Horn und H Erlich. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**:263–273, 1986.

- L Mwai, E Ochong, A Abdirahman, SM Kiara, S Ward, G Kokwaro, P Sasi, K Marsh, S Borrmann, M Mackinnon und A Nzila. Chloroquine resistance before and after its withdrawal in Kenya. *Malar J*, **8**:106, 2009.
- DN Nabarro und EM Tayler. The roll back malariacampaign. *Science*, **280**(5372): 2067–2068, 1998.
- S Nair, JT Williams, A Brockman, L Paiphun, M Mayxay, PN Newton, JP Guthmann, FM Smithuis, TT Hien, NJ White, F Nosten und TJ Anderson. A selective sweep driven by pyrimethamine treatment in southeast asian malaria parasites. *Mol Biol Evol*, **20**(9):1526–1536, 2003.
- D Nash, S Nair, M Mayxay, PN Newton, J Guthman, F Nosten und TJC Anderson. Selection strength and hitchhiking around two anti-malarial resistance genes. *Proc R Soc B*, **272**(1568):1153–1161, 2005.
- NCBI Blast. *National Center for Biotechnology Information*. URL <file:///home/nici/www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.
- NCBI Map Viewer. *National Center for Biotechnology Information*. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>.
- MH Nguyen, TM Davis, J Cox-Singh, S Hewitt, QT Tran, BK Tran, TH Nguyen, NP Vo, HN Doan und DC Le. Treatment of uncomplicated falciparum malaria in southern Vietnam: can chloroquine or sulfadoxine-pyrimethamine be reintroduced in combination with artesunate? *Clin Infect Dis*, **37**(11):1461–1466, 2003.
- S Nkhoma, M Molyneux und S Ward. Molecular surveillance for drug-resistant Plasmodium falciparum malaria in Malawi. *Acta Trop*, **102**(2):138–142, 2007.
- AM Noor, JJ Mutheu, AJ Tatem, SI Hay und RW Snow. Insecticide-treated net coverage in Africa: mapping progress in 2000-07. *Lancet*, **373**(9657):58–67, 2009.
- N Noranate, R Durand, A Tall, L Marrama, A Spiegel, C Sokhna, B Pradines, S Cojean, M Guillotte, E Bischoff, MT Ekala, C Bouchier, T Fandeur, F Arieu, J Patarapotikul, J Le Bras, JF Trape, C Rogier und O Mercereau-Puijalon. Rapid dissemination of Plasmodium falciparum drug resistance despite strictly controlled antimalarial use. *PLoS ONE*, **2**(1):e139, 2007.
- F Ntoumi, J Ngoundou-Landji, F Lekoulou, A Luty, P Deloron und P Ringwald. Site-based study on polymorphism of Plasmodium falciparum MSP-1 and MSP-2 genes in isolates from two villages in Central Africa. *Parassitologia*, **42**(3-4): 197–203, 2000.
- PM O'Neill, PG Bray, SR Hawley, SA Ward und BK Park. 4-Aminoquinolines - Past, Present, and Future: A Chemical Perspective. *Pharmacol Ther*, **77**(1): 29–58, 1998.

- R Ord, N Alexander, S Dunyo, R Hallett, M Jawara, G Targett, CJ Drakeley und CJ Sutherland. Seasonal carriage of *pfert* and *pfmdr1* alleles in Gambian *Plasmodium falciparum* imply reduced fitness of chloroquine-resistant parasites. *J Infect Dis*, **196**(11):1613–1619, 2007.
- D Payne. Spread of Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today*, **3**(8):241–246, 1987.
- R Pearce, A Malisa, SP Kachur, K Barnes, B Sharp und C Roper. Reduced variation around drug-resistant *dhfr* alleles in African *Plasmodium falciparum*. *Mol Biol Evol*, **22**(9):1834–1844, 2005.
- RJ Pearce, H Pota, MS Evehe, el-H Bâ, G Mombo-Ngoma, AL Malisa, R Ord, W Inojosa, A Matondo, DA Diallo, W Mbacham, IV van den Broek, TD Swarthout, A Getachew, S Dejene, MP Grobusch, F Njie, S Dunyo, M Kweku, S Owusu-Agyei, D Chandramohan, M Bonnet, JP Guthmann, S Clarke, KI Barnes, E Streat, ST Katokele, P Uusiku, CO Agboghoroma, OY Elegba, B Cissé, IE A-Elbasit, HA Giha, SP Kachur, C Lynch, JB Rwakimari, P Chanda, M Hawela, B Sharp, I Naidoo und C Roper. Multiple origins and regional dispersal of resistant *dhps* in African *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Med*, **6**(4):e1000055, 2009.
- PlasmoDB. *The Plasmodium Genome Resource*. URL <http://www.plasmodb.org>.
- N Prescott, AW Stowers, Q Cheng, A Bobogare, CM Rzepczyk und A Saul. *Plasmodium falciparum* genetic diversity can be characterised using the polymorphic merozoite surface antigen 2 (MSA-2) gene as a single locus marker. *Mol Biochem Parasitol*, **63**(2):203–212, 1994.
- RBM. *Roll Back Malaria Partnership*. URL <http://www.rollbackmalaria.org>.
- MB Reed, KJ Saliba, SR Caruana, K Kirk und AF Cowman. *Pgh1* modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **403**(6772):906–909, 2000.
- Robert Koch-Institut. Reiseassoziierte Infektionskrankheiten 2008. Epidemiologisches Bulletin 39, 2009.
- DJ Roberts, AG Craig, AR Berendt, R Pinches, G Nash, K Marsh und CI Newbold. Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature*, **357**(6380):689–692, 1992.
- SJ Rogerson, E Chaluluka, M Kanjala, P Mkundika, C Mhango und ME Molyneux. Intermittent sulfadoxine-pyrimethamine in pregnancy: effectiveness against malaria morbidity in Blantyre, Malawi, in 1997–99. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **94**(5):549–553, 2000.
- C Roper, R Pearce, B Bredenkamp, J Gumede, C Drakeley, F Mosha, D Chandramohan und B Sharp. Antifolate antimalarial resistance in southeast Africa: a population-based analysis. *Lancet*, **361**(9364):1174–1181, 2003.

- C Roper, R Pearce, S Nair, B Sharp, F Nosten und T Anderson. Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. *Science*, **305**(5687):1124, 2004.
- RK Saiki, DH Gelfand, S Stoffel, SJ Scharf, R Higuchi, GT Horn, KB Mullis und HA Erlich. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**(4839):487–491, 1988.
- KJ Saliba, PI Folb und PJ Smith. Role for the Plasmodium falciparum digestive vacuole in chloroquine resistance. *Biochem Pharmacol*, **56**(3):313–320, 1998.
- F Sanger, GM Air, BG Barrell, NL Brown, AR Coulson, CA Fiddes, CA Hutchison, PM Slocombe und M Smith. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, **265**(5596):687–695, 1977.
- D Schellenberg, C Menendez, E Kahigwa, J Aponte, J Vidal, M Tanner, H Mshinda und P Alonso. Intermittent treatment for malaria and anaemia control at time of routine vaccinations in Tanzanian infants: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*, **357**(9267):1471–1477, 2001.
- A Schwenke, C Brandts, J Philipps, S Winkler, WH Wernsdorfer und PG Kremsner. Declining chloroquine resistance of Plasmodium falciparum in Lambaréné, Gabon from 1992 to 1998. *Wien Klin Wochenschr*, **113**(1-2):63–64, 2001.
- ABS Sidhu, D Verdier-Pinard und DA Fidock. Chloroquine resistance in Plasmodium falciparum malaria parasites conferred by pfcrt mutations. *Science*, **298**(5591):210–213, 2002.
- AFG Slater, WJ Swiggard, BR Orton, WD Flitter, DE Goldberg, A Cerami und GB Henderson. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**(2):325–329, 1991.
- JD Smith, CE Chitnis, AG Craig, DJ Roberts, DE Hudson-Taylor, DS Peterson, R Pinches, CI Newbold und LH Miller. Switches in expression of Plasmodium falciparum var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell*, **82**(1):101–110, 1995.
- JA Smythe, RL Coppel, KP Day, RK Martin, AM Oduola, DJ Kemp und RF Anders. Structural diversity in the Plasmodium falciparum merozoite surface antigen 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(5):1751–1755, 1991.
- XZ Su und TE Wellems. Toward a high-resolution Plasmodium falciparum linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. *Genomics*, **33**(3):430–444, 1996.
- XZ Su und JC Wootton. Genetic mapping in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol*, **53**(6):1573–1582, 2004.

- XZ Su, VM Heatwole, SP Wertheimer, F Guinet, JA Herrfeldt, DS Peterson, JA Ravetch und TE Wellems. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cell*, **82**(1):89–100, 1995.
- XZ Su, LA Kirkman, H Fujioka und TE Wellems. Complex polymorphisms in an 330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant P. falciparum in Southeast Asia and Africa. *Cell*, **91**(5):593–603, 1997.
- XZ Su, MT Ferdig, Y Huang, CQ Huynh, A Liu, J You, JC Wootton und TE Wellems. A genetic map and recombination parameters of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Science*, **286**(5443):1351–1353, 1999.
- XZ Su, K Hayton und TE Wellems. Genetic linkage and association analyses for trait mapping in Plasmodium falciparum. *Nat Rev Genet*, **8**(7):497–506, 2007.
- DJ Jr. Sullivan, IY Gluzman, DG Russell und DE Goldberg. On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(21):11865–11870, 1996.
- HM Taylor, SA Kyes und CI Newbold. Var gene diversity in Plasmodium falciparum is generated by frequent recombination events. *Mol Biochem Parasitol*, **110**(2):391–397, 2000.
- EA Temu, I Kimani, N Tuno, H Kawada, JN Minjas und M Takagi. Monitoring chloroquine resistance using Plasmodium falciparum parasites isolated from wild mosquitoes in Tanzania. *Am J Trop Med Hyg*, **75**(6):1182–1187, 2006.
- NV Thanh, AF Cowman, D Hipgrave, TB Kim, BQ Phuc, LD Cong und BA Biggs. Assessment of susceptibility of Plasmodium falciparum to chloroquine, quinine, mefloquine, sulfadoxine-pyrimethamine and artemisinin in southern Viet Nam. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **95**(5):513–517, 2001.
- W Trager und JB Jensen. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, **193**(4254):673–675, 1976.
- JF Trape. The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am J Trop Med Hyg*, **64**(1-2 Suppl):12–17, 2001.
- S Vinayak, P Mitra und YD Sharma. Wide variation in microsatellite sequences within each Pfert mutant haplotype. *Mol Biochem Parasitol*, **147**(1):101–108, 2006.
- X Wang, J Mu, G Li, P Chen, X Guo, L Fu, L Chen, X Su und TE Wellems. Decreased prevalence of the Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter 76T marker associated with cessation of chloroquine use against P. falciparum malaria in Hainan, People's Republic of China. *Am J Trop Med Hyg*, **72**(4):410–414, 2005.

- TE Wellems und CV Plowe. Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis*, **184**(6): 770–776, 2001.
- TE Wellems, LJ Panton, IY Gluzman, VE do Rosario, RW Gwadz, A Walker-Jonah und DJ Krogstad. Chloroquine resistance not linked to mdr-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. *Nature*, **345**(6272):253–255, 1990.
- TE Wellems, A Walker-Jonah und LJ Panton. Genetic mapping of the chloroquine-resistance locus on *Plasmodium falciparum* chromosome 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(8):3382–3386, 1991.
- WHO. *World Health Organization: Global Anti-Malarial Drug Policies database*, 2008a. URL <http://www.who.int/malaria>.
- WHO. *World Health Organization: Guidelines for the treatment of malaria*, 2006.
- WHO. *World Health Organization: World Malaria Report*, 2008b.
- E Wildling, S Winkler, PG Kremsner, C Brandts, L Jenne und WH Wernsdorfer. Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogooué, Gabon. *Trop Med Parasitol*, **46**(2):77–82, 1995.
- S Winkler, C Brandts, WH Wernsdorfer, W Graninger, U Bienzle und PG Kremsner. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* in Gabon. Activity correlations between various antimalarials. *Trop Med Parasitol*, **45**(3):214–218, 1994.
- JC Wootton, X Feng, MT Ferdig, RA Cooper, J Mu, DI Baruch, AJ Magill und XZ Su. Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, **418**(6895):320–323, 2002.
- A Yayon. The antimalarial mode of action of chloroquine. *Rev Clin Basic Pharm*, **5**(1-2):99–139, 1985.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt

Herrn Professor Dr. Peter G. Kremsner für die freundliche Überlassung des Themas und erfahrene Leitung bei schwierigen Fragestellungen,

Herrn Dr. Matthias Frank für die ausgezeichnete Betreuung, die methodische Einarbeitung und die stete Diskussionsbereitschaft

Herrn Professor Dr. Klaus Dietz für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung,

Silvelia Grummes und Andrea Weierich für die Hilfe beim Sequenzieren,

Corinna Enderes für die nette Bench-Nachbarschaft und gelegentliches Zell-Sitting, allen Laborkollegen und -kolleginnen für die Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre,

Pembe Mayengue für das zu Verfügung Stellen der Proben von 1995/96 und 2002, allen Mitarbeitern am Albert-Schweitzer-Hospital in Lambaréné, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, insbesondere Bertrand Lell, Martin Grobusch, Francine Ntoumi und Christian Supan,

allen Kindern aus Lambaréné für die Teilnahme an den verschiedenen Studien,

dem IZKF-Promotionskolleg Molekulare Medizin für die finanzielle Förderung und inhaltliche Begleitung dieser Arbeit,

Gregor Giesen für die Einführung in \LaTeX sowie besonders für den seelischen und moralischen Beistand,

zu guter Letzt meinen Eltern Gudrun und Claus Lehnern, die mir dieses Studium ermöglicht und mich stets in allen meinen Vorhaben unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Nicola Nadine Lehners
Geburtsdatum	08.10.1983
Geburtsort	Hannover
Eltern	Dr. Gudrun Lehners, Gymnasiallehrerin Dr. Claus Lehners, Diplom-Mathematiker

Schulischer Werdegang

1990	bis	1994	Sommerhofen-Grundschule Sindelfingen Grundschule Darmsheim
1994	bis	2003	Goldberggymnasium Sindelfingen Abiturnote „sehr gut“ (1,0)

Studium

10/2003			Beginn des Medizinstudiums an der Universität Tübingen
09/2005			1. Ärztliche Prüfung, Note „sehr gut“
01/2007	bis	12/2007	Stipendiatin des IZKF-Promotionskollegs Molekulare Medizin
03/2007	bis	10/2007	Forschungssemester am Institut für Tropenmedizin im Rahmen der Promotion
07/2008	bis	12/2008	Auslandssemester an der PUCRS Porto Alegre, Brasilien
02/2009	bis	01/2010	Praktisches Jahr Innere Medizin an der Universität Tübingen und der University of Leicester, UK Chirurgie an der University of Warwick, UK Pädiatrie an der Universität Tübingen
24.06.2010			2. Ärztliche Prüfung, Note „sehr gut“
04/2004	bis	06/2010	Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes